TÜBİTAK

Osmotik Stres Koşullarında Dıştan Uygulanan Osmolitlerin Hücresel Poliamin, Prolin, Sakkaroz ve Absisik Asit Metabolizması İle İlgili Gen İfadeleri Üzerine Etkisi

Program Kodu: 1002

Proje No: 116Z807

Proje Yürütücüsü:

Prof.Dr. Asim KADIOĞLU

Araştırmacılar:

Doç. Dr. Aykut SAĞLAM

Dr. Öğr. Üyesi Mehmet DEMİRALAY

Danışman(lar):

Bursiyer(ler):

Kamil ÖZTÜRK

Nurtaç TAŞÇI

TEMMUZ 2018

TRABZON

ÖNSÖZ

Osmotik stres kuraklık, tuzluluk ve donma gibi bir çoklu stres etkeni sonucunda ortaya çıkan oldukça yaygın bir stres çeşididir. Kuraklık, tuzluluk gibi sıkça rastlanılan çevresel etkenler, bitkinin su durumunu olumsuz yönde değiştirir ve bunun sonucunda bitki hayatta kalmak için bir çok biyokimyasal ve moleküler korunma mekanizmalarını devreye sokar. Osmolit üretimi bu savunma ve kaçınma mekanizmalarından birisidir. Osmolitler biriktirildikleri bitki hücresinde su potansiyelini düşürür ve böylece osmotik dengenin korunmasına ve ayarlanmasına yardımcı olurlar. Mevcut çalışmanın konusu olan prolin, sakkaroz ve poliaminler bu önemli osmolitlere örnek verilebilir. Absisik asit, normal büyüme ve gelişme fonksiyonlarına ek olarak bitkilerde stres sürecinde de önemli roller üstlenen bitkisel bir hormondur. Absisik asit seviyesi, stres anında artar ve osmolit seviyesinin artmasından, büyümemin durdurulmasına kadar birçok fizyolojik uyum süreci başlar.

Dışarıdan bitkiye çeşitli şekillerde uygulanan osmolitlerin stress dayanıklılığı arttırdığı yada stres kaynaklı hasarların giderilmesine yardımcı olduğu bir çok çalışmada gösterilmiştir. Buna karşın dışarıdan yapılan osmolit uygulamalarının ilişkili olduğu genetik ve moleküler mekanizmalar henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Söz konusu bu mekanizmaların daha iyi anlaşılmasına yardımcı olmak amacıyla mevcut proje çalışması tamamlanmıştır. Daha önce tamamlanan projemizden (111T511) elde ettiğimiz veriler, dışarıdan uygulanan prolin, poliamin ve sakkaroz gibi osmolitlerin içsel osmolit ve ABA sentezi uyararak yaprak kıvrılmasını azalttığı ve osmotk strese karşı tolerans kazanımına yardımcı olduklarını göstermiştir. Bununla birlikte osmolit seviyesinin ne şekilde arttırıldığına dair bir çalışma yapılmamıştır. Mevcut projemizin amacı bu etkileşimin nasıl gerçekleştiğini hakkında yeni veriler elde etmektir.

“Osmotik Stres Koşullarında Dıştan Uygulanan Osmolitlerin Hücresel Poliamin, Prolin, Sakkaroz ve Absisik Asit Metabolizması İle İlgili Gen İfadeleri Üzerine Etkisi” adlı ve 116Z807 kodlu bu projemiz, TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir. Projedeki denemeler ve analizler, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Bitki Fizyolojisi Laboratuvarı’nda gerçekleştirilmiştir.

Proje çalışanları adına projemizi destekleyen TÜBİTAK’a ve laboratuar olanaklarını kullandığımız Karadeniz Teknik Üniversitesi’ne teşekkürlerimi sunarım.

Prof. Dr. Asim KADIOĞLU

Proje Yürütücüsü

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ II
İÇİNDEKİLER III
TABLOLAR DİZİNİ V
ŞEKİLLER DİZİNİ VI
ÖZET VII
SUMMARY VIII
1. GİRİŞ 1
2. LİTERATÜR ÖZETİ 5
2.1. Bitkilerde Stres 5
2.1.1. Osmotik Stres 6
2.2. Osmolitler 7
2.2.1. Prolin 7
2.2.2. Sakkaroz 8
2.2.3. Poliaminler 10
2.3. Absisik Asit (ABA) 14
2.6. Mısır (*Zea mays* L.) Bitkisi 15
3. GEREÇ VE YÖNTEM 18
3.1. Bitkilerin Büyütülmesi 18
3.2. Polietilen Glikol, Osmolit ve Osmolit İnhibitörlerinin Uygulanması 18
3.3. Stres Parametrelerinin Belirlenmesi 19
3.3.1 Yaprak Su Potansiyeli 19
3.3.2. Yaprak Kıvrılması 19
3.4. Moleküler Analizler 19
3.4.1. Real Time Analizleri İçin Uygun Primerlerin Tasarlanması 20
3.4.2. Toplam RNA İzolasyonu ve cDNA Kütüphanesinin Oluşturulması 20

3.4.3. Gen İfadelerinin Real Time (RT) PCR Analizleri ile Belirlenmesi.....21

3.5. İstatistiksel Analizler.....22

4. BULGULAR.....23

4.1. Orta Dereceli Yaprak Kıvrılmasına (%30-50) Neden Olan Etkin PEG Konsantrasyonun Belirlenmesi 23

4.2. Etkin PEG (%10) Konsantrasyonuna Göre Yaprak Kıvırlması ve Su Potansiyeli Değerleri.....23

4.3. Dışarıdan Uygulanan Osmolitler ve İnhibitörlerin Gen İfadeleri Üzerine Etkileri…….....24

4.3.1. Prolin Metabolizmasında Görevli Gen İfadeleri Üzerine Uygulamaların Etkileri…….....24

4.3.2.Poliamin Metabolizmasında Görevli Gen İfadeleri Üzerine Uygulamaların Etkileri.....26

4.3.3. Sakkaroz Metabolizmasında Görevli Gen İfadeleri Üzerine Uygulamaların Etkileri.....29

4.3.4. Absisik Asit Metabolizmasında Görevli Gen İfadeleri Üzerine Uygulamaların Etkileri.....31

5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....33

6. KAYNAKLAR.....39

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1. Mısır bitkisinin bitki sistematiğindeki yeri. 16
Tablo 2. Uygulamalar ve ifade seviyeleri belirlenen genler. 19
Tablo 3. İfadeleri belirlenen genlere ait primerler. 20
Tablo 4. RT PCR protokolü. 21
Tablo 5. RT PCR reaksiyon ortamı. 22
Tablo 6. Çeşitli PEG konsantrasyonlarına göre yaprak kıvrılma derecesi ve su potansiyeli değerleri. 23
Tablo 7. Yaprak kıvrılma derecesi ve su potansiyelindeki değişimlerin belirlenmesi 24

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Bitkilerde stres çeşitleri (Schulze vd., 2005; Yılmaz vd., 2011).....5
Şekil 2. Prolinin strese karşı yanıt yolları (Szabados ve Savoure, 2010).....8
Şekil 3. Sakkarozun yapısı. 9
Şekil 4. Sakkaroz sentez yolu (Nelson ve Cox, 2004).....9
Şekil 5. Bitkilerde yaygın olarak bulunan poliaminler (Bitrian vd., 2012). 11
Şekil 6. Poliamin metabolizması. 13
Şekil 7. ABA bağımlı ve bağımsız stres sinyal yolları (Gujjar vd., 2014). 15
Şekil 8. Uygulamaların *P5CS* geninin ifade seviyesi üzerine etkisi 25
Şekil 9. Uygulamaların *P5CR* geninin ifade seviyesi üzerine etkisi 25
Şekil 10. Uygulamaların *ProDH* geninin ifade seviyesi üzerine etkisi.....26
Şekil 11. Uygulamaların *ADC* geninin ifade seviyesi üzerine etkisi 27
Şekil 12. Uygulamaların *SAMDC* geninin ifade seviyesi üzerine etkisi.....27
Şekil 13. Uygulamaların *DAO* geninin ifade seviyesi üzerine etkisi.....28
Şekil 14. Uygulamaların *PAO* geninin ifade seviyesi üzerine etkisi 29
Şekil 15. Uygulamaların *SPS* geninin ifade seviyesi üzerine etkisi 30
Şekil 16. Uygulamaların *SUCS* geninin ifade seviyesi üzerine etkisi.....30
Şekil 17. Uygulamaların *AAOX* geninin ifade seviyesi üzerine etkisi.....31
Şekil 18. Uygulamaların *NCED* geninin ifade seviyesi üzerine etkisi.....32

ÖZET

Bitkilerde osmotik stres nedeniyle meydana gelen ürün kayıplarını azaltmak için çeşitli uygulamaların yapıldığı bilinmektedir. Dışarıdan gerçekleştirilen osmolit uygulamaları bu çözümlerden birisidir. Bitkilere dıştan yapılan uygulamalardan en önemlileri prolin, glisin-betain, şeker ve poliamindir.

Mevcut projenin amacı, osmotik stres koşulları altında dıştan uygulanan osmolitler (prolin, sakkaroz ve spermidin) ile hücresel osmolitler (prolin, poliamin, şeker) ve ABA metabolizması arasındaki olası etkileşimin hangi genlerle ilişkili olduğu hakkında veriler elde etmektir. Bu amaca ulaşmak için dıştan uygulanan osmolitlerin ve bazı osmolit inhibitörlerinin, prolin, sakkaroz, poliamin ve ABA ile ilgili gen ifadeleri üzerine etkisinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

Denemelerde 4 haftalık mısır bitkileri kullanılmıştır. Daha sonra poliamin inhibitörleri (α-difluorometil arginin (DFMA) ile α -difluorometil ornitin (DFMO), sakkaroz inhibitörü imidodifosfat ve prolin inhibitörü cordycepin uygulanmıştır. Bu uygulamalardan sonra bitkiler polietilen glikol (PEG) ortamında osmotik strese maruz bırakılmıştır. Uygulamalar sonucunda bitki yapraklarında stres parametreleri olarak su potansiyeli, yaprak kıvrılması ölçülmüş ve toplam RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Poliamin metabolik enzimleri ile ilgili arginin dekarboksilaz (ADC), S-adenozil metionin dekarboksilaz (SAMDC), diamin oksidaz (DAO) ve poliamin oksidaz (PAO) genleri ile prolin metabolizmasında rol alan Δ1 -pirolin-5-karboksilat sentaz (P5CS), Δ1-pirolin-5-karboksilat-redüktaz (P5CR) ve prolin dehidrogenaz (ProDH) ve şeker sentezinde görev alan sakkaroz fosfat sentaz (SPS) ve sakkaroz sentaz (SUCS), ABA sentezinde rol oynayan 9-cis-epoksikarotenoid dioksigenaz (NCED), ABA aldehid oksidaz (AAOX) genlerinin ifadesindeki değişimler real time PCR ile belirlenmiştir.

Proje bulguları %30-50 yaprak kıvrımına neden olan etkili ozmotik stres değerinin %10 PEG olduğunu göstermiştir. Sakkaroz, prolinin içsel dengesini sağlamak için yıkımını azaltırken, putresin sentezini teşvik etmektedir. Prolin, spermidinin sentezini teşvik edici bir rol üstlenmektedir. Spermidin ise sakkaroz sentezini uyarmaktadırlar. Bu üç osmolitin de ABA sentezini uyardığı tespit edilmiştir. Sakkaroz, prolin ve spermidinin herbirinin bir diğerinin metabolik yolu üzerinde pozitif veya negatif düzenlemeler yaptığı belirlenmiştir. Kuraklık şartları altında bitki içsel dengesini korumak için bu söz konusu moleküllerin bir sinyal gibi davranarak biribirinin içsel miktarlarının ayarlanmasında fonksiyon gördüğü kanaatine varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Osmolit, osmotik stres, Poliamin, Sakkaroz, Prolin, ABA, Osmolit metabolizma genleri, ABA sentez genleri.

SUMMARY

It is known that various applications have been made to reduce yield losses caused by osmotic stress in plants. Exogenous osmolyte application is one of these applications. Most important exogenous applications to the plants are proline, glycine-betaine, sucrose and polyamine.

Aim of the project is to gather information about the relationship between exogenously applied osmolytes and cellular osmolytes and ABA metabolism and to learn the relations is related which genes of osmolyte metabolism. For this reason, we aimed to detect the effects of exogenously-treated osmolytes and osmolyte synthesis inhibitors on the expressions of genes in the metabolism of proline, sucrose, polyamine and ABA.

Four-week old maize seedlings were used for the experiments. Inhibitors of polyamine synthesis (α-difluoromethyl arginine (DFMA) and α -difluoromethyl ornithine (DFMO)), sucrose inhibitor (imidodiphospate) and proline inhibitor (cordycepin) were applied to the seedlings. After these treatments, seedlings have been subjected to polyethylene glycol (PEG) to induce osmotic stress. After the applications, water potential and leaf rolling were measured as stress parameters in plant leaves and total RNA isolation was performed. Expression levels of genes related with polyamine metabolism (arginine decarboxylase (ADC), S-adenosyl methionine decarboxylase (SAMDC), diamine oxidase (DAO) and polyamine oxidase (PAO)), proline metabolism (Δ1 -pyrroline-5-carboxylate synthase (P5CS), Δ1-pyrroline-5-carboxylate-reductase (P5CR) and proline dehydrogenase (ProDH)), sucrose synthesis (sucrose phosphate synthase (SPS) and sucrose synthase (SUCS), and ABA synthesis (9-cis-epoxyicarotenoid dioxygenase (NCED), ABA aldehide oxidase (AAOX)) were been measured by real time PCR.

The project findings showed that effective osmotic stress value, which causes 30-50% leaf fold, was 10% PEG. Sucrose promoted the synthesis of putrescine while reducing destruction to provide an internal balance of proline. Prolin promoted the synthesis of spermidine. Spermidine stimulated the synthesis of sucrose. It has been determined that these three osmolytes also stimulate ABA synthesis. It has been determined that each of the sucrose, proline, and spermidine made positive or negative regimens on the metabolic pathway of another. Under drought conditions, in order to preserve the plant's internal equilibrium, it has come to the conclusion that these molecules functioned as a signal to adjust the internal quantities of one another.

Key Words: Osmolyte, Osmotic stress, Polyamine, Sucrose, Proline, ABA, Osmolyte metabolism genes, ABA synthesis genes.

1. GİRİŞ

Gelişmekte olan birçok ülke için tarımsal büyüme; ekonomik büyümenin lokomotifi durumundadır. Dahası, tarımsal büyüme; dünyayı saran ekonomik krizlere karşı diğer sektörlere göre daha güvenli bir liman durumundadır. Dünya nüfus artışına yönelik tahminler geçerli olursa; 2050 yılında kentsel dünya nüfusu 2 milyar kadar artacaktır (Conforti, 2011). Buna karşın; kırsal bölge nüfusu 2050 yılında çok fazla değişmeyecektir (FAO, 2013). Toplam nüfusun 2050 yılında 9 milyar olacağı öngörülmektedir. Bu ise büyüme eğrisi fazlaca değişmeyen tarımsal sektörün (kırsal bölge), şimdiye kıyasla gelecekte daha fazla insanı beslemek zorunda olacağı anlamına gelmektedir. Bu nedenle tarımsal olarak yenilikçi ve doğru sulama yöntemlerinin geliştirilmesi, aynı zamanda kuraklık gibi büyümeyi ve ürün verimini azaltan faktörlere karşı dayanıklı ürünlerin yetiştirilmesi gerekmektedir. FAO; kuraklık stresini, besin eksikliğinin en önemli nedeni olarak görmekte ve kuraklığa bağlı ürün kayıplarının gelişmekte olan ülkelerde büyük problemlere neden olan yanlış ekonomik politikalar, sel baskınları gibi sorunlardan daha ağır bastığını belirtmektedir. Kuraklığa karşı en önemli çözüm olarak düşünülen sulama yönetimi, birçok üretici için bir seçenek olmaktan uzaktır ve gelişmekte olan ülkelerde sulama imkânlarını arttırmak sınırlıdır (World Bank, 2005). Daha önemlisi, iklimde meydana gelen uzun vadeli değişimlerin öngörülemez ve yıkıcı hava hareketlerine yol açmasıdır. Örneğin Dünya ısısında 1,4-5,8 °C'lik artışların meydana gelmesi beklenmekte ve bu artışın dünyanın şimdiye kadar hiç kuraklık yaşamamış bölgelerinde bile kuraklık stresine yol açacağı tahmin edilmektedir (IPCC, 2001).

Kuraklık stresini de içine alan abiyotik stresler dünya genelinde bitkisel verim kaynaklı ekonomik kayıpların en önemlisidir ve yaklaşık normal bitkisel veriminde yaklaşık %50 oranında ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Rout ve Das, 2013). Bitkiler kuraklık ve tuzluluk gibi çeşitli stres etkenlerine maruz kaldıkları zaman bitkide osmotik stres meydana gelir (Hoffmann, 2002). Genel olarak, osmotik stres büyümeyi, gelişmeyi ve üremeyi olumsuz olarak etkileyen bir dizi morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler değişimlere sebep olur ve bunun sonucunda bitkisel verim önemli oranda azalır. Mevcut çalışmada kuraklık stresini iyi bir şekilde uyaran osmotik stres uygulaması yapılmıştır. Bu amaçla PEG 6000 maddesi kullanılmıştır.

Bitkiler abiyotik stres koşullarına (kuraklık, tuzluluk, donma gibi) maruz kaldıklarında osmolit adı verilen osmotik potansiyeli ayarlamaya yardımcı olan bileşikler biriktirirler. Bu osmolitlerden prolinin abiyotik streslerin olumsuz etkilerine karşı bitkilerde osmotik ayarlamaya katkıda bulunduğu, membranların, proteinlerin ve enzimlerin kararlılığını sağladığı ve serbest radikalleri temizlediği kaydedilmiştir (Kadioglu ve Terzi, 2007; Türkan ve Demiral, 2009). Diğer

çalışmalarda ise birçok bitki çeşidinde strese toleranslı bitkilerde hassas olanlara göre prolin miktarının daha fazla bulunduğu kaydedilmiştir (Ashraf ve Foolad, 2007). Ayrıca prolinin kuraklıkta lipid peroksidasyonunu azalttığı da bilinmektedir (Molinari vd., 2007).

Diğer bir osmolit olan poliaminler (PA) bütün bitki hücrelerinde bulunur ve biyotik ve abiyotik stres koşullarında savunmada rol oynadıkları kadar büyüme ve gelişme olaylarına da katılırlar (Alcazar vd., 2010a; Minocha vd., 2010). Bitkilerde poliaminlerin osmotik (Legocka ve Kluk, 2005), tuzluluk (Jimenez-Bremont vd., 2007), ağır metal (Groppa vd., 2001) ve UV radyasyonu (Lutz vd., 2005) gibi abiyotik streslerde etkili oldukları kaydedilmiştir. Poliamin biyosentezinin ana enzimi olan arginin dekarboksilaz aktivitesinin stres koşullarında uyarıldığı ve böylece PA içeriğinin de arttığı rapor edilmiştir. Ayrıca, bitkilerin stresi kontrol etme kabiliyetinin PA sentezleyebilme potansiyeli ile ilişkili olduğu da ileri sürülmüştür (Gupta vd., 2013). Yine, dıştan uygulanan PA'ların çeşitli abiyotik stres koşullarındaki kültür bitkilerinin toleransını artırdığı ve böylece verimi iyileştirdiği bilinmektedir (Zhao ve Yang, 2008; Yang vd., 2011). Yüksek bitkilerdeki yaygın poliaminler bir diamin olan putresin (Put), triamin spermidin (Spd) ve tetramin spermin (Spm)'dir. Bitkilerde PA sentezinin anahtar enzimleri arginin dekarboksilaz (ADC), ornitin dekarboksilaz (ODC) ve S-adenozil metionin dekarboksilaz (SAMDC)'dır (Kusano vd., 2008; Tavladoraki vd., 2012).

Hücrede yaygın olarak bulunan osmolitlerden glukoz, fruktoz ve sakkaroz gibi çözünebilir şekerler bitki yapı ve metabolizmasında önemli fonksiyonlara sahiptirler. Ayrıca bitkilerde şeker birikiminin içsel osmotik potansiyelin düzenlenmesi ile biyomolekül ve membranların korunmasına katkıda bulunduğu bilinmektedir (Seki vd., 2007). Şekerler çok çeşitli stres cevapları ile ilişkili olup, metabolit ve sinyal molekül olarak rol oynarlar. Böylece gen ifadesinde de modifikasyonuna neden olurlar. Çözünebilir şekerlerin reaktif oksijen türlerini (ROS) üreten metabolik yollara karıştığı veya bu yollarla birleştiği bilinmektedir. Patojen saldırısı, kuraklık, tuz stresi gibi stresler ve düşük sıcaklık gibi farklı stresler ve ABA muamelesi direkt veya dolaylı olarak ROS üretimine neden olurlar. Böylece adaptif stres cevabı olarak kabul edilen şeker birikimi meydana gelir (Roitsch, 1999). Çözünebilir şekerlerden biri olan sakkarozun sentezi, sakkaroz fosfat sentaz ve sakkaroz sentaz olmak üzere iki enzim tarafından katalizlenir (Huber ve Huber, 1996).

Absisik asit (ABA) çiçekli bitkilerde su eksikliğine (kuraklığa) cevap olarak üretilir. Kuraklığa ve diğer çevresel streslere toleransla ilgili cevapların başlamasında önemli bir rol oynar. Bitkilerde kuraklık stresi sırasında ABA konsantrasyonunun artması, büyüme, gelişim (Hartung ve Davies, 1991; Bray, 1993; Reddy vd., 2004) ve bazı genlerin ifade edilmesini de kapsayan çok sayıda değişimler meydana getirir (Zeevaart ve Creelman, 1988; Bray, 1993). En iyi çalışılmış

ABA sinyal iletim yollarından biri, ABA'ya cevap olarak stomaların kapanmasıdır (Allen vd., 2001). ABA'nın strese karşı stoma kapanması, osmolit birikimi, büyümenin inhibisyonu ve metabolizmanın değiştirilmesi gibi fizyolojik adaptasyonlarının yanı sıra, moleküler düzeyde gen ekspresyonunda birçok değişiklikler yaptığı ve geç embriyogenez bolluk proteinleri (LEA), sıcaklık şok proteinleri (HSP) koruyucu proteinlerin ve reaktif oksijen temizleyicilerin sentezini artırdığı bildirilmiştir (Huang ve Wu, 2006; Sripinyowanich vd., 2013).

Yukarıda verilen bilgilerden anlaşıldığı üzere osmolitlerin ve ABA'nın abiyotik strese karşı bitkileri korumada önemli rol oynadıkları bilinmektedir. Ancak dıştan uygulanan osmolitlerin hücresel osmolitler ve ABA ile ilişkileri konusundaki çalışmalar nispeten sınırlıdır. Literatürdeki bu konuda yapılan çalışmalar incelendiğinde; bezelye bitkisinde tuz stresi koşullarında dıştan prolin uygulamasının yapraklardaki poliamin (Spm, Spd ve Put) sentezini arttırdığı bulunmuştur. Bu artışın dıştan uygulanan proline cevap olarak ADC ve SAMDC gibi poliamin sentez enzimlerinin aktivitelerinin uyarılmasıyla sağlandığı kaydedilmiştir (Shahid vd., 2014). Kuraklık koşullarında dıştan uygulanan spermidininin üçgül bitkisinde çözünebilir ve indirgen şeker miktarı ile P5CS ve ProDH enzim aktivitelerini arttırdığı (Li vd., 2014), kabak fidelerinde kuraklık ve domates fidelerinde tuz-alkali stres koşullarında prolin birikime neden olduğu bulunmuştur (Kubis vd., 2014; Zhang vd., 2014). Ayrıca tuz-alkali stres koşullarında domates fidelerine dıştan uygulanan spermidinin çözünebilir şeker miktarını azalttığı, bu azalışın muhtemelen polisakkarit hidroliz enzimlerini inhibe ederek veya polisakkaritlere çözünebilir şekerlerin bağlanmasını sağlayarak yerine getirdikleri ileri sürülmüştür (Alcazar vd., 2010b, Zhang vd., 2014). Diğer taraftan tuz stresi koşullarında dıştan farklı bitkilere uygulanan spermidinin indirgen şeker miktarını artırdığı rapor edilmiştir (Duan vd., 2008; Roychoudhury vd., 2011). Bunlara ilave olarak dıştan uygulanan ABA'nın içsel osmolitler üzerindeki etkileri konusunda yapılan çalışmalar literatürde yaygın olmakla birlikte (Stewart ve Voetberg, 1985; Xin ve Li, 1993), dıştan uygulanan osmolitler (prolin, sakkaroz ve spermidin gibi) ile ABA metabolizması arasındaki olası etkileşim hakkında yapılan bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu literatür bilgilerinden; çeşitli streslere maruz bırakılan bitkilere dıştan uygulanan osmolit etkilerinin özellikle son yıllarda çalışıldığı, birbirlerini desteklemeyen farklı verilerin elde edildiği, içsel osmolit artış ve azalışlarının hangi enzimlerle ilgili olduğunun fazlaca bilinmediği, dışarıdan uygulanan üç osmolitin (poliamin, sakkaroz ve prolin) hücresel osmolit seviyeleri üzerindeki etkileri ve ABA ile ilişkileri konusunda değişimlerinin aynı anda değerlendirildiği çalışmaların yeterli olmadığı ve dıştan uygulanan osmolitler ile hücresel osmolit ve ABA metabolizması arasındaki ilişkisinin gen seviyesinde çalışılması ile ilgili çalışmalara literatürde rastlanılmadığı anlaşılmaktadır. Mevcut projemiz kapsamında düşünülen çalışmaya en yakın araştırma sonucu, TÜBİTAK 111T511 nolu proje raporu olup, bu raporda kuraklık stresi

koşullarında prolin ve sakkaroz uygulamalarında içsel prolin, şeker, spermin, spermidin, putrescin ve ABA seviyelerinin arttığı, spermidin uygulamasında ise prolin miktarının azaldığı, diğer osmolitlerin seviyelerinin arttığı bulunmuştur. Ayrıca DTT (sakkaroz inhibitörü) ve Diflurometil arginin (DFMA) +Difloromethil ornitin (DFMO) (poliamin sentez yolu inhibitörleri) uygulanan bitkilerde ise prolin, şeker, spermin, spermidin, putrescin ve ABA seviyelerinin azaldığı saptanmıştır. Ancak söz konusu raporda belirtilen artış ve azalışların hangi metabolik yollarla gerçekleştiği konusunda herhangi bir çalışma ve yorum bulunmamaktadır.

Bu nedenle mevcut projede osmotik stres altındaki mısır bitkilerinde dıştan uygulanan osmolitlerin ve sakkaroz, prolin ve poliamin inhibitörlerinin içsel prolin, poliamin, şeker ve ABA miktarlarını azaltma veya arttırmadaki etkisinin hangi yolla gerçekleştiğini ortaya koymak için prolin sentez genleri Δ1 -pirolin-5-karboksilat sentaz (P5CS), Δ1-pirolin-5-karboksilat-redüktaz (P5CR) ve prolin yıkım geni prolin dehidrogenaz (ProDH), poliamin sentez genleri arginin dekarboksilaz (ADC), S-adenozilmetiyonin dekarboksilaz (SAMDC), poliamin yıkım genleri diamin oksidaz (DAO), poliamin oksidaz (PAO), sakkaroz sentez enzimleri olan sakkaroz sentaz (SPS) ve sakkaroz fosfat sentaz (SUCS) ile ABA sentez enzimleri olan 9-cis-epoksikarotenoid dioksigenaz (NCED) ve ABA aldehid oksidaz (AAOX) genlerinin ifade seviyeleri belirlenmiştir.

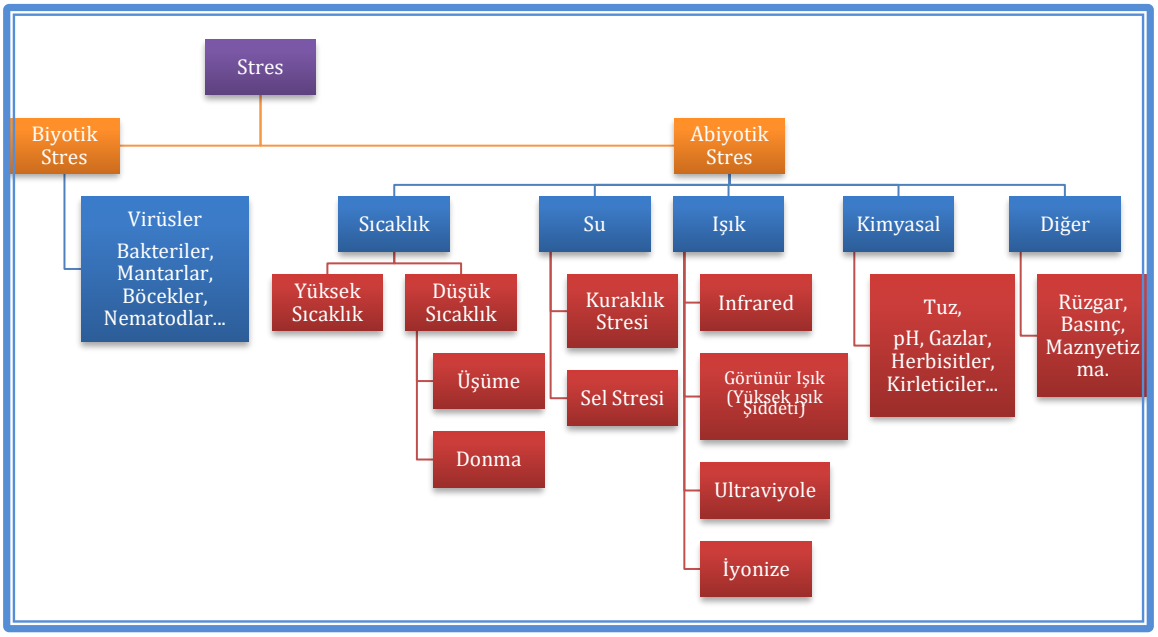
Mevcut projede, osmotik stres koşullarında dıştan uygulanan osmolitler (prolin, sakkaroz ve spermidin) ile hücresel osmolitler ve ABA metabolizması arasındaki olası etkileşimin hangi genlerle ilişkili olduğu hakkında veriler elde edilmiştir. Proje sonucunda elde edilen bulgular, dıştan uygulanan osmolitlerin etki mekanizması hakkında önemli veriler sağlamaka ve hafif osmotik stres koşullarında yaprak kıvrılmasının neden olduğu ürün kayıplarının azaltılmasına katkıda bulunacak uygulamalara temel bilgi oluşturacak niteliktedir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Bitkilerde Stres

Canlılarda normal sistemin fonksiyonlarını inhibe etme eğiliminde olan ters etkiler ya da kuvvetler stres olarak tanımlanır (Kadıoğlu, 2011). Stres terimi aynı zamanda hasar meydana getirme potansiyelini de kapsar. Stres hücresel yapıları bozabilir ve bitki için hayati değeri olan anahtar fizyolojik fonksiyonlara zarar verebilir (Krasensky ve Jonak, 2012). Kuraklık, tuzluluk, düşük sıcaklık gibi çevresel etkiler; bitkilerde osmotik stresi tetikler ve bu durum turgor kaybına neden olur. Ayrıca strese maruz kalan bitkide; hücre zarının yapısal bütünlüğü bozulabilir, proteinlerde aktivite kaybı meydana gelir (ya da tamamen denatüre olabilir) ve ek olarak oksidatif hasara neden olan reaktif oksijen türleri aşırı derecede üretilir. Bunun sonucunda fotosentez inhibisyonu, metabolik bozukluklar, büyüme bozuklukları, üremede azalma ve erken senesens meydana gelir (Krasensky ve Jonak, 2012).

Bitkilerin maruz kaldığı başlıca stres faktörleri, biyotik ve abiyotik olmak üzere iki kısma ayrılabilir (Hale ve Orcutt, 1987; Schulze vd., 2005). Bitkilerin maruz kaldığı başlıca abiyotik stres faktörleri: düşük ve yüksek sıcaklık, kuraklık, tuzluluk, su fazlalığı, radyasyon, çeşitli kimyasallar, oksidatif stres, rüzgar ve besin yetersizliğinden; biyotik stres faktörleri ise: virüs, bakteri ve fungusları içeren patojenler, böcekler ve herbivorlardan oluşur (Schulze vd., 2005; Yılmaz vd., 2011) (Şekil 1). Bütün bu faktörler; bitkinin gelişimini, hayatta kalmasını, biyokütle üretimini ve ürün verimini olumsuz yönde etkilerler (Agarwal vd., 2006).



Şekil 1. Bitkilerde stres çeşitleri (Schulze vd., 2005; Yılmaz vd., 2011).

Bitkilerin ideal yaşam çevreleri oldukça değişkenlik göstermektedir ve bir bitki türü için zararlı olabilecek çevresel şartlar başka bir tür için stres etkisi oluşturmayabilir (Krasensky ve Jonak, 2012). Bu durum aynı zamanda strese karşı verilen yanıt mekanizmalarına da yansır. Strese karşı verilen yanıt; sakınma ve tolerans olmak üzere ikiye ayrılır (Levitt, 1980). Sakınma, bitkiye dıştan etki eden olumsuz bir faktörün etkisini stres oluşturmadan önleme yeteneğidir (Street ve Öpik, 1984). Çoğu bitkide çeşitli kuraklık sakınma mekanizmaları gelişmiştir. Örneğin, kserofit bitkilerde su kaybını azaltan yaprak kıvrılması, yüzey tüyleri, alt durumlu stoma ve benzer mekanizmalar bulunur. Eğer bir bitki stres sonucu oluşan hasarları azaltabilme veya tamamen engelleme özelliğinde ise bu durum tolerans olarak adlandırılır. Diğer bir deyişle tolerans; bitkinin çevresel strese etkenlerine karşı dayanabilme yeteneğidir (Street ve Öpik, 1984). Örneğin kuraklık toleransına sahip bitkiler protoplazma su kaybettiği zaman protoplazması yeniden su alana kadar yaşamsal faaliyetlerine devam edebilirler (Hopkins, 1995).

Stres altındaki bitkiler üzerinde çalışma yapılmasının iki önemli nedeni vardır. Birincisi bitkilerin strese karşı reaksiyon mekanizmasının öğrenilmesidir. İkincisi ise tarımsal alanlarda stres altında bulunan bitkilerin söz konusu streslere dayanma yeteneklerinin ölçülmesi ve dolayısıyla daha verimli ürün elde edilmesidir. Bilindiği gibi dünya topraklarının yaklaşık %12'si tarıma elverişlidir. Bu nedenle aşırı olumsuz şartlardan kaynaklanan streslere dayanabilen ya da bu stresleri tolere edebilen bitkiler yetiştirmeye ihtiyaç vardır. Daha dayanıklı ve toleranslı bitkiler yetiştirmek için strese dayanıklılık ve tolerans mekanizmalarının bilinmesi gerekir (Bidwell, 1974). Dahası günümüzdeki moleküler biyoloji ve genetik çalışmaların strese tolerans konusunda aldığı mesafe göz önüne alınırsa; stres teşvikli genetik mekanizmaların anlaşılması hem bilimsel hem de insani (besin yetersizliğinden kaynaklanan hastalıklar, savaşlar ve diğer problemler) açılardan önemlidir.

2.1.1. Osmotik Stres

Osmotik stres kuraklık, tuzluluk ve düşük sıcaklık stresi gibi çevresel koşulların neden olduğu en önemli abiyotik streslerden biridir. Genel olarak osmotik stres bitkilerin büyümesi, gelişimi ve verimini değiştiren morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler değişimlere neden olur ve bitkilerinin büyüme ve verimini sınırlandırır. Kuraklık, tuzluluk ve düşük sıcaklık gibi etkenlerin uyardığı oksidatif stres genellikle birbiriyle bağlantılıdır ve bu koşullar tek başına veya kombine olarak çeşitli hücresel hasarlara neden olurlar. Bitkilerde osmotik stresi tetikleyen bu tip stresler karmaşık bir yapıdadır. Osmotik stresin en önemli cevaplarından biri ABA birikimidir. ABA osmotik stres cevaplarını uyarır. Osmotik stres sinyalleri ABA bağımlı ve ABA bağımsız yolla gerçekleşir (Upadhyaya vd., 2013).

Osmotik stres ayrıca oksidatif hasara da neden olur ve bitki hücrelerinde reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşmasını başlatır. Bununla beraber, bitkiler antioksidan enzimlerin aktivasyonu ve çözünebilir bileşiklerin birikimi gibi ROS birikimini etkili bir şekilde temizleyerek oksidatif hasarı azaltan mekanizmalara sahiptirler. Eğer ROS üretimi bitkinin temizleyebileceği seviyeyi aşarsa, istenmeyen reaksiyonlar sonucunda tipik belirti olarak osmotik duyarlılık kaybı, solma ve nekroz meydana gelir. Bu nedenle ROS üretimi ve temizlenmesi arasındaki denge, bitklerin normal büyüme ve metabolizmasının sürmesi ve bitkilerde osmotik stres toleransının gerçekleşmesi için gereklidir (Upadhyaya vd., 2013).

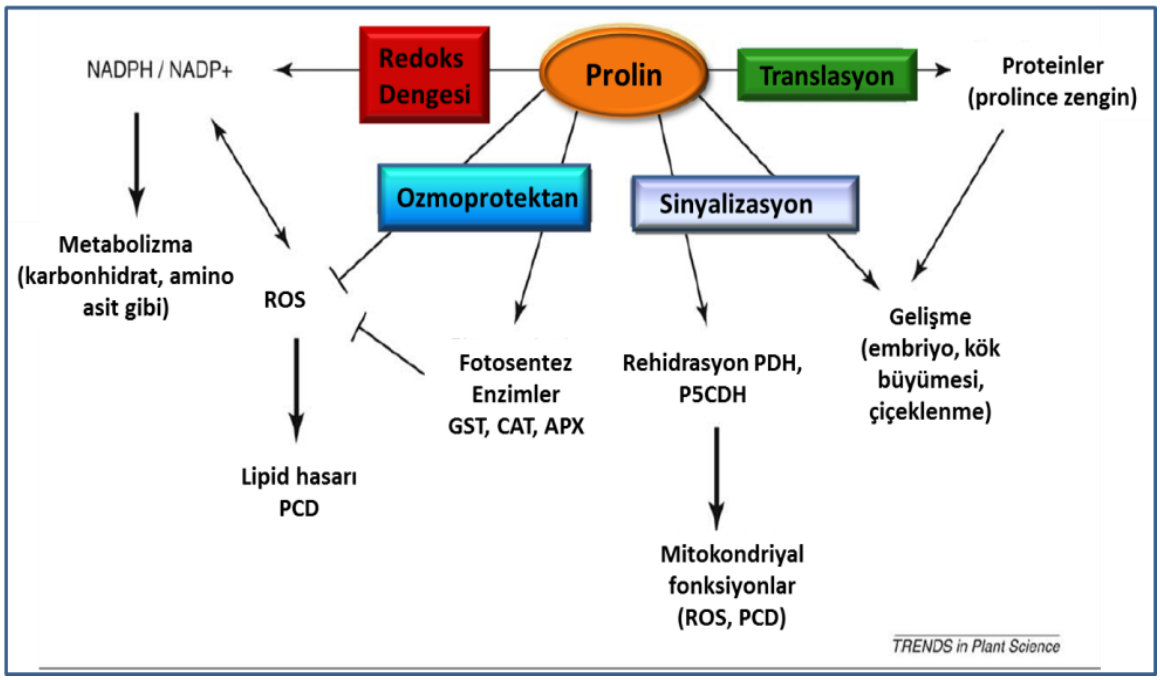
2.2. Osmolitler

Osmolitler, hücrede sitoplazmada biriktiğinde osmotik potansiyelin ayarlanmasına yardımcı olan metabolizma ürünü olan bileşiklerdir. Bu bileşikler ihtiyaç anında üretilebildikleri gibi diğer hücre ve dokulardan ihtiyaç duyulan yerlere taşınabilirler. Stres koşulları altında bitkiler, osmotik dengenin sağlanması ve hücresel yapıların korunması için yaygın olarak prolin, glisin betain, poliamin, çözünebilir şeker (fruktoz, sakkaroz ve glukoz) ve şeker alkoller (mannitol, gliserol, metillenmiş inositol) gibi osmolitler (osmotik ayarlayıcılar) biriktirirler (Borsani vd., 2003; Ashraf ve Foolad, 2007; Yazıcı vd., 2007). Ayrıca dıştan bitkilere sakkaroz, prolin veya spermidin gibi osmolit uygulamalarının da bitkilerin abiyotik stres toleransını artırdığı da çeşitli çalışmalarla rapor edilmiştir (Ali vd., 2007; Zhao ve Yang, 2008; Ramel vd., 2009; Moustakas vd., 2011; Yang vd., 2011; Slathia vd., 2012; Ali vd., 2013).

2.2.1. Prolin

Prolin, patojen enfeksiyonu gibi biyotik stres koşullarında (Lobato vd., 2009; Lobato vd., 2010) ya da su eksikliği (Costa vd., 2008), tuzluluk ve ağır metal (Chen vd., 2001) gibi abiyotik stres koşullarında büyük miktarda sentezlenen bir amino asittir. Ayrıca, su stresi koşullarında bitkiler arasında yaygın bir olgudur ve çoğu kez osmoregülasyon ile bağlantılıdır (Henda vd., 1986). Bilinen bir başka olgu ise; prolin kuraklık ve tuzluluk gibi streslerle ilişkili genlerin ifadesini düzenlemesidir (Zhu vd., 1998; Chinnusamy vd., 2005; Dawood vd., 2014). Yapılan çalışmalarda birçok strese toleranslı bitki türünde hassas olanlara göre prolin miktarı fazla bulunmuştur (Ashraf ve Foolad, 2007). Prolin birikiminin, abiyotik streslerin olumsuz etkilerine karşı bitkilerde ozmotik ayarlamaya katkıda bulunduğu, membranların, proteinlerin ve enzimlerin kararlılığını sağladığı ve serbest radikalleri temizlediği kaydedilmiştir (Kadıoğlu ve Terzi, 2007; Türkan ve Demiral, 2009). Prolin birikimi stres toleransını birçok yoldan etkileyebilir (Şekil 2) (Szabados ve Savoure, 2010). Ayrıca prolin kuraklıkta lipid peroksidasyonun önlenmesinde de rol oynamaktadır (Molinari vd., 2007).

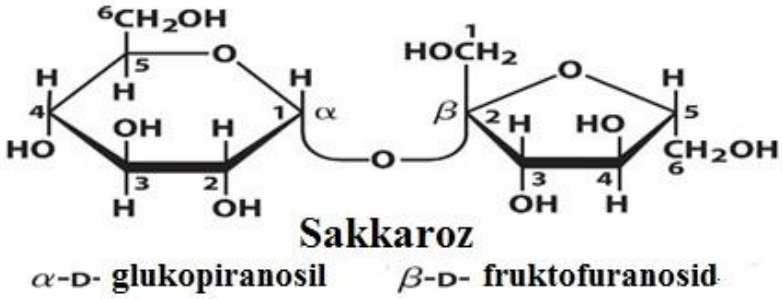
Bir ozmolit olan prolin yüksek yapılı bitkilerde glutamat veya ornitinden sentezlenir. *Arabidopsis thaliana*'da glutamat yoluyla prolin biyosentezi, çift işlevli Δ1-pirolin-5-karboksilat sentaz (P5CS) enzimi tarafından denetlenir. P5CS enzimi glutamik asiti fosforile ederek glutamil-5-semialdehit (G5SA)'e dönüştürür. Bu enzimin P5CS1 ve P5CS2 olmak üzere iki izoformu bulunmaktadır. Prolin, G5SA'den pirolin-5-karboksilat (P5C) aracılığıyla Δ1-pirolin-5-karboksilat-redüktaz (P5CR) enzimi katalizörlüğünde sentezlenir (Delauney ve Verma, 1993). Bu reaksiyonun hızını belirleyen basamak, P5CS enziminin γ-glutamil kinaz aktivitesidir. Prolin katabolizması ise prolin dehidrogenaz (PDH) ile parçalanır (Özfidan, 2010). Bunun yanı sıra, bitkilerde osmotik strese cevapta ABA birikiminin P5CS gen ekspresyonunu düzenlediği rapor edilmiştir (Xiong vd., 2001). Prolinin esas olarak sitoplazmada sentezlendiği bilinse de son yıllarda az da olsa kloroplastlarda sentezlendiği ileri sürülmüştür (Szekely vd., 2008).



Şekil 2. Prolinin strese karşı yanıt yolları (Szabados ve Savoure, 2010).

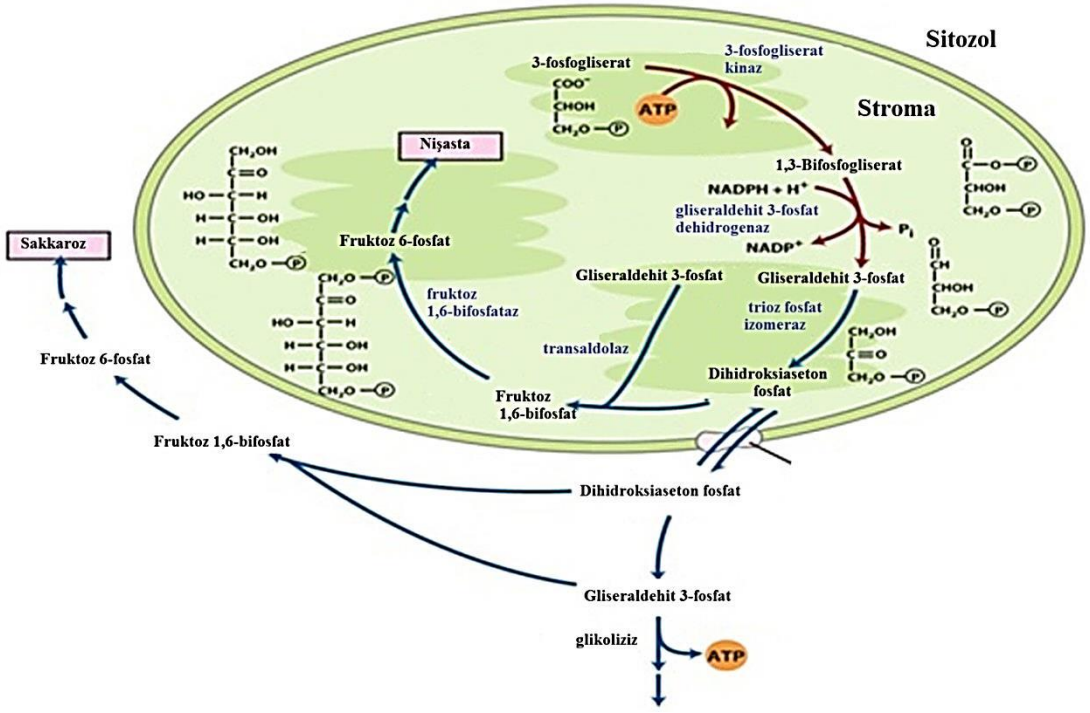
2.2.2. Sakkaroz

Sakkaroz glukoz ve fruktozdan oluşan bir disakkarit (Şekil 3) olup bitkiler tarafından sentezlenir (Nelson ve Cox, 2004). Sakkaroz gibi indirgenmeyen şekerler, keton ya da aldehit gruplarıyla alkole indirgenir ya da bir başka şeker üzerinden benzer gruplarla birleştirilir. Sakkaroz en yaygın taşınabilir şekerdir ve birçok diğer hareketli karbohidratlar sakkaroza bağlı çeşitli sayıda galaktoz molekülü içerir. Sakkaroz içeren bitkilerdeki fotosentetik dokular karbon akışının kontrolünde önemli katkı sağlar (Stitt vd. 1987; Stitt, 1996; Winter ve Huber, 2000).



Şekil 3. Sakkarozun yapısı.

Sakkaroz, sitozolde sentezlenir ve gliseraldehit 3-fosfat ve dihidroksiaseton fosfatın kloroplasttan dışarı çıkması ile başlar. Fruktoz 1,6 bifosfatın oluşması (aldolaz tarafından katalizlenir) için iki trioz fosfatın birleşmesinden sonra, fruktoz 1,6-bifosfataz hidrolizlenerek fruktoz 6-fosfatı verir (Nelson ve Cox, 2004). Daha sonra sakkaroz 6- fosfat sentaz (EC 2.4.1.14), üridin difosfat glikozdan (UDP- Glc) fruktoz-6-fosfatın (Fru-6-P) glikozil grubunun tranferi ile sakkaroz-6-fosfat (Suc-6-P) sentezini katalizler. Sakkaroz 6-fosfat daha sonra sakkaroz fosfat-fosfataz (EC 3.1.3.24) tarafından sakkaroza hidrolizlenir (Şekil 4) (Taneja ve Das, 2014).



Şekil 4. Sakkaroz sentez yolu (Nelson ve Cox, 2004).

Sakkaroz, sitozolde (Barratt vd., 2009), mitokondride (Szarka vd., 2008), kloroplastlarda (Gerrits vd., 2001) ve vakuollerde (Sonnewald vd., 1991; Grennan ve Gragg, 2009) parçalanabilir. Sakkaroz sentaz (SUCS)'ın üridin-difosfat (UDP), glukozu ve fruktozu substrat

gibi kullanarak, sakkaroz sentezinde rol aldığı bilinmektedir ve bu olay yaprak gibi kaynak dokularda daha yüksektir (Hoffman-Thoma vd., 1996). Sakkaroz sentazın fizyolojik koşullar altında sadece bitki enzimi olarak bilinen sakkaroz katabolizmasını başlattığı (Patrick vd., 2012) ve sitosolde sakkarozun UDP-glukoz ve fruktoza dönüşümünü katalizlediği bildirilmiştir. İnvertazlar ise hücre içinin yanı sıra apoplastta sakkarozun glukoz ve fruktoza dönüşümünü katalizler. Vakuolar ve sitosol/plastid/mitokondri invertazları glukoz ve fruktozu içeren sakkaroz metabolizmasıyla ilişkiliyken, hücre duvarı invertazları seçici geçirgen elementlerden sakkarozun geçirilmesi söz konusudur (Roitsch ve Gonzalez, 2004).

Sakkaroz fosfat sentaz (SPS)'ın sakkaroz fosfat sentezi için gerekli olduğu bilinir. Kaynak dokulardaki bu enzim invertaz aktivitesi tarafından oluşturulan heksozların yeniden sakkaroz sentezine katılmasına yardımcı olur. Hızlı büyüyen dokularda, vakuolar invertaz aktivitesi yüksektir ve bu enzimin solunum için gerekli olan sitoplazmik heksoz havuzunu düzenlediği düşünülmektedir (Whittaker ve Botha, 1997). Sakkaroz fosfat sentaz ve vakuolar (asit) invertazlar, kaynak dokularda ve diğer dokularda sakkaroz akışını düzenlemede önemli rol oynarlar (Zhu vd., 1997). Sakkaroz fosfat sentaz yerleşimi bakımından fotosentetik dokularda sınırlı değildir. Aynı zamanda, olgunlaşmakta olan meyveler gibi fotosentetik olmayan dokularda da bulunurlar ve bu dokularda da aktiftirler (Castleden vd., 2004).

Değişen sakkaroz metabolizması ve taşınımının metabolik etkileri çeşitli bitkilerde araştırılmıştır. Sakkaroz sentezindeki artış genellikle yüksek biyomas üretimi ile sonuçlanır. *Arabidopsis'*de SPS'nin aşırı ekspresyonu yüksek sakkaroz seviyesine ve kuru ağırlıkta artışa sebep olur (Park vd., 2008).

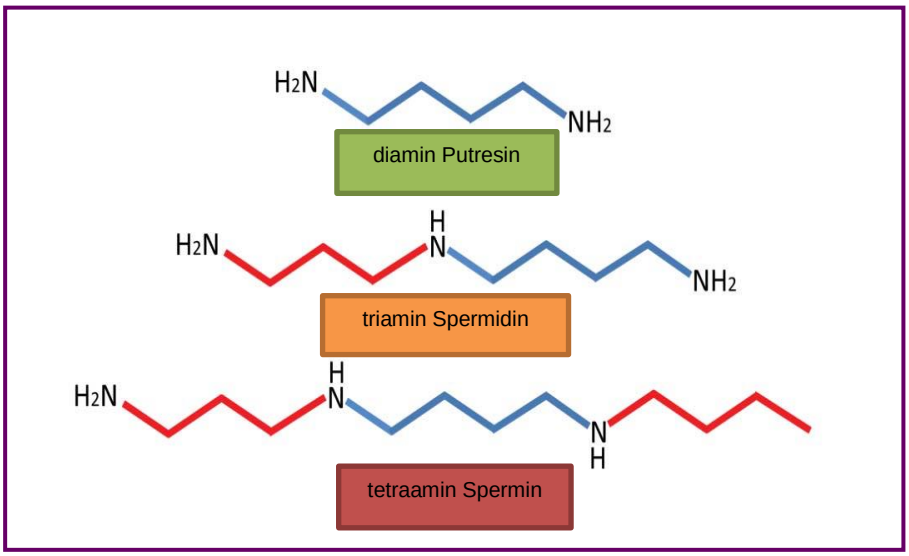
2.2.3. Poliaminler

Poliaminler, biyokimyada tanımlanmış en eski gruplardan birisi olarak kabul edilebilir (Galston 1991). Gerçekten de 1678 yılında Antonie van Leewenhoek insan genç spermlerinde gözlemleyemediği, sadece birkaç günlük insan eskimiş spermlerinde kristalize yapılardan (triamin yapılı Spermin=Spm) bahsetmiştir. İlk olarak Rosenheim 1924 yılında (bugün poliaminler olarak adlandırılan) putresin [PUT=$NH_2(CH_2)_4\,NH_2$], spermidin [Spmd= $NH_2\,(CH_2)_3\,NH(CH_2)_4\,NH_2$] ve sperminin [Spm= $NH_2(CH_2)_3\,NH(CH_2)_4\,NH(CH_2)_3\,NH_2$] testislerde sentezlediğini bildirmiştir (Gupta vd., 2013). En çok bilinen Put, Spm ve bir triamin olan spermidinin (Spd) yapısal ve kimyasal özellikleri 1920'li yıllarda aydınlatılmış ve dahası bunların azot içeren düşük moleküler ağırlıklı bileşikler olduğu ortaya çıkarılmıştır (Alcazar, 2010a). Günümüzde poliaminlerin yaşayan bazı arkeik metanojen ve halofit bakteriler hariç tüm hücrelerde bulunduğu kabul edilir (Gupta vd., 2013). Ayrıca poliaminler; nükleus dahil bir bitki hücresinin tüm içsel yapılarında ve birçok yaşamsal süreçlerinde bulunur (Galston vd.,

1997; Walden vd., 1997; Bouchereau vd., 1999; Kuznetsov ve Shevyakova, 2007; Bachrach, 2010).

Birçok araştırma poliaminlerin yaşam için gerekli olduğunu göstermiştir. Protonize olmaları, poliaminlere pozitif bir yük kazandırır böylece negatif yüklü olan hayati makromoleküllere bağlanabilirler. Makromoleküllere bağlanan poliaminler, bağlandıkları kritik molekülleri degradasyondan ve modifikasyondan koruyarak hayatsal fonksiyonların devam etmesine yardımcı olurlar (Ruiz-Herrera vd., 1995; D'Agostino vd., 2005). Aynı zamanda; poliaminler; organ oluşumu, embriyo oluşumu, çiçek oluşumu ve gelişimi, yaprak senesensi, meyve gelişimi ve olgunlaşması, biyotik ve abiyotik stres yanıtları gibi diğer bir çok fizyolojik süreçlere de katılırlar (Alcazar vd., 2006; Kusano vd., 2008). Kimyasal ya da genetik müdahalelerle poliamin seviyesinin azaltılmasının mayalarda, protistalarda ve bitkilerde ölümcül olduğu kaydedilmiştir (Urano vd., 2005).

Poliaminlerin bitkilerdeki biyosentez ve metabolik yolları ayrıntılarıyla incelenmiştir (Wimalasekera vd., 2011; Tavladoraki vd., 2012). Poliamin sentezi bakterilerden, hayvanlara ve bitkilere kadar küçük varyasyonlara rağmen büyük oranda korunmuştur (Gupta vd., 2013). Ökaryotik hücrelerde en fazla bulunan putresin, spermidin ve spermin (Şekil 5); L-arjininden (veya bir dizi enzimatik yolla ornitinden) ve metiyoninden, birbirine bağlı altı basamaklı bir seri enzimatik reaksiyon ile sentezlenir (Kusano vd., 2008; Alcazar vd., 2010a).

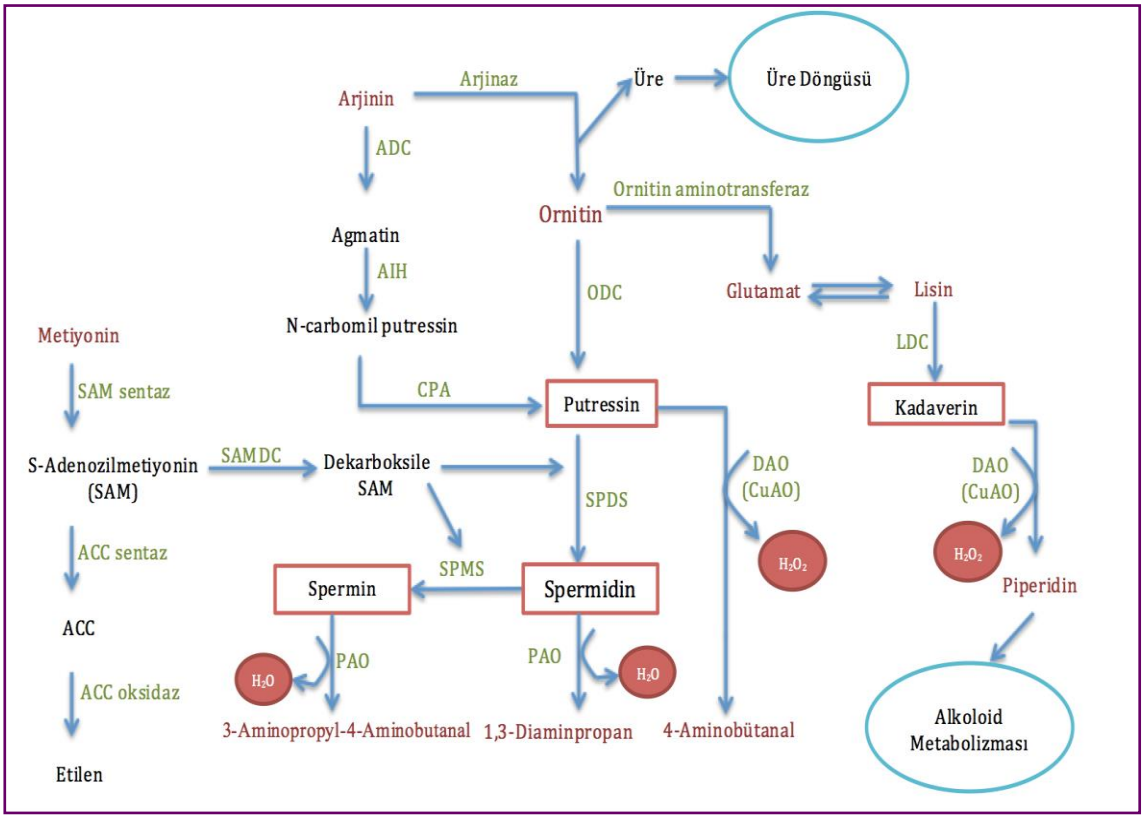


Şekil 5. Bitkilerde yaygın olarak bulunan poliaminler (Bitrian vd., 2012).

Arjinin amino asiti, arjinaz (EC 3.5.3.1) ve ornitin dekarboksilaz (ODC, EC 4.1.1.17) enzimlerinin aktiviteleriyle putresine dönüştürülür. Hemen hemen serbest yaşayan tüm ökaryotlar; ornitin dekarboksilaz (ODC) enzimin etkisiyle, doğrudan bir şekilde ornitinden, putresin (1,4-diaminobütan) sentezleyebilir. Bitkilerde ve bakterilerde putresin; arjinin dekarboksilaz (ADC, EC 4.1.1.19) enziminin kullanıldığı ve iyi tanımlanmış bir alternatif yolla da sentezlenir. Buna göre; ADC aktivitesi ile arjininden elde edilen agmatinin sıralı bir şekilde, agmatin iminohidrolaz/deaminaz (AIH, EC 3.5.3.12) ve N-karbomil putresin amidohidrolaz (CPA, EC 3.5.1.53) enzimleri tarafından katalize edilmeleriyle putresin sentezlenir (Shi ve Chan, 2013). Alcazar vd (2005)'e göre, bitkilerdeki putresin seviyesini sınırlayan enzim ADC'dir. Bu iddiayı destekleyen bir duruma örnek vermek gerekirse; *Arabidopsis* bitkisinde ODC aktivitesine tespit edilememiştir. Bunun yerine *ADC1* ve *ADC2* olmak üzere iki gen bölgesi ve aktivitesi vardır ve putresin sentezi tamamen ADC aktivitesi tarafından gerçekleştirilir (Tiburcio vd., 2014).

Putresin, S-adenozilmetiyonin dekarboksilaz (SAMDC, EC 4.1.1.50) tarafından oluşturulan dcSAM (dekarboksile S-adenosilmetiyonin)'ın aminopropil kısmı ile spermidin (Spd) üretilmesi için, spermidin sentaz enzimi etkinliğiyle (SPDS, EC 2.5.1.16) birleştirilir. Spermidin son olarak, spermin sentaz (SPMS, EC 2.5.1.22) enzimi tarafından katalizlenerek ikinci bir aminopropil grubu eklenerek spermin sentezlenir (Şekil 6.) (Gupta vd., 2013).

Poliaminlerin bitkilerde katabolize edilmelerini amin oksidazlar gerçekleştirir. Bunlar; diamin oksidaz (DAO/CuAO, EC 1.4.3.6) ve poliamin oksidazdır (PAO, EC 1.5.3.3). İlk sınıf olan diamin oksidazlar, bakır içeren enzimlerdir (CuAO) ve diamin putresin ile diamin kadaverinde bulunan primer amino gruplarının oksidasyonunu katalizlerler. Putresinin katabolize edilmesiyle 4-aminobütanal (kendiliğinden Δ^1 proline dönüşür), H_2O_2 ve amonyak ürünleri ortaya çıkar (Alcazar vd., 2010a; Bitrian vd., 2012). Amin oksidazların diğer sınıfı, flavin içeren poliamin oksidazlardır. Bunlar spermidin ve sperminin terminal katabolizasyonundan sorumludur. Terminal bölgelerin katalize edilmesi sonucunda 4-aminobütanal ya da N-(3-aminopropil)-4-aminobütanal, 1,3-diaminopropan ve H_2O_2 oluşur (Cona vd., 2006; Moschou vd., 2008).



Şekil 6. Poliamin metabolizması.

Farklı bitki türleriyle devam eden çalışmalar poliamin birikiminin; kuraklık, tuzluluk, düşük ve yüksek sıcaklık, ozon, UV, ağır metal toksisitesi, mekanik yaralanma ve herbisit uygulamaları gibi birçok çevresel duruma karşı yanıt olduğunu göstermiştir (Bouchereau vd., 1999; Alcazar vd., 2006; Groppa ve Benavides, 2008).

Zhou ve Yu (2010) PEG teşvikli kuraklık stresine maruz kalmış kabe samanı bitkisinde serbest ve bağlı poliaminleri ayrıntılı bir şekilde çalışmışlardır. Bu bitki, su eksikliğine ya da kuraklık stresine maruz kaldığında aşırı miktarda poliamin (özellikle spermidin) biriktirerek yaşamını devam ettirebilmektedir. Poliaminlerin abiyotik stresle olan ilişkilerini incelemek için; transgenik olarak elde edilen ve poliamin sentezi yönünden eksik ya da aşırı ekspres mutantların kullanılması günümüzde uygulanan bir yaklaşımdır. Buna ek olarak; dışarıdan poliamin uygulaması veya poliamin biyosentezini bloke eden inhibitörlerin uygulanması gibi birçok yaklaşımlar mevcuttur (Groppa ve Benavides, 2008; Moschou vd., 2012). Dışarıdan uygulanan poliaminlerin çeşitli derecelerde fizyolojik süreçlere katıldığını gösteren çok fazla kanıt vardır. Bu süreçler; hücre membranı bütünlüğün korunması, stres kaynaklı büyüme inhibisyonun geri çevrilmesi, osmotik yanıt genleri ifadelerinin düzenlenmesi, süperoksit radikali ve H_2O_2'in seviyelerinin azaltılması, Na^+ ve Cl^-iyonlarının farklı organlarda birikiminin

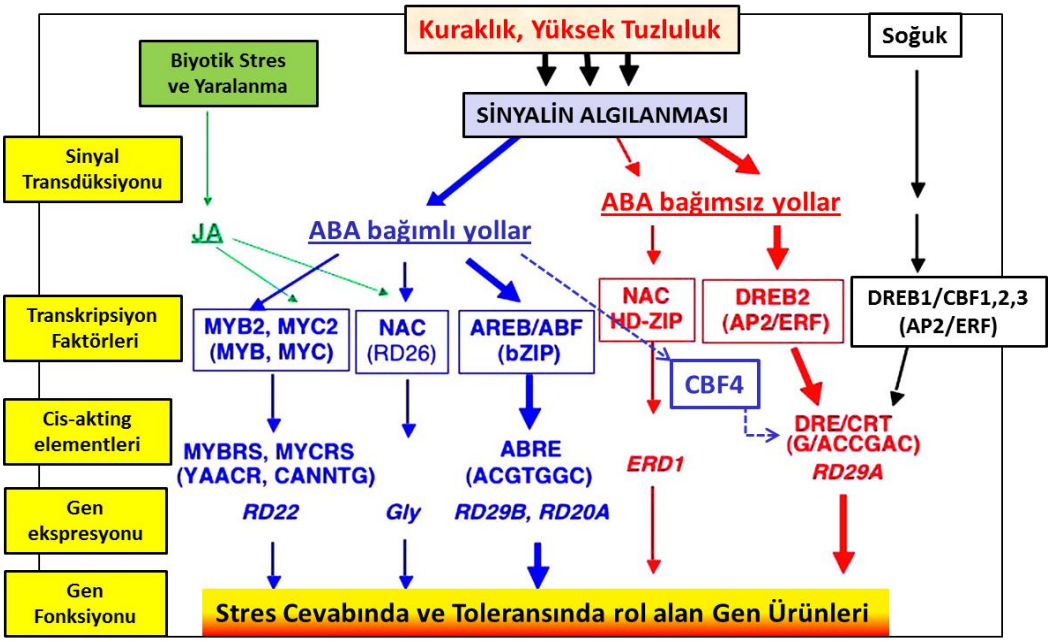
azaltılması ve antioksidan enzim etkinliğinin arttırılması olarak özetlenebilir (Yiu vd., 2009; Zhang vd., 2009).

2.3. Absisik Asit (ABA)

Büyüme hormonları bitkilerin strese cevabını düzenlemede önemli rol oynarlar (Wang vd., 2001). Kuraklık stresi esnasında hücrelerdeki turgorun azalması sonucunda yaprak kıvrılmasının yanı sıra ABA gibi bazı büyüme hormonlarının seviyesi de değişir (Pierce ve Raschke, 1980; Turner vd., 1986). ABA çiçekli bitkilerde su eksikliğine (kuraklığa) cevap olarak üretilir, kuraklığa ve diğer çevresel streslere toleransla ilgili cevapların başlamasında önemli bir rol oynar. Bitkilerde kuraklık stresi sırasında ABA konsantrasyonunun artması, büyüme, gelişim (Hartung ve Davies, 1991; Bray, 1993; Reddy vd., 2004) ve bazı genlerin ifade edilmesini de (Bray, 1991) kapsayan çok sayıda değişimler meydana getirir (Zeevaart ve Creelman, 1988). Dışarıdan uygulanan ABA'nın da bitkilerde stres ilişkili birçok genin ekspresyonunu uyararak strese karşı toleransı artırdığı belirtilmiştir (Xiong ve Zhu, 2002; Fediuc vd., 2005; Zhu, 2010).

Stres süresince ABA biyosentezi ilk olarak köklerde artar ve sonra ksilem vasıtasıyla kimyasal bir sinyal oluşturarak stomaların kapanmasını sağlamak üzere gövdeye taşınır (Galle vd., 2013). ABA'nın strese karşı stoma kapanması, ozmolit birikimi, büyümenin inhibisyonu ve metabolizmanın değiştirilmesi gibi fizyolojik adaptasyonlarının yanı sıra, moleküler düzeyde gen ekspresyonunda birçok değişiklikler yaptığı ve LEA, HSP gibi koruyucu proteinlerin ve reaktif oksijen temizleyicilerin sentezini artırdığı bildirilmiştir (Huang ve Wu, 2006; Sripinyowanich vd., 2013). Bununla birlikte, ABA eksik mutantlarla yürütülen deneyler sonucu, stresle uyarılabilen genlerin bazılarının ABA'ya bağımlı olmasına rağmen bazılarının ise ABA'dan bağımsız olarak kontrol edildiği ortaya çıkmıştır (Zhu, 2002).

Kurak ve tuzluluk stresi ABA bağımlı ve ABA bağımsız yolundaki, *ABF* (ABRE binding factor)/*AREB* (ABA responsive element binding protein), *MYC* (myelocytomatosis)/*MYB* (myeloblastosis), *DREB2* (drought responsive element binding) ve *NAC* (NAM, ATAF1,2, CUC) transkripsiyon faktörlerine ait gen ifadelerini aktive eder. Bu önemli transkripsiyon faktörleri farklı streslere cevap olarak farklı transkript düzenlenmesi gösterir ve aşırı ifadeleri bitkilerde stresle ilişkili çok sayıda genin doğrudan veya dolaylı olarak devreye girmesi ile sonuçlanır (Agarwal ve Jha, 2010). *AREB/ABF* ve *MYC/MYB* transkripsiyon faktörleri ve *bZIP* (basic leucine zipper factor), *ABRE*, *MYCR*, *MYBR* transkripsiyon faktörleri iki farklı mekanizma ile ABA'ya bağlı olarak strese cevap verirken, DREB proteinleri ise ABA'ya bağlı olmayan durumlarda DRE aracılığı ile strese cevap yolağını aktive ederler (Şekil 7).



Şekil 7. ABA bağımlı ve bağımsız stres sinyal yolları (Gujjar vd., 2014).

2.4. Mısır (*Zea mays* L.) Bitkisi

Bu araştırmanın bitki materyali olan mısır; buğday ve çeltikten sonraki en önemli besin kaynağıdır ve günümüzde en fazla üretimi yapılan tahıl çeşitlerinden biridir. Araştırmalar 2050 yılında bu üretimin daha da fazla olacağını rapor etmektedir (Alexandratos ve Bruinsma, 2012). Ayrıca hektar başına elde edilen ürün bakımından mısır, buğday ve pirince göre daha fazla ürün vermesi nedeniyle geleceğin temel besin kaynağı olma ihtimali yönünden önemlilik arz etmektedir. Türkiye'de mısır, ekim ve üretim bakımından buğday ve arpadan sonra üçüncü sırayı almaktadır (FAO, 2013).

Mısır, Poaceae (buğdaygiller) familyasına ait monokotiledon bir bitkidir (Tablo 1). Poaceae familyası içerisinde çiçeklenme biçimi bakımından diğer türlerden farklıdır. Çiçekleri monoik yapıda olup, erkek (tepe püskülü) ve dişi çiçekler (koçan) aynı bitki üzerinde fakat farklı yerlerde bulunmaktadır. Bitkinin sistematikteki yeri aşağıdaki şekilde olup, mısır, geniş adaptasyon kabiliyeti nedeniyle Dünya'nın farklı bölgelerinde kültürü yapılabilmektedir. 50º kuzey enleminden 50º güney enlemlerine, deniz seviyesinden 3000-4000 m yüksekliğe kadar olan alanlarda ve ayrıca birçok toprak tipinde tarımı yapılabilmektedir (Morris, 2002).

Tablo 1. Mısır bitkisinin bitki sistematiğindeki yeri.

Alem:	Plantae
Bölüm:	Magnoliophyta
Sınıf:	Liliopsida
Takım:	Poales
Familya:	Poaceae
Cins:	Zea
Tür:	*Zea mays* L.
Alttür	*Zea mays* subsp. *mays* L.

Mısır bitkisi dört aylık kısa bir süreçte 2,5–4,5 metre boya ulaşabilmekte ve tek bir bitkiden 600-1000 tohum elde edilebilmektedir. Buğday ise 7-8 aylık bir zaman diliminde 70-120 cm boya sahip olurken, bitki basına düşen verim 50-100 tohum civarındadır. Bu yüksek dane ve bitkinin yeşil kısım veriminden dolayı mısır bitkisinin önemi insan gıdası ve hayvan yemi olarak kullanımının yanında biyo-yakıt olarak ta değerlendirilebilmesi mısırın önemini ortaya koymaktadır (Özcan, 2009).

Mısır, geniş bir kullanım alanı olması nedeni ile diğer tahıllara göre oldukça farklı bir konuma sahiptir. İçerdiği zengin besin maddeleri ile mısır, hem insan hem de hayvan beslenmesinde kullanılır. Mısır danesinin yapısında ticari değere sahip birçok kimyasal bileşik vardır. Olgun bir mısır danesi %70-75 nişasta, % 8-10 protein ve % 4-5 yağ içerir (Earle vd., 1946). Mısır, nişasta protein ve yağ kaynağı olarak kullanılmasının dışında diğer birçok kullanım alanları (glukoz; içeceklerde ve reçel yapımında, etanol; biodizel yakıt, plastik yapımında ve bunun gibi) ile de dikkat çekmektedir. Birçok kullanım alanı nedeniyle bugün; koçan uzunluğu ve şekli, tane büyüklüğü ve şekli, dane rengi, yapısı, aroması ve lezzeti, pişirim kalitesi, endospermi, yağ, protein ve nişasta içeriği gibi birçok farklı özelliklere sahip farklı mısır çeşitleri geliştirilmiştir (Cömertpay, 2008).

Mısır bitkisi 2009 yılında genetik sekansı tamamlanan, 2n=20 kromozomlu diploid bir bitkidir ve 10 tane haploid kromozomu üzerinde yerleşmiş 39469 geni ihtiva eden 2,4 milyar bazdan

oluşan büyük bir genoma sahiptir (Schnable vd., 2009; Zhang vd., 2009). İlginçtir ki; bu genlere ait 63391 transkript elde edilmiştir. Bunun sebebi ise, bir gene ait birden fazla mRNA sekansının ya da farklı ekzon kesimlerinin olmasıdır. Gen sekansının 2009 yılında tamamlanması ve bu projeye ayrılan fonlar; mısır bitkisinin geleceğin dünyası için ne kadar değerli olduğunun göstergesidir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Bitkilerin Büyütülmesi

Mevcut projede mısır tohumları (Şafak çeşidi) kullanılmıştır. Tohumlar, 25×18×12 cm'lik saksılarda, 22 °C gündüz /18 °C gece sıcaklığında, %50–60 bağıl nemin bulunduğu toprakta 4 hafta büyütülmüştür. Denemeler, tesadüf parseller deneme deseni planında kurulmuş olup, 3 paralel ve en az 5 tekrarlı olarak yapılmıştır.

3.2. Polietilen Glikol, Osmolit ve Osmolit İnhibitörlerinin Uygulanması

Mevcut çalışmada denemeler için 4 haftalık mısır fidelerinin toprak üzerinden kesilen yapraklı gövde kısımları kullanılmıştır. Bunun için kesilen gövde kısımları aklimasyon için 1 saat fizyolojik su içerisinde bekletilmiştir. Daha sonra osmotik stres oluşturmak için sözkonusu bitki kısımları %3- 10 arasında değişik polietilen glikol (PEG 6000) konsantrasyonlarında 6 saat bekletilerek en etkili konsantrasyon (orta dereceli kıvrılmaya (%30-50) neden olan %3, %5, %7, ve %10 konsantrasyonlarından birisi) belirlendikten sonra denemelere sadece bu PEG konsantrasyonu ile devam edilmiştir. Aklimasyondan sonra kesilmiş gövde kısımları aşağıda belirtilen derişimlerdeki osmolit ve inhibitör çözeltilerinde 6 saat tutulmuş ve bu süre sonunda yukarıda belirlenen PEG konsantrasyonu ile muamele edilerek 6 saat osmotik strese maruz bırakılmıştır. Bu süre sonunda aşağıda belirtilen stres parametreleri ölçülmüş ve gen ifadeleri belirlenmiştir. Analizler için 3. ve 4. yapraklar kullanılmıştır.

Dıştan uygulanan osmolitlerin hücresel osmolit ve ABA metabolizmasında görev alan genler üzerindeki etkilerini araştırmak için, yapraklara 20 mM sakkaroz (Sulmon vd., 2004), 1 mM spermidin (Kubis, 2008), 20 mM prolin (Özden vd., 2009) uygulanmıştır. Aynı zamanda içsel poliamin, prolin ve sakkaroz seviyelerini azaltmak için poliamin sentez inhibitörü olarak arginin dekarboksilazı (ADC) inhibe eden α-difluorometil arginin (DFMA) (Shih ve Kao 1996), ornitin dekarboksilazı (ODC) inhibe eden α-difluorometil ornitin (DFMO) (Rajam vd., 1986), sakkaroz sentez inhibitörü olarak imidodifosfat (Neuhaus ve Stitt, 1991) ve prolin inhibitörü olarak cordycepin (Stewart vd., 1986) inhibitörleri kullanılmıştır. DFMA ve DFMO 5 µM (Rajam vd., 1986), imidodifosfat ve cordycepin inhibitrleri sırasıyla 1 mM ve 2 mM (Stewart vd., 1986; Neuhaus ve Stitt, 1991) konsantrasyonlarında deney gruplarına uygulanmıştır.

3.3. Stres Parametrelerinin Belirlenmesi

Çalışmanın bu aşamasında öncelikle, temel stres belirteci olarak su potansiyeli ve yaprak kıvrılması parametreleri ölçülmüştür. Daha önce tamamlanan ve mevcut çalışmaya ön ayak olan projemizde bu parametreler ölçülmesine rağmen, osmotik stres derecesini belirlemek açısından bu ölçümler tekrarlanmıştır.

3.3.1 Yaprak Su Potansiyeli

Mevcut çalışmada bitkilerin stres seviyesini belirlemek için yaprak su potansiyelleri belirlenmiştir. Su potansiyelleri Psypro P2-132 Water Potential System (Wescor, Inc.) kullanılarak Savage ve Cass (1984)'a göre ölçülmüştür.

3.3.2. Yaprak Kıvrılması

Bitkilerin su durumunun bir göstergesi olan yaprak kıvrılmasının düzeyi (Premachandra vd., 1993)'e göre, yaprak eni ölçülerek yaprağın enindeki yüzde azalma olarak hesaplanmış ve yaprak kıvrılma derecesi (%) olarak ifade edilmiştir.

3.4. Moleküler Analizler

Çalışmanın bu aşamasında toplam RNA izolasyonu, cDNA eldesi, primer tasarlanması ve Tablo 2'de belirtilen hücresel osmolit ve ABA metabolizmasında görev alan genlerin ifade seviyesi belirlenmiştir. Gen analizleri sadece PEG uygulanan (kontrol) gruptaki orta derecede bir yaprak kıvrılmasının elde edildiği aşamada, bütün uygulama gruplarını kapsayacak şekilde yapılmıştır.

Tablo 2. Uygulamalar ve ifade seviyeleri belirlenen genler.

P5CS: Δ1 -pirolin-5-karboksilat sentaz, P5CR: Δ1-pirolin-5-karboksilat-redüktaz ProDH: prolin dehidrogenaz ADC: arginin dekarboksilaz SAMDC: S-adenosilmetiyonin dekarboksilaz, DAO: diamin oksidaz, PAO: poliamin oksidaz, SUCS: sakkaroz sentez, SPS: sakkaroz fosfat sentaz, NCED: 9-cis-epoksikarotenoid dioksigenaz, AAOX: ABA aldehid oksidaz

	PROLİN			**POLİAMİN**				**ŞEKER**		**ABA**	
UYGULAMALAR	*P5CS*	*P5CR*	*ProDH*	*ADC*	*SAMDC*	*DAO*	*PAO*	*SPS*	*SUCS*	*NCED*	*AAOX*
peg (kontrol)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
peg+sakkaroz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
peg+spermidin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
peg+prolin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
peg+cordycepın	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
peg+imidodıfosfat	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
peg+dfma+dfmo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

3.4.1. Real Time Analizleri İçin Uygun Primerlerin Tasarlanması

İfade seviyesi belirlenecek genler için gerekli primerler, NCBI very tabanındaki gen sekansları kalıp olarak kullanılarak, Primer 3 plus programı ile tasarlanmıştır. Tasarlanan primerler, NCBI veritabanını kullanan "primer3 plus" programı kullanılarak blast yapılmış ve primerlerin, eşleşme oranlarına bakılarak, istenen gen bölgelerine doğru bir şekilde bağlanabildiği teyit edilmiştir. Gen ifadelerinin referansı için AKTİN 1 genine ait primerler tasarlanmıştır. Çalışmada ifade seviyeleri belirlenecek genlere ait primerler Tablo 3'de verilmiştir.

Tablo 3. İfadeleri belirlenen genlere ait primerler.

Aktin 1	NM_001155179.1	**ACT1Zm_F:** "GAAGATCACCCTGTGCTGCT" **ACT1Zm_R:** "ACCAGTTGTTCGCCCACTAG"
P5CS	DQ864376.1	**P5CSZm_F:** "AACATCTTGCCCTCTGGGTG" **P5CSZm_R:** "CCATTGCCACTTCGAACTGC"
P5CR	NM_001112317.1	**P5CRZm_F:** "CCATGGCTGATGGTGGAGTT" **P5CRZm_R:** "CAGTTGCCCTGGATGTTTGC"
PRODH	NM_001154105.1	**PRODHZm_F:** "TCAGCAAGTACCTGCCGTAC" **PRODHZm_R:** "ACCCTCCTCACCAACTCCTT**"**
ADC	EU968980.1	**ADCZm_F:** "GACATCACCTGCGACAGTGA" **ADCZm_R:** "GAACAGGTTGTGCTTGCCAG"
SAMDC	EU968400.1	**SAMDCZm_F:** "GGAGGCGTGAAGAAGTTCCA" **SAMDCZm_R:** "TTATCAGGAAGCAGCAGGCC"
DAO	NM_001152492.1	**DAOZm_F:** "ACAGCAAGTCCGAGAAGTGG" **DAOZm_R:** "TGTACCACAGCACGATGTCC"
PAO	NM_001111636.1	**PAOZm_F:** "CGCTACGAATACGACCAGCT" **PAOZm_R:** "TGGGCGCAGTTGATGAGAAT"
SUCS	NM_001111941.1	**SUCSZm_F:** "GAATGCTTCAGCGCCATCAG" **SUCSZm_R:** "CTTCCTGAGCAGCACGAAGA"
SPS	NM_001112224.1	**SUPSZm_F:** "GCCGCGGGATAAATACCTCA" **SUPSZm_R:** "GCAGTACTGGCCTCCCATTT"
AAOX	NM_001111838.1	**AAOXZm_F:** "CCTGACAAGAAGCGTGTCCT" **AAOXZm_R:** "GAATGTGACGGCGGATTTCG"
NCED1	NM_001112432.2	**NCED1Zm_F:** "GTGGTGCTGGACAAGGAGAA" **NCED1Zm_R:** "AGGTGGAAGCAGAAGCAGTC"
GAPDH	EU953063.1	**GAPDH_F: "**CTGCACATCTCAAGGGTGGT**"** **GAPDH_R: "**GAGCAAGGCAGTTTGTGGTG**"**
ATUB	L27815.1	**ATUB_F: "**ATGATGAGGGTGACGAGGGA" **ATUB_R: "**GGAAACACACACAGCAGCAG"

3.4.2. Toplam RNA İzolasyonu ve cDNA Kütüphanesinin Oluşturulması

Toplam RNA izolasyonu için taze ya da -80 °C'de saklanan numunelerden 0,1 g miktar kullanılmıştır. Sıvı azot ile dondurulan örnekler, doku homojenizatörü ile parçalandıktan sonra Toplam RNA izolasyon kiti (Pure Link RNA Mini Kit 121830018A, Ambion Applied Life Tech.) kullanılarak ve üreticinin talimatlarına uyularak toplam RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen RNA örneklerinin miktarı ve saflığı nanodrop spektrofotometre (Thermo Scientific,

Nanodrop 2000, Amerika) ile ölçülmüştür. Miktarı ve saflığı belirlenen toplam RNA örnekleri cDNA eldesi için -80 °C'de saklanmıştır.

İzole edilen Toplam RNA örneklerinden grup başına 2000 ng olacak şekilde cDNA eldesi gerçekleştirilmiştir. cDNA sentezi için Applied marka (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit 4368814, Applied Biosystems) cDNA sentez kiti kullanılmıştır. Sentezlenen cDNA'lar Real Time PCR analizleri gerçekleştirilene kadar -20 °C'de saklanmıştır.

3.4.3. Gen İfadelerinin Real Time (RT) PCR Analizleri ile Belirlenmesi

Bir önceki aşamada örneklerden elde edilen cDNA'lar, gen ifadelerinin belirlenmesi için Real Time PCR analizlerinde kullanılmıştır. Analizler için "5x HOT FIREPol Eva Green qPCR Supermix (08-36-00008, Solis Biodyne)" süpermiks ve "CFX Connect Real Time PCR System (BioRad)" cihazı kullanılmıştır. RT PCR protokolü ise Solis Biodyne talimatları modifiye edilerek; 95 °C'de 12 dk, 95 °C'de 15 sn 45 döngü, 60.0 °C'de 30 saniye, 72.0 °C'de 30 sn, melt curve için 65.0 ºC'den 95 ºC'ye 0,5 ºC'lik artışlarla olacak şekilde gerçekleştirilmiştir (Tablo 3). Her biyolojik tekerrür 3 teknik tekerrür şeklinde analiz edilecek ve ortalama teknik hata 0,5(±1) Cq values olacak şekilde kabul edilmiştir. Protokol Tablo 4'te verilmiştir. Ayrıca referans geni için AKTİN 1 genine ait primerler kullanılmıştır. Real Time PCR analizi sonrasında AKTİN 1 genine ait kantitatif gen ifade değerleri (Cq) gözönünde bulundurularak osmotik stres sırasında değişiklik olup olmadığı gözlenmiştir.

Tablo 4. RT PCR protokolü.

Adım	Sıcaklık	Süre	Döngü
Başlangıç Aktivasyonu	95,0 °C	12 dk	1
Denaturasyon	95,0 °C	15 sn	44
Bağlanma	60,0 °C	30 sn	
Uzama	72,0	30 sn	
Plate Okuma	-	-	
Melt Curve Analizi	65,0 °C -95,0 °C arası 0,5 °C'lik artışlar 5 sn aralıklarla plate okuma		-

RT PCR reaksion ortamı yine miks üreticisinin talimatlarına göre hazırlanmıştır. Reaksiyon ortamında kullanılan bileşikler ve oranları Tablo 5'da verilmiştir.

Tablo 5. RT PCR reaksiyon ortamı.

Reaksiyon Bileşeni	Miktarı (µL)
Süper Miks	4
Forward Primer	1
Reverse Primer	1
cDNA	1
Nükleaz içermeyen su	13
Toplam	20

3.5. İstatistiksel Analizler

Denemeler, tesadüf parseller deneme deseni planında kurulmuş olup, 3 paralel ve en az 5 tekrarlı olarak yapılmıştır. Elde edilen verilere ANOVA testi uygulanmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Orta Dereceli Yaprak Kıvrılmasına (%30-50) Neden Olan Etkin PEG Konsantrasyonun Belirlenmesi

Proje önerisinde belirtildiği gibi, çalışmanın bu aşamasında etkin PEG konsantrasyonun belirlenmesi amaçlanmıştır. Gereç ve yöntem kısmında açıklandığı şekilde yapılan denemelerde bitkiler sırasıyla %3, %5, %7 ve %10 konsantrasyonlarda PEG ortamında osmotik strese maruz bırakılmıştır. Uygulama süresi (6 saat) sonrasında yapraklarda hem kıvrılma dereceleri hem de su potansiyelleri ölçülmüştür. Sonuçlar analiz edildiğinde %36,4 yaprak kıvırlma derecesine neden olan en uygun osmotik stres seviyesinin %10 PEG konsantrasyonu olduğu gözlenmiştir (Tablo 6).

Tablo 6. Çeşitli PEG konsantrasyonlarına göre yaprak kıvrılma derecesi ve su potansiyeli değerleri.

GRUPLAR	Kıvrılma derecesi %	Yaprak Su Potansiyeli, MPa
KONTROL	0	-0,77±0,08a
%3 PEG	9,2±1,1c	-0,93±0,07b
% 5 PEG	9,5±1,0c	-1,22±0,08c
%7 PEG	17,9±2,3b	-1,31±0,09cd
%10 PEG	36,4±4,4a	-1,37±0,02d

Not: Değerler ortalamalar olup; ± değerleri standart sapmadır. Sütünlar kendi içersinde değerlendirilmiştir. Farklı harfler $p < 0,05$ seviyesinde istatistiksel olarak önemli farklılıkları göstermektedir.

4.2. Etkin PEG (%10) Konsantrasyonuna Göre Yaprak Kıvırlması ve Su Potansiyeli Değerleri

Çalışmalara % 10 PEG konsantrasyonu ile devam edilmiştir. Uygulamaların tamamı PEG (% 10 PEG 6000) ihtiva eden solüsyonlar ile yapılmıştır. Dışarıdan sakkaroz, spermidin ve prolin uygulamaları sonucu yaprak kıvrılma dereceleri kontrol (Sadece %10 PEG içeren su) grubuna göre önemli ölçüde azalmıştır (Tablo 7). Sakkaroz ve prolin uygulamaları, spermidin uygulamasına göre yaprak kıvrılma derecesi daha fazla azaltmıştır. İnhibitör kullanımları ise yaprak kıvrılma derecesini, kontrol grubuna kıyasla önemli derecede artırmıştır. Cordisepin (prolin sentez inhibitörü) yaprak kıvrılma derecesinin en yüksek olduğu uygulama olmuştur. Yaprak su potansiyeli açısından değerlendirme yapıldığında ise, sakkaroz, prolin ve spermidin uygulamalarının yaprak su potansiyelini kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde artırdığı saptanmıştır (Tablo 7). En yüksek su potansiyeli değeri prolin uygulaması ile elde edilmiştir. İnhibitör uygulamaları ise yaprak su potansiyelini, kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde azaltmıştır. En düşük su potansiyeli değeri cordipesin uygulaması sonucunda belirlenmiştir.

Tablo 7. Yaprak kıvrılma derecesi ve su potansiyelindeki değişimlerin belirlenmesi.

GRUPLAR	Kıvrılma derecesi %	Yaprak Su Potansiyeli, MPa
Kontrol	30,7±1,59d	-1,25±0,03c
Sakkaroz	16,0±2,2d	-1,09±0,03b
Spermidin	21,5±2,06e	-1,07±0,04b
Prolin	14,6±1,28d	-0,93±0,03a
İmidodifosfat	33,3±0,47c	-1,35±0,01d
DFMA+DFMO	38,5±1,56b	-1,39±0,02de
Cordisepin	47,2±0,50a	1,44±0,04e

Not: Değerler ortalamalar olup; ± değerleri standart sapmadır. Sütünlar kendi içersinde değerlendirilmiştir. Farklı harfler $p < 0,05$ seviyesinde istatistiksel olarak önemli farklılıkları göstermektedir.

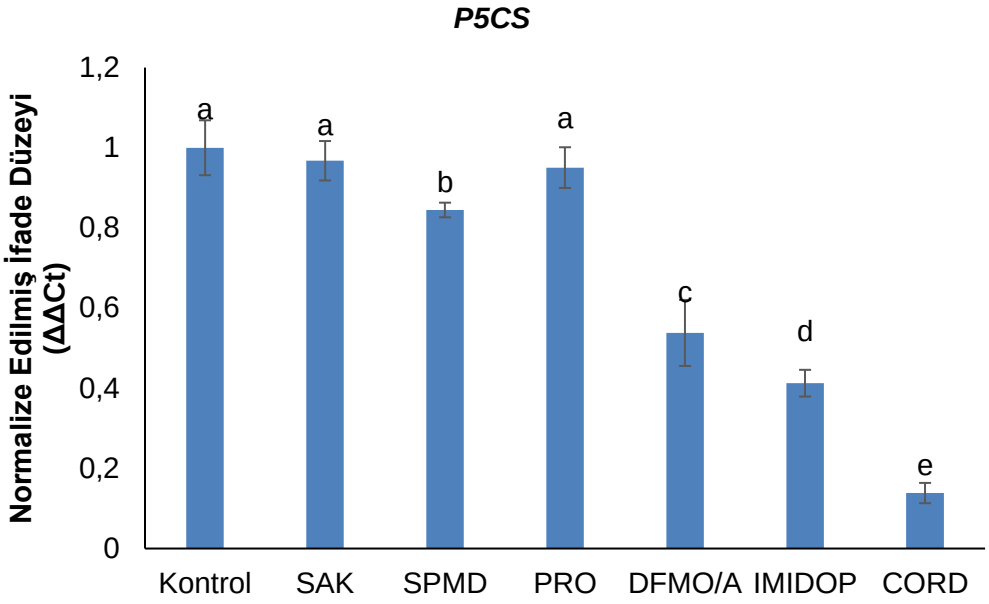
4.3. Dışarıdan Uygulanan Osmolitler ve İnhibitörlerin Gen İfadeleri Üzerine Etkileri

Osmotik stres koşulları altında dıştan uygulanan osmolitler (prolin, sakkaroz ve spermidin) ile hücresel osmolitler (prolin, poliamin, şeker) ve ABA metabolizması arasındaki olası etkileşimin hangi genlerle ilişkili olduğu hakkında veriler elde etmek amacıyla dıştan uygulanan osmolitlerin ve bazı osmolit inhibitörlerinin, prolin, sakkaroz, poliamin ve ABA ile ilgili gen ifadeleri üzerine etkisileri belirlenmiştir.

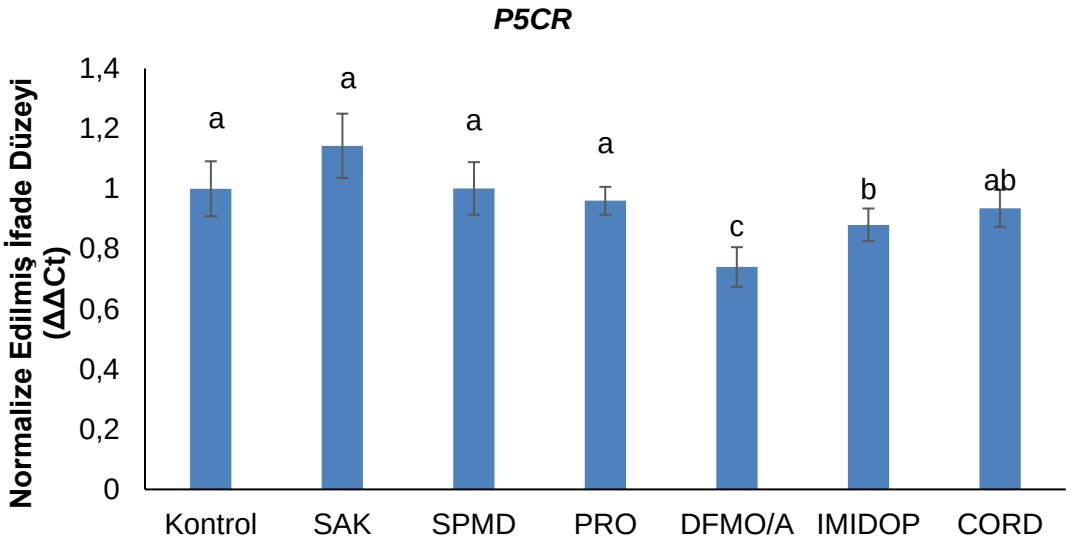
4.3.1. Prolin Metabolizmasında Görevli Gen İfadeleri Üzerine Uygulamaların Etkileri

Prolin sentez ve yıkımda görevli *P5CS, P5CR* ve *ProDH* genlerin ifade düzeyleri qPCR ile incelenmiştir. Uygulama sonuçları *P5CS* geninin ifade düzeyi değişimleri açısından incelendiğinde, sakkaroz ve prolin uygulamalarında kontrol grubuna kıyasla fark bulunamamıştır (Şekil 8). Spermidin uygulaması genin ifade düzeyini kontrol grubuna göre önemli biçimde azaltmıştır. İnhibitör uygulamaları da benzer biçimde *P5CS* gen ifade düzeyini azaltmıştır. Genin ifade düzeyinde en büyük artış cordisepin uygulamasında tespit edilmiştir. Poliamin (DFMA+DFMO) ve sakkaroz (İmidodifosfat) sentez inhibitörleri ise cordisepine kıyasla ifade düzeyini daha az etkilemişlerdir (Şekil 8). *P5CR* geninin ifade düzeyindeki değişimler ele alındığında ise prolin, imidodifosfat ve DFMA+DFMO uygulamaları sonucu *P5CR* geninin ifade düzeyinde kontrol grubun göre önemli azalmalar tespit edilmiştir (Şekil 9). Diğer uygulamalar *P5CR* ifade düzeyinde kontro grubuna kıyasla önemli bir fark oluşturmamıştır. Prolinin parçalanmasında rol oynayan bir gen olan *ProDH'ın* ifade düzeyi ele alındığında ise sakkaroz, prolin, poliamin ve DFMA+DFMO uygulamarı ile *ProDH* geninin ifade düzeyinin kontrol grubuna göre önemli derecede azaldığı belirlenmiştir (Şekil 10). İmidodifisfat

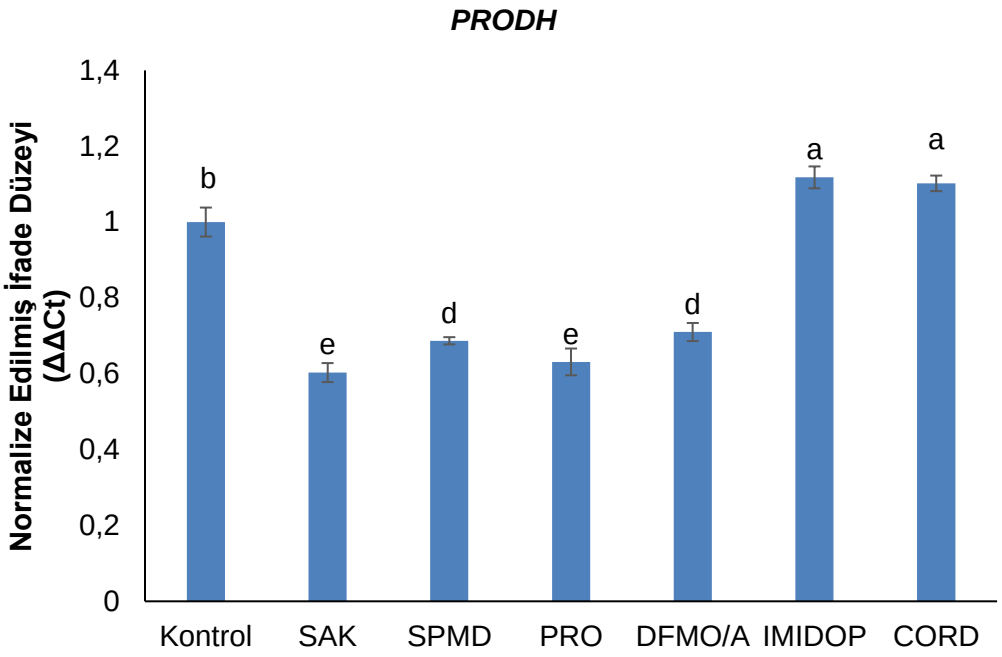
ve cordisepin uygulamalarında ise *ProDH* geninin ifade düzeyi kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde artış göstermiştir (Şekil 10).



Şekil 8. Uygulamaların *P5CS* geninin ifade seviyesi üzerine etkisi. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir. Aynı harfle gösterilen kolonlar arasındaki fark %5 ($P<0.05$) seviyesinde önemsizdir. SAK: Sakkaroz, SPMD: Spermidin, PRO: Prolin, DFMA/O: DFMA+DFMO, IMIDOP: İmidodifosfat, CORD: Cordisepin



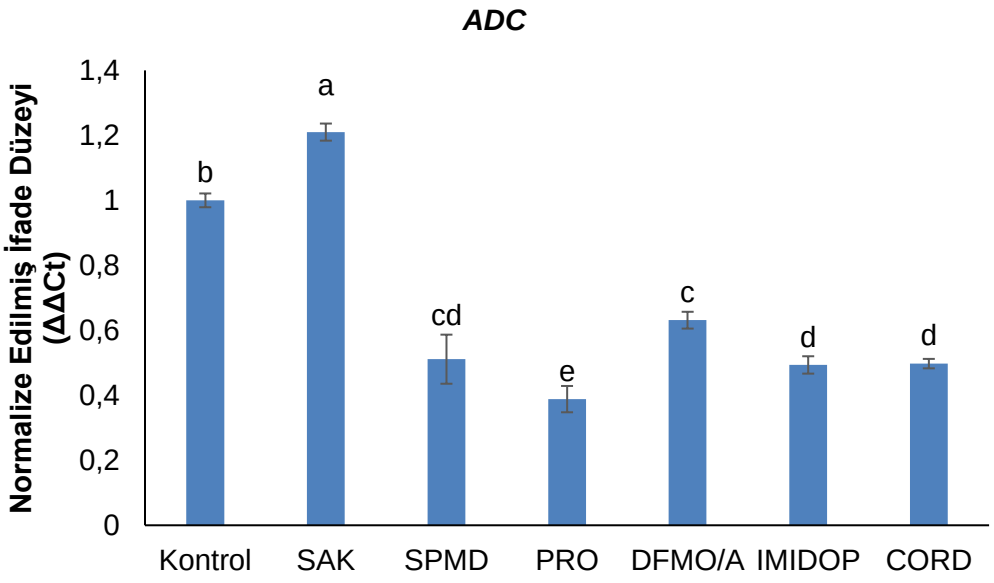
Şekil 9. Uygulamaların *P5CR* geninin ifade seviyesi üzerine etkisi. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir. Aynı harfle gösterilen kolonlar arasındaki fark %5 ($P<0.05$) seviyesinde önemsizdir. SAK: Sakkaroz, SPMD: Spermidin, PRO: Prolin, DFMA/O: DFMA+DFMO, IMIDOP: İmidodifosfat, CORD: Cordisepin



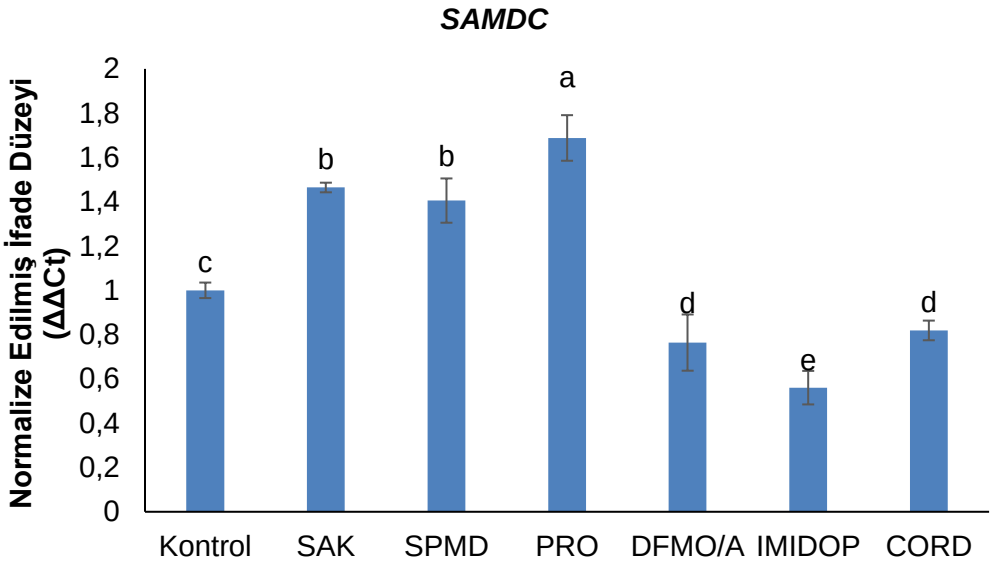
Şekil 10. Uygulamaların *ProDH* geninin ifade seviyesi üzerine etkisi. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir. Aynı harfle gösterilen kolonlar arasındaki fark %5 ($P<0.05$) seviyesinde önemsizdir. SAK: Sakkaroz, SPMD: Spermidin, PRO: Prolin, DFMA/O: DFMA+DFMO, IMIDOP: İmidodifosfat, CORD: Cordisepin

4.3.2. Poliamin Metabolizmasında Görevli Gen İfadeleri Üzerine Uygulamaların Etkileri

Bu kapsamda *ADC*, *SAMDC*, *DAO* ve *PAO* genlerinin ifade düzeyleri üzerinde osmolitlerin ve osmolit biyosentez inhibitörlerinin etkileri incelenmiştir. *ADC* geninin ifade düzeyinin sakkaroz uygulamasıyla arttığı, spermidin ve prolin uygulamalarıyla azaldığı belirlenmiştir (Şekil 11). İnhibitör uygulamaları da spermidin ve prolin uygulamalarına benzer olrak *ADC* gen ifade düzeyini kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde azaltmıştır (Şekil 11). En düşük gen ifade seviyeleri cordisepin ve imidodifosfat uygulamaları sonucu belirlenmiştir. *SAMDC* geni ele alındığında ise, sakkaroz, spermidin ve prolin uygulamaları sonucu genin ifade düzeyinde kontrol grubuna göre önemli artışlar tespit edilmiştir (Şekil 12). En yüksek artış prolin uygulaması ile gerçekleşmiştir. İnhibitör uygulamaları ise SAMDC geninin ifade düzeyini kontrol grubuna kıyasla önemli oranda düşürmüştür. Gen ifade seviyesinde meydana gelen en fazla azalma imidodifosfat uygulaması sonucu gerçekleşmiştir (Şekil 12).

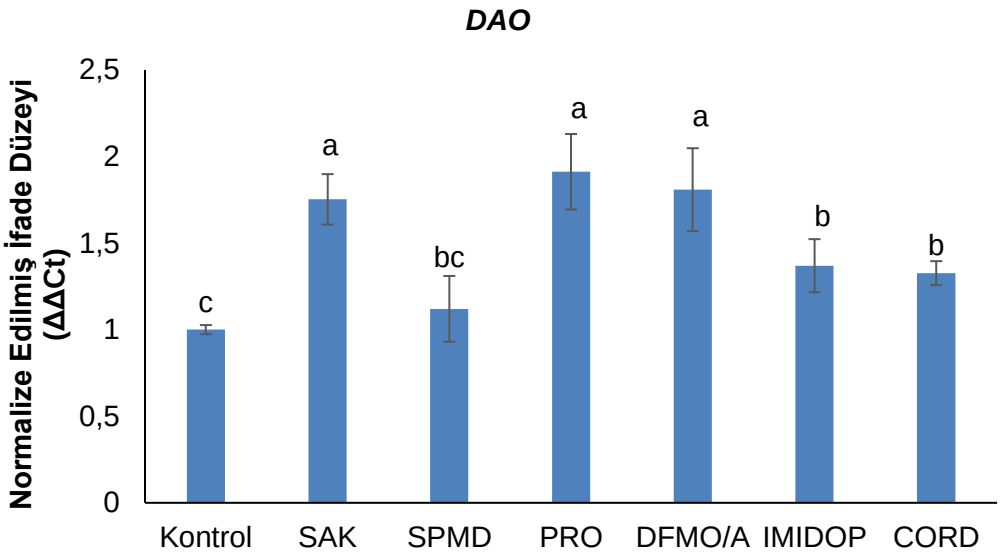


Şekil 11. Uygulamaların *ADC* geninin ifade seviyesi üzerine etkisi. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir. Aynı harfle gösterilen kolonlar arasındaki fark %5 ($P<0.05$) seviyesinde önemsizdir. SAK: Sakkaroz, SPMD: Spermidin, PRO: Prolin, DFMA/O: DFMA+DFMO, IMIDOP: İmidodifosfat, CORD: Cordisepin

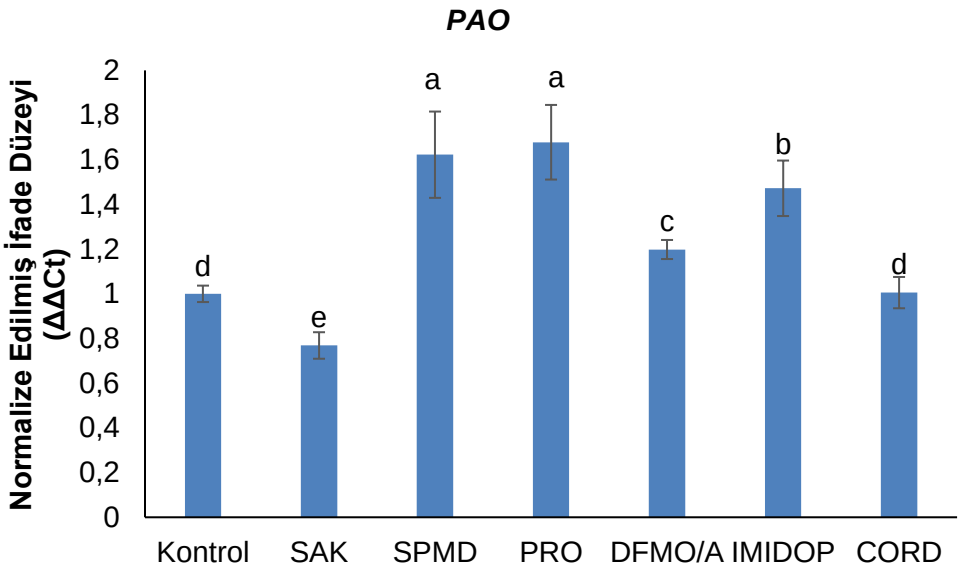


Şekil 12. Uygulamaların *SAMDC* geninin ifade seviyesi üzerine etkisi. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir. Aynı harfle gösterilen kolonlar arasındaki fark %5 ($P<0.05$) seviyesinde önemsizdir. SAK: Sakkaroz, SPMD: Spermidin, PRO: Prolin, DFMA/O: DFMA+DFMO, IMIDOP: İmidodifosfat, CORD: Cordisepin

DAO geni ifade düzeyi üzerine osmolit ve osmolit sentez inhibitörlerinin etkileri ele alındığında; Spermidin uygulaması hariç diğer tüm uygulamalarda genin ifade düzeyinin kontrol grubuna göre arttığı belirlenmiştir (Şekil 13). Spermidin uygulaması sonucu kontrol grubuna göre önemli bir fark bulunamamıştır. *PAO* geninin ifade düzeyi ele alındığında, sakkaroz uygulamasıyla genin ifade düzeyinin kontrol grubuna göre azaldığı belirlenmiştir (Şekil 14). Spermidin ve prolin uygulamalarında ise kontrol grububa kıyasla önemli artışlar tespit edilmiştir. İnhibitör uygulamalarından DFMA+DFMO ve imidodifosfat uygulamalarının *PAO* gen ifadesini kontrol grubuna göre daha fazla teşvik ettiği belirlenirken, cordisepin uygulamasının bir fark oluşturmadığı gözlenmiştir (Şekil 14).



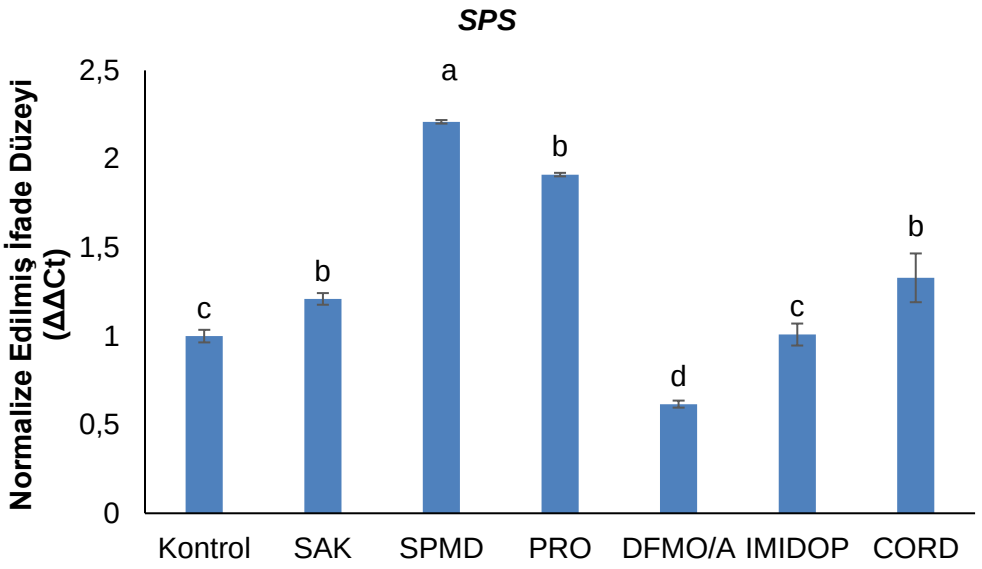
Şekil 13. Uygulamaların *DAO* geninin ifade seviyesi üzerine etkisi. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir. Aynı harfle gösterilen kolonlar arasındaki fark %5 ($P<0.05$) seviyesinde önemsizdir. SAK: Sakkaroz, SPMD: Spermidin, PRO: Prolin, DFMA/O: DFMA+DFMO, IMIDOP: İmidodifosfat, CORD: Cordisepin



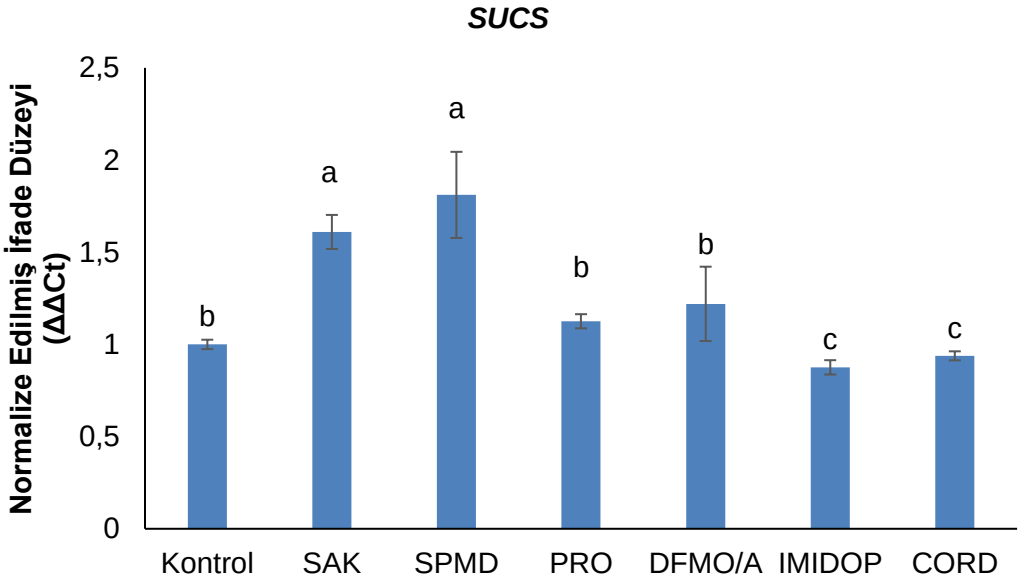
Şekil 14. Uygulamaların *PAO* geninin ifade seviyesi üzerine etkisi. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir. Aynı harfle gösterilen kolonlar arasındaki fark %5 ($P<0.05$) seviyesinde önemsizdir. SAK: Sakkaroz, SPMD: Spermidin, PRO: Prolin, DFMA/O: DFMA+DFMO, IMIDOP: İmidodifosfat, CORD: Cordisepin

4.3.3. Sakkaroz Metabolizmasında Görevli Gen İfadeleri Üzerine Uygulamaların Etkileri

Sakkarozun biyosentezinde görev alan *SPS* ve *SUCS* genlerinin ifade düzeyleri üzerine dıştan uygulanan osmolit ve osmolit inhibitörlerinin etkileri incelenmiştir. *SPS* geninin ifade düzeyinin osmolit (sakkaroz, spermidin ve prolin) muameleri sonucu kontrol grubuna göre önemli ölçüde arttığı saptanmıştır (Şekil 15). Osmolitler arasında en yüksek gen ifade seviyesi spermidin uygulaması sonucu belirlenmiştir. İnhibitor uygulamalarından DFMA+DFMO uygulaması *SPS* gen ifade düzeyini düşürürken, imidofosfat uygulaması ise bir değişime yol açmamıştır (Şekil 15). Cordisepin uygulaması ise *SPS* geninin ifade düzeyini kontrol grubuna göre artırmıştır. *SUCS* geninin ifade düzeyi ise sakkaroz ve spermidin uygulamaları ile kontrol grubuna göre artarken, prolin ve DFMA+DFMO uygulamalarıyla gen ifade seviyesi değişiklik göstermemiştir (Şekil 16). İmidodifosfat ve cordisepin uygulamarı ise gen ifae düzeyini kontrol grubuna göre önemli biçimde azaltmıştır.



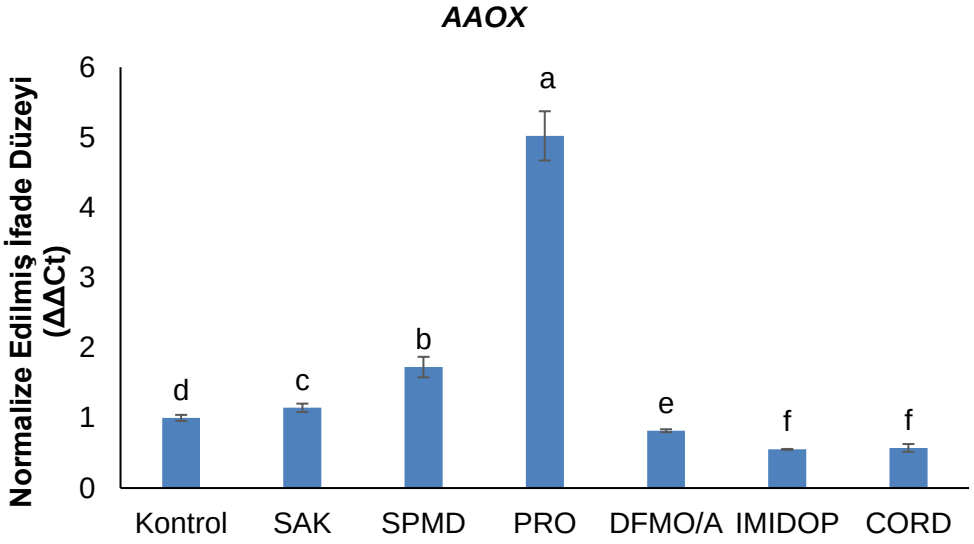
Şekil 15. Uygulamaların *SPS* geninin ifade seviyesi üzerine etkisi. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir. Aynı harfle gösterilen kolonlar arasındaki fark %5 ($P<0.05$) seviyesinde önemsizdir. SAK: Sakkaroz, SPMD: Spermidin, PRO: Prolin, DFMA/O: DFMA+DFMO, IMIDOP: İmidodifosfat, CORD: Cordisepin



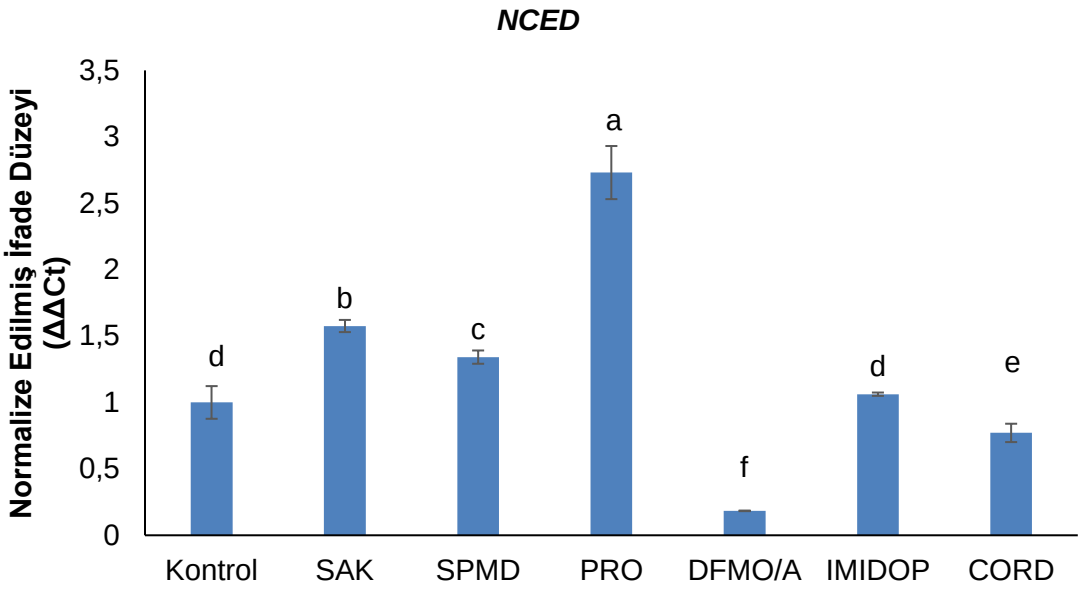
Şekil 16. Uygulamaların *SUCS* geninin ifade seviyesi üzerine etkisi. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir. Aynı harfle gösterilen kolonlar arasındaki fark %5 ($P<0.05$) seviyesinde önemsizdir. SAK: Sakkaroz, SPMD: Spermidin, PRO: Prolin, DFMA/O: DFMA+DFMO, IMIDOP: İmidodifosfat, CORD: Cordisepin

4.3.4. Absisik Asit Metabolizmasında Görevli Gen İfadeleri Üzerine Uygulamaların Etkileri

Dışarıdan uygulanan osmolitler ve osmolit sentez inhibitörlerinin Abisisik asit (ABA) biyosentezinde görev yapan *AAOX* ve *NCED* genlerinin ifade düzeyleri üzerindeki etkileri de araştırılmıştır. *AAOX* geninin iade düzeyi osmolit uygulamaları ile uyarılmılmıştır (Şekil 17). En yüksek gen ifade düzeyi prolin uygulaması sonucu meydana gelmiştir. İnhibitör uygulamaları ise *AAOX* gen ifade seviyesini kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde azaltmıştır (Şekil 17). *NCED* geninin ifade düzeyi incelendiğinde; dışarıdan uygulanan osmolitler söz konusu genin ifade düzeyini artırdığı tespit edilmiştir (Şekil 18). DFMA+DFMO ve cordisepin İnhibitör uygulamalarının *NCED* gen ifade düzeyini kontrol grubuna göre azalttığı belirlenmiştir.



Şekil 17. Uygulamaların *AAOX* geninin ifade seviyesi üzerine etkisi. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir. Aynı harfle gösterilen kolonlar arasındaki fark %5 ($P<0.05$) seviyesinde önemsizdir. SAK: Sakkaroz, SPMD: Spermidin, PRO: Prolin, DFMA/O: DFMA+DFMO, IMIDOP: İmidodifosfat, CORD: Cordisepin



Şekil 18. Uygulamaların *NCED* geninin ifade seviyesi üzerine etkisi. Kolonlar üzerindeki barlar standart sapmayı göstermektedir. Aynı harfle gösterilen kolonlar arasındaki fark %5 ($P<0.05$) seviyesinde önemsizdir. SAK: Sakkaroz, SPMD: Spermidin, PRO: Prolin, DFMA/O: DFMA+DFMO, IMIDOP: İmidodifosfat, CORD: Cordisepin

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Yaprak kıvrılması sebebiyle yaprak alanının ve transpirasyonun azalması, etkili bir kuraklık sakınma mekanizması olarak kabul edilir (Kadioglu vd., 2012). Bununla birlikte, uzun süreli yaprak kıvrılması verim kaybına neden olabilir. Bu nedenle, yaprak kıvrılmasındaki bir azalma çevresel stres altındaki bitkiler için faydalı olabilir. Osmolitlerin (sakkaroz, prolin ve poliaminler) dışarıdan uygulamaları sonucu yaprak kıvrılmasını geciktirdiği Kadıoğlu ve arkadaşları tarafında yapılan çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur (Saruhan vd., 2006; Kadıoğlu ve Terzi, 2007; Kadioglu vd., 2012). Bu proje çalışması ile yaprak kıvrılmasının geciktirilmesinde hangi osmolit/osmolitlerle ilgili genlerin daha etkili olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle mevcut projenin amacı, osmotik stres koşulları altında dıştan uygulanan osmolitler (prolin, sakkaroz ve spermidin) ile hücresel osmolitler (prolin, poliamin, şeker) ve ABA metabolizması arasındaki olası etkileşimin hangi genlerle ilişkili olduğu hakkında veriler elde etmektir.

Kuraklık stresinden etkilenen ve bitkinin su durumunu gösteren önemli bir parametre yaprak su potansiyelidir (Ψ). Yaprak su potansiyelinin kuraklık stresi için iyi bir indikatör olduğu bilinmektedir (Shaw vd., 2002). Benzer şekilde kuraklık stresi altındaki çeltik kültivarlarında yapılan bir çalışmada yaprak su potansiyelinin -0.5 MPa'dan -2 MPa'a düştüğü rapor edilmiştir (Sharma ve Dubey, 2005). Yine buğdayda yapılan bir çalışmada kuraklık stresinin yaprak su potansiyelini kontrol bitkilerinde -0.63 MPa'dan -2 MPa'a düşürdüğü kaydedilmiştir (Siddique vd., 2000). Yaprak kıvrılması, yaprak su içeriği ile yakından ilişkilidir ve bu nedenle, mevcut çalışmada kuraklık stresi koşulları altında yaprak su potansiyeli ölçülmüştür. Mevcut çalışmada dışarıdan sakkaroz uygulaması sonucu yaprak su potansiyelinin kontrol grubuna kıyasla önemli derecede arttığı yaprak kıvrılma derecesinin de azaldığı belirlenmiştir. Bilindiği gibi karbohidrat metabolizması kuraklık stresiyle güçlü bir şekilde etkilenir. Su stresine maruz bırakılan bitkiler, şeker ve polioller ve rafinoz ailesi oligasakkaritler gibi şeker türevlerini biriktirirler (Valliyodan ve Nguyen, 2006; Toldi vd., 2009). Bu ozmolitlerin birikmesi hücredeki su dengesinin devamlılığını sağlayarak bitkilerin dehidrasyona toleransına yardım ederler (Choluj vd., 2008; Costa vd., 2008). Bilindiği gibi, şekerler hem hücresel metabolik durum hem de abiyotik stres tepkileriyle ilişkili olarak sinyal molekülleri olarak önemli rol oynarlar (Rolland ve ark. 2006). Önceki çalışmalar, dıştan uygulanan sakkarozun, *Arabidopsis thaliana* fideleri ve salatalık yapraklarında antioksidan sistemi indükleyerek çeşitli abiyotik streslerin zararlarını hafiflettiğini göstermiştir (Qiu vd., 2014; Cao ve ark., 2015). Kaynak yapraklardaki karbonhidrat metabolizmasının bir diğer önemli bileşeni sakkaroz fosfat sentaz (SPS) dır. Kuraklık / ılıman su stresine maruz kalan bitkilerin yapraklarındaki SPS aktivitesinde bir azalma bildirilmiştir

(Gupta ve Kaur 2005). Çalışmamızda da *SPS* gen ifadesinin ekzojen sakkaroz uygulamasıyla kontrol grubuna kıyasla artış gösterdiği belirlenmiştir. Sakkaroz sentaz (SUCS) geninin de çeştli abiyoltik streslerde uyarıldığı bilinmektedir (Gupta ve Kaur, 2005). Mecvut çalışmada dışarıdan uygulanan sakkarozun, *SUCS* geninin ifade düzeyini önemli ölçüde uyardığı görülmektedir. Dışarıdan uygulanan sakkaroz, kendi içsel sentezini uyarmaktadır. Bu durum da, bitkide içsel bir osmotik düzenlemeyle su içeriğinin belirli bir düzeyde tutulmasını ve yaprak kıvrılmasının gecikmesini sağlamış olabilir. Bilindiği gibi bitkiler biyotik ve abiyotik streslere maruz kaldığında, prolin birikimi bitkilerin stres toleransına katkıda bulunur (Ashraf ve Foolad, 2007). Bitkilerin stres toleransını arttırmak için bitkilere dışarıdan uygulanan koruyucu bileşiklerden bir diğeri de prolindir. Prolin sadece bir osmolit değil aynı zamanda metal bir şelatör, bir antioksidan bileşik ve stres sırasında bir sinyal molekülüdür (Hayat vd., 2012). Bununla beraber çalışmamızda, dışarıdan sakkaroz uygulasıyla prolin sentezinde görev alan iki önemli gen olan *P5CS* ve *P5CR* gen ifade düzeylerinin önemli biçimde etkilenmediği, öte yandan prolinin yıkımından sorumlu *ProDH* geninin ifade düzeyinin azaldığı belirlenmiştir. Sakkaroz uygulamasının prolin yıkımını azaltarak içsel prolin dengesine katkıda bulabileceği sonucuna varılmıştır. Nitekim, dışarıdan uygulanan sakkarozun çeltik ve *Brassica napus* bitkilerinde prolin içeriğinin artışına katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Kavi Kishor vd., 2005). Bununla birlikte çeşitli hormonlar ve şekerlerin katılımıyla bitkilerinde prolin yıkımının düzenlenebileceği de ifade edilmektedir (Kavi Kishor ve Sreenivasulu, 2014).

ABA birikimi, stomaların kapanması, osmoprotektanların sentezi ve antioksidan sistemin indüksiyonu gibi nihayetinde fizyolojik değişiklikler olan bazı yanıt mekanizmalarını başlatabilir (Akpinar vd., 2012). Buna ilaveten yaprak kıvrılmasını da geciktirebildiği grubumuzca yapılan çalışmalarla belirlenen ABA'nın (Sezgin vd., 2018) sentezinde görevli olan *9-cis-epoksikarotenoid dioksigenaz (NCED)* ve *ABA aldehid oksidaz (AAOX)* genlerinin ifade düzeylerinin proje çalışmalarımız sırasında dıştan uygulanan sakkaroz uygulamasıyla arttığı belirlendi. Bu artışın da içsel ABA'nın miktarını arttıracağı ve stoma açıklığının azalmasıyla beraber, yaprak su kaybının azalmasına yol açacağı ve buna paralel olarak yaprak kıvrılmasını geciktirtirdiği düşünülmektedir. Sakkarozun ABA sentezini düşük konsantrasyonlarda uyardığı ve tohumları kuraklık stresine karşı daha dayanıklı kıldığı ya da stressiz şartlar altında ABA ile ilişkili bir biçimde radikula gelişimini artırdığı bazı çalışmalarla da rapor edilmiştir (Finkelstein, 2013).

Poliaminler, kuraklık toleransı için önemli olduğu bilinen ozmotik olarak aktif maddelerdir. Pliaminlerin yaprak kıvrılmasının geciktirilmesinde öncemli rolleri olduğu daha önceki çalışmalarda ifade edilmiştir (Kadioğlu vd., 2002; Saruhan vd., 2006). Mevcut proje çalışmamızda da sakkaroz muamelesinin poliamin sentez ve yıkımında görev alan genlerin (*Arginin dekarboksilaz* (*ADC*), *S-adenosilmetiyonin dekarboksilaz* (*SAMDC*)*, diamin oksidaz*

(*DAO), poliamin oksidaz* (*PAO*)) ifade düzeyleri incelenmiştir. Sakkaroz muamelesi ile *ADC, SAMDC* ve *DAO* genleri uyarılırken, *PAO* geni baskılanmıştır. Sakkaroz uygulaması sonucu Spermin ve spermidin sentezinde fonksiyon gören *SAMDC* geninin ifade düzeyinin artışı ve bu poliaminlerin yıkımında rol oynayan *PAO* geninin ifade seviyesinin azalması ile spermin ve spermidin seviyelerinin artması teşvik edilirken, putresin sentezinde (*ADC*) ve yıkımda (*DAO*) görev alan genlerin ifade düzeylerindeki artış ile putresin seviyesi bir dengede tutulmaktadır. Sonuç olarak dıştan uygulanan sakkarozun stres koşullarında poliamin havuzunun homeostazını sağladığı düşünülmektedir. Dışarıdan 20 mM sakkaroz uygulanan *A. thaliana* bitkilerinde poliamin içeriklerinin arttığı rapor edilmiştir (Majumdar vd., 2016). Benzer bir biçimde yulaf bitkilerinde putrescin ve spermidinin sakkaroz teşvikli artışı da belirlenmiştir (Flores ve Galston,1984).

İçsel sakkaroz sentezi inhibitörü imidodifosfat uygulamasının ardından yaprak su potansiyelinin, kontrol grubuna göre önemli derecede azalışı ve yaprak kıvrılmasındaki artış hücre içi dengenin bozulduğuna ve osmotik stresin arttığını göstermektedir. Sakkaroz sentezin de görevli *SPS* ve *SUCS* genlerinin ifade düzeylerinin imidodifosfat uygulamasıyla azalması, benzer biçimde prolin sentezi genleri olan *P5CS* ve *P5CR*'nin ifade düzeylerinin imidodifosfat ile düşüşü ve prolin yıkımının *ProDH* ile teşviki, buna ilaveten poliamin sentez genleri olan *ADC* ve *SAMDC* ifade seviyelerinin azalması ve yıkım genlerinin (*PAO* ve *DAO*) inhibitör ile uyarılması ve ABA sentezinin *AAOX* genin ifade seviyesinin düşmesi ile azalması, içsel sakkarozun hücre içi dengede ne kadar önemli olduğunu, osmotik düzenlenmenin sağlanmasında anahtar bir rolü olabileceğini göstermektedir. Bir osmotik düzenleyici olarak sakkarozun hücresel homeostasın sağlamasındaki önemli rolü çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur (Singh vd., 2015). Yaptığımız çalışmalar neticesinde, dışarıdan uygulanan sakkarozun, içsel sakkarozun üretimi teşvik ederken, içsel prolin ve poliamin dengesinin kurulmasında rol oynadığı ve içsel ABA artışını sağlayarak su kaybını ve sonuç olarak yaprak kıvrılma derecesini azalttığı düşünülmektedir.

Çalışmamızda ekzojen prolin uygulaması sonucu yaprak su potansiyeli kontrol grubuna kıyasla artarken, yaprak kıvrılması ise azalmıştır. Bu değişimin sakkarozla ilişkisini detaylı bir biçimde ortaya koymak için prolin uygulaması yapılmış bitkilerin *SPS* ve *SUCS* gen ifade düzeyleri incelenmiştir. Prolin uygulamasının *SPS* genini uyardığı, *SUCS* geni üzerinde etkisi olmadığı gözlenmiştir. Böylece içsel sakkaroz miktarının ayarlanmasında prolinin rolü olabileceği fikri akla gelmektedir. Daha önce bir çalışmada Moustakas vd. (2011) ekzojen prolinin *A. thaliana* bitkisinde endojen şeker içeriğini kuraklık stresi şartları altında artırdığını rapor etmiştir. Bir başka osmolit olan poliminlerin metabolizması genler açısında ele alındığında ise dışarıdan uygulanan prolinin, *ADC* geninin ifade seviyesini azalttığı, *DAO* geninin ifade seviyesini de artırarak bitkinin putrescin seviyesini azaltması için metabolizması

üzerinde düzenleyici bir etki yaptığı görülmektedir. Buna ek olarak, *SAMDC* ve *PAO* genlerinin ifade seviyelerini de benzer oranlarda (2 kat artış) uyarmak suretiyle spermin ve spermidin havuzlarının dengesini de koruduğu anlaşılmaktadır. Yaptığımız çalışmada dıştan uygulanan prolin, poliamin metabolizmasını spermin-spermidin yönüne doğru kaydırmıştır. Çalışmamıza benzer olarak dışarıdan uygulanan prolin, bezelye bitkilerinin poliamin içeriklerinde NaCl stresi koşullarında artışa neden olmuştur (Shahid vd 2014).

Ekzojen prolin uygulamasının osmotik stres şartları altında endojen prolinin metabolizması üzerindeki etkisi *P5CS*, *P5CR* ve *ProDH* genlerinin ifade düzeyleri incelenerek ele alınmıştır. Mevcut çalışmamızda ekzojen prolin, biyosentez yolu üzerine etki etmek yerine daha çok *ProDH* geninin ifade düzeyini düşürerek içsel prolinin yıkımını azaltarak, miktarını artırmış olabilir. Ekzojen prolinin, içsel prolin miktarını artırdığına dair çeşitli çalışmalar mevcuttur (Demiralay vd., 2017). Nounjan vd. (2012) prolin uygulanan çeltik bitkilerinde tuz stresi şartları altında *P5CS* ve *P5CR* genlerinin arttığını rapor etmişlerdir.

Dışarıdan uygulanan prolinin ABA biyosentez genleri olan *AAOX* ve *NCED* genlerinin ifade düzeyleri üzerindeki etkisi incelenmiştir. Dıştan uygulanan prolin, *AAOX* ve *NCED* genlerini uyarmıştır. Bu durumda prolin, içsel ABA'nın artışı teşvik etmiş olabileceği akla gelmektedir. Daha önceki bazı çalışmalarda kök uzaması için gereken ABA'nın sentezi için ortamda yeterli miktarda prolinin bulunmasının gerekliliği ortaya konmuştur (Kavi Kishor vd., 2015). Sonuç olarak, mevcut çalışmada dıştan uygulanan prolin, endojen sakkaroz, spermidin ve prolin içeriklerini artırmak suretiyle osmoregulasyon sağlamak suretiyle yaprak su potansiyelini korumuş olabilir. Buna ilaveten endojen prolin, ABA içeriğini artırmak suretiyle stomataları kapatarak su kaybını azaltarak, yaprak kıvrılmasını geciktirmiş olabilir. İçsel prolin içeriğini azaltmak için cordisepin inhibitörü kullanıldığında *P5CS* geninin transkriptlerinin azalması, *ProDH* geninin aktive olması neticesinde içsel prolin içeriğinde meydana gelen olası azalma, *SUCS* geninin ifade düzeylerinin düşmesi sonucu sakkaroz içeriğinde meydana gelebilecek azalma, *AAOX* ve *NCED* genlerinin ifade seviyelerinin düşmesi ile ABA seviyesinin düşmesi, *ADC*, *SAMDC* ifade düzeylerinin düşmesi ve *DAO* geninin ifade düzeyinin artması ile poliamin içeriğindeki azalma yaprak kıvrılma derecesinin artması ve su potansiyelinin azalmasıyla sonuçlanmıştır. Bütün bu veriler de yaprak kıvrılmasının düzenlenmesinde prolinin önemini işaret etmektedir.

Yaprak kıvrılmasındaki rolü daha önceki çalışmalarımızla da ortaya konan poliaminlerden biri olan spermidin uygulaması sonucunda, *SPS* ve *SUCS* genlerinin ifade düzeylerinde önemli derece bir artış meydana gelmiştir. Bu da içsel sakkarozun artmasına yol açabilir. Dışarıdan uygulanan spermidinin, tuz stresi koşullarındaki domates bitkilerinde çözünebilir şekerlerin içeriğini arttırdığı belirlenmiştir (Zhang vd., 2014). Benzer biçimde spermidin uygulanan *Vitis vinifera* çeşitlerinin yapraklarındaki toplam çözünebilir şeker

içeriklerinin arttığı rapor edilmiştir (Aziz, 2003). Poliamin sentez genlerinden *P5CS*'nin ifade seviyesi spermidinle azalırken, *P5CR* genin de bir değişim gözlenmemiştir. Aksine *ProDH* geninin ifade düzeyi azalmıştır. Bu durum ekzojen spermidinin, içsel prolinin miktarının dengede kalmasında ya da artmasında rolü olabileceğini düşündürmektedir. Puyang vd. (2016) tarafından yapılan bir çalışmada dışarıdan uygulanan spermidinin tuz stresi koşulları altındaki *Poa pratensis* bitkisinde prolin içeriğini artırdığını göstermektedir. Bu çalışmaya benzer olarak, dışarıdan uygulanan spermidinin, tuz stresi koşullarındaki domates bitkilerinde prolin içeriğini arttıdığı belirlenmiştir (Zhang vd., 2014).

Mevcut çalışmada dışarıdan uygulanan spermidin, *SAMDC* ve *PAO*'ı uyarırken *ADC*'ı baskılamıştır. Bu durum putresin sentezini azaltırken, poliamin sentezini spermidin ve spermine doğru kaydırmakta, bir diğer taraftan bu iki poliaminin miktarlarını dengede tutmak için *PAO* genini uyarmaktadır. Ekzogen spermidinin, karmaşık bir poliamin dengesinin yöneticisi durumunda olduğu düşünülmektedir. Tuz stresi altındaki çeltik bitkilerinde spermidin uygulamasının SAMDC ve ODC enzim aktivitelerini teşvik ettiği, spermin ve spermidin içeriklerini artırdığı rapor edilmiştir (Li vd., 2016).

Dışarıdan uygulanan spermidinin ABA metabolizması üzerindeki etkisi incelendiğinde, *AAOX* ve *NCED* genlerinin ifade düzeyini arttığı görülmektedir. Bu artışlar büyük olasılıkla içsel ABA miktarını da artırmış ve mısır bitkileri stomalarını kapatmak suretiyle su kaybını azaltıcı bir mekanizmayı devreye sokmuş olabilir. Nitekim, ekzojen spermidinin, buğday tanelerinde içsel ABA miktarını oldukça fazla artırdıkları bilirnmektedir (Liu vd., 2013).

Özetle dıştan uygulaman spermidin, sakkaroz ve prolin sentezini uyarırken, poliamin sentezini spermin ve spermidine doğru kaydırmıştır. Böylece bir içsel denge kurarak su içeriğini korumayı hedeflediği düşünülmektedir. Bu içsel düzenlemeler sayesinde yaprak kıvrılmasının da geciktirilmesi söz konusu olmuş olabilir. Spermidinin yaprak kıvrılmasında ne derece önemi olduğunu daha iyi kavramak için poliaminlerin sentez inhibitörleri olan DFMA ve DFMO bitkilere birlikte verilmiştir. Uygulamayı takiben *SPS* geninin ifade seviyesi düşmüştür. *SUCS* geni ise etkilenmemiştir. Bu durum içsel sakkarozun azalmasına yol açmış olabilir. *ADC* ve *SAMDC* genleri baskılanırken, *PAO* ve *DAO* genleri uyarılmıştır. Bunun sonucunda poliamin sentezi durma noktasına geldiği gibi, mevcut poliaminlerin de yıkımı söz konusu olabilir. Diğer taraftan içsel prolin sentezinde görev alan *P5CS* VE *P5CR* genlerinin ifade düzeyleri DFMA+DFMO uygulamasıyla azalmıştır. Benzer bir biçimde *ProDH* geninin ifade düzeyi de azalmıştır. Bu durumu içsel prolinin azalmasına da yol açmış olabilir. DFMA+DFMO uygulamaları, *AAOX* ve *NCED* genlerinin baskılanmasına yol açmıştır. Böylece ABA içeriği de azalmış olmalıdır. Tüm bu olayların neticesinde bitki su kaybetmeye devam etmiş ve süregelen içsel dengesizlikler sebebiyle bir savunma mekanizması olan yaprak kıvrılmasını hızlandırmış olabilir.

Sonuç olarak, sakkaroz, prolin ve spermidinin yaprak kıvırlmasının düzenlenmesinde oldukça önemli oldukları, herbirinin bir diğerinin metabolik yolu üzerinde pozitif veya negatif düzenlemeler yaptığı belirlenmiştir. Kuraklık şartları altında bitki içsel dengesini korumak için bu söz konusu moleküllerin bir sinyal gibi davranarak biribirinin içsel miktalarının ayarlanmasında fonksiyon gördüğü kanaatine varılmıştır. Örneğin sakaroz, prolinin içsel dengesini sağlamak için yıkımını azaltırken, putresin sentezini teşvik etmektedir. Prolin, spermidinin sentezini teşvik edici bir rol üstlenmektedir. Spermidin ise sakkaroz sentezini uyarmaktadırlar. Bu üç osmolitin de ABA sentezini uyardığı tespit edilmiş olup, bu artışların ortak bir sinyal mekanizması ile başarılıp başarılmadığı araştırılmalıdır. Buna ilaveten düzenleyici transkripsiyon faktörlerinin rolleri de yaprak kıvrılmasının nasıl kontrol edildiğinin anlaşılması açısından önem arz etmektedir.

Bu proje ile elde ettiğimiz bulgular ışığında yaprak kıvrılmasının düzenlenmesinde ABA'nın osmolitlerin metabolizmasında düzenleyici rolü olup olmadığının, regülatör fonksiyon analizleri vb daha detaylı moleküler tekniklerle aydınlatılması önerilmektedir. Bununla beraber, mısır bitkisinde prolin ve poliamin sentezinde veya yıkımında görevli gen veya genlerin (*P5CS*, *ProDH*, *PAO*, *ADC* ve *SAMDC*) mutasyonu ve fazlaca ifade edilemeleri (overexpression) ile kıvrılma davranışlarının nasıl etkileneceğinin belirlenmesi ve bu değişimlerin diğer osmolitler üzerindeki etkisinin araştırlması da ayrı çalışma konuları olarak tarafımızdan önerilmektedir.

6. KAYNAKLAR

Agarwal, P. K., Agarwal, P., Sudhir, M. K. R., Sopory, K. 2006. “Role of DREB Transcription Factors in Abiotic and Biotic Stress Tolerance in Plants”, Plant Cell Reports, 25 (12), 1263-1274.

Agarwal, P., Jha, B. 2010. “Transcription Factors in Plants and ABA Dependent and Independent Abiotic Stress Signalling”, Biologia Plantarum, 54 (2), 201–212.

Akpinar, B. A., Avsar, B., Lucas, S. J., Budak, H. 2012. “Plant abiotic stress signaling”, Plant Signalling and Behaviour, 7, 1450–1455.

Alcazar, R., Garcia-Martinez, J. L., Cuevas, J. C., Tiburcio, A. F., Altabella, T. 2005. “Overexpression of ADC2 in *Arabidopsis* Induces dwarfism and Late-Fowering Through GA Deficiency”, Plant Journal, 43 (3), 425-436.

Alcazar, R., Marco, F., Cuevas, J. C., Patron, M., Ferrando, A., Carrasco, P., Tiburcio, A. F., Altabella, T. 2006. “Involvement of Polyamines in Plant Response to Abiotic Stress”, Biotechnology Letters, 28 (23), 1867-1876.

Alcazar, R., Altabella, T., Marco, F., Bortolotti, C., Reymond, M., Koncz, C., P. Carrasco., Tiburcio, A. F. 2010a. "Polyamines: Molecules with Regulatory Functions in Plant Abiotic Stress Tolerance", Planta, 231 (6), 1237-1249.

Alcazar, R., Planas, J., Saxena, T., Zarza, X., Bortolotti, C., Cuevas, J., Bitrian, M., Tiburcio, A. F., Altabella, T. 2010b. “Putrescine Accumulation Confers Drought Tolerance in Transgenic *Arabidopsis* Plants Overexpressing the Homologous Arginine Decarboxylase 2 Gene”, Plant Physiology and Biochemistry, 48 (7), 547-552.

Alexandratos N., Bruinsma, J. 2012. World Agriculture Towards 2030/2050: the 2012 revision. Roma: ESA-FAO.

Ali, K., Ashraf, M., Athar, H. R. 2007. "Exogenously Applied Proline at Different Growth Stages Enhances Growth of Two Maize Cultivars Grown Under Water Deficit Conditions", Pakistan Journal of Botany, 39 (4), 1133-1144.

Ali, K., Anwar, F., Ashraf, M., Saari, N., Perveen, R. 2013. "Ameliorating Effects of Exogenously Applied Proline on Seed Composition, Seed Oil Quality and Oil Antioxidant

Activity of Maize (*Zea mays* L.) Under Drought Stress", International Journal of Molecular Sciences, 14 (1), 818-835.

Allen, G. J., Chu, S. P., Harrington, C. L., Schumacher, K., Hoffmann, T., Tank, Y. Y., Grill, E., Schroeder, J. I. 2001. "A Defined Range of Guard Cell Calcium Oscillation Parameters Encodes Stomatal Movements", Nature, 411, 1053-1057.

Altabella, T., Tiburcio, A. F., Ferrando, A. 2009. Plant with Resistance to Low Temperature and Method of Production Thereof. Barcelona: Spanish patent application. WO2010/004070

Ashraf, M., Foolad, M. R. 2007. "Roles of Glycine Betaine and Proline in Improving Plant Abiotic Stress Resistance", Environmental and Experimental Botany, 59 (2), 206-216.

Aziz, A. 2003. “Spermidine and related-metabolic inhibitors modulate sugar and amino acid levels in *Vitis vinifera* L.: Possible relationships with initial fruitlet abscission”, Journal of Experimental Botany, 54, 355–363.

Bachrach, U. 2010. "The Early History of Polyamine Research”, Plant Physiology and Biochemistry, 48 (7), 490-495.

Barratt, D. H., Derbyshire, P., Findlay, K., Pike, M., Wellner, N., Lunn, J., Feil, R., Simpson, C., Maule, A. J., Smith, A. M. 2009. “Normal Growth of Arabidopsis Requires Cytosolic Invertase but Not Sucrose Synthase”, Proceedings of the National Academy of Sciences of USA, 106 (31), 13124–13129.

Bidwell, R. G. S. 1974. Plant Physiology. New York: Macmillan Publishing Com.

Bitrian, M., Zarza, X., Altabella, T., Tiburcio, A. F., Alcazar, R. 2012. “Polyamines under Abiotic Stress: Metabolic Crossroads and Hormonal Crosstalks in Plants”, Metabolites, 2 (3), 516-528.

Borsani, O., Valpuesta, V., Botella, M. A. 2003. "Developing Salt Tolerant Plants in A New Century: A Molecular Biology Approach", Plant Cell Tissue and Organ Culture, 73 (2), 101-115.

Bouchereau, A., Aziz, A., Larher, F., Martin-Tanguy, J. 1999. "Polyamines and Environmental Challenges: Recent Development", Plant Science, 140 (2), 103-125.

Bray, E. A. 1991. Regulation of Gene Expression by Endogenous ABA During Drought Stress. Physiology and Biochemistry of Abscisic Acid. Editörler: Davies, W.J., Jones, H.G. UK: Bios Scientific Publishers.

Bray, E. A. 1993. "Molecular Responses to Water Deficit", Plant Physiology, 103, 1035-1040.

Cao, Y.Y., Yang, M.T., Chen, S.Y., Zhou, Z.Q., Li, X., Wang, X. J., Bai, J.G. 2015. “Exogenous sucrose influences antioxidant enzyme activities and reduces lipid peroxidation in water-stressed cucumber leaves”, Biologia Plantarum, 59, 1, 147-153.

Castleden, C. K., Aoki, N., Gillespie. V. J., MacRae, E. A., Quick, W. P., Buchner, P., Foyer, C. H., Furbank, R. T., Lunn, J. E. 2004. “Evolution and Function of The Sucrose Phosphate Synthase Gene Families in Wheat and Other Grasses”, Plant Physiology, 135, 1753-64.

Chen, C., Chen, L., Lin, C., Kao, C. 2001. “Regulation of Proline Accumulation in Detached Rice Leaves Exposed to Excess Copper”, Plant Science, 160 (2), 283-290.

Chinnusamy, V., Jagendorf, A., Zhu, J. K. 2005. “Understanding and Improving Salt Tolerance in Plants”, Crop Science, 45, 437–448.

Choluj, D., Karwowska, R., Ciszewska, A., Jasińska, M. 2008. “Influence of long-term drought stress on osmolyte accumulation in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants”, Acta Physiologiae Plantarum, 30, 679-687.

Cona, A., Rea, G., Angelini, R., Federico, R., Tavladoraki, P. 2006. “Functions of Amine Oxidases in Plant Development and Defence”, Trends in Plant Science, 11 (2), 80-88.

Conforti, P. 2011. Looking Ahead in World Food and Agriculture: Perspectives to 2050. Roma: FAO.

Costa, R. C. L., Lobato, A. K. S., Oliveira Neto, C. F., Maia, P. S. P., Alves, G. A. R., Laughinghouse IV, H. D. 2008. “Biochemical and Physiological Responses in Two Vigna unguiculata (L.) Walp. Cultivars Under Water Stress”, Agronomy Journal, 7 (1), 98-101.

Cömertpay, G. 2008. Yerel Mısır Popülasyonlarının Morfolojik ve DNA Moleküler İşaretleyicilerinden SSR Tekniği İle Karakterizasyonu, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.

D’Agostino, L., Di Pietro, M., Di Luccia, A. 2005. “Nuclear Aggregates of Polyamines are Supramolecular Structures That Play a Crucial Role in Genomic DNA Protection and Conformation”, FEBS Journal, 272 (15), 3777-3787.

Dawood, M. G., Taie, H. A. A., Nassar, M. R. A., Abdelhamid, M. T., Schmidhalter, U. 2014. “The Changes Induced in The Physiological, Biochemical and Anatomical Characteristics of

Vicia faba by The Exogenous Application of Proline Under Seawater Stress", South African Journal of Botany, 93, 54–63.

Delauney, A. J., Verma, D. P. S. 1993. "Proline Biosynthesis and Osmoregulation in Plants", Plant Journal, 4 (2), 215-23.

Demiralay M., Altuntaş C., Sezgin A., Terzi R., Kadioğlu A., 2017. "Application of proline to root medium is more effective for amelioration of photosynthetic damages as compared to foliar spraying or seed soaking in maize seedlings under short-term drought", Turkish Journal Of Biology, 41, 649-660.

Duan, J., Li, J., Guo, S., Kang, Y. 2008. "Exogenous Spermidine Affects Polyamines Metabolism in Salinity Stressed Cucummis sativas Roots and Enhances Short-term Salinity Tolerance", Journal Plant Physiology, 165 (15), 1620-1635.

Earle, F. R., Curtis, J. J., Hubbard, J. E. 1946. "Composition of The Component Parts of The Kernel", Cereal Chemistry, 23, 504-511.

FAO. 2013. FAO Statistical Yearbook. Roma: FAO.

Fediuc, E., Lips, S. H., Erdei, L. 2005. "O-acetylserine (Thiol) Lyase Activity in Phragmites and Typha Plants Under Cadmium and NaCl Stress Conditions and The Involvement of ABA in The Stress Response", Journal of Plant Physiology, 162 (8), 865-872.

Finkelstein, R. 2013. "Abscisic Acid synthesis and response". The Arabidopsis book 11, e0166.

Flores, H. E., Galston, A. W. 1984. "Osmotic stress-induced polyamine accumulation in cereal leaves : I. Physiological parameters of the response", Plant Physiology, 75,102-109.

Galle, A., Csiszar, J., Benyo, D., Laskay, G., Leviczky, T., Erdei, L., Tari, I. 2013. "Isohydric and Anisohydric Strategies of Wheat Genotypes Under Osmotic Stress: Biosynthesis and Function of ABA in Stress Responses", Journal of Plant Physiology, 170 (16), 1389– 1399.

Galston, A. W. 1991. "On the Trail of A New Regulatory System in Plants", New Biologist, 3, 450-453

Galston, A. W., Kaur-Sawhney, R., Altabella, T., Tiburcio, A. F. 1997. "Plant Polyamines in Reproductive Activity and Aesponse to Abiotic Stress", Botanica Acta, 110 (3), 197-207.

Gerrits, N., Turk, S. C., van Dun, K. P., Hulleman, S. H., Visser, R. G., Weisbeek, P. J., Smeekens, S. C. 2001. “Sucrose Metabolism in Plastids”, Plant Physiology, 125, 926-934.

Grennan, A. K., Gragg, J. 2009. “How Sweet It Is: Identification of Vacuolar Sucrose Transporters”, Plant Physiology, 150, 1109-1110.

Groppa, M. D., Tomaro, M. L., Benavides, M. P. 2001. "Polyamines as Protectors Against Cadmium or Copper-Induced Oxidative Damage in Sunflower Leaf Discs", Plant Science, 161 (3), 481-488.

Groppa, M. D., Benavides, M. P. 2008. “Polyamines and Abiotic Stress: Recent Advances”, Amino Acids, 34 (1), 35-45.

Gujjar R. S.,Akhtar, M., Singh M. 2014. “Transcription factors in abiotic stress tolerance”, Indian Journal of Plant Physiology, 19, 4, 306–316.

Gupta, A. K., Kaur, N. 2005. “Sugar signalling and gene expression in relation to carbohydrate metabolism under abiotic stresses in plants”, Journal of Biosciences, 30, 761–776.

Gupta, K., Dey, A., Gupta, B. 2013. "Plant Polyamines in Abiotic Stress responses", Acta Pyhsiologiae Plantarum, 35 (7), 2015-2036.

Hale, M. G., Orcutt, D. M. 1987. The Physiology of Plants Under Stress. New York: John Wiley & Sons.

Hartung, W., Davies, W. J. 1991. 'Drought-Induced Changes in Physiology and ABA. Abscisic Acid: Physiology and Biochemistry. Editörler: Davies, W.J., Jones, H.G. UK: Bios Scientific Publishers Ltd.

Hayat, S., Hayat, Q., Alyemeni, M. N., Wani, A. S., Pichtel, J., Ahmad, A. 2012. “Role of proline under changing environments”, Plant Signaling and Behavior, 7, 1456-1466.

Henda, S., Handa, A. K., Hasegawa, P. M., Bessan, R. A. 1986. “Proline Accumulation and The Adaptation of Cultured Plant Cells to Water Stress”, Plant Physiology, 80 (4), 938-945.

Hoffmann, S. 2002. “Osmotic Stress Signaling and Osmoadaptation in Yeasts”, Microbiol Mol Biol Rev., 66 (2), 300-372

Hoffmann-Thoma, G., Hinkel, K., Nicolay, P., Willenbrink, J. 1996. “Sucrose Accumulation in Sweet Sorghum Stem Internodes in Relation to Growth”, Plant Physiology, 97 (2), 277-84.

Hopkins, W. G. 1995. Sayfa 423-443. Introduction to Plant Physiology. Canada: John Wiley & Sons.

Huang, M., Wu, W. 2006. "Genome Wide in Silico Identification and Experimental Confirmation of Abscisic Acid-Regulated Genes in Arabidopsis", Plant Science, 170 (5), 986–993.

Huber, S. C., Huber, J. L. 1996. "Role and Regulation of Sucrose-Phosphate Synthase in Higher Plants", Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 47, 431-444.

IPCC. 2001. Climate Change 2001: Synthesis Report. A Contribution of Working Groups I, II, and III to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Editörler: Watson, R.T., Core Writing Team. UK: Cambridge University Press.

Jimenez-Bremont, J. F., Ruiz, O. A., Rodriguez-Kessler, M. 2007. "Modulation of Spermidine and Spermine Levels in Maize Seedlings Subjected to Long-Term Salt Stress", Plant Physiology and Biochemistry, 45 (10-11), 812–821.

Kadioğlu, A., Terzi, R., Saruhan Güler, N. 2002. "Effect Of Polyamines On Leaf Rolling During Drought Stress In Ctenanthe Setosa (Rosc.) Eichler", Israel Journal of Plant Sciences, 50, 1, 19-23.

Kadıoğlu, A., Terzi, R. 2007. "A Dehydration Avoidance Mechanism: Leaf Rolling", The Botanical Review, 73 (4), 290-302.

Kadıoğlu, A. 2011. Bitki Fizyolojisi (5. Basım). Trabzon: Gündüz Ofset Matbaacılık.

Kadioğlu, A., Terzi, R., Saruhan Güler, N., Sağlam, A. 2012. "Current Advances In The Investigation Of Leaf Rolling Caused By Biotic And Abiotic Stress Factors", Plant Science, 182, 42-48.

Kavi Kishor, P. B., Sangam, S., Amrutha, R. N., Sri Laxmi, P., Naidu, K. R., Rao, K. R. S. S., Rao, S., Reddy, K. J., Theriappan, P., Sreenivasulu, N. 2005. “Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance”, Current Science, 88, 424–438.

Kavi Kishor, P. B., Sreenivasulu, N. 2014. “Is proline accumulation per se correlated with stress tolerance or is proline homeostasis a more critical issue?”, Plant Cell and Environment, 37, 300–311.

Kavi Kishor, P. B., Hima Kumari, P., Sunita, M. S. L., Sreenivasulu, N. 2015. “Role of proline in cell wall synthesis and plant development and its implications in plant ontogeny”, Frontiers in Plant Science, 6, 544.

Krasensky, J., Jonak, C. 2012. “Drought, Salt, and Temperature Stress-induced Metabolic Rearrangements and Regulatory Networks”, Journal of Experimental Botany, 63 (4), 1493-1608.

Kubis, J. 2008. "Exogenous Spermidine Differentially Alters Activities of Some Scavenging System Enzymes, H2O2 and Superoxide Radical Levels in Water Stressed Cucumber Leaves", Journal of Plant Physiology, 165, 397-406.

Kubis, J., Floryszak-Wieczorek, J., Arasimowicz-Jelonek, M. 2014. "Polyamines Induce Adaptive Responses in Water Deficit Stressed Cucumber Roots", Journal of Plant Research, 127 (1), 151-158.

Kusano, T., Berberich, T., Tateda, C., Takahashi, Y. 2008. "Polyamines: Essential Factors for Growth and Survival", Planta, 228 (3), 367-381.

Kuznetsov, V. V., Shevyakova, N. I. 2007. “Polyamines and Stress Tolerance of Plants”, Plant Stress, 1, 50-71.

Legocka, J., Kluk, A. 2005. "Effect of Salt and Osmotic Stress on Changes in Polyamine Content and Arginine Decarboxylase Activity in Lupinus luteus Seedlings", Journal of Plant Physiology, 162 (6), 662–668.

Levitt, J. 1980. Responses of Plants to Environmental Stresses. New York: Academic Press.

Li, Z., Yan Peng, Y., Zhang, X. Q., Pan, M. H., Ma, X., Huang, L. K., Yan, Y. H. 2014. "Exogenous Spermidine Improves Water Stress Tolerance of White Clover (*Trifolium repens* L.) Involved in Antioxidant Defence, Gene Expression and Proline Metabolism", Plant Omics Journal, 7 (6), 517-526.

Li, S., Jin, H., and Zhang, Q. 2016. “The Effect Of Exogenous Spermidine Concentration On Polyamine Metabolism and Salt Tolerance in Zoysia Grass (*Zoysia japonica* Steud) Subjected To Short-Term Salinity Stress”. Frontiers in Plant Science, 7:1221. doi: 10.3389/fpls.2016.01221.

Liu Y, Gu, D. D., Wu, W., Wen, X. X., Liao Y C. 2013. “The Relationship between polyamines and hormones in the regulation of wheat grain filling” PLOS ONE, 8, p. e78196.

Lobato, A. K. S., Gonçalves Vidigal, M. C., Vidigal Filho, P. S., Costa, R. C. L., Lopes, M. J. S., Cruz, A. S., Meirelles, A. C. S., Gonçalves, A. M. O. 2009. “Nitrogen Compounds Responses in Two Cultivars of Common Bean Inoculated with Colletotrichum lindemuthianum”, Research Journal of Biological Science, 4 (3), 293-297.

Lobato, A. K. S., Gonçalves Vidigal, M. C., Vidigal Filho, P. S., Andrade, C. A. B., Kvitschal, M. V., Bonato, C. M. 2010. “Relationships Between Leaf Pigments and Photosynthesis in Common Bean Plants Infected by Anthracnose”, New Zealand Journal of Crop Horticultural Science, 38 (1), 29-37.

Lutz, C., Navakoudis, E., Seidlitz, H. K., Kotzabasis, K. 2005. "Simulated Solarirradiation with Enhanced UV-B Adjust Plastid and Thylakoid-Associated Polyamine Changes for UV-B Protection", Biochimica et Biophysica Acta, 1710 (1), 24–33.

Majumdar, R., Barchi, B., Turlapati, S. A., Gagne, M., Minocha, R., Long, S., Minocha, S. C. 2016. “Glutamate, ornithine, arginine, proline, and polyamine metabolic interactions: the pathway is regulated at the post-transcriptional level”, Frontiers in Plant Science, 7, 78.

Minocha, R., Long, S., Thangavel, P., Minocha, S. C., Eagar, C., Driscoll, C. T. 2010. "Elevation Dependent Sensitivity of Northern Hardwoods to Ca-addition at HubbardBrook Experimental Forest", Forest Ecology and Managament, 260, 2115-2124.

Molinari, H. B. C., Marur, C. J., Daros, E., De Campos, M. K. F., De Carvalho, J. F. R. P., Filho, J. C. B., Pereira, L. F. P., Vieira, L. G. E. 2007. "Evaluation of The Stress-Inducible Production of Proline in Transgenic Sugarcane (Saccharum spp.): Osmotic Adjustment, Chlorophyll Fluorescence and Oxidative Stress", Physiologia Plantarum, 130 (2), 218-229.

Morris, M. L. 2002. Sayfa 1966-98. Impacts of International Maize Breeding Research in Developing Countries. Mexico: DF: CIMMYT.

Moschou, P. N., Paschalidis, K. A., Roubelakis-Angelakis, K. A. 2008. “Plant Polyamine Catabolism: The State of The Art”, Plant Signaling and Behaviour, 3 (12), 1061-1066.

Moschou, P. N., Wu, J., Tavladoraki, P., Angelini, R., Roubelakis-Angelakis, K. A. 2012. “The Polyamines and Their Catabolic Products Are Significant Players In The Turnover of Nitrogenous Molecules in Plants”, Journal of Experimental Botany, 63 (14), 5003–5015.

Moustakas, M., Sperdouli, I., Kouna, T., Antonopoulou, C. I., Therios, I. 2011. "Exogenous Proline Induces Soluble Sugar Accumulation and Alleviates Drought Stress Effects on

Photosystem II Functioning of *Arabidopsis thaliana* Leaves", Plant Growth Regulation, 65, 315–325.

Nounjan, N., Nghia, P. T., Theerakulpisut, P. 2012. “Exogenous proline and trehalose promote recovery of rice seedlings from salt-stress and differentially modulate antioxidant enzymes and expression of related genes”, Journal of Plant Physiology, 169, 596–604.

Nelson, D. L., Cox, M. M. 2004. Lehninger Principles of Biochemistry (4. Basım). New York: John Wiley & Sons Ltd.

Neuhaus, H., Stitt, M. 1991. ''Inhibition of Sucrose Sythesis by Imidodiphosphate, An Analog of Inorganic Pyrophosphate '', Plant Science, 76 (1), 49-55.

Özcan, S. 2009. “Modern Dünyanın Vazgeçilmez Bitkisi Mısır: Genetiği Değiştirilmiş (Transgenik) Mısırın Tarımsal Üretime Katkısı”, Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi, 2 (2), 01-34.

Özden, M., Demirel, U., Kahraman, A. 2009. "Effects of Proline on Antioxidant System in Leaves of Grapevine (*Vitis vinifera* L.) Exposed to Oxidative Stress by H2O2”, Scientia Horticulturae, 119 (2), 163-68.

Özfidan, C. 2010. “Ekzojen ABA Uygulamasının Kuraklık Stresi Altındaki Yabani ve ABA Eksik Arabidopsis Mutantları Üzerindeki Biyokimyasal ve Fizyolojik Etkilerinin Araştırılması”, Doktora Tezi Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.

Park, J. Y., Canam, T., Kang, K. Y., Ellis, D. D., Mansfield, S. D. 2008. “Over Expression of an Arabidopsis Family A Sucrose Phosphate Synthase (SPS) Gene Alters Plant Growth and Fibre Development”, Transgenic Research, 17 (2), 181-192.

Patrick, J. W., Botha, F. C., Brich, R.G. 2012. “Metabolic Engineering of Sugars and Simple Sugar Derivatives in Plants”, Plant Biotechnology Journal, 11 (2), 142-156.

Pierce, M. L., Raschke, K. 1980. “Correlation Between Loss of Turgor and Accumulation of Abscisic Acid in Detached Leaves”, Planta, 148 (2), 174-182.

Premachandra, G. S., Saneoka, H., Fujita, K., Ogata, S. 1993. "Water Stress and Potassium Fertilization in Field Grown Maize (Zea mays L.): Effects on Leaf Water Relations and Leaf Rolling", Agronomy and Crop Science, 170 (3), 195-201.

Puyang, X., An, M., Xu, L., Han, L., Zhang X. 2016. “Protective effect of exogenous spermidine on ion and polyamine metabolism in Kentucky bluegrass under salinity stress”, Horticulture, Environment and Biotechnolgy,1;57(1):11–19.

Qiu, Z. B., Wang, Y. F., Zhu, A. J., Peng, F. L., Wang, L. S. 2014. “Exogenous sucrose can enhance tolerance of Arabidopsis thaliana seedlings to salt stress”, Biologia Plantarum, 58, 4, 611–617.

Rajam, M. V., Weinstein, L. H., Galston, A. W. 1986. "Kinetic Studies on The Control of The Bean Rust Fungus (Uromyces phaseoli L) by An Inhibitor of Polyamine Biosynthesis", Plant Physiology, 82 (2), 485-87.

Ramel, F., Sulmon, C., Bogard, M., Couee, I., Gouesbet, G. 2009. "Differential Patterns of Reactive Oxygen Species and Antioxidative Mechanisms During Atrazine Injury and Sucrose-Induced Tolerance in Arabidopsis thaliana Plantlets", BMC Plant Biology, 9 (28), 1-18.

Reddy, A. R., Chaitanya, K. V., Vivekanandan, M. 2004. "Drought Induced Responses of Photosynthesis and Antioxidant Metabolism in Higher Plants", Journal of Plant Physiology, 161 (11), 1189-1202.

Roitsch, T. 1999. "Source Sink Regulation by Sugar and Stress", Current Opinion in Plant Biology, 2 (3), 198-206.

Roitsch, T., Gonzalez, M. C. 2004. “Function and Regulation of Plant Invertases: Sweet Sensations”, Trends in Plant Science, 9 (12), 606–613.

Rolland, F., Baena-Gonzalez, E., and Sheen, J. 2006. “Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms”, Annual Review of Plant Biology, 57, 675–709.

Rout, G. R., Das, A. B. 2013. Molecular Stress Physiology of Plants: Molecular Physiology of Osmotic Stress in Plants. India: Springer.

Roychoudhury, A., Basub, S., Sengupta, D. N. 2011. "Amelioration of Salinity Stress by Exogenously Applied Spermidine or Spermine in Three Varieties of Indica Rice Differing in Their Level of Salt Tolerance", Journal of Plant Physiology, 168 (4), 317-328.

Ruiz-Herrera, J., Ruiz-Medrano, R., Dominguez, A. 1995. “Selective Inhibition of Cytosine-DNA Methylases by Polyamines”, FEBS Letters, 357 (2), 192-196.

Saruhan Güler, N., Terzi, R., Kadioğlu A. 2006. "The Effects Of Exogenous Polyamines On Some Biochemical Changes During Drought Stress In *Ctenanthe setosa* (Rosc.) Eichler ", Acta Biologica Hungarica, 57, 2, 221-229.

Savage, M. J., Cass, A. 1984. "Psychrometric Field Measurement of Water Potential Changes Following Leaf Excision", Plant Physiology, 74 (1), 96-98.

Sezgin, A., Altuntaş, C., Sağlam A., Terzi, R., Demiralay, M., Kadıoğlu, A. 2018. “Abscisic acid cross-talking with hydrogen peroxide and osmolyte compounds may regulate the leaf rolling mechanism under drought”, Acta Physiologiae Plantarum, 40, 141-153.

Schnable, S. S., Ware, D., Fulton., R. S., Stein J. C., Wei, F. 2009. “The B73 Maize Genome: Complexity, Diversity, and Dynamics”, Science, 326 (5956),1112-1115.

Schulze, E. D., Beck, E., Müller-Hohenstein, K. 2005. Plant Ecology (1. Basım). Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Seki, M., Umezawa, T., Urano, K., Shinozaki, K. 2007. "Regulatory Metabolic Networks in Drought Stress Responses", Current Opinion in Plant Biology, 10 (3), 296-302.

Shahid, M. A., Balal, R. M., Pervez, M. A., Abbas T., Aqeel, M. A., Javaid, M. M., Francisco Garcia-Sanchez, F. 2014. "Exogenous Proline and Proline-Enriched Lolium Perenne Leaf Extract Protects Against Phytotoxic Effects of Nickel and Salinity İn Pisum Sativum by Altering Polyamine Metabolism in Leaves", Turkish Journal of Botany, 38 (5), 1312-1313.

Sharma, P., Dubey, R. S. 2005. “Modulation of nitrate reductase activity in rice seedlings under aluminium toxicity and water stress: role of osmolytes as enzyme protectant”, Journal of Plant Physiology, 162, 8, 854-862.

Shaw, M. R., Zavaleta, E. S., Chiariello, N. R., Cleland, E. E., Mooney, H. A., Field, C. B. 2002. “Grassland responses to global environmental changes suppressed by elevated CO_2”. Science 298,1987–1990.

Shi, H., Chan, Z. 2013. “Improvement of Plant Abiotic Stress Tolerance Through Modulation of The Polyamine Pathway”, Journal of Integrative Plant Biology, 56 (2), 114-121.

Shih, C.Y., Kao, C. H. 1996. "Growth Inhibition in Suspension-Cultured Rice Cells Under Phosphate Deprivation is Mediated through Putrescine Accumulation", Plant Physiology, 111, 721–724.

Singh, M., Kumar, J., Singh, S. 2015. “Roles of osmoprotectants in improving salinity and drought tolerance in plants: a review”, Reviews in Environmental Science and Biotechnology 14, 407–426.

Siddique, M. R. B., Hamid, A., Islam, M. S. 2000. “Drought stress effects on water relations of wheat”, Botanical Bulletin of Academia Sinica. 41, 35–39.

Slathia, S., Sharma, A., Choudhary, S. P. 2012. "Influence of Exogenously Applied Epibrassinolide and Putrescine on Protein Content, Antioxidant Enzymes and Lipid Peroxidation in Lycopersicon esculentum Under Salinity Stress", American Journal of Plant Sciences, 3 (6), 714-720.

Sonnewald, U., Brauer, M., Von Schaewen, A., Stitt, M., Willmitzer, L. 1991. “Transgenic Tobacco Plants Expressing Yeast Derived Invertase in Either the Cytosol, Vacuole or Apoplast: A Powerful Tool for Studying Sucrose Metabolism and Sink/Source Interactions”, Plant Journal, 1 (1), 95-106.

Sripinyowanich, S., Klomsakul, P., Boonburapong, B., Bangyeekhun, T., Asami, T., Gu, H., Buaboocha, T., Chadchawan, S. 2013. "Exogenous ABA Induces Salt Tolerance in Indica Rice (Oryza sativa L.): The Role of OsP5CS1 and OsP5CR Gene Expression During Salt Stress", Environmental and Experimental Botany, 86, 94-105.

Stewart, C. R., Voetberg, G. 1985. "Relationship between Stress Induced ABA and Proline Accumulations and ABA Induced Proline Accumulation in Excised Barley Leaves", Plant Physiology, 79, 24-27.

Stewart, C. R., Voetberg, G., Rayapati, P. J. 1986. "The Effects of Benzyladenine, Cycloheximide, and Cordycepin on Wilting-Induced Abscisic Acid and Proline Accumulations and Abscisic Acid- and Salt-Induced Proline Accumulation in Barley Leaves", Plant Physiology, 82 (3), 703-707.

Stitt, M., Huber, S. C., Kerr, P.S. 1987. “Control of Photosynthetic Sucrose Formation. The Biochemistry of Plants. Editörler: Hatch, M. D., Boardman, N. K. New York: Academic Press.

Stitt, M., 1996. Metabolic regulation of photosynthesis. Photosynthesis and the Environment, Editör: Baker, N. R. London: Academic Press.

Street, H. E., Öpik, H. 1984. The Physiology of Flowering Plants: Their Growth and Devolopment (3. Basım). London: Edward Arnold Ltd.

Sulmon, C., Gouesbet, G., Couee, I., El Amrani, A. 2004. "Sugar Induced Tolerance to Atrazine in Arabidopsis Seedlings: Interacting Effects of Atrazine and Soluble Sugars on psbA mRNA and D1 Protein Levels", Plant Science, 167 (4), 913–923.

Szabados, L., Savoure, A. 2010. "Proline: a multifunctional amino acid", Trends in Plant Science, 15 (2), 89-97.

Szarka, A., Horemans, N., Passarella, S., Tarcsay, A., Orsi, F., Salgo, A., Banhegyi, G. 2008. “Demonstration of An Intramitochondrial Invertase Activity and The Corresponding Sugar Transporters of The Inner Mitochondrial Membrane in Jerusalem Artichoke (Helianthus tuberosus L.) Tubers”, Planta, 228 (5), 765-775.

Szekely, G., Abraham, E., Cseplo, A., Rigo, G., Zsigmond, L., Csiszar, J., Ayaydın, F., Strizhov, N., Jasik, J., Schmelzer, E., Koncz, C., Szabados, L. 2008. “Duplicated P5CS Genes of Arabidopsis Play Distinct Roles in Stress Regulation and Developmental Control of Proline Biosynthesis”, The Plant Journal, 53 (1), 11-28.

Taneja, D., Das, N. 2014. “Molecular Cloning, Sequance Analyses and Expression Studies of Sucrose Phosphate Synthase in Patato (Solanum tuberosum L.) Cultivars”, Acta Physiologiae Plant, 36 (8), 2253-2269.

Tavladoraki, P., Cona, A., Federico, R., Tempera, G., Viceconte, N., Saccoccio, S., Battaglia, V., Toninello, A., Agostinelli, E. 2012. "Polyamine Catabolism: Target Forantiproliferative Therapies in Animals and Stress Tolerance Strategies in Plants, Amino Acids, 42 (2-3), 411-426.

Tiburcio, A. F., Altabella, T., Bitrian, M., Alcazar, R. 2014. “The Roles of Polyamines During the Lifespan of Plants: From Development to Stress”, Planta, 240 (1), 1-18.

Toldi, O., Tuba, Z., Scott, P. 2009. “Vegetative desiccation tolerance: is it a goldmine for bioengineering crops?”, Plant Science, 176, 187-199.

Türkan, İ., Demiral, T. 2009. "Recent Developments in Understending Salinity Tolerance, Environmental and Experimental Botany, 67 (1), 2–9.

Turner, L.B., Stewart, G.R. 1986. “The Effect of Water Stress Upon Polyamine Levels in Barley (Hordeum vulgare L) Leaves”, Journal of Experimental Botany, 37 (2), 170-177.

Upadhyaya, H., Sahoo, L. ve Panda, S. K. 2013. Molecular Physiology of Osmotic Stress in Plants. Molecular Stress Physiolgy of Plants. Rout, G.R., Das, A. B., New Delhi: Springer India.

Urano, K., Hobo, T., Shinozaki, K. 2005. “*Arabidopsis* ADC Genes Involved in Polyamine Biosynthesis are Essential for Seed Development”, FEBS Letters, 579 (6), 1557-1564.

Valliyodan, B., Nguyen, H. T. 2006. “Understanding Regulatory Networks and Engineering for Enhanced Drought Tolerance in Plants”, Current Opinion in Plant Biology, 9, 189-195.

Walden, R., Cordeiro, A., Tiburcio, A. F. 1997. “Polyamines: Small Molecules Triggering Pathways in Plant Growth ve Development”, Plant Physiology, 113 (4), 1009–1013.

Wang, Y., Mopper, S., Hasenstein, K.H. 2001. “Effects of Salinity on Endogenous ABA, IAA, JA, and SA in Iris hexagona”, Journal of Chemical Ecology, 27 (2), 327-342.

Whittaker, A., Botha, F. C. 1997. “Carbon Partitioning During Sucrose Accumulation in Sugar Cane Internodal Tissue”, Plant Physiology, 115, 1651-9.

Wimalasekera, R., Tebartz, F., Scherer, G. F. E. 2011. “Polyamines, Polyamine Oxidases and Nitric Oxide in Development, Abiotic and Biotic Stresses”, Plant Science, 181 (5), 593-603.

Winter, H., Huber, S. C. 2000. “Regulation of Sucrose Metabolism in Higher Plants: Localization and Regulation of Activity of Key Enzymes”, Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 35 (4), 253-289.

World Bank. 2005. Agriculture Investment Sourcebook. Washington DC: World Bank.

Xin, Z., Li, P. H. 1993. "Relationship between Proline and Abscisic Acid in the Induction of Chilling Tolerance in Maize Suspension-Cultured Cells", Plant Physiology, 103 (2), 607-613.

Xiong, L., Gong, Z., Rock, C. D., Subramanian, S., Guo, Y., Xu, W., Galbraith, D., Zhu, J. K. 2001. "Modulation of Abscisic Acid Signal Transduction and Biosynthesis by An Sm-like Protein in Arabidopsis", Developmental Cell, 1 (6), 771-81.

Xiong, L., Zhu, J. K. 2002. “Molecular and Genetics Aspects of Plant Responses to Osmotic Stress”, Plant Cell & Environment, 25 (2), 131-139.

Yang, H. Y., Shi, G. X., Qiao, X. Q., Tian, X. L. 2011. "Exogenous Spermidine and Spermine Enhance Cadmium Tolerance of Potamogeton malaianus", Russian Journal of Plant Physiology, 58, 622-628.

Yazıcı, I., Türkan, İ., Sekmen, A.H., Demiral, T. 2007. "Salinity Tolerance of Purslane (Portulaca oleracea L.) is Achieved by Enhanced Antioxidative System, Lower Level of Lipid

Peroxidation and Proline Accumulation", Environmental and Experimental Botany, 61 (1), 49-57.

Yılmaz, E., Tuna, L. A., Bürün, B. 2011. "Bitkilerin Tuz Stresi Etkilerine Karşı Geliştirdikleri Tolerans Stratejileri", Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi, 7 (1), 47–66.

Yiu, J. C., Juang, L. D., Fang, D. Y. T., Liu, C. W., Wu, S. J. 2009. “Exogenous Putrescine Reduces Flooding- Induced Oxidative Damage by Increasing the Antioxidant Properties of Welsh Onion”, Scientia Horticulturae, 120 (3), 306-314.

Zeevaart, J. A. D., Creelman, R. A. 1988. "Metabolism and Physiology of Abscisic Acid", Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 39, 439-73.

Zhang, L., Chia, J. M., Kumari, S., Stein, J. C., Liu Z., Narechania, A., Maher, C. A., Guill, K, McMullen, M. D., Ware, D. 2009. “A Genome-Wide Characterization of microRNA Genes in Maize”, PLoS Genetics, 5 (11), 1-16.

Zhang, Y., Zhang, L., Hu, X. H. 2014. "Exogenous Spermidine Induced Changes at Physiological and Biochemical Parameters Levels in Tomato Seedling Grown in Saline-Alkaline Condition", Botanical Studies, 55-58.

Zhao, H., Yang, H. 2008. "Exogenous Polyamines Alleviate the Lipid Peroxidation Induced by Cadmium Chloride Stress in Malus hupehensis Rehd.", Scientia Horticulturae, 116 (4), 442–447.

Zhou, Q., Yu, B. 2010. “Changes in Content of Free, Conjugated and Bound Polyamines and Osmotic Adjustment in Adaption of Vetiver Grass to Water Deficit”, Plant Physiology and Biochemistry, 48 (6), 417- 425.

Zhu, Y. J., Komor, E., Moore, P. H., 1997. “Sucrose Accumulation in The Sugarcane Stem is Regulated by The Difference Between the Activities of Soluble Acid Invertase and Sucrose Phosphate Synthase”, Plant Physiology, 115, 609-16.

Zhu, B. C., Su, J., Chan, M. C., Verma, D. P. S., Fan, Y. L., Wu, R. 1998. “Over Expression of a Δ-Pyrroline-5-Carboxylate Synthetase Gene and Analysis of Tolerance to Water and Salt Stress in Transgenic Rice”, Plant Science, 139 (1), 41-48.

Zhu, J. K. 2002. “Salt and Drought Stress Signal Transduction in Plants”, Annual Reviews of Plant Biology, 53 247-73.

Zhu, Q., Zhang, J., Gao, X., Tong, J., Xiao, L., Li, W., Zhang, H. 2010. “The Arabidopsis AP2/ERF Transcription Factor RAP2.6 Participates in ABA, Salt and Osmotic Stress Responses”, Gene, 457 (1-2), 1-12.

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Prof. Dr. ASİM KADIOĞLU
Proje No:	116Z807
Proje Başlığı:	Osmotik Stres Koşullarında Dıştan Uygulanan Osmolitlerin Hücresel Poliamin, Prolin, Sakkaroz ve Absisik Asit Metabolizması ile İlgili Gen İfadeleri Üzerine Etkisi
Proje Türü:	1002 - Hızlı Destek
Proje Süresi:	12
Araştırmacılar:	MEHMET DEMİRALAY, AYKUT SAĞLAM
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	KARADENİZ TEKNİK Ü. FEN-EDEBİYAT F. BİYOLOJİ B.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/07/2017 - 01/07/2018
Onaylanan Bütçe:	30000.0
Harcanan Bütçe:	29998.66
Öz:	Mevcut projenin amacı, osmotik stres koşulları altında dıştan uygulanan osmolitler (prolin, sakkaroz ve spermidin) ile hücresel osmolitler (prolin, poliamin, şeker) ve ABA metabolizması arasındaki olası etkileşimin hangi genlerle ilişkili olduğu hakkında veriler elde etmektir. Bu amaca ulaşmak için dıştan uygulanan osmolitlerin ve bazı osmolit inhibitörlerinin, prolin, sakkaroz, poliamin ve ABA ile ilgili gen ifadeleri üzerine etkisinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Denemelerde 4 haftalık mısır bitkileri kullanılmıştır. Daha sonra poliamin inhibitörleri (?-difluorometil arginin (DFMA) ile ? -difluorometil ornitin (DFMO), sakkaroz inhibitörü imidodifosfat ve prolin inhibitörü cordycepin uygulanmıştır. Bu uygulamalardan sonra bitkiler polietilen glikol (PEG) ortamında osmotik strese maruz bırakılmıştır. Uygulamalar sonucunda bitki yapraklarında stres parametreleri olarak su potansiyeli, yaprak kıvrılması ölçülmüş ve toplam RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Poliamin metabolik enzimleri ile ilgili arginin dekarboksilaz (ADC), S-adenozil metionin dekarboksilaz (SAMDC), diamin oksidaz (DAO) ve poliamin oksidaz (PAO) genleri ile prolin metabolizmasında rol alan ?1 -pirolin-5-karboksilat sentaz (P5CS), ?1-pirolin-5-karboksilat-redüktaz (P5CR) ve prolin dehidrogenaz (ProDH) ve şeker sentezinde görev alan sakkaroz fosfat sentaz (SPS) ve sakkaroz sentaz (SUCS), ABA sentezinde rol oynayan 9-cis-epoksikarotenoid dioksigenaz (NCED), ABA aldehid oksidaz (AAOX) genlerinin ifadesindeki değişimler real time PCR ile belirlenmiştir. Proje bulguları %30-50 yaprak kıvrımına neden olan etkili ozmotik stres değerinin %10 PEG olduğunu göstermiştir. Sakkaroz, prolinin içsel dengesini sağlamak için yıkımını azaltırken, putresin sentezini teşvik etmektedir. Prolin, spermidinin sentezini teşvik edici bir rol üstlenmektedir. Spermidin ise sakkaroz sentezini uyarmaktadırlar. Bu üç osmolitin de ABA sentezini uyardığı tespit edilmiştir. Sakkaroz, prolin ve spermidinin herbirinin bir diğerinin metabolik yolu üzerinde pozitif veya negatif düzenlemeler yaptığı belirlenmiştir. Kuraklık şartları altında bitki içsel dengesini korumak için bu söz konusu moleküllerin bir sinyal gibi davranarak biribirinin içsel miktarlarının ayarlanmasında fonksiyon gördüğü kanaatine varılmıştır.
Anahtar Kelimeler:	Osmolit, osmotik stres, Poliamin, Sakkaroz, Prolin, ABA, Osmolit metabolizma genleri
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır

TÜBİTAK