



T.C.
NİĞDE ÖMER HALİSDEMİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL GENETİK MÜHENDİSLİĞİ

RNA METABOLİZMA REGÜLATÖRÜ CPL1'İN TUZ STRES
TOLERANSINDAKİ ROLÜNÜN *ARABIDOPSIS THALIANA*'DA
İNCELENMESİ

BUASIMUHAN ABUDUREYIMU

Ağustos 2019

T.C.
NİĞDE ÖMER HALİSDEMİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL GENETİK MÜHENDİSLİĞİ

RNA METABOLİZMA REGÜLATÖRÜ CPL1'İN TUZ STRES
TOLERANSINDAKİ ROLÜNÜN *ARABIDOPSIS THALIANA*'DA
İNCELENMESİ

BUASIMUHAN ABUDUREYIMU

Yüksek Lisans Tezi

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Emre AKSOY

Ağustos 2019

Buasimuhan ABUDUREYIMU tarafından **Dr. Öğr. Üyesi Emre AKSOY** danışmanlığında hazırlanan “**RNA Metabolizma Regülatörü CPL1’in Tuz Stres Toleransındaki Rolünün Arabidopsis thaliana’da İncelenmesi**” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Tarımsal Genetik Mühendisliği** Ana Bilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.



Başkan : Dr. Öğr. Üyesi Emre AKSOY, Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi



Üye : Dr. Öğr. Üyesi Allah BAKHSH, Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi



Üye : Dr. Öğr. Üyesi Oya AKÇA, Harran Üniversitesi

ONAY:

Bu tez, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca belirlenmiş olan yukarıdaki jüri üyeleri tarafından/....../20.... tarihinde uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu’nun/....../20.... tarih ve sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

...../...../20...

Doç. Dr. Murat BARUT
MÜDÜR

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Buasimuhan ABUDUREYIMU



ÖZET

RNA METABOLİZMA REGÜLATÖRÜ CPL1'İN TUZ STRES TOLERANSINDAKİ ROLÜNÜN ARABIDOPSIS THALIANA'DA İNCELENMESİ

ABUDUREYIMU, Buasimuhan
Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Tarımsal Genetik Mühendisliği Ana Bilim Dalı

Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Emre AKSOY

Ağustos 2019, 143 sayfa

Tuz stresine maruz kalan bitkilerde pek çok problem gözlenmektedir. Bitki tuz tolerans mekanizmasında stres genlerinin transkripsiyonunu kontrol eden ko-transkripsiyon faktörlerinin görevleri henüz tam anlaşılamamıştır. Bunlardan bir tanesi C uç bölgesi (CTD) Phosphatase-Like1 (CPL1) olarak bilinen fosfatazdır. Bu çalışmada model bitki olan glikofit *Arabidopsis thaliana*'da *cpl1-6* mutanı ile tuz tolerans mekanizmasından sorumlu genlerin mutantlarının (*sos1-1*, *sos3-1* ve *hkt1-1*) genetik olarak birbirleriyle olan etkileşimleri incelenmiştir. Hidroponik koşullarda 2 hafta yetiştirilen bitkilere bir hafta 50 mM sodyum klorür uygulanması sonucunda *sos1-1*, *sos3-1* ve *hkt1-1* mutantlarının Col-0 yabanıl tipe kıyasla daha hassas olduğu; *cpl1-6*, *sos1-1hkt1-1*, *sos3-1hkt1-1*, *cpl1-6sos3-1* ve *hkt1-1cpl1-6* mutantlarının ise daha dayanıklı olduğu belirlenmiştir. Homozigot *sos1-1cpl1-6* bitkileri gelişim süreçlerini tamamlayamadan ölmüşlerdir. Tuz toleransı ile alakalı genlerin ifade seviyeleri genel olarak *cpl1-6*, *cpl1-6sos3-1* ve *hkt1-1cpl1-6* mutantlarında tuz stresi uygulanmasıyla artış göstermiştir. Bu sonuçlar ışığında, CPL1'in SOS (Salt Overly Sensitive) yolağı ile genetik etkileşime girerek bitki gelişimi ve tuz toleransında görev aldığı ve yolaktaki genleri negatif olarak etkilediği ispatlanmıştır.

Anahtar Sözcükler: CPL1, RNA metabolizma regülatörü, transkripsiyon, tuz stresi, SOS tolerans mekanizması

SUMMARY

ANALYSIS OF THE ROLE OF RNA METABOLISM REGULATOR CPL1 IN SALTINITY STRESS TOLERANCE IN *ARABIDOPSIS THALIANA*

ABUDUREYIMU, Buasimuhan
Niğde Ömer Halisdemir University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Agricultural Genetic Engineering

Supervisor : Asst. Prof. Dr. Emre AKSOY

August 2019, 143 pages

Many problems are observed in plants exposed to salt stress. The roles of co-transcription factors that control the transcription of stress-related genes in plant salt tolerance have not been fully understood yet. C-terminal domain (CTD) Phosphatase-Like1 (CPL1) is one of the co-transcription factors ensuring the continuity of the transcription cycle. In this study, the genetic interaction of *cpl1-6* mutant and mutants of the genes responsible for the salt tolerance mechanism (*sos1-1*, *sos3-1* and *hkt1-1*) were investigated in glycophyte *Arabidopsis thaliana*. The plants grown in hydroponics for 2 weeks were treated with 50 mM sodium chloride for one week, so that the *sos1-1*, *sos3-1* and *hkt1-1* mutants were more sensitive than the Col-0 wild type; *cpl1-6*, *sos1-1hkt1-1*, *sos3-1hkt1-1*, *cpl1-6sos3-1* and *hkt1-1cpl1-6* mutants were more tolerant. Homozygous *sos1-1cpl1-6* plants died before they could complete their life cycles. Expression levels of salt-related genes generally increased under salt stress in *cpl1-6*, *cpl1-6sos3-1* and *hkt1-1cpl1-6* mutants. As a result, it has been proved that CPL1 is involved in plant growth and salt tolerance by genetically interacting with SOS (Salt Overly Sensitive) pathway and negatively affecting genes in the pathway.

Keywords: CPL1, RNA metabolism regulator, transcription, salt stress, SOS tolerance mechanism

ÖN SÖZ

Yüksek lisans sırasında ve bu tez çalışmalarımın yürütülmesi ve değerlendirilmesinde bilgi ve yardımlarını esirgemeyen, laboratuvar çalışmaları ve ekipmanları ile bana çalışma imkanı sağlayan, her türlü zorluklarda yardım ve desteklerde bulunan değerli danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Emre AKSOY'ya sonsuz teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarında yardımını esirgemeyen sayın Dr. Öğr. Üyesi Allah BAKHSH'a ve bu tez çalışmasında jüri görevi yapan sayın Dr. Öğr. Üyesi Oya AKÇA'ya teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmasında yardıma bulunan değerli arkadaşlarım Amir MAQBOOL, Bayram Ali YERLİKAYA, Sefa AYTEN, Dilan ATEŞ ve Ilhom RAHAMKULOV'a teşekkür ederim.

Tez çalışmaları ve yazımı esnasında manevi destek olan değerli arkadaşlarım Farhat KHALİLY ve Rowida KHALİLY'ya ve ev arkadaşım Yipaer YILHAMU'ya teşekkür ederim.

Lüksek lisans sırasında yanımda olamasa da maddi-manevi desteği ve sevgisiyle bana güç veren ve benim günlere gelmemde büyük katkıları olan annem Ayşe KURBAN'a, babam Abdurehim ABDURAHMAN'a ve manevi desteği ile benim gönül rahatlığıyla eğitim alabilmemi sağlayan tüm kardeşlerime sonsuz şükranlarımı iletirim.

Bu çalışmaya GTB 2018/07 numaralı BAGEP projesi ile finansal destek sağlayan Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine ve çalışanları ile iki yıl süresince eğitim bursu veren Ayhan Şahenk Vakfı'na katkılarından dolayı teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
SUMMARY	iv
ÖN SÖZ	v
İÇİNDEKİLER	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
SİMGE VE KISALTMALAR	viii
BÖLÜM I GİRİŞ	1
BÖLÜM II LİTERATÜR ÖZETİ.....	3
2.1 Tuz Stresi	3
2.2 Tuz Stresinin Bitkilere Vermiş Olduğu Zararlar	4
2.2.1 Tuzluluğun tohum çimlenme ve bitki büyümesine olan etkisi	4
2.2.2 Tuzluluğun su basıncı üzerine olan etkisi	6
2.2.3 Tuzluluğun iyon düzeylerine olan etkisi	6
2.2.4 Tuzluluğun karbonhidratlar ve proteinler üzerine etkisi	7
2.2.5 Tuzluluğun kloroplast yapısı ve fotosentetik pigmentler üzerine etkisi	8
2.2.6 Tuzluluğun fotosentez üzerine etkisi.....	9
2.2.7 Tuzluluğun hücre zarı üzerine etkisi	10
2.2.8 Tuzluluğun reaktif oksijen türleri, antioksidanlar ve antioksidatif enzimler üzerine etkisi	11
2.3 Tuz Toleransı	12
2.3.1 İyon regülasyonu	12
2.3.1.1 SOS yolağının düzenleyici rolü	13
2.3.1.2 K ⁺ taşıyıcılarının düzenleyici rolü	14
2.3.2 Tuz toleransında antioksidatif enzimlerin aktivitesi	15
2.3.3 Tuz toleransında ozmolitlerin birikimi ve ozmotik koruma.....	15
2.3.4 Tuz toleransında bitki hormonlarının indüksiyonu	16
2.4 Tuz Toleransında Önemi Rolü Olan Genler ve Transkripsiyon Faktörleri	17
2.5 Abiyotik Stres Altında RNA Metabolizma Regülatörü CPL1'in Önemi	19
2.6 Tez Çalışmasının Önemi ve Amacı	21

BÖLÜM III MATERYAL VE METOT.....	23
3.1 Çifte Mutantların Elde Edilmesi	23
3.1.1 Bitki genotipleri ve genel büyüme koşulları	23
3.1.2 Genetik çaprazlamalar	24
3.1.3 F ₁ , F ₂ ve F ₃ generasyonlarının PCR ile taranması ve doğrulanması	25
3.1.3.1 Genomik DNA izolasyonu	25
3.1.3.2 PCR ve jel elektroforez	26
3.1.3.3 cpl1-6sos1-1 homozigot bitkisinin elde edilmesi.....	29
3.1.3.4 cpl1-6sos3-1 homozigot bitkisinin elde edilmesi.....	30
3.1.3.5 hkt1-1cpl1-6 homozigot bitkisinin elde edilmesi.....	31
3.2 Bitkilerin Büyütülmesi ve Stres Uygulaması.....	32
3.2.1 Genel büyütme koşulları.....	32
3.2.1.1 Hoagland çözeltilisinin hazırlanması.....	33
3.2.1.2 Hidroponik sistem.....	34
3.2.2 Stres uygulaması.....	37
3.3 Fizyolojik Ölçümler	38
3.3.1 Kök uzunlukları	38
3.3.2 Kök ve gövde yaş ve kuru ağırlıkları.....	39
3.3.3 SPAD değeri (yaprak klorofil indeksi)	39
3.3.4 Yaprak sıcaklığı (°C).....	39
3.3.5 Kök ve yaprak taze ve kuru ağırlığı ile oransal su içeriği	40
3.4 Biyokimyasal Analizler	40
3.4.1 Klorofil miktar tayini	40
3.4.2 Malondialdehit (MDA) tayini.....	41
3.4.2 Element seviyelerinin tayini	42
3.5 Bitkilerin Kök Dokularından Toplam RNA İzolasyonu ve Gen İfade Seviye Tayinleri.....	42
3.5.1 Toplam RNA izolasyonu	42
3.5.2 Toplam RNA örneklerine DNaz I uygulanması	43
3.5.3 Birinci zincir cDNA sentezi.....	44
3.5.4 Gerçek zamanlı kantitatif PCR ile gen ifadesinin tayini	44
3.6 İstatistiksel Analizler	45
BÖLÜM IV BULGULAR.....	46
4.1 Çifte Mutantların Elde Edilmesi	46

4.1.1 Homozigot cpl1-6sos1-1 çifte mutantının geliştirilmesi	47
4.1.1.1 F ₁ generasyonunda PCR ile melez bitkilerin seçimi.....	47
4.1.1.2 Homozigot F ₂ cpl1-6sos1-1 bitkilerinin belirlenmesi.....	48
4.1.1.3 Homozigot cpl1-6sos1-1 bitkisinin morfolojik yapısı.....	51
4.1.1.4 Homozigot cpl1-6sos1-1 bitki morfolojik yapısının doğrulanması.....	53
4.1.1.5 Homozigot cpl1-6sos1-1 bitkisinin tuz stresine olan tepkisi.....	56
4.1.2 Homozigot cpl1-6sos3-1 çifte mutantının geliştirilmesi	60
4.1.2.1 F ₁ generasyonunda PCR ile melez bitkilerin seçimi.....	60
4.1.2.2 Homozigot F ₂ cpl1-6sos3-1 bitkilerinin belirlenmesi.....	60
4.1.2.3 F ₃ generasyonunda homozigot cpl1-6sos3-1 bitkisinin doğrulanması	63
4.1.3 Homozigot hkt1-1cpl1-6 çifte mutantının geliştirilmesi	65
4.1.3.1 F ₁ generasyonunda PCR ile melez bitkilerin seçimi.....	65
4.1.3.2 Homozigot F ₂ hkt1-1cpl1-6 bitkilerinin belirlenmesi.....	66
4.1.3.3 F ₃ generasyonunda homozigot cpl1-6sos3-1 bitkisinin doğrulanması	69
4.2 Fizyolojik Ölçümler	70
4.2.1 Kontrol ve stres gurubundaki bitkilerin morfolojik görüntüsü.....	71
4.2.2 Kök uzunlukları	72
4.2.2.1 Besiyeri ortamında tuzun bitki kök uzunluklarına olan etkisi	72
4.2.2.2 Hidroponik ortamda tuzun bitki kök uzunluklarına olan etkisi	76
4.2.3 Yaprak ve kök dokularının yaş ve kuru ağırlığı	77
4.2.3.1 Yaprak yaş ağırlığı.....	78
4.2.3.2 Kök yaş ağırlığı.....	80
4.2.3.3 Yaprak kuru ağırlığı.....	81
4.2.3.4 Kök kuru ağırlığı.....	83
4.2.4 SPAD değeri (yaprak klorofil indeksi).....	85
4.2.5 Yaprak sıcaklığı (°C).....	87
4.2.6 Yaprak ve kök oransal su içeriği	88
4.3 Biyokimyasal Analizler	91
4.3.1 Klorofil miktar tayini	91
4.3.2 Malondialdehit (MDA) ölçümü	93
4.3.3 Element seviyelerinin tayini	95
4.4 RNA İzolasyonu ve Gen İfade Seviye Tayini	98
4.4.1 RNA izolasyonu.....	98
4.4.2 Gen ifade seviye tayini	99

BÖLÜM V TARTIŞMA.....	108
5.1 CPL1 Proteini Tuz Stresi ile İlgili Genleri Negatif Yönden Etkiler.....	108
5.2 Tuz Stresi Altında CPL1 Proteini Na ⁺ 'un Kök Kofuluna Alımını ve Ksilemden Çekilmesini Kontrol Eder	111
5.3 CPL1, Farklı Hücrel ve Biyokimyasal İşlemlerde Yer Alan Çok Fonksiyonlu Bir Fosfatazdır	112
BÖLÜM VI SONUÇLAR	114
KAYNAKLAR	116
EKLER.....	134
ÖZ GEÇMİŞ	142
TEZ ÇALIŞMASINDAN ÜRETİLEN ESERLER	143



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Tuz stresi altında indüklenen bazı genler ve fonksiyonları	19
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan mutantlarla ilgili genel bilgiler	23
Çizelge 3.2. Çaprazlamada kullanılan bitki genotip sayıları	25
Çizelge 3.4. DNA izolasyon tamponu	26
Çizelge 3.5. PCR karışım içeriği	27
Çizelge 3.3. Mutantların taranması için kullanılan primer dizileri ve PCR ampikon uzunlukları	28
Çizelge 3.6. Mutant taraması için kullanılan PCR programları.....	28
Çizelge 3.7. 1/4 x Hoagland besin çözeltisi içeriği.....	34
Çizelge 3.8. Hoagland besin çözeltisinin hazırlanmasında kullanılan minör içeriği.....	34
Çizelge 3.9. RT-qPCR çalışmalarında kullanılan genler ve primer sekansları	45
Çizelge 4.1. PCR sonunda elde edilen bitki çeşitleri ve sayısı	56
Çizelge 4.2. <i>cpl1-6</i> (anne) X <i>sos1-1</i> (baba) F ₂ bitkisinden yapılan PCR sonunda elde edilen bitki genotipleri ve sayıları	59
Çizelge 4.3. Col-0, <i>sos1-1</i> , <i>sos3-1</i> , <i>hkt1-1</i> , <i>cpl1-6</i> , <i>hkt1-1cpl1-6</i> ve <i>cpl1-6sos3-1</i> genotiplerinin <i>in vitro</i> NaCl uygulamasına vermiş oldukları kök uzunluk tepkileri	75

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Tuz stresi altında bitkilerin büyüme tepkisi şeması.....	5
Şekil 2.2. SOS yolağının düzenleyici rolü	14
Şekil 2.3. <i>cpl1-6</i> mutantında <i>RD29A::LUC</i> 'ın hiperekspresyonu	21
Şekil 3.1. F ₂ <i>cpl1-6sos1-1</i> çifte mutant bitkilerinin morfolojisi	30
Şekil 3.2. Hidroponik sistem şematığı	35
Şekil 3.3. Hidroponik sistemin genel görünümü	36
Şekil 3.4. Hidroponik sisteminde bitkilerin büyüme aşamaları.....	37
Şekil 4.1. 28 adet F ₁ bitkisinden elde edilen genomik DNAların yapılan <i>sos1-1</i> PCR sonuçları.....	47
Şekil 4.2. 12 adet F ₂ bitkisinden elde edilen genomik DNAlardan yapılan <i>sos1-1</i> PCR sonuçları.....	48
Şekil 4.3. 12 adet F ₂ bitkisinden elde edilen genomik DNAlardan yapılan <i>cpl1-6</i> PCR sonuçları.....	49
Şekil 4.4. 74 adet F ₂ bitkisinden elde edilen genomik DNAlardan yapılan <i>sos1-1</i> PCR sonuçları.....	50
Şekil 4.5. <i>sos1-1</i> PCR'ında homozigot olduğu belirlenen 15 adet F ₂ bitkisinden elde edilen genomik DNAlardan yapılan <i>cpl1-6</i> PCR sonuçları.....	51
Şekil 4.6. <i>SOS1</i> ile <i>CPL1</i> 'in genetik etkileşiminin bitki gelişimi üzerine etkisi	52
Şekil 4.7. Homozigot <i>cpl1-6sos1-1</i> mutantının Col-0 ile morfolojik karşılaştırılması ..	52
Şekil 4.8. Col-0 ile Homozigot <i>cpl1-6sos1-1</i> mutantının çiçek morfolojisinin karşılaştırılması.....	53
Şekil 4.9. Örnek olarak 92 adet F ₂ bitkisinden elde edilen genomik DNAlardan yapılan <i>sos1-1</i> PCR sonuçları.....	54
Şekil 4.10. Örnek olarak 92 adet F ₂ bitkisinden elde edilen genomik DNAlardan yapılan <i>cpl1-6</i> yabancı tip PCR sonuçları	55
Şekil 4.11. Örnek olarak 92 adet F ₂ bitkisinden elde edilen genomik DNAlardan yapılan <i>cpl1-6</i> T-DNA ekleme PCR sonuçları	55
Şekil 4.12. <i>cpl1-6sos1-1</i> mutantının 4 gün 10 mM NaCl uygulaması sonucundaki morfolojik görüntüsü	57

Şekil 4.13. 10 mM NaCl altında gelişemeyen 2 adet F ₂ bitkisinden elde edilen genomik DNAlardan yapılan <i>cpl1-6</i> PCR sonuçları.....	57
Şekil 4.14. 10 mM NaCl altında gelişemeyen 2 adet F ₂ bitkisinden elde edilen genomik DNAlardan yapılan <i>sos1-1</i> PCR sonuçları	57
Şekil 4.15. <i>cpl1-6</i> (anne) X <i>sos1-1</i> (baba) F ₂ bitkilerin 10 mM NaCl uygulaması sonucundaki kök uzunlukları	59
Şekil 4.16. 17 adet F ₁ bitkisinden elde edilen genomik DNAlardan yapılan <i>hkt1-1</i> T DNA PCR sonuçları.....	60
Şekil 4.17. <i>cpl1-6</i> (anne) ile <i>sos3-1hkt1-1</i> (baba) melezlemesinden alınan 118 adet F ₂ bitkisinden elde edilen genomik DNAlardan yapılan <i>hkt1-1</i> T-DNA PCR sonuçları.....	61
Şekil 4.18. <i>hkt1-1</i> T-DNA PCR'ında negatif olarak belirlenen F ₂ bitkilerinden elde edilen genomik DNAlardan yapılan <i>cpl1-6</i> ve <i>sos3-1</i> PCR sonuçları.....	62
Şekil 4.19. Homozigot F ₂ <i>cpl1-6sos3-1</i> çifte mutantının moleküler doğrulanması.....	63
Şekil 4.20. F ₂ generasyonunda homozigot <i>cpl1-6sos3-1</i> olduğu belirlenen bitkilerin F ₃ generasyonunda doğrulanması için yapılan <i>cpl1-6</i> PCR sonuçları	64
Şekil 4.21. F ₂ generasyonunda homozigot <i>cpl1-6sos3-1</i> olduğu belirlenen bitkilerin F ₃ generasyonunda doğrulanması için yapılan <i>sos3-1</i> PCR sonuçları	64
Şekil 4.22. F ₂ generasyonunda homozigot <i>cpl1-6sos3-1</i> olduğu belirlenen bitkilerin F ₃ generasyonunda doğrulanması için yapılan <i>hkt1-1</i> PCR sonuçları	65
Şekil 4.23. 5 adet F ₁ bitkisinden elde edilen genomik DNAlardan yapılan <i>cpl1-6</i> PCR sonuçları.....	66
Şekil 4.24. Örnek olarak <i>sos1-1hkt1-1</i> (anne) ile <i>cpl1-6</i> (baba) melezlemesinden elde edilen F ₂ bitkilerinden izole edilen DNA'dan yapılan <i>cpl1-6</i> PCR sonuçları.....	67
Şekil 4.25. Örnek olarak <i>sos1-1hkt1-1</i> (anne) ile <i>cpl1-6</i> (baba) melezlemesinden elde edilen F ₂ bitkilerinden izole edilen DNA'dan yapılan <i>hkt1-1</i> PCR sonuçları.....	67
Şekil 4.26. Örnek olarak <i>sos1-1hkt1-1</i> (anne) ile <i>cpl1-6</i> (baba) melezlemesinden elde edilen F ₂ bitkilerinden izole edilen DNA'dan yapılan <i>sos1-1</i> PCR sonuçları.....	68
Şekil 4.27. Homozigot F ₂ <i>hkt1-1cpl1-6</i> çifte mutantının moleküler doğrulanması.....	69

Şekil 4.28. F ₂ generasyonunda homozigot <i>hkt1-1cpl1-6</i> olduğu belirlenen bitkilerin F ₃ generasyonunda doğrulanması için yapılan <i>cpl1-6</i> , <i>hkt1-1</i> ve <i>sos1-1</i> PCR sonuçları.....	70
Şekil 4.29. kontrol ve tuz stresi grubundaki Col-0, <i>sos1-1</i> , <i>hkt1-1</i> , <i>sos3-1</i> , <i>cpl1-6</i> , <i>sos1-1hkt1-1</i> , <i>sos3-1hkt1-1</i> , <i>hkt1-1cpl1-6</i> ve <i>cpl1-6sos3-1</i> mutantlarının morfolojik görüntüsü	71
Şekil 4.30. Col-0, <i>sos1-1</i> , <i>sos3-1</i> , <i>hkt1-1</i> , <i>cpl1-6</i> , <i>hkt1-1cpl1-6</i> ve <i>cpl1-6sos3-1</i> genotiplerinin farklı NaCl konsantrasyonu içeren MS ortamında 5 gün stres uygulanması sonucundaki morfolojik görüntüsü.....	74
Şekil 4.31. Genotiplerin <i>in vitro</i> koşullarda NaCl uygulamasına vermiş oldukları kök uzunluk değişim oranları	75
Şekil 4.32. Genotiplerin tuz stresi altındaki kök uzunlukları	76
Şekil 4.33. Kök uzunluğu yüzde değişimi	77
Şekil 4.34. Genotiplerin tuz stresi altındaki yaprak yaş ağırlıkları.....	79
Şekil 4.35. Yaprak yaş ağırlığı yüzde değişimi	79
Şekil 4.36. Genotiplerin tuz stresi altındaki kök yaş ağırlıkları.....	80
Şekil 4.37. Kök yaş ağırlığı yüzde değişimi	81
Şekil 4.38. Genotiplerin tuz stresi altındaki yaprak kuru ağırlıkları.....	82
Şekil 4.39. Yaprak kuru ağırlığı yüzde değişimi	83
Şekil 4.40. Genotiplerin tuz stresi altındaki kök kuru ağırlıkları.....	84
Şekil 4.41. Kök kuru ağırlığı yüzde değişimi	84
Şekil 4.42. Genotiplerin tuz stresi altındaki yaprak klorofil indeksleri	86
Şekil 4.43. Yaprak klorofil indeksinin yüzde değişimi	86
Şekil 4.44. Genotiplerin tuz stresi altındaki yaprak sıcaklıkları	87
Şekil 4.45. Yaprak sıcaklığı yüzde değişimi.....	88
Şekil 4.46. Genotiplerin tuz stresi altındaki yaprak oransal su içerikleri	89
Şekil 4.47. Yaprak oransal su içeriği yüzde değişimi.....	89
Şekil 4.48. Genotiplerin tuz stresi altındaki kök oransal su içerikleri	90
Şekil 4.49. Kök oransal su içeriği yüzde değişimi.....	91
Şekil 4.50. Genotiplerin tuz stresi altındaki toplam klorofil miktarları. Büyük harfler, kontrol grubundaki genotipler arasındaki istatistiksel farkı;	92
Şekil 4.51. Toplam klorofil miktarı yüzde değişimi	92
Şekil 4.52. Genotiplerin tuz stresi altındaki MDA miktarları.....	94
Şekil 4.53. MDA miktarı yüzde değişimi	94

Şekil 4.54. Genotiplerin tuz stresi altındaki sodyum birikim miktarları	96
Şekil 4.55. Sodyum miktarları yüzde değişimi.....	97
Şekil 4.56. RNA kalitesini gösteren jel elektroforez sonuçları.....	99
Şekil 4.57. <i>SOS1</i> geninin ifade seviyesi	100
Şekil 4.58. <i>HKT1</i> geninin ifade seviyesi.....	100
Şekil 4.59. <i>SOS3</i> geninin ifade seviyesi	101
Şekil 4.60. <i>NHX1</i> geninin ifade seviyesi	102
Şekil 4.61. <i>RD29A</i> geninin ifade seviyesi.....	102
Şekil 4.62. <i>RD29B</i> genini ifade seviyesi.....	103
Şekil 4.63. <i>COR15A</i> 'in ifade seviyesi	104
Şekil 4.64. <i>ABI1</i> 'in ifade seviyesi.....	104
Şekil 4.65. <i>CPL1</i> 'in ifade seviyesi.....	105
Şekil 4.66. <i>DREB2A</i> 'in ifade seviyesi	106
Şekil 4.67. <i>DREB2B</i> 'in ifade seviyesi	106
Şekil 4.68. <i>AREB1</i> 'in ifade seviyesi	107

SİMGE VE KISALTMALAR

Simgeler	Açıklama
%	yüzde
μg	microgram
μl	mikrolitre
μM	mikromolar
$^{\circ}\text{C}$	santigrat derece
cm	santimetre
dk.	Dakika
g	gram
l	litre
m	metre
M	molar
mg	milligram
ml	mililitre
mm	milimetre
mM	milimolar
nm	nanometre
nM	nanomolar
sn.	Saniye
U/ μl	Ünite/miktolitire
V/cm	volt/santimetre
V/V	hacim/hacim
w/v	ağırlık/hacim

Kısaltmalar	Açıklama
ABA	Absisik asit
ABI	ABA Insensitive (ABA hassas)
bç	Baz çifti
Ca ²⁺	Kalsiyum

Cl ⁻	Klor
CPL1	CTD PHOSPHATASE-LIKE1 (CTD FOSFATAZ-BENZERİ1)
CTD	C-terminal domain (C uç bölgesi)
dNTP	Deoksinükleosid trifosfat
DREB	Dehydration responsive element-binding protein (Kuraklığa tepki elementine bağlanan protein)
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
HCl	Hidroklorik asit
K ⁺	Potasyum
LUC	LUCIFERASE
MDA	Malondialdehit
Na ⁺	Sodyum
NaCl	Sodyum klorür
PCR	Polymerase chain reaction (Polimeraz zincir reaksiyonu)
ROS	Reactive oxygen species (Reaktif oksijen türleri)
rpm	Dakikadaki devir sayısı
SDS	Sodyum dedosil sülfat
SOS	Salt Overly Sensitive (Tuza aşırı duyarlı)
vd.	Ve diğerleri

BÖLÜM I

GİRİŞ

Tuzluluk, artan insan nüfusu ile birlikte verimli tarımı tehlikeye atarak besin ürünlerinin üretimini önemli düzeyde kısıtlayan abiyotik streslerden biridir. Tuz stresine maruz kalan bitkilerde çeşitli gelişim süreçlerinin yanında morfolojik, hücresel, fizyolojik ve moleküler seviyede pek çok problemler gözlenmektedir. Bu durum, hücre genişlemesinin azalması ve sürgün gelişimin yavaşlamasına neden olarak ürün verimi ve kalitesini olumsuz yönden etkilemektedir. Dünyada 1128 milyon hektar alan tuzluluk tehdidi altındadır ve bu alan dünyanın tüm karasal alanlarının %7'sinden fazladır. Tuzluluk, bitkiler üzerindeki doğrudan etkisini ozmotik ve iyon stresi oluşturarak gösterirken, dolaylı etkisini bu stres faktörleri sonucu bitkide meydana gelen yapısal bozulmalar ve toksik bileşiklerin sentezlenmesi ile gösterir. Sodyum klorürün (NaCl) sebep olduğu olumsuz etkiler; DNA, protein, klorofil ve zar fonksiyonuna zarar veren reaktif oksijen türlerinin (ROS) sentezi; fotosentezin inhibisyonu; metabolik toksisite; K⁺ alımının engellenmesi ve hücre ölümü olarak sayılabilir. Bu nedenle bitki tuz tolerans mekanizmasının ve sinyal taşınma yöntemlerinin anlaşılması ve buradan yola çıkarak tuza dayanıklı bitkilerin geliştirilmesi son derece önemlidir.

Tuz stresine maruz kalan bitkilerde farklı birçok tolerans mekanizması gelişmiştir. Bunlardan en önemlisi tuza aşırı duyarlı (SOS - Salt Overly Sensitive) stres sinyal yolağıdır. SOS yolağının iyon homeostazında ve tuz toleransında çok önemli bir role sahip olduğunu gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda SOS yolağında yer alan SOS1, SOS2 ve SOS3 proteinlerini kodlayan genlerde oluşturulan mutasyonların bitkiyi tuza karşı aşırı hassas hale getirdiği, bu genlerin yüksek seviyede ifade edilmesiyle de bitkilerin tuz stresine dayanıklı hale getirilebildiği gösterilmiştir.

Bitkiler, tuzun etkilerinden sakınmasına rağmen tuzlu habitatlarda yetişebilirler ve bu bitkilerin tuzluluğa karşı geliştirdikleri iyon regülasyonu, SOS tolerans mekanizması, gen ekspresyonunda meydana gelen değişiklikler ve transkripsiyon faktörlerin regülasyonu ile gerçekleştirirler. Tuzluluğa karşı bu tolerans mekanizmalarını sağlayan moleküler cevapların sinyal iletim yolları ile çeşitli genlerin aktivasyonu ve /veya inaktivasyonu oluşur ve bu moleküler cevapların sonucunda bitkilerde tuz

regülasyonunun korunması sağlanır. Son yıllarda tuz stresinin glikofitlerdeki moleküler mekanizmasının anlaşılması amacıyla yoğun çalışmalar yapılmış olsa da SOS yolağı ile ilişkili ko-transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel kontrol mekanizmaları henüz tam anlamıyla bilinmemektedir.

Bitki tuz tolerans mekanizmasında transkripsiyonu kontrol eden ko-transkripsiyon faktörleri bulunmakta ve bunlar hücre içinde belli başlı proteinlerin sentezlenmesini kontrol etmektedir. Bunlardan bir tanesi C uç bölgesi (CTD) FOSFATAZ-BENZERİ1 (CPL1 – CTD PHOSPHATASE-LIKE1) olarak bilinen ve RNA Polymeraz II (RNAPII) holoenziminin en büyük parçasının CTD bölgesini defosfatlayarak transkripsiyon döngüsünün devamlılığını sağlayan fosfatazdır. CPL1'in tuz stres koşullarında sinyal iletimini durdurarak bitkilerin tuz stresine olan tepkilerini negatif yönden etkilediği tahmin edilmektedir. Yapılan çalışmalara göre *cpl1* mutant bitkisinde strese duyarlı olan *RD29A* geninin ifade seviyesinin artış gösterdiği ve mutant bitkinin tuz stresi altında kontrol bitkilerine oranla daha iyi büyüebildiği gösterilmiştir. Bu nedenle, CPL1'in tuz tolerans mekanizmasında önemli rol oynayan SOS1, SOS3 ve HKT1 ile olan genetik etkileşimi ve bu etkileşimin bitki tuz stresi toleransındaki etkilerinin anlaşılabilmesi yüksek önem taşımaktadır.

Bu çalışmada, RNA metabolizma regülatörü olan CPL1'in tuz stres tolerans yolağı ile olan genetik etkileşimi ve bu etkileşim sonucunda bitkilerin tolerans mekanizmasındaki fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler değişimler ortaya çıkartılmıştır. CPL1'in tuz stres toleransındaki rolünün ortaya çıkartılması ve bu tolerans mekanizmasının kontrolünde RNA metabolizma regülatörü CPL1'in görevlerinin anlaşılması açısından bir ilk olmuştur. Bu sayede, CPL1'in SOS yolağı ve altındaki stres hedef genlerini nasıl etkilediği keşfedilmiştir. Bu çalışmadan elde edilen veriler glikofitlerin tuza dayanma mekanizmalarında RNA metabolizmasının etkilerinin anlaşılabilmesi açısından büyük önem arz etmekte ve tuza dayanıklı tarla bitkilerinin geliştirilmesine büyük katkı sağlayacağı tahmin edilmektedir.

BÖLÜM II

LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Tuz Stresi

Tuzluluk, bitki büyümesi ve gelişmesini sınırlandırarak besin üretimini kısıtlayan önemli abiyotik stres faktörlerinden biridir. Tuzluluğun oluşma sebepleri primer (doğal) ve sekonder tuzluluk olarak iki gruba ayrılabilir. Primer tuzluluk, tuz bataklıkları, tuz gölleri, gelgit bataklıkları gibi doğal tuz olarak ortaya çıkmakta, sekonder tuzluluk ise insan faaliyetlerinden kaynaklanır. Primer tuzluluk, tuz deposu okyanuslar, ana kayaların ayrışması ve iklimsel değişimler nedeniyle; Sekonder tuzluluk ise tarımsal alanlarda yoğun sulama, çeşitli tuzlar bakımından zengin yer altı suyu seviyesinin toprak yüzeyine kadar yükselmesi, aşırı otlatma, bir bölgenin doğal vejetasyonunu yok ederek tarım arazilerinin açılması ve toprakların tuzluluğa sebep olan kimyasallarla kontaminasyonu nedeniyle meydana gelmektedir (Çulha vd., 2011). Tuzlu toprak, topraktaki çözünür tuz içeriğinin bitkilerin büyümesi ve gelişmesini önemli düzeyde etkileyen toprakları göstermekte ve araştırmalara göre toprak tuzluluğunun % 0.2 ~ 0.25'dan yüksek olması bitkilerin strese girmesine neden olmaktadır (Wang vd.,2009). Dünyadaki tuzdan etkilenmiş toprakların büyük kısmı yüksek miktarda sodyum (Na^+), kalsiyum (Ca^{2+}), magnezyum (Mg^{2+}) iyonları ile kirlenmiş durumdadır (Pessarakli vd., 1999).

Orta Doğu, Avustralya, Kuzey Afrika ve Rusya'da birçok alan yüksek oranda tuzdan etkilenmektedir. En son yapılan çalışmalara göre dünyada 1128 milyon hektar alan tuzluluk tehdidi altındadır (Mudgal vd., 2010). Kuru tarım yapılan 150 milyon hektarlık alanın 32 milyon hektarı çeşitli oranlarda ikincil tuzluluk tehdidi altındadır. 230 milyon hektar sulama yapılan alanın 45 milyon hektarı tuzdan etkilenmektedir. Türkiye'de ise topraklarının yaklaşık 1.5 milyon hektarı (bunun % 32.5'i sulanabilir alanları içermektedir) tuzluluk sorunuyla karşı karşıyadır (Çulha vd., 2011). Bu da artan insan nüfusu ile birlikte verimli tarımı tehlikeye atarak tarımsal alanda büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır.

2.2 Tuz Stresinin Bitkilere Vermiş Olduğu Zararlar

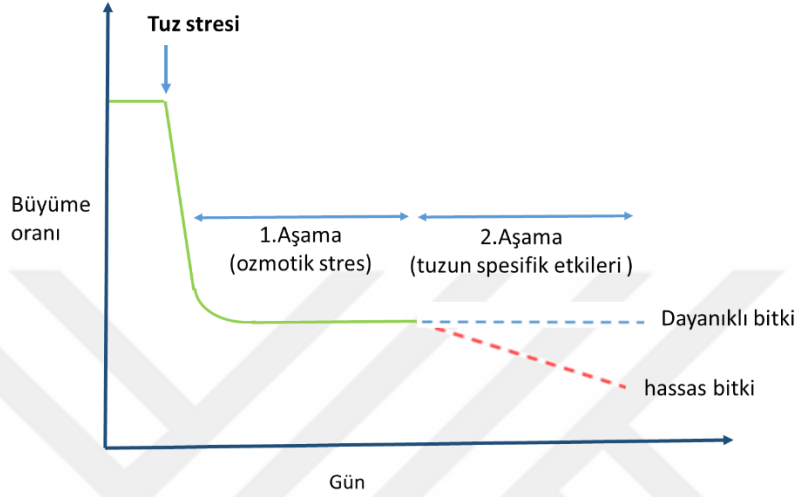
Bitkiler tuz stresi altında, kök rizosferinde tuz miktarının artmasından dolayı su potansiyeli azalır ve iyon dengesi bozulur, bu da ozmotik ve iyon stresine neden olarak bitkilerin büyümesini ve gelişmesini engeller (Yıldız vd., 2010). Tuz stresinden dolayı oluşan ozmotik stres bitkinin kullanılabilir su miktarının azalmasına neden olur, bu da “fizyolojik kuraklık” olarak adlandırılır (Tuteja, 2007). Stresin devam etmesi sonucunda ortaya çıkan iyon dengesizliği Na^+ ve Cl^- iyonlarının K^+ , Ca^{+2} ve nitrat (NO^{-3}) gibi gerekli besin elementleri ile rekabete girmesi nedeniyle bitkide besin eksikliği veya besin dengesizliğini meydana getirir. Mineral eksiklikleri bitkilerde hücre genişlemesinin azalması ve sürgün gelişiminin yavaşlamasına neden olur (Temel, 2014). Bitkilerin uzun süre tuz stresine maruz kalması sonucunda DNA, protein, klorofil ve zar fonksiyonuna zarar veren aktif oksijen türlerinin (AOT) sentezi; fotosentezin inhibisyonu; metabolik toksisite; K^+ alımının engellenmesi ve hücre ölümü ortaya çıkmaktadır (Cheeseman, 1988).

2.2.1 Tuzluluğun tohum çimlenme ve bitki büyümesine olan etkisi

Çimlenme, tohumun içindeki embriyonun uygun koşullarda gelişerek genç bir bitki oluşturmasıdır. Tohumun çimlenmesi için suyun emilmesi, enzim ve solunum faaliyetlerinin aktif olması, yedek besin maddelerinin basit ve eriyebilir hale geçmesi gerekmektedir (Bewley, 1997). Tuz stresi altında ozmotik basıncın artması nedeniyle suyun emilimi kısıtlanır, bu da tohum çimlenme oranının düşmesine neden olur (Munns vd., 2008).

Tuz stresi bitki büyümesini de önemli düzeyde etkilemektedir (Hernandez vd., 1995). Topraktaki yüksek tuz konsantrasyonları, köklerin su alma kapasitesini bozar ve sitoplazmada tuz konsantrasyonunun artmasına neden olur, bu da birçok fizyolojik ve biyokimyasal işlemin yavaşlanmasına, besin alımı ve asimilasyonun engellenmesine neden olur. Böylece, bu etkiler bitki büyümesini, gelişimini ve hayatta kalma oranını azaltır (Hasegawa vd., 1995). Tuz stresi altında ozmotik ve iyonik dengesizliklerin bitki büyümesine olan etkisi iki aşamalı şema ile Munns (1995) tarafından önerilmiştir (Şekil 2.1). Bitkilerin tuz stresine hassas veya dayanıklı olması bitkilerin çeşidine, strese

maruz kalma süresi ve tuzluluk seviyesine, tuzun yapraklarda toksik seviyelere ulaşma hızına göre değişir. Birinci aşama boyunca, her iki bitki türünün büyümesi, yüksek tuzun köklerin dışındaki ozmotik etkisi nedeniyle azalır. Eğer stres devam ederse ikinci aşamaya geçilir ve bu aşamada stres daha şiddetli hale gelir, böylece hassas bitkideki yaşlı yapraklar ölür ve bitkinin fotosentetik kapasitesini azaltır (Carillo vd., 2011).



Şekil 2.1. Tuz stresinde bitkilerin büyüme tepkisi şeması (Munns, 1995'ten adapte edilmiştir)

Bitkiler tuz stresine maruz kaldıkları zaman yaprak, gövde ve köklerin taze ve kuru ağırlıklarında önemli düzeyde azalma meydana gelmektedir (Dinar vd., 1999). Sürgün büyümesi kök büyümesine göre yüksek tuz konsantrasyonuna bağlı ozmotik strese karşı daha hassastır, yüksek tuz nedeniyle sürgün büyümesindeki azalma, genellikle küçük yaprak alanından kaynaklanır. Bunun nedeni; kök gelişimine göre yaprak alanı gelişimindeki azalmanın bitki tarafından kullanılan suyu azaltması ve böylece bitkide tuz konsantrasyonunun yükselmesinin önlenmesidir (Carillo vd., 2011). Duan (2010) tarafından *Arabidopsis*'te yapılan çalışmada şiddetli su eksikliği altında, bitkilerin primer kök ucunda meristematik aktivitelerin yavaşlamasından dolayı kök büyümesinin durduğu ve bu nedenle yanal kök üretiminin artırıldığı ortaya çıkarılmıştır (Duan vd., 2010).

2.2.2 Tuzluluğun su basıncı üzerine olan etkisi

Topraktaki tuz konsantrasyonunun yükselmesi bitkilerin kullanabilir su miktarını sınırlandırmakta ve bu da bitkide su potansiyeli ve ozmotik potansiyelin azalmasına ve turgor basıncının artmasına neden olmaktadır (Romero-Aranda, 2001; Khan, 2003). Turgor basıncının artması hücrel su dengesinin engellenmesine, çeşitli hücrel aktivitelerin bozulmasına veya ciddi durumlarda bitki ölümüne yol açmaktadır (Xiong vd., 2002). Hint kenevirinde yapılan kısa süreli sodyum klorür (NaCl) uygulamasında bitkilerin oransal su içeriği, yaprak su potansiyeli, su alımı, terleme hızı, su tutma ve kullanım yeteneğinde azalma gözlenmiştir (Chaudhuri vd., 1997). Halofitik çok yıllık çim bitkisi olan *Urochondra setulosa*'da yapılan çalışmada su potansiyeli, ozmotik potansiyel ve stoma iletkenliğinin tuz konsantrasyonundaki artıştan negatif yönden etkilendiği; ancak, turgor basıncında artışın gözlendiği bildirilmiştir (Gulzar vd., 2003). *Suaeda salsa*'da tuz konsantrasyonunun artmasıyla birlikte, yaprak su potansiyeli ve buharlaşma hızı önemli ölçüde azalırken, yaprak oransal su içeriğinde herhangi bir değişiklik olmamaktadır (Lu vd., 2002). Yaprak su potansiyeli ve ozmotik potansiyel, köklenme ortamındaki tuz konsantrasyonunun artmasına bağlı olarak azalmaktadır (Rajasekaran vd., 2001). Hiper-ozmotik stres (150 mM'nin üzerinde NaCl konsantrasyonları) koşulları altında, plazmoliz (plazma zarının hücre duvarından protoplast hacminde azalması ile birlikte hücre duvarından ayrılması) sonucunda hücre ölümü gözlenmektedir (Slayman, 1982; Cho, 1993).

2.2.3 Tuzluluğun iyon düzeylerine olan etkisi

Yüksek tuz alımı bitki hücresinde Na^+ , Cl^- ve SO_4^{2-} gibi iyonların yüksek konsantrasyonlarda birikimine neden olarak iyon dengesizliğini ortaya çıkarır, bu da spesifik iyon toksisitesi olarak adlandırılır. Spesifik iyon toksisitesi sonucunda ortamdaki fazla Na^+ ve Cl^- iyonları besin iyonlarının, özellikle K^+ 'un alımı ile rekabete girmekte ve K^+ eksikliğine neden olmaktadır. NaCl'nin artması, Na^+ ve Cl^- 'un artmasına neden olurken bazı bitkilerde Ca^{2+} , K^+ ve Mg^{2+} seviyelerinde azalışlara yol açmaktadır (Khan vd., 2003). Normalde, yüksek bitkilerin sitoplazması 100-200 mM K^+ ve 1-10 mM Na^+ içermektedir ve bu şartlarda metabolik faaliyetler devam etmektedir (Bressan, 2008) *Vicia faba*'da yapılan çalışmada, tuz stresi altında Na^+ ve Cl^- içeriği artarken, K^+ /

Na⁺ oranı azalmaktadır (Gadallah, 1999). *Ulva fasciata*'da (denizaltı yeşil makro alg) yapılan çalışmada artan tuzluluk ile paralel olarak Na⁺, K⁺ ve Cl⁻ konsantrasyonlarının arttığı belirlenmiştir. Na⁺ ve Cl⁻ iyonlarındaki artış, prolin birikimini indüklerken, prolin dehidrojenaz aktivitesini ve toplam Ca²⁺ konsantrasyonunu azaltmaktadır. Bu da *U. fasciata*'da hücrel Ca²⁺ kaybının, prolin dehidrojenaz aktivitesinin inhibisyonu yoluyla prolin birikiminin NaCl indüksiyonu ile ilişkili olduğunu göstermektedir (Lee vd., 1999). Ferreira (2001) tarafından guava'da yapılan bir çalışmada tuz stresi altında bitkilerde biriken Na⁺ ve Cl⁻ seviyelerinde bir artışın gözlemlendiği ve en yüksek iyon birikiminin yapraklarda ve ardından köklerde olduğu ortaya çıkmıştır. Ca²⁺ seviyeleri ise köklerde değişmezken, saplarda ve yapraklarda azalmıştır. Artan tuz stresi altında K⁺ seviyesinin yapraklarda azaldığı, Mg²⁺ seviyesinin ise köklerde değişmezken yapraklarında azaldığı saptanmıştır (Ferreira vd., 2001). Yapraklarda meydana gelen Ca²⁺ ve Mg²⁺ seviyelerindeki azalmanın membran stabilitesini arttırdığı ve klorofil içeriğinin azalmasına yol açtığı belirlenmiştir (Parida vd., 2004). Ayrıca, yüksek Na⁺ düzeyi ve yüksek Na⁺/K⁺ oranı çeşitli enzimatik olayları engelleyebilmektedir. Özellikle yüksek Na⁺, protein sentezinde aksaklıklara neden olabilmektedir (Parvaiz vd., 2008).

2.2.4 Tuzluluğun karbonhidratlar ve proteinler üzerine etkisi

Şekerler (glikoz, fruktoz, sukroz, fruktanlar) ve nişasta gibi karbonhidratlar, hücre büyümesi için ihtiyaç duyulan önemli substratlardır ve bunlar esasen fotosentez işlemi yoluyla temin edilir. Bitkiler tuz stresine maruz kaldıkları zaman çeşitli radikallerin temizlenmesi, ozmotik dengeleme ve koruma için çeşitli karbonhidratlar biriktirmektedir. Birçok bitki hücresinde karbonhidratların azalmasıyla birlikte stres daha şiddetli hale gelir (Kerepesi, 2000; Kerkeb, 2001; Singh, 2000). Parida (2002) tarafından *Bruguiera parviflora*'da yapılan çalışmada tuz stresi altında bitkinin yapraklarındaki nişasta içeriğinde azalma gözlenirken, sukroz miktarında artış olduğu bildirilmiştir (Parida vd., 2002). Çeltikte de indirgeyici ve indirgeyici olmayan şekerlerin içeriği ve sukroz fosfat sentaz aktivitesi tuz stresi altında artarken, nişasta fosforilaz aktivitesi azalmaktadır (Dubey vd., 1999). Domates yapraklarında çözünür şekerlerin ve toplam sakaritlerin içeriğinin önemli düzeyde arttığı, ancak nişasta içeriğinin ise NaCl uygulanmasından önemli ölçüde etkilenmediği bulunmuştur (Khavari-Nejad vd., 1998). Gao (1998) tarafından yine domates (*Lycopersicon*

esculentum L.)’te yapılan çalışmada tuz stresi altında yapraklarda sükröz konsantrasyonunun ve sükröz fosfat sentazın aktivitesinin arttığı, ancak asit invertaz aktivitesinin azaldığı bildirilmiştir (Gao vd., 1998). Polifenol seviyesinin ise *B. parviflora* yapraklarında tuz stresi ile arttığı bildirilmiştir (Parida vd., 2002).

Farklı bitki türlerinde tuzlulukla teşvik edilen çok sayıda proteyinler bulunmakta ve bunlar tuz stres altında ozmotik düzenlemeye olanak sağlamaktadırlar (Ashraf vd., 2004). Agastian (2000)’in dutta yapan çalışmasında çözünür proteinlerin düşük tuzlulukta artarken yüksek tuzlulukta ise azaldığını bildirmiştir (Agastian vd., 2000). mısır köklerinde ise NaCl uygulanması 61, 51, 39 ve 29kDa olan dört polipeptidin birikmesini sağlamaktadır (Tamas vd., 2001). Yen (1997)’in *M. crystallinum*’ın SDS ve 2D-PAGE ile yaptığı çalışmada NaCl stresi altında callusta moleküler kütleleri 40, 34, 32, 29 ve 14 kDa olan beş polipeptidin biriktiği bildirmiş ve bu polipeptitler indüksiyon seyrine göre erken indüklenen (40-, 34- ve 29-kDa) ve geç indüklenen (32- ve 14-kDa) proteinler iki ayrı gruba ayrılmıştır (Yen vd., 1997). Parida (2004)’nin *B. parviflora*’da yaptığı bir çalışmaya göre tuzluluğun molekül ağırlığı 17, 23, 32, 33 ve 34kDa olan birkaç protein bandının yoğunluğunda bir azalmaya neden olduğu ve bu protein bantlarının azalma derecesinin uygulanan NaCl konsantrasyon yükselmesi ile orantılı olduğunu belirtmiştir. En belirgin değişiklik, 400mM NaCl’de 45 günlük uygulamadan sonra kaybolan 23kDa polipeptidi. Tuzluluk stresi altında *B. parviflora*’da kaybolan 23kDa polipeptidi, fideler tuzdan arındırıldığında tekrar ortaya çıkmaktadır ve bu gözlemler, bu polipeptitlerin *B. parviflora*’da tuz stresi altında ozmotik düzenleme için önemli yer aldığını göstermektedir (Parida vd., 2004).

2.2.5 Tuzluluğun kloroplast yapısı ve fotosentetik pigmentler üzerine etkisi

Tuz stresi altında bitki dokusunda Na^+ konsantrasyonunun yükselmesi oksidatif stresin artmasına neden olmakta, bu da kloroplast yapısında bozulmaya ve buna bağlı olarak klorofil biyosentezinde kayıplara yol açmaktadır. Klorofil miktarının azalması da fotosentetik aktivitenin azalmasına sebep olmaktadır (El-Tayeb, 2005). Tuzluluk, domateste kloroplastların kümelenmesine; patatesten kloroplast sayılarının azalmasına (Parida vd., 2005); çeltik bitkilerinde tilakoidlerin şişmesine ve lipit damlacıkları ile polisakkarit tanelerinin birikimine neden olmaktadır (Rahman vd., 2000).

Tuz stresi altında yapraklarda klorofil ve toplam karotenoid içeriklerindeki azalma nedeniyle yaşlı yapraklarda kloroz gelişmeye başlar ve tuz stresinin devam etmesiyle yaprakların dökülmesine yol açar (Gadallah, 1999). *Grevilea*'da yapılan çalışmada NaCl stresi altında protoklorofil, klorofiller ve karotenoidlerin önemli ölçüde azaldığı; ancak, protoklorofil ve klorofildeki azalma oranının klorofil a (Chl-a) ve karotenoidlerinkinden daha yüksek olduğu; antosiyanin pigmentlerin ise belirgin ölçüde arttığı belirlenmiştir (Kennedy vd., 1997). Domates yapraklarında, toplam klorofil (Chl-a + b), Chl-a ve β -karoten içeriği NaCl stresi altında azalmaktadır (Khavari-Nejad vd., 1998). Alamgir (1999) tarafından çeltikte yapılan çalışmada tuzluluk stresi altında yaprak pigmentleri dokuz genotipte azalış gösterirken, altı genotipte nispeten artış göstermiştir (Alamgir vd., 1999). Tuzluluk, *B. parviflora* yapraklarında Chl-a, Chl-b ve karotenoid miktarlarında önemli düşümlere neden olmaktadır (Parida vd., 2002). Klorofil içeriğindeki azalma, klorofil sentezinin azalmasından ya da klorofil pigmentlerinin parçalanmasındaki artıştan kaynaklanmakta, klorofil parçalanması ise klorofilaz enzim aktivitesindeki artış sonucunda ortaya çıkmaktadır (Yıldız vd., 2010).

2.2.6 Tuzluluğun fotosentez üzerine etkisi

Bitkilerin büyümesi birçok fizyolojik sürecin birleşmesi ve düzenlenmesi sonucunda ortaya çıkmaktadır. Bu süreçte bitkiler maruz kaldığı çevresel faktörlerden etkilenirler. Bu da bitkilerin strese verdiği cevabı belirler. Bitkinin büyümesi ve gelişmesi için en önemli olan faktör de fotosentezdir. Biyokütle üretimi net fotosentezin bir ölçüsüdür ve büyümenin yavaşlaması da büyümeyi etkileyen çevresel stresten dolayı fotosentezin azalmasından kaynaklanmaktadır. Tuz stresi, fotosentezde kısa ya da uzun süreli etkilere neden olmaktadır. Kısa süreli etki strese maruz kalmanın başlamasından birkaç saat sonra veya bir-iki gün sonra ortaya çıkmakta ve bu süreçte karbon asimilasyonunun tamamen kesilmesinden dolayı bu yanıt önemlidir. Tuzun uzun vadeli etkisi birkaç gün strese maruz kaldıktan sonra ortaya çıkar ve bu da karbon asimilasyonundaki azalma ve gelişmekte olan yapraklardaki tuz birikiminden kaynaklanmaktadır (Munns vd., 1986). Tilakoidlerin pigment-protein analizleri, yüksek tuzluluğun Fotosistem I (PS I) ve Fotosistem II (PS II) reaksiyon merkezlerini önemli derecede etkilediğini göstermiştir (Parida vd., 2003). Tuz stresi altında bitkilerin net fotosentez oranı, transpirasyon hızı ve stoma iletkenliği azaltmakta, stoma direnci ise artmaktadır (Ashraf vd., 2004). Dutta

yapılan çalışmada tuz stresi altında net CO₂ asimilasyon oranı (*PN*), stoma iletkenliği (*g_s*) ve transpirasyon hızı (*E*) düşerken, hücreler arası CO₂ konsantrasyonu (*C_i*) artmıştır (Agastian vd., 2000). Horsegram'da (*Macrotyloma uniflorum*) yapılan çalışmada tuz stresi altında CO₂ asimilasyon oranında ve stoma iletkenliğinde azalma olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada, tuz stresinin fotosentetik elektron taşınmasını ve Calvin döngüsünde rol alan enzimlerinin aktivitesini inhibe ettiği ortaya çıkartılmıştır (Aubert vd., 1999). Parida (2005) tarafından *Atriplex lentiformis*'de yapılan deney sonucunda tuz stresi altında fosfoenol piruvat karboksilaz (PEPC)/ribuloz bifosfat karboksilaz (Rubisco) oranı ve net CO₂ asimilasyon oranının azaldığı ortaya çıkartılmıştır (Parida vd., 2005).

2.2.7 Tuzluluğun hücre zarı üzerine etkisi

Hücre zarları en önemli enerjisi depolama kaynaklarıdır ve hücre iç organların izolatörleri olarak işlev görmektedir. Aynı zamanda hücrel membranların yapısal korunmasında ve stres altında organizmaların hayatta kalabilmesinin sağlanması için önemli rol oynamaktadır (Singh vd., 2002). Bu koruma mekanizması fosfolipit çift katmanlı membrana dayanmaktadır. Bu membranın sahip olduğu doymamış yağ asitleri kuraklık veya tuz stresinin önlenmesinde önemli role sahiptirler. Olefinik bağlara bitişik hidrojen atomları oksidatif saldırılara karşı hassastır ve lipitler bu bağlar bakımından zengin olduklarından oksidatif saldırıda birincil hedefler. Oksidatif reaksiyon sırasında enzimler reaksiyonu kontrol edemediğinden dolayı lipit oksidasyonu meydana gelmekte ve bu saldırı da bazı proteinlerin ve DNA'nın yapısını değiştiren yüksek oranda reaktif türlerin üretilmesine neden olmaktadır (Singh vd., 2002). Yer fıstığında (*A. hypogaea* L.), düşük NaCl konsantrasyonunda (45mM'ye kadar) lipit içeriğinin arttığı gözlenmişken, daha yüksek konsantrasyonlarda ise azaldığı saptanmıştır (Hassanein, 1999). Wu vd. (1998), tuzlu bataklık otunun (*Spartina patens*) kök hüce plazma membranında NaCl stresi altında meydana gelen değişikliklerini analiz etmiştir ve sterollerin (serbest steroller dahil olmak üzere) ve fosfolipidin molar yüzdelерinin artan tuzluluk oranı ile azaldığını; sterol / fosfolipid oranının ise NaCl'den etkilenmediğini bildirmiştir (Wu vd., 1998). NaCl tuzluluğunun membran yapısında sebep olduğu değişimlerle ilgili *Dactylis glomerata* L.'da yapılan bir çalışmada, 200 mM NaCl uygulaması sonucunda plazma membranında bozulmalar ve kıvrılmalar meydana

geldiği ve hücrelerin sitoplazmalarında membrana bağlı keseciklerin geliştiği saptanmıştır (Gupta, 2007).

2.2.8 Tuzluluğun reaktif oksijen türleri, antioksidanlar ve antioksidatif enzimler üzerine etkisi

Tuz stresi, bitkilerin çeşitli metabolik aktiviteleri üzerindeki ozmotik etkilerin bir sonucu olarak su eksikliğine neden olmakta ve bu su eksikliği, süperoksit, hidroksil ve peroksit radikalleri gibi reaktif oksijen türlerinin oluşumu nedeniyle oksidatif strese yol açmaktadır. Hiperozmotik ve iyonik streslerin yan ürünleri olan reaktif oksijen türleri, membran fonksiyon bozukluğuna ve hücre ölümüne neden olmaktadır (Bohnert vd., 1996). Bu durumda bitkiler reaktif oksijen türlerini temizleyen katalaz, peroksidaz, glutatyon redüktaz ve süperoksit dismutaz gibi bazı antioksidatif enzimlerin aktivitelerini arttırarak strese karşı bir savunma mekanizması geliştirirler. Bitkilerin stres altında antioksidan enzimlerin aktivitesinin arttırıldığına dair birçok rapor bulunmaktadır. Buğdayda tuz stresi altında, askorbat peroksidaz, glutatyon redüktaz, monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR), dehidroaskorbat redüktaz (DHAR) ve manganez süperoksitdismutaz (Mn-SOD) gibi antioksidatif enzimlerin aktiviteleri artarken, Cu / Zn-SOD'un sabit kaldığı ve toplam askorbat içeriğinin azaldığı bulunmuştur (Hernandez vd., 2000). Gossett (1994), pamukta (*Gossypium hirsutum* L.) NaCl stresinin SOD, guaikol peroksidaz ve glutatyon redüktaz aktivitelerini arttırdığını; katalaz ve askorbat peroksidaz aktivitelerini ise azalttığını bildirmiştir (Gossett vd., 1994). Çeltikte yapılan çalışma sonucunda, tuz stresi altında yapraklarda hidrojen peroksit (H_2O_2) içeriği ile SOD, APX ve GPX'in aktivitelerinin arttığı; katalaz aktivitesinin ise azaldığı bulunmuştur (Lee vd., 2001).

Hücre membranı üzerine serbest oksijen radikalleri lipid peroksidasyonu ile etki göstermektedir. Hücre membranının tahribatına yol açan lipid peroksidasyonu, birkaç reaksiyon aşaması sonucunda malondialdehit (MDA) üretmekte ve MDA miktarı membran lipid peroksidasyonunu anlamak için önemli bir ölçüm değeri olarak bilinmektedir. MDA, tuza dayanıklı genotiplerde hassas genotiplere göre daha az miktarda üretilmekte ve MDA üretimi lipid peroksidasyonu sonucunda meydana geldiğinden dolayı membran zararlanması nedeniyle iyon sızıntısına yol açmaktadır

(Koyro, 2006). Tuz stresi altındaki susam bitkilerinde yapılan çalışma 100 mM NaCl uygulaması sonucunda MDA içeriğinin arttığı ve en yüksek değere çıktığı belirlenmiştir (Koca vd., 2007).

2.3 Tuz Toleransı

Tuz toleransı, bitkilerin çok yüksek konsantrasyonda çeşitli çözülebilir tuzların içerdiği ortamlarda büyüme ve hayat döngülerini tamamlayabilme yeteneklerine denir. Bitkilerin tuz stresine dayanıklılığın bir göstergesi olan tuz toleransı bitki türü, yaşadığı ortam ve çevre şartlarına göre çeşitlilik göstermektedir (Gürel vd., 2001). Bitkiler, tuz stresine maruz kaldıkları zaman biyokimyasal ve moleküler mekanizmalarında değişiklik yaparak hayatta kalmaya çalışırlar. Bitkiler tuz stresine karşı toleranslığına göre halofitler ve glikofitler olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Halofitler, *Salicornia herbacea*, *Atriplex vericaria*, *Suaeda maritima* gibi yüksek tuz şartlarına adapte olmuş ve bu şartlarda yaşamını sürdürebilen bitkilerdir. Glikofitler, tuza hassas olan bitkilerdir ve bunlar yüksek tuz şartlarında yaşayamazlar. Örneğin, fasulye, soğan, mısır, limon, marul, fındık ve ceviz tuza çok hassas bitkilerdir. Domates, karanfil, pamuk, meşe ve arpa orta derece toleranslık göstermekte; hurma, seker pancarı, palmiye, kavak ve gül yüksek derecede toleranslık göstermektedir (Ekmekçi, 2005; Bressan, 2008). Bitkilerin tuza karşı geliştirdikleri tolerans mekanizmaları, iyon regülasyonu, SOS yolunun düzenleyici rolü, ozmolitlerin biyosentezi, antioksidatif enzimlerin aktivitesi ve bitki hormonlarının indüksiyonu, stres toleransından görevli genlerin ekspresyonunda meydana gelen değişiklikler ve transkripsiyon faktörlerinin düzenleyici rolü olarak sıralanabilir.

2.3.1 İyon regülasyonu

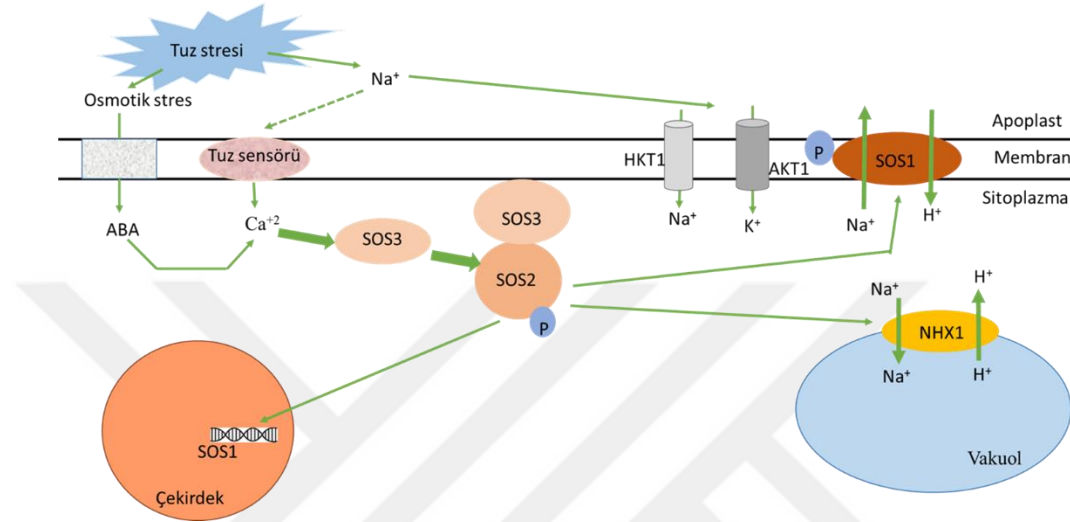
Tuz stresi iyon homeostazının bozulmasına neden olduğundan dolayı iyon alımı ve depolanması sadece normal gelişim için değil aynı zamanda tuzlu koşullar altındaki büyüme için de önemlidir (Adams vd., 1992). Bitkiler, glikofit veya halofit olsun, sitoplazmada büyük miktarda tuzu tolere edemezler ve bu nedenle tuzlu koşullar altında fazla tuzu kofulda depolamakla birlikte aynı zamanda metabolik fonksiyonlarını kolaylaştırmak için farklı dokularda bölümlere ayırırlar (Zhu, 2003).

Na^+ , toprakta tuzluluğun oluşmasına neden olan en önemli iyonlardan biridir. Bu nedenle tuz stresi çalışmalarının ana odak noktası, Na^+ iyonunun taşınım mekanizması ve bunun depolanmasına ilişkin olmaktadır. Sitoplazmadaki fazla Na^+ iyonu Na^+ / H^+ antiporteri ile kofula taşınır. Koful membranında iki tip proton (H^+) pompası bulunmaktadır. Koful H^+ -ATPaz (V-ATPase) ve koful pirofosfataz (V-PPaz). Bunlardan V-ATPaz, bitki hücresinde bulunan en önemli H^+ pompasıdır. Stresli koşullar altında bitkinin hayatta kalabilmesi V-ATPazın aktivitesine bağlıdır. Otoch (2001) tarafından börülce (*Vigna unguiculata*) bitkilerinin hipokotillerinde yapılan bir çalışmada, bitkiler tuzluluk stresine maruz kaldığında V-ATPaz aktivitesinin arttığı, fakat benzer şartlar altında V-PPaz aktivitesinin inhibe edildiği ortaya çıkmıştır (Wang vd., 2001)

2.3.1.1 SOS yolağının düzenleyici rolü

Bitki tuz stresi üzerinde yürütülen birçok çalışma tuza aşırı duyarlı (SOS - Salt Overly Sensitive) stres sinyal yolağının iyon homeostazında ve tuz toleransında çok önemli bir rolle sahip olduğunu göstermektedir (Hasegawa, 2000; Sanders, 2000). SOS sinyal yolağı (Şekil 2.2) SOS1, SOS2 ve SOS3 olmak üzere üç ana proteinden oluşur. SOS1, plazma zarında hücrese seviyede Na^+ akışını düzenleyen Na^+ / H^+ antiporteridir. Aynı zamanda sodyumun kökten gövdeye taşınımını kolaylaştırır. SOS1'in aşırı ekspresyonu bitkilerde tuz toleransı sağlamaktadır (Shi vd., 2002). SOS2, bir serin / treonin kinaz olup bir N-terminal katalitik bölgesi ve bir C-terminal düzenleme bölgesinden oluşmakta ve tuz stresi altında Ca^{2+} sinyali tarafından aktifleştirilmektedir (Liu vd., 2000). SOS stres sinyal yolağında yer alan üçüncü protein ise N-terminalinde bir miristoilasyon bölgesi içeren Ca^{2+} bağlayıcı protein olan SOS3 proteindir. Bu protein bitki tuz toleransı sağlanmada önemli bir rol oynamaktadır (Ishitani vd., 2000). SOS2 proteininin C-terminal düzenleyici bölgesi yaklaşık 21 amino asit uzunluğunda olan bir FISL motifi (NAF bölgesi olarak da bilinir) içermekte ve Ca^{2+} ye bağlanan SOS3 proteini için bir etkileşim bölgesi olarak işlev görmektedir (Guo vd., 2004). SOS2 ve SOS3 proteini arasındaki bu etkileşim, kinazın aktivasyonu ile sonuçlanır ve aktive olan kinaz daha sonra SOS1 proteinini fosfatlayarak aktive etmektedir (Quintero vd., 2002). SOS1 proteininin bir nükleotid bağlama motifi ve bir oto-inhibitör bölgesi içeren, yaklaşık 700 amino asit uzunluğunda bir sitosolik C-terminal kuyruğu vardır. Bu oto-inhibitör bölge SOS2 fosforilasyonu için hedef bölgedir. Ca^{2+} , SOS proteinleri ile

birlikte hücre içi Na^+ homeostazını kontrol etmektedir. SOS3 proteini kendi inhibisyonunu serbest bırakarak SOS2 proteini ile etkileşime girer ve SOS2 proteinini aktifleştirir. Daha sonra SOS2-SOS3 kompleksi SOS1'i fosforile ederek aktifleştirir ve böylece SOS1 sitoplazmaya doğru Na^+ akışının artmasına engel olarak sodyum toksisitesini azaltır (Martínez-Atienza vd., 2007).



Şekil 2.2. SOS yolağının düzenleyici rolü (Gupta vd., 2014)

2.3.1.2 K^+ taşıyıcılarının düzenleyici rolü

Birçok bitki türünde *HKT* (high-affinity K^+ transporter) ve *NHX* (Na^+/H^+ exchanger) gibi K^+ taşıyıcılarını kodlayan genler tanımlanmıştır. *HKT* ailesine ait plazma zarında bulunan taşıyıcılar, Na^+ ve K^+ 'un taşınmasını düzenleyerek tuz toleransında önemli bir rol oynarlar. *Arabidopsis*'te tanımlanmış olan *HKT* taşıyıcıları, bitkilerde aşırı miktarda Na^+ birikimini önleyerek bitkiyi tuzluluğun olumsuz etkilerinden korurlar. Çeltikte yapılan deneyde de benzer şekilde *HKT* taşıyıcısının fazla Na^+ 'ı ksilemden uzaklaştırdığı keşfedilmiştir. Böylece fotosentetik yaprak dokuları Na^+ iyonunun toksik etkisinden korunmuştur (Schroeder vd., 2013). Hücre içi *NHX* proteinleri, K^+ homeostazında, endozomal pH düzenlemesi ve tuz toleransında görev alan Na^+ ve K^+/H^+ antiporterleridir. Barrag vd. (2012) tarafından yapılan çalışma sonucunda tonoplastta lokalize olan *NHX* proteinlerinin (*NHX1* ve *NHX2*: iki ana tonoplast lokalize *NHX* izoformu), tonoplastta aktif K^+ alım, turgor regülasyonu ve stoma fonksiyonu için gerekli olduğunu bulunmuştur.

2.3.2 Tuz toleransında antioksidatif enzimlerin aktivitesi

Bitkilerde abiyotik ve biyotik stres kloroplastlarda ve mitokondrilerde deregülasyon ve elektron taşıma zincirlerinin (ETC) bozulmasına neden olmaktadır. Bu koşullarda, moleküler oksijen (O_2) bir elektron alıcısı olarak hareket eder ve ROS birikimine neden olur. Tekli oksijen (1O_2), hidroksil radikali (OH^-), süperoksit radikali (O_2^-) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) çok güçlü oksitleyici bileşikleridir ve bu nedenle hücre bütünlüğü için potansiyel olarak zararlı etki gösterirler (Groß vd., 2013.). Tuz stresi altında antioksidan enzimler ve enzimatik olmayan bileşikler dahil olmak üzere antioksidan metabolizması ROS'un indüklediği detoksifikasyon yolağında kritik rol oynamaktadır. Bu nedenle tuzluluk toleransı, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksit (GPX), askorbat peroksidaz (APX) ve glutatyon redüktaz (GR) gibi antioksidan enzimlerin aktivitesi ile pozitif olarak ilişkilidir (Asada vd., 1999; Gupta vd., 2005). Mısır bitkisinde yapılan çalışmada 100 mM NaCl uygulanması sonucunda hassas ve toleranslı genotiplerin yapraklarında APX, SOD, GPX ve GR aktiviteleri kontrole göre artmıştır ve enzim aktivitesindeki artış toleranslı genotiplerde daha belirgin olmuştur (Sairam vd., 2004). Buğdayda yapılan başka bir çalışmada, tuz, kuraklık ve yüksek sıcaklık şartları altında SOD, APX, CAT ve GR aktivitesi artarken enzim aktivitelerindeki artış toleranslı buğday genotiplerinde daha fazla ortaya çıkmıştır (Sairam vd., 2002).

2.3.3 Tuz toleransında ozmolitlerin birikimi ve ozmotik koruma

Stres şartları altında ozmotik dengenin sağlanması ve hücresel yapıların korunması bitkilerde bulunan glisin betain, şeker, polioller ve azot içeren bileşikler gibi ozmolitlerin fonksiyonları ile başarılmaktadır. Birikimleri dış ozmolarite ile orantılı olduğu için, bu ozmolitlerin ana fonksiyonları yapıyı koruma, ozmotik dengeleme, oksijen radikallerinin ortadan kaldırılma ve karbon depolamaktır (Parida vd., 2005).

Toplam serbest amino asitlerin yaklaşık % 55'ini oluşturan sistein, arginin ve metiyonin gibi amino asitler tuzluluk stresi altında azalırken, prolin konsantrasyonu tuz stresine cevap olarak artmaktadır (El-Shintinawy vd., 2001). Prolin birikimi, tuz stresinin hafifletilmesi için önemli bir role sahip olup, tuz stresi sırasında biriken hücre içi prolin sadece strese karşı tolerans sağlamakla kalmaz, aynı zamanda stresin geri kazanılması

sırasında organik bir azot rezervi görevi görmektedir (Matysik vd., 2002; Ben vd., 2010; Saxena vd., 2013). Prolin, glutamat veya ornitinden sentezlenir ve ozmotik stres altında hücrelerde glutamat, prekürsör olarak işlev yapmaktadır (Sairam vd., 2004). Zeytinde (*Olea europaea*) yapılan çalışmada prolinin bazı antioksidan enzimlerin aktivitelerini, fotosentetik aktiviteyi, bitki büyümesini ve tuz stresi altında bitkide suyun korunmasını arttırarak, tuz toleransını geliştirdiğini gözlemlenmiştir (Ben Ahmet vd., 2010). *Nicotiana tabacum*'da prolinin antioksidan savunma sisteminde yer alan enzimlerin aktivitesini arttırarak tuz toleransını arttırdığı bildirilmiştir (Hoque vd., 2008). Ayrıca, 1 mM prolin uygulanan tohumlardan elde edilen çeltik bitkilerinin tuz stresi altındaki gelişimlerinin önemli ölçüde daha az etkilendiği gösterilmiştir (Deivanai vd., 2011).

Tuz stresi altında şeker (örneğin, glikoz, fruktoz, fruktanlar ve trehaloz) ve nişasta gibi karbonhidrat birikimi meydana gelmektedir (Parida vd., 2004). Bu karbonhidratların stres toleransında oynadığı en büyük rol, ozmotik koruma, karbon depolama ve ROSun uzaklaştırılması olmaktadır. Tuz stresi altında farklı türlere ait bitkilerin birçoğunda hücre içindeki indirgeyici şekerlerin (sakaroz ve fruktan) seviyelerinde artış görülmüştür (Kerepesi vd., 2000). Tuzluluk altında sükroz fosfat sentaz aktivitesinin artmasına bağlı olarak sükroz içeriğinin domateste (*Solanum lycopersicum*) arttığı bulunmuştur (Gao vd., 1998).

2.3.4 Tuz toleransında bitki hormonlarının indüksiyonu

Tuzluluk ve kuraklık gibi abiotik stresler bitkilerde absisik asit (ABA) biyosentezi ve birikimine neden olmaktadır. Tuzluluk stresi ozmotik strese ve su eksikliğine neden olarak sürgün ve köklerde ABA üretimini arttırmaktadır (Popova vd., 1995; He vd., 1996). ABA birikimi, tuzluluğun fotosentez, büyüme ve asimilatların translokasyonu üzerindeki inhibe edici etkisini azaltmaktadır (Popova vd., 1995; Jaschke vd., 1997). ABA, tuz stresi ve kuraklık ile ilgili bir dizi genlerin ekspresyonunu modüle ederek bitkinin strese toleranslığını arttırır. Buğdayda ABA uygulanması, tuzluluk stresi altında *MAPK4* benzeri, *TIP1* ve *GLP1* genlerinin ekspresyonunu indüklemiştir (Keskin vd., 2010).

Salisilik asit (SA) ve brassinosteroidler (BR) gibi hormonal özelliklere sahip diğer bazı bileşikler de bitki abiyotik stres tepkilerine katılmaktadır (Clouse vd., 1998; Fragnière

vd.,2011). Jayakannan vd. (2013), SA'nın *Arabidopsis*'te membran potansiyelini geri sağlayarak ve K⁺ (GORK) kanalını dışa doğrultucu bir koruma hücresi yoluyla tuz stresi kaynaklı K⁺ kaybını önleyerek bitkinin tuzluluk toleransını arttırdığını göstermiştir. SA uygulanan *Arabidopsis* bitkilerinde H⁺ - ATPase aktivitesi artmış ve böylece tuz stresi sırasında K⁺ korunması sağlanmıştır.

2.4 Tuz Toleransında Önemi Rolü Olan Genler ve Transkripsiyon Faktörleri

Tuzluluk stresinde gen ifadesinin düzenlenmesi, bitkiler tarafından spesifik gen ürünlerinin (protein veya RNA) üretimini yeniden düzenlemek (arttırmak veya azaltmak) için kullanılan çeşitli mekanizmaları içerir. Santral dogma sırasında, transkripsiyon başlangıcından RNA üretime ve proteinin post-translasyonel modifikasyonuna kadar çeşitli gen regülasyon mekanizmaları tanımlanmıştır.

Transkriptomik analiz, mRNA seviyesindeki gen ekspresyonu hakkında ayrıntılı bilgi sağladığından dolayı strese yanıt veren genleri taramak için yaygın olarak kullanılmakta ve bu nedenle genomik yaklaşımlar, önemli genlerin kodlanması, klonlanması ve karakterizasyonunda önemli bir rol oynamaktadır. Tuzluluk stresine cevap olarak indüklenen veya baskılanan çok sayıda transkripsiyon faktörü ve gen tanımlanmış ve transkriptomik ve genomik yaklaşımlar kullanılarak karakterize edilmiştir (Balfagón vd., 2019).

Transkripsiyon faktörleri, gen ifadelerini kontrol eden en önemli regülatör olarak bilinmekte ve bunların arasında, bZIP, WRKY, AP2, NAC, C2H2 çinko parmak faktörleri ve DREB aileleri çok sayıda strese duyarlı üye içermektedir. Bu transkripsiyon faktörleri hedef genlerin promotörlerinde yer alan spesifik cis elementlere bağlanarak genlerin ekspresyonunu kontrol etmektedir. Johnson vd. (2002), bZIP transkripsiyon faktörlerinin tuza hassas buğday çeşitlerinde uzun süre tuz uygulaması sonucunda indüklendiğini, ancak tuza toleranslı çeşitlerde ise ifade seviyesinin azaldığını göstermiştir. Başka bir çalışmada hem pirinç hem de buğdayda NAC transkripsiyon faktörünün aşırı ekspresyonunun tuz toleransı sağladığı bulunmuştur (Nakashima vd., 2007). Çeltikte DREB1 / CBF, DREB2 ve AREB / ABF transkripsiyon regülatörlerinin abiyotik stres yanıtlarında önemli bir rol oynadığı kanıtlanmıştır (Ito vd., 2006; RoyChoudhury vd., 2008; Fujita vd., 2011; Mizoi vd.,

2012; Fujita vd., 2013). OsNAC5 ve ZFP179 gibi transkripsiyon faktörlerinin tuz stresi altında indüklendiği bilinmiş, bunun da stres toleransında önemli rol oynayan prolin, şeker ve LEA proteinlerinin sentezini ve birikmesini düzenlediği gösterilmiştir (Song vd., 2011). *Arabidopsis*'te yapılan çalışmada, tuz stresi altında *RD29A* promotörüne bağlanan *AtWRKY8*'in indüklendiği bilinmiş ve bu da *RD29A*'nın *AtWRKY8*'in hedef genlerinden biri olduğunu göstermektedir (Hu vd., 2013).

Farklı bitki türlerinde tuzluluğa yanıt olarak işlev gören çok sayıda gen ve transkripsiyon faktörü bulunmaktadır (Chakraborty vd., 2012; Hu vd., 2013). Bitki tuz toleransında önemli rolü olan genler ve transkripsiyon faktörleri Çizelge 2.1'de sıralanmıştır. Bunlar aşağıdaki fonksiyonel kategorilere ayrılabilir: iyon taşıma veya homeostaz ile ilişkili genler (örneğin *SOS* genleri, *AtNHX1* ve H^+ - *ATPase* genleri), yaşlanma ile ilişkili genler (örneğin *SAG*), moleküler şaperonlar (örneğin *HSP* genleri) ve dehidrasyonla ilişkili transkripsiyon faktörleri (örneğin *DREB* genleri).

Tuz veya kuraklık stresine karşı indüklenen genler, erken ve geç yanıt veren genler olarak ikiye ayrılmaktadır. Erken yanıt veren genler (indüklenebilir transkripsiyon aktivatörleri) dakikalar içerisinde ve geçici olarak ifade edilmekte ve bunların teşvikinde tüm sinyal komponentleri zaten bulunduğu için bu aşamada yeni protein sentezini gerektirmemektedir. Fakat tuza duyarlı genlerin çoğunluğunu oluşturan geç yanıt veren genler (stres tolerans efektörleri), bitkiler strese maruz kaldıktan saatler sonra aktive edilmekte ve devamlı ifade edilmektedirler. Geç yanıt veren genleri erken yanıt veren genler tarafından kodlanan transkripsiyon faktörleri aktive etmektedir (Kalefetoğlu vd., 2005; Meng vd., 2009).

Çizelge 2.1. Tuz stresi altında indüklenen bazı genler ve fonksiyonları

Türler	NaCl konsantrasyonu (mM)	Gen adı	Gen fonksiyonları	Kaynak
<i>Brassica juncea</i> ve <i>Brassica campestris</i>	25 ve 50	<i>SOS1</i> <i>SOS2</i> <i>SOS3</i> <i>NHX1</i>	Plazma membran ve Koful Na ⁺ /K ⁺ antiporter, Protein kinazı, Kalsiyum bağlayıcı protein	Chakraborty vd., (2012)
<i>Oryza sativa</i>	50	<i>PRP</i> <i>SAG</i> <i>HSPC025</i>	Prolin bakımından zengin proteinler ve hücre çeperinin korunması, düzenleyici süreçler ve hücrel sinyal iletimi, Isı şoku proteinleri, protein stabilizasyonu	Roshandel vd., (2009)
<i>Oryza sativa</i>	100	<i>OsHSP23.7</i> <i>OsHSP71.1</i> <i>OsHSP80.2</i>	Isı şok proteinleri, katlama, montaj ve proteinlerin taşınması	Zou vd., (2009)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	150	<i>AtSKIP</i>	Transkripsiyon faktörü, transkripsiyonel ön başlatma, ekleme ve poliadenilasyon	Lim vd., (2010)
<i>Oryza sativa</i>	200	<i>OsHsp17.0</i> <i>OsHsp23.7</i>	Isı şok proteinleri, moleküler şaperonlar ve proteinlerin katlanması, birleştirilmesi ve taşınması	Zou vd., (2012)
Havuç	300	<i>DcHsp17.7</i>	Yüksek sıcaklık altında hücre canlılığı ve membran stabilitesi	Song vd., (2011)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	300	<i>JcDREB</i>	Transkripsiyon faktörü	Tang vd., (2011)

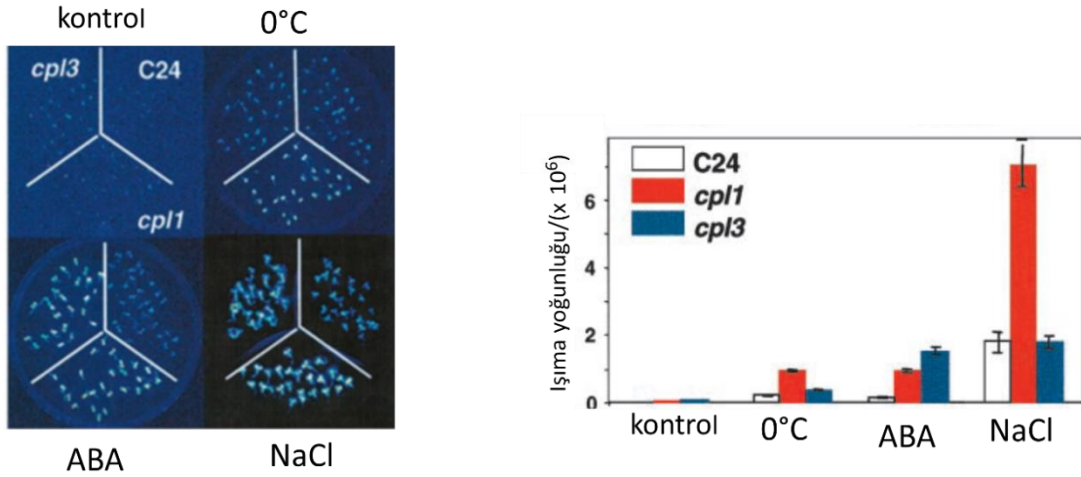
2.5 Abiyotik Stres Altında RNA Metabolizma Regülatörü CPL1'in Önemi

RNA polimeraz II (RNAP II), mRNA sentezinden sorumlu olan enzimdir ve en büyük alt ünitesinin C uç bölgesi (CTD – C terminal domain), Y¹S²P³T⁴S⁵P⁶S⁷ olarak tekrar eden heptapeptitler içermektedir (Jeong vd., 2013). CTD'nin fosforilasyonu transkripsiyon ve mRNA olgunlaşma süreçlerinin düzenlemesi için önemlidir (Ho vd., 1999; Ahn vd., 2004). Transkripsiyon döngüsü sırasında, CTD'nin fosforilasyonu heptapeptit tekrarları içindeki ikinci ve beşinci serin aminoasitlerinde gerçekleşir (Komarnitsky vd., 2000). CTD-Phosphatase-Like1 (CPL1), RNA polimeraz II holoenziminin CTD gölgesindeki bu serin aminoasitlerinin defosfatlanmasını sağlayan bir protein fosfatazdır. Fakat birçok CTD fosfatazın aksine, CPL1 çift sarmallı (ds) RNA-bağlayan motifli (dsRBM) içerir ve dsRNA'ya bağlı yolakların aracılık ettiği genlerin regülasyonunda işlev görmektedir (Jeong vd., 2013).

Arabidopsis genomunda CPL ailesinin 20'den fazla üyesi bulunmaktadır (Jeong vd., 2013). *Arabidopsis* CPL gen ailesi, strese duyarlı genlerin transkripsiyonunu negatif olarak kontrol etmektedir (Koiwa vd., 2002; Xiong vd., 2002). Jeong vd. (2013) tarafından yapılan genetik etkileşim çalışmasında, *cpl1*'in *ros1*'de transkripsiyonel gen susturma ve DNA hipermetilasyon fenotipini kısmen baskılayabildi bildirilmiş, bu da

CPL1'in siRNA üretimini azaltmadan RNA yönlendiren DNA metilasyon yolağında (RNA-directed DNA methylation pathway) yer aldığını göstermektedir. CPL1 proteini mikroRNA (miRNA) biyogenezini için önemli olan proteinlerle etkileşime girerek, CPL1'in miRNA işlemlerini düzenlediği gösterilmiştir. AtCPL3 ve AtCPL4, prototip CTD fosfataz olan *Saccharomyces cerevisiae* FCP1 ile homolog olup, C terminallerinde BRCT içerir. BRCT, ABA sinyalleşmesini kolaylaştıran AtCPL3'ün *in planta* işlevi için gereklidir (Bang vd., 2006). Buna karşılık, AtCPL1 ve AtCPL2, C-terminallerinde BRCT alanı içermemektedir. AtCPL1'in C-terminal bölgesi, iki dsRNA bağlayıcı motif (DRM) ve bir çekirdek lokalizasyon sinyali (Koiwa vd., 2004) içermekte ve strese duyarlı gen ekspresyonunun regüle edilmesi için gereklidir (Xiong vd., 2002). Memelilerde yapılan çalışmalar CTD fosfatazların transkripsiyon kompleksi ile etkileşime girdiğini göstermiştir (Li vd., 2003; Yeo vd., 2005). AtCPL1'in strese duyarlı genlerin spesifik promotörüne yönlendiren protein-protein veya protein-RNA etkileşimlerinde kritik bir rol oynadığı gösterilmiştir (Koiwa vd., 2004).

Jeong vd. (2013) tarafından yapılan çalışmada *cpl1* mutasyonunun soğuk stresi, ABA ve NaCl uygulamasına cevap olarak *RD29A::LUC* hiperekspresyonuna neden olduğu ve özellikle NaCl uygulamasında soğuk stresine göre *RD29A::LUC* ifadesinin yaklaşık 7 kat daha fazla indüklendiği gösterilmiştir (Şekil 2.3). Bu sonuçlar, RNAP II fosforilasyon durumunun C-terminal bölgesinin fosfataz aracılı düzenlemesinin, bitki stres tepkileri ve gelişimi gibi karmaşık işlemlerin odak kontrol noktası olduğunu göstermektedir. AtCPL ailesi üyeleri, bitki tepkisini belirleyen sinyal çıkışını farklılaştıran hem benzersiz hem de örtüşen transkripsiyonel düzenleyici fonksiyonlara sahiptir. Buna ek olarak, global transkriptom analizi ve oksidatif stres analizleri *cpl1* mutantlarının bitkide oksidatif strese karşı toleranslarının arttığını göstermiştir (Thatcher vd., 2018), bu da AtCPL1'in strese duyarlı genlerin regülasyonunda önemli rolü olduğunu göstermektedir.



Şekil 2.3. *cpl1-6* mutantında *RD29A::LUC*'ın hiperekspresyonu. On günlük *cpl1* ve *cpl3* T4 ve yabancı tip (C24) bitkilerinin soğuk (0 °C, 2 gün), ABA'dan (100 mM, 4 saat) ve NaCl (100 mM, 2 gün) uygulamalarından sonra strese yanıt olarak gösterdikleri *RD29A::LUC* hiperekspresyonu (Alıntı: Hisashi vd., 2001).

2.6 Tez Çalışmasının Önemi ve Amacı

Bitkilerin stres koşulunda oluşturduğu cevap hücrel olarak oldukça kompleks olup, pek çok fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler mekanizmayı aktifleştirebilmektedir. Tuz stresi toleransı ile ilgili moleküler kontrol mekanizmalarının aydınlatılması stres ile ilişkili çeşitli genlerin aktivasyonu, inaktivasyonu ve/veya birbirleriyle olan genetik etkileşime dayanmaktadır. Tuz stresinin glikofitlerdeki moleküler mekanizması aydınlatılmaya çalışılmış olsa da özellikle ko-transkripsiyon ve post-transkripsiyonel kontrol mekanizmaları henüz tam anlamıyla araştırılmamıştır. RNA metabolizma regülatörü olan CPL1'in tuz stresi ile olan etkileşimi her ne kadar uzun yıllardır bilinse de, bu etkileşimin genetik karakterizasyonu ve tuz stres toleransındaki rolü henüz anlaşılammıştır. CPL1'in tuz stres toleransındaki rolünün ortaya çıkartılması, bu tolerans mekanizmasının kontrolünde RNA metabolizma regülatörlerinin görevlerinin anlaşılması açısından bir ilk olmuştur.

Bu tez çalışmasının amacı; model bitki olan glikofit *Arabidopsis thaliana* bitkisinde *cpl1* mutanı ile tuz tolerans mekanizmasından sorumlu genlerin (*SOS1*, *SOS3* ve *HKT1*) mutantlarının genetik olarak birbirleriyle olan etkileşimlerinin incelenmesi ve dolaylı yoldan bütün mutantların tuz stresine karşı vermiş oldukları fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler tepkilerin analiz edilerek, genlerin fonksiyonlarının ve tuz toleransındaki önemlerinin anlaşılmasıdır. Bu sayede, bitkilerin tuza tolerans

mekanizmasının ve bu mekanizmadaki genler ile RNA metabolizma regülatörü CPL1 arasındaki genetik etkileşimin aydınlatılması sağlanmıştır.



BÖLÜM III

MATERYAL VE METOT

3.1 Çifte Mutantların Elde Edilmesi

3.1.1 Bitki genotipleri ve genel büyüme koşulları

Bu tez çalışmasında *cpl1-6sos1-1*, *cpl1-6sos3-1* ve *cpl1-6hkt1-1* çifte mutant bitkilerini elde etme amacıyla homozigot *Arabidopsis thaliana cpl1-6*, *sos1-1*, *sos3-1*, *hkt1-1*, *sos1-1hkt1-1* ve *sos3-1hkt1-1* tohumları kullanılmıştır. Homozigot *cpl1-6* ve *hkt1-1*, T-DNA ekleme mutantlarıdır. *sos1-1* ve *sos3-1*, homozigot olup nokta mutasyonu içermektedir. Bütün mutantlar Kolombiya-0 (Col-0) ekotipinde üretildiğinden, Col-0 çalışmada kontrol bitkisi olarak kullanılmıştır. Bütün tekil mutant tohumları Ohio Eyalet Üniversitesi Arabidopsis Biyolojik Kaynak Merkezi'nden (Arabidopsis Biological Resource Center - ABRC) satın alınmıştır. Mutantlarla ilgili detaylı bilgiler Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan mutantlarla ilgili genel bilgiler

Genler	AGI numarası	Mutant ismi	Mutant numarası	Mutasyon Türü	Referans
<i>CPL1</i>	AT4G21670	<i>cpl1-6</i>	GK-165H09	T-DNA ekleme	Aksoy vd., 2006
<i>SOS1</i>	AT2G01980	<i>sos1-1</i>	CS3862	EMS mutasyonu sonucu çerçeve kayması	Shi vd., 2000
<i>SOS3</i>	AT5G24270	<i>sos3-1</i>	CS3864	Hızlı nötron sonucu delesyon mutasyonu	Zhu vd., 1998
<i>HKT1</i>	AT4G10310	<i>hkt1-1</i>	CS6531	T-DNA ekleme	Rus vd., 2001
<i>SOS1</i> <i>HKT1</i>	-	<i>sos1-1hkt1-1</i>	CS6527	-	Rus vd., 2004
<i>SOS3</i> <i>HKT1</i>	-	<i>sos3-1hkt1-1</i>	CS6529	-	Rus vd., 2004

Çifte mutant bitkilerini elde etme amacıyla ilk olarak her bir mutanttan yaklaşık 50-60 tohum 1.5 ml'lik eppendorf tüplere konulmuş ve laminar akış kabininin içinde 300 µl % 70'lik etanol ile 30 sn çalkalandıktan sonra 3 kez 300 µl steril saf su ile 10 sn yıkılarak yüzey sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Ardından tohumlar, 100 µl %1'lik agar ile karıştırılıp 1 ml'lik pipet ucu yardımıyla 1/4 mukavemetli Murashige and Skoog (1/4 X MS) besiyerine (Murashige ve Skoog, 1962) takviye olarak % 0.5 (w/v) sükröz ve %

0.8 (w/v) agar (Sigma E) ilave edilen bazal besiyerine her bir petride yaklaşık 15-20 adet olarak yerleştirilmiştir. Bazal besiyerinin içeriği ve hazırlanmasıyla ilgili bilgiler Ek-1’de verilmiştir. Tohumların ekildiği petri kapları prafilm ile sarıldıktan sonra 4 °C’de 3 gün stratifiye edilmiş ve uzun gün fotoperiyodunda (16 saat ışık/8 saat karanlık) 24 °C’de kontrollü bir iklim dolabında % 60 nem ve 500 lux ışık (Philips marka floresan, 6500K tam gün ışığı) altında 15 gün çimlendirilmiştir. Çimlenen bitkiler 2:1 oranında torf (Klasmann Ts1) ve perlit içeren 5 litrelik saksılara her bir çeşitten 12 bitki olacak şekilde aktarılmıştır ve toprak doyma kapasitesine gelene kadar sulanarak aynı kabinde çiçeklenme periyoduna kadar büyütülmüştür.

3.1.2 Genetik çaprazlamalar

Bitkiler çiçekleme evresine gelince *cpl1-6* bitkisiyle *sos1-1*, *sos3-1*, *hkt1-1*, *sos1-1hkt1-1* ve *sos3-1hkt1-1* bitkileri melezlenmiştir. Bitkilerin çaprazlanması stereo mikroskop altında gerçekleştirilmiştir. *Arabidopsis thaliana* erkek ve dişi organı aynı çiçek üzerinde bulunan kendine tozlanan bir bitkidir. Çiçeği 4 tane taç yaprak (petal), 6 tane erkek orgn (stamen), 1 tane dişi organ (pistil) ve 4 tane çanak yaprak (sepal)’den oluşmaktadır. Çaprazlama yapılırken anne olarak kullanılan bitki çiçeğinin erkek organları çiçekten uzaklaştırılmalı ve seçilen çiçeğinin de kendine tozlanmamış olması gerekmektedir. Bu nedenle, bu tez çalışmasında bitki melezlemelerinin günün erken saatlerinde yapılmasına özen gösterilmiştir ve o gün yeni açılan ve kendine tozlanmayan çiçekler kullanılmıştır. Çaprazlama yapılırken ilk olarak stereo mikroskop altında anne olarak kullanılacak bitki çiçeğinin erkek organları ince uçlu cımbız yardımıyla taç yaprak ve çanak yapraklarıyla birlikte çiçekten uzaklaştırılmıştır. Bu aşamada anterlerin dişi organ üzerindeki stigmaya değmemesine dikkat edilmiştir. Ardından baba olarak kullanılacak bitkiden bir adet çiçek alınıp erkek organları uzaklaştırılan çiçeğin stigması üzerine değdirilerek baba bitki anterlerin anne bitki stigması üzerine yapışması sağlanmıştır. Çaprazlama işlemleri bitikten sonra stigmanın kurumaması için yaklaşık 1.5 cm çapında küçük bir parça streç film ile kapatılmış ve anne olarak kullanılan bitki çeşidi, baba olarak kullanılan bitki çeşidi ve tarih belirtilerek etiketlenmiştir. Bu şekilde her gün sabah saatlerinde yaklaşık iki hafta boyunca *cpl1-6* bitkisiyle *sos1-1*, *sos3-1*, *hkt1-1*, *sos1-1hkt1-1* ve *sos3-1hkt1-1* çaprazlama yapılmıştır. Çaprazlama yapılan melezlemeler Çizelge 3.2’de gösterilmiştir. Çaprazlama bitince bitkiler tekrardan büyüme kabine getirilip tohum oluşması beklenmiştir.

Çizelge 3.2. Çaprazlamada kullanılan bitki genotip sayıları

Anne bitki	Baba bitki	F ₁ genotipi	Çaprazlama yapılan bitki sayısı
<i>cpl1-6</i>	<i>sos1-1</i>	<i>cpl1-6 sos1-1</i>	10
<i>cpl1-6</i>	<i>sos3-1</i>	<i>cpl1-6 sos3-1</i>	6
<i>cpl1-6</i>	<i>hkt1-1</i>	<i>cpl1-6 hkt1-1</i>	12
<i>sos1-1</i>	<i>cpl1-6</i>	<i>sos1-1cpl1-6</i>	11
<i>sos3-1</i>	<i>cpl1-6</i>	<i>sos3-1cpl1-6</i>	7
<i>hkt1-1</i>	<i>cpl1-6</i>	<i>hkt1-1cpl1-6</i>	9

3.1.3 F₁, F₂ ve F₃ generasyonlarının PCR ile taranması ve doğrulanması

Çaprazlama yapılan bitkilerin tohum taslağında tohumlar oluşup kuruduktan sonra tohumlar 1.5 ml'lik eppendorf tüplere toplanmış ve 7 gün oda sıcaklığında kurutulmuştur. Ardından, her bir çaprazlamadan elde edilen 25-30 adet tohum tekli mutant tohumlarıyla paralel olarak 3.1.1'de anlatılan yöntemle yüzey sterilizasyonu yapıldıktan sonra 1/4 X MS içeren bazal besiyerine ekilmiş ve 4°C'de 3 gün stratifiye edilip, iklim dolabında çimlendirilmiştir. Çimlenen bitkiler 2:1 oranında torf ve perlit içeren 5 litrelik saksılara her bir melezden 20-25 bitki olacak şekilde aktarılmış ve toprak doyma kapasitesine gelene kadar sulanarak iklim dolabında büyütülmüştür. F₁ bitkilerin çaprazlanmasının (heterozigotluğun) doğrulanması için bütün bitkilerden genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. Devamında Çizelge 3.3'te gösterilen erkek bitkideki mutasyona özgü primer çifti kullanılarak PCR ile çoğaltım yapılmış ve erkek mutasyonların dişi üstüne elle tozlanıp tozlanamadığı doğrulanmıştır.

3.1.3.1 Genomik DNA izolasyonu

Bitkiler 7-8 yaprak evresine gelince numaralandırılıp her bir bitkiden yaklaşık 5-8 mm çapında yaprak örnekleri toplanarak genomik DNA izolasyonu yapılmıştır.

Çizelge 3.4. DNA izolasyon tamponu

Stok	250 ml için	son Derişim
1 M Tris-HCl pH 7.5	50 ml	200 mM Tris-HCl pH7.5
5 M NaCl	12.5 ml	250 mM NaCl
0.5 M EDTA pH 8.0	12.5 ml	25 mM NaCl
% 10 SDS	12.5 ml	% 0.5 SDS
saf su	162.5 ml	-

DNA izolasyonu Edwards vd. (1991) tarafından belirtilen yöntemde bazı değişiklikler yapılarak gerçekleştirilmiştir. Buna göre, iki grup eppendorf tüpü hazırlanmış ve her gruptaki tüpler DNA izolasyonu yapılacak bitkilerin numaralarıyla numaralandırılmıştır. Birinci gruptaki tüplere 200 µl DNA izolasyon tamponu (Çizelge 3.4), ikinci gruptaki tüplere 200 µl izopropanol eklenmiştir. DNA izolasyonu yapılacak bitkiler de tüplerle aynı şekilde numaralandırılmış ve her bir bitkiden yaklaşık 5-8 mm çapında yaprak örnekleri toplanarak aynı numaradaki DNA izolasyon tamponu içeren tüplere konulmuştur. Daha sonra örnekler mavi çubuklar (temiz ama otoklavlanmamış) yardımıyla oda sıcaklığında ezilmiştir. Parçalanmış örnekler 13,500 rpm devirde 4 ° C’de 5 dk santrifüj yapılmış ve üst faz izopropanol içeren ikinci gruptaki tüplere aktarılıp alt üst çevrilerek karıştırılmıştır. Tüpler – 20 °C’de gece boyunca çöktürme işlemi için bekletilmiştir. Ertesi gün tüpler 13,500 rpm devirde 4 ° C’de 5 dk santrifüj yapılmış ve üst faz atıldıktan sonra pelet 500 µl % 70’lik etanol ile yıkanmıştır. Daha sonra tüpler 13,500 rpm devirde 4 ° C’de 5 dk santrifüj yapılmış ve üst faz atılıp, 7-8 saniye spin yapılarak tüpün yan duvarlarında kalan etanol de uzaklaştırılmıştır. Tüplerin dibinde kalan pelet speedvac ile 25 °C’de 5-7 dk kurutulmuştur. Son olarak, DNA, 30 µl otoklavlanmış saf su ile 20 µl’lik pipet ucu yardımıyla çözüldükten sonra 3-4 saniye spin yapılmış ve PCR’da kullanmak üzere 4°C saklanmıştır.

3.1.3.2 PCR ve jel elektroforez

Genomik DNA örneklerinde ilgili mutasyonların var olup olmadığının belirlenmesinde polimeraz zincir reaksiyonu (polymerase chain reaction – PCR) tekniği kullanılmıştır. Elde edilen DNA örnekleri kullanılarak bitkilerin mutasyon içerip içermediklerinin test edilmesi için kullanılan PCR karışım içeriği, Çizelge 3.5’te verilmiştir. Mutasyonların belirlenmesinde kullanılan PCR programları Çizelge 3.6’te gösterilmiştir. Hazırlanan PCR karışımları her bir mutantın belirlenmesi için uygun PCR programında 35 döngü

olacak şekilde çoğaltılmış ve çoğaltılan PCR ürünleri agaroz jel elektroforezde koşturularak Col-0 kontrol bitkisi ve uygun tekil mutantlara kıyasla belirlenmiştir.

sos1-1 mutanti nokta mutasyonu içermekte olup PCR sonucunda çoğaltılan ampikon *SOS1* gen ampikonundan 14 baz kısadır (Shi vd., 2000). Bu tez çalışmasında *SOS1* yabancı tip ve *sos1-1* mutanti için PCR yapılırken kullanılan ileri ve geri primeler aynı olup, bu primer çiftleri *SOS1* yabancı tip için 115 bazlık bir bölgeyi çoğaltırken *sos1-1* mutantında ise 101 bazlık bir bölgeyi çoğaltmaktadır. Bu nedenle agaroz jelde *SOS1* yabancı tip ve *sos1-1* mutantını ayırıştırabilmek için PCR ürünleri etidyum bromür içeren % 2.5'lik agaroz jelde, geri kalan genlerde yabancı tip ve mutantın ayırıştırılabilmesi için % 1'lik agaroz jelde koşturulmuştur. PCR ampikon uzunluğuna bağlı olarak jel hazırlandıktan sonra yaklaşık 30 dk jelin donması beklenmiştir. Ardından 0.5 X'lik tris-borate-EDTA (TBE) içeren elektroforez tankına aktarılmış ve örnekler 5 µl PCR ürünü, 2 µl DNA jel yükleme boyası (6x) ve 5 µl otoklavlanmış saf su ile karıştırılıp jele yüklenmiştir. Markır olarak Thermo Scientific'in GeneRuler 100 bç'lik DNA markırı (Kat.No. SM0241) kullanılmıştır. *SOS1* PCR ürünleri 3 V/cm'de 90 dk koşturulmuş, geri kalan örnekler 5 V/cm'de en az 40 dk koşturulmuştur. Ardından UV ışığı altında BioRad görüntüleme sistemi aracılığıyla görüntülenmiştir.

Çizelge 3.5. PCR karışım içeriği

İçerik	Son konsantrasyon
10 x PCR reaksiyon tamponu	1x
20 mM dNTP karışımı	Her bir NTP'den 200 µM
İleri primer (10 µM)	250 nM
Ters primer (10 µM)	250 nM
25 mM MgSO ₄	1.5 mM
Taq DNA polimeraz (5 U/µL) ^a	0.5 U/µL
DNA ^b	0.5 – 1.5 µg/µl

^a Bütün PCR çoğaltımlarında ThermoFisher rekombinant Taq DNA polimeraz (Kat.No. EP0402) kullanılmıştır.

^b İzole edilen DNA örneklerinin konsantrasyonları 0.5 – 1.5 µg/µl aralığında olduğundan teker teker ölçülmemiş ve PCR için her birinden 2 µl kullanılmıştır.

Toplam hacim, steril saf su ile 20 µl'ye tamamlanmıştır.

Çizelge 3.3. Mutantların taranması için kullanılan primer dizileri ve PCR amplicon uzunlukları

Mutant	PCR çeşidi	İleri primer (5' – 3')	Ters primer (5' – 3')	Amplikon uzunluğu (bp)
<i>cpl1-6</i>	T-DNA PCR ₁ (GABI LB3)	CATACTCATTGCTGATCCATG	GAGACTGCTCGACGAATTTG A	500-600
	Yabancı tip PCR ₁	GCTGATACTGAAGTGGAGAG	GAGACTGCTCGACGAATTTG A	639
<i>sos1-1</i>	Mutant PCR ₁	GGCATTGCATCAGTTATTTGG	GGTCTACAGAAAGACGTACA G	101
	Yabancı tip PCR ₁			115
<i>sos3-1</i>	Mutant PCR ₁	GCTGTGCTTTCAAGTTACG	TTTATCTTTCCTTGCATGGC	713
	Yabancı tip PCR ₁	ATGTGCTTTCAAGTTGTACG	TTTATCTTTCCTTGCATGGC	725
<i>hkt1-1</i>	T-DNA PCR ₁ (SAIL LB1)	GCCTTTTCAGAAATGGATAAATAGCCT TG	TTACTTCCTCAATCCATGGG AG	~ 1100
	Yabancı tip PCR ₁	AGTAGACCTCTCTACACTTCC	TTACTTCCTCAATCCATGGG AG	665

Çizelge 3.6. Mutant taraması için kullanılan PCR programları

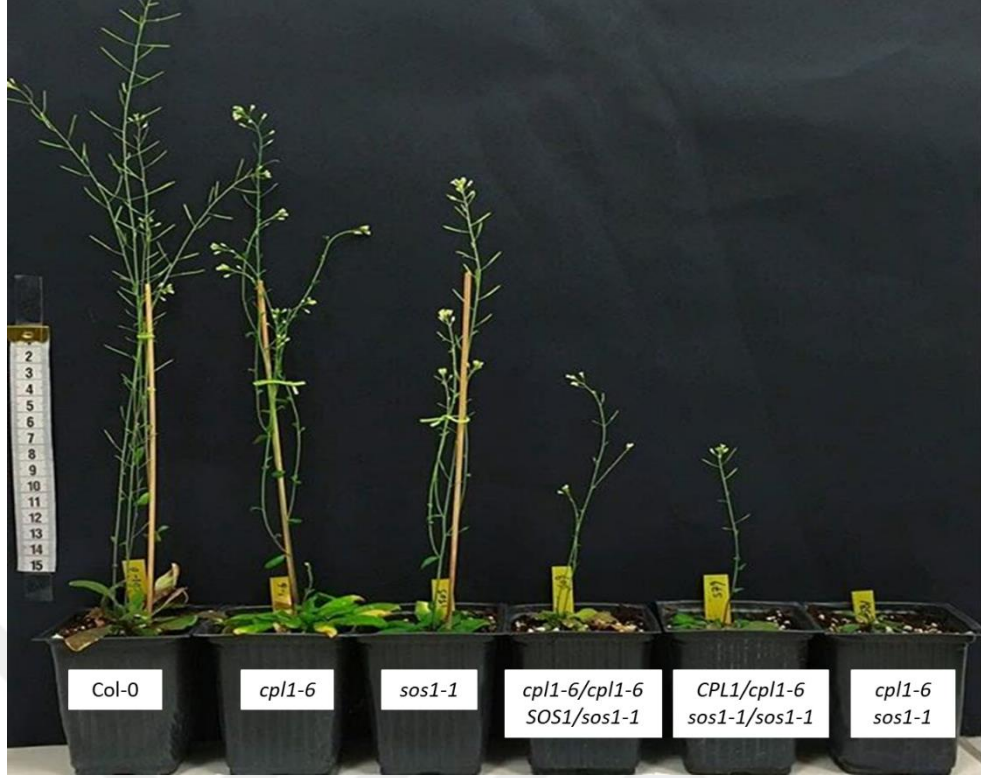
Program basamakları	PCR programları						
	<i>cpl1-6</i> T-DNA PCR ₁	<i>cpl1-6</i> Yabancı tip PCR ₁	<i>sos1-1</i> PCR ₁	<i>sos3-1</i> Yabancı tip PCR ₁	<i>sos3-1</i> Mutant PCR ₁	<i>hkt1-1</i> T-DNA PCR ₁	<i>hkt1-1</i> Yabancı tip PCR ₁
Öncü denatürasyon (94°C)	3 dk.	3 dk.	3 dk.	3 dk.	3 dk.	3 dk.	3 dk.
Denatürasyon (94°C)	30 sn.	30 sn.	30 sn.	30 sn.	30 sn.	30 sn.	30 sn.
Primer bağlanma	50 °C 30 sn.	50 °C 30 sn.	51 °C 30 sn.	44 °C 30 sn.	44 °C 30 sn.	48 °C 30 sn.	48 °C 30 sn.
Uzatma (72°C)	40 sn.	40 sn.	30 sn.	30 sn.	30 sn.	70 sn.	70 sn.
Son uzatma (72°C)	5 dk.	5 dk.	5 dk.	5 dk.	5 dk.	5 dk.	5 dk.

PCR, 35 döngü olarak yapılmıştır.

3.1.3.3 *cpl1-6sos1-1* homozigot bitkisinin elde edilmesi

Homozigot *cpl1-6sos1-1* çifte mutant bitkilerini elde etme amacıyla *cpl1-6* (anne) ile *sos1-1* (baba) çaprazlamasından elde edilen tohumlardan 30 tanesi 3.1.1’de belirtilen yönteme göre ekilerek 27 adet F₁ bitkisi yetiştirilmiştir. Bu bitkilerden 3.1.2.1’de belirtilen yöntemle genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. Ardından elde edilen DNA  rnekleri kullanılarak F₁ bitkilerinin *sos1-1* mutasyonunu içerip içermediklerini tespit etmek için *SOS1* yabancı tip ve *sos1-1* mutantına özgü primerler aracılığıyla PCR yapılmıştır. Deneyde Col-0 negatif kontrol, homozigot *sos1-1* tekli mutanı ise pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. PCR ile tarama sonucunda 27 adet F₁ bitkisinden bir tanesinin  aprazlamasının başarılı olduğu ortaya çıkmıştır. Bu bitkiden tohum toplamak için bitki iklim dolabında büyümeye devam ettirilmiştir. Bitki tohum oluşturup tohumları kuruduktan sonra tohumlar eppendorf tüplere toplanmıştır ve oda sıcaklığında 7 gün kurutulmuştur.

Toplanan F₂ tohumları F₁ tohumlarıyla aynı yöntemle  implendirilip büyütülmüştür ve 7-8 yaprak evresine gelince numaralandırılıp genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. Ardından her bir bitki için ayrı ayrı *sos1-1* PCRı, *CPL1* yabancı tip PCRı ve *cpl1-6* T-DNA PCRı yapılarak bitkilerin homozigot veya heterozigotluğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada 3 bağımsız deney kurulmuş olup, birinci deneyde 72 adet F₂ bitkisinden 4 adet ve ikinci deneyde 87 adet F₂ bitkisinden 4 adet homozigot *cpl1-6sos1-1* bitkisi elde edilirken,   nc c  deneyde 92 adet F₂ bitkisinden hiç  ifte mutant elde edilememiştir. Fakat bu deneylerde elde edilen homozigot F₂ *cpl1-6sos1-1*  ifte mutant bitkileri yetişirken, bitkiler bodur kalmış,  i ek açmamıştır (Şekil 3.1). Bu nedenle homozigot F₂ *cpl1-6sos1-1*  ifte mutantlarından tohum toplanamamış ve ileriki deneylerde *cpl1-6sos1-1* homozigot bitkiler kullanılamamıştır.



Şekil 3.1. F₂ *cpl1-6sos1-1* çifte mutant bitkilerinin morfolojisi

3.1.3.4 *cpl1-6sos3-1* homozigot bitkisinin elde edilmesi

cpl1-6sos3-1 homozigot bitki elde etme amacıyla *cpl1-6* (anne) ile *sos3-1hkt1-1* (baba) çaprazlamasından elde edilen F₁ tohumlardan 2 tane F₁ bitki yetiştirilmiştir ve bu bitkilerden 3.1.2.1’de gösterildiği yöntemle genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. Ardından elde edilen DNA örnekleri kullanılarak F₁ bitkilerinin *hkt1-1* mutantını içerip içermediklerini tespit etmek için *hkt1-1* T-DNA PCR yapılmıştır. Deneyde Col-0 negatif kontrol, *hkt1-1* homozigot pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. PCR ile tarama sonucunda 2 tane F₁ bitkiden bir tanesinin çaprazlaması başarılı olduğu ortaya çıkmıştır ve bu bitkiden tohum toplamak için iklim dolabında büyümeye devam ettirilmiştir. Bitki tohum oluşturup tohumları kuruduktan sonra tohumlar eppendorf tüplere toplanmıştır ve oda sıcaklığında 7 gün kurutulmuştur.

Toplanan F₂ tohumlar F₁ tohumlarıyla aynı yöntemle çimlendirilip büyütülmüştür ve 7-8 yaprak evresine gelince numaralandırılıp genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. Ardından her bir bitki için ayrı ayrı *CPL1* yabancı tip PCR ve *cpl1-6* T-DNA PCR;

SOS3 yabancı tip PCR ve *sos3-1* mutant PCR; *HKT1* yabancı tip PCR ve *hkt1-1* T-DNA PCR yapılarak bitkilerin homozigot veya heterozigotluğu ayrıştırılmıştır.

Bu çalışmada toplam 117 tane F₂ bitkiden PCR taraması yapılmış olup, tarama sonucunda 3 tane *cpl1-6sos3-1* homozigot bitki elde edilmiştir. Ardından doğrulama amacıyla bu 3 bitkiden tekrardan DNA izole edilip *CPL1* yabancı tip PCR ve *cpl1-6* T-DNA PCR; *SOS3* yabancı tip PCR ve *sos3-1* mutant PCR; *HKT1* yabancı tip PCR ve *hkt1-1* T-DNA PCR yapılmıştır ve hepsinin *cpl1-6sos3-1* homozigot olduğu kanatlanmıştır. Elde edilen 3 tane *cpl1-6sos3-1* homozigot bitkileri iklim dolabında büyümeye devam ettirilmiştir ve tohum oluşup tohumlar kuruduktan sonra ayrı ayrı tüplere tohumlar toplanmıştır. Tohumlar 7 gün oda sıcaklığında kurutulduktan sonra her bir tüpten 5 adet tohum çimlendirip büyütülerek toplam 15 adet F₃ bitkisi elde edilmiştir ve bu bitkilerden de DNA izole edilip PCR yapılarak F₃ generasyonunda tekrardan doğrulama yapılmış ve ilerdeki çalışmalarda kullanmak üzere yeterince *cpl1-6sos3-1* homozigot tohumu elde edilmiştir.

3.1.3.5 *hkt1-1cpl1-6* homozigot bitkisinin elde edilmesi

Homozigot *hkt1-1cpl1-6* çifte mutant bitkilerini elde etme amacıyla *sos1-1hkt1-1* (anne) ile *cpl1-6* (baba) çaprazlamasından elde edilen F₁ tohumlarından 5 adet F₁ bitkisi yetiştirilmiştir. Bu bitkilerden 3.1.2.1’de belirtilen yöntemle genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. Ardından elde edilen DNA örnekleri kullanılarak F₁ bitkilerinin *hkt1-1* mutasyonunu içerip içermediklerini tespit etmek için *hkt1-1* T-DNA PCR yapılmıştır. Deneyde Col-0 negatif kontrol, homozigot *hkt1-1* tekli mutantı pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. PCR ile tarama sonucunda 5 adet F₁ bitkisinden bir tanesinin çaprazlamasının başarılı olduğu ortaya çıkmıştır. Bu bitkiden tohum toplamak için bitki iklim dolabında büyümeye devam ettirilmiştir. Bitki tohum oluşturup tohumları kuruduktan sonra tohumlar eppendorf tüplere toplanmıştır ve oda sıcaklığında 7 gün kurutulmuştur.

Toplanan F₂ tohumları F₁ tohumlarıyla aynı yöntemle çimlendirilip büyütülmüştür ve 7-8 yaprak evresine gelince numaralandırılıp genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. Ardından her bir bitki için ayrı ayrı *CPL1* yabancı tip PCRı ve *cpl1-6* T-DNA PCRı;

SOS1 yabancı tip PCR₁ ve *sos1-1* mutant PCR₁; *HKT1* yabancı tip PCR₁ ve *hkt1-1* T-DNA PCR₁ yapılarak bitkilerin homozigot veya heterozigotluğu belirlenmiştir.

Bu çalışmada toplam 138 adet F₂ bitkisinden PCR taraması yapılmış olup, tarama sonucunda 3 adet homozigot *hkt1-1cpl1-6* çifte mutant bitki elde edilmiştir. Ardından doğrulama amacıyla bu 3 bitkiden tekrardan genomik DNA izole edilip *CPL1* yabancı tip PCR₁ ve *cpl1-6* T-DNA PCR₁; *SOS1* yabancı tip PCR₁ ve *sos1-1* mutant PCR₁; *HKT1* yabancı tip PCR₁ ve *hkt1-1* T-DNA PCR₁ yapılmıştır. Sonuçta, bir bitkinin homozigot *hkt1-1cpl1-6* çifte mutant olduğu kanatlanmıştır. Elde edilen homozigot *hkt1-1cpl1-6* bitkisi iklim dolabında büyümeye devam ettirilmiştir ve tohum oluşup bitkiler kurduktan sonra tohumları toplanmıştır. Tohumlar 7 gün oda sıcaklığında kurutulduktan sonra 8 adet tohum çimlendirip büyütülerek F₃ bitkisi elde edilmiştir. Daha sonra bu bitkilerden de genomik DNA izole edilip PCR yapılarak F₃ generasyonunda tekrardan doğrulama yapılmıştır. Doğrulama sonucunda bu bitkilerin hepsinin homozigot *hkt1-1cpl1-6* olduğu saptanmıştır. Bu sayede, ilerideki çalışmalarda kullanılmak üzere yeterli homozigot *hkt1-1cpl1-6* çifte mutant tohumu elde edilmiştir.

Sonuç olarak, bu aşamada laboratuvar stoklarımızda mevcut olan mutant tohumları kullanılarak genetik çaprazlama ve PCR ile tarama sonucunda ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere homozigot *cpl1-6sos3-1* ve homozigot *hkt1-1cpl1-6* tohumları elde edilmiştir. Lakin, *cpl1-6sos1-1* çifte mutant bitkileri bodur kalmış ve çiçek açmamıştır. Bu nedenle F₂ generasyonundaki homozigot *cpl1-6sos1-1* çifte mutantlarından tohum toplanamamış ve ileriki çalışmalarda kullanılmamasına karar verilmiştir.

3.2 Bitkilerin Büyütülmesi ve Stres Uygulaması

3.2.1 Genel büyütme koşulları

Bu tez çalışmasında Col-0 ekotip, *cpl1-6*, *sos1-1*, *sos3-1*, *hkt1-1*, *sos1-1hkt1-1* ve *sos3-1hkt1-1* mutant tohumları ile çaprazlamalar sonucunda elde edilen *cpl1-6sos3-1* ve *hkt1-1cpl1-6* tohumları kullanılmış olup, tohumlar paralel olarak yetiştirilmiş, çalışmalarda kullanılan tohumların eski olmamasına dikkat edilmiştir.

Yüzey sterilizasyonu için tohumlar % 70 etanol ile 30 sn çalkalandıktan sonra 3 kez steril saf su ile yıkanmıştır. Bütün deneylerde steril besiyeri ortamında 90x15 mm (çap x yükseklik) boyutundaki steril plastik petri kapları içerisinde büyütülen bitkiler kullanılmıştır. Bitkilerin büyütülmesinde 1/4 mukavemetli Murashige and Skoog (1/4 X MS) besiyeri kullanılmış olup, besiyerine takviye olarak % 0.5 (w/v) sükröz ve % 1.5 (w/v) agar (Sigma E) ilave edilmiştir (Bu besiyeri bazal besiyeridir). Stres uygulamalarının kolay yapılabilmesi için petri kutusunun büyüklüğünde kesilen selofan membranlar (Sigma, Kat.No. GESE542) otoklavda steril edildikten sonra besiyerinin üzerine yerleştirilmiştir. Üzerindeki nano boyutlu delikler sayesinde membranlar besin geçişine olanak tanımakta ve bitki stres uygulamalarında sıklıkla kullanılmaktadırlar (Koiwa vd., 2006; Kang vd., 2008; Aksoy vd., 2013). Bu membranın üzerine tohumlar yerleştirilip petriler 4 °C’de 3 gün stratifiye edildikten sonra uzun gün fotoperiyodunda (16 saat ışık/8 saat karanlık) 24 °C’de kontrollü bir iklim dolabında, % 60 nem ve 500 lux altında 4 gün büyütülmüştür.

Hidroponik deneyi için ¼ x MS ortamında 15 gün çimlendirilen bitkiler 1/4 mukavemetli Hoagland besin çözeltisinde 2 hafta büyütülmüştür.

3.2.1.1 Hoagland çözeltisinin hazırlanması

Çözeltinin hazırlanması için makroelementler Çizelge 3.7’de verilen miktara göre her birinden 250 ml hazırlanmış, mikroelementler Çizelge 3.8’de verildiği miktara göre tartıldıktan sonra hepsi birlikte çözülerek 100 ml minör karışımı hazırlanmıştır. Hoagland besin çözeltisini hazırlamak için gerekli stok makro- ve mikro-besin element çözeltileri 4 °C’de muhafaza edilmiştir.

Çizelge 3.7. 1/4 x Hoagland besin çözeltisi içeriği (Hoagland ve Arnon, 1950)

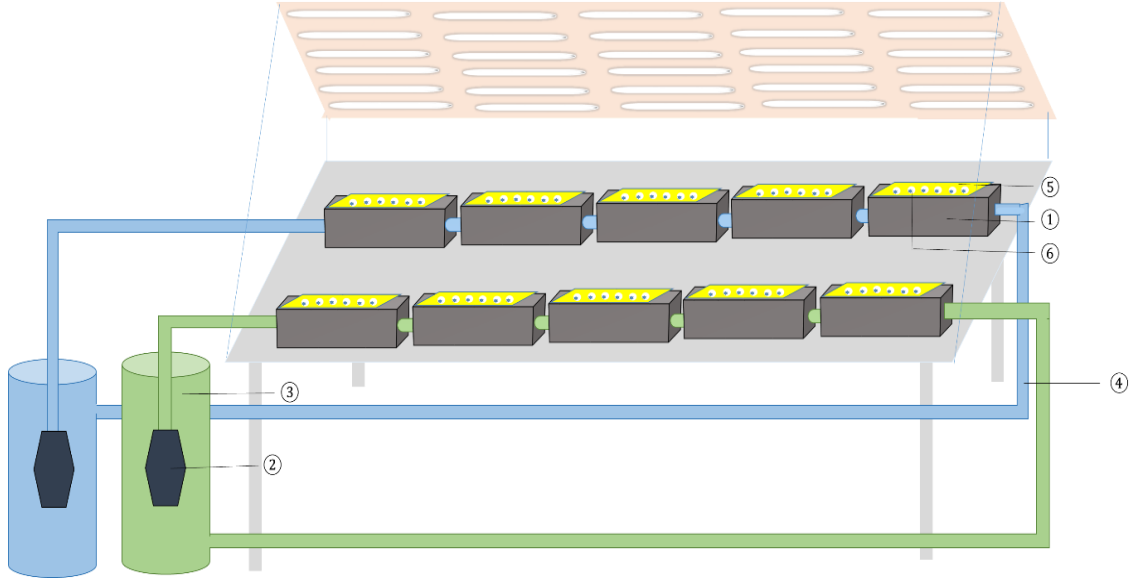
Elementler	Moleküler Ağırlık	Stok konsantrasyonu	g / 250 ml stok	Son konsantrasyon	ml stok / son hacim 30 L
KNO ₃	101.10	2 M	50.55	2.5 mM	18.75
FeNa-EDTA	367.00	20 mM	1.83	2.5 µM	18.75
KH ₂ PO ₄	136.09	1 M	34.02	2.0 mM	15.00
MgSO ₄	120.47	2 M	123.23	1.0 mM	7.50
CaCl ₂ .2H ₂ O	147.02	2 M	73.51	1.0 mM	7.50
NH ₄ NO ₃	080.04	2 M	40.2	1.0 mM	7.50
minör	-	-	-	-	7.50

Çizelge 3.8. Hoagland besin çözeltisinin hazırlanmasında kullanılan minör içeriği

Elementler	Moleküler Ağırlık	Stok konsantrasyonu	Son konsantrasyon	g / 100 ml stok
H ₃ BO ₃	61.83	70 mM	17.5 µM	0.43
MnCl ₂	179.91	14 Mm	3.50 µM	0.28
CuSO ₄	249.69	0.5 mM	0.125 µM	0.0125
ZnSO ₄	287.54	1.0 mM	0.250 µM	0.0288
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	241.95	0.2 mM	0.050 µM	0.004839

3.2.1.2 Hidroponik sistem

Col-0, *cpl1-6*, *sos1-1*, *sos3-1*, *hkt1-1*, *sos1-1hkt1-1* ve *sos3-1hkt1-1* mutant tohumları ile çaprazlamalar sonucunda elde edilen *cpl1-6sos3-1* ve *hkt1-1cpl1-6* tohumları yüzey sterilizasyonu tamamlandıktan sonra 15 gün süresince iklim dolabında çimlendirdikten sonra Şekil 3.9'de gösterildiği gibi önceki çalışmalardan ilham alınarak tasarlanan hidroponik sistemine aktarılıp bitkilerin büyümesi ve stres uygulanması bu hidroponik sistemde gerçekleştirilmiştir (Smeets vd., 2008; Conn vd., 2013; Zeng vd., 2018). Hidroponik sistem için uzunluğu 40 cm, genişliği 28 cm, yüksekliği 10 cm (hacmi 11.2 litre) olan 10 adet dikdörtgen şeffaf plastik kutu ①; alt çapı 30 cm, üst çapı 40 cm, yüksekliği 30 cm (hacmi 29.045 litre) olan 2 adet kesik koni şeklindeki kova ②; 2 adet WP-2880 tipli akvaryum pompası ③; yaklaşık 20 m uzunluktaki su borusu ④; uzunluğu 39 cm, genişliği 27.5 cm olan 10 adet izolasyon köpüğü ⑤; yaklaşık 1500 adet uzunluğu ve genişliği 1 cm, yüksekliği 5 cm olacak şekilde kesilen sünger parçaları ⑥ kullanılmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Hidroponik sistem şematığı

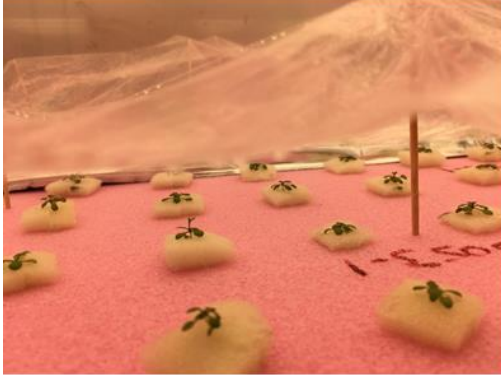
Hidroponik sistemin kurulması için şeffaf dikdörtgen kutular dış kısmında siyah akrilik boya ile boyanıp ardından matkap yardımıyla iki yandan 3 cm çapında delikler açıldıktan sonra 10 cm uzunluğundaki plastik boru ile 5 adet kutu bir grup olacak şekilde birbirine bağlanmış ve bu iki grup kutu toplu olarak iklim dolabına yerleştirilmiştir. Her bir grup kutu için 1. ve 5. kutunun baş ve sonundaki deliğe 1 m ve 4 m uzunluktaki borular silikon yardımıyla sabitleştirilip birinci kutuya bağlı olan burunun ucuna akvaryum pompası yerleştirilmiştir. Kutuların sol tarafına 2 adet kova yerleştirilmiş ve 3.2.1.1’de belirtilen yöntemle göre 160 litre, pH’sı 5.7 olan Hoagland çözeltisi hazırlanıp tüm kutu ve kovalar hoaglan çözeltisi ile doldurulmuştur. Her bir grup için ucuna birinci kutudan gelen boru takılan akvaryum pompası ve beşinci kutudan gelen borunun ucu Hoagland çözeltisi doldurulan kovanın içine yerleştirilmiş ve pompa çalıştırılıp Hoagland çözeltisinin stok ile kutular arasında devirdaim olması sağlanmıştır. Bu sırada besin solüsyonuna doğal oksijen girişi sağlanmıştır.

Bitkilerin Hoagland çözeltisi üstünde yüzebilmesini sağlamak için 10 adet uzunluğu 39 cm (kutunun uzunluğundan 1cm kısa), genişliği 27.5 cm (kutu genişliğinden 0.5 cm kısa) olan izolasyon köpüğü kullanılmış olup, her birinin üzerine 1.5 cm çapında 40 adet delik açılmıştır. Ardından 15 gün iklim dolabında çimlendirilen bitkiler cımbızla alınmış ve bitkilerin kökleri 2 adet uzunluğu ve genişliği 1 cm, yüksekliği 5 cm olacak şekilde kesilip Hoagland çözeltisi ile ıslatılan sünger arasına konulduktan sonra cımbız ile köpüklü süngerdeki delikler içine yerleştirilmiştir. Bitkilerin aktarılması bitince

izolasyon köpükleri vakit kaybetmeden Hoagland içeren kutulara yerleştirilmiş ve bitkilerin kurummasını önlemek için üzerleri streç film ile kapatılmıştır. Böylece her bir kutuya 40 adet bitki aktarılmış olup her bir çeşitten bir uygulamada 40 bitki olarak toplam 400 bitki aktarılmıştır. Bitkiler aktarıldıktan sonra 3 gün streç film ile kapalı kalmış, 3. günün sonunda streç film üzerinde ufak delikler açılarak bitkilerin aklimatasyonu sağlanmış ve 2 haftaya kadar üzeri kapalı kalmıştır. Bu çalışmada bitkilerin tutunması için kullanılan sünger beyaz olduğu için ışık geçirebilmekte ve bundan dolayı süngerin etrafında yosun büyümeye başladığı gözlemlenmiştir. Bu durumu engellemek için siyah bezle sünger kapatılmıştır (Şekil 3.3; Şekil 3.4). Deney süresince Hoagland besin çözeltisinin miktarının aynı kalmasını sağlamak için deneyi başlatmadan önce stoktaki Hoagland besin çözeltisinin seviyesi markör kalem ile kova üzerine işaretlenmiş ve Hoagland çözelti seviyesinin düştüğü halde yeniden hazırlanıp üstüne ilave edilmiştir.



Şekil 3.3. Hidroponik sistemin genel görünümü



A



B



C



D

Şekil 3.4. Hidroponik sisteminde bitkilerin büyüme aşamaları. (A) Yeni hidroponik sistemine aktarılan bitkiler, 0. gün. (B) Hidroponik isteminde normal koşullarda bir hafta büyütülen bitkiler. (C) Hidroponik isteminde normal koşullarda iki hafta büyütülen bitkilerin kök görüntüsü. (D) Hidroponik isteminde normal koşullarda 3 hafta büyütülen bitkilerin görüntüsü.

3.2.2 Stres uygulaması

In vitro tuz stresi uygulamalarında deneye bağlı olarak farklı sodyum klorür (NaCl) dozları uygulanmıştır. Çimlenme deneyi için tohumlar 0, 100, 120, 150 ve 200 mM NaCl içeren besiyerlerine ekilmiş ve 5, 7 ve 10. günlerinde çimlenen tohum sayısı alınmıştır (Quesada vd., 2000). Kök uzunluğu deneylerinde 0, 10, 25, 30, 50, 75, 90 ve 100 mM NaCl içeren besiyerleri kullanılmış ve bitkilerin tuz ortamına aktarılmasını takiben 5 gün boyunca her gün kök uzunlukları markör kalem ile işaretlenmiştir (Shi vd., 2000; Qiu vd., 2002). Petri deneyinde tüm işlemler laminar flowun içinde yapılmış ve bitkilerin çimlenme ve büyütülmesi kontrollü iklim dolabında gerçekleştirilmiştir.

Hidroponik deneyde bitkiler Hoagland besin çözeltisinde 2 hafta büyütüldükten sonra stres uygulanması başlatılmıştır. Buna göre iki grup olarak kurulan hidroponik sistemdeki birinci grup bitkiler kontrol olarak normal Hoagland solüsyonunda büyümeye devam ettirilmiştir. İkinci gruptaki bitkilere tuz stresi uygulamak üzere her bir kutu ve stoktaki Hoagland miktarı tekrardan hesaplanmış ve 4 litre 1.5 M NaCl hazırlanıp Hoaglandın miktarına göre üstüne ilave edilerek her bir kutu ve stoktaki NaCl konsantrasyonunun 50 mM olması sağlanmıştır. Bitkilere 1 hafta stres uygulanmıştır.

3.3 Fizyolojik Ölçümler

Col-0, *cpl1-6*, *sos1-1*, *sos3-1*, *hkt1-1*, *sos1-1hkt1-1*, *sos3-1hkt1-1* ve *cpl1-6sos3-1*, *hkt1-1cpl1-6* mutantlarının tuz stresi altında göstermiş oldukları fizyolojik tepkileri değerlendirmek ve stresin yol açtığı değişiklikleri belirlemek için stres uygulaması sırasında ve stres uygulanması sonucunda stres uygulanan ve kontrol bitkilerinden aşağıdaki fizyolojik ölçümler alınmıştır.

3.3.1 Kök uzunlukları

Tohumlar yüzey sterilizasyonu yapıldıktan sonra stres uygulamalarının kolay yapılabilmesi için petri kutusunun büyüklüğünde kesilen selofan membranlar (Sigma, Kat.No. Z377600) otoklavda steril edilmiş ve besiyerinin üzerine yerleştirilmiştir (Koiwa vd., 2006). Devamında tohumlar membran üzerine yerleştirilip 4 °C'de 3 gün stratifiye edildikten sonra iklim dolabında dikey olarak yerleştirilip 4 gün çimlendirilmiştir. Ardından çimlenen bitkicikler cımbız yardımıyla selofan membranla birlikte alınıp 0, 10, 25, 30, 50, 75, 90 ve 100 mM NaCl içeren ¼ x MS ortamına aktarılmış ve 5 gün daha büyütülmüştür. Deney her bir çeşit için her petride 6-7 adet bitki olacak şekilde 5 biyolojik tekrar olarak yapılmıştır.

cpl1-6sos1-1 çifte mutantının tuz stresine olan etkisini anlayabilmek için *cpl1-6* ile *sos1-1* melezlenmesinden elde edilen F₂ tohumlarına yüzey sterilizasyonu yapıldıktan sonra selofan membran üzerine yerleştirilip 4 °C'de 3 gün stratifiye edilmiştir. Ardından iklim dolabında dikey olarak yerleştirilip 4 gün çimlendirilmiştir. Çimlenen bitkicikler cımbız yardımıyla selofan membranla birlikte alınıp 0 ve 10 mM NaCl içeren ¼ X MS

ortamına aktarılmış ve 5 gün daha büyütülmüştür. Deney her bir çeşit için her petride 10 adet bitki olacak şekilde 8 biyolojik tekrar olarak yapılmıştır. Bitkilerin homozigot ve heterozigotluğunu anlamak için de tüm bitkilerden tek tek DNA izolasyonu ve PCR yapılmış ve deney sonucunda genotiplerin kök uzunlukları analiz edilmiştir.

Stres uygulamasının başlangıcından itibaren 5 gün boyunca hergün bitkilerin kök uzunlukları markör kalem ile işaretlenmiştir. Beşinci günün sonunda bitkiler fotoğraflanmış ve Aksoy vd. (2013)'da anlatıldığı gibi kök uzunlukları ImageJ (Abramoff vd., 2004) yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir.

3.3.2 Kök ve gövde yaş ve kuru ağırlıkları

Ölçümler hidroponik ortamda yetiştirilen kontrol ve stres koşullarında bulunan tüm bitkilerden stres uygulamasının akabinde (7. günün sonunda) yapılmıştır. Kök ve gövde yaş ve kuru ağırlıklarını almak için bitki örnekleri toplanmış ve kök ile gövdeleri ayrılarak Aksoy vd. (2013)'da anlatıldığı gibi yaş ağırlığı tartılmıştır. Daha sonra örnekler 65 °C fırında 24 saat kurutuluş ve kuru ağırlıkları tartılmıştır. Bu deneyde her bir uygulamaya ait 6 farklı bitkinin kök ve gövdelerin yaş ve kuru ağırlıkları alınmış ve ortalama değer hesaplanmıştır.

3.3.3 SPAD değeri (yaprak klorofil indeksi)

Yaprak klorofil indeksi hidroponik ortamda yetiştirilen kontrol ve stres koşullarında bulunan tüm bitkilerden stres uygulamasının akabinde (7. günün sonunda) yapılmıştır. Ölçümler bitkilerin gelişimini tamamlamış en üstteki 4. yapraktan Minolta SPAD 502 Klorofilmetreyle her bir yapraktan 3 defa ölçüm alınıp cihaz yardımıyla ortalama değeri hesaplanmıştır. Deney her bir uygulamaya ait 6 biyolojik tekrar olarak yapılmış ve ortalama değerleri hesaplanmıştır.

3.3.4 Yaprak sıcaklığı (°C)

Yaprak sıcaklığı hidroponik ortamda yetiştirilen kontrol ve stres koşullarında bulunan tüm bitkilerden stres uygulamasının akabinde (7. günün sonunda) yapılmıştır. Ölçümler bitkilerin gelişimini tamamlamış en üstteki 4. yapraktan kızılötesi termometre (IRT,

MASTECH BM380 Lazer Sıcaklık Ölçüm Cihazı) yardımıyla her bir yapraktan 3 defa ölçüm alınıp ortalama değer hesaplanmıştır. Deney her bir uygulamaya ait 6 biyolojik tekrar olarak yapılmış ve ortalama değerleri hesaplanmıştır.

3.3.5 Kök ve yaprak taze ve kuru ağırlığı ile oransal su içeriği

Ölçümler hidroponik ortamda yetiştirilen kontrol ve stres koşullarında bulunan tüm bitkilerden stres uygulamasının akabinde (7. günün sonunda) yapılmıştır. Kök ve yaprak taze ve kuru ağırlığı ile oransal su içeriği analizi için bitki örnekleri toplanmış ve kök ile gelişimini tamamlamış en üstteki 4. yapraklar ayrılıp hemen hassas terazide tartılarak taze ağırlıkları kaydedilmiştir. Daha sonra taze kök ve yapraklar saf su içerisinde gece boyu bekletilmiş ve turgor haldeki ağırlığı ölçülerek kaydedilmiştir. Ardından turgor haldeki kök ve yaprak örnekleri 65 °C fırında 24 saat kurutuluş ve kuru ağırlığı tartılarak kaydedilmiştir. Oransal su içeriği, elde edilen değerlerin aşağıdaki eşitliğe yerleştirilmesiyle hesaplanmıştır. Deneyde her bir uygulamaya ait 3 farklı bitkinin kök ve yapraklarının taze ve kuru ağırlığı ile oransal su içeriği analizi yapılmış ve ortalama değer hesaplanmıştır.

$$\text{Oransal Su İçeriği} = [(\text{Taze Ağırlık} - \text{Kuru Ağırlık}) / (\text{Turgor Ağırlık} - \text{Kuru Ağırlık})] * 100$$

3.4 Biyokimyasal Analizler

Biyokimyasal analizler hidroponik ortamda yetiştirilen kontrol ve stres koşullarında bulunan tüm bitkilerden stres uygulamasının akabinde (7. günün sonunda) yapılmıştır.

3.4.1 Klorofil miktar tayini

Klorofil miktar tayini çalışmaları klorofilin foto-transformasyonunu engellemek için loş ışık altında yapılmıştır. Çalışmada gelişimini tamamlamış en üstteki 4. yapraklar kullanılmıştır. Yaklaşık 50 mg yaprak örnekleri tartılmış ve 1 ml soğuk % 75 (v/v)'lik soğuk aseton içerisinde TissueLyser (Qiagen) aracılığıyla her saniyede 30 frekansta 50 saniye çalkalanarak dokuların parçalanması sağlanmıştır. Akabinde örnekler 2 ml'lik eppendorf tüpler içerisinde 4°C'de gece boyu bekletilmiştir. Daha sonra örnekler

4°C'de 5000 rpm'de 10 dk. santrifüj edildikten sonra 750 µl üst faz alınıp klorofil a, klorofil b ve toplam karotenoid miktarların belirlenebilmesi için UV-Viz spektrofotometrede (Shimadzu, UV-1800) aracılığıyla 470 nm, 646.8 nm ve 663.2 nm dalgaboylarındaki absorbans değerleri alınıp not edilmiştir. Ölçümler UV-Viz spektrofotometrede bitki örneği koyulmamış % 75 (v/v)'lik aseton kullanılarak sıfırlandıktan sonra alınmıştır. Lichtenthaler (1987) tarafından verilen aşağıdaki hesaplamalar kullanılarak toplam klorofil ve karotenoid miktarları hesaplanmıştır. Sonuçlar mg/g yaş ağırlık cinsinden verilmiştir. Deney her bir uygulamaya ait 6 biyolojik tekrar olarak yapılmıştır.

$$\text{Klorofil a} = 10.3 \times A_{663.2} - 0.918 \times A_{646.8} \text{ (mg ml}^{-1}\text{)}$$

$$\text{Klorofil b} = 19.7 \times A_{646.8} - 3.87 \times A_{663.2} \text{ (mg ml}^{-1}\text{)}$$

$$\text{Toplam klorofil} = \text{Klorofil a} + \text{Klorofil b} \text{ (mg ml}^{-1}\text{)}$$

$$\text{Karotenoid} = 5.02 \times A_{470} \text{ (mg ml}^{-1}\text{)}$$

3.4.2 Malondialdehit (MDA) tayini

Analiz, kontrol ve stres koşullarında bulunan tüm bitkilerde stres uygulamasının akabinde lipid peroksidasyonunda son ürün olan MDA miktarını belirlemede kullanılan 2-Thiobarbiturik asit (TBA) testiyle gerçekleştirilmiştir. Heath ve Packer (1968) yöntemine göre yapılan analizde, sıvı azot içinde parçalanıp – 80 °C'de depolanan kök örnekleri (100 mg) 1 ml (w/v) % 0,1'lik trikloroasetik asit (TCA) solüsyonu ile vorteks yapılarak karıştırılmış ve örnekler 10.000 g' de 10 dk. santrifüj edilmiştir. Elde edilen üst fazdan 500 µl alınmış ve üzerine % 0,5 (w/v) TBA içeren % 20'lik (w/v) TCA çözeltilisinden 500 µl eklendikten sonra alt üst çevirilip karıştırılmıştır. Karışım 90 °C'deki su banyosunda 20 dk. inkübe edildikten sonra reaksiyonu durdurmak için tüpler buz içerisinde 2 dk. bekletilmiştir. Örnekler oda sıcaklığına gelince 10.000 g'de 5 dk. santrifüj edilmiş ve 750 µl üst faz alınıp absorbansı 532 nm ve 600 nm'de okunmuştur. MDA miktarı, 155 mM⁻¹cm⁻¹ katsayı değeri kullanılarak hesaplanmıştır. Absorbans ölçümünde, % 0,5 TBA içeren % 20'lik TCA çözeltilisi kör olarak kullanılmıştır. Deney her bir uygulamaya ait 4 biyolojik tekrar olarak yapılmıştır.

3.4.2 Element seviyelerinin tayini

Analiz, kontrol ve stres koşullarında bulunan tüm bitkilerde stres uygulamasının akabinde yapılmıştır. Bitkilerin kök ve yaprakları ayrılarak kuru ağırlıkları tartılmış ve Aksoy vd. (2013)'de belirtilen yöntem takip edilerek kök ve yapraklarında biriken Na⁺ miktarları Endüktif Eşleşmiş Plazma Kütle Spektrometresi (ICP-MS) yardımıyla belirlenmiştir. Buna göre, alınan örneklerin kök ve gövdeleri ayrıldıktan sonra 65 °C'de 24 saat kurutulmuştur (Aksoy vd., 2013). Kurutulan örnekler her bir ölçüm için 50-70 mg olacak şekilde tartılmış ve kuru ağırlıkları kaydedildikten sonra aside dayanıklı borosilikat test tüplerinin içerisine konulmuştur. Test tüplerinin içerisindeki örnekler 4 mL % 98.8 nitrik asit (HNO₃) (tekrar damıtılmış) ve 1 mL hidroklorik asit (HCl) içerisinde gece boyunca oda sıcaklığında çekerocakta bekletilmiş, sonraki gün kül fırınında 100 °C'de 1 saat, 150 °C'de 1 saat, 180 °C'de 1,5 saat ve son olarak da 210 °C'de 2 saat inkübe edilmiştir (Vasconcelos vd., 2006). Inkübasyon sonrası örnekler çıkartılmış ve oda sıcaklığına geldikten sonra her birinden 2 µl alınıp % 2'lik 10 ml HNO₃ ile seyreltilmiştir. HNO₃'in % 2 olarak seyreltilmesi ultra saf su (18.2 Ω) kullanarak yapılmıştır. Seyreltme işlemleri yapıldıktan sonra ICP-MS aletinde (Perkin Elmer DRC II model ICP-MS) hizmet alımı olarak ODTÜ Merkez Laboratuvarı'nda Na⁺ seviyeleri tayin edilmiştir. Dahili standart olarak indiyum, kalibrasyon için ise uygun standartlar kullanıcı kılavuzuna uygun şekilde kullanılmıştır. Elde edilen veriler kuru ağırlıktaki milyonda bir birim olacak metal seviyesine çevrilerek hesaplanmıştır (ppm/kuru ağırlık). Deney her bir uygulamaya ait 3 biyolojik tekrar olarak yapılmıştır.

3.5 Bitkilerin Kök Dokularından Toplam RNA İzolasyonu ve Gen İfade Seviye Tayinleri

3.5.1 Toplam RNA izolasyonu

Toplam RNA izolasyonu hidroponik ortamda yetişen kontrol ve stres koşullarında bulunan tüm bitkilerden stres uygulamasının akabinde bitkilerin kök dokularından yapılmıştır. Stresin sonlandırıldığı gün bitki kökleri toplanarak hemen sıvı azot içinde dondurulmuş ve – 80 °C'de saklanmıştır. Toplam RNA izolasyonu Trizol solüsyonu (Invitrogen) kullanılarak üreticinin protokolünde küçük değişiklikler yapılarak gerçekleştirilmiştir (Rio vd., 2010). Kısaca, doku parçalayıcı kullanılarak sıvı azot

yardımıyla toz haline getirilen 50 mg bitki kök örneğine 1 ml Trizol eklenip hemen vortekslenerek örneklerin Trizol içinde çözülmesi sağlanmıştır. Örnekler 15.000 rpm'de 4 °C'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra 900-950 µl üst faz yeni bir ependorf tüpe aktararak 200 µl kloroform eklenmiştir ve 15 saniye alt üst çevirilip karıştırılmıştır. Daha sonra, örnekler oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildikten sonra 15.000 rpm'de 4 °C'de 20 dakika santrifüj gerçekleştirilmiştir. Oluşan iki fazdan üstte olanından 300 µl alınıp yeni bir tüpe aktarılmış ve 300 µl soğuk izopropanol eklendikten sonra birkaç defa alt üst çevirilip karıştırılmıştır. 10 dakika – 20 °C'de bekletilen karışım daha sonra 15.000 rpm'de 4 °C'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Oluşan pelete 1 ml % 75'lik soğuk etanol eklenmiş ve vorteks ile karıştırılıp peletin yıkanması sağlanmıştır. Tüp oda sıcaklığında 3 dakika bekletildikten sonra 15.000 rpm'de 4 °C'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Üst faz atılmış ve 15 saniye spin yapılarak tüpün yan duvarlarında kalan etanol de çöktürülüp atılmıştır. Son olarak, RNA örnekleri speedvac ile 3 dk kurutulmuş ve kurutulan pelet üzerine 40 µl DEPC içeren steril saf su eklenip 65 °C'de 15 dakika inkübasyonda bekletilerek peletin çözülmesi sağlanmıştır. Çözülen pelet 3-4 saniye spin yapılmış ve - 20 °C'de saklanmıştır.

Toplam RNA konsantrasyonu mikrospektrofotometre (nanodrop) ile ölçülmüş, kalite ve sağlamlığının belirlenebilmesi için 400 ng toplam RNA örnekleri 0,5x tris borat EDTA (TBE) tamponu ile hazırlanan % 1'lik agaroz jel ile görüntülenmiştir. Jel görüntüleme sırasında Thermo Scientific'in 100 bp'lik DNA markırı kullanılmıştır.

3.5.2 Toplam RNA örneklerine DNaz I uygulanması

Elde edilen toplan RNA örneklerinin içerisindeki genomik DNA kontaminasyonunun giderilmesi için DNaz I uygulaması üreticinin protokolüne göre gerçekleştirilmiştir (Thermo Scientific, Kat.No. EN0521). Kısaca, steril 1.5 ml'lik eppendorf tüpün içerisinde 20 µg'a eşlenik hacimde RNA örneği, 20 µl MgCl₂ içeren 10 x reaksiyon tamponu ve 20 µl RNaz-ari DNaz I eklenerek, steril saf su ile karışım 200 µl'ye tamamlanmıştır. Tüpler 37 °C'de 30 dk. inkübe edildikten sonra buz üzerinde oda sıcaklığına gelene kadar 2-3 dk. bekletilmiş ve üzerlerine 50 mM EDTA'dan 20 µl ilave edilip reaksiyonun durdurulması için tüpler 65 °C'de 10 dk. inkübe edilmiştir. Daha sonra RNA konsantrasyonu mikrospektrofotometre (nanodrop) ile ölçülmüş, kalite ve sağlamlığının belirlenebilmesi için 400 ng toplam RNA örnekleri 0,5x tris borat EDTA

(TBE) tamponu ile hazırlanan % 1'lik agaroz jel ile görüntülenmiştir. Jel görüntüleme sırasında Thermo Scientific'in 100 bp'lik DNA markırı kullanılmıştır.

3.5.3 Birinci zincir cDNA sentezi

Genomik DNA'nın RNA örneklerinden uzaklaştırılmasından sonra 2 µg toplam RNA, SuperScript® VILO™ cDNA sentez kiti (Invitrogen) kullanılarak birinci zincir cDNA'ya çevrilmiştir. Kısaca, 4 µl 5X VILO™ reaksiyon karışımı, 2 µl 10X SuperScript™ enzim karışımı ve RNA örneği steril bir PCR tüpü içerisinde karıştırılarak toplam hacim DEPC uygulanmış su ile 20 µl'ye tamamlanmıştır. Daha sonra karışım PCR makinesine yazılan bir programda 25 °C'de 10 dk., 42 °C 60 dk ve son olarak da 85 °C'de 5 dk. inkübe edilmiştir. Elde edilen cDNA ürünleri – 20 °C'de saklanmıştır.,

3.5.4 Gerçek zamanlı kantitatif PCR ile gen ifadesinin tayini

500 ng/µl olacak şekilde seyreltilmiş cDNA örneğinin 1 µl'si 0.8 µM gene özgü ileri ve geri primerler kullanılarak toplam 20 µl hacim içerisinde SYBR Green PCR kiti (Roche) ile Rotorgene PCR makinesinde (Qiagene) çoğaltılmıştır. Amplifikasyon sonrası erime eğrisi değerlendirmesi yapılmış ve sadece tek bir amplikonun çoğaltıldığı veriler değerlendirmeye alınmıştır. RNA izolasyonu ve cDNA sentezi sırasında oluşabilecek farklılıkları anlamlandırabilmek amacıyla, her bir örnekten 3 ayrı toplam RNA izolasyonu ve cDNA sentezi gerçekleştirilmiş, seçilen hedef genlerin amplifikasyonu ise her bir kantitatif PCR aşamasında 3 kez gerçekleştirilmiştir. Bu şekilde her bir örnek için 9 veri elde edilmiş ve ortalaması alınarak hesaplamalar tamamlanmıştır.

RT-qPCR çalışmalarında referans gen olarak AKTIN2 (ACTIN2 - ACT2 - AT4G05320) kullanılmıştır (Czechowski vd., 2005). İlgili primerler Çizelge 3.9'de gösterilmiştir. Gen ifadelerinin analizinde Muller vd. (2002) ve Pfaffl (2001) tarafından geliştirilen ve o PCR çalışmasına ait amplifikasyon verimini de dikkate alan yaklaşım kullanılmıştır. Buna göre, gen ifade seviyelerinin analizi için $2^{-\Delta \Delta Ct}$ formülü kullanılmıştır.

Çizelge 3.9. RT-qPCR çalışmalarında kullanılan genler ve primer sekansları

AGI	Gen ismi	İleri primer (5' – 3')	Ters primer (5' – 3')
AT2G01980	<i>SALT OVERLY SENSITIVE1 (SOS1)</i>	CACTTCTGGGAAATGGTTGCA	TGCCTTCAGCAATGACAACAC
AT5G24270	<i>SALT OVERLY SENSITIVE3 (SOS3)</i>	TCCTTAGGTGTCTTCCATCCAA	CGCTACTACCATCTCTTTCAATTCTT
AT4G10310	<i>HIGH-AFFINITY K⁺ TRANSPORTER1 (HKT1)</i>	GACCTCTCTACACTTTCCTCCAGC	TCGTCTTTTGTTCGTCACGCGC
AT5G27150	<i>NA⁺/H⁺ EXCHANGER1 (NHX1)</i>	TGGGTGATTATCTTGCTATTGGT	TGGTTTAGGTGAGTGAGATCAA A
AT5G52310	<i>RESPONSIVE TO DESICCATION2 9A (RD29A)</i>	TATCTTGATGGTCAACGGAAGG	TCCTCCAGTTTCTTCTTTGGTG
AT5G52300	<i>RESPONSIVE TO DESICCATION2 9B (RD29B)</i>	TCACAGTTGACACGTCCTTATG	ATGCTCTTCTTCTTCTGGATGG
AT2G42540	<i>COLD-REGULATED15 A (COR15A)</i>	CAGCGGAGCCAAGCAGAGCAG	CGTTGAGGTCATCGAGGATGTT G
AT4G26080	<i>ABA INSENSITIVE1 (ABI1)</i>	CCATAAACCGGATAGAGAAGATG AAG	TCAGGAATGATGGATGGTTTCA AG
AT4G21670	<i>C-TERMINAL DOMAIN PHOSPHATASE-LIKE1 (CPL1)</i>	CCTGATGTCAGCCATTATTTGGT	GAAATTGCCTCCTTCAGTCTTCT C
AT5G05410	<i>DEHYDRATION-RESPONSIVE ELEMENT BINDING PROTEIN2A (DREB2A)</i>	CAGTGTTGCCAACGGTTCAT	GCGGATCAAAACCACTTTGT
AT3G11020	<i>DEHYDRATION-RESPONSIVE ELEMENT BINDING PROTEIN2B (DREB2B)</i>	GGTGGTTTAACGGTGGCTGA	CCCTTTCGCAGGAACCTTTC
AT1G45249	<i>ABA-RESPONSIVE ELEMENT BINDING PROTEIN1 (AREB1)</i>	GAGTTACAACGAAAGCAGGCAA	GAAGATTCTCATCTCCGTCTC

3.6 İstatistiksel Analizler

Çalışmadan elde edilen veriler Statistix 8.1 (Analytical Software, USA) yazılımı kullanılarak tek yönlü varyans analizine (ANOVA) tabi tutulmuş ve devamında çoklu karşılaştırma (post-hoc) olarak da LSD (en önemsiz fark) yöntemi kullanılarak % 5 seviyesinde analiz edilmiştir.

BÖLÜM IV

BULGULAR

Bu çalışma, model glikofit bitki *Arabidopsis thaliana*'da *cpl1-6* mutanı ile tuz tolerans mekanizmasından sorumlu olan *sos1-1*, *sos3-1*, *hkt1-1* mutantlarının genetik olarak birbirleriyle olan etkileşimlerinin incelenmesi ve dolaylı yoldan bütün mutantların tuz stresine karşı vermiş oldukları fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler tepkilerin analiz edilerek, genlerin fonksiyonlarının ve tuz toleransındaki önemlerinin anlaşılması için yapılmıştır. Bu sayede, bitkilerin tuza tolerans mekanizmasının ve bu mekanizmadaki genler ile RNA metabolizma regülatörü CPL1 arasındaki genetik etkileşimin aydınlatılması sağlanmıştır.

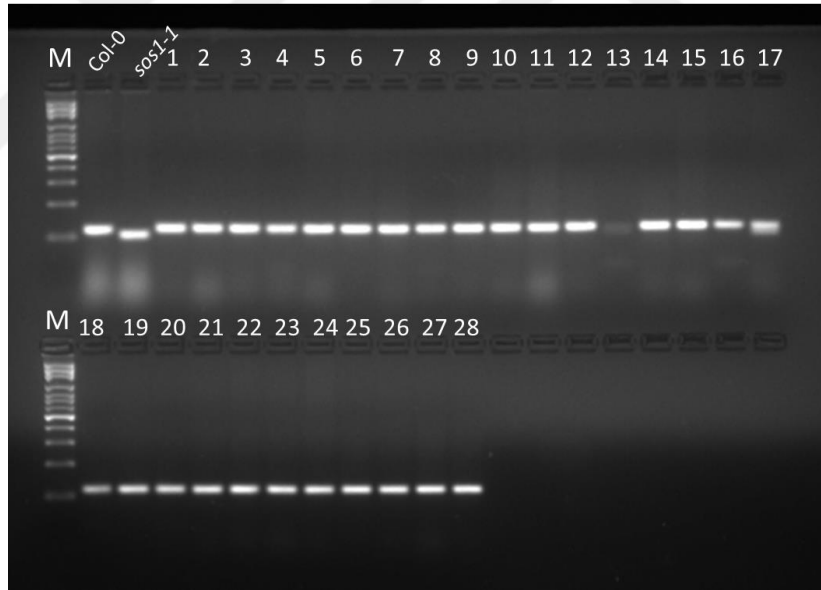
4.1 Çifte Mutantların Elde Edilmesi

Glikofit *Arabidopsis thaliana* bitkisinde *cpl1-6* mutanı ile tuz tolerans mekanizmasından sorumlu olan *sos1-1*, *sos3-1*, *hkt1-1* mutantlarının genetik olarak birbirleriyle olan etkileşimlerini inceleyebilmek için *sos1-1*, *sos3-1*, *hkt1-1* tekli mutantlarının *cpl1-6* mutanı ile melezleme yapılarak çifte mutant bitkileri elde edilmesi gerekmektedir. Bu nedenle, *sos1-1*, *sos3-1*, *hkt1-1*, *sos1-1hkt1-1*, *sos3-1hkt1-1* ve *cpl1-6* mutantları bitki büyüme kabinde büyütülüp çiçeklenme evresine geldikten sonra melezleme yapılmış ve bunlardan F₁ tohumlar toplanarak F₁ bitkiler büyütülüp erkek mutasyona özgü primer çifti kullanılarak PCR ile çoğaltım yapıp erkek mutasyonların dişi üstüne elle taşınıp taşınmadığı doğrulanmıştır. Doğrulan F₁ bitkileri büyütülüp tohumları toplandıktan sonra tekrardan ekilerek F₂ bitkiler elde edilmiş ve F₂ bitkilerden PCR ile tarama yapılarak homozigot çifte mutant bitkileri elde edilmiştir. Ardından F₂ bitkilerden tohum toplanıp F₃ generasyona geçilmiş ve F₃ generasyonunda tekrardan PCR yapıp homozigot çifte mutant bitkilerin doğrulanmasıyla birlikte ilerdeki çalışmalarda kullanmak üzere yeterince homozigot tohumu elde edilmiştir.

4.1.1 Homozigot *cpII-6sosI-1* çift mutantının geliştirilmesi

4.1.1.1 F₁ generasyonunda PCR ile melez bitkilerin seçimi

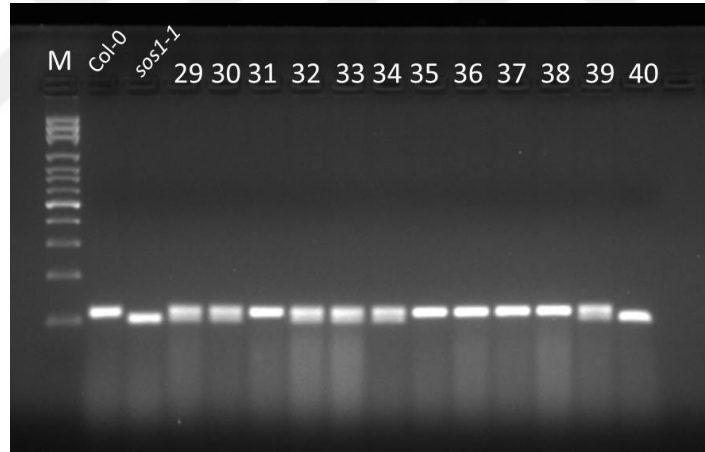
Homozigot *cpII-6sosI-1* çift mutant genotipini elde etmek amacıyla *cpII-6* (anne) ile *sosI-1* (baba) melezlemesinden elde edilen tohumlardan 28 adet F₁ bitki yetiştirilmiştir ve bu bitkilerden DNA izolasyonu yapılmıştır. Ardından *sosI-1* mutantına özgün primerler aracılığıyla PCR yapılmış ve jelde yürütülüp görüntüleyerek 28 adet F₁ bitkiden bir bitkinin (17 numara) melezlemesinin başarılı olduğu bulunmuştur (Şekil 4.1). *SOSI-1* yabanıl tip PCR'ı ve *sosI-1* mutant PCR'ında aynı primer çiftleri kullanılmış olup, bu primer çiftleri yabanıl tip PCR'da 115 baz çifti (bç) olan bölgeyi çoğaltırken, mutant PCR'da ise 101 bç olan bölgeyi çoğaltmaktadır. PCR taraması sonucunda melezlemesi başarı dolan 17 numaralı F₁ bitkisinden F₂ tohumları toplanıp uygun koşullarda kurutulduktan sonra F₂ generasyona geçilmiştir.



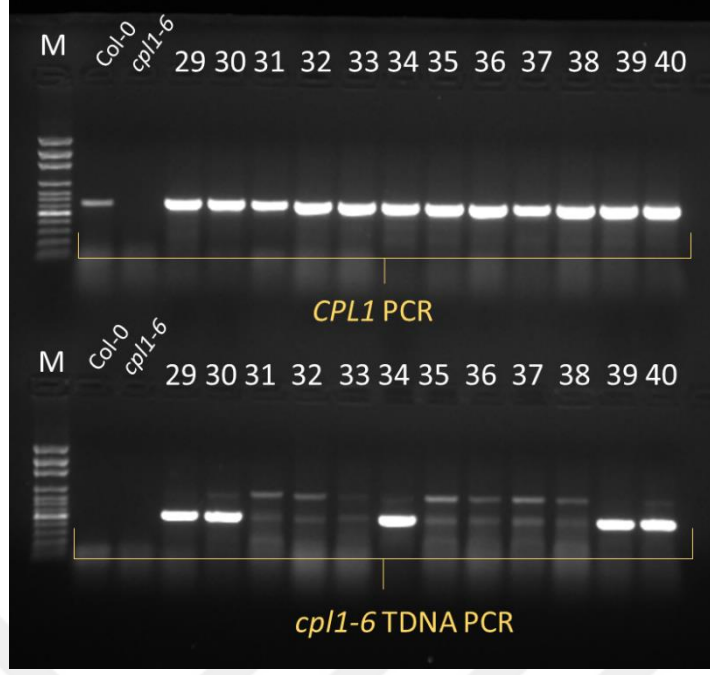
Şekil 4.1. 28 adet F₁ bitkisinden elde edilen genomik DNAların yapılan *sosI-1* PCR sonuçları. Col-0; yabanıl tip PCR'da pozitif kontrol, mutant PCR'ında ise negatif kontrol olarak kullanılmıştır. *sosI-1*; yabanıl tip PCR'da negatif kontrol, mutant PCR'ında ise pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. M: GeneRuler 100 bp DNA Markörü (ThermoScientific).

4.1.1.2 Homozigot F₂ *cpl1-6sos1-1* bitkilerinin belirlenmesi

F₁ generasyonundan toplanan heterozigot tohumlar besiyeri ortamında çimlendirildikten sonra toprağa aktarılmış ve 12 adet F₂ bitkisi yetiştirilmiştir. Ardından *sos1-1* mutanlığı, *CPL1-6* yabancı tip ve *cpl1-6* mutanlığına özgü primerler aracılığıyla PCRLar yapılmış ve elde edilen ürünler jelde yürütülüp görüntülenerek bitkilerin homozigot veya heterozigot olup olmadığı tespit edilmiştir. *sos1-1* PCRı sonunda 6 adet *sos1-1* heterozigot, 1 adet *sos1-1* homozigot bitkisi bulunmuştur (Şekil 4.2). Buna göre, PCR sonucunda 29, 30, 32, 33, 34, 39 numaralı bitkilerin *sos1-1* heterozigot; 40 numaralı bitkinin *sos1-1* homozigot; ve 31, 35, 36, 37 ve 38 numaralı bitkilerin ise *SOS1* yabancı tip homozigot olduğu belirlenmiştir. *cpl1-6* PCR sonuçlarında ise 5 adet *cpl1-6* heterozigot bitkisi bulunmuştur. Buna göre, PCR sonucunda 29, 30, 34, 39, 40 numaralı bitkilerin *cpl1-6* heterozigot olduğu belirlenmiştir. Fakat, *cpl1-6sos1-1* çifte homozigot bitkisi elde edilememiştir (Şekil 4.3).

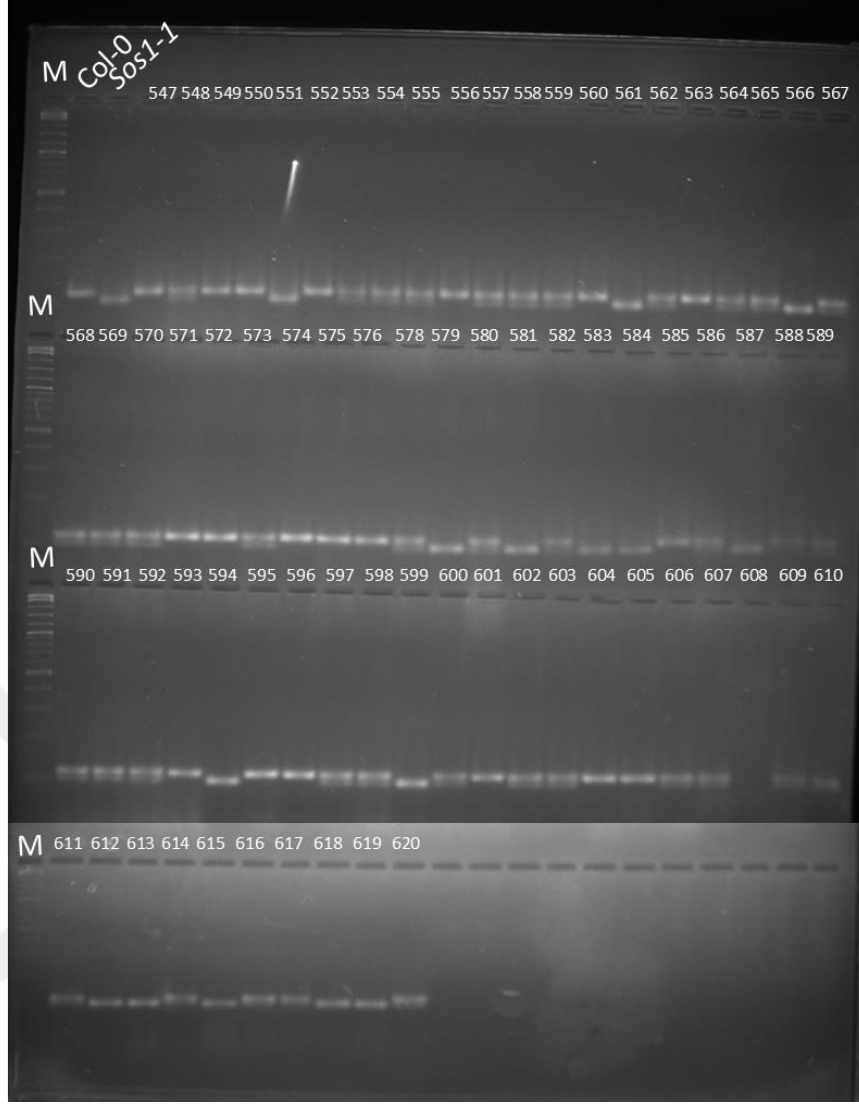


Şekil 4.2. 12 adet F₂ bitkisinden elde edilen genomik DNAlardan yapılan *sos1-1* PCR sonuçları. Col-0; yabancı tip PCR’da pozitif kontrol, mutant PCR’ında ise negatif kontrol olarak kullanılmıştır. *sos1-1*; yabancı tip PCR’da negatif kontrol, mutant PCR’ında ise pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. M: GeneRuler 100 bp DNA Markörü (ThermoScientific).

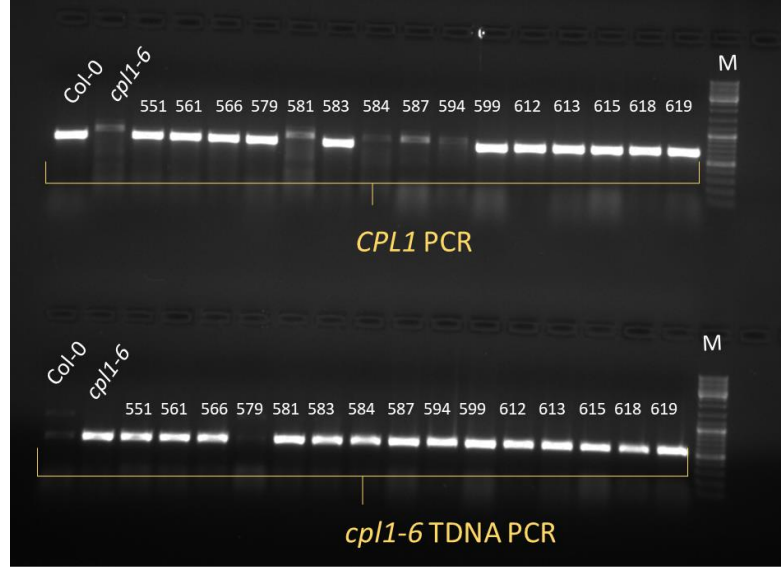


Şekil 4.3. 12 adet F₂ bitkisinden elde edilen genomik DNAlardan yapılan *cpl1-6* PCR sonuçları. Col-0; yabancı tip PCR’da pozitif kontrol, T-DNA ekleme PCR’ında ise negatif kontrol olarak kullanılmıştır. *cpl1-6*; yabancı tip PCR’da negatif kontrol, T-DNA ekleme PCR’ında ise pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. M: GeneRuler 100 bp DNA Markörü (ThermoScientific).

CPL1 4. kromozom (AT4G21670), *SOS1* ise 2. kromozom (AT2G01980) üzerinde yer almaktadır. Melezleme yapılan mutantların lokusları farklı kromozomlarda bulunduğundan F₂ popülasyonunda taranan bitkilerden homozigot çifte mutantların elde edilmesinde normal Mendel genetiğine uygun bir dağılım olması beklenmektedir. Dolayısıyla çifte mutantlarda her iki lokusun da homozigot olma olasılığı % 6.25’dir. Bu nedenle ilk taramada kullanılan bitki sayısının yetersizliğinden homozigot bitkisi elde edilemediği düşünerek bitki sayısı çoğaltılarak deney tekrarlanmıştır. Bu deneyde, 74 adet F₂ bitkisi yetiştirilmiş ve PCR sonucunda 4 adet (581, 584, 587, 594 numaralı) *cpl1-6sos1-1* homozigot bitkisi elde edilmiştir (Şekil 4.4; Şekil 4.5). Ancak, elde edilen homozigot F₂ *cpl1-6sos1-1* çifte mutant bitkileri normal toprakta yetişirken, bitkiler bodur kalmış ve çiçek açmamıştır. Dolayısıyla da homozigot F₂ *cpl1-6sos1-1* çifte mutant bitkilerinden tohum elde edilememiştir. İlginç bir şekilde tekil mutantlara kıyasla çifte mutant yapraklarında daha fazla antosiyanin biriki gözlenmiştir. Bu da bitkilerin normal büyütme koşullarında dahi çevresel stres hissettikleri anlamına gelmektedir.



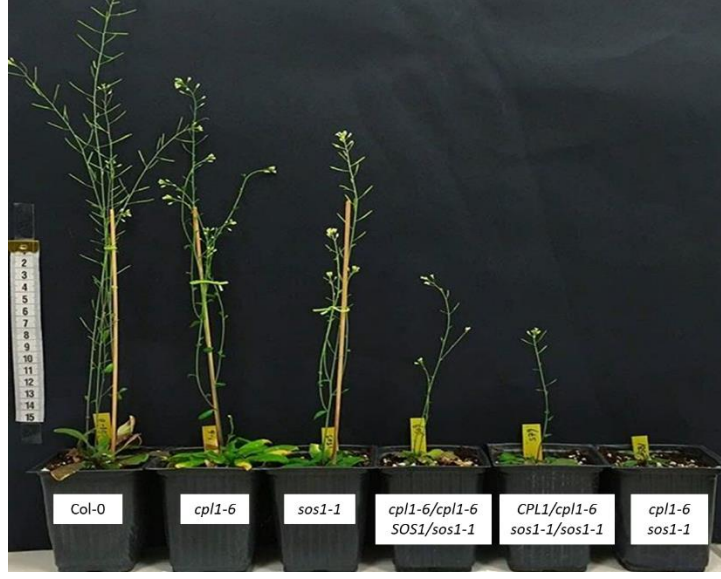
Şekil 4.4. 74 adet F₂ bitkisinden elde edilen genomik DNAlardan yapılan *sosI-1* PCR sonuçları. Col-0; yabancı tip PCR’da pozitif kontrol, mutant PCR’ında ise negatif kontrol olarak kullanılmıştır. *sosI-1*; yabancı tip PCR’da negatif kontrol, mutant PCR’ında ise pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. M: GeneRuler 100 bp DNA Markörü (ThermoScientific). PCR sonucunda 551, 561, 566, 579, 581, 583, 584, 587, 594, 599, 612, 613, 615, 618, 619 numaralı bitkinin *sosI-1* homozigot olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.5. *sos1-1* PCR’ında homozigot olduğu belirlenen 15 adet F₂ bitkisinden elde edilen genomik DNAlardan yapılan *cpl1-6* PCR sonuçları. Col-0; yabancı tip PCR’da pozitif kontrol, T-DNA ekleme PCR’ında ise negatif kontrol olarak kullanılmıştır. *cpl1-6*; yabancı tip PCR’da negatif kontrol, T-DNA ekleme PCR’ında ise pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. M: GeneRuler 100 bp DNA Markörü (ThermoScientific). *sos1-1* ve *cpl1-6* PCR sonucunda 581, 584, 587, 594 numaralı bitkilerin *cpl1-6sos1-1* homozigot olduğu belirlenmiştir.

4.1.1.3 Homozigot *cpl1-6sos1-1* bitkisinin morfolojik yapısı

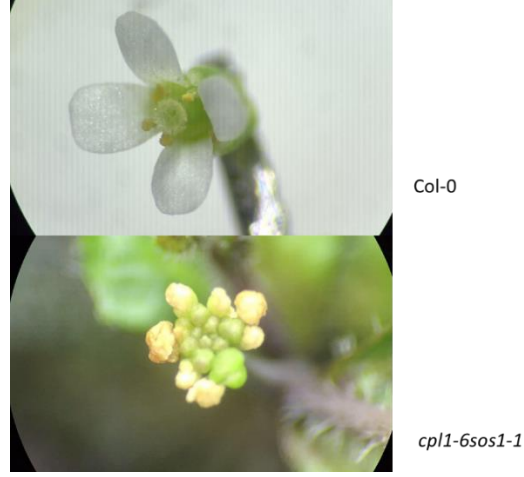
Deney sonucunda F₂ taramasından elde edilen *cpl1-6/cpl1-6 SOS1/sos1-1* heterozigot ve *CPL1/cpl1-6 sos1-1/sos1-1* heterozigot bitkilerin Col-0, *sos1-1*, *cpl1-6* ve homozigot *cpl1-6sos1-1* genotipleriyle kıyaslanması için yan yana saksılarda normal koşullarda yetiştirilmiştir (Şekil 4.6). Şaşırtıcı bir şekilde, *sos1-1* mutasyonunun homozigot olması bitkileri olumsuz yönde etkilemekte ve *CPL1* ile *SOS1*’in genetik etkileşimi bitki gelişimini olumsuz etkilemektedir. Col-0 ile homozigot *cpl1-6sos1-1* mutantının gelişimsel karşılaştırması Şekil 4.7’de, çiçek morfolojisi Şekil 4.8’de gösterilmiştir. Buna göre, homozigot *cpl1-6sos1-1* mutantı gelişmemekte ve çiçek açmadığından dolayı tohum verememektedir. Bu durum *cpl1* ile *sos1*’in normal koşullar altında bile birbiriyle genetik etkileşime girerek bitkinin gelişmesi ve çiçek açmasını olumsuz yönden etkilediğini göstermektedir.



Şekil 4.6. *SOS1* ile *CPL1*'in genetik etkileşiminin bitki gelişimi üzerine etkisi



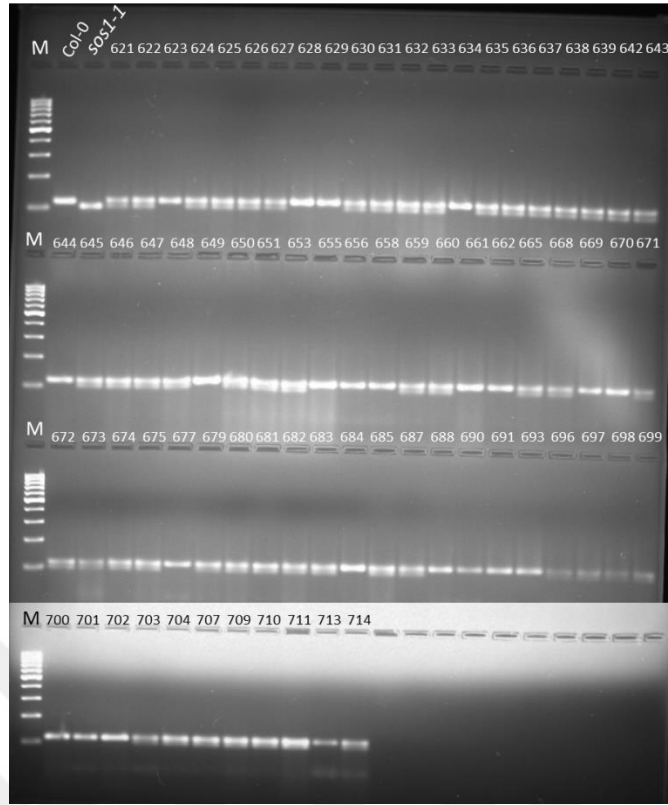
Şekil 4.7. Homozigot *cpl1-6sos1-1* mutantının Col-0 ile morfolojik karşılaştırılması



Şekil 4.8. Col-0 ile Homozigot *cpl1-6sos1-1* mutantının çiçek morfolojisinin karşılaştırılması

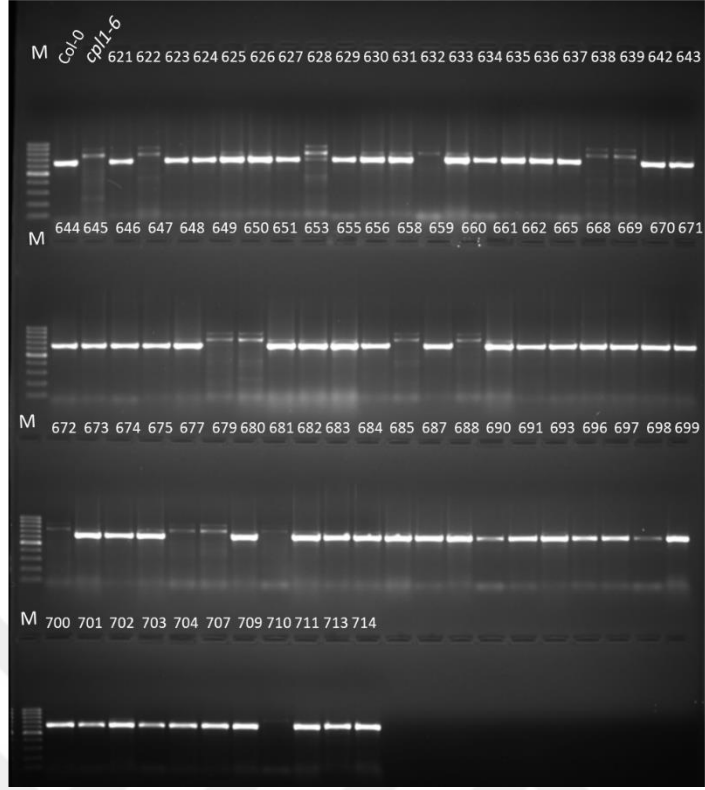
4.1.1.4 Homozigot *cpl1-6sos1-1* bitki morfolojik yapısının doğrulanması

Homozigot *cpl1-6sos1-1* bitkisinde meydana gelen morfolojik değişikliklerin doğrulanması için 179 adet F₂ tohumu bir kez daha yetiştirilip PCR ile taranmıştır. Deney sonunca 4 adet homozigot *cpl1-6sos1-1* bitkisi, 16 adet *CPL1/cpl1-6 sos1-1/sos1-1* bitkisi, 19 adet *cpl1-61/cpl1-6 SOS1/sos1-1* bitkisi elde edilmiştir. Deney sonucunda, bu bitkiler de bir önceki deneyle aynı tepkiyi göstermiş, homozigot *cpl1-6sos1-1* bitkileri aynı şekilde bodur kalmış ve çiçek açmamıştır. Bitkilerin taranmasında yapılan PCR sonuçları Şekil 4.9; Şekil 4.10 ve Şekil 4.11’de gösterilmiştir.

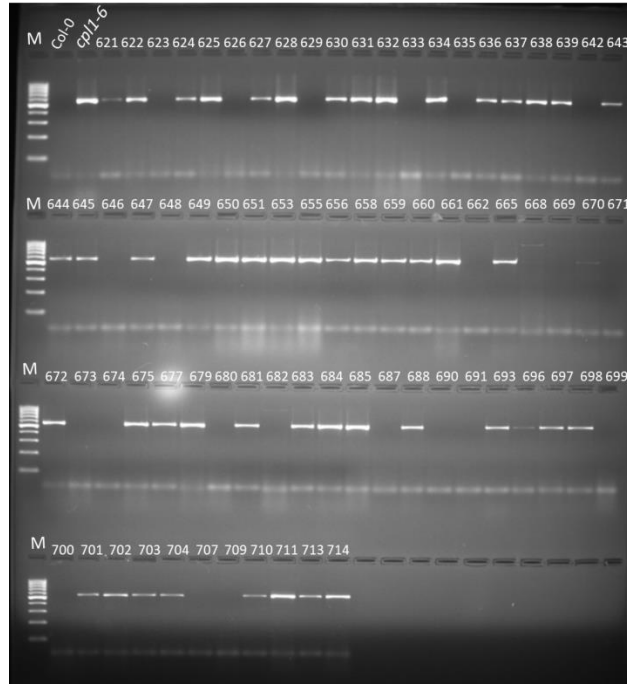


Şekil 4.9. Örnek olarak 92 adet F₂ bitkisinden elde edilen genomik DNAlardan yapılan *sos1-1* PCR sonuçları. Col-0; yabanıl tip PCR’da pozitif kontrol, mutant PCR’ında ise negatif kontrol olarak kullanılmıştır. *sos1-1*; yabanıl tip PCR’da negatif kontrol, mutant PCR’ında ise pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. M: GeneRuler 100 bp DNA Markörü (ThermoScientific).

PCR taraması bittikten sonra deney sonuçlarına göre bitkiler homozigot ve heterozigot guruplara bölünmüş ve muantların elde edilme yüzdeleri hesaplanmıştır (Çizelge 4.1). Hesaplama sonucunda *cpl1-6sos1-1* homozigot bitkisi hariç geri kalan 8 genotipin yüzdesinin beklenen yüzdelerine yakın olduğu belirlenmiştir. Bu da *cpl1-1* (4. kromozom üzerinde yer almakta) ve *sos1-1* (2. kromozom üzerinde yer almakta) mutant bitkilerinin melezlenmesi sonucunda, melezleme yapılan mutantların lokusları farklı kromozomlarda bulunduğundan F₂ popülasyonunda taranan bitkilerden homozigot ve heterozigot mutantların elde edilmesinde normal Mendel genetiğine uygun bir dağılım olduğu göstermektedir.



Şekil 4.10. Örnek olarak 92 adet F₂ bitkisinden elde edilen genomik DNAlardan yapılan *cpl1-6* yabancı tip PCR sonuçları. Col-0 pozitif kontrol, *cpl1-6* negatif kontrol olarak kullanılmıştır. M: GeneRuler 100 bp DNA Markörü (ThermoScientific).



Şekil 4.11. Örnek olarak 92 adet F₂ bitkisinden elde edilen genomik DNAlardan yapılan *cpl1-6* T-DNA ekleme PCR sonuçları. Col-0 negatif kontrol, *cpl1-6* pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. M: GeneRuler 100 bp DNA Markörü (ThermoScientific).

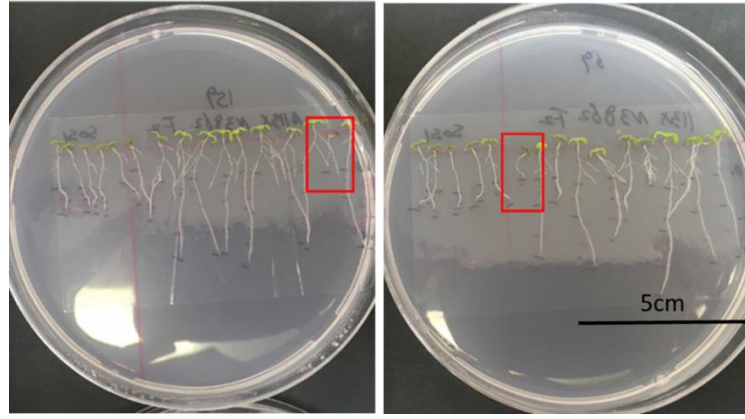
F₂ popülasyonunda tarama sonucunda elde edilen *cpl1-6sos1-1* homozigot bitkisinin yüzdesinin beklenen orandan daha düşük olmasının nedeni de *CPL1* ile *SOS1*'in etkileşiminin sadece bitki büyüme ve çiçekleme sürecinde değil, tohum çimlenmesini de negatif yönden etkilediği olarak tahmin edilmektedir. Bundan dolayı, *cpl1-6sos1-1* homozigot tohumların viabilitesinin düşük olduğu tahmin edilmektedir.

Çizelge 4.1. PCR sonunda elde edilen bitki çeşitleri ve sayısı

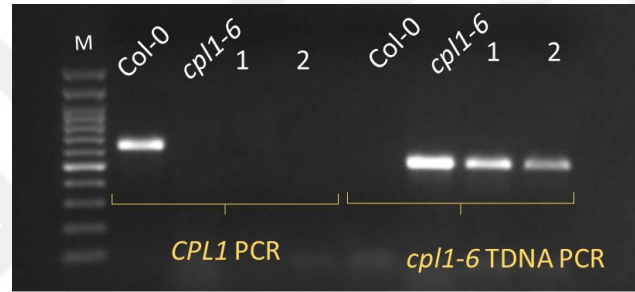
Bitki genotipi	Bitki sayısı	Mendel genetiğine uygun dağılım yüzdesi (%)	Muantların elde edilme yüzdeleri (%)
Col-0	17	6.25	9.50
<i>cpl1-6sos1-1</i>	4	6.25	2.23
<i>cpl1-6/cpl1-6</i>	16	6.25	8.94
<i>sos1-1/sos1-1</i>	21	6.25	11.73
<i>CPL1/cpl1-6 SOS1/sos1-1</i>	16	12.50	8.94
<i>cpl1-6/cpl1-6 SOS1/sos1-1</i>	19	12.50	10.61
<i>CPL1/cpl1-6</i>	20	12.50	11.17
<i>SOS1/sos1-1</i>	22	12.50	12.29
<i>CPL1/cpl1-6 SOS1/sos1-1</i>	44	25.00	24.58
Toplam bitki sayısı	179	-	-

4.1.1.5 Homozigot *cpl1-6sos1-1* bitkisinin tuz stresine olan tepkisi

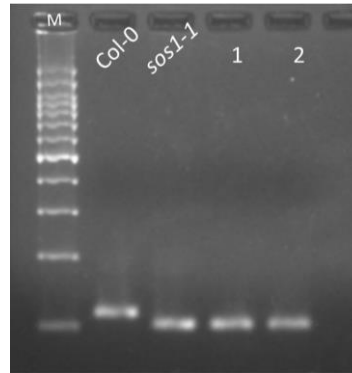
Bu deney, *cpl1-6sos1-1* homozigot bitkisinden tohum alınmadığından dolayı tuzun *cpl1-6sos1-1* homozigot bitkisine olan etkisini anlayabilmek amacıyla yapılmıştır. Deneyde toplam 103 adet *sos1-1* ve *cpl1-6* (anne) X *sos1-1* (baba) F₂ bitkisi yetiştirilmiş olup bitkiler 10 mM NaCl içeren besiyerine aktarıldıktan 4 gün sonra iki adet bitkinin stres ortamında hiç büyümediği ve yapraklarında ölmeye yakın sararmalar olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.12). Bu tepki sonucunda bu bitkilerden DNA izolasyonu ve PCR yapıldıktan sonra bu iki bitkinin *cpl1-6sos1-1* homozigot olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.13; Şekil 4.14).



Şekil 4.12. *cpl1-6sos1-1* mutantının 4 gün 10 mM NaCl uygulaması sonucundaki morfolojik görüntüsü. Kırmızı kutu ile işaretlenen bitkiler homozigot *cpl1-6sos1-1* mutantıdır.



Şekil 4.13. 10 mM NaCl altında gelişemeyen 2 adet F₂ bitkisinden elde edilen genomik DNAlardan yapılan *cpl1-6* PCR sonuçları. Col-0; yabancı tip PCR'da pozitif kontrol, T-DNA ekleme PCR'ında ise negatif kontrol olarak kullanılmıştır. *cpl1-6*; yabancı tip PCR'da negatif kontrol, T-DNA ekleme PCR'ında ise pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. M: GeneRuler 100 bp DNA Markörü (ThermoScientific). Bu iki bitkinin *cpl1-6* homozigot olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.14. 10 mM NaCl altında gelişemeyen 2 adet F₂ bitkisinden elde edilen genomik DNAlardan yapılan *sos1-1* PCR sonuçları. Col-0; yabancı tip PCR'da pozitif kontrol, mutant PCR'ında ise negatif kontrol olarak kullanılmıştır. *sos1-1*; yabancı tip PCR'da negatif kontrol, mutant PCR'ında ise pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. M: GeneRuler 100 bp DNA Markörü (ThermoScientific). Bu iki bitkinin *cpl1-6sos1-1* homozigot olduğu belirlenmiştir.

Geri kalan bitkiler büyümeye devam etmiş ve 7 gün büyütülüp kök uzunlukları için fotoğrafları alındıktan sonra DNA izolasyonu ve PCR yapıp bitkilerin heterozigot veya homozigotluğu belirlenmiştir (Çizelge 4.2). Buna göre, yetiştirilen popülasyonda normal Mendel genetiğine uygun bir dağılım olduğu görülmüştür. Deney sonucunda her bir bitkinin kök uzunlukları alınmış ve her bir genotip grubundaki bitkilerin kök uzunlukları Statistix 8.1 programı kullanılarak varyans analizine tabi tutularak, elde edilen ortalama değerler arasındaki farklılıklar LSD analizi aracılığıyla % 5 önem seviyesinde karşılaştırılmıştır. Sonuçta homozigot *cpl1-6sos1-1* bitkisin 10 mM NaCl uygulamasında kök uzunluğunun diğer genotiplere göre önemli farklılık gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.15). Bu da homozigot *cpl1-6sos1-1* bitkisin tuza aşırı hassas olduğunu göstermiştir.

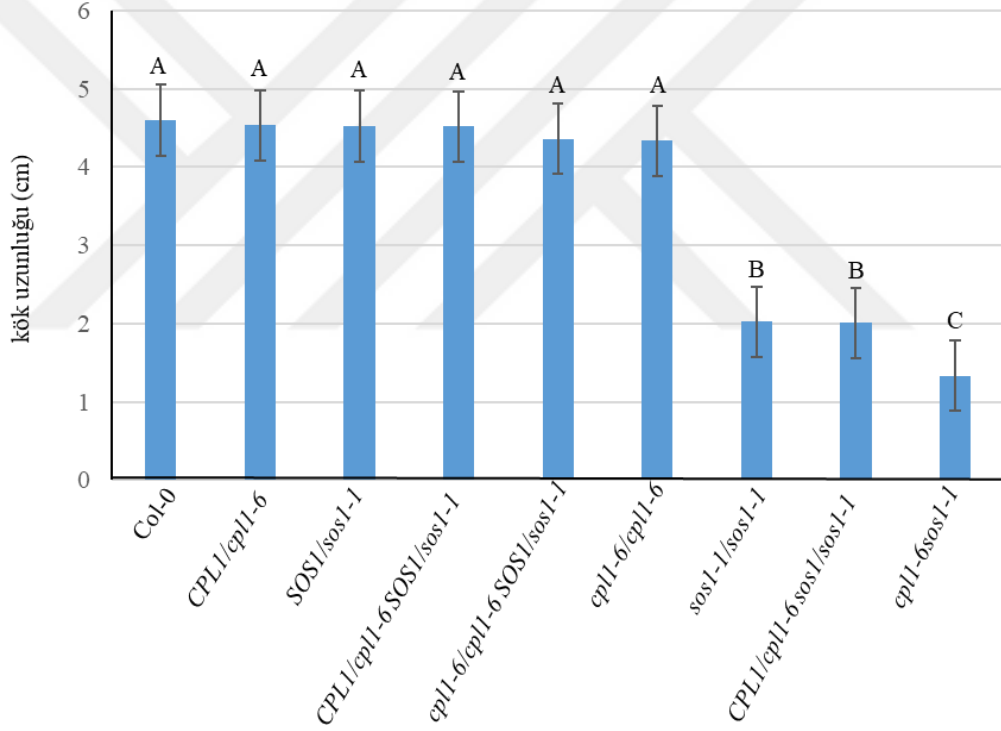
Bu deneyde toplam 6 adet homozigot *cpl1-6sos1-1* bitkisi elde edilmiş; lakin, ikisinde stres uygulamasından 4 gün sonra ölüm gözlenmişken geri kalan 4 tanesi yaşayabilmiştir. Bunun nedeninin F₂ generasyonunda çifte mutant tohumlarının yaşayamaması, yaşasa dahi gelişimini tamamlayamaması, tohum geliştirememesi veya gelişen tohumların viabilitesinin düşük olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

10 mM NaCl uygulanması sonucunda *sos1-1* ve *cpl1-6* (anne) X *sos1-1* (baba)'den elde edilen bitkilerin F₂ generasyonunda açılım göstermesi sonucunda elde edilen çeşitli homozigot ve heterozigot bitkilerin kök uzunluklarıyla Şekil 4.15'de gösterelen F₂ bitkilerinin boy uzunlukları arasında benzer tepki belirlenmiştir. Bu da *cpl1-6* mutant bitkisine *sos1-1* mutantı eklendiği zaman genlerin birbirleri ile etkileşiminin bitkinin gelişimi ve fizyolojisi üzerinde önemli etkisinin olduğunu göstermektedir.

cpl-6sos1-1 çifte mutant elde etme amacıyla toplam 368 adet *cpl1-6* (anne) X *sos1-1* (baba) F₂ bitkisi PCR ile taranmış ve sonuçta 14 adet homozigot *cpl-6sos1-1* çifte mutant bitkisi elde edilmiş, fakat bitkiler bodur kalmış, tohum vermemiştir. Bundan dolayı ileriki hidroponik deneylerde homozigot *cpl1-6sos1-1* bitkiler kullanılamamıştır.

Çizelge 4.2. *cpl1-6* (anne) X *sos1-1* (baba) F₂ bitkisinden yapılan PCR sonunda elde edilen bitki genotipleri ve sayıları

Bitki çeşidi	Bitki sayısı	Mendel genetiğine uygun dağılım yüzdesi (%)	Muantların elde edilme yüzdeleri (%)
Col-0	5	6.25	4.85
<i>cpl1-6sos1-1</i>	6	6.25	5.83
<i>cpl1-6/cpl1-6</i>	6	6.25	5.83
<i>sos1-1/sos1-1</i>	7	6.25	6.80
<i>CPL11/cpl1-6 sos1/sos1-1</i>	18	12.50	17.48
<i>cpl1-6/cpl1-6 SOS1/sos1-1</i>	9	12.50	8.74
<i>CPL11/cpl1-6</i>	8	12.50	7.77
<i>SOS1/sos1-1</i>	14	12.50	13.59
<i>CPL11/cpl1-6 SOS1/sos1-1</i>	30	25.00	29.13
Toplam bitki sayısı	103	-	-

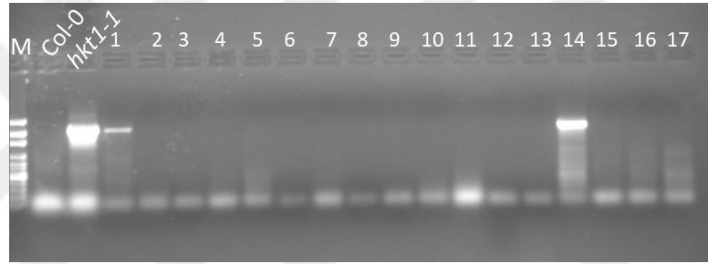


Şekil 4.15. *cpl1-6* (anne) X *sos1-1* (baba) F₂ bitkilerin 10 mM NaCl uygulaması sonucundaki kök uzunlukları. Harfler gruplar arası istatistiksel farkı belirtmektedir ($p \leq 0.05$).

4.1.2 Homozigot *cpl1-6sos3-1* çift mutantının geliştirilmesi

4.1.2.1 F₁ generasyonunda PCR ile melez bitkilerin seçimi

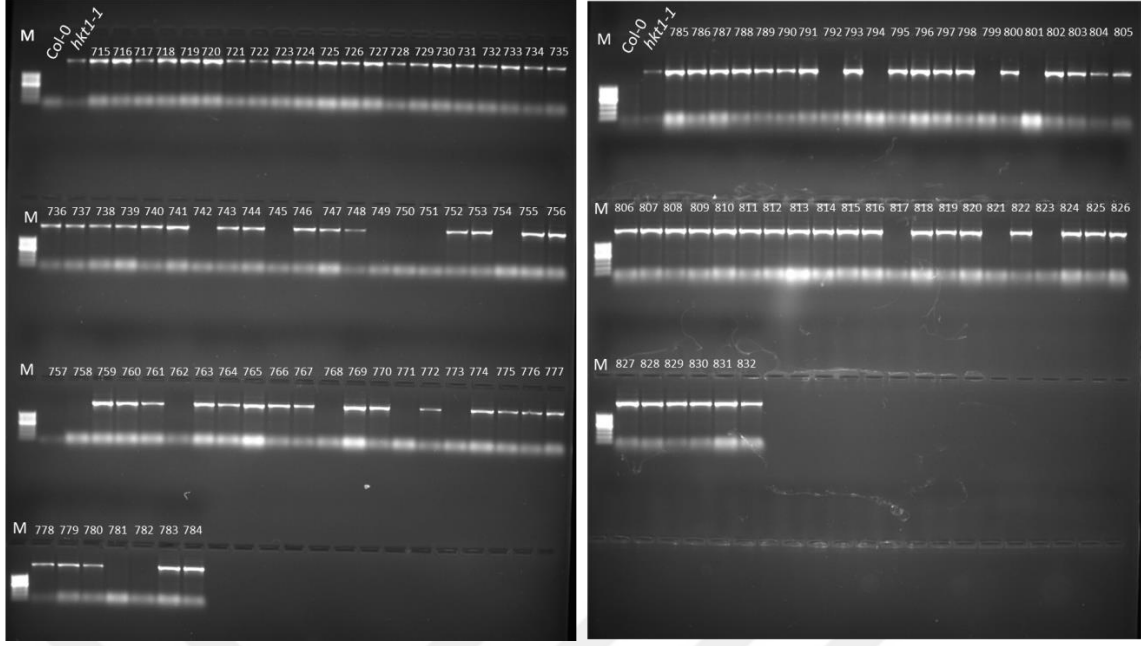
Homozigot *cpl1-6sos3-1* çift mutantını elde etmek amacıyla *cpl1-6* (anne) ile *sos3-1hkt1-1* (baba) melezlemesinden elde edilen tohumlardan 17 adet F₁ bitkisi yetiştirilmiştir ve bu bitkilerden DNA izolasyonu yapılmıştır. Ardından *hkt1-1* mutantına özgün primerler aracılığıyla PCR yapılmış ve jelde yürütülüp görüntülenerek 17 adet F₁ bitkisinden 2 bitkinin (1, 14 numara) melezlemesinin başarılı olduğu bulunmuştur (Şekil 4.16). PCR taraması sonucunda melezlemesi başarılı olan 1 ve 14 numaralı F₁ bitkilerinden tohum toplanıp uygun koşullarda kurutulduktan sonra F₂ generasyona geçilmiştir.



Şekil 4.16. 17 adet F₁ bitkisinden elde edilen genomik DNAlardan yapılan *hkt1-1* T-DNA PCR sonuçları. Col-0; negatif kontrol olarak kullanılmıştır. *hkt1-1*; pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. M: GeneRuler 100 bp DNA Markörü (ThermoScientific).

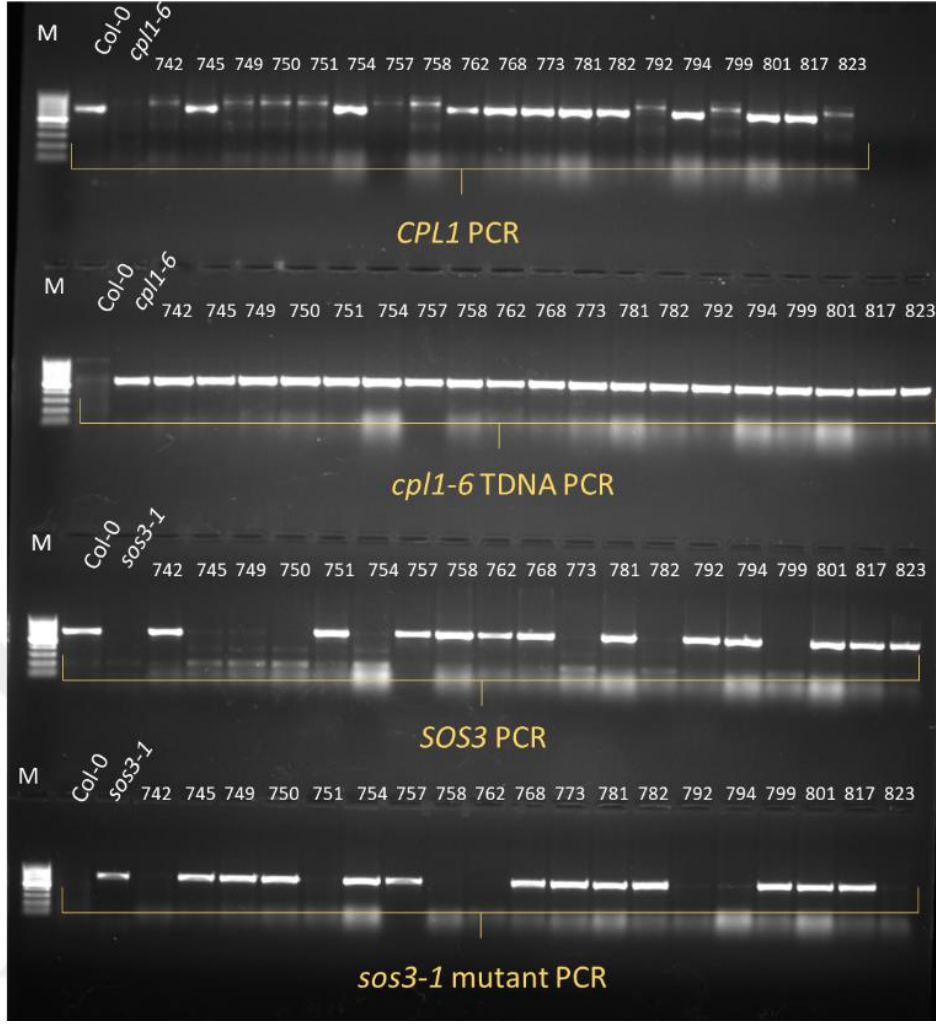
4.1.2.2 Homozigot F₂ *cpl1-6sos3-1* bitkilerinin belirlenmesi

cpl1-6 (anne) ile *sos3-1hkt1-1* (baba) melezlemesinden elde edilen F₂ tohumlarından 118 adet F₂ bitkisi yetiştirilmiştir. Deneyde homozigot *cpl1-6sos3-1* bitkisini elde etmek amaçlandığı için ilk olarak *hkt1-1* T-DNA ekleme mutantına özgü primerler aracılığıyla *hkt1-1* T-DNA PCR'ı yapılmış ve elde edilen ürünler jelde yürütülüp görüntülenmiştir (Şekil 4.17). Deney sonucunda *hkt1-1* T-DNA mutasyonunu içeren 97 adet bitki ortadan kaldırılmıştır.



Şekil 4.17. *cpl1-6* (anne) ile *sos3-1hkt1-1* (baba) melezlemesinden alınan 118 adet F₂ bitkisinden elde edilen genomik DNAlardan yapılan *hkt1-1* T-DNA PCR sonuçları. Col-0 negatif kontrol olarak, *hkt1-1* pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. M: GeneRuler 100 bp DNA Markörü (ThermoScientific). 742, 745, 749,750,751,754, 757,758,762, 768,771,773,781,782,792,794,799,801,817,821,823 numaralı bitkiler *hkt1-1* T-DNA negatif olarak belirlenmiştir.

Geri kalan 21 adet bitkiden *cpl1-6* yabancı tip PCR, T-DNA PCR ile *sos3-1* yabancı tip PCR, mutant PCR yapılarak 3 adet homozigot *cpl1-6sos3-1* bitkisi (749, 750, 799 numaralı) elde edilmiştir (Şekil 4.18). PCR taramalarında elde edilen 3 adet homozigot *cpl1-6sos3-1* bitkisinden tekrardan DNA izolasyonu yapılmış ve tekrardan PCR yapıp jelde görüntülerek homozigotlukları doğrulanmıştır (Şekil 4.19).



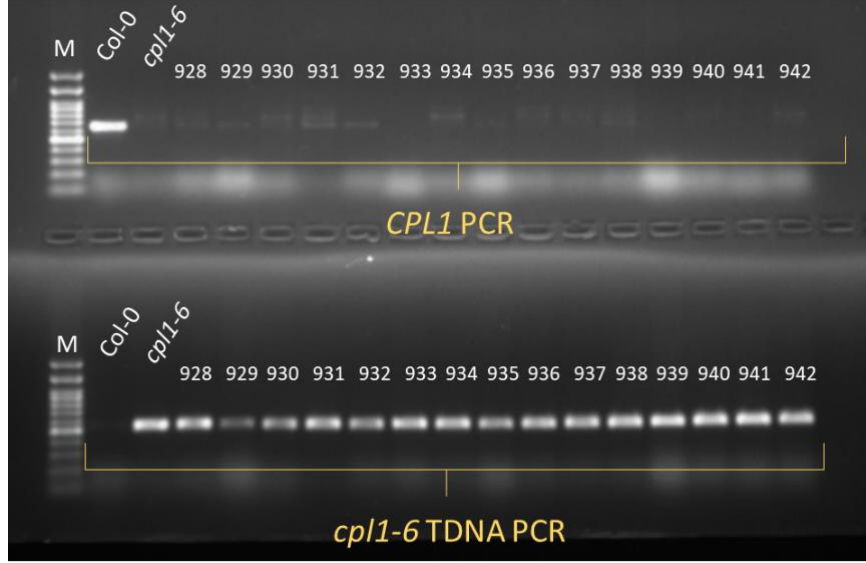
Şekil 4.18. *hkt1-1* T-DNA PCR’ında negatif olarak belirlenen F₂ bitkilerinden elde edilen genomik DNAlardan yapılan *cpl1-6* ve *sos3-1* PCR sonuçları. Col-0; yabancı tip PCR’da pozitif kontrol, *cpl1-6* T-DNA ekleme PCR ve *sos3-1* mutant PCR’ında ise negatif kontrol olarak kullanılmıştır. *cpl1-6*; yabancı tip PCR’da negatif kontrol, T-DNA ekleme PCR’ında ise pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. *sos3-1*; yabancı tip PCR’da negatif kontrol, mutant PCR’ında ise pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. M: GeneRuler 100 bp DNA Markörü (ThermoScientific). 749, 750, 799 numaralı 3 adet bitkinin *cpl1-6sos3-1* homozigot olduğu belirlenmiştir.



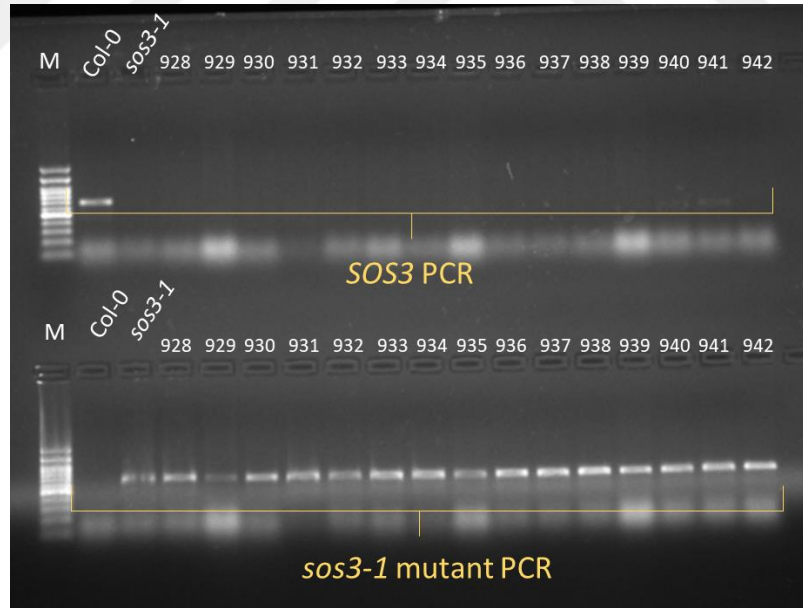
Şekil 4.19. Homozigot F₂ *cp11-6sos3-1* çifte mutantının moleküler doğrulanması. M: GeneRuler 100 bp DNA Markörü (ThermoScientific). 749, 750, 799 numaralı bitkilerin *cp11-6sos3-1* homozigot olduğu doğrulanmıştır.

4.1.2.3 F₃ generasyonunda homozigot *cp11-6sos3-1* bitkisinin doğrulanması

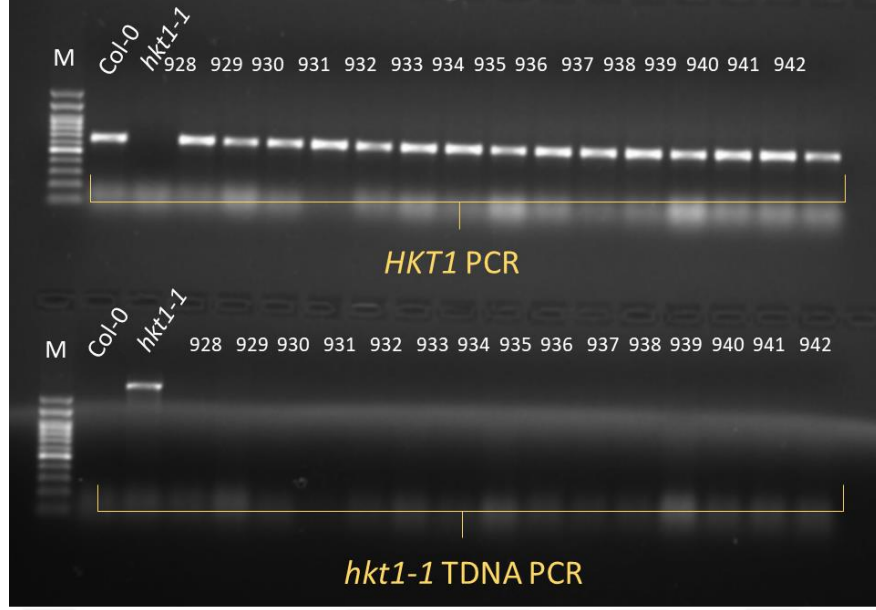
F₂ generasyonunda homozigot *cp11-6sos3-1* olduğu belirlenen 3 adet bitkiden tohum toplanmış ve her bir bitkiden elde edilen tohumlardan beşer adet tohum ekilerek toplam 15 adet F₃ bitkisi yetiştirilmiştir. Bitkiler 10 yaprak evresine gelince DNA izole edildikten sonra *cp11-6* PCR₁ (Şekil 4.20), *sos3-1* PCR₁ (Şekil 4.21) ve *hkt1-1* PCR₁ (Şekil 4.22) yapılmıştır. PCR sonucunda bu 3 bitkinin homozigot *cp11-6sos3-1* olduğu doğrulanmış ve sonraki yapılacak çalışmalar için yeterince tohum elde edilmiştir.



Şekil 4.20. F₂ generasyonunda homozigot *cpl1-6sos3-1* olduğu belirlenen bitkilerin F₃ generasyonunda doğrulanması için yapılan *cpl1-6* PCR sonuçları. Col-0; yabancı tip PCR’da pozitif kontrol, *cpl1-6* T-DNA ekleme PCR’ında ise negatif kontrol olarak kullanılmıştır. *cpl1-6*; yabancı tip PCR’da negatif kontrol, T-DNA ekleme PCR’ında ise pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. M: GeneRuler 100 bp DNA Markörü (ThermoScientific). 15 adet F₃ bitkisinin tamamının homozigot *cpl1-6* olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.21. F₂ generasyonunda homozigot *cpl1-6sos3-1* olduğu belirlenen bitkilerin F₃ generasyonunda doğrulanması için yapılan *sos3-1* PCR sonuçları. Col-0; yabancı tip PCR’da pozitif kontrol, *sos3-1* mutant PCR’ında ise negatif kontrol olarak kullanılmıştır. *sos3-1*; yabancı tip PCR’da negatif kontrol, mutant PCR’ında ise pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. M: GeneRuler 100 bp DNA Markörü (ThermoScientific). 15 adet F₃ bitkinin tamamının *sos3-1* homozigot olduğu belirlenmiştir.

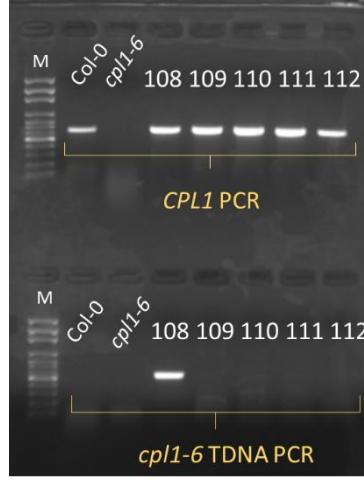


Şekil 4.22. F₂ generasyonunda homozigot *cpl1-6sos3-1* olduğu belirlenen bitkilerin F₃ generasyonunda doğrulanması için yapılan *hkt1-1* PCR sonuçları. Col-0; yabancı tip PCR’da pozitif kontrol, *hkt1-1* T-DNA ekleme PCR’ında ise negatif kontrol olarak kullanılmıştır. *hkt1-1*; yabancı tip PCR’da negatif kontrol, T-DNA ekleme PCR’ında ise pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. M: GeneRuler 100 bp DNA Markörü (ThermoScientific). 15 adet F₃ bitkinin tamamının *hkt1-1* homozigot olduğu belirlenmiştir.

4.1.3 Homozigot *hkt1-1cpl1-6* çifte mutantının geliştirilmesi

4.1.3.1 F₁ generasyonunda PCR ile melez bitkilerin seçimi

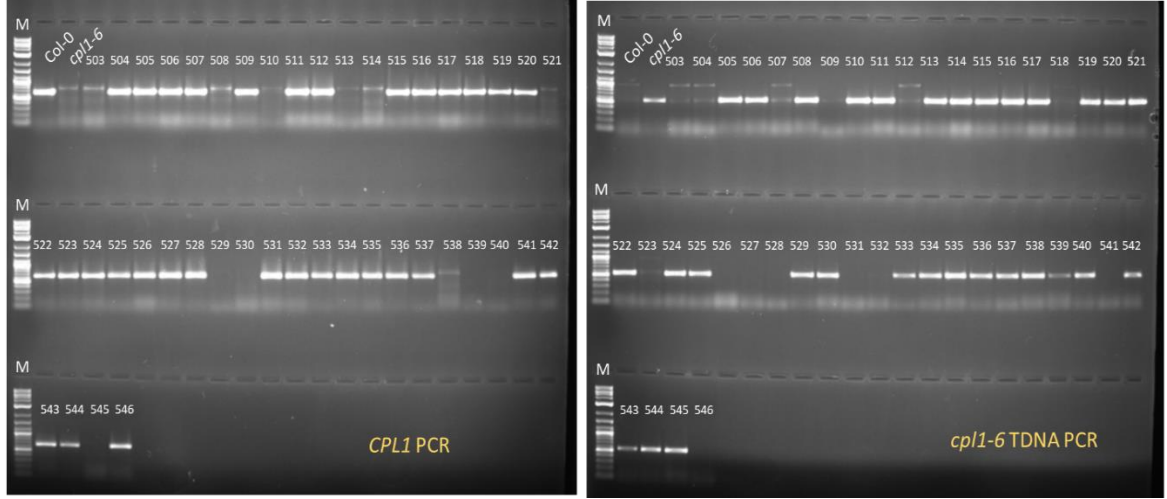
Homozigot *hkt1-1cpl1-6* çifte mutantını elde etmek amacıyla *sos1-1hkt1-1* (anne) ile *cpl1-6* (baba) melezlemesinden elde edilen tohumlardan 5 adet F₁ bitkisi yetiştirilmiştir ve bu bitkilerden DNA izolasyonu yapılmıştır. Ardından *cpl1-6* mutantına özgü primerler aracılığıyla PCR yapılmış ve elde edilen ürünler jelde yürütülüp görüntülenerek 5 adet F₁ bitkisinden bir bitkinin (108 numara) melezlemesinin başarılı olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.23). PCR taraması sonucunda melezlemesi başarılı olan 108 numaralı F₁ bitkisinden tohum toplanıp uygun koşullarda kurutulduktan sonra F₂ generasyona geçilmiştir.



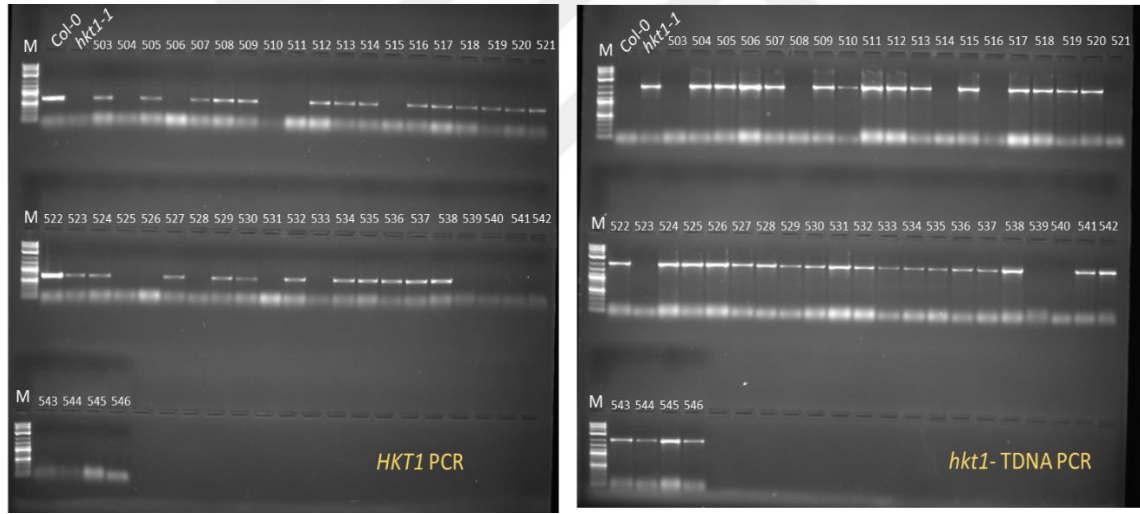
Şekil 4.23. 5 adet F₁ bitkisinden elde edilen genomik DNAlardan yapılan *cpl1-6* PCR sonuçları. Col-0; yabancı tip PCR’da pozitif kontrol, *cpl1-6* T-DNA ekleme PCR’ında ise negatif kontrol olarak kullanılmıştır. *cpl1-6*; yabancı tip PCR’da negatif kontrol, T-DNA ekleme PCR’ında ise pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. M: GeneRuler 100 bp DNA Markörü (ThermoScientific). 5 adet F₁ bitkisinden sadece 108 numaralı bitkinin melezlenmesinin başarılı olduğu belirlenmiştir.

4.1.3.2 Homozigot F₂ *hkt1-1cpl1-6* bitkilerinin belirlenmesi

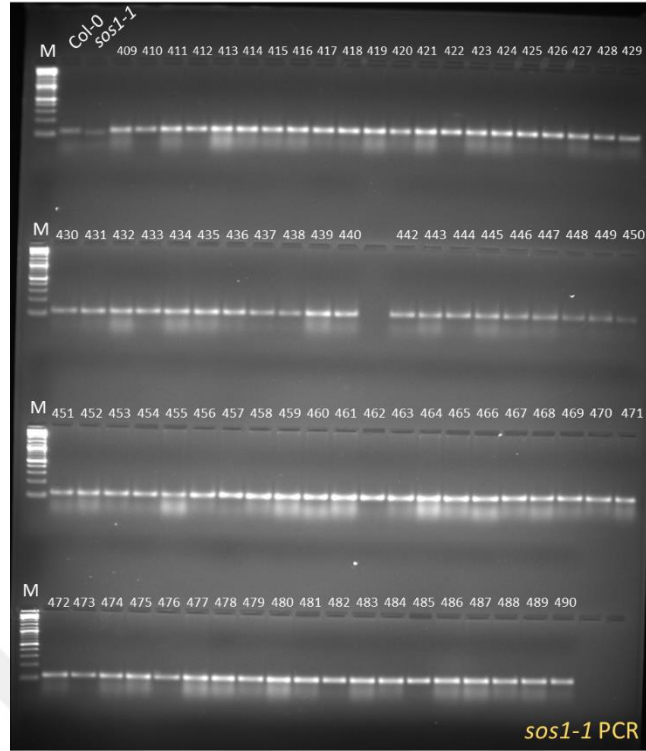
sos1-1hkt1-1 (anne) ile *cpl1-6* (baba) melezlemesinden elde edilen F₁ tohumlardan 138 adet F₂ bitkisi yetiştirilmiştir. Ardından tüm bitkiler için *cpl1-6* yabancı tip PCR, *cpl1-6* T-DNA PCR (Şekil 4.24), *hkt1-1* yabancı tip PCR, *hkt1-1* T-DNA PCR (Şekil 4.25) ve *sos1-1* PCR (Şekil 4.26) yapılarak 3 adet bitkinin homozigot *hkt1-1cpl1-6* çifte mutant olduğu (452, 510, 545 numaralı) belirlenmiştir.



Şekil 4.24. Örnek olarak *sos1-1hkt1-1* (anne) ile *cpl1-6* (baba) melezlemesinden elde edilen F₂ bitkilerinden izole edilen DNA'dan yapılan *cpl1-6* PCR sonuçları. Col-0; yabancı tip PCR'da pozitif kontrol, *cpl1-6* T-DNA ekleme PCR'ında ise negatif kontrol olarak kullanılmıştır. *cpl1-6*; yabancı tip PCR'da negatif kontrol, T-DNA ekleme PCR'ında ise pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. M: GeneRuler 100 bp DNA Markörü (ThermoScientific). 15 adet F₃ bitkisinin *cpl1-6* homozigot olduğu belirlenmiştir.

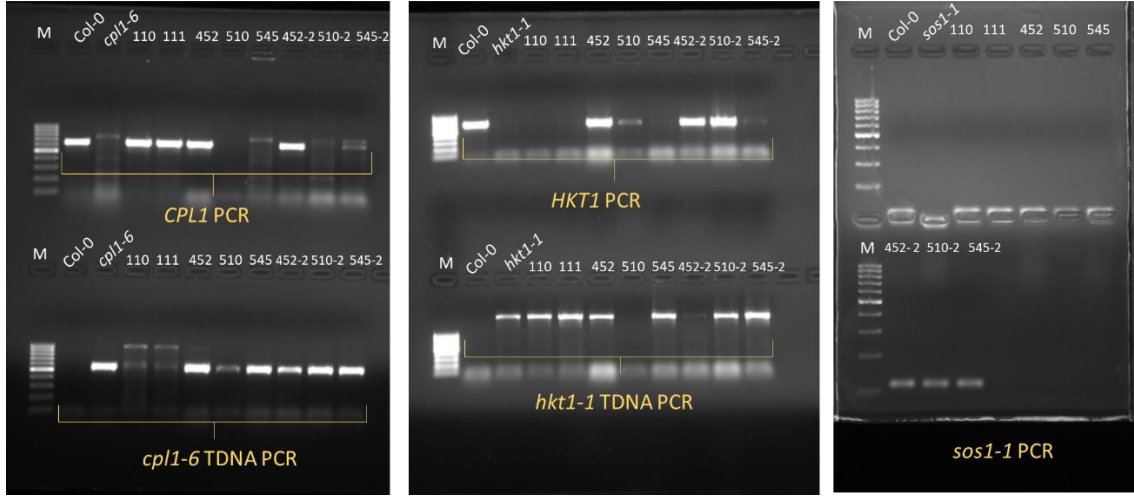


Şekil 4.25. Örnek olarak *sos1-1hkt1-1* (anne) ile *cpl1-6* (baba) melezlemesinden elde edilen F₂ bitkilerinden izole edilen DNA'dan yapılan *hkt1-1* PCR sonuçları. Col-0; yabancı tip PCR'da pozitif kontrol, *hkt1-1* T-DNA ekleme PCR'ında ise negatif kontrol olarak kullanılmıştır. *hkt1-1*; yabancı tip PCR'da negatif kontrol, T-DNA ekleme PCR'ında ise pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. M: GeneRuler 100 bp DNA Markörü (ThermoScientific).



Şekil 4.26. Örnek olarak *sos1-1hkt1-1* (anne) ile *cpl1-6* (baba) melezlemesinden elde edilen F₂ bitkilerinden izole edilen DNA'dan yapılan *sos1-1* PCR sonuçları. Col-0; yabancı tip PCR'da pozitif kontrol, mutant PCR'ında ise negatif kontrol olarak kullanılmıştır. *sos1-1*; yabancı tip PCR'da negatif kontrol, mutant PCR'ında ise pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. M: GeneRuler 100 bp DNA Markörü (ThermoScientific).

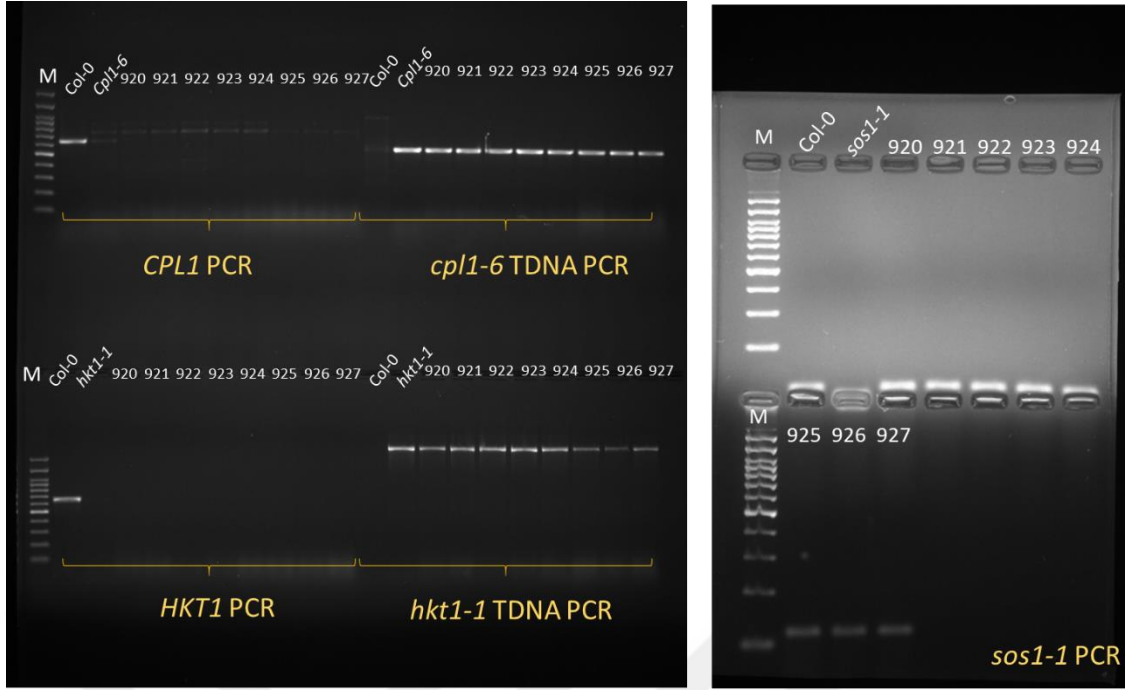
PCR taramalarından elde edilen 3 adet homozigot *hkt1-1cpl1-6* bitkisinden tekrardan DNA izolasyonu yapıldıktan sonra bu üç bitkinin yeni izole edilen DNA'ss ve daha önce kullanılan DNA'sından tekrar PCR yapıp jelde görüntülenerek doğrulanması sonucunda bir bitkinin (545 numara) homozigot *hkt1-1cpl1-6* çifte mutant olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.27).



Şekil 4.27. Homozigot F₂ *hkt1-1cpl1-6* çifte mutantının moleküler doğrulanması. Col-0; yabancı tip PCR’da pozitif kontrol, *cpl1-6* T-DNA ekleme PCR’ı, *hkt1-1* T-DNA ekleme PCR’ı ve *sos1-1* mutant PCR’ında ise negatif kontrol olarak kullanılmıştır. *cpl1-6*; yabancı tip PCR’da negatif kontrol, T-DNA ekleme PCR’ında ise pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. *hkt1-1*; yabancı tip PCR’da negatif kontrol, T-DNA ekleme PCR’ında ise pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. *sos1-1*; yabancı tip PCR’da negatif kontrol, mutant PCR’ında ise pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. M: GeneRuler 100 bp DNA Markörü (ThermoScientific). Sayı-2: tekrardan izole edilen DNA’lardan yapılan PCR’ı göstermektedir. İlk taramada 138 adet bitkiden seçilen 3 adet homozigot olarak bilinen bitkilerden 452 ve 510 numaralı bitkilerin homozigot olmadığı, sadece 454 numaralı bitkinin homozigot *hkt1cpl1-6* olduğu belirlenmiştir.

4.1.3.3 F₃ generasyonunda homozigot *cpl1-6sos3-1* bitkisinin doğrulanması

F₂ generasyonunda homozigot *hkt1-1cpl1-6* olduğu belirlenen 1 adet bitkiden tohum toplanmış ve bu tohumlardan 8 adet F₃ bitkisi yetiştirilmiştir. Bitkiler 10 yaprak evresine gelince DNA izole edildikten sonra *cpl1-6* PCRı, *hkt1-1* PCRı ve *sos3-1* PCRı (Şekil 4.28) yapılmıştır. PCR sonucunda bu bitkilerin homozigot *hkt1-1cpl1-6* olduğu doğrulanmış ve sonraki yapılacak çalışmalar için yeterince tohum elde edilmiştir.



Şekil 4.28. F₂ generasyonunda homozigot *hkt1-1cpl1-6* olduğu belirlenen bitkilerin F₃ generasyonunda doğrulanması için yapılan *cpl1-6*, *hkt1-1* ve *sos1-1* PCR sonuçları. Col-0; yabancı tip PCR’da pozitif kontrol, *cpl1-6* T-DNA ekleme PCR’ı, *hkt1-1* T-DNA ekleme PCR’ı ve *sos1-1* mutant PCR’ında ise negatif kontrol olarak kullanılmıştır. *cpl1-6*; yabancı tip PCR’da negatif kontrol, T-DNA ekleme PCR’ında ise pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. *hkt1-1*; yabancı tip PCR’da negatif kontrol, T-DNA ekleme PCR’ında ise pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. *sos1-1*; yabancı tip PCR’da negatif kontrol, mutant PCR’ında ise pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. M: GeneRuler 100 bp DNA Markörü (ThermoScientific). PCR taramasında elde edilen bir adet 454 numaralı bitkinin homozigot *hkt1cpl1-6* olduğu belirlenmiştir.

4.2 Fizyolojik Ölçümler

Col-0, *sos1-1*, *hkt1-1*, *sos3-1*, *cpl1-6*, *sos1-1hkt1-1*, *sos3-1hkt1-1*, *hkt1-1cpl1-6* ve *cpl1-6sos3-1* mutantlarının tuz stresi altında göstermiş oldukları fizyolojik tepkileri değerlendirmek ve stresin yol açtığı değişiklikleri belirlemek için stres uygulanması sonucunda stres ve kontrol gruplarındaki bitkilerden aşağıdaki fizyolojik ölçümler alınmıştır.



Şekil 4.29. kontrol ve tuz stresi gurubundaki Col-0, *sos1-1*, *hkt1-1*, *sos3-1*, *cpl1-6*, *sos1-1hkt1-1*, *sos3-1hkt1-1*, *hkt1-1cpl1-6* ve *cpl1-6sos3-1* mutantlarının morfolojik görüntüsü.

MS besiyeri ortamında 2 hafta boyunca çimlendirilen bitkiler normal hidroponik ortamına aktarılmış, bir hafta normal ortamda büyütüldükten sonra bitkilerin yarısı kontrol olarak normal ortamda büyümeye devam etmiş, tuz grubundakilere ise 50 mM NaCl uygulanmıştır. Bir hafta stres uygulandıktan sonra bitkiler hidroponik ortamdan çıkartılıp fotoğrafları alınmıştır.

4.2.1 Kontrol ve stres gurubundaki bitkilerin morfolojik görüntüsü

Bitkiler Hoagland besin çözeltisinde 2 hafta büyütüldükten sonra stres uygulanması başlatılmıştır. Buna göre iki grup olarak kurulan hidroponik sistemdeki birinci grup bitkiler kontrol olarak normal Hoagland solüsyonunda büyümeye devam ettirilmiştir. İkinci gruptaki bitkilere tuz stresi uygulamak üzere her bir kutu ve stoktaki Hoagland miktarı tekrardan hesaplanmış ve 4 litre 1.5 M NaCl hazırlanıp Hoaglandın miktarına göre üstüne ilave edilerek her bir kutu ve stoktaki NaCl konsantrasyonunun 50 mM olması sağlanmıştır. Bitkilere 1 hafta stres uygulanmıştır. Şekil 4.29'de Col-0 yabanıl tip ile *sos1-1*, *hkt1-1*, *sos3-1*, *cpl1-6*, *sos1-1hkt1-1*, *sos3-1hkt1-1*, *hkt1-1cpl1-6* ve *cpl1-6sos3-1* mutantlarının kontrol ve tuz stresi altındaki morfolojik görüntüsü gösterilmektedir. Kontrol guruplarındaki bitkilerin morfolojik görüntüsünde çok değişiklik gözlemlenmemektedir. Tuz gurubunda ise *sos1-1*, *hkt1-1*, *sos3-1* mutantların yapraklarında sararma ve solgunluk gözlemlenmiş, bitki boyu kontrol guruplarına göre çok daha küçük kalmıştır. Tuz stresi altında *cpl1-6* mutantının yapraklarında sararma gözlenmemiş ama bitki boyu çok da etkilenmemiş ve hatta Col-0'dan daha iyi büyüebilmiştir. Bu da *cpl1-6* mutantının tuz stresine dayanıklı olduğunu göstermektedir. *sos1-1hkt1-1*, *sos3-1hkt1-1* çifte mutant bitkilerinin *sos1-1*, *hkt1-1*, *sos3-1* tekli mutant bitkilerine göre daha dayanıklı olduğu gözlemlenmiş, bu da Rus vd

(2001)'nin *Arabidopsis*'ta yaptığı çalışmada *sos3-1hkt1-1* bitkisine 75 mM tuz uygulaması sonucunda morfolojik olarak Col-0 ile aynı tepkiyi vermesiyle kanıtlanabilmektedir. *hkt1-1cpl1-6* çifte mutant bitkisinde ise, *hkt1-1* tekli mutant bitkisi tuza hassas iken *cpl1-6* ile melezlenip çifte mutant üretildiğinde *hkt1-1* tekli mutant bitkilerinde gözlemlenen bitki boyunun küçük kalması hafiflemiş, stres altında tekli mutant bitkisine göre daha iyi büyüebildiği gözlemlenmiştir. Yine aynı şekilde *sos3-1* tekli mutant bitkisine *cpl1-6* mutanıt eklendiği zaman tuz stresi altında *sos3-1* tekli mutantında ortaya çıkan sararma ve solgunluk ortadan kalkmış, bitki boyuda artış gözlemlenmiştir. Bu da *hkt1-1cpl1-6* ve *cpl1-6sos3-1* çifte mutantlarının *hkt1-1*, *sos3-1* tekli mutantlarında gözlemlenen hassaslığın hafiflediğini göstermektedir. Tuz stresi altında *cpl1-6* mutantının *hkt1-1* ve *sos3-1* mutantlarındaki hassaslığın hafiflemesine neden olması, *cpl1-6* tekli mutant bitkisinin ise tuzdan çok da etkilenmemesi, CPL1 proteininin tuz stresi ile ilişkili genlerin gen ifade yolağında daha yukarı bölgesinde yer alarak bu genlerin ifadesini negatif yönden etkilediğini ispatlamaktadır.

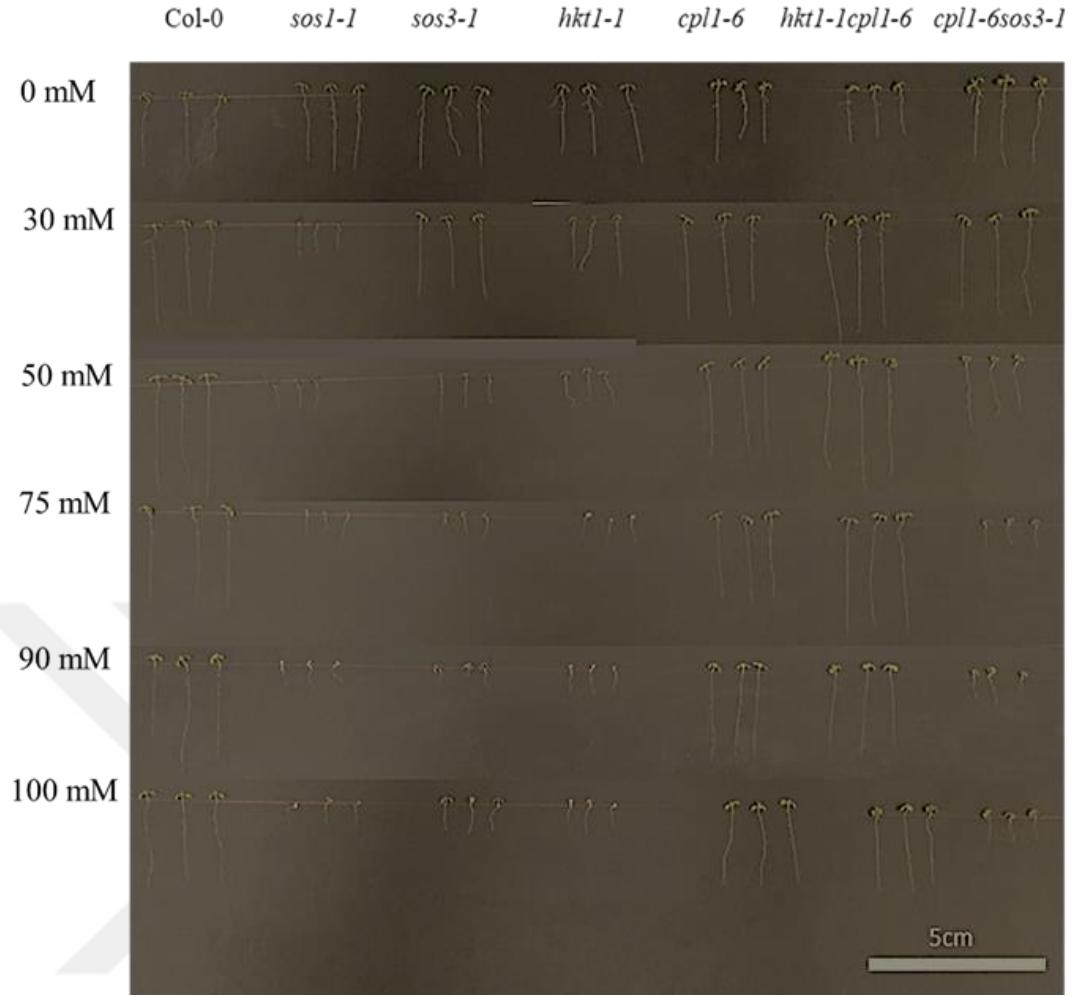
4.2.2 Kök uzunlukları

Tuz stresi altında köklerin gelişimi yüksek tuzun köklerin dışındaki ozmotik etkisi nedeniyle azalmaktadır. Bundan dolayı kök uzunlukları bitkilerin tuz stresine olan tepkisinin anlaşılmasında önemli bir ölçüm değeri olarak bilinmektedir. Bitki çeşitlerine göre değişim göstermekle birlikte düşük tuz altında bitkilerin kök uzunluklarında artış meydana gelirken, yüksek tuz stresi altında bitki kök uzunluklarında kısalma gözlemlenmektedir. Bu çalışmada, bitki kök uzunlukları besiyeri ve hidroponikte yetiştirilen kontrol ve stres koşullarında bulunan bitkilerden stres uygulamasının akabinde fotoğrafları alındıktan sonra ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir.

4.2.2.1 Besiyeri ortamında tuzun bitki kök uzunluklarına olan etkisi

Col-0 yabanıl tip ile *sos1-1*, *sos3-1*, *hkt1-1*, *cpl1-6*, *hkt1-1cpl1-6* ve *cpl1-6sos3-1* mutant tohumları MS besiyeri ortamında 4 gün çimlendirildikten sonra 0, 10, 25, 30, 50, 75, 90 ve 100 mM sodyum klorür (NaCl) içeren besiyerlerinde aktarılmış ve ilave 5 gün daha büyütölüp fotoğrafları alınmıştır. Şekil 4.30'da bitkilere 5 gün stres uygulanması sonucunda genotiplerin kök morfolojileri, Çizelge 4.4'te bitkilerin kök uzunlukları, Şekil

4.31'de ise bitkilerinin kontrol bitkisine göre kök uzunluklarının yüzde değişimi verilmiştir. Ele edilen veriler Statistix 8.1 programı aracılığıyla varyans analizine tabi tutularak, elde edilen ortalama değerler arasındaki farklılıklar LSD analizi ile % 5 önem seviyesinde karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak *sos1-1*, *sos3-1* ve *hkt1-1* mutantlarının tuza hassas olduğu belirlenmiştir. *cpl1-6* mutantının kök uzunluklarının tüm tuz uygulama guruplarında Col-0 ile aynı tepkiyi verdiği, istatistiksel olarak farklılık olmadığı belirlenmiş, bu da *cpl1-6* mutantının tuz stresine Col-0 kadar dayanıklı olduğun göstermektedir. *hkt1-1cpl1-6* bitkisi 0, 10, 30, 50 ve 75 mM tuz uygulamasında *cpl1-6* bitkisi ile istatistiksel olarak farklılık göstermemiştir. Bu da *hkt1-1* tekli mutanı tuza hassas iken *cpl1-6* mutantının eklenmesiyle dayanıklı olduğu göstermektedir. *cpl1-6sos3-1* bitkisi 25 ve 30 mM tuz uygulamalarında *cpl1-6* bitkisi ile istatistiksel olarak farklılık göstermemişken, 50 mM tuz uygulamasında kök uzunlukları birden düşüş göstermektedir. Bu da *in vitro* koşullarda *cpl1-6sos3-1* bitkisinin yüksek tuza hassas olduğunu göstermektedir. 50 mM tuz uygulamasında gözlemlenen kök uzunluğundaki kısalma *sos1-1*, *sos3-1*, *hkt1-1* bitkileri için de geçerlidir. Bundan dolayı, bir sonraki yapılacak olan hidroponik deneyde stres guruplarına 50 mM NaCl uygulanması kararlaştırılmıştır.

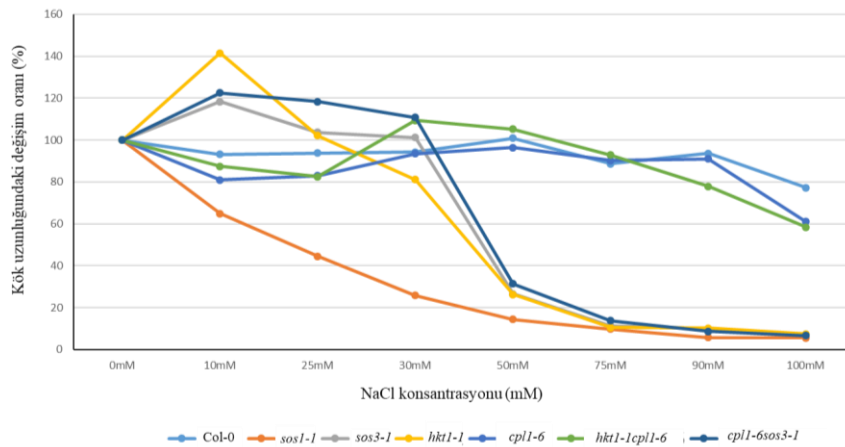


Şekil 4.30. Col-0, *sos1-1*, *sos3-1*, *hkt1-1*, *cpl1-6*, *hkt1-1cpl1-6* ve *cpl1-6sos3-1* genotiplerinin farklı NaCl konsantrasyonu içeren MS ortamında 5 gün stres uygulanması sonucundaki morfolojik görüntüsü

Çizelge 4.3. Col-0, *sos1-1*, *sos3-1*, *hkt1-1*, *cpl1-6*, *hkt1-1cpl1-6* ve *cpl1-6sos3-1* genotiplerinin *in vitro* NaCl uygulamasına vermiş oldukları kök uzunluk tepkileri

NaCl konsantrasyonu (mM)	Bitki genotipi	Kök uzunluğu (cm)	NaCl konsantrasyonu (mM)	Bitki genotipi	Kök uzunluğu (cm)
0	Col-0	2.39 ± 0.13 ^{Ab}	50	Col-0	2.42 ± 0.07 ^{Aab}
	<i>sos1</i>	1.52 ± 0.30 ^{Ab}		<i>sos1</i>	0.22 ± 0.02 ^{Ed}
	<i>sos3</i>	2.02 ± 0.22 ^{Bab}		<i>sos3</i>	0.54 ± 0.10 ^{Cc}
	<i>hkt1</i>	1.61 ± 0.11 ^{Bb}		<i>hkt1</i>	0.42 ± 0.10 ^{Dc}
	<i>cpl1-6</i>	2.42 ± 0.68 ^{Aa}		<i>cpl1-6</i>	2.33 ± 0.11 ^{ABb}
	<i>hkt1 cpl1-6</i>	2.45 ± 0.59 ^{ABa}		<i>hkt1 cpl1-6</i>	2.58 ± 0.32 ^{Aa}
	<i>cpl1-6sos3</i>	1.86 ± 0.09 ^{Cb}		<i>cpl1-6sos3</i>	0.58 ± 0.12 ^{Dc}
10	Col-0	2.23 ± 0.23 ^{ABab}	75	Col-0	2.12 ± 0.26 ^{Ba}
	<i>sos1</i>	0.98 ± 0.09 ^{Bd}		<i>sos1</i>	0.15 ± 0.01 ^{Eb}
	<i>sos3</i>	2.39 ± 0.23 ^{Aa}		<i>sos3</i>	0.23 ± 0.06 ^{Db}
	<i>hkt1</i>	2.27 ± 0.14 ^{Aab}		<i>hkt1</i>	0.17 ± 0.07 ^{Eb}
	<i>cpl1-6</i>	1.96 ± 0.15 ^{Bc}		<i>cpl1-6</i>	2.18 ± 0.09 ^{ABa}
	<i>hkt1 cpl1-6</i>	2.14 ± 0.24 ^{BCbc}		<i>hkt1 cpl1-6</i>	2.27 ± 0.26 ^{A-Ca}
	<i>cpl1-6sos3</i>	2.28 ± 0.10 ^{Aab}		<i>cpl1-6sos3</i>	0.26 ± 0.07 ^{Eb}
25	Col-0	2.25 ± 0.23 ^{ABa}	90	Col-0	2.24 ± 0.21 ^{ABa}
	<i>sos1</i>	0.68 ± 0.09 ^{Cc}		<i>sos1</i>	0.09 ± 0.02 ^{Ec}
	<i>sos3</i>	2.09 ± 0.23 ^{Ba}		<i>sos3</i>	0.20 ± 0.04 ^{Dc}
	<i>hkt1</i>	1.64 ± 0.14 ^{Bb}		<i>hkt1</i>	0.16 ± 0.03 ^{Ec}
	<i>cpl1-6</i>	2.01 ± 0.15 ^{ABa}		<i>cpl1-6</i>	2.20 ± 0.16 ^{ABa}
	<i>hkt1 cpl1-6</i>	2.02 ± 0.24 ^{Ca}		<i>hkt1 cpl1-6</i>	1.91 ± 0.20 ^{Cb}
	<i>cpl1-6sos3</i>	2.20 ± 0.10 ^{ABa}		<i>cpl1-6sos3</i>	0.16 ± 0.03 ^{Ec}
30	Col-0	2.25 ± 0.13 ^{ABb}	100	Col-0	1.85 ± 0.06 ^{Ca}
	<i>sos1</i>	0.39 ± 0.04 ^{De}		<i>sos1</i>	0.09 ± 0.02 ^{Ec}
	<i>sos3</i>	2.05 ± 0.17 ^{Bc}		<i>sos3</i>	0.14 ± 0.06 ^{Dc}
	<i>hkt1</i>	1.31 ± 0.10 ^{Cd}		<i>hkt1</i>	0.12 ± 0.03 ^{Ec}
	<i>cpl1-6</i>	2.26 ± 0.04 ^{ABac}		<i>cpl1-6</i>	1.47 ± 0.10 ^{Cb}
	<i>hkt1 cpl1-6</i>	2.68 ± 0.21 ^{Aa}		<i>hkt1 cpl1-6</i>	1.43 ± 0.21 ^{Db}
	<i>cpl1-6sos3</i>	2.06 ± 0.17 ^{Bac}		<i>cpl1-6sos3</i>	0.12 ± 0.02 ^{Ec}

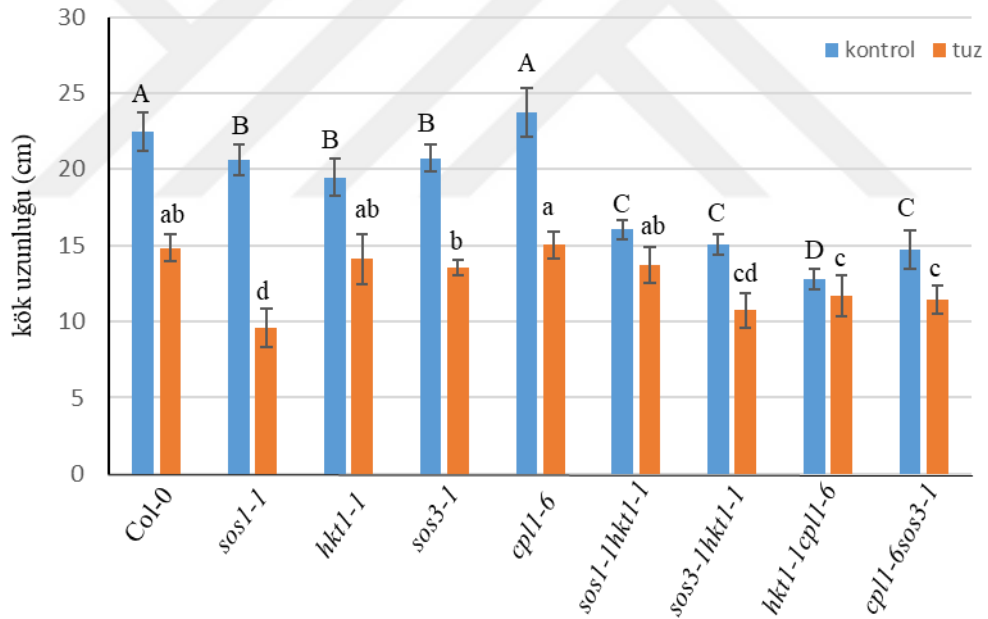
Büyük harfler, aynı genotipte farklı uygulamalar arasındaki istatistiksel farkı; küçük harfler, bir uygulamadaki 7 farklı genotipin arasındaki istatistiksel farkı belirtmektedir. ($p \leq 0.05$).



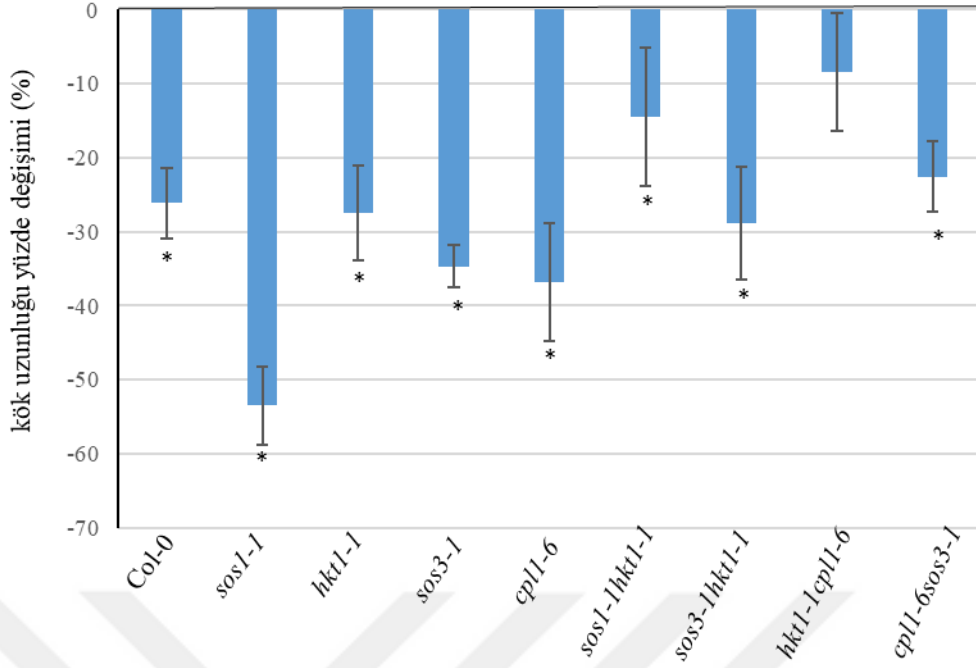
Şekil 4.31. Genotiplerin *in vitro* koşullarda NaCl uygulamasına vermiş oldukları kök uzunluk değişim oranları

4.2.2.2 Hidroponik ortamda tuzun bitki kök uzunluklarına olan etkisi

Col-0 yabanıl tip ile *sos1-1*, *hkt1-1*, *sos3-1*, *cpl1-6*, *sos1-1hkt1-1*, *sos3-1hkt1-1*, *hkt1-1cpl1-6* ve *cpl1-6sos3-1* mutant tohumları MS besiyeri ortamında 2 hafta çimlendirildikten sonra hidroponik ortamına aktarılmış ve normal ortamda bir hafta büyümeye devam etmiştir. Ardından bitkiler kontrol ve stres grubu olarak iki gruba ayrılarak kontrol grubundaki bitkiler normal ortamda büyümeye devam ederken stres grubundaki bitkilere bir hafta boyunca 50 mM NaCl uygulanmıştır. Deney sonunda her bir genotipten 6 bitkinin kök uzunlukları alınmış ve Statistix 8.1 programı aracılığıyla varyans analizine tabi tutularak elde edilen ortalama değerler arasındaki farklılıklar LSD analizi ile % 5 önem seviyesinde karşılaştırılmıştır. Şekil 4.32’de kontrol ve stres gruplarındaki bitkilerin kök uzunluklarının ortalama değeri verilmiştir. Şekil 4.33’de tuz stresi altında kök uzunluklarının kontrol grubuna göre yüzde değişimi verilmiştir.



Şekil 4.32. Genotiplerin tuz stresi altındaki kök uzunlukları. Büyük harfler, kontrol grubundaki genotipler arasındaki istatistiksel farkı; küçük harfler, stres grubundaki genotipler arasındaki istatistiksel farkı belirtmektedir ($p \leq 0.05$).



Şekil 4.33. Kök uzunluğu yüzde değişimi. * istatistiksel farkı belirtmektedir ($p \leq 0.05$).

Buna göre, normal koşullarda Col-0, *cpl1-6* bitkileri; *sos1-1*, *hkt1-1*, *sos3-1* bitkileri ve *sos1-1hkt1-1*, *sos3-1hkt1-1*, *cpl1-6sos3-1* bitkilerin kök uzunlukları arasında istatistiksel fark gözlenmemişken, tuz stresi altında *cpl1-6* bitkisinin en dayanıklı olduğu belirlenmiştir. Kök uzunluğunun yüzde değişiminde ise *cpl1-6sos3-1* bitkisinde istatistiksel fark gözlenmemiştir, bu da *cpl1-6sos3-1* bitkisinin tuz stresi karşı dayanıklılık gösterdiğini belirtmektedir.

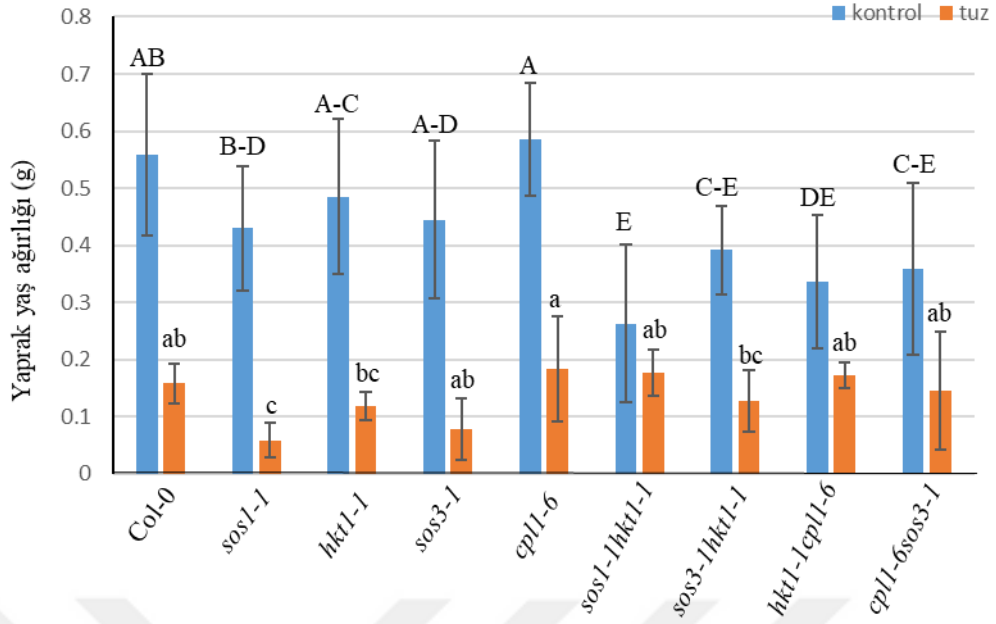
4.2.3 Yaprak ve kök dokularının yaş ve kuru ağırlığı

Tuz stresi bitkilerde fizyolojik kuraklığa neden olarak bitkileri su eksikliğine uğratmakla birlikte gelişmeyi yavaşlatarak bitki boyunun ve köklerin küçük kalmasına neden olmaktadır. Bu nedenle, yaprak ve köklerin yaş ve kuru ağırlıklarının belirlenmesi bitkinin tuzdan etkilenme derecesini anlamak için önemli faktörlerden biridir. Yaprak ve kök yaş ve kuru ağırlığı hidroponik ortamda yetiştirilen kontrol ve stres koşullarında bulunan bitkilerden stres uygulamasının akabinde (7. günün sonunda), her bir uygulamada her bir genotipten 6 bitki olmak üzere toplam 108 adet bitkinin kök ve yapraklarından yapılmıştır. Elde edilen veriler Statistix 8.1 programı kullanılıp varyans analizine tabi tutularak, ortalama değerler arasındaki farklılıklar LSD analizi ile % 5 önem seviyesinde karşılaştırılmıştır.

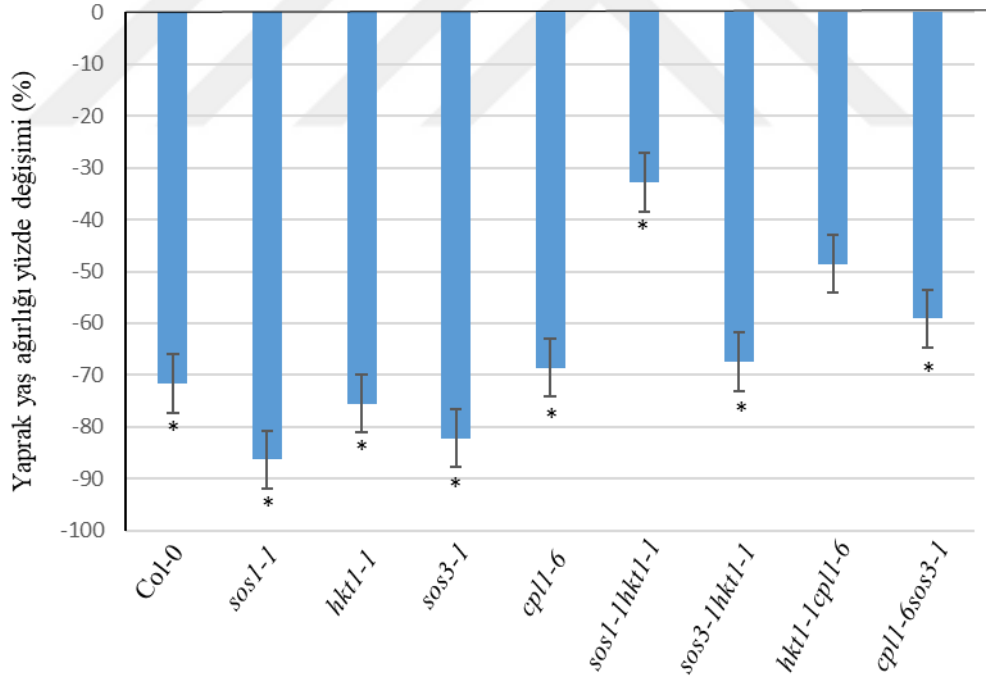
4.2.3.1 Yaprak yaş ağırlığı

Şekil 4.34’de kontrol ve stres gruplarındaki bitkilerin yaprak yaş ağırlıklarının ortalama değerleri verilmiştir. Şekil 4.35’de tuz stresi altında, genotiplerin yaprak yaş ağırlıklarının kontrol grubuna göre yüzde değişimleri verilmiştir.

Ölçüm sonuçlarına göre kontrol koşullarında yetişen bitkilerin yaprak yaş ağırlığının stres gurubuna göre daha yüksek olduğu, bu farklılığın da istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir. Bitkilerin stres altında gelişimlerinin yavaşlamasından kaynaklı bitkinin küçük kalması nedeniyle tuz grubundaki yaprakların yaş ağırlığı kontrol grubuna göre daha düşük olmaktadır. Kontrol koşullarında *sos1-1*, *hkt1-1*, *sos3-1* ve *cpl1-6* bitkileri Col-0 bitkisiyle aynı tepkiyi vermişken *sos1-1hkt1-1*, *sos3-1hkt1-1*, *hkt1-1cpl1-6* ve *cpl1-6sos3-1* çifte mutantlarının yaprak ağırlığında önemli düzeyde düşüş meydana gelmiştir. Bu da normal şartlarda birkaç genin eş zamanlı mutasyona uğramasının bitkilerin normal yaşam döngülerini tamamlamalarını önemli düzeyde etkilediğini kanıtlamaktadır. Tuz stresi altında *sos1-1* bitkisinin yaprak yaş ağırlığı en düşük, *cpl1-6* bitkisinin ise en yüksek olarak bulunmuştur. Bu da *sos1-1* bitkisinin tuz stresine hassas, *cpl1-6* bitkisinin ise dayanıklı olduğunu göstermektedir. İlginç bir şekilde, daha önceki çalışmalarda hassas olduğu belirlenen *hkt1-1*, *sos3-1* tekli mutant bitkileri, dayanıklı olduğu bilinen *sos3-1hkt1-1* bitkisi ve bu tez çalışmasında incelenen *hkt1-1cpl1-6* ve *cpl1-6sos3-1* çifte mutant bitkilerinin yaprak yaş ağırlıkları Col-0 bitkisiyle istatistiksel olarak farklılık göstermemektedir. Bu da bu bitkilere bir hafta boyunca 50 mM tuz uygulanmasının yaprak yaş ağırlığını yeterli düzeyde etkilemediğini göstermektedir.



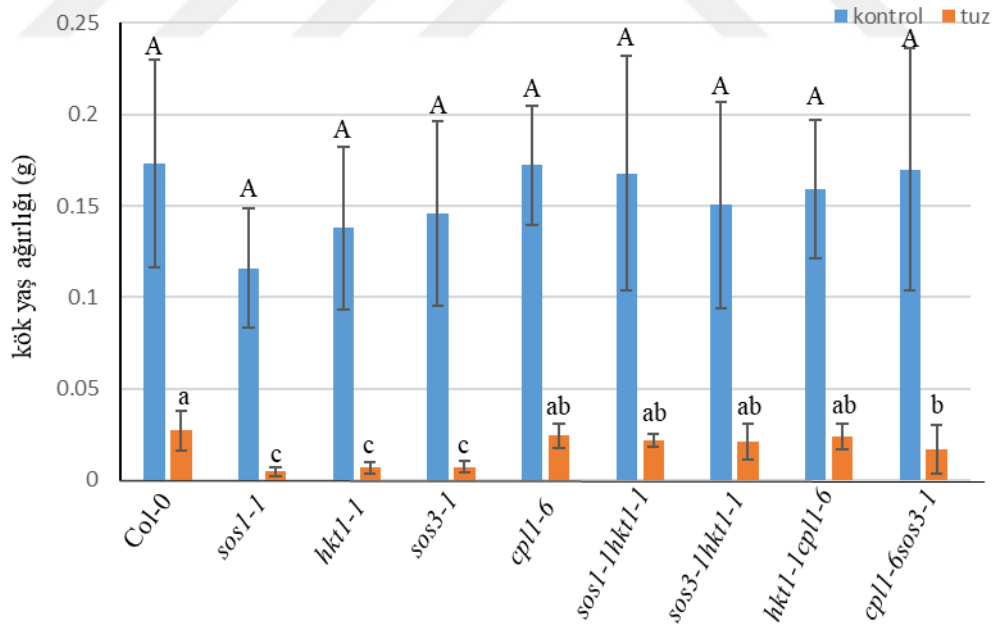
Şekil 4.34. Genotiplerin tuz stresi altındaki yaprak yaş ağırlıkları. Büyük harfler, kontrol grubundaki genotipler arasındaki istatistiksel farkı; küçük harfler, stres grubundaki genotipler arasındaki istatistiksel farkı belirtmektedir ($p \leq 0.05$).



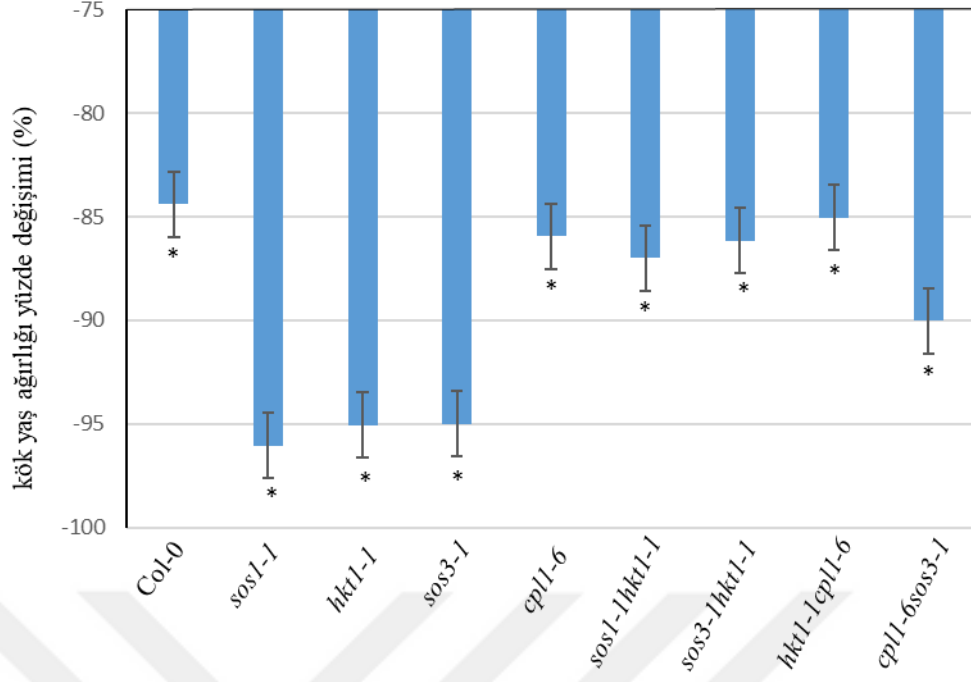
Şekil 4.35. Yaprak yaş ağırlığı yüzde değişimi. * istatistiksel farkı belirtmektedir ($p \leq 0.05$).

4.2.3.2 Kök yaş ağırlığı

Şekil 4.36’da kontrol ve stres gruplarındaki bitkilerin kök yaş ağırlıklarının ortalama değeri verilmiştir. Şekil 4.37’de tuz stresi altında kök yaş ağırlıklarının kontrol grubuna göre yüzde değişimi verilmiştir. Köklerin yaş ağırlıkları yaprak yaş ağırlığına paralel olarak tuz stresi altında azalma göstermektedir. Fakat kök yaş ağırlığındaki yüzde değişim yapraktaki yüzde değişimden daha yüksek gözlenmiştir. Bu da tuz stresinin köklere olan etkisinin yapraklara olan etkisinden daha yüksek olduğunu göstermektedir. Kontrol gruplarının kök yaş ağırlığında istatistiksel olarak farklılık gözlenmemiştir. Tuz gruplarında ise *sos1-1*, *hkt1-1*, *sos3-1* tekli mutant bitkileri hassasken, *cpl1-6* ve *sos1-1hkt1-1*, *sos3-1hkt1-1*, *hkt1-1cpl1-6* çifte mutant bitkilerinin kök yaş ağırlığı Col-0’a göre istatistiksel olarak farklılık göstermemiş, *cpl1-6sos3-1* bitkisi ise *cpl1-6* bitkisiyle farklılık göstermemiştir. *hkt1-1*, *sos3-1* tekli mutantlara *cpl1-6* mutanını eklenerek *hkt1-1cpl1-6* ve *cpl1-6sos3-1* çifte mutant elde edildiğinde, bitkilerin dayanıklılığın artması *cpl1-6* mutantından kaynaklanmaktadır. Bu da CPL1 proteininin tuz stresi altındaki genleri negatif yönden etkilediğini göstermektedir.



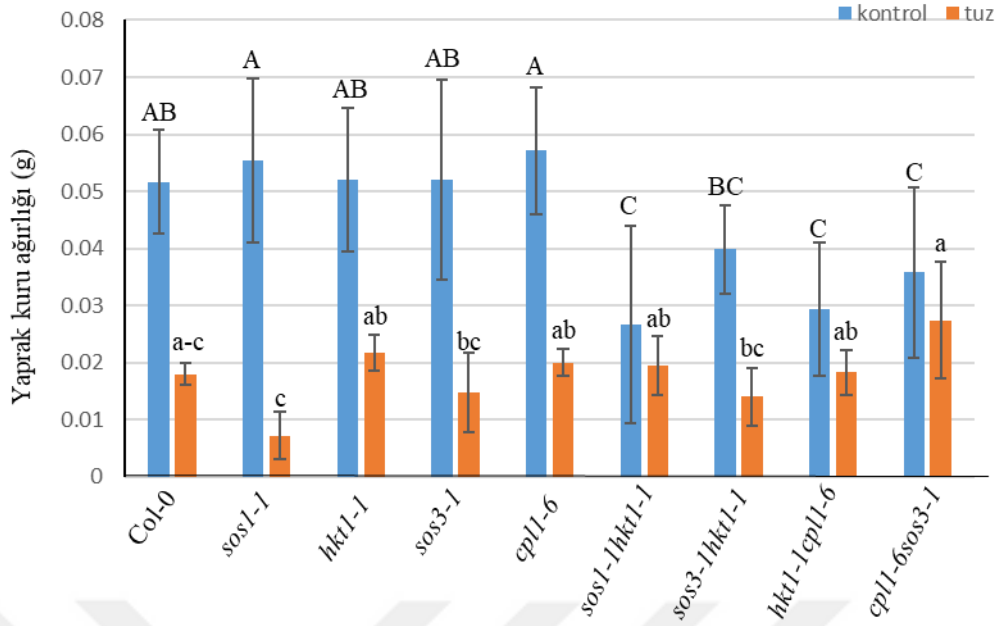
Şekil 4.36. Genotiplerin tuz stresi altındaki kök yaş ağırlıkları. Büyük harfler, kontrol grubundaki genotipler arasındaki istatistiksel farkı; küçük harfler, stres grubundaki genotipler arasındaki istatistiksel farkı belirtmektedir ($p \leq 0.05$).



Şekil 4.37. Kök yaş ağırlığı yüzde değişimi. * istatistiksel farkı belirtmektedir ($p \leq 0.05$).

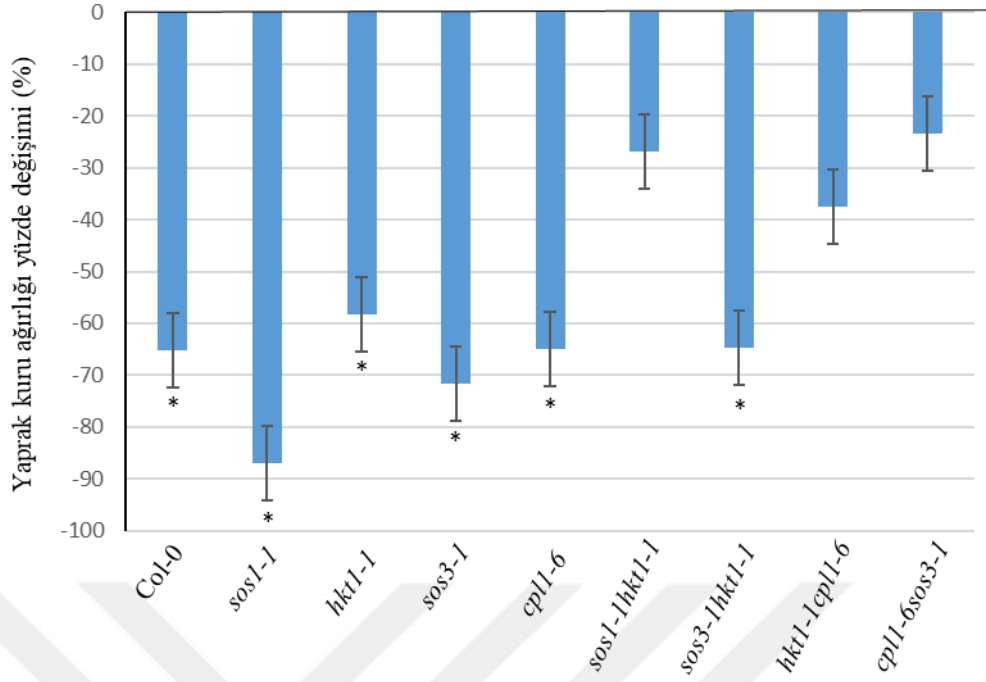
4.2.3.3 Yaprak kuru ağırlığı

Şekil 4.38'da kontrol ve stres gruplarındaki bitkilerin yaprak kuru ağırlıklarının ortalama değeri verilmiştir. Şekil 4.39'da tuz stresi altında yaprak kuru ağırlığının kontrol grubuna göre yüzde değişimi verilmiştir.



Şekil 4.38. Genotiplerin tuz stresi altındaki yaprak kuru ağırlıkları. Büyük harfler, kontrol grubundaki genotipler arasındaki istatistiksel farkı; küçük harfler, stres grubundaki genotipler arasındaki istatistiksel farkı belirtmektedir ($p \leq 0.05$).

Yaprak kuru ağırlığı yaş ağırlığıyla aynı şekilde stres altında azalmaktadır. Kontrol koşullarında *sos1-1*, *hkt1-1*, *sos3-1* ve *cpl1-6* bitkileri Col-0 bitkisiyle aynı tepkiyi vermişken, *sos1-1hkt1-1*, *sos3-1hkt1-1*, *hkt1-1cpl1-6* ve *cpl1-6sos3-1* çifte mutantlarının yaprak kuru ağırlığında önemli düzeyde düşüş meydana gelmiştir. Stres gruplarında ise istatistiksel olarak farklılık meydana gelmemiştir. Yaprak yaş ağırlığında *sos1-1* bitkisinin yaprak yaş ağırlığı en düşük, *cpl1-6* bitkisinin ise en yüksek olmuşken, kuru ağırlığında farklılık olmaması stres altında *sos1-1* bitkisinin su tutma kapasitesinin en düşük, yani en hassas, *cpl1-6* bitkisinin su kapasitesinin en yüksek, yani en dayanıklı olduğunu göstermektedir.

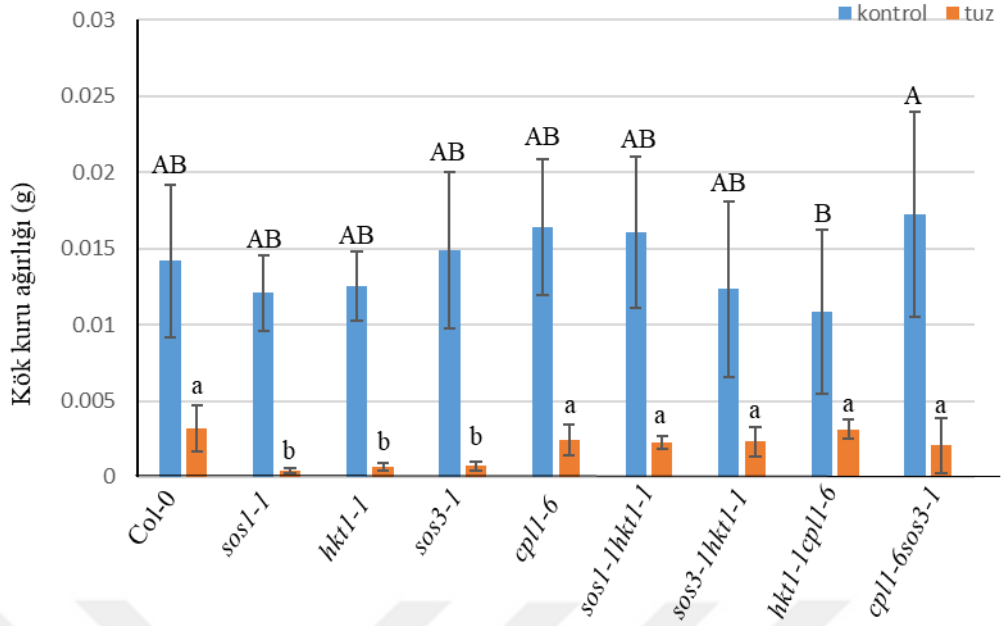


Şekil 4.39. Yaprak kuru ağırlığı yüzde değişimi. * istatistiksel farkı belirtmektedir ($p \leq 0.05$).

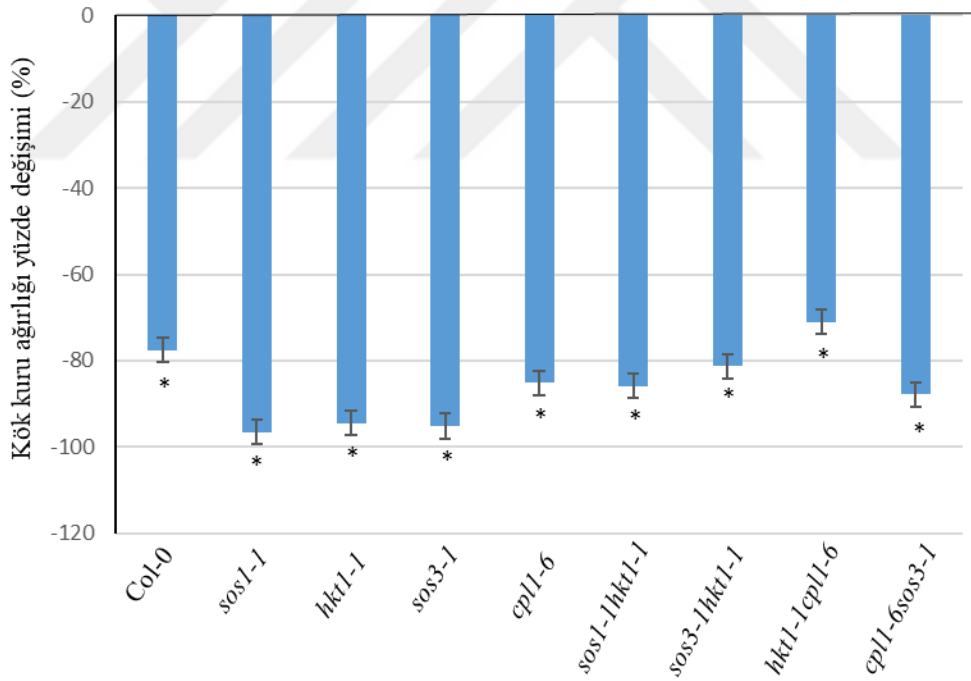
4.2.3.4 Kök kuru ağırlığı

Şekil 4.40’da kontrol ve stres gruplarındaki bitkilerin kök kuru ağırlıklarının ortalama değeri verilmiştir. Şekil 4.41’de tuz stresi altında kök kuru ağırlığının kontrol grubuna göre yüzde değişimi verilmiştir.

Köklerin kuru ağırlıkları yaş ağırlıklarıyla aynı şekilde tuz stresi altında azalma göstermekte ve kontrol grubundaki bitkilerin kök yaş ağırlıkları arasında istatistiksel olarak bir farklılık görülmemiştir. Tuz gruplarında *sos1-1*, *hkt1-1*, *sos3-1* tekli mutant bitkileri hassasken, *cpl1-6* ve *sos1-1hkt1-1*, *sos3-1hkt1-1*, *hkt1-1cpl1-6*, *cpl1-6sos3-1* çifte mutant bitkilerinin kök kuru ağırlığı Col-0’a göre istatistiksel olarak farklılık göstermemiştir. Kök yaş ağırlıklarıyla aynı şekilde *hkt1-1*, *sos3-1* tekli mutantlara *cpl1-6* mutanı eklenerek *hkt1-1cpl1-6* ve *cpl1-6sos3-1* çifte mutant elde edilmesiyle bitkilerin dayanıklılığın artması *cpl1-6* mutantından kaynaklanmaktadır. Bu da, CPL1 proteininin tuz stresi altındaki genleri negatif yönden etkilediğini göstermektedir.



Şekil 4.40. Genotiplerin tuz stresi altındaki kök kuru ağırlıkları. Büyük harfler, kontrol grubundaki genotipler arasındaki istatistiksel farkı; küçük harfler, stres grubundaki genotipler arasındaki istatistiksel farkı belirtmektedir ($p \leq 0.05$).

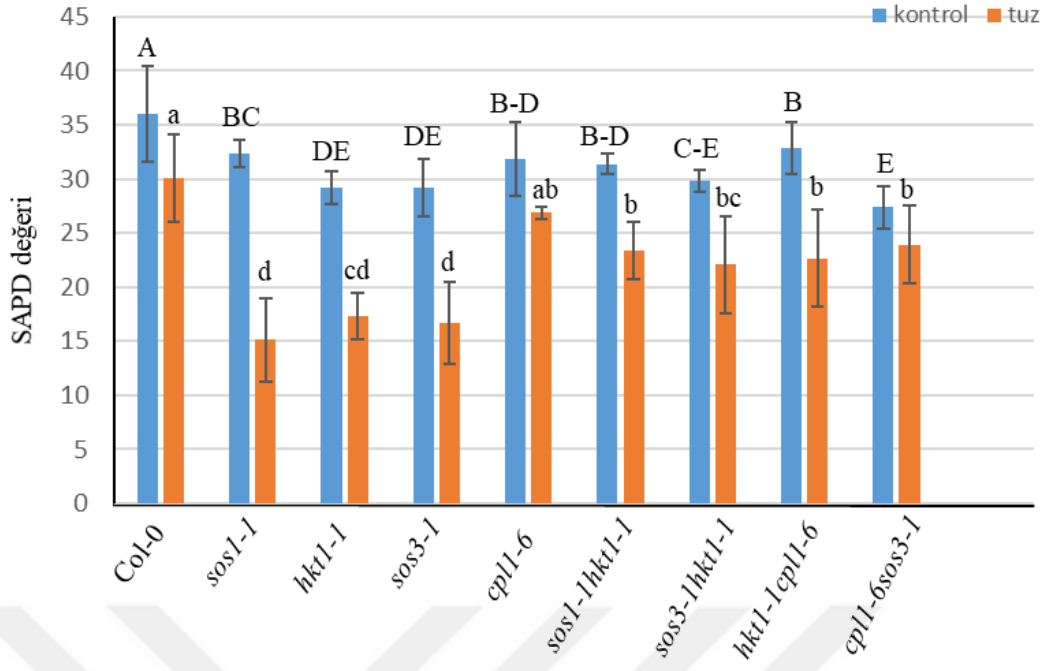


Şekil 4.41. Kök kuru ağırlığı yüzde değişimi. * istatistiksel farkı belirtmektedir ($p \leq 0.05$).

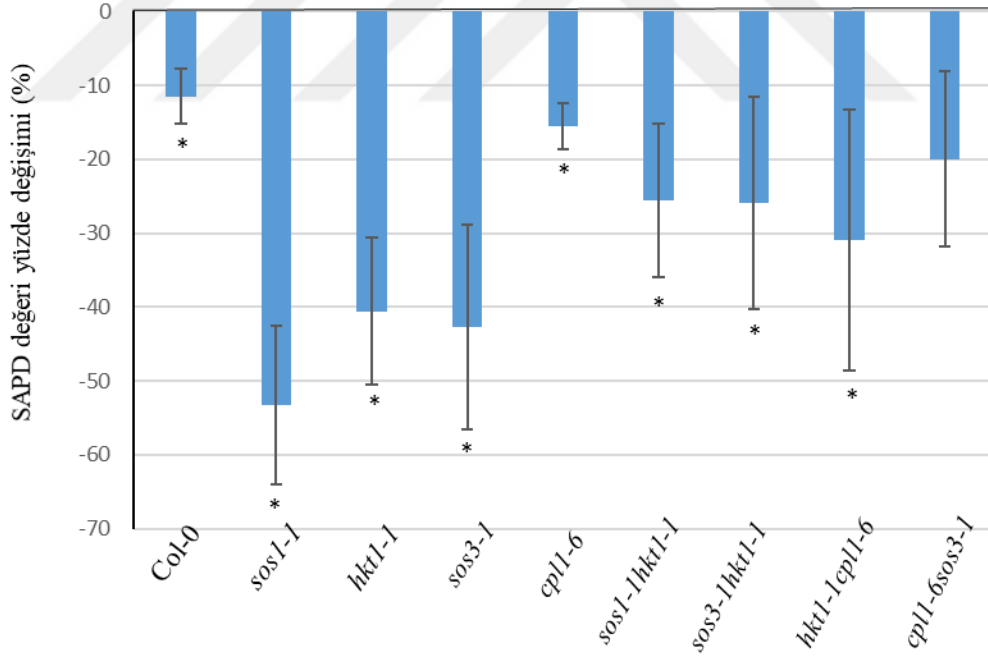
4.2.4 SPAD değeri (yaprak klorofil indeksi)

Yapraktaki klorofil indeksinin belirlenmesi için SPAD ölçümü yapılmıştır. SPAD ölçümü hidroponik ortamda yetiştirilen kontrol ve stres koşullarında bulunan bitkilerden stres uygulamasının akabinde (7. günün sonunda) yapılmıştır. Elde edilen veriler Statistix 8.1 programı kullanılıp varyans analizine tabi tutularak, ortalama değerler arasındaki farklılıklar LSD analizi ile % 5 önem seviyesinde karşılaştırılmıştır. Şekil 4.42’de kontrol ve stres gruplarındaki bitkilerin SPAD değerinin ortalaması verilmiştir. Şekil 4.43’te tuz stresi altında SPAD değerinin kontrol grubuna göre yüzde değişimi verilmiştir.

Kontrol koşullarında yetişen bitkilerin SPAD değerinin stres grubuna göre daha da yüksek olduğu, bu farklılığın da *cpl1-6sos3-1* bitkisinden başka bütün genotiplerde istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur. Bu da tuz stresinin yapraktaki klorofil indeksini negatif yönden etkilediğini kanıtlamaktadır. Tuz stresi altında *cpl1-6* mutanıtı ile Col-0 arasında SPAD değerinde istatistiksel farklılık görülmemiştir. Bu da *cpl1-6* mutanıtının tuz stresine dayanıklılık gösterdiğini bildirmektedir. Tuz stresi altında *sos3-1*, *hkt1-1* mutanıtları düşük klorofil indeksi gösterirken, *cpl1-6* ile melezleme sonucunda elde edilen *cpl1-6sos3-1* ve *hkt1-1cpl1-6* çifte mutanıt bitkilerinde ise yaprak klorofil indeksi istatistiksel olarak önemli düzeyde artmaktadır. Özellikle *cpl1-6sos3-1* bitkisinde kontrol ve stres grubu arasındaki SPAD değerinde istatistiksel farklılık görülmemiştir. Bu da *cpl1-6sos3-1* bitkisinin tuza dayanıklı olduğunu kanıtlamaktadır.



Şekil 4.42. Genotiplerin tuz stresi altındaki yaprak klorofil indeksleri. Büyük harfler, kontrol grubundaki genotipler arasındaki istatistiksel farkı; küçük harfler, stres grubundaki genotipler arasındaki istatistiksel farkı belirtmektedir ($p \leq 0.05$).

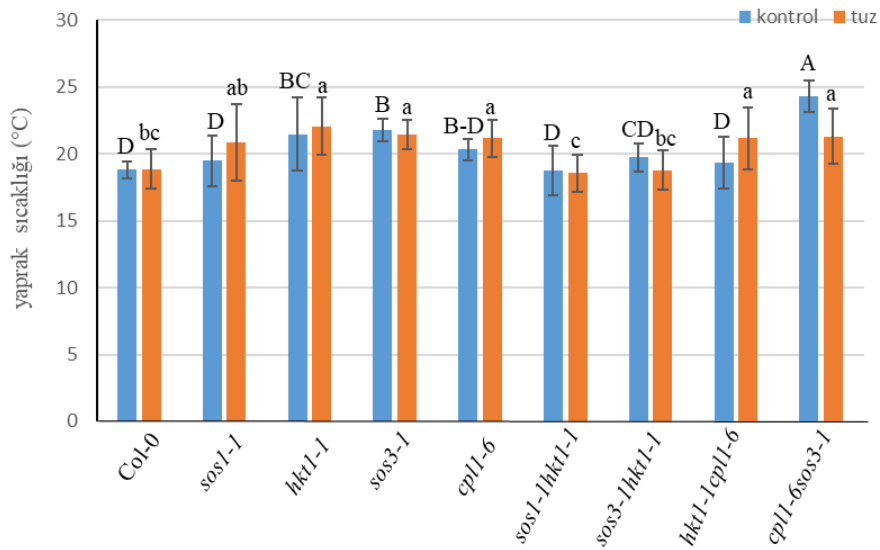


Şekil 4.43. Yaprak klorofil indeksinin yüzde değişimi. * istatistiksel farkı belirtmektedir ($p \leq 0.05$).

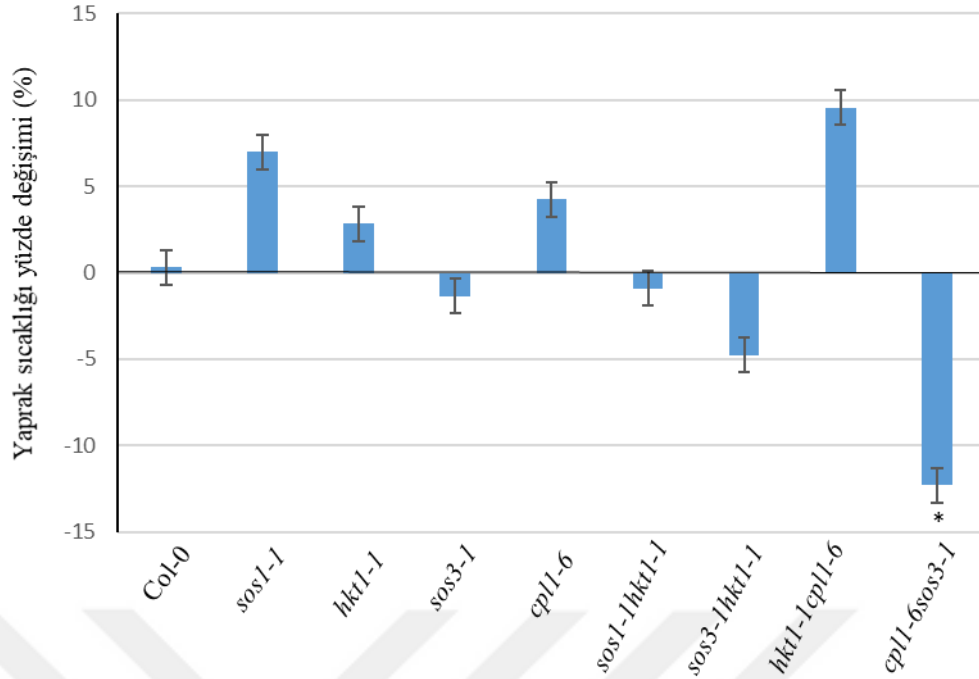
4.2.5 Yaprak sıcaklığı (°C)

Tuz stresi bitkilerde fizyolojik kuraklığın oluşmasına neden olmakta ve bu denkle bitkiler su kaybını azaltmak için stomalarını kapatmaktadır. Stomaların kapanması da yapraklarda terlemeyi azaltarak yaprak sıcaklığının artmasına sebep olmaktadır (Dolferus, 2014; Farooq vd., 2009). Bu nedenle tuz stresi altında yaprak sıcaklığın artması beklenmektedir. Bu çalışmada yaprak sıcaklığı hidroponik ortamda yetiştirilen kontrol ve stres koşullarında bulunan bitkilerden stres uygulamasının akabinde (7. günün sonunda) yapılmış ve Statistix 8.1 programı kullanılıp varyans analizine tabi tutularak elde edilen ortalama değerler arasındaki farklılıklar LSD analizi ile % 5 önem seviyesinde karşılaştırılmıştır. Şekil 4.44'te kontrol ve stres gruplarındaki bitkilerin yaprak sıcaklıklarının ortalama değeri verilmiştir. Şekil 4.45'de tuz stresi altında yaprak sıcaklığının kontrol grubuna göre yüzde değişimi verilmiştir.

Buna göre tuz stresi altında Col-0 ile *cpl1-6sos3-1*, *hkt1-1cpl1-6* bitkilerinin yaprak sıcaklığında istatistiksel bir farklılık görüldüğü belirlenmiştir. Öte yandan, *cpl1-6*, *sos3-1*, *hkt1-1*, *cpl1-6sos3-1* ve *hkt1-1cpl1-6* bitkilerinin yaprak sıcaklıkları arasında ise istatistiksel farklılık görülmemiştir. Fakat tuz stresi altında yaprak sıcaklığının yükselmesi beklenirken *cpl1-6sos3-1* bitkisinde ise düştüğü belirlenmiştir. Bu da *cpl1-6sos3-1* mutantının tuz stresine dayanıklı olduğunu göstermektedir.



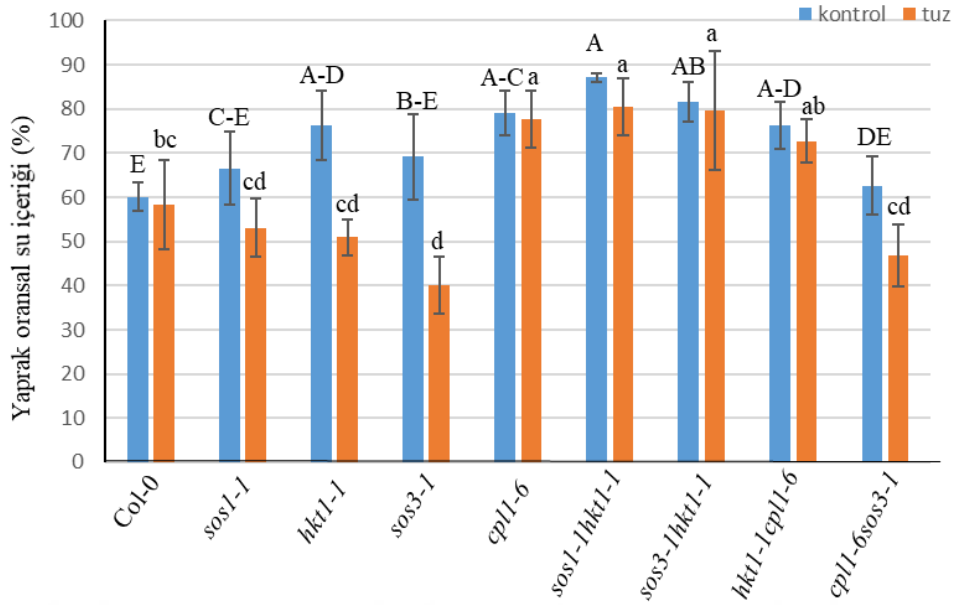
Şekil 4.44. Genotiplerin tuz stresi altındaki yaprak sıcaklıkları (°C). Büyük harfler, kontrol grubundaki genotipler arasındaki istatistiksel farkı; küçük harfler, stres grubundaki genotipler arasındaki istatistiksel farkı belirtmektedir ($p \leq 0.05$).



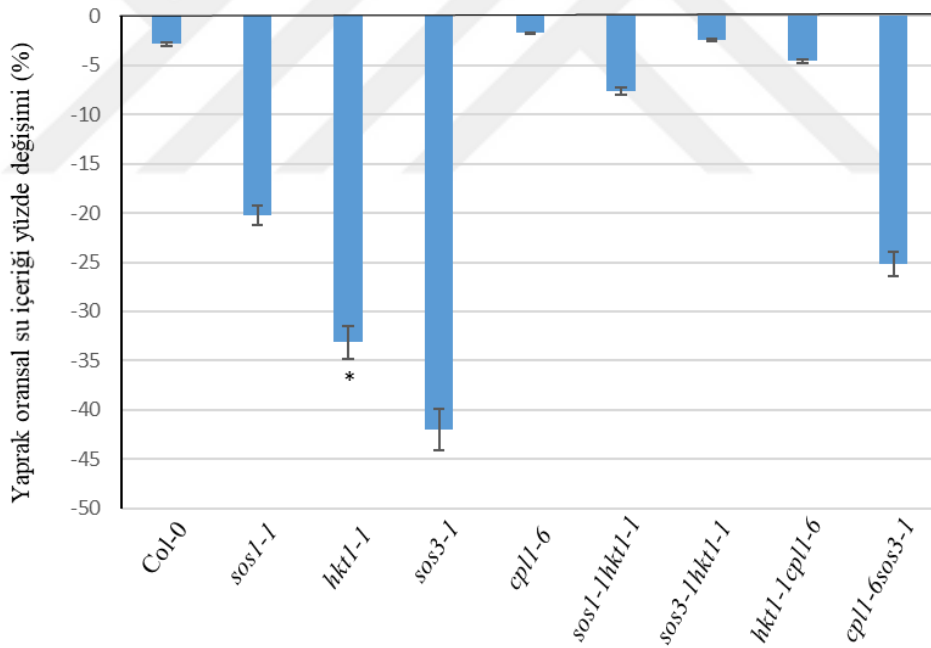
Şekil 4.45. Yaprak sıcaklığı yüzde değişimi. * istatistiksel farkı belirtmektedir ($p \leq 0.05$).

4.2.6 Yaprak ve kök oransal su içeriği

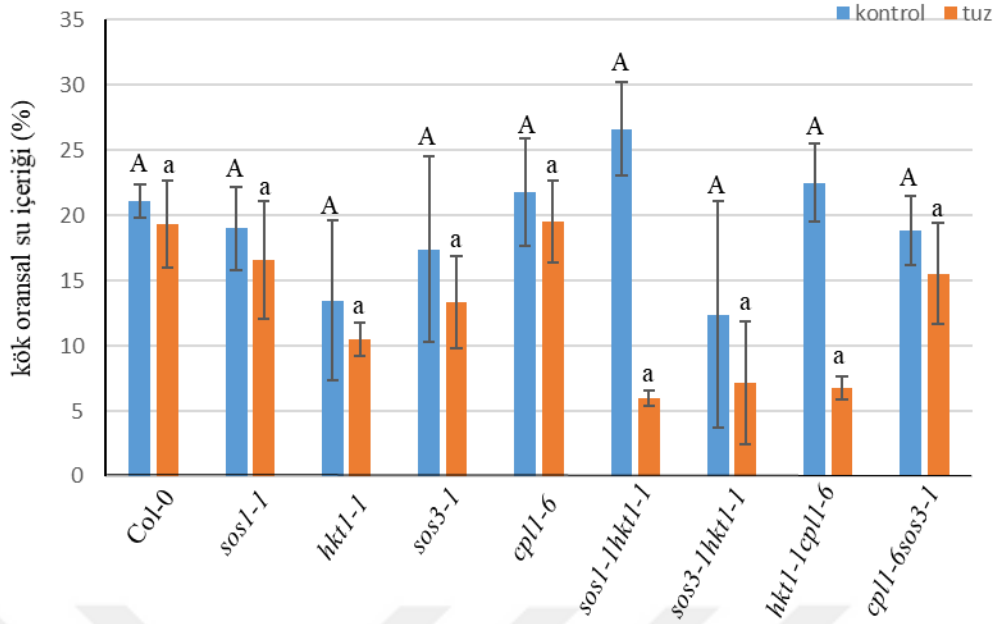
Tuz stresi bitkilerde oransal su içeriğinin düşmesine neden olmaktadır. Bassiouny vd. (2005) tarafından yapılan çalışmada tuz stresi altında mısır bitkisinin oransal su içeriğinin azaldığı gösterilmiştir. Yine buğdayda yapılan başka bir çalışmada hassas çeşitlerin oransal su içeriğindeki azalmanın dayanıklı çeşitlere göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Sairam vd., 2002). Bu çalışmada yaprak ve kök oransal su içeriği hidroponik ortamda yetiştirilen kontrol ve stres koşullarında bulunan bitkilerden stres uygulamasının akabinde (7. günün sonunda) yapılmıştır. Elde edilen değerler Statistix 8.1 programı kullanılıp varyans analizine tabi tutularak, ortalama değerler arasındaki farklılıklar LSD analizi ile % 5 önem seviyesinde karşılaştırılmıştır. Sırası ile Şekil 4.46 ve Şekil 4.48’de kontrol ve stres gruplarındaki bitkilerin yaprak ve kök oransal su içeriğinin ortalama değeri verilmiştir. Sırası ile Şekil 4.47 ve Şekil 4.49’da yaprak ve köklerin tuz stresi altında oransal su içeriğinin kontrol grubuna göre yüzde değişimi verilmiştir.



Şekil 4.46. Genotiplerin tuz stresi altındaki yaprak oransal su içerikleri. Büyük harfler, kontrol grubundaki genotipler arasındaki istatistiksel farkı; küçük harfler, stres grubundaki genotipler arasındaki istatistiksel farkı belirtmektedir ($p \leq 0.05$).

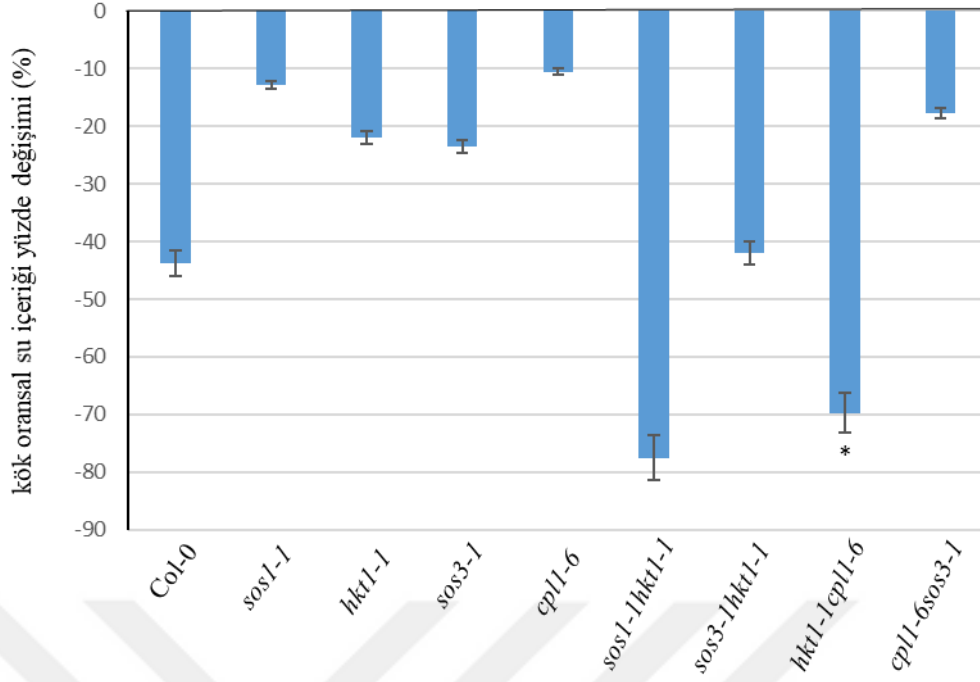


Şekil 4.47. Yaprak oransal su içeriği yüzde değişimi. * istatistiksel farkı belirtmektedir ($p \leq 0.05$).



Şekil 4.48. Genotiplerin tuz stresi altındaki kök oransal su içerikleri. Büyük harfler, kontrol grubundaki genotipler arasındaki istatistiksel farkı; küçük harfler, stres grubundaki genotipler arasındaki istatistiksel farkı belirtmektedir ($p \leq 0.05$).

Buna göre tuz stresi altında yaprak ve kökte oransal su içeriğinde azalış belirlenmiştir. Yaprakta tuz stresi altında *cpl1-6*, *sos1-1hkt1-1* ve *sos3-1hkt1-1* mutantlarının oransal su içeriğinin Col-0'ya göre daha yüksek olduğu ve bu değerlerin istatistiksel farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Bu da *cpl1-6*, *sos1-1hkt1-1* ve *sos3-1hkt1-1* mutantlarının tuza dayanıklılık gösterdiğini kanıtlamaktadır. Yine *hkt1-1* mutant bitkisinin yaprak oransal su içeriği düşükken, *hkt1-1cpl1-6* mutanti *hkt1-1* mutantına göre daha yüksek su içeriğe sahiptir. Bu da *hkt1-1* mutantına *cpl1-6* mutanti eklendiği zaman bitkinin tuza dayanıklılığını arttırdığını göstermektedir. Kökün oransal su içeriğinde ise genotipler arasında istatistiksel farklılık görülmemiş, yani bir haftalık stres uygulamasının 3 haftalık *Arabidopsis* bitkisinin kök oransal su içeriğine etkisi olmamıştır. Aynı genotiplerin tuz stresi altında yaprak oransal su içeriğinin kontrol bitkilerine göre yüzde değişiminde yaprakta *hkt1-1* mutantının en yüksek olduğu, dolayısıyla tuza hassas olduğu belirlenmiştir.

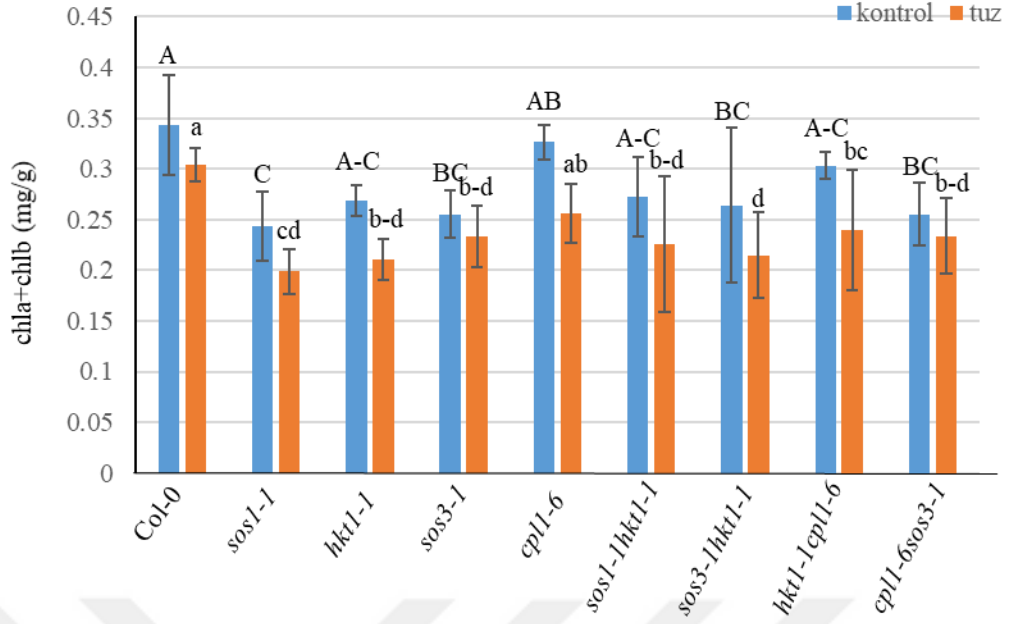


Şekil 4.49. Kök oransal su içeriği yüzde değişimi. * istatistiksel farkı belirtmektedir ($p \leq 0.05$).

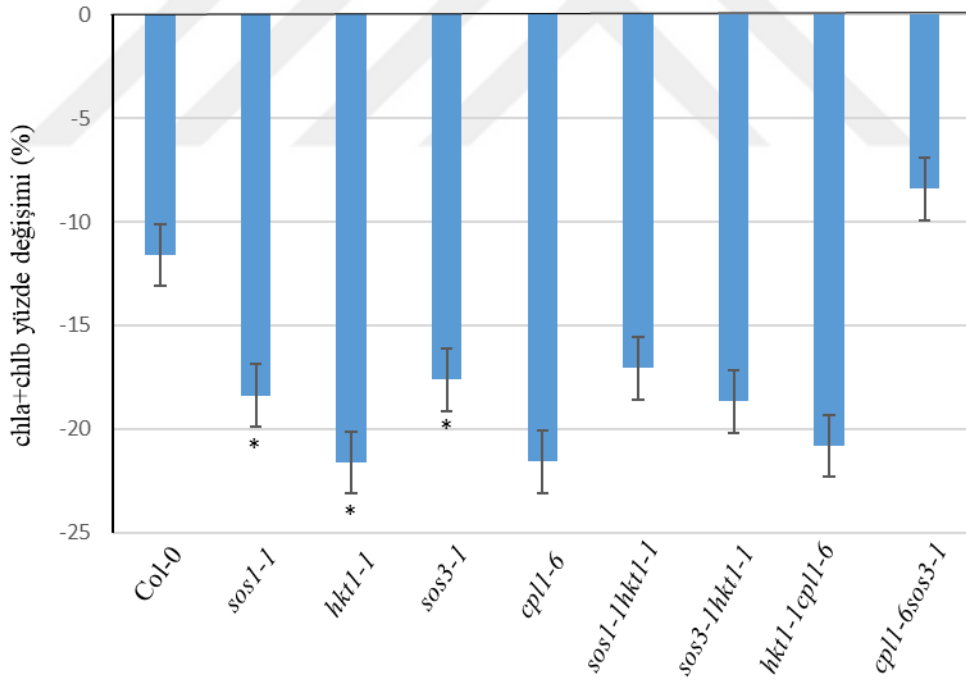
4.3 Biyokimyasal Analizler

4.3.1 Klorofil miktar tayini

Tuz stresi altında, bitki dokusunda Na^+ konsantrasyonunun yükselmesi oksidatif stresin artmasına neden olmakta, bu da kloroplast yapısında bozulmaya ve buna bağlı olarak klorofil miktarında azalmaya yol açmaktadır (El-Tayeb, 2005). Klorofil miktar tayini hidroponik ortamda yetiştirilen kontrol ve stres koşullarında bulunan bitkilerden stres uygulamasının akabinde (7. günün sonunda) yapılmıştır. Elde edilen veriler Statistix 8.1 programı kullanılıp varyans analizine tabi tutularak, ortalama değerler arasındaki farklılıklar LSD analizi ile % 5 önem seviyesinde karşılaştırılmıştır. Şekil 4.50'de kontrol ve stres gruplarındaki bitkilerin $\text{chl}_a + \text{chl}_b$ değerinin ortalaması verilmiştir. Şekil 4.51'de tuz stresi altında $\text{chl}_a + \text{chl}_b$ değerinin kontrol grubuna göre yüzde değişimi verilmiştir.



Şekil 4.50. Genotiplerin tuz stresi altındaki toplam klorofil miktarları. Büyük harfler, kontrol grubundaki genotipler arasındaki istatistiksel farkı; küçük harfler, stres grubundaki genotipler arasındaki istatistiksel farkı belirtmektedir ($p \leq 0.05$).



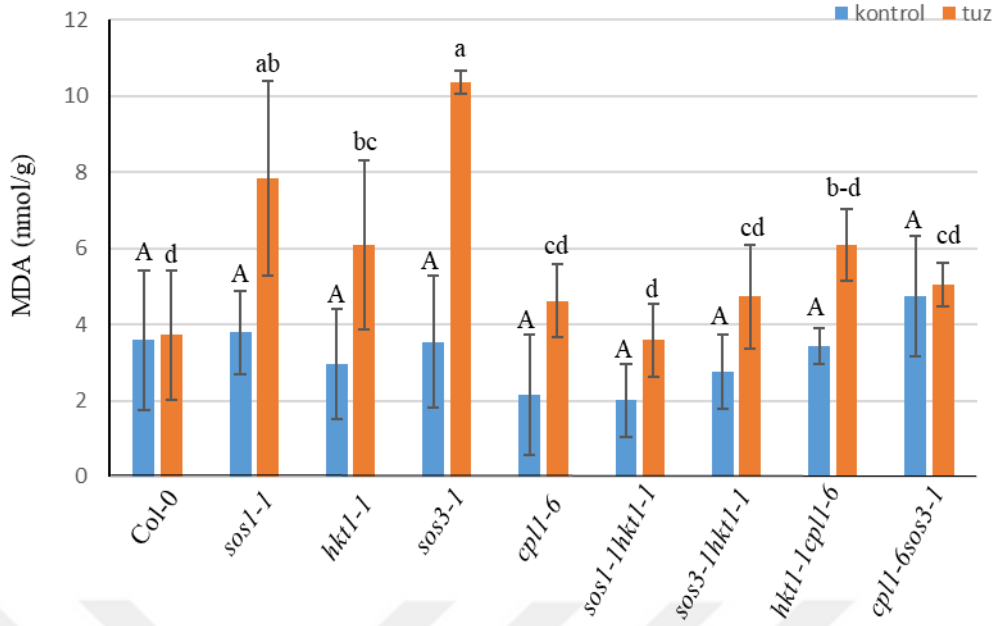
Şekil 4.51. Toplam klorofil miktarı yüzde değişimi. * istatistiksel farkı belirtmektedir ($p \leq 0.05$).

Tuz stresi altında *cpl1-6* mutant bitkisinin toplam klorofil miktarı ile Col-0 bitkisinin toplam klorofil miktarı arasında istatistiksel olarak farklılık görülmemiştir. Bu da *cpl1-6* mutantının tuza dayanıklı olduğunu göstermektedir. *sos1-1hkt1-1*, *hkt1-1cpl1-6* ve *cpl1-*

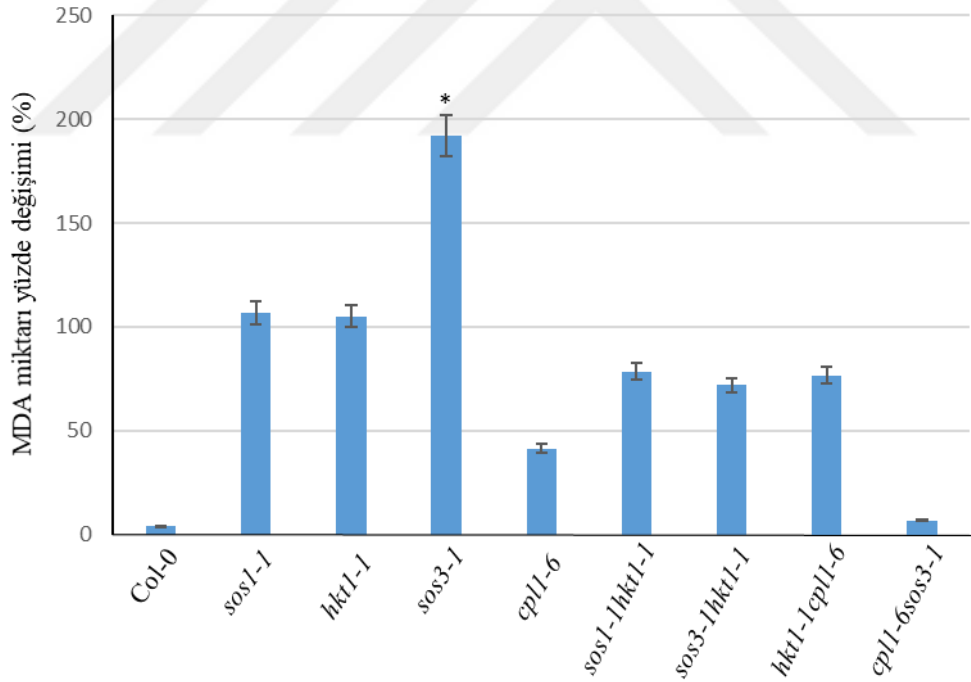
6*sos3-1* çifte mutant bitkilerinin SPAD değerinde *sos1-1*, *hkt1-1* ve *sos3-1* tekli mutant bitkilerine kıyasla istatistiksel olarak farklılık görölmüşken, klorofil miktarlarında farklılık görölmemiştir. Bu da bir hafta stres uygulamasının bu bitkilere yeterli olmadığını göstermektedir.

4.3.2 Malondialdehit (MDA) ölçümü

Hücre membranının zararlanmasına yol açan lipit peroksidasyonu, birkaç reaksiyon aşaması sonucunda malondialdehit (MDA) üretmekte ve MDA miktarı membran lipit peroksidasyonunu anlamak için önemli bir ölçüm değeri olarak bilinmektedir. MDA üretimi lipit peroksidasyonu sonucunda meydana gelmekte ve tuza dayanıklı genotiplerde hassas genotiplere göre daha az miktarda üretilmektedir (Koyro, 2006). MDA miktar ölçümü hidroponik ortamda yetiştirilen kontrol ve stres koşullarında bulunan bitkilerden stres uygulamasının akabinde (7. günün sonunda) yapılmıştır. Elde edilen veriler Statistix 8.1 programı kullanılıp varyans analizine tabi tutularak, ortalama değerler arasındaki farklılıklar LSD analizi ile % 5 önem seviyesinde karşılaştırılmıştır. Şekil 4.52’de kontrol ve stres gruplarındaki bitkilerin MDA miktarlarının ortalaması verilmiştir. Şekil 4.53’te tuz stresi altında MDA miktarının kontrol grubuna göre yüzde değişimi verilmiştir.



Şekil 4.52. Genotiplerin tuz stresi altındaki MDA miktarları. Büyük harfler, kontrol grubundaki genotipler arasındaki istatistiksel farkı; küçük harfler, stres grubundaki genotipler arasındaki istatistiksel farkı belirtmektedir ($p \leq 0.05$).



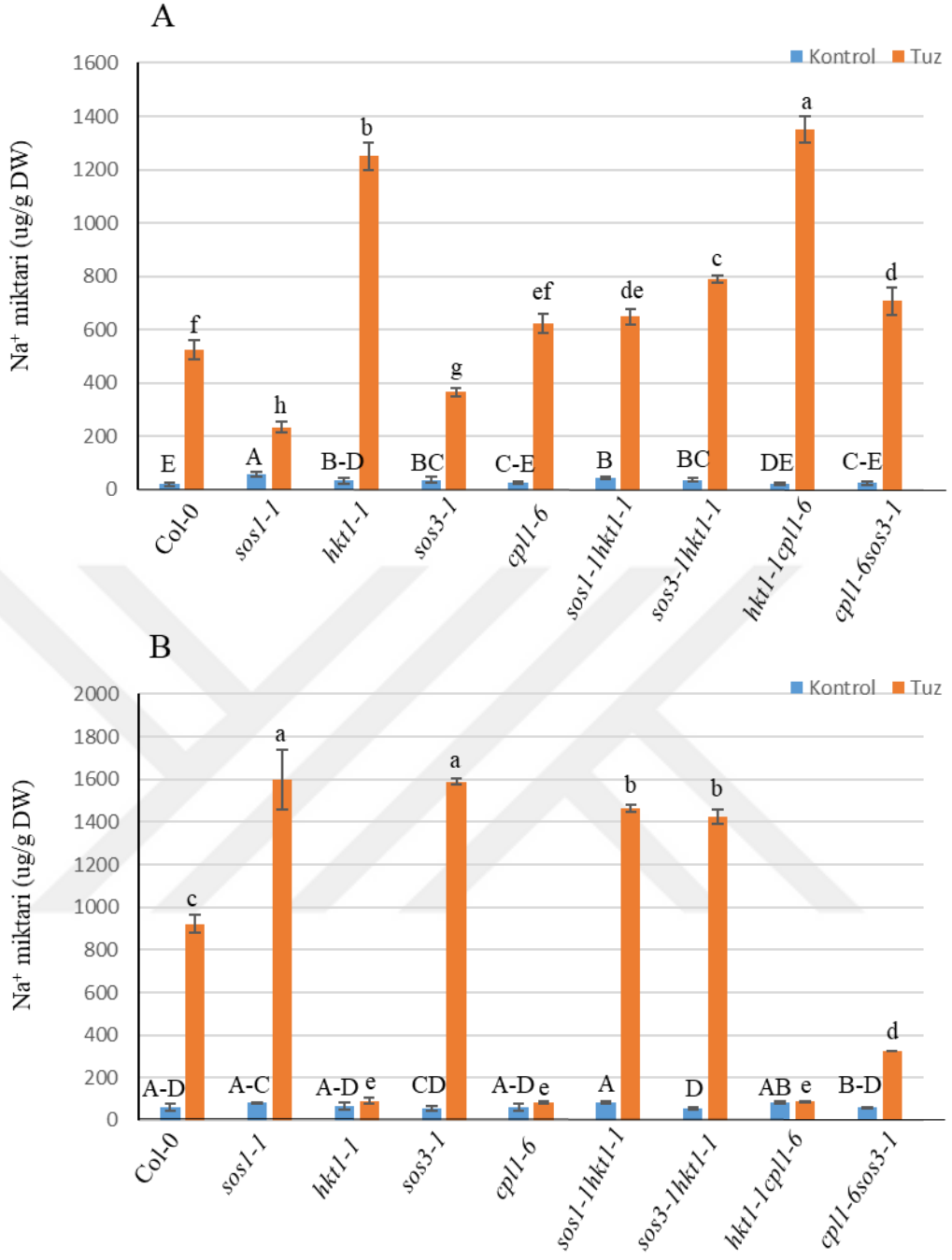
Şekil 4.53. MDA miktarı yüzde değişimi. * istatistiksel farkı belirtmektedir ($p \leq 0.05$).

Tuz stresi altında tüm genotiplerde MDA miktarı kontrol gruplarına göre daha yüksek olarak bulunmuştur. Fakat bu artış *sos3-1* mutantının haricindeki genotiplerde istatistiksel olarak farklılık göstermemiştir. Bu da bitkilere bir hafta boyunca 50 mM tuz uygulanmasının yeterli olmadığını, *sos3-1* mutantının tuza hassas olduğunu

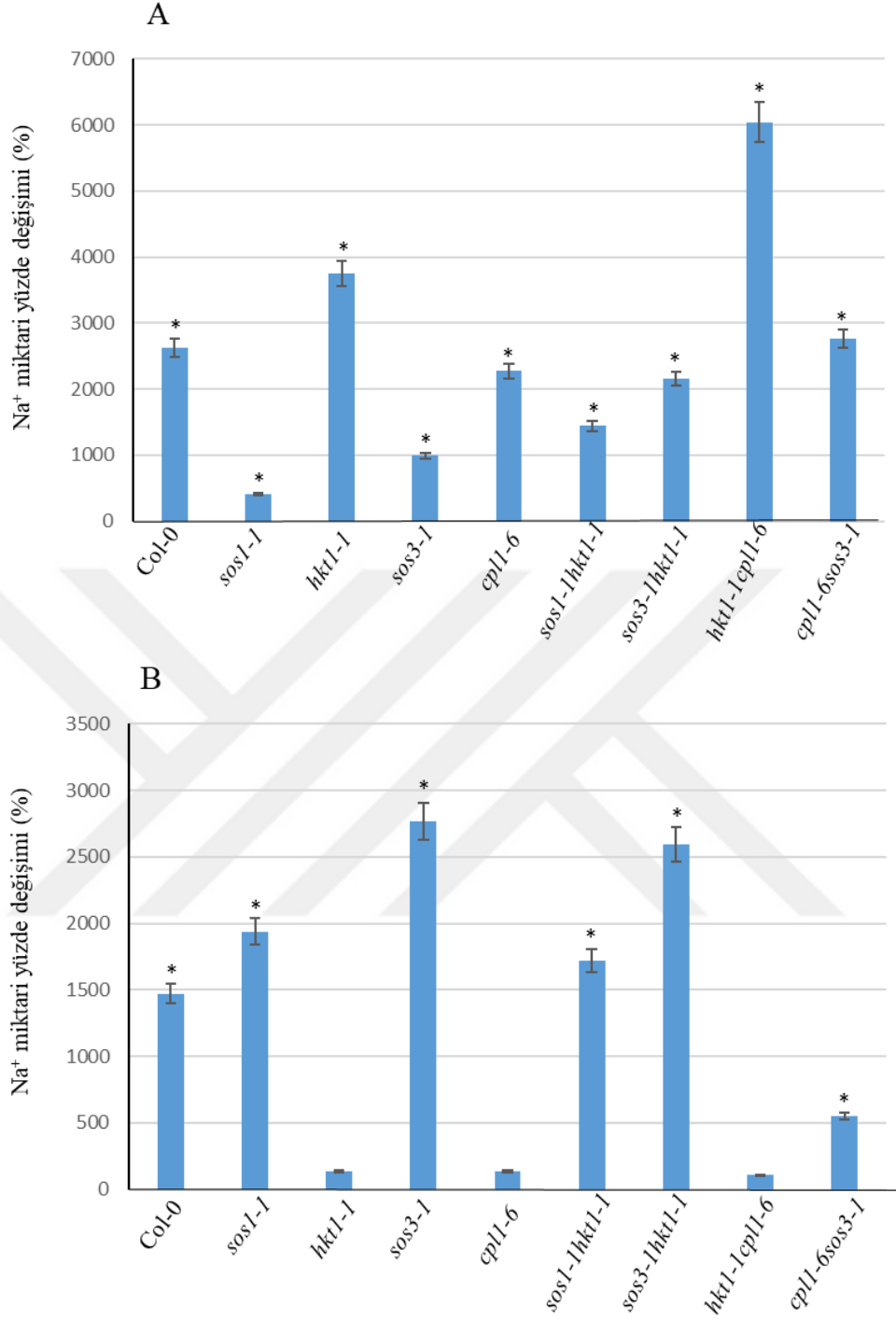
göstermektedir. Kontrol grubundaki bitkilerin MDA miktarında istatistiksel olarak farklılık görülmemiştir. Tuz stresi altında *sos1-1*, *sos3-1* ve *hkt1-1* mutantlarının MDA miktarı yüksekken, *cpl1-6*, *sos1-1hkt1-1*, *sos3-1hkt1-1*, *hkt1-1cpl1-6* ve *cpl1-6sos3-1* mutantlarının MDA miktarı Col-0 ile istatistiksel bir farklılık göstermemiştir. Deney sonucuna göre *cpl1-6* bitkisi dayanıklılık göstermekte, bu da CPL1 proteininin tuz stresiyle ilişkili genleri negatif yönden etkilediğini göstermektedir. Hassas olan *sos3-1* ve *hkt1-1* tekli mutant bitkileriyle, dayanıklı olan *cpl1-6* bitkisinin melezlenmesi sonucunda elde edilen *cpl1-6sos3-1* ve *hkt1-1cpl1-6* çifte mutant bitkilerinin tuz stresine dayanıklı olması CPL1 proteininin tolerans gen ifade yolağının üstünde çalışarak, tuz stresi ile ilgili genleri negatif yönden etkilediğini göstermektedir.

4.3.3 Element seviyelerinin tayini

Elde edilen mutant bitkilerin tuz stresi altında yaprak ve köklerinde biriken sodyum miktarlarının belirlenmesi için hidroponik ortamda yetiştirilen kontrol ve stres koşullarında bulunan bitkilerden stres uygulamasının akabinde (7. günün sonunda) yaprak ve kök örnekleri kurutulup, kuru örnekler asit karışımı ile parçalanmış ve ICP-MS ile mineral birikim seviyeleri belirlenmiştir. Elde edilen veriler Statistix 8.1 programı kullanılıp varyans analizine tabi tutularak, ortalama değerler arasındaki farklılıklar LSD analizi ile % 5 önem seviyesinde karşılaştırılmıştır. Şekil 4.54'de kontrol ve stres gruplarındaki bitkilerin yaprak ve köklerinde biriken Na⁺ miktarlarının ortalaması verilmiştir. Şekil 4.55'te tuz stresi altında yaprak ve köklerinde biriken Na⁺ miktarının kontrol grubuna göre yüzde değişimi verilmiştir.



Şekil 4.54. Genotiplerin tuz stresi altındaki sodyum birikim miktarları. A. Yapraklarda biriken sodyum miktarı. B. Köklerde biriken sodyum miktarı. Büyük harfler, kontrol grubundaki genotipler arasındaki istatistiksel farkı; küçük harfler, stres grubundaki genotipler arasındaki istatistiksel farkı belirtmektedir ($p \leq 0.05$).



Şekil 4.55. Sodyum miktarları yüzde değişimi. A. Yapraklarda biriken sodyum miktarının yüzde değişimi. B. Köklerde biriken sodyum miktarının yüzde değişimi. * istatistiksel farkı belirtmektedir ($p \leq 0.05$).

Beklendiği üzere tuz stresi altında bütün genotiplerin yapraklarında daha fazla Na⁺ birikmiştir. Bu birikim özellikle *hkt1-1*, *hkt1-1cpl1-6* ve *cpl1-6sos3-1* mutantlarında Col-0 yabanıl tipe kıyasla istatistiksel olarak daha fazla iken, *sos1-1* ve *sos3-1* mutantlarında istatistiksel olarak daha azdır.

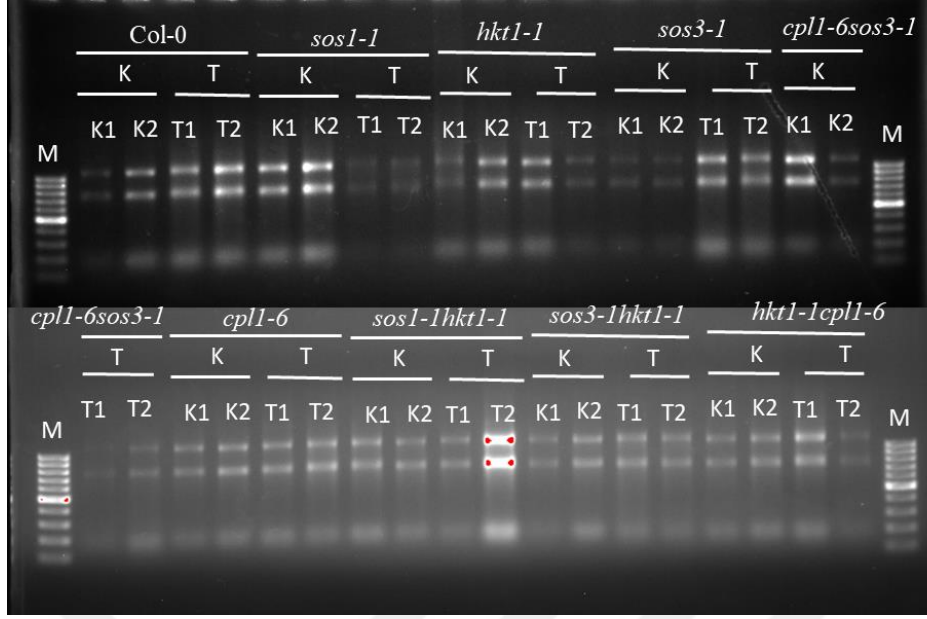
Köklerde biriken Na⁺ miktarlarına bakıldığı zaman ise farklı bir sonuç elde edilmiştir. Buna göre tuz stress uygulamasının akabinde *hkt1-1*, *cpl1-6* ve *hkt1-1cpl1-6* mutantlarının köklerinde biriken Na⁺ miktarı kontrol koşullarında aynı bitkilerin köklerinde biriken miktardan farklı değildir. Bu da bu mutantların tuz stresine daha dayanıklı olmaları ile açıklanabilir. Bu nedenle de mutant bitkiler büyük bir olasılıkla hidroponik ortamdaki fazla tuzu köklerine almamaktadır. Öte yandan tuz stresine hassas olan *sos1-1* ve *sos3-1* ile dayanıklı olan *sos1-1hkt1-1*, *sos3-1hkt1-1* ve *cpl1-6sos3-1* bitkilerinin köklerinde tuz uygulaması sonucunda daha fazla Na⁺ birikimi gözlenmiştir. Yabanıl tip Col-0 ile kıyaslandığında *sos1-1*, *sos3-1*, *sos1-1hkt1-1* ve *sos3-1hkt1-1* mutantlarının köklerinde istatistiksel olarak daha fazla Na⁺ birikimi gözlenirken, *hkt1-1*, *cpl1-6*, *hkt1-1cpl1-6* ve *cpl1-6sos3-1* mutantlarının köklerinde istatistiksel olarak daha az Na⁺ birikimi bulunmuştur.

Tuz stresi uygulandıktan sonra farklı genotiplerin yaprak ve köklerinde biriken Na⁺ miktarları arasındaki farklılıklara bakıldığında istatistiksel olarak bütün genotiplerde bir artış sözkonusudur. Ancak köklerdeki bu artış özellikle dayanıklı olarak tahmin edilen *cpl1-6*, *hkt1-1cpl1-6* ve *cpl1-6sos3-1* mutantlarında Col-0 yabanıl tipine kıyasla daha az gerçekleşmiştir. Bu sonuçlara bakılarak, *cpl1-6*'nın köklerde Na⁺ alımını engelleyerek tuz stresine dayanıklılığa yol açtığı, öte yandan fazla tuzu yapraklarda biriktiren, tuzun zararlı etkilerini kolaylıkla ortadan kaldırabildiğini göstermektedir.

4.4 RNA İzolasyonu ve Gen İfade Seviye Tayini

4.4.1 RNA izolasyonu

RNA izolasyonu kontrol ve stres koşullarında büyüyen bitkilerden stres uygulamasının sonunda her bir çeşitten 3 bitki, 2 biyolojik tekrar olarak yapılmıştır. RNA izolasyonunun sonunda DNA kontaminasyonunu gidermek için DNaze I uygulanmıştır. Daha sonra örneklerin nanodrop ile konsantrasyonuna (Ek 2) ve jel elektroforezde yütölüp RNA kalitesine bakılmıştır(Şekil 4.56).

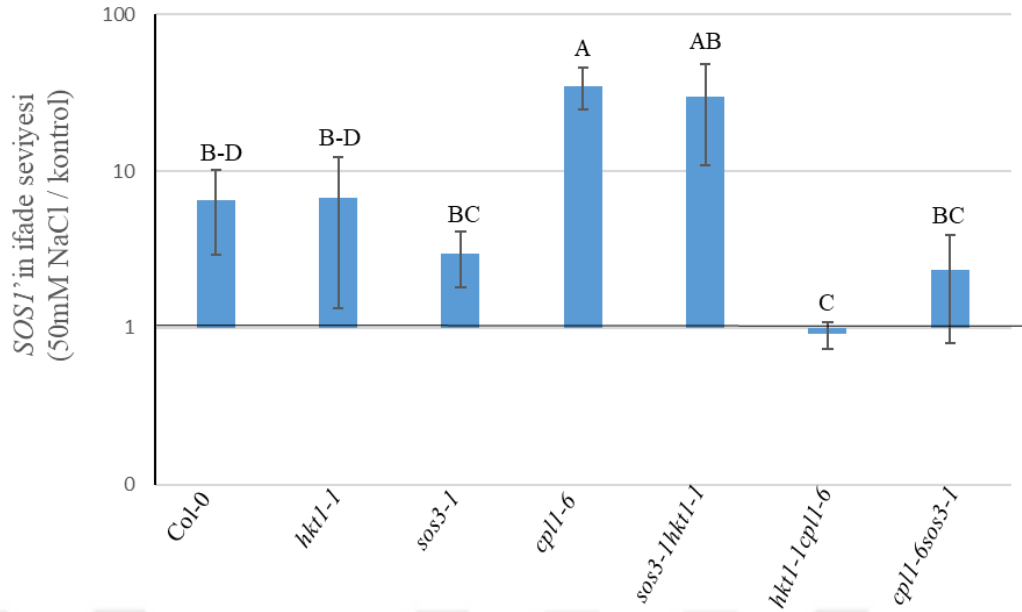


Şekil 4.56. RNA kalitesini gösteren jel elektroforez sonuçları

4.4.2 Gen ifade seviye tayini

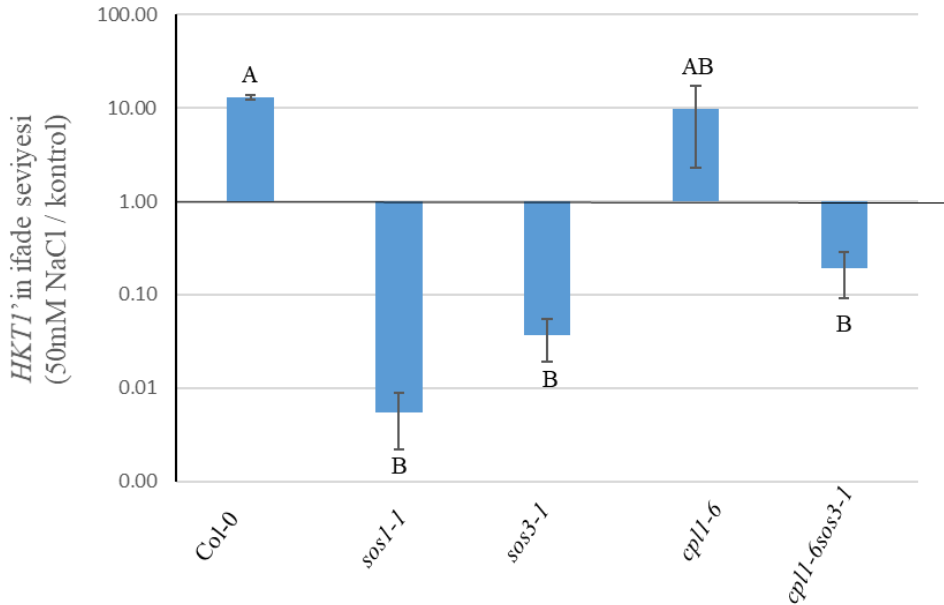
Col-0, *sos1-1*, *hkt1-1*, *sos3-1*, *cpl1-6*, *sos1-1hkt1-1*, *sos3-1hkt1-1*, *hkt1-1cpl1-6* ve *cpl1-6sos3-1* bitkilerinin tuz stresinde önemli rolü olan *SOS1*, *SOS3*, *HKT1*, *NHX1*, *RD29A*, *RD29B*, *COR15A*, *CPL1*, *DERB2A*, *DREB2B*, *AREB1*, *ABI1* gen ve transkripsiyon faktörlerinin ifade seviyelerine Real Time quantitative PCR (RT-qPCR) aracılığıyla bakılmıştır (Ek 3). Gen anlatımının kantifikasyonunda housekeeping gen olarak kullanılması için β -*tubulin* (*TUB8*), *ACTIN2* ve *18S rRNA* genlerinin kontrol ve tuz koşullarında RT-qPCR aracılığıyla gen ifade seviyesine bakılmış ve kontrol ve stres koşullarında ifadesinde değişiklik olmayan *ACTIN2* geni referans gen olarak seçilmiştir.

Şekil 4.57’de Col-0, *hkt1-1*, *sos3-1*, *cpl1-6*, *sos1-1hkt1-1*, *sos3-1hkt1-1*, *hkt1-1cpl1-6* ve *cpl1-6sos3-1* bitkilerinde *SOS1* geninin ifade seviyesi gösterilmiştir. *cpl1-6* ve *sos3-1hkt1-1* bitkilerinde *SOS1*’in ifade seviyesi Col-0’ya göre artarken *hkt1-1cpl1-6* bitkisinde azalmaktadır.



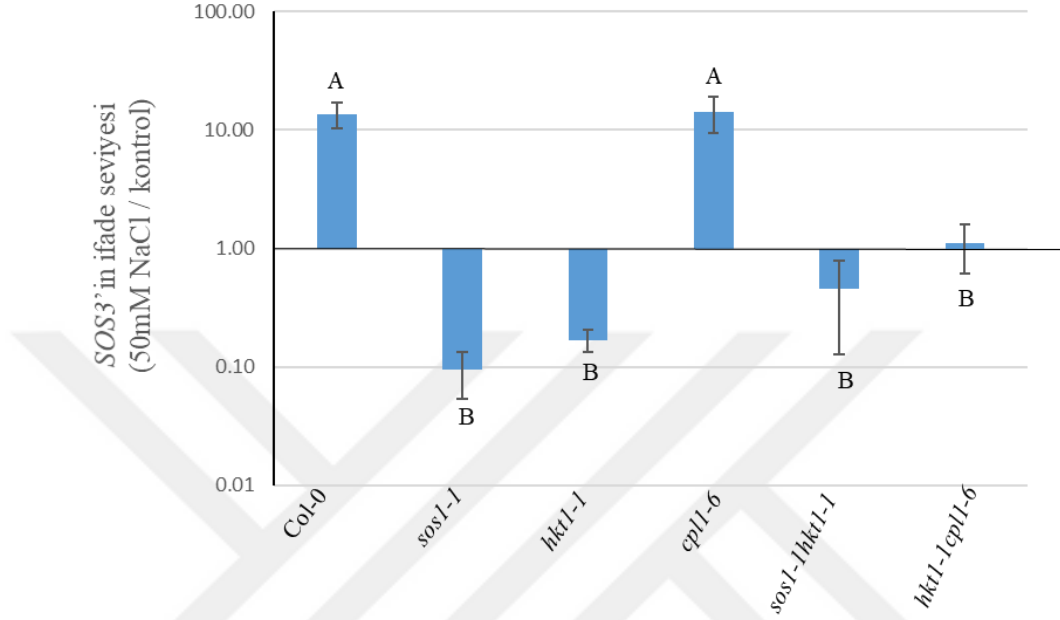
Şekil 4.57. *SOS1* geninin ifade seviyesi. Harfler genotipler arasındaki istatistiksel farkı belirtmektedir ($p \leq 0.05$).

Şekil 4.58’de Col-0, *sos1-1*, *sos3-1*, *cpl1-6* ve *cpl1-6sos3-1* bitkilerinde *HKT1* geninin ifade seviyesi gösterilmiştir. *sos1-1*, *sos3-1* ve *cpl1-6sos3-1* bitkilerinde *HKT1*’in ifade seviyesi Col-0’ya göre azalmış, *cpl1-6* bitkisinde ise istatistiksel olarak farklılık gözlenmemiştir.



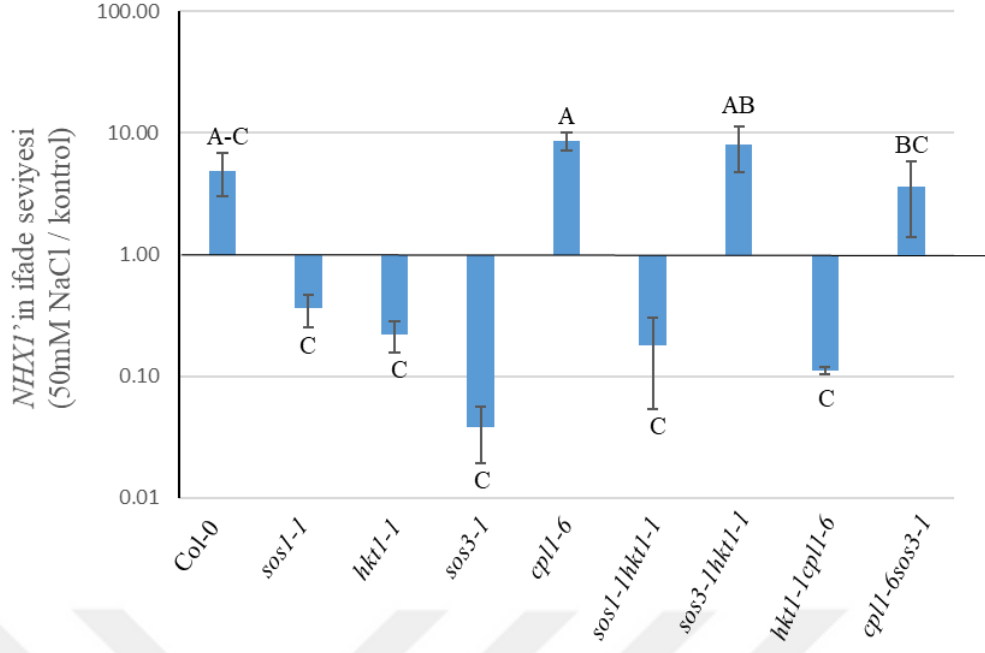
Şekil 4.58. *HKT1* geninin ifade seviyesi. Harfler genotipler arasındaki istatistiksel farkı belirtmektedir ($p \leq 0.05$).

Şekil 4.59’de Col-0, *sos1-1*, *hkt1-1*, *cpl1-6*, *sos1-1hkt1-1* ve *hkt1-1cpl1-6* bitkilerinde *SOS3* geninin ifade seviyesi gösterilmiştir. *sos1-1*, *hkt1-1*, *sos1-1hkt1-1* ve *hkt1-1cpl1-6* bitkilerinde *SOS3*’ün ifade seviyesi Col-0’ya göre azalmış, *cpl1-6* bitkisinde ise istatistiksel olarak farklılık göstermemiştir.



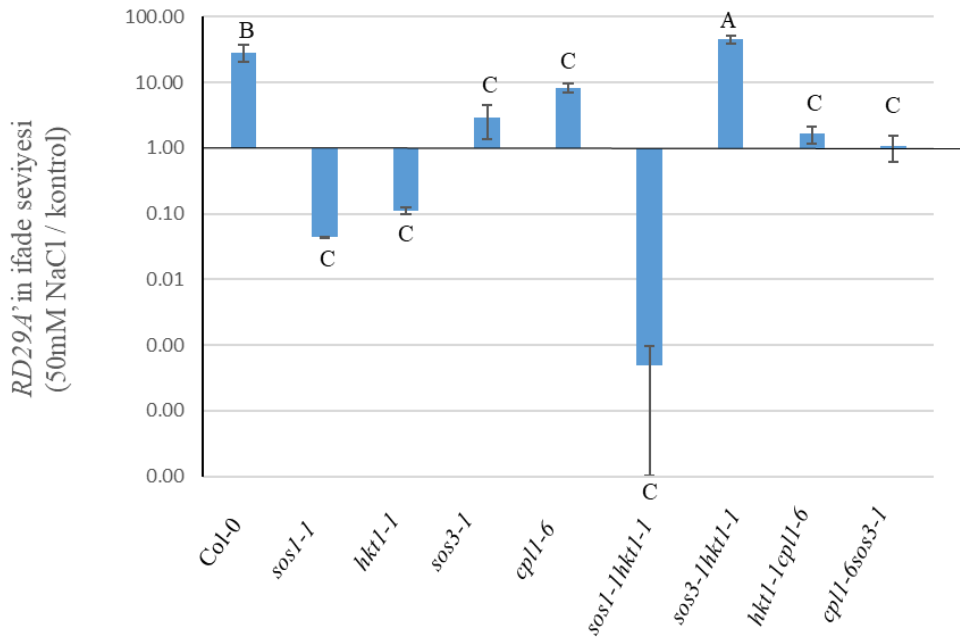
Şekil 4.59. *SOS3* geninin ifade seviyesi. Harfler genotipler arasındaki istatistiksel farkı belirtmektedir ($p \leq 0.05$).

Şekil 4.60’de Col-0, *sos1-1*, *hkt1-1*, *sos3-1*, *cpl1-6*, *sos1-1hkt1-1*, *sos3-1hkt1-1*, *hkt1-1cpl1-6* ve *cpl1-6sos3-1* bitkilerinde *NHX1* geninin ifade seviyesi gösterilmiştir. Bu çalışmada kullanılan 8 mutant bitkinin hiçbirinde *NHX1* geninin ifade seviyesi Col-0’a göre istatistiksel olarak fark göstermemiştir.



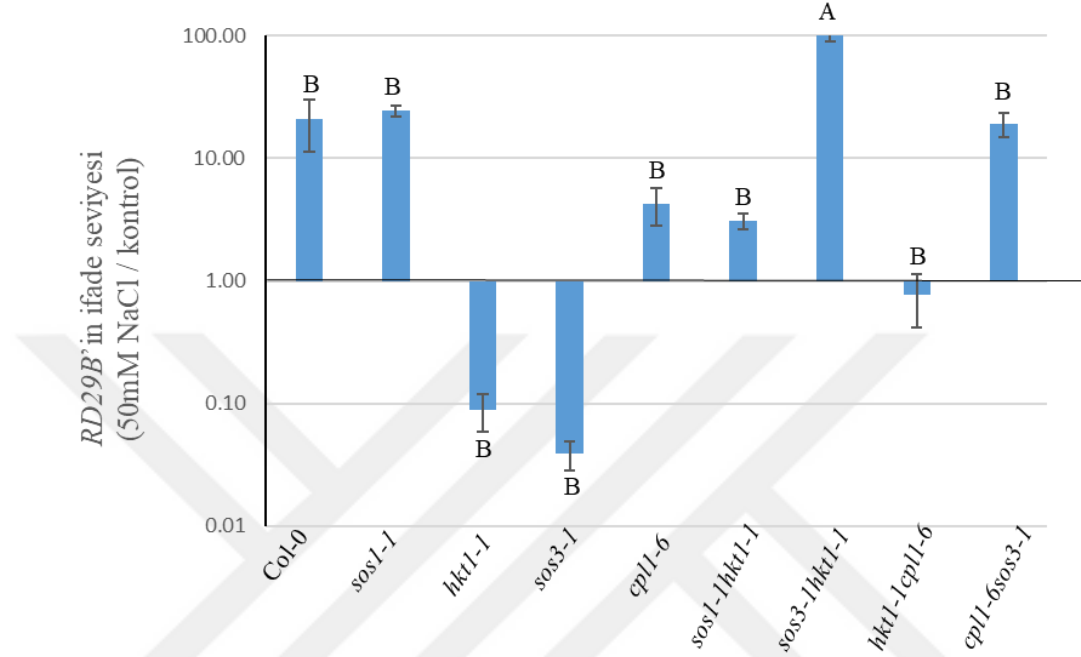
Şekil 4.60. *NHX1* geninin ifade seviyesi. Harfler genotipler arasındaki istatistiksel farkı belirtmektedir ($p \leq 0.05$).

Şekil 4.61’te Col-0, *sos1-1*, *hkt1-1*, *sos3-1*, *cpl1-6*, *sos1-1hkt1-1*, *sos3-1hkt1-1*, *hkt1-1cpl1-6* ve *cpl1-6sos3-1* bitkilerinde *RD29A* geninin ifade seviyesi gösterilmiştir. *sos3-1hkt1-1* bitkisinde *RD29A* geninin ifade seviyesi en yükselirken *sos1-1*, *hkt1-1*, *sos3-1*, *cpl1-6*, *sos1-1hkt1-1*, *hkt1-1cpl1-6* ve *cpl1-6sos3-1* bitkilerinde ise azalmaktadır.



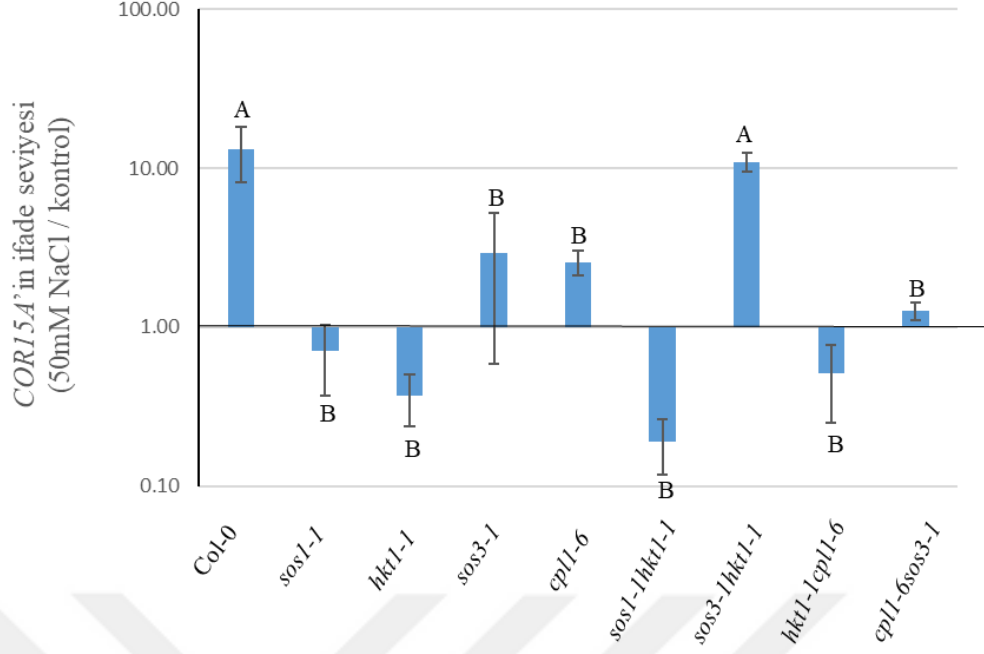
Şekil 4.61. *RD29A* geninin ifade seviyesi. Harfler genotipler arasındaki istatistiksel farkı belirtmektedir ($p \leq 0.05$).

Şekil 4.62’te Col-0, *sos1-1*, *hkt1-1*, *sos3-1*, *cpl1-6*, *sos1-1hkt1-1*, *sos3-1hkt1-1*, *hkt1-1cpl1-6* ve *cpl1-6sos3-1* bitkilerinde *RD29B* geninin ifade seviyesi gösterilmiştir. *sos3-1hkt1-1* bitkisinde *RD29B* geninin ifade seviyesi yükselmiş, geri kalan 7 mutant bitkinin gen ifadesinde Col-0’a göre istatistiksel olarak farklılık göstermemiştir.



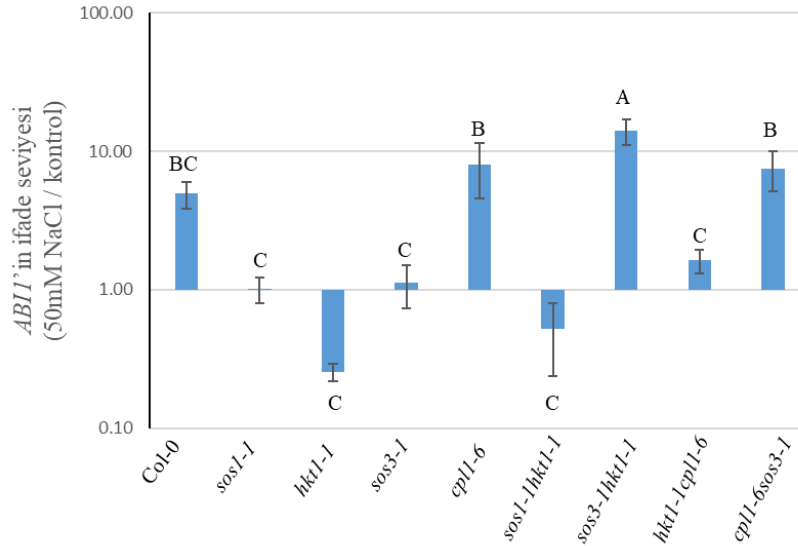
Şekil 4.62. *RD29B* genini ifade seviyesi. Harfler genotipler arasındaki istatistiksel farkı belirtmektedir ($p \leq 0.05$).

Şekil 4.63’te Col-0, *sos1-1*, *hkt1-1*, *sos3-1*, *cpl1-6*, *sos1-1hkt1-1*, *sos3-1hkt1-1*, *hkt1-1cpl1-6* ve *cpl1-6sos3-1* bitkilerinde *COR15A*’ın ifade seviyesi gösterilmiştir. *sos1-1*, *hkt1-1*, *sos3-1*, *cpl1-6*, *sos1-1hkt1-1*, *hkt1-1cpl1-6* ve *cpl1-6sos3-1* bitkilerinde *COR15* geninin ifade seviyesi azalmaktadır.



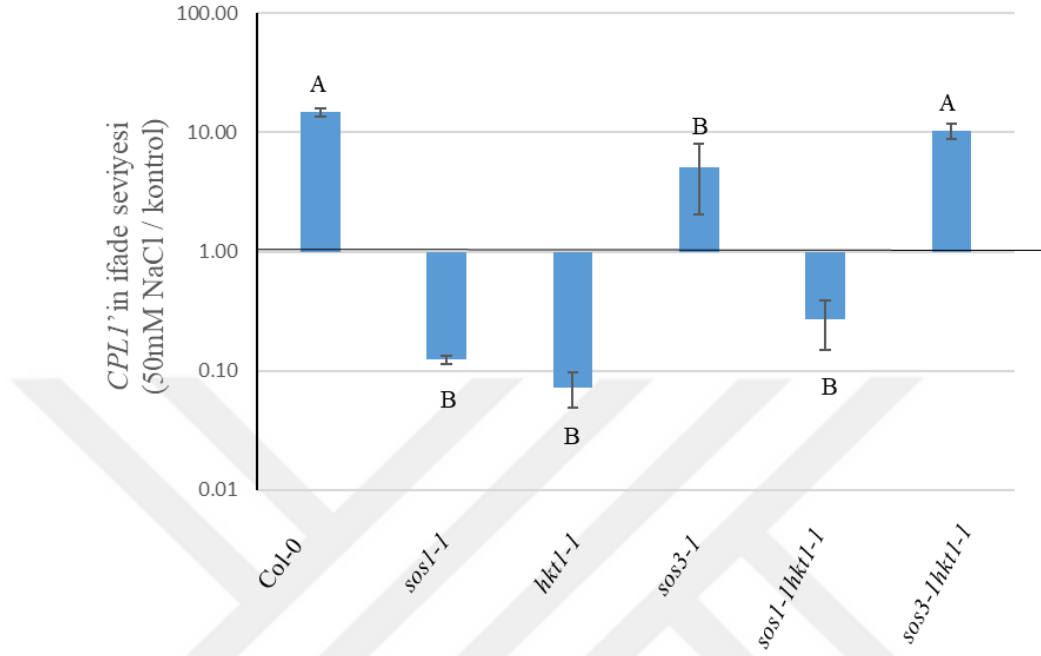
Şekil 4.63. *COR15A*'in ifade seviyesi. Harfler genotipler arasındaki istatistiksel farkı belirtmektedir ($p \leq 0.05$).

Şekil 4.64'te Col-0, *sos1-1*, *hkt1-1*, *sos3-1*, *cpl1-6*, *sos1-1hkt1-1*, *sos3-1hkt1-1*, *hkt1-1cpl1-6* ve *cpl1-6sos3-1* bitkilerinde *ABII* geninin ifade seviyesi gösterilmiştir. *sos3-1hkt1-1* bitkisinde *ABII*'in ifade seviyesi yükselmiş, geri kalan 7 mutant bitkinin gen ifadesinde Col-0'a göre istatistiksel olarak farklılık göstermemiştir.



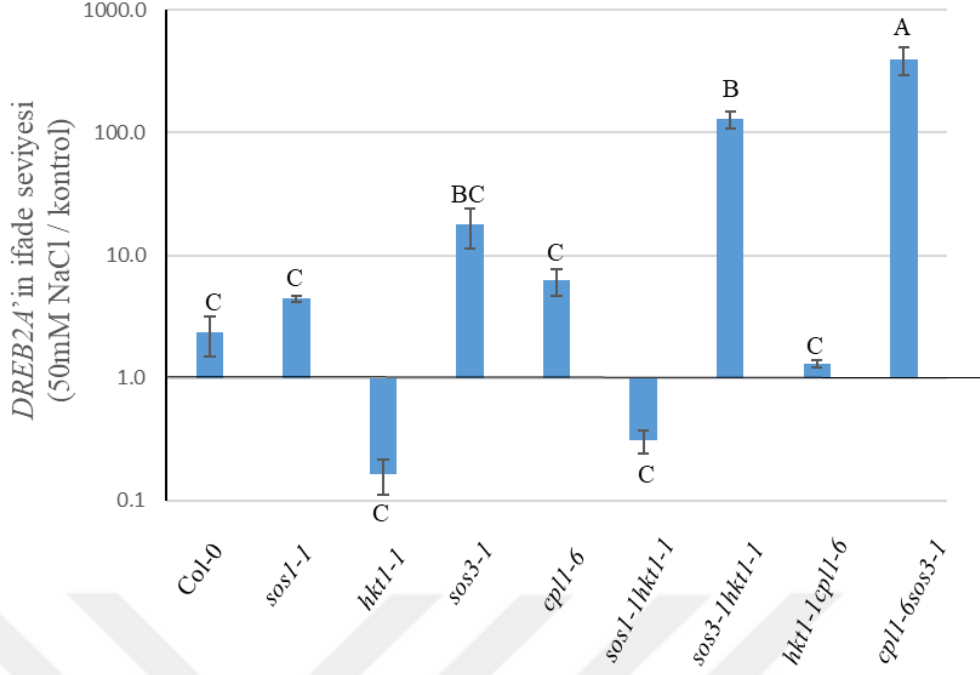
Şekil 4.64. *ABII*'in ifade seviyesi. Harfler genotipler arasındaki istatistiksel farkı belirtmektedir ($p \leq 0.05$).

Şekil 4.65'te Col-0, *sos1-1*, *hkt1-1*, *sos3-1*, *sos1-1hkt1-1* ve *sos3-1hkt1-1* bitkilerinde *CPLI*'in ifade seviyesi gösterilmiştir. *sos1-1*, *hkt1-1*, *sos3-1*, *sos1-1hkt1-1* bitkisinde *CPLI*'in ifade seviyesi azalmıştır.



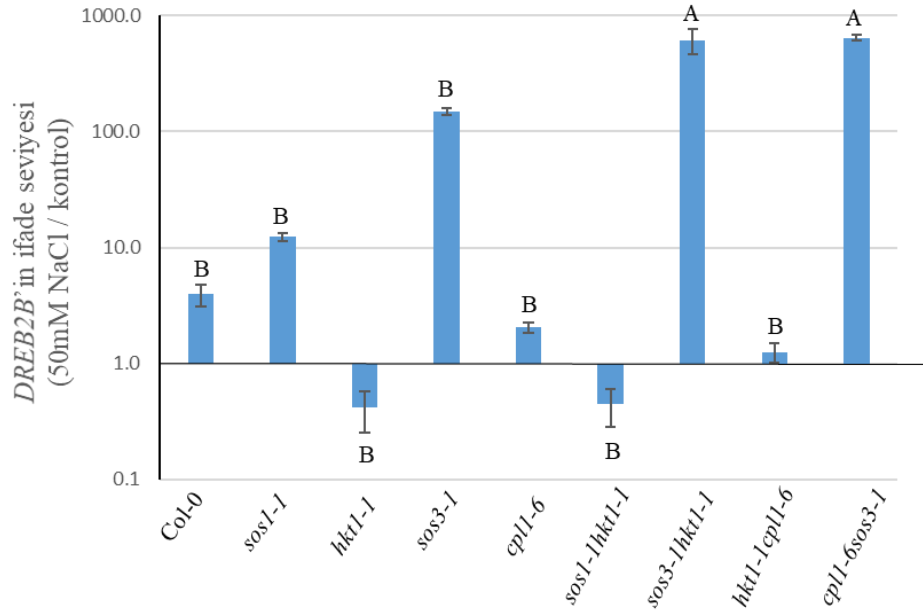
Şekil 4.65. *CPLI*'in ifade seviyesi. Harfler genotipler arasındaki istatistiksel farkı belirtmektedir ($p \leq 0.05$).

Şekil 4.66'de Col-0, *sos1-1*, *hkt1-1*, *sos3-1*, *cpl1-6*, *sos1-1hkt1-1*, *sos3-1hkt1-1*, *hkt1-1cpl1-6* ve *cpl1-6sos3-1* bitkilerinde *DREB2A* geninin ifade seviyesi gösterilmiştir. *sos3-1hkt1-1* ve *cpl1-6sos3-1* bitkilerinde genin ifade seviyesi yükselmiştir.



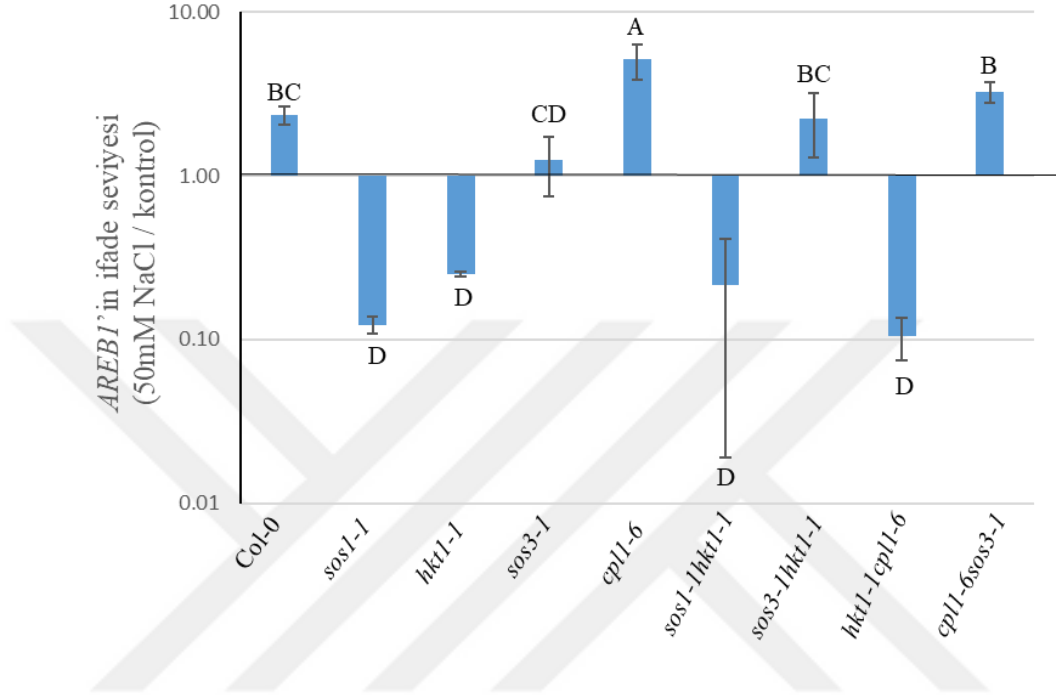
Şekil 4.66. *DREB2A*'ın ifade seviyesi. Harfler genotipler arasındaki istatistiksel farkı belirtmektedir ($p \leq 0.05$).

Şekil 4.67'de Col-0, *sos1-1*, *hkt1-1*, *sos3-1*, *cpl1-6*, *sos1-1hkt1-1*, *sos3-1hkt1-1*, *hkt1-1cpl1-6* ve *cpl1-6sos3-1* bitkilerinde *DREB2B*'ın ifade seviyesi gösterilmiştir. *sos3-1hkt1-1* ve *cpl1-6sos3-1* bitkilerinde genin ifade seviyesi yükselmiştir.



Şekil 4.67. *DREB2B*'ın ifade seviyesi. Harfler genotipler arasındaki istatistiksel farkı belirtmektedir ($p \leq 0.05$).

Şekil 4.68’de Col-0, *sos1-1*, *hkt1-1*, *sos3-1*, *cpl1-6*, *sos1-1hkt1-1*, *sos3-1hkt1-1*, *hkt1-1cpl1-6* ve *cpl1-6sos3-1* bitkilerinde *AREB1*’in ifade seviyesi gösterilmiştir. *cpl1-6* bitkisinde genin ifade seviyesi yükselmiş; *sos1-1*, *hkt1-1*, *sos1-1hkt1-1* ve *hkt1-1cpl1-6* bitkilerinde ise ifade seviyesi azalmıştır.



Şekil 4.68. *AREB1*’in ifade seviyesi. genotipler arasındaki istatistiksel farkı belirtmektedir ($p \leq 0.05$).

BÖLÜM V

TARTIŞMA

Tuz stresi, verimli tarımı tehlikeye atarak besin üretimini önemli düzeyde kısıtlayan abiyotik streslerden biridir. Tuz stresi bitkilerde yaprak sıcaklığın artması, bitki boyu ve köklerin kısa kalması, klorofil miktarının azalması, MDA birikimi ve tuz stresi ile ilişkili gen ve transkripsiyon faktörlerinin ifade seviyesindeki değişmesine neden olmaktadır (Çulha vd., 2011).

5.1 CPL1 Proteini Tuz Stresi ile İlgili Genleri Negatif Yönden Etkiler

Tuz stresi altında ozmotik ve iyonik dengesizliklerden dolayı besin alımı ve üretimi azalmakta, besin eksikliği de bitki kök ve gövdelerinin kısa kalması, yaprakların ise sararmasına neden olmaktadır. Tuz stresine maruz kalan bitkilerin toleransında tuza aşırı duyarlı (SOS - Salt Overly Sensitive) stres sinyal yolağında yer alan SOS1, SOS2 ve SOS3 proteinlerin iyon homeostansında çok önemli rolleri mevcuttur (Hasegawa, 2000; Sanders, 2000). *SOS1*'in yüksek seviyede ekspresyonu bitkilerde tuz toleransı sağlarken (Shi vd., 2002), *sos1-1* ve *sos3-1* mutantlarında ise tuza hassasiyet dikkati çekmektedir. Bu mutantlarda 100mM NaCl uygulamasında kök uzunluklarının kısa kaldığı saptanmıştır (Dalmay vd., 2000). *Arabidopsis*'te yapılan çalışmada şiddetli su eksikliği altında, bitkilerin primer kök ucunda meristematik aktivitenin yavaşlamasından dolayı kök büyümesin durduğu saptanmıştır (Duan vd., 2010). Rus vd (2004)'nin *Arabidopsis*'te yaptığı çalışmada *sos1-1*, *sos3-1* ve *hkt1-1* tekli mutantlarının tuz stresi altında bitki boylarının küçük kalması, yapraklarında sararma ve hatta ölme gözlenirken, *sos1-1*, *sos3-1* mutantlarına *hkt1-1* mutantının eklenmesi sonucunda elde edilen *sos1-1hkt1-1* ve *sos3-1hkt1-1* çifte mutantlarının 50 mM NaCl altında yetiştirildiklerinde strese dayanıklı oldukları saptanmıştır. Hisashi vd. (2002) tarafından yapılan çalışmada *cpl1* mutasyonunun soğuk stresi, ABA ve NaCl uygulamasına cevap olarak *RD29A::LUC* hiperexpressionuna neden olduğu gösterilmiştir.

Bu tez çalışmasında da bitkilere 50 mM NaCl uygulanması sonucunda, bitkilerin kök uzunluklarının kontrol gurubuna göre kısa kaldığı, yaş ve kuru ağırlıklarının da kontrole göre daha düşük olduğu belirlenmiştir. Özellikle *sos1-1*, *hkt1-1* ve *sos3-1* tekli mutant

bitkileri tuz stresinden en çok etkilenmiş, *cpl1-6* mutanı ise Col-0 ile aynı tepkiyi vermiştir. *sos1-1hkt1-1*, *sos3-1hkt1-1* çifte mutant bitkilerinin *sos1-1*, *hkt1-1* ve *sos3-1* tekli mutant bitkilerine göre tuz stresi altında daha iyi büyüebildiği, yaş ve kuru ağırlıklarının tekli mutant bitkilerine göre daha yüksek olduğu saptanmıştır. *hkt1-1cpl1-6* ve *cpl1-6sos3-1* çifte mutantlarında ise *hkt1-1* ve *sos3-1* tekli mutantlarında gözlemlenen hassaslığın hafiflediği ve stres altında tekli mutant bitkilerine kıyasla yaş ve kuru ağırlıklarının daha yüksek olduğu ortaya çıkmıştır. Tuz stresi altında *cpl1-6* mutantının *hkt1-1* ve *sos3-1* mutantlarındaki hassaslığın hafiflemesine neden olması, *cpl1-6* tekli mutant bitkisinin ise tuzdan etkilenmemesi, CPL1 proteininin tuz stresi ile ilişkili yolların kontrolünü negatif yönden etkilediğini göstermektedir.

Yaprak su potansiyeli ve ozmotik potansiyel, köklenme ve bitki büyümesinde ortamdaki tuz konsantrasyonunun artmasına bağlı olarak azalmaktadır (Rajasekaran vd., 2001). Bu tez çalışmasında da aynı şekilde, bitkilere tuz uygulanması sonucunda yaprak ve kök yaş ve kuru ağırlıklarında önemli ölçümde azalış görülmektedir. *sos1-1*, *sos3-1* ve *hkt1-1* mutantlarının tuza hassas olduğu, *hkt1-1cpl1-6*, *cpl1-6sos3-1*, *sos1-1hkt1-1* ve *sos3-1hkt1-1* bitkilerinin ise tuz stresine karşı dayanıklılık gösterdiği belirlenmiştir. Tuz stresi altında bitki yaprakları terlemeyi azaltarak su kaybını engellemekte ve bunu da stomaları kapatarak gerçekleştirmektedir. Bu nedenle stomaların kapanması yapraktaki suyun buharlaşmasını engellerken, aynı zamanda da sıcaklığının artmasına sebep olmaktadır (Dolferus, 2014). Bu tez çalışmasında stres koşullarında bitkilerin yaprak sıcaklıkları kontrol gurubundaki bitkilere kıyasla artmış, fakat *cpl1-6sos3-1* bitkisinde ise stres altında yaprak sıcaklığın düştüğü ortaya çıkmıştır. *cpl1-6sos3-1* bitkisinin yaprak oransal su içeriğinin önceki çalışmalarda dayanıklılığı bilinen *sos1-1hkt1-1* ve *sos3-1hkt1-1* çifte mutant bitkileri ve bu tez çalışmasında dayanıklılığı ortaya çıkartılan *hkt1-1cpl1-6* çifte mutant bitkisine göre istatistiksel olarak daha düşük olduğu bulunmuştur. Yaprak oransal su içeriği yüzde değişiminin ise bu bitkilerden daha da belirgin olması, *cpl1-6sos3-1* mutantının stres altında yapraktaki suyun bir kısmını buharlaştırıp, bitki sıcaklığının artmasını engelleyerek stres altında metabolizmanın normal devam etmesini sağlayıp, yaşamını devam ettirdiğinin göstergesidir.

Tuz stresi altında oksidatif stresin artmasıyla kloroplast yapısında önemli bir bozulma gerçekleşerek, fotosentetik aktivitenin azalmasına ve yaşlı yapraklarda kloroz gelişimine sebep olmaktadır (El-Tayeb vd., 2005; Turhan vd., 2019). SPAD değeri ve

toplam klorofil miktarı tayini bitki stresinin bir göstergesi ve çevresel streslere adaptasyonunun göstergesi olarak bilinmektedir. Tuz stresi bitkilerde SPAD değeri ve klorofil miktarının azalmasına neden olmaktadır (Merzlyak vd., 1999; Shah vd., 2017). Bu tez çalışmasında yapraktaki klorofil indeksinin belirlenmesi için SPAD ölçümü ve toplam klorofil miktar tayini yapılmıştır. Önceki çalışmalara benzer olarak tuz stresinin yapraktaki klorofil indeksini negatif yönden etkilediği ve *cpl1-6* mutantının tuz stresine dayanıklılık gösterdiği belirlenmiştir. Tuz stresi altında *sos3-1* ve *hkt1-1* mutantları düşük klorofil indeksi gösterirken, *cpl1-6* ile melezleme sonucunda elde edilen *cpl1-6sos3-1* ve *hkt1-1cpl1-6* çifte mutant bitkilerinde ise yaprak klorofil indeksi önemli düzeyde artmıştır.

Tuz stresi altında hücre membranının tahribatına yol açan lipit peroksidasyonu, birkaç reaksiyon aşaması sonucunda malondialdehit (MDA) üretmekte, MDA ölçümü de bitki stresinin göstergesi olarak bilinmekte ve tuz stresi altında miktarı yükselmektedir (Koyro vd., 2006). Koca (2007) tarafından susam bitkilerinde yapılan çalışmada 100 mM NaCl uygulaması sonucunda MDA içeriğinin arttığı bulunmuştur. Bu tez çalışmasında da aynı şekilde tuz stresi altında tüm bitki genotiplerinde MDA miktarı kontrol gruplarına göre daha yüksek bulunmuş, *cpl1-6* mutantı Col-0 ile aynı tepkiyi göstermiş, *sos1-1*, *sos3-1* ve *hkt1-1* mutantlarının MDA miktarı en yüksek olarak belirlenmiştir. Hassas olan *hkt1-1* ve *sos3-1* mutant bitkilerine *cpl1-6* mutantının eklenmesi sonucunda bitkilerin MDA içeriği azalmış ve dolayısıyla hassasiyeti ortadan kalkmıştır. Özellikle *cpl1-6sos3-1* bitkisinde % 182 oranında azalma gözlenmiştir.

Tez çalışmasında kontrol ve stres grubundaki bitkilerden elde edilen fizyolojik ve biyokimyasal analizler sonucunda tuz stresi altında *cpl1-6* mutantının Col-0 ile aynı tepkiyi gösterdiği, hassas olan *sos3-1* ve *hkt1-1* mutantlarıyla *cpl1-6* mutantının melezlenmesi sonucunda elde edilen *cpl1-6sos3-1* ve *hkt1-1cpl1-6* çifte mutant bitkilerinin tuz stresi altında daha iyi büyüebildiği; kök uzunluğu, yaprak ve kök yaş ve kuru ağırlığı, oransal su içeriği ve klorofil miktarının tekli mutantlara göre daha yüksek, MDA birikiminin ise daha düşük olduğu, dolayısıyla *sos3-1* ve *hkt1-1* mutantlarına *cpl1-6* mutantının eklenmesiyle bitkilerin tuz stresinden daha az etkilendiği ve bu nedenle tekli mutantlardaki hassasiyetin ortadan kalktığı saptanmıştır. Bu nedenle, CPL1 proteininin tuz stresi ile ilgili yolları negatif yönden etkilediği gösterilmiştir.

5.2 Tuz Stresi Altında CPL1 Proteini Na⁺'un Kök Kofuluna Alımını ve Ksilemden Çekilmesini Kontrol Eder

Bitkiler tuz stresine karşı dayanıklılığına göre halofitler ve glikofitler olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Halofitler yüksek tuz şartlarına adapte olmuş ve bu şartlarda yaşamını sürdürebilen bitkilerdir. Glikofitler, yüksek tuz şartlarında yaşayamayan, tuza hassas olan bitkilerdir (Bressan, 2008). Halofitlerin dayanıklılık mekanizması bu bitkilerin Na⁺ ve Cl⁻'ü yapraklara etkin şekilde taşıyarak yaşlı dokularda depo bileşeni gibi kullanması ve ozmotik dengeleme için fruktoz ve prolin biriktirmelerine dayanmaktadır (Al Hassan vd., 2017). Glikofitler ise taşıyıcılar aracılığıyla Na⁺'un kök içerisine girişinin engellenmesi ve sitoplazmadaki fazla Na⁺'un kofulda biriktirilmesiyle tuz stresine karşı dayanıklılık sağlamaktadır (Bartels vd., 2005).

Huazhong vd (2002) tarafından yapılan çalışmada, *sos1-1* mtantınına 2 gün boyunca 100 mM NaCl uygulanması sonucunda köklerde biriken Na⁺ miktarının yapraklara göre daha yüksek olduğu ve SOS1'in kökten gövdeye Na⁺ taşımalarını kontrol etmek için kritik öneme sahip olduğunu saptanmıştır. *sos3-1* mtantınına 100 mM NaCl uygulanması sonucunda da köklerde daha çok Na⁺ birikimi olduğu bulunmuştur (Rus vd., 2004). Bu tez çalışmasında da benzer sonuçlar elde edilmiş, *sos1-1* ve *sos3-1* mutantların köklerinde Na⁺ birikiminin yapraklara göre daha yüksek olduğu saptanmıştır. Bu nedenle, *sos1-1* ve *sos3-1* mutantlarının köklerinde Na⁺ birikiminin fazla olması nedeniyle bu bitkilerin daha hassas olduğu anlaşılmaktadır. Fakat ilginç bir şekilde bu tez çalışmasında ve daha önceki yapılan tüm deneylerde (Rus vd., 2004; Davenport vd., 2007) *hkt1-1* tekli mutant bitkisinin yapraklarında köklerine göre daha çok Na⁺ birikimi olduğu, yani tuz stresine karşı halofitler gibi davranmasına rağmen tuz stresine hassas olduğu ortaya çıkmıştır. Bu durumu açıklamak için Davenport vd (2007) radyoaktif izleyiciler kullanmış ve *hkt1-1* mutant bitkisinde Na⁺ birikimi tespiti sonucunda da aynı sonuçlar elde etmiş ve HKT1'in Na⁺'un kök kofuluna alımını ve ksilemden çekilmesini kontrol ettiğini bulmuştur. Bu nedenle *sos1-1hkt1-1* bitkisinin dayanıklı olması, *sos1-1* mutantına *hkt1-1* mutantının eklenmesi sonucunda kök tarafından alınan fazla Na⁺'un yaşlı yapraklara taşınarak bitkinin tuz stresinden korunmasına yardım etmesiyle açıklanmıştır (Davenport vd., 2007). Bu tez çalışmasında da benzer sonuçlar elde edilmiş, *sos1-1hkt1-1* ve *sos3-1hkt1-1* mutantların tuz dayanıklı olduğu gözlenmiştir. *cpl1-6* mutantının köklerinde Na⁺ miktarının diğer

mutantlara kıyasla en az olması ve alınan az miktardaki Na⁺u da yapraklarda depolaması, *cpl1-6* mutantının tuz stresi altında fazla Na⁺un toksik etkilerinden kendini koruyup fizyolojik ve biyokimyasal olarak Col-0 ile aynı tepkiyi verme nedenini açılmamaktadır. *sos3-1* tekli mutantına *cpl1-6* mutantının eklenmesiyle *cpl1-6* mutantı köklerdeki fazla Na⁺u yapraklara taşınmasını sağlayarak *cpl1-6sos3-1* bitkinin tuz stresine dayanıklı yapmaktadır. Bu sonuçlar ışığında CPL1 proteininin tuz stresi altında *HKT1* gibi Na⁺un kök kofuluna alımını ve ksilemden çekilmesini kontrol eden yolların kontrolünü negatif yönden etkilediği saptanmıştır.

5.3 CPL1, Farklı Hücresel ve Biyokimyasal İşlemlerde Yer Alan Çok Fonksiyonlu Bir Fosfatazdır

Arabidopsis CTD-Phosphatase-Like 1 (CPL1), RNA polimeraz II C uç bölgesinin (CTD) defosfatlanmasını sağlayan bir protein fosfatazdır (Jeong vd., 2013) ve *Arabidopsis* CPL gen ailesinin strese duyarılı olan genlerin ekspresyonunun negatif yönden regüle ettiği bilinmektedir (Koiwa vd., 2002; Xiong vd., 2002). Jiang vd. (2013) tarafından yapılan çalışmada *Arabidopsis* K homoloji motifleri ile bağlanan protein SHINY1'in, strese bağlı gen ifadesini bastırmak için CPL1 ile etkileşimde girdiği, *shi1* mutantının vejetatif büyüme sırasında soğuk stresine hassas olduğu, nükleer lokalize proteinleri olan SHI1 hem de SHI4 / CPL1'in *in vitro* ve *in vivo* olarak birbiriyle etkileşime girdiği, *shi1* ve *shi4* mutantlarının yabancı tip ile karşılaştırıldığında, stres ile indüklenebilen genlerin bazılarında daha yüksek mRNA korunma etkinliği ve değiştirilmiş poliadenilasyon yeri seçimi sergilediği, SHI1-SHI4 / CPL1 kompleksinin, gene özgün olarak mRNA kapağını ve transkripsiyon başlangıcı ve uzamasını inhibe ettiği bulunmuştur. *Arabidopsis thaliana* K homolojisi (KH) bölgesi proteininin belirli bitki dokularında miRNA biyogenezini etkileyen bir kofaktör olarak bilinen REGULATOR OF CBF GENE EXPRESSION 3 (RCF3) regülatörü bulunmakta ve *rcf3* mutantının bazı miRNAların ve miRNAların hedef genlerinin ifade seviyesinde azalışa neden olduğu, RCF3'ün miRNA biyogenezini ise C-TERMINAL DOMAIN PHOSPHATASE-LIKE1 ve 2 (CPL1 ve CPL2) fosfatazları ile nükleer etkileşimler yoluyla çift sarmallı RNA bağlayıcı protein ve DICER-LIKE1 (DCL1) kofaktör HYPONASTIC LEAVES1'in (HYL1) fosforilasyon durumunu ve dolayısıyla aktivitesini düzenlemek için önemli olduğu ortaya çıkmıştır (Karlsson vd., 2015).

Bu tez çalışmasında, tuz stresi altında önemli rolü olan gen ve transkripsiyon faktörlerinin gen ifade seviyesi tayini sonucunda *sos3-1* mutantına *cpl1-6* mutantının eklenmesiyle *ABII*, *DREB2A* ve *DREA2B*'in gen ifade seviyelerinin arttığı, dolayısıyla tuz stresi altında CPL1 proteininin *ABII*, *DREB2A* ve *DREA2B*'in ifade seviyelerini negatif yönden etkilediği ortaya çıkmıştır. *SOS3* ve *HKT1*'in ifade seviyesi *hkt1-1* ile *hkt1-1cpl1-6* mutant bitkilerinde ve *sos3-1* ile *cpl1-6sos3-1* mutant bitkilerinde bir değişiklik göstermemiş, bu sonuç da *cpl1-6*'in eklenmesinin *SOS3* ve *HKT1*'in ifadesini etkilemediğini göstermekte. Fakat ilginç bir şekilde SOS yolağı mutantlarında *CPL1*'in ifade seviyesi azalmaktadır. *cpl1-6* mutantında *AREB1*'in ifade seviyesi yükselmekte, bu da CPL1 proteininin *AREB1*'in ifade seviyesini negatif yönden etkilediğini belirtmektedir. Sonuç olarak, *cpl1-6* mutasyonu SOS yolağındaki genlerin ifade seviyesini değiştirmezken bu yolakta birlikte çalışan SOS yolağının altındaki genleri aktifleştirerek bitkilerin tuz stresine olan tepkilerini negatif yönden etkilediği saptanmıştır. CPL1 üzerinde yapılan önceki çalışmalar ve bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlar yardımıyla RNA metabolizma ragülatörü CPL1'in farklı hücrel ve biyokimyasal işlemlerde yer alan çok fonksiyonlu bir RNA Polimeraz II CTD fosfataz olduğu saptanmıştır.

BÖLÜM VI

SONUÇLAR

Hem doğal hem de andropogenik etkilerden dolayı toprakta yüksek oranda biriken tuz, bitkilerin gelişimini etkileyerek ürün verimini azaltmaktadır. Tuz stresine maruz kalan bitkilerde morfolojik, hücresel, fizyolojik ve moleküler seviyede pek çok problem gözlenmektedir. Bitkilerdeki tuz toleransı ile ilgili moleküler kontrol mekanizmalarının aydınlatılması stres ile ilişkili çeşitli genlerin aktivasyonu, inaktivasyonu ve/veya birbirleriyle olan genetik etkileşime dayanmaktadır. Bitki tuz tolerans mekanizmasında stres genlerinin transkripsiyonunu kontrol eden ko-transkripsiyon faktörleri bulunmakta olup, bunlar hücre içinde belirli proteinlerin sentezlenmesini kontrol etmektedir. Bunlardan bir tanesi C uç bölgesi (CTD) Phosphatase-Like1 (CPL1) olarak bilinen ve RNA polimeraz II holoenziminin en büyük parçasının CTD bölgesini defosfatlayarak transkripsiyon döngüsünün devamlılığını sağlayan fosfatazdır. RNA metabolizma regülatörü olan CPL1'in tuz stresi ile olan etkileşimi her ne kadar uzun yıllardır bilinse de, bu etkileşimin genetik karakterizasyonu ve tuz stres toleransındaki rolü henüz anlaşılamamıştır.

Tuz stresi altında bitkiler tepki olarak farklı yolları aktive ederler. Bunlardan en önemlisi SOS (Salt Overly Sensitive) tolerans mekanizmasıdır. İçerisinde SOS1, SOS2, SOS3, SOS4 ve SOS5 proteinlerini barındıran SOS yolağı, bitkinin tuza toleransı açısından büyük önem taşımaktadır. SOS yolağının üyeleri ilk kez 1997 yılında keşfedilmiş ve görevleri yavaş da olsa bugüne kadar çalışılmıştır. Ancak, son on yıl içerisinde yapılan çalışmalar ile SOS yolağının aslında daha karmaşık bir regülasyonu içerdiği anlaşılmıştır.

CPL1'in SOS yolağında görevli SOS1, SOS3 ve HKT1 ile genetik etkileşime girerek, tuz stres toleransındaki rolünün ortaya çıkartılması bu tolerans mekanizmasının kontrolünde RNA metabolizma regülatörlerinin görevlerinin anlaşılması açısından büyük önem arz etmektedir. Bu çalışmada model bitki olan glikofit *Arabidopsis thaliana*'da *cpl1-6* mutanı ile tuz tolerans mekanizmasından sorumlu genlerin mutantlarının (*sos1-1*, *sos3-1* ve *hkt1-1*) genetik olarak birbirleriyle olan etkileşimleri fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler yöntemlerle incelenmiştir. Çalışma kapsamında

ilk olarak *sos1-1*, *sos3-1* ve *hkt1-1* tekli mutantları *cpl1-6* mutanlığı ile melezlenerek F3 generasyonunda homozigot *sos1-1cpl1-6*, *cpl1-6sos3-1* ve *hkt1-1cpl1-6* çift mutanları elde edilmiş ve PCR yöntemiyle homozigotlukları belirlenmiştir. İlginç bir şekilde, genetik melezleme sonucunda homozigot *sos1-1cpl1-6* bitkileri gelişim süreçlerini tamamlayamadan ölmüşlerdir. Bu nedenle, CPL1 proteininin SOS1 ile etkileşiminin bitki gelişimine olumsuz bir etkisinin olduğu anlaşılmaktadır. Ek olarak, bu çalışmada *sos1-1hkt1-1* ve *sos3-1hkt1-1* çift mutanları da kullanılmıştır.

Hidroponik koşullarda 2 hafta yetiştirilen bitkilere bir hafta 50 mM sodyum klorür uygulanması sonucunda *sos1-1*, *sos3-1* ve *hkt1-1* tekli mutantlarının Col-0 yabanıl tipe kıyasla daha hassas olduğu; *cpl1-6*, *sos1-1hkt1-1*, *sos3-1hkt1-1*, *cpl1-6sos3-1* ve *hkt1-1cpl1-6* mutantlarının ise daha dayanıklı olduğu kök uzunluk, kök/gövde yaş/kuru ağırlık, sodyum ve malondialdehit birikimi, klorofil miktarı ve oransal su içeriği deneyleriyle belirlenmiştir. Yapılan bütün stress deneylerindedeki *cpl1-6* tekli mutantının Col-0 yabanıl tipe oranla ya daha dayanıklı olduğu, ya da yabanıl tip ile benzerlik gösterdiği bulunmuştur. Öte yandan, *cpl1-6* mutantının eklendiği *sos1-1*, *sos3-1* ve *hkt1-1* genotiplerinde de hassasiyet ortadan kalkmıştır. CPL1 ve SOS yolağının altında yer alan genlerin ifade seviyelerine bakılarak bitkilerin tuz toleransına dayanıklılıkla alakalı genleri nasıl kontrol ettikleri anlaşılmaya çalışılmıştır. Bu bağlamda yapılan RT-qPCR analizlerinde tuz toleransı ile alakalı genlerin ifade seviyeleri *cpl1-6*, *cpl1-6sos3-1* ve *hkt1-1cpl1-6* mutantlarında tuz stresi uygulanmasıyla artış göstermiştir. Bu sonuçlar ışığında, CPL1'in SOS yolağı ile genetik etkileşime girerek bitki gelişimi ve tuz toleransında görev aldığı ve yolaktaki genleri negatif olarak etkilediği ispatlanmıştır. Sonuç olarak, CPL1'in SOS tolerans yolağını negatif olarak etkileyen bir RNA metabolizma regülatörü olduğu kanıtlanmıştır.

KAYNAKLAR

Abbott, K. L., Archambault, J., Xiao, H., Nguyen, B. D., Roeder, R. G., Greenblatt, J. and Legault, P., “Interactions of the HIV-1 Tat and RAP74 proteins with the RNA polymerase II CTD phosphatase FCP1”, *Biochemistry*, 44(8), 2716-2731, 2005.

Abbott, K. L., Renfrow, M. B., Chalmers, M. J., Nguyen, B. D., Marshall, A. G., Legault, P. and Omichinski, J. G., “Enhanced binding of RNAP II CTD phosphatase FCP1 to RAP74 following CK2 phosphorylation”, *Biochemistry*, 44(8), 2732-2745, 2005.

Adams, P., Thomas, J. C., Vernon, D. M., Bohnert, H. J. and Jensen, R. G., “Distinct cellular and organismic responses to salt stress”, *Plant and Cell Physiology*, 33(8), 1215-1223, 1992.

Agastian, P., Kingsley, S. J. and Vivekanandan, M., “Effect of salinity on photosynthesis and biochemical characteristics in mulberry genotypes”, *Photosynthetica*, 38(2), 287-290, 2000.

Ahn, S. H., Kim, M. and Buratowski, S., “Phosphorylation of serine 2 within the RNA polymerase II C-terminal domain couples transcription and 3' end processing”, *Molecular cell*, 13(1), 67-76, 2004.

Al Hassan, M., Estrelles, E., Soriano, P., López-Gresa, M. P., Bellés, J. M., Boscaiu, M. and Vicente, O., “Unraveling salt tolerance mechanisms in halophytes: a comparative study on four Mediterranean *Limonium* species with different geographic distribution patterns”, *Frontiers in plant science*, 8, 1438, 2017.

Alamgir, A. N. M. and Ali, M. Y., “Effect of salinity on leaf pigments, sugar and protein concentrations and chloroplast ATPase activity of rice (*Oryza sativa* L.)”, *Bangladesh Journal of Botany*, 28(2), 145-149, 1999.

Ali-Dinar, H. M., Ebert, G. and Ludders, P., “Growth, chlorophyll content, photosynthesis and water relations in guava (*Psidium guajava* L) under salinity and different nitrogen supply”, *Gartenbauwissenschaft*, 64(2), 84, 1999.

Archambault, J., Chambers, R. S., Kobor, M. S., Ho, Y., Cartier, M., Bolotin, D. and Greenblatt, J., “An essential component of a C-terminal domain phosphatase that interacts with transcription factor IIF in *Saccharomyces cerevisiae*”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(26), 14300-14305, 1997.

Asada, K., “The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons”, *Annual review of plant biology*, 50(1), 601-639, 1999.

Ashraf, M. P. J. C. and Harris, P. J. C., “Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants”, *Plant science*, 166(1), 3-16, 2004.

Ashraf, M., “Some important physiological selection criteria for salt tolerance in plants”, *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 199(5), 361-376, 2004.

Aubert, S., Hennion, F., Bouchereau, A., Gout, E., Bligny, R. and Dorne, A. J., “Subcellular compartmentation of proline in the leaves of the subantarctic Kerguelen cabbage *Pringlea antiscorbutica* R. Br. In vivo ¹³C-NMR study”, *Plant, Cell & Environment*, 22(3), 255-259, 1999.

Balfagón, D., Zandalinas, S. I. and Gómez-Cadenas, A., “High temperatures change the perspective: Integrating hormonal responses in citrus plants under co-occurring abiotic stress conditions”, *Physiologia plantarum*, 165(2), 183-197, 2019.

Bang, W. Y., Kim, S. W., Jeong, I. S., Koiwa, H. and Bahk, J. D., “The C-terminal region (640–967) of *Arabidopsis* CPL1 interacts with the abiotic stress- and ABA-responsive transcription factors”, *Biochemical and biophysical research communications*, 372(4), 907-912, 2008.

Bang, W., Kim, S., Ueda, A., Vikram, M., Yun, D., Bressan, R. A. and Koiwa, H., “Arabidopsis carboxyl-terminal domain phosphatase-like isoforms share common catalytic and interaction domains but have distinct in planta functions”, *Plant physiology*, 142(2), 586-594, 2006.

Barragán, V., Leidi, E. O., Andrés, Z., Rubio, L., De Luca, A., Fernández, J. A. and Pardo, J. M., “Ion exchangers NHX1 and NHX2 mediate active potassium uptake into vacuoles to regulate cell turgor and stomatal function in Arabidopsis.”, *The Plant Cell*, 24(3), 1127-1142, 2012.

Bartels, D. and Sunkar, R., “Drought and salt tolerance in plants”, *Critical reviews in plant sciences*, 24(1), 23-58, 2005.

Ben Ahmed, C., Ben Rouina, B., Sensoy, S., Boukhriss, M. and Ben Abdullah, F., “Exogenous proline effects on photosynthetic performance and antioxidant defense system of young olive tree”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(7), 4216-4222, 2010.

Bewley, J. D., “Seed germination and dormancy”, *The plant cell*, 9(7), 1055, 1997.

Bohnert, H. J. and Jensen, R. G., “Strategies for engineering water-stress tolerance in plants. *Trends in biotechnology*, 14(3), 89-97, 1996.

Bohnert, H. J. and Jensen, R. G., “Strategies for engineering water-stress tolerance in plants”, *Trends in biotechnology*, 14(3), 89-97, 1996.

Bressan, R. A., ‘Stres Fizyolojisi. Editörler: Taiz, L., Zeiger, E., Çeviri Editörü: Türkan D., ‘Bitki Fizyolojisi’, *Palme Yayıncılık*, Ankara, 591-620, 2008.

Bressan, R. A., “Stres fizyolojisi 591-620”, *Bitki fizyolojisi (Eds. L. Taiz & E. Zeiger*, 2008.

Carillo, P., Annunziata, M. G., Pontecorvo, G., Fuggi, A. and Woodrow, P., "Salinity stress and salt tolerance", *Abiotic stress in plants–Mechanisms and adaptations*, 1, 21-38, 2011.

Chakraborty, K., Sairam, R. K. and Bhattacharya, R. C., "Differential expression of salt overly sensitive pathway genes determines salinity stress tolerance in Brassica genotypes", *Plant Physiology and Biochemistry*, 51, 90-101, 2012.

Chambers, R. S. and Dahmus, M. E., "Purification and characterization of a phosphatase from HeLa cells which dephosphorylates the C-terminal domain of RNA polymerase II", *Journal of Biological Chemistry*, 269(42), 26243-26248, 1994.

Chaudhuri, K. and Choudhuri, M. A., "Effects of short-term NaCl stress on water relations and gas exchange of two jute species", *Biologia plantarum*, 40(3), 373, 1997.

Cheeseman, J. M., "Mechanisms of salinity tolerance in plants", *Plant physiology*, 87(3), 547-550, 1988.

Cho, M. H., Shears, S. B. and Boss, W. F., "Changes in phosphatidylinositol metabolism in response to hyperosmotic stress in *Daucus carota* L. cells grown in suspension culture", *Plant Physiology*, 103(2), 637-647, 1993.

Clouse, S. D. and Sasse, J. M., "Brassinosteroids: essential regulators of plant growth and development", *Annual review of plant biology*, 49(1), 427-451, 1998.

Corden, J. L., "Tails of RNA polymerase II", *Trends in biochemical sciences*, 15(10), 383-387, 1990.

Corden, J. L., Cadena, D. L., Ahearn, J. M. and Dahmus, M. E., "A unique structure at the carboxyl terminus of the largest subunit of eukaryotic RNA polymerase II", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(23), 7934-7938, 1985.

Cushman, J. C., Meyer, G., Michalowski, C. B., Schmitt, J. M. and Bohnert, H. J., “Salt stress leads to differential expression of two isogenes of phosphoenolpyruvate carboxylase during Crassulacean acid metabolism induction in the common ice plant”, *The Plant Cell*, 1(7), 715-725, 1989.

Çulha, Ş. and Çakırlar, H., “Tuzluluğun bitkiler üzerine etkileri ve tuz tolerans mekanizmaları”, *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 11(2), 11-34, 2011.

Dahmus, M. E., “Reversible phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II”, *Journal of Biological Chemistry*, 271(32), 19009-19012, 1996.

Dalmay, T., Hamilton, A., Rudd, S., Angell, S. and Baulcombe, D. C., “An RNA-dependent RNA polymerase gene in Arabidopsis is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus”, *Cell*, 101(5), 543-553, 2000.

Davenport, R. J., MUÑOZ-MAYOR, A. L. I. C. I. A., Jha, D., Essah, P. A., Rus, A. N. A. and Tester, M., “The Na⁺ transporter AtHKT1; 1 controls retrieval of Na⁺ from the xylem in Arabidopsis”, *Plant, cell and environment*, 30(4), 497-507, 2007.

Duan, Y., Zhang, W., Li, B., Wang, Y., Li, K., Han, C. and Li, X., “An endoplasmic reticulum response pathway mediates programmed cell death of root tip induced by water stress in Arabidopsis”, *New Phytologist*, 186(3), 681-695, 2010.

Dubey, R. S. and Singh, A. K., “Salinity induces accumulation of soluble sugars and alters the activity of sugar metabolising enzymes in rice plants”, *Biologia Plantarum*, 42(2), 233-239, 1999.

Ekmekci, E., Mehmet, A. P. A. N. and Tekin, K. A. R. A., “Tuzluluğun bitki gelişimine etkisi”, *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, 20(3), 118-125, 2005.

El-Bassiouny, H. M. and Bekheta, M. A., “Effect of salt stress on relative water content, lipid peroxidation, polyamines, amino acids and ethylene of two wheat cultivars”, *Int. J. Agric. Biol.*, 7(3), 363-368, 2005.

- El-Shintinawy, F. and El-Shourbagy, M. N., "Alleviation of changes in protein metabolism in NaCl-stressed wheat seedlings by thiamine", *Biologia plantarum*, 44(4), 541-545, 2001.
- El-Tayeb, M. A., "Response of barley grains to the interactive effect of salinity and salicylic acid", *Plant Growth Regulation*, 45(3), 215-224, 2005.
- Ferreira, R. G., Távora, F. J. A. F. and Ferreyra, Hernandez F. F., "Dry matter partitioning and mineral composition of roots, stems and leaves of guava grown under salt stress conditions", *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 36(1), 79-88, 2001.
- Fragnière, C., Serrano, M., Abou-Mansour, E., Métraux, J. P. and L'haridon, F., "Salicylic acid and its location in response to biotic and abiotic stress", *FEBS letters*, 585(12), 1847-1852, 2011.
- Fujita, Y., Fujita, M., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K., "ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants", *Journal of plant research*, 124(4), 509-525, 2011.
- Fujita, Y., Yoshida, T. and Yamaguchi-Shinozaki, K., "Pivotal role of the AREB/ABF-SnRK2 pathway in ABRE-mediated transcription in response to osmotic stress in plants", *Physiologia plantarum*, 147(1), 15-27, 2013.
- Gadallah, M. A. A., "Effects of proline and glycinebetaine on Vicia faba responses to salt stress", *Biologia plantarum*, 42(2), 249-257, 1999.
- Gadallah, M. A. A., "Effects of proline and glycinebetaine on Vicia faba responses to salt stress", *Biologia plantarum*, 42(2), 249-257, 1999.
- Gao, Z., Sagi, M. and Lips S. H., "Carbohydrate metabolism in leaves and assimilate partitioning in fruits of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) as affected by salinity", *Plant Science*, 135(2), 149-159, 1998.

- Gossett, D. R., Millhollon, E. P., “Lucas, M. (1994). Antioxidant response to NaCl stress in salt-tolerant and salt-sensitive cultivars of cotton”, *Crop Science*, 34(3), 706-714, 1994.
- Groß, F., Durner, J. and Gaupels, F., “Nitric oxide, antioxidants and prooxidants in plant defence responses”, *Frontiers in plant science*, 4, 419, 2013.
- Gulzar, S., Khan, M. A. and Ungar, I. A., “Salt tolerance of a coastal salt marsh grass”, *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 34(17-18), 2595-2605, 2003.
- Guo, Y., Qiu, Q. S., Quintero, F. J., Pardo, J. M., Ohta, M., Zhang, C. and Zhu, J. K., “Transgenic evaluation of activated mutant alleles of SOS2 reveals a critical requirement for its kinase activity and C-terminal regulatory domain for salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*”, *The Plant Cell*, 16(2), 435-449, 2004.
- Gupta, K. J., Stoimenova, M. and Kaiser, W. M., “In higher plants, only root mitochondria, but not leaf mitochondria reduce nitrite to NO, in vitro and in situ”, *Journal of Experimental Botany*, 56(420), 2601-2609, 2005.
- Gupta, S. D., “Plasma membrane ultrastructure in embryogenic cultures of orchardgrass during NaCl stress”, *Biologia plantarum*, 51(4), 759-763, 2007.
- Hasegawa, P. M., Bressan, R. A., Zhu, J. K. and Bohnert, H. J., “Plant cellular and molecular responses to high salinity”, *Annual review of plant biology*, 51(1), 463-499, 2000.
- Hassanein, A., “Alterations in protein and esterase patterns of peanut in response to salinity stress”, *Biologia plantarum*, 42(2), 241-248, 1999.
- He, T. and Cramer, G. R., “Abscisic acid concentrations are correlated with leaf area reductions in two salt-stressed rapid-cycling Brassica species”, *Plant and Soil*, 179(1), 25-33, 1996.

Hernandez, J. A., Olmos, E., Corpas, F. J., Sevilla, F. and Del Rio, L. A., "Salt-induced oxidative stress in chloroplasts of pea plants", *Plant Science*, 105(2), 151-167, 1995.

Ho, C. K. and Shuman, S., "Distinct roles for CTD Ser-2 and Ser-5 phosphorylation in the recruitment and allosteric activation of mammalian mRNA capping enzyme", *Molecular cell*, 3(3), 405-411, 1999.

Hoque, M. A., Banu, M. N. A., Nakamura, Y., Shimoishi, Y. and Murata, Y., "Proline and glycinebetaine enhance antioxidant defense and methylglyoxal detoxification systems and reduce NaCl-induced damage in cultured tobacco cells", *Journal of plant physiology*, 165(8), 813-824, 2008.

Hu, Y., Chen, L., Wang, H., Zhang, L., Wang, F. and Yu, D., "A rabidopsis transcription factor WRKY 8 functions antagonistically with its interacting partner VQ 9 to modulate salinity stress tolerance", *The Plant Journal*, 74(5), 730-745, 2013.

Huazhong, S., Quintero, F. J., Pardo, J. M. and Jian-Kang, Z., "The putative plasma membrane Na (+)/H (+) antiporter SOS1 controls long-distance Na (+) transport in plants", *Plant Cell*, 14, 465-477, 2002.

Ishitani, M., Liu J., Halfter, U., Kim, C. S., Shi, W. and Zhu, J. K., "SOS3 function in plant salt tolerance requires N-myristoylation and calcium binding", *The Plant Cell*, 12(9), 1667-1677, 2000.

Ito, Y., Katsura, K., Maruyama, K., Taji, T., Kobayashi, M., Seki, M. and Yamaguchi-Shinozaki, K., "Functional analysis of rice DREB1/CBF-type transcription factors involved in cold-responsive gene expression in transgenic rice", *Plant and Cell Physiology*, 47(1), 141-153, 2006.

Jaschke, W. D., Peuke, A. D., Pate, J. S. and Hartung, W., "Transport, synthesis and catabolism of abscisic acid (ABA) in intact plants of castor bean (*Ricinus communis* L.) under phosphate deficiency and moderate salinity", *Journal of Experimental Botany*, 48(9), 1737-1747, 1997.

Jayakannan, M., Bose, J., Babourina, O., Rengel, Z. and Shabala, S., “Salicylic acid improves salinity tolerance in Arabidopsis by restoring membrane potential and preventing salt-induced K⁺ loss via a GORK channel”, *Journal of Experimental Botany*, 64(8), 2255-2268, 2013.

Jeong, I. S., Aksoy, E., Fukudome, A., Akhter, S., Hiraguri, A., Fukuhara, T., and Koiwa, H., “Arabidopsis C-terminal domain phosphatase-like 1 functions in miRNA accumulation and DNA methylation”, *PLoS One*, 8(9), e74739, 2013.

Jiang, J., Wang, B., Shen, Y., Wang, H., Feng, Q. and Shi, H., “The Arabidopsis RNA binding protein with K homology motifs, SHINY1, interacts with the C-terminal domain phosphatase-like 1 (CPL1) to repress stress-inducible gene expression”, *PLoS genetics*, 9(7), e1003625, 2013.

Johnson, R. R., Wagner, R. L., Verhey, S. D. and Walker-Simmons, M. K., “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, 2002.

Kalefetoğlu, T. and Ekmekci, Y., “The effects of drought on plants and tolerance mechanisms”, *Gazi University Journal of Science*, 18(4), 723-740, 2005.

Kang, M. E. and Dahmus, M. E., “RNA polymerases IIA and IIO have distinct roles during transcription from the TATA-less murine dihydrofolate reductase promoter”, *Journal of Biological Chemistry*, 268(33), 25033-25040, 1993.

Karlsson, P., Christie, M. D., Seymour, D. K., Wang, H., Wang, X., Hagemann, J. and Manavella, P. A., “KH domain protein RCF3 is a tissue-biased regulator of the plant miRNA biogenesis cofactor HYL1”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(45), 14096-14101, 2015.

Kennedy, B. and De, Filippis L. F., “Physiological and oxidative response to NaCl of the salt tolerant *Grevillea ilicifolia* and the salt sensitive *Grevillea arenaria*”, *Journal of plant physiology*, 155(6), 746-754, 1999.

Kerepesi, I. and Galiba, G., “Osmotic and salt stress-induced alteration in soluble carbohydrate content in wheat seedlings”, *Crop Science*, 40(2), 482-487, 2000.

Kerkeb, L., Donaire, J. P. and Rodríguez-Rosales, M. P., “Plasma membrane H⁺-ATPase activity is involved in adaptation of tomato calli to NaCl”, *Physiologia Plantarum*, 111(4), 483-490, 2001.

Keskin, B. C., Yuksel, B., Memon, A. R. and Topal-Sarıkaya, A., “ Abscisic Acid Regulated Gene Expression in Bread Wheat ('Triticum aestivum'L.)”, *Australian journal of crop science*, 4(8), 617, 2017.

Khan, M. A. and Gulzar, S., “Germination responses of Sporobolus ioclados: a saline desert grass”, *Journal of Arid Environments*, 53(3), 387-394, 2003.

Khavari-Nejad, R. A. and Mostofi, Y., “Effects of NaCl on photosynthetic pigments, saccharides, and chloroplast ultrastructure in leaves of tomato cultivars”. *Photosynthetica*, 35(1), 151-154, 1998.

Kobor, M. S., Simon, L. D., Omichinski, J., Zhong, G., Archambault, J. and Greenblatt, J., “A motif shared by TFIIF and TFIIB mediates their interaction with the RNA polymerase II carboxy-terminal domain phosphatase Fcp1p in *Saccharomyces cerevisiae*”, *Molecular and cellular biology*, 20(20), 7438-7449, 2000.

Koca, H., Bor, M., Özdemir, F. and Türkan, I., “The effect of salt stress on lipid peroxidation, antioxidative enzymes and proline content of sesame cultivars”, *Environmental and experimental botany*, 60(3), 344-351, 2007.

Koiwa, H., Barb, A. W., Xiong, L., Li, F., McCully, M. G., Lee, B. H. and Sharkhuu, A., “C-terminal domain phosphatase-like family members (AtCPLs) differentially regulate *Arabidopsis thaliana* abiotic stress signaling, growth, and development”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(16), 10893-10898, 2002.

Koiwa, H., Hausmann, S., Bang, W. Y., Ueda, A., Kondo, N., Hiraguri, A. and Hasegawa, P. M., “Arabidopsis C-terminal domain phosphatase-like 1 and 2 are essential Ser-5-specific C-terminal domain phosphatases”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(40), 14539-14544, 2004.

Komarnitsky, P., Cho, E. J. and Buratowski, S., “Different phosphorylated forms of RNA polymerase II and associated mRNA processing factors during transcription”, *Genes and development*, 14(19), 2452-2460, 2000.

Koyro, H. W., “Effect of salinity on growth, photosynthesis, water relations and solute composition of the potential cash crop halophyte *Plantago coronopus* (L.)”, *Environmental and Experimental Botany*, 56(2), 136-146, 2006.

Lee, D. H., Kim, Y. S. and Lee, C. B., “The inductive responses of the antioxidant enzymes by salt stress in the rice (*Oryza sativa* L.)”, *Journal of plant physiology*, 158(6), 737-745, 2001.

Lee, T. M. and Liu, C. H., “Correlation of decreased calcium contents with proline accumulation in the marine green macroalga *Ulva fasciata* exposed to elevated NaCl contents in seawater”, *Journal of Experimental Botany*, 50(341), 1855-1862, 1999.

Li, X., Ohgi, K. A., Zhang, J., Krones, A., Bush, K. T., Glass, C. K. and Rosenfeld, M. G., “Eya protein phosphatase activity regulates Six1–Dach–Eya transcriptional effects in mammalian organogenesis.”, *Nature*, 426(6964), 247, 2003.

Lim, G. H., Zhang, X., Chung, M. S., Lee, D. J., Woo, Y. M., Cheong, H. S. and Kim, C. S., “A putative novel transcription factor, AtSKIP, is involved in abscisic acid signalling and confers salt and osmotic tolerance in *Arabidopsis*”, *New Phytologist*, 185(1), 103-113, 2010.

Liu, J., Ishitani, M., Halfter, U., Kim, C. S. and Zhu, J. K., “The *Arabidopsis thaliana* SOS2 gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance”, *Proceedings of the national academy of sciences*, 97(7), 3730-3734, 2000.

Lu, H., Zawel, L., Fisher, L., Egly, J. M. and Reinberg, D., “Human general transcription factor IIIH phosphorylates the C-terminal domain of RNA polymerase II”, *Nature*, 358(6388), 641, 1992.

Lu, J., Takaichi, K., Uematsu, T., Shirakawa, A., Musha, M., Ueda, K. and Kaminskii, A. A., “Promising ceramic laser material: Highly transparent Nd³⁺: Lu₂O₃ ceramic.”, *Applied physics letters*, 81(23), 4324-4326, 2002.

Martínez-Atienza, J., Jiang, X., Garciadeblas, B., Mendoza, I., Zhu, J. K., Pardo, J. M. and Quintero, F. J., “Conservation of the salt overly sensitive pathway in rice”, *Plant physiology*, 143(2), 1001-1012, 2007.

Matysik, J., Alia, Bhalu, B. and Mohanty, P., “Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants”, *Current Science*, 525-532, 2002.

Meinzer, F. C. and Zhu, J., “Efficiency of C₄ photosynthesis in *Atriplex lentiformis* under salinity stress”, *Functional Plant Biology*, 26(1), 79-86. 1999.

Merzlyak, M. N., Gitelson, A. A., Chivkunova, O. B. and Rakitin, V. Y., “Non-destructive optical detection of pigment changes during leaf senescence and fruit ripening”, *Physiologia plantarum*, 106(1), 135-141, 1999.

Mizoi, J., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K., “AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1819(2), 86-96, 2012.

Mudgal, V., Madaan, N. and Mudgal, A., “Biochemical mechanisms of salt tolerance in plants: a review”, *International Journal of Botany*, 6(2), 136-143, 2010.

Munns, R. and Tester, M., “Mechanisms of salinity tolerance”, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59, 651-681, 2008.

Munns, R., Schachtman, D. P. and Condon, A. G., “The significance of a two-phase growth response to salinity in wheat and barley”, *Functional Plant Biology*, 22(4), 561-569, 1995.

Nakashima, K., Tran, L. S. P., Van Nguyen, D., Fujita, M., Maruyama, K., Todaka, D. and Yamaguchi-Shinozaki, K., “Functional analysis of a NAC-type transcription factor OsNAC6 involved in abiotic and biotic stress-responsive gene expression in rice”, *The Plant Journal*, 51(4), 617-630, 2007.

Parida, A. K. and Das, A. B., “Salt tolerance and salinity effects on plants: a review”, *Ecotoxicology and environmental safety*, 60(3), 324-349, 2005.

Parida, A. K., Das, A. B. and Mitra, B., “Effects of NaCl stress on the structure, pigment complex composition, and photosynthetic activity of mangrove *Bruguiera parviflora* chloroplasts”, *Photosynthetica*, 41(2), 191, 2003.

Parida, A. K., Das, A. B. and Mitra, B., “Effects of salt on growth, ion accumulation, photosynthesis and leaf anatomy of the mangrove, *Bruguiera parviflora*”, *Trees*, 18(2), 167-174, 2004.

Parida, A. K., Das, A. B. and Mohanty, P., “Defense potentials to NaCl in a mangrove, *Bruguiera parviflora*: differential changes of isoforms of some antioxidative enzymes”, *Journal of plant physiology*, 161(5), 531-542, 2004.

Parida, A. K., Das, A. B. and Mohanty, P., “Investigations on the antioxidative defence responses to NaCl stress in a mangrove, *Bruguiera parviflora*: differential regulations of isoforms of some antioxidative enzymes”, *Plant Growth Regulation*, 42(3), 213-226, 2004.

Parida, A., Das, A. B. and Das, P., “NaCl stress causes changes in photosynthetic pigments, proteins, and other metabolic components in the leaves of a true mangrove, *Bruguiera parviflora*, in hydroponic cultures”, *Journal of Plant Biology*, 45(1), 28-36, 2002.

Parvaiz, A. and Satyawati, S., “Salt stress and phyto-biochemical responses of plants-a review”, *Plant Soil and Environment*, 54(3), 89, 2008.

Pessaraki, M. and Szaboles, I., “Soil salinity and sodicity as particular plant/crop stress factors”, *Handbook of plant and crop stress*, 2, 1999.

Popova, L. P., Stoinova, Z. G. and Maslenkova, L. T., “Involvement of abscisic acid in photosynthetic process in *Hordeum vulgare* L. during salinity stress”, *Journal of plant growth regulation*, 14(4), 211, 1995.

Quintero, F. J., Ohta, M., Shi, H., Zhu, J. K. and Pardo, J. M., “Reconstitution in yeast of the Arabidopsis SOS signaling pathway for Na⁺ homeostasis”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(13), 9061-9066, 2002.

Rahman, S., Matsumuro, T., Miyake, H. and Takeoka, Y., “Salinity-induced ultrastructural alterations in leaf cells of rice (*Oryza sativa* L.)”, *Plant Production Science*, 3(4), 422-429, 2000.

Rajasekaran, S. A., Palmer, L. G., Moon, S. Y., Peralta, Soler, A., Apodaca, G. L., Harper, J. F. and Rajasekaran, A. K., “Na, K-ATPase activity is required for formation of tight junctions, desmosomes, and induction of polarity in epithelial cells”, *Molecular biology of the cell*, 12(12), 3717-3732, 2001.

Roshandel, P. and Flowers, T., “The ionic effects of NaCl on physiology and gene expression in rice genotypes differing in salt tolerance”, *Plant and Soil*, 315(1-2), 135-147, 2009.

RoyChoudhury, A., Gupta, B. and Sengupta, D. N., “Trans-acting factor designated OSBZ8 interacts with both typical abscisic acid responsive elements as well as abscisic acid responsive element-like sequences in the vegetative tissues of indica rice cultivars”, *Plant cell reports*, 27(4), 779-794, 2008.

Rus, A., Lee, B. H., Muñoz-Mayor, A., Sharkhuu, A., Miura, K., Zhu, J. K. and Hasegawa, P. M., “AtHKT1 facilitates Na⁺ homeostasis and K⁺ nutrition in planta”, *Plant physiology*, 136(1), 2500-2511, 2004.

Rus, A., Yokoi, S., Sharkhuu, A., Reddy, M., Lee, B. H., Matsumoto, T. K. and Hasegawa, P. M., “AtHKT1 is a salt tolerance determinant that controls Na⁺ entry into plant roots”, *Proceedings of the national academy of sciences*, 98(24), 14150-14155, 2001.

Sairam, R. K. and Tyagi, A., “Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants”, *Current science*, 407-421, 2004.

Sairam, R. K., Rao, K. V. and Srivastava, G. C., “Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration”, *Plant Science*, 163(5), 1037-1046, 2002.

Sanders, D., “Plant biology: the salty tale of Arabidopsis”, *Current Biology*, 10(13), R486-R488, 2000.

Saxena, S. C., Kaur, H., Verma, P., Petla, B. P., Andugula, V. R. and Majee, M., “Osmoprotectants: potential for crop improvement under adverse conditions”, *In Plant Acclimation to Environmental Stress*, 197-232, 2013.

Schroeder, J. I., Delhaize, E., Frommer, W. B., Guerinot, M. L., Harrison, M. J., Herrera-Estrella, L. and Tsay, Y. F., “Using membrane transporters to improve crops for sustainable food production”, *Nature*, 497(7447), 60, 2013.

Schroeder, S. C., Schwer, B., Shuman, S. and Bentley, D., “Dynamic association of capping enzymes with transcribing RNA polymerase II”, *Genes and development*, 14(19), 2435-2440, 2000.

Shah, S., Houborg, R. and McCabe, M., “Response of chlorophyll, carotenoid and SPAD-502 measurement to salinity and nutrient stress in wheat (*Triticum aestivum* L.)”, *Agronomy*, 7(3), 61, 2017.

Shi, H., Ishitani, M., Kim, C. and Zhu, J. K., “The Arabidopsis thaliana salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter”, *Proceedings of the national academy of sciences*, 97(12), 6896-6901, 2000.

Singh, S. C., Sinha, R. P. and Hader, D. P., “Role of lipids and fatty acids in stress tolerance in cyanobacteria”, *Acta protozoologica*, 41(4), 297-308, 2002.

Singh, S. K., Sharma, H. C., Goswami, A. M., Datta, S. P. and Singh, S. P., “In vitro growth and leaf composition of grapevine cultivars as affected by sodium chloride”, *Biologia plantarum*, 43(2), 283-286, 2000.

Slayman, C. L., “Charge-transport characteristics of a plasma membrane proton pump. *In Membranes and Transport* (pp. 485-490). Springer, Boston, MA, 1982.

Song, N. H. and Ahn, Y. J., “DcHsp17. 7, a small heat shock protein in carrot, is tissue-specifically expressed under salt stress and confers tolerance to salinity”, *New biotechnology*, 28(6), 698-704, 2011.

Song, S. Y., Chen, Y., Chen, J., Dai, X. Y. and Zhang, W. H., “Physiological mechanisms underlying OsNAC5-dependent tolerance of rice plants to abiotic stress”, *Planta*, 234(2), 331-345, 2011.

Tamas, L., Huttova, J. and Mistrik, I., “Impact of aluminium, NaCl and growth retardant tetcyclacis on growth and protein composition of maize roots”, *Section Cellular and Molecular Biology*, 2001.

Tang, M., Liu, X., Deng, H. and Shen, S., “Over-expression of JcDREB, a putative AP2/EREBP domain-containing transcription factor gene in woody biodiesel plant *Jatropha curcas*, enhances salt and freezing tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana*”, *Plant Science*, 181(6), 623-631, 2011.

Temel, A., “Comparison of salinity-induced changes in two cultivars of barley”, *European Journal of Biology*, 73(2), 9-16, 2014.

Turhan, A. and Kuşçu, H., “Tuzluluk Stresinin Patlıcanda (*Solanum melongena* L.) Su Kullanım Etkinliği, Verim Bileşenleri, Yaprak Klorofil ve Karotenoid İçeriği Üzerine Etkileri”, *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 29(1), 61-68.

Tuteja, N., “Mechanisms of high salinity tolerance in plants”, *In Methods in enzymology* (Vol. 428, pp. 419-438). Academic Press, 2007.

Wang, B., Lüttge, U. and Ratajczak, R., “Effects of salt treatment and osmotic stress on V-ATPase and V-PPase in leaves of the halophyte *Suaeda salsa*”, *Journal of Experimental Botany*, 52(365), 2355-2365, 2001.

Wu, J., Seliskar, D. M. and Gallagher, J. L., “Stress tolerance in the marsh plant *Spartina patens*: Impact of NaCl on growth and root plasma membrane lipid composition”, *Physiologia Plantarum*, 102(2), 307-317, 1998.

Xavier, R., Vinod, V., Timalata, K. and Lim, O. F., “Role of exogenous proline in ameliorating salt stress at early stage in two rice cultivars”, *Journal of Stress Physiology and Biochemistry*, 7(4), 2011.

Xiong, L., Lee, H., Ishitani, M., Tanaka, Y., Stevenson, B., Koiwa, H. and Zhu, J. K., “Repression of stress-responsive genes by FIERY2, a novel transcriptional regulator in *Arabidopsis*”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(16), 10899-10904, 2002.

Xiong, L., Schumaker, K. S. and Zhu, J. K., “Cell signaling during cold, drought, and salt stress” *The plant cell*, 14(suppl 1), S165-S183, 2002.

Yen, H. E., Zhang, D., Lin, J. H., Edwards, G. E. and Ku, M. S., “Salt-induced changes in protein composition in light-grown callus of *Mesembryanthemum crystallinum*”, *Physiologia Plantarum*, 101(3), 526-532, 1997.

Yeo, M., Lee, S. K., Lee, B., Ruiz, E. C., Pfaff, S. L. and Gill, G. N., “Small CTD phosphatases function in silencing neuronal gene expression”, *Science*, 307(5709), 596-600, 2005.

Yıldız, M., Terzi, H., Cenkci, S., Arıkan, Terzi E. S. And Uruşak, B., “Bitkilerde tuzluluğa toleransın fizyolojik ve biyokimyasal markörleri”, 2010.

Zhang, T. and Guo, W., “Characterization of six novel NAC genes and their responses to abiotic stresses in *Gossypium hirsutum* L”, *Plant Science*, 176(3), 352-359, 2009.

Zhu, J. K., “Regulation of ion homeostasis under salt stress”, *Current opinion in plant biology*, 6(5), 441-445, 2003.

Zou, J., Liu, A., Chen, X., Zhou, X., Gao, G., Wang, W. and Zhang, X., “Expression analysis of nine rice heat shock protein genes under abiotic stresses and ABA treatment”, *Journal of Plant Physiology*, 166(8), 851-861, 2009.

Zou, J., Liu, C., Liu, A., Zou, D. and Chen, X., “Overexpression of OsHsp17. 0 and OsHsp23. 7 enhances drought and salt tolerance in rice”, *Journal of plant physiology*, 169(6), 628-635, 2012.

EKLER

Ek-1. Bazal MS besiyerinin içeriği

Şişe I

<u>Kimyasal</u>	<u>M</u>	<u>1L'deki miktar</u>
KNO ₃	0.375	38 g
NH ₄ NO ₃	4.12x10 ⁻³	33 g

1 L'lik kahverengi şişede hazırlanır.

Şişe II

<u>Kimyasal</u>	<u>M</u>	<u>250 ml'deki miktar</u>
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.075	4.625 g
KH ₂ PO ₄	0.625	2.125 g

250 ml'lik kahverengi şişede hazırlanır.

Şişe III

<u>Kimyasal</u>	<u>M</u>	<u>100 ml'deki miktar</u>
CaCl ₂ .H ₂ O	0.3	4.4 g

100 ml'lik kahverengi şişede hazırlanır. Çabuk kontamine olur.

Şişe IV

<u>Kimyasal</u>	<u>M</u>	<u>100 ml'deki miktar</u>
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.02	0.552 g
Na ₂ EDTA	0.02	0.745 g

100 ml'lik kahverengi şişede hazırlanır. İlk başta oda sıcaklığında Na₂EDTA suda çözülür. Hazırlandıktan sonra demirin oksitlenmesini önlemek için karanlıkta turulmalıdır.

Şişe V

<u>Kimyasal</u>	<u>M</u>	<u>500 ml'deki miktar</u>
MnSO ₄ .H ₂ O	10x10 ⁻³	0.845 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	3x10 ⁻³	0.429 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	1x10 ⁻⁵	0.0012 g
CoCl ₂ .6H ₂ O	1x10 ⁻⁵	0.0012 g
KI	5x10 ⁻⁴	0.0416 g
H ₃ BO ₃	0.01	0.31 g
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	1.03x10 ⁻⁴	0.013 g

500 ml'lik şişede hazırlanır.

Ek-2. Bazal MS besiyerinin hazırlanması

1. Saf su içerisinde aşağıda sıralananlar eklenir (Toplam hacmin % 20'si kadar sui lave edilir).

Şişe Numarası	Son Konsantrasyon								
	¼ X (Çeyrek)			½ X (Yarım)			1 X (Tam)		
	250 mL	500 mL	1 L	250 mL	500 mL	1 L	250 mL	500 mL	1 L
I	3.125 ml	6.25 ml	12.5 ml	6.25 ml	12.5 ml	25 ml	12.5 ml	25 ml	50 ml
II	1.25 ml	2.5 ml	5 ml	2.5 ml	5 ml	10 ml	5 ml	10 ml	20 ml
III	0.625 ml	1.25 ml	2.5 ml	1.25 ml	2.5 ml	5 ml	2.5 ml	5 ml	10 ml
IV	0.625 ml	1.25 ml	2.5 ml	1.25 ml	2.5 ml	5 ml	2.5 ml	5 ml	10 ml
V	0.625 ml	1.25 ml	2.5 ml	1.25 ml	2.5 ml	5 ml	2.5 ml	5 ml	10 ml

2. Sükroz (Sigma) ilave edilir.

	Son Konsantrasyon					
	¼ X (Çeyrek)		½ X (Yarım)		1 X (Tam)	
	500 mL	1 L	500 mL	1 L	500 mL	1 L
Sükroz	2.5 g	5 g	2.5 g	5 g	2.5 g	5 g

3. pH, KOH veya HCl kullanılarak 5,6 – 5,8 arasında ayarlanır.
4. Son hacim saf sui le ayarlanır.
5. Şişelere aşağıdaki agar konsantrasyonları eklenir.

	Son Konsantrasyon											
	0.8%				1%				1.5%			
	100 mL	250 mL	500 mL	1 L	100 mL	250 mL	500 mL	1 L	100 mL	250 mL	500 mL	1 L
Agar^a	0.8 g	2 g	4 g	8 g	1 g	2.5 g	5 g	10 g	1.5 g	2.5 g	7.5 g	15 g

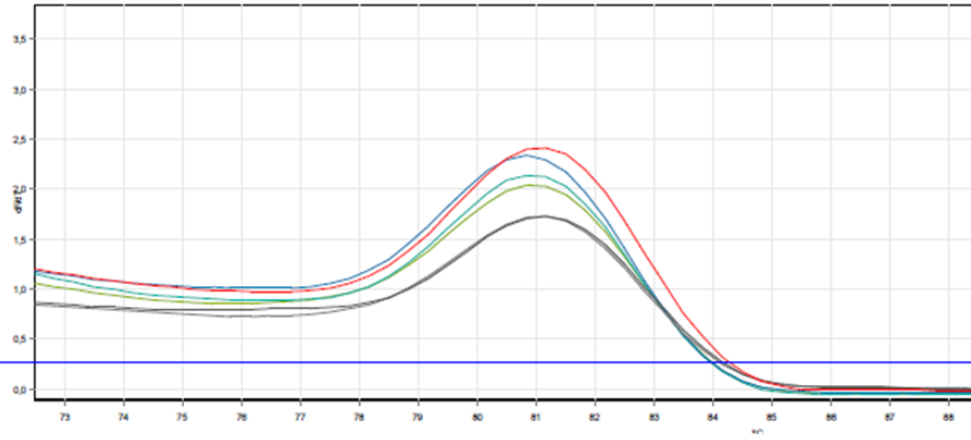
^a Sigma E agar kullanılmaktadır.

6. Sıvı döngüde 121°C'de 20 - 25 dakika otoklavlanır.
7. 55°C'deye soğutulup steril kabin içerisinde steril petrilere dökülür.

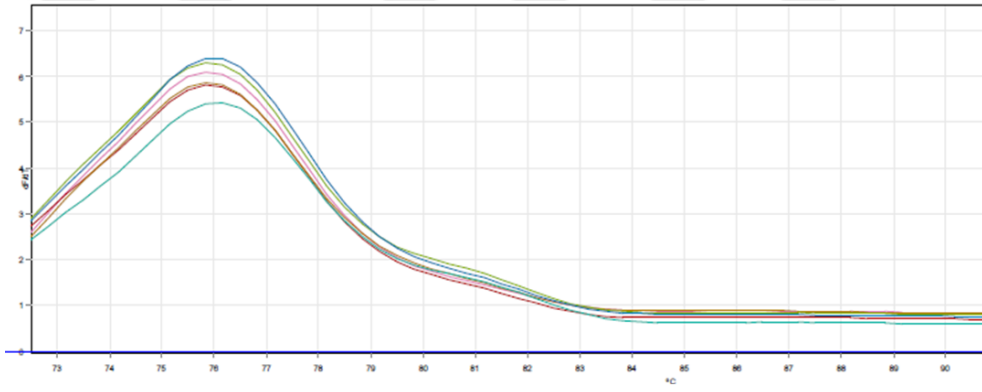
Ek-3. RNA Örneklerinin Konsantrasyon Bilgileri

Genotipler	A260/A280	Konsantrasyon (ng/ul)	Genotipler	A260/A280	Konsantrasyon (ng/ul)
Col-0 kontrol-1	2.137	189.960	<i>cpl1-6</i> kontrol-1	2.022	730.720
Col-0 kontrol-2	2.044	234.160	<i>cpl1-6</i> kontrol-2	2.210	385.400
Col-0 tuz-1	2.097	197.400	<i>cpl1-6</i> tuz-1	1.969	538.480
Col-0 tuz-2	2.096	226.560	<i>cpl1-6</i> tuz-2	2.194	366.960
<i>sos1-1</i> kontrol-1	2.075	191.600	<i>sos1-1hkt1-1</i> kontrol-1	2.115	250.520
<i>sos1-1</i> kontrol-2	2.157	194.040	<i>sos1-1hkt1-1</i> kontrol-2	2.090	1179.720
<i>sos1-1</i> tuz-1	2.086	960.120	<i>sos1-1hkt1-1</i> tuz-1	2.051	932.040
<i>sos1-1</i> tuz-2	1.981	616.080	<i>sos1-1hkt1-1</i> tuz-2	2.108	317.760
<i>hkt1-1</i> kontrol-1	2.008	272.400	<i>sos3-1hkt1-1</i> kontrol-1	2.266	1573.920
<i>hkt1-1</i> kontrol-2	2.155	226.680	<i>sos3-1hkt1-1</i> kontrol-2	2.175	1354.480
<i>hkt1-1</i> tuz-1	2.123	319.160	<i>sos3-1hkt1-1</i> tuz-1	2.085	1106.640
<i>hkt1-1</i> tuz-2	2.139	1178.440	<i>sos3-1hkt1-1</i> tuz-2	2.002	735.800
<i>sos3-1</i> kontrol-1	2.157	1126.760	<i>hkt1-1cpl1-6</i> kontrol-1	2.042	924.680
<i>sos3-1</i> kontrol-2	1.999	672.280	<i>hkt1-1cpl1-6</i> kontrol-2	1.964	551.560
<i>sos3-1</i> tuz-1	2.077	548.680	<i>hkt1-1cpl1-6</i> tuz-1	2.111	290.000
<i>sos3-1</i> tuz-2	2.008	508.320	<i>hkt1-1cpl1-6</i> tuz-2	1.950	482.600
<i>cpl1-6sos3-1</i> kontrol-1	2.097	349.880	<i>cpl1-6</i> kontrol-1	2.022	730.720
<i>cpl1-6sos3-1</i> kontrol-2	2.335	1884.560	<i>cpl1-6</i> kontrol-2	2.210	385.400
<i>cpl1-6sos3-1</i> tuz-1	2.285	1615.920	<i>cpl1-6</i> tuz-1	1.969	538.480
<i>cpl1-6sos3-1</i> tuz-2	1.970	677.880	<i>cpl1-6</i> tuz-2	2.194	366.960

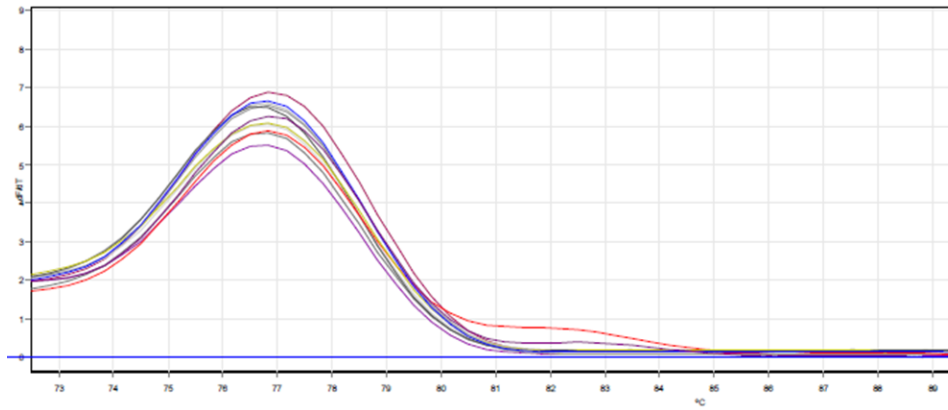
Ek-4. qPCR'da Kullanılan Primlerin Erime Sıcaklık Bilgileri



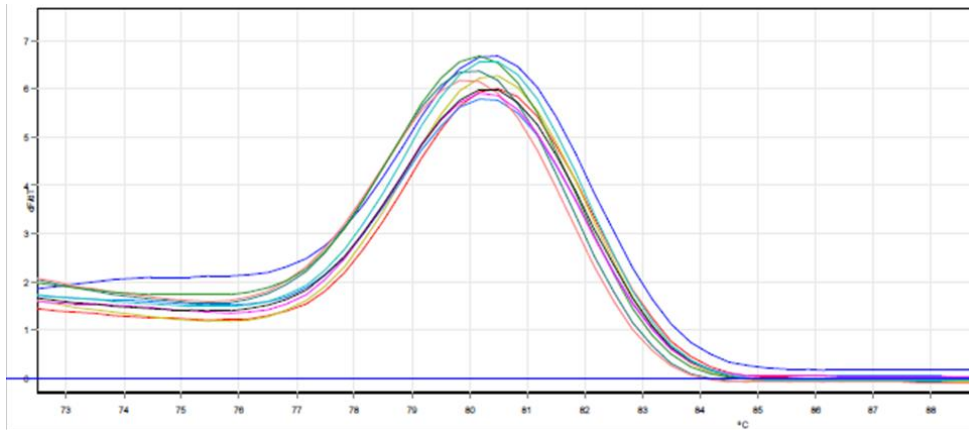
ACT2



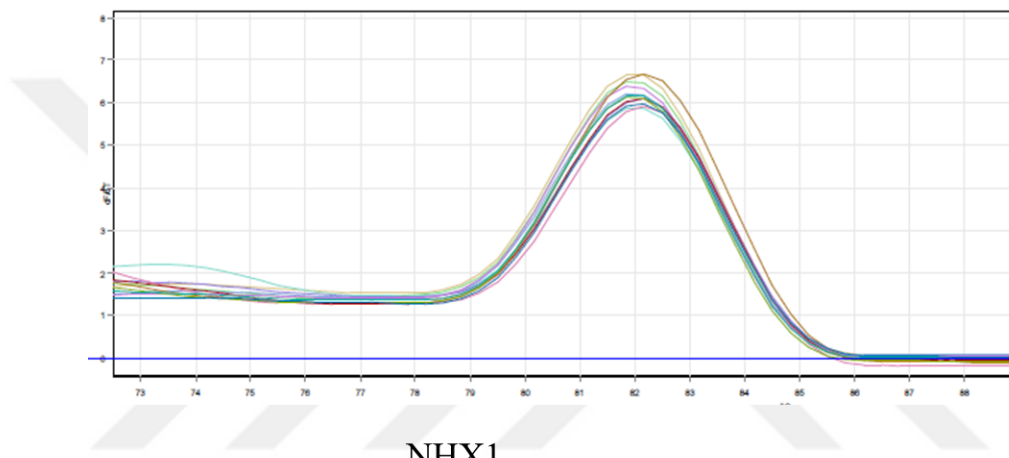
SOS1



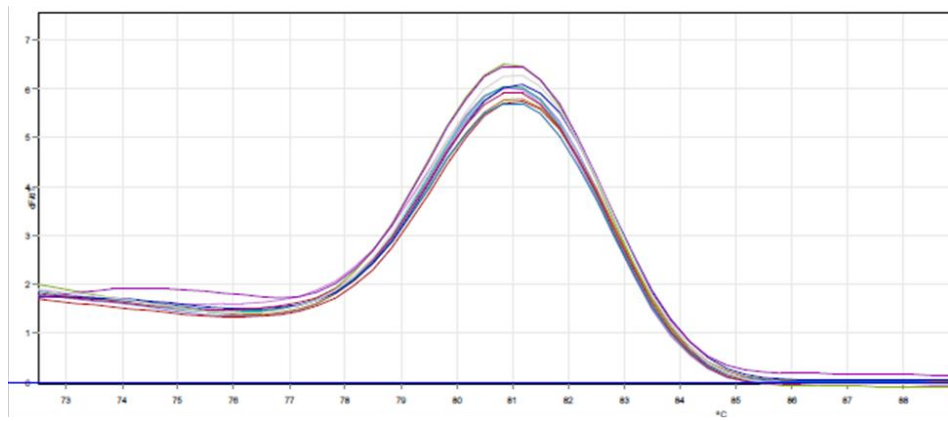
HKT1



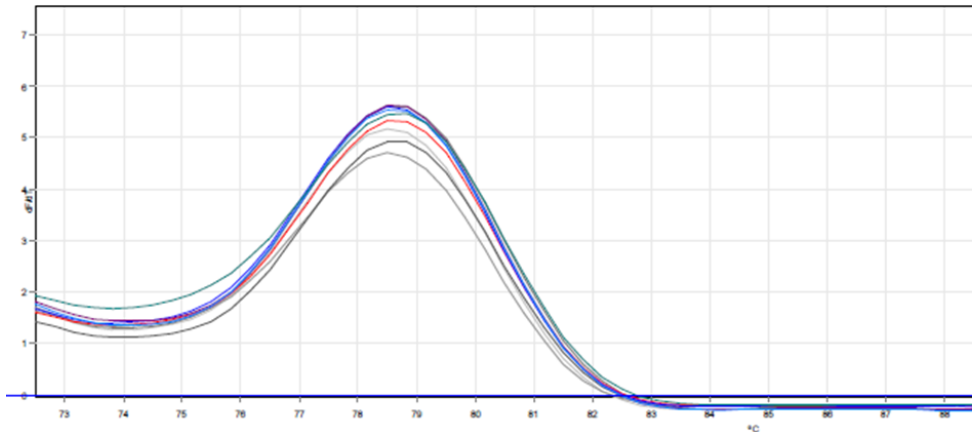
SOS3



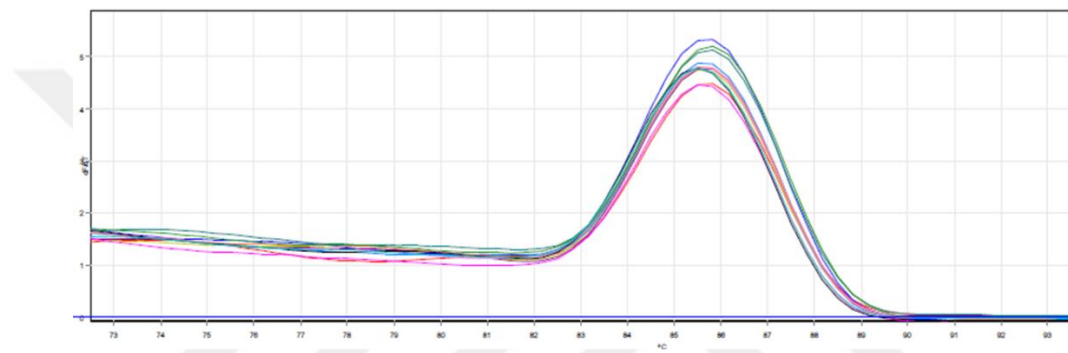
NHX1



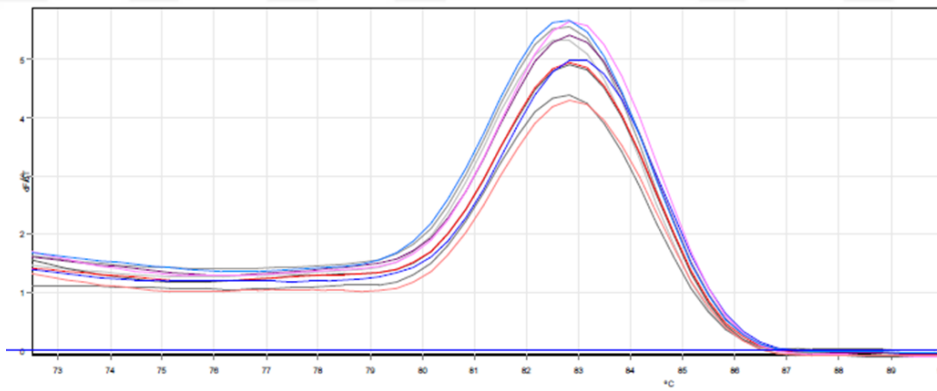
RD29A



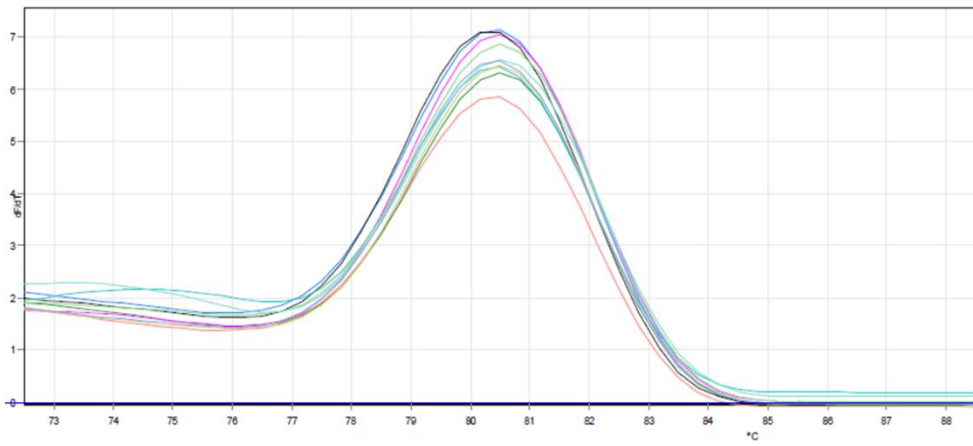
RD29B



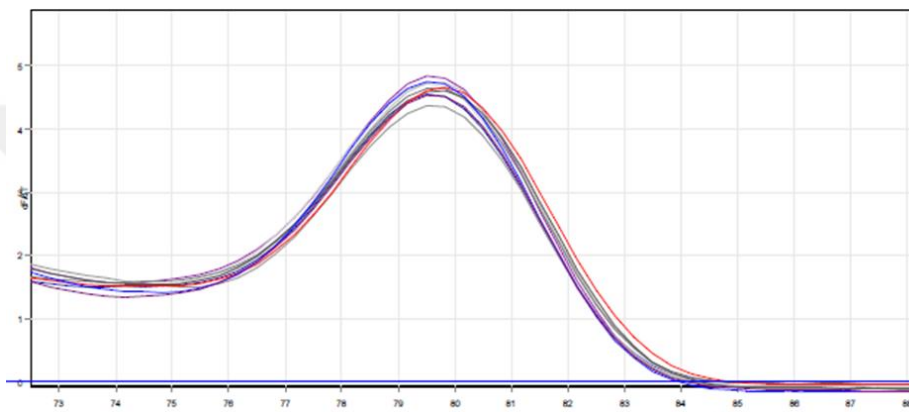
COR15A



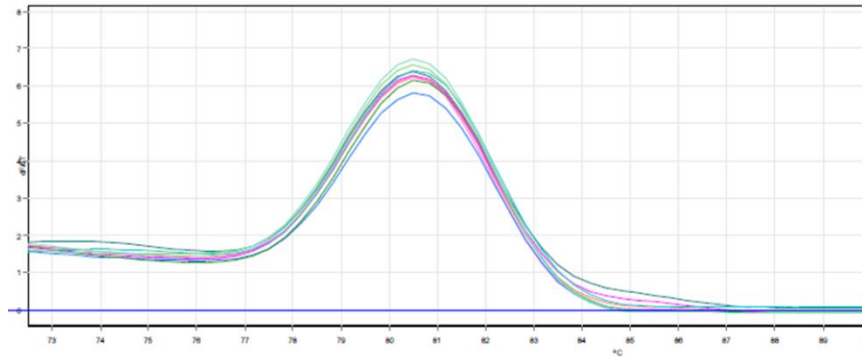
ABI1



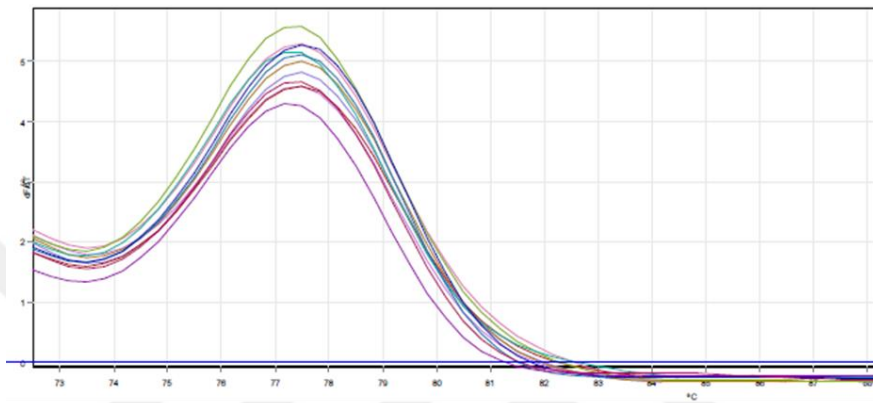
CPL1



DREB2A



DREB2B



AREB1

ÖZ GEÇMİŞ

Buasimuhan ABUDUREYIMU 15.11.1990 tarihinde Çin'in Hoten şehrinde dünyaya geldi. İlkokul ve ortaokul eğitimini Qira 1. ilkokulunda ve Qira 2. ortaokulunda, lise eğitimini Dalian 20. lisesinde tamamladı. Lisenin ardından 2010 yılında Tianjin Ticaret Üniversitesi Biyoteknoloji ve Gıda Mühendisliği Fakültesi Gıda Kalitesi ve Güvenliği Bölümünü kazandı ve 2014 yılında bu bölümden mezun oldu. 2015 ve 2016 yıllarında Türkçe eğitimini tamamladıktan sonra, 2016 Ağustos ayında Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Tarım Bilimleri ve Teknolojileri Fakültesi Tarımsal Genetik Mühendisliği Bölümü'nde yüksek lisans eğitimine başladı. Uygurca, Türkçe, Çince ve İngilizce bilmektedir.

TEZ ÇALIŞMASINDAN ÜRETİLEN ESERLER

Bu tez çalışmasından 2 (iki) adet ulusal ve 3 (üç) adet uluslararası bildiri üretilmiştir. Ayrıca, bir adet araştırma makalesi de hakem incelemesindedir. Bu üretilen çalışmalar aşağıda sunulmuştur.

Abudureyimu, B. ve E. Aksoy, “Bir RNA Metabolizma Regülatörü Olan CPL1’in Tuz Stresindeki Görevi” *VI. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi*, 05-07 Ekim, Adana, Türkiye (Poster sunum), 2017.

Abudureyimu, B. ve E. Aksoy, “*Bitkilerde Tuz Stresinin Moleküler Kontrol Mekanizması*” VI. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi, 05-07 Ekim, Adana, Türkiye (Poster sunum), 2017.

Abudureyimu, B. ve E. Aksoy, “CPL1 SOS Yolağı ile Genetik Etkileşime Girerek Tuz Toleransını Kontrol Eder” *8. Uluslararası Katılımlı Tarım Öğrenci Kongresi*, 27-29 Nisan, Niğde, Türkiye (Poster sunum), 2018.

Abudureyimu, B. ve E. Aksoy, “CPL1, Bitki Tuz Toleransının Önemli Bir Regülatörüdür” *8. Uluslararası Katılımlı Tarım Öğrenci Kongresi*, 27-29 Nisan, Niğde, Türkiye (Poster sunum), 2018.

Abudureyimu, B. ve E. Aksoy, “RNA Metabolizma Regülatörü CPL1’in Bitki Tuz Stresindeki Rolünün İncelenmesi” *Uluslararası Türk Dünyası Fen ve Mühendislik Kongresi*, 17-18 Haziran, Niğde, Türkiye (Sözlü sunum), 2019.

Abudureyimu, B. ve E. Aksoy, “SOS Yolağından Sorumlu Arabidopsis Mutantlarının Tuz Stresi Altındaki Hassasiyetlerinin Karşılaştırılması” (Hakem incelemesinde), 2019.

