

**ANADOLU ÜNİVERSİTESİ**



**BİLECİK ŞEYH EDEBALI  
ÜNİVERSİTESİ**

**Fen Bilimleri Enstitüsü  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

***Chlamydomonas reinhardtii* KÜLTÜRLERİNDE  
PUTRESİNİN SOĞUK ve TUZLULUK STRESİNE  
TOLERANSTAKİ ROLÜNÜN BELİRLENMESİ**

**Müslüm Süleyman İNAL  
Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı  
Doç.Dr. Dilek ÜNAL**

**BİLECİK, 2017**

**Ref.No: 10134449**



**ANADOLU ÜNİVERSİTESİ**



**BİLECİK ŞEYH EDEBALI  
ÜNİVERSİTESİ**

**Fen Bilimleri Enstitüsü  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

***Chlamydomonas reinhardtii* KÜLTÜRLERİNDE  
PUTRESİNİN SOĞUK ve TUZLULUK STRESİNE  
TOLERANSTAKİ ROLÜNÜN BELİRLENMESİ**

**Müslüm Süleyman İNAL  
Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı  
Doç. Dr. Dilek ÜNAL**

**BİLECİK, 2017**



**ANADOLU UNIVERSITY**



**BILECIK SEYH EDEBALI  
UNIVERSITY**

**Graduate School of Sciences  
Department of Molecular Biology and Genetic**

**IN THE *Chlamydomonas reinhardtii* CULTURES  
DETERMINATION OF THE PUTRESCINE ROLE ON  
THE TOLERANCE OF SALINITY AND COLD STRESS**

**Müslüm Süleyman İNAL  
Master's Thesis**

**Thesis Advisor  
Assoc. Prof. Dilek ÜNAL**

**BILECIK, 2017**



**BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ YÜKSEK LİSANS**  
**JÜRİ ONAY FORMU**

Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun.....tarih ve .....sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 03/01/2017 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Müslüm Süleyman İNAL'ın“..*ehlami damanas... reinhardtii... kültürlerinde... Patresinin Sıfuk... ve... Tuzluk... stresine... Toleranstaki... Rolünün Belirlenmesi*.....” başlıklı tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak oy birliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

**JÜRİ**

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI): Doç. Dr. Dilek ÜNAL

ÜYE

: Prof Dr. Serpil ÜNYAYAR

ÜYE

: Prof. Dr. Hatice Mehtap KUTLU

ÜYE

: Doç. Dr. Okan ACAR

ÜYE

: Yard. Doç. Dr. Onur EROĞLU

.....  
.....  
.....  
.....  
.....

**ONAY**

Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun  
...../...../..... Tarih ve ...../.....sayılı  
kararı

## TEŞEKKÜR

Lisans ve yüksek lisans dönemi boyunca elinden gelen bütün yardımları esirgemeyen, bütün bilgi ve tecrübelerinden yararlanmamı sağlayıp beni her zaman desteklediği için saygı değer danışman hocam Doç.Dr. Dilek ÜNAL' a sonsuz teşekkürlerimi borç bilirim.

Çalışmalarım sırasında bölüm imkânlarından faydalanmamı sağlayan Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Başkanlığına teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasını 2014-02.BİL.04-03 nolu proje ile destekleyen Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi bilimsel araştırma projesi koordinatörlüğüne teşekkür ederim.

Tüm öğrenim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerinden dolayı aileme teşekkürlerimi sunarım.

## ÖZET

Düşük sıcaklık ve tuz stresi, fotosentetik organizmaların büyüme, gelişme ve verimini sınırlayan en önemli çevresel streslerden biridir. Çevresel streslerin birçoğuna karşı verilen yanıtlarda poliaminlerin ve özellikle putresinin önemli rolleri vardır. Bu tezde *Chlamydomonas reinhardtii* kültürlerine düşük sıcaklık ve tuzluluk stresi altında dışsal putresin uygulaması yapılmıştır. Fotosistem II D1 proteinini kodlayan *psbA* geninin ve *psbA* geninin translasyon faktörlerinden biri olan *tba1* geninin ifadesindeki değişimler gerçek zamanlı PCR ile belirlenmiştir. Fotosentez tamir mekanizması genlerinin yanı sıra ısı şoku proteinlerini kodlayan genlerin (*hsp70c*, *hsp90a*, *hsp90c*), poliamin biyosentez genlerinin (*odc2*, *spd1*) stres altında ve dışsal putresin uygulamasıyla ifadelerindeki değişimler de saptanmıştır. Ayrıca fizyolojik olarak hücre büyüme oranı, lipit peroksidasyon miktarı, antioksidan enzim içerikleri, içsel ABA seviyeleri de belirlenmiştir. Düşük sıcaklık ve tuzluluk stresinin; hücre büyümesinin önemli miktarda azalmasına, lipit peroksidasyon oranının artmasına, APX ve CAT enzim aktivitelerinin değişimine neden olduğu gözlenmiştir. Dışsal putresin uygulaması yapılan kültürlerde ısı şoku proteinlerinin gen ifadelerinin düşük sıcaklığa yanıtta ilk 24 saatte teşvik edildiği, tuz stresine yanıtta ise 7. günde tüm konsantrasyonlarda önemli bir artışın meydana geldiği belirlenmiştir. Elde edilen verilere göre dışsal putresin uygulaması içsel ABA seviyesini artırıp, düşük sıcaklık stresi ve tuzluluk stresine karşı yanıtta *psbA* ve *tba1* genlerinin ifadesini artırmıştır.

### Anahtar Kelimeler

*Chlamydomonas reinhardtii*; Putresin; ABA; D1 proteini; HSP; tuzluluk; düşük sıcaklık.

## ABSTRACT

Low temperature and salt stress are among the most important environmental stresses that limit the growth, development and yield of photosynthetic organisms. Polyamines and especially putresin have important roles in response to most environmental stresses. In this thesis, *Chlamydomonas reinhardtii* cultures were subjected to exogenous putrescine under low temperature and salinity stress. The changes in the expression of the *psbA* gene encoding the photosystem II D1 protein and the expression of the *tba1* gene, which is one of the translational factors of the *psbA* gene, was determined by real-time PCR. In addition to genes for the repair mechanism of photosynthesis, genes encoding heat shock proteins (*hsp70c*, *hsp90a*, *hsp90c*), polyamine biosynthesis genes (*odc2*, *spd1*) under stress conditions and exogenous putrescine application were also determined. Physiologically, cell growth rate, amount of lipid peroxidation, antioxidant enzyme contents, and intrinsic ABA levels were also determined. It has been observed that low temperature and salinity stress causes a significant decrease in cell growth, an increase in lipid peroxidation rate, and a change in APX and CAT enzyme activities. It has been determined that in cultures in which exogenous putrescine is applied, gene expressions of heat-shock proteins are promoted in the first 24 hours in response to low temperature and in salt stress response in all concentrations at 7th days. According to the obtained results, the application of external putresin increased the level of intrinsic ABA, and increased the expression of *psbA* and *tba1* genes in response to low temperature stress and salinity stress.

### Key Words

*Chlamydomonas reinhardtii*; Putrescine; ABA; D1 protein; HSP; salinity; low temperature.

**JÜRİ ONAY SAYFASI****TEŞEKKÜR**

<b>ÖZET</b> .....	<b>I</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>II</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>III</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>V</b>
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	<b>VI</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR</b> .....	<b>VII</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>2</b>
2.1. Poliaminler .....	2
2.2. Absisik Asit (ABA) Hormonu .....	4
2.3. Fotosistem II Tamir Mekanizması.....	5
2.4. Isı Şoku Proteinleri .....	9
2.5. Düşük Sıcaklık Stresi.....	10
2.6. Tuzluluk Stresi .....	12
2.7. Literatür Özeti .....	12
<b>3. MATERYAL VE METOT</b> .....	<b>15</b>
3.1. Kültür Koşulları.....	15
3.2. Stres Denemeleri .....	17
3.3. Hücre Büyüme Ölçümü .....	17
3.4. Lipit Peroksidasyonu Analizi .....	17
3.5. Rubisko Enzim Analizi .....	18
3.6. Prolin Analizi .....	18
3.7. Total Protein İzolasyonu .....	19
3.8. CAT Enzim Analizi .....	19
3.9. APX Enzim Analizi .....	19
3.10. ABA Analizi.....	20
3.11. RNA İzolasyonu ve cDNA Çevrimi .....	20
3.12. Kantitatif Gerçek Zamanlı-PZR .....	21
3.13. İstatistiksel Analiz .....	22
<b>4. BULGULAR</b> .....	<b>23</b>

4.1. Düşük Sıcaklık Stresine Ait Bulgular .....	23
4.1.1. Büyüme sonuçları .....	23
4.1.2. Lipit peroksidasyonu .....	23
4.1.3. Rubisko enzim aktivitesi .....	24
4.1.4. Antioksidan enzim aktivitesi .....	24
4.1.5. İçsel ABA seviyesi .....	26
4.1.6. Fotosentezle ilişkili genlerin ifade değişimleri .....	26
4.1.7. Poliaminlerin biyosentez genlerinin ifadesi ( <i>odc2</i> ve <i>spd1</i> ) .....	27
4.1.8. Isı şoku proteinlerine ait genlerin ifade değişimleri .....	28
4.1.9. Pearson korelasyon testi .....	30
4.2. Tuzluluk Stresine Ait Bulgular .....	31
4.2.1. Büyüme sonuçları .....	31
4.2.2. Lipit peroksidasyonu .....	31
4.2.3. Rubisko içeriği .....	32
4.2.4. Prolin içeriği .....	33
4.2.5. APX aktivitesi .....	33
4.2.6. İçsel ABA seviyesi .....	34
4.2.7. Fotosentezle ilişkili genlerin ifade değişimleri .....	35
4.2.8. Poliaminlerin biyosentez genlerinin ifade değişimleri .....	37
4.2.9. Isı şoku proteinlerinin gen ifadesi değişimi .....	39
4.2.10. Pearson korelasyon testi .....	40
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>	<b>41</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>48</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Poliaminlerin biyosentez yolları .....	3
Şekil 2.2. ABA biyosentezinin düzenlenmesi.....	4
Şekil 2.3. <i>C. reinhardtii</i> 'de <i>psbA</i> gen ifadesinin basamaklarını gösteren model .....	7
Şekil 2.4. PSII Tamir döngüsünde meydana gelen süreçlerin şeması .....	8
Şekil 2.5. Poliaminler ile ABA' nın birbirleriyle olağan ilişkisi.....	11
Şekil 3.1. <i>C. reinhardtii</i> hücrenin genel görünümü .....	16
Şekil 4.1. Düşük sıcaklık stresi Rubisko enzim içeriği sonuçları .....	24
Şekil 4.2. Düşük sıcaklık stresi CAT enzim aktivitesi sonuçları .....	25
Şekil 4.3. Düşük sıcaklık stresi APX enzim aktivitesi sonuçları .....	25
Şekil 4.4. Düşük sıcaklık stresi içsel ABA seviyesi.....	26
Şekil 4.5. Düşük sıcaklık stresi <i>psbA</i> genin ifade değişimleri .....	26
Şekil 4.6. Düşük sıcaklık stresi <i>tba1</i> genin ifade değişimleri .....	27
Şekil 4.7. Düşük sıcaklık stresi <i>odc2</i> genin ifade değişimleri.....	27
Şekil 4.8. Düşük sıcaklık stresi <i>spd1</i> genin ifade değişimleri.....	28
Şekil 4.9. Düşük sıcaklık stresi <i>hsp70c</i> genin ifade değişimleri .....	28
Şekil 4.10. Düşük sıcaklık stresi <i>hsp90c</i> genin ifade değişimleri .....	29
Şekil 4.11. Düşük sıcaklık stresi <i>hsp90a</i> genin ifade değişimleri .....	29
Şekil 4.12. Tuzluluk stresi Rubisko enzim içeriği.....	32
Şekil 4.13. Tuzluluk stresi içsel prolin içeriği.....	33
Şekil 4.14. Tuzluluk stresi APX enzim aktivitesi .....	34
Şekil 4.15. Tuzluluk stresi içsel ABA seviyesi .....	34
Şekil 4.16. Tuzluluk stresi <i>psbA</i> genin 1. gün ifadesi.....	35
Şekil 4.17. Tuzluluk stresi <i>psbA</i> genin 7. gün ifadesi.....	35
Şekil 4.18. Tuzluluk stresi <i>tba1</i> genin 1. gün ifadesi .....	36
Şekil 4.19. Tuzluluk stresi <i>tba1</i> genin 7. gün ifadesi .....	36
Şekil 4.20. Tuzluluk stresi <i>odc2</i> genin 1. gün ifadesi.....	37
Şekil 4.21. Tuzluluk stresi <i>odc2</i> genin 7. gün ifadesi.....	37
Şekil 4.22. Tuzluluk stresi <i>spd1</i> genin 1. gün ifadesi .....	38
Şekil 4.23. Tuzluluk stresi <i>spd1</i> genin 7. gün ifadesi .....	38
Şekil 4.24. Tuzluluk stresi <i>hsp70c</i> genin 1. gün ifadesi .....	39
Şekil 4.25. Tuzluluk stresi <i>hsp70c</i> genin 7. gün ifadesi .....	39

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 2.1.</b> Temel moleküler şaperonlar ve protein aileleri .....	9
<b>Çizelge 3.1.</b> TAP ortamı (pH=7) içeriği .....	15
<b>Çizelge 3.2.</b> <i>C. reinhardtii</i> ' nin taksonomisi.....	16
<b>Çizelge 3.3.</b> 50 mM fosfat tamponu (pH= 7,5) içeriği .....	19
<b>Çizelge 3.4.</b> CAT reaksiyon tamponu (pH= 7,5) içeriği.....	19
<b>Çizelge 3.5.</b> APX reaksiyon tamponu (pH= 7,8) içeriği.....	19
<b>Çizelge 3.6.</b> RT-PCR reaksiyonu için örnek başına kullanılan mix içeriği .....	20
<b>Çizelge 3.7.</b> RT-PCR protokolü .....	21
<b>Çizelge 3.8.</b> Gerçek Zamanlı PZR reaksiyon içeriği .....	21
<b>Çizelge 3.9.</b> Kullanılan primer dizileri .....	21
<b>Çizelge 4.1.</b> Düşük sıcaklık stresi hücre büyüme sonuçları.....	23
<b>Çizelge 4.2.</b> Düşük sıcaklık stresi lipit peroksidasyon sonuçları .....	23
<b>Çizelge 4.3.</b> Poliamin biyosentez genlerinin diğer genlerin ifadesi ile ilişkisinin Pearson korelasyon test sonuçları.....	30
<b>Çizelge 4.4.</b> Bazı fizyolojik parametreler ve poliamin biyosentez gen ifadelerinin Pearson korelasyon test sonuçları.....	30
<b>Çizelge 4.5.</b> Tuzluluk stresi büyüme sonuçları .....	31
<b>Çizelge 4.6.</b> Tuzluluk stresi lipit peroksidasyon sonuçları .....	31
<b>Çizelge 4.7.</b> Poliamin biyosentez genlerinin diğer gen ifadeleri ile olan ilişkisini gösteren Pearson korelasyon test sonuçları .....	40
<b>Çizelge 4.8.</b> Bazı fizyolojik parametreler ve poliamin biyosentez gen ifadelerinin Pearson korelasyon test sonuçları.....	40

## SİMGELER VE KISALTMALAR

%	Yüzde	µg	Mikrogram
°C	Santigrad Derece	sn	Saniye
µl	Mikrolitre	CO <sub>2</sub>	Karbon Dioksit
mM	milimolar	ADP	Adenozin difosfat
cDNA	Komplementer DNA	ABA	Absisik Asit
DNA	Deoksribonükleik asit	CAT	Katalaz
RNA	Ribonükleik asit	APX	Askorbat Peroksidaz
dNTP	Deoksinükleotid	SOD	Süperoksit Dismutaz
gr	Gram	GR	Glutasyon Redüktaz
ml	Mililitre	Pa	Poliamin
nm	Nanometre	Put	Putresin
µmol	Mikromol	Spd	Spermidin
M	Molar derişim	Spm	Spermin
L	Litre	Cad	Kadaverin
rpm	Dakikadaki devir sayısı	h	Saat
TCA	Trikloroasetik Asit	PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
TBA	Tiyobarbütirik Asit	g	Rölatif Santrifüj Kuvveti
Dk	Dakika	OD	Optik Yoğunluk
OH·	Hidroksi Radikali	HSP	Isı Şoku Proteini
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Süperoksit Radikali	ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SAM	S- Adenosil Metionin		

## 1. GİRİŞ

İlk olarak 1833 yılında C.G. Ehrenberg tarafından tanımlanmış olduğu belirtilen ve yaklaşık 10 µm boyutlarında olan *Chlamydomonas* tek hücreli ve çift kamçılı yeşil alglerdendir. İlk laboratuvar suşu topraktan G.M. Smith tarafından izole edilen *Chlamydomonas reinhardtii* ise günümüzde moleküler biyoloji çalışmalarında en fazla kullanılan türdür. Kamçı hareketliliği, kloroplast dinamiği, hücre duvarının hidroksiprolince zengin glikoprotein yapısı ve ışısız ortamda tek karbon kaynağı olarak asetatı kullanması gibi özellikleri nedeniyle moleküler biyoloji ve fizyoloji araştırmalarında kullanılmaktadır. Ayrıca, fotosistem II (PSII) tamir mekanizmasının aydınlatılması ve çeşitli stres koşullarına verilen yanıtlara model oluşturmak açısından da ideal bir organizmadır. Küresel ısınma ve insanoğlunun çevre üzerindeki olumsuz etkilerinden dolayı günümüzde, yüksek ve düşük sıcaklık, tuzluluk ve kuraklık gibi çevresel faktörlerin fotosentetik organizmalar üzerinde etkileri yaygın olarak araştırılmaktadır.

Fotosentetik organizmalarda stres toleransı PSII onarım sürecindeki dengeyle ilişkilidir. Çeşitli stres koşullarına uyumda PSII tamir mekanizmasının merkezi bir rol oynayabileceği yapılan çalışmalar ile ortaya konmuştur (Allakhverdiev, vd., 2002; Nishiyama, vd., 2004). Daha önce yapılan çalışmalar tuz stresi, metal stresi ve oksidatif stresin *psbA* (D1 proteinin kodlayan gen) gen transkripsiyonunu ve translasyonunu inhibe ederek, PSII fotohasarının tamirini engellediğini göstermiştir (Allakhverdiev, vd., 2002; Qian, vd., 2009; Nishiyama, vd., 2004). Buna karşın, düşük sıcaklık ve tuz stresinin *psbA* geninin translasyon faktörlerinden biri olan *tba1* ifadesi üzerine etkileri konusunda veri bulunmamaktadır. Bu tezde düşük sıcaklık ve tuzluluk stresinin *psbA* ve *tba1* ifadesi üzerine etkileri araştırılmıştır. Dışsal putresin uygulamasının PSII tamir mekanizmasında ana rolü üstlenen *psbA* ve *tba1* genlerinin ifadeleri üzerine etkileri ve oluşturulan bazı fizyolojik yanıtlar belirlenmiştir. Ayrıca, PSII tamir mekanizması ile absisik asit (ABA) biyosentezi ve poliamin biyosentez genlerinin (*odc2* ve *spd1*) ifade edilmesi arasında bir ilişki olup olmadığı bu tezde araştırılmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Poliaminler

Önceleri hormon olarak nitelendirilse de günümüzde poliaminler bitki büyüme düzenleyicileri olarak bilinmektedir. Poliaminler tüm canlı organizmalarda bulunan düşük molekül ağırlığına sahip en az iki amino grubu taşıyan hidrokarbon yapıda bileşiklerdir. İlk defa Antonie van Leeuwenhoek tarafından 1678 yılında insan seminal sıvısında keşfedilmişlerdir (Wallace, 2006). Tüm ökaryotlarda başlıca putresin (Put), spermidin (Spd), spermin (Spm) olmak üzere milimolar konsantrasyonlarda 3 tip poliamin bulunmaktadır (Ünsal-Palavan, 1993).

Poliaminler hücrel pH' da polikasyonik özelliktedir ve bu değerlerde anyonik formlara, DNA, RNA, protein, fosfolipidlere ve dolayısıyla hücre çeperindeki bileşenlere bağlanabilmektedir (Thomas ve Thomas, 2001; Ünsal-Palavan, 1993). Bu sayede gerek çevresel streslere karşı bu kalıtım materyallerini ve hücrenin diğer yapılarını koruyabilmekte gerekse normal koşullarda hücre siklusunda birçok sürece katkı sağlamaktadır. Poliaminler bu özelliklerinden dolayı bir hücrenin veya organizmanın optimum büyümesi ve gelişmesi için mutlak gerekli olmaktadır.

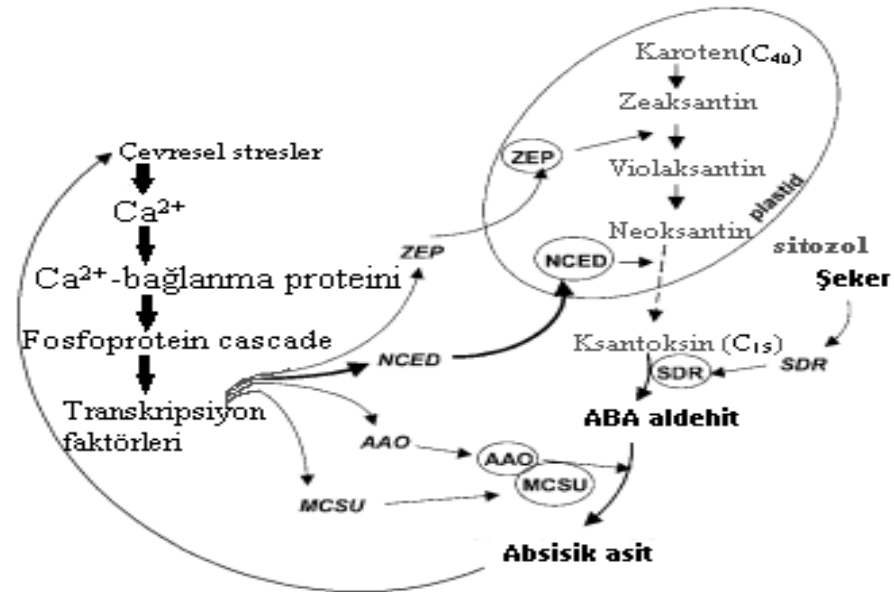
Poliaminlerin biyosentetik yolu ilk olarak mantarlarda aydınlatılmıştır. Putresin arjininden 2 yolla türevlenir ve sentez sırasında bu iki yoldan biri izlenir; ilk yol arjininin üre kaybetmesi ile ornitini oluşturması ve ardından ornitin dekarboksilaz (ODC) enzimi ile CO<sub>2</sub> kaybederek putresinin oluşturulduğu yoldur (Şekil 2.1.). İkinci yol ise, arjinin dekarboksilaz (ADC) enzimi tarafından arjinin dekarboksile olarak agmatin ve bundan da putresinin oluşmasıdır. Bu ikinci yol stres koşullarında yüksek bitkiler tarafından daha yaygın kullanılmaktadır. Buna karşın, yapılan araştırmalar *C. reinhardtii*'de putresinin ODC yolağı üzerinden sentezlendiğini ortaya koymuştur (Voigt, vd., 2000).

Hormonlar gibi yüksek biyolojik faaliyet gösteren poliaminler bitkilerde abiyotik ve biyotik streslere adaptasyon, replikasyon ve gen ifadesi, büyüme ve gelişme, yaşlanma, membran stabilizasyonu, enzim aktivitesi modülasyonu gibi birçok hücrel süreçlerde yer almaktadır (Galston, vd., 1997; Bais ve Ravishankar, 2002; Zapata, vd., 2008). Bugüne kadar yapılan çalışmalar poliaminlerin tuzluluk stresi, UV stresi, kuraklık stresi, ağır metal stresi, soğuk stresi, sıcaklık stresi gibi birçok çevresel streslere karşı



## 2.2. Absisik Asit (ABA) Hormonu

Yüksek bitkilerde stres sinyal iletiminde en önemli rolü üstlenen hormon ABA hormonudur ve bu yüzden bitki stres hormonu olarak nitelendirilmektedir. ABA genelde tohum dormansisi, stomatal açılıp-kapanma ve bitkilerde stres toleransının artırılmasıyla ilişkilidir (Zeevaart ve Creelman, 1988; Phillips, vd., 1997; Xiong, vd.,2002). Ayrıca ABA, çevresel stresler sonucunda bazı özel gelişimsel genlerin düzenlediği sinyal iletim yollarıyla ilişkilidir (Shizonaki ve Yamaguchi, 1997). Bugüne kadar birçok çalışma ABA' nın tuzluluk stresi, düşük sıcaklık stresi, oksidatif stres, yüksek sıcaklık stresi gibi çoğu abiyotik çevresel streslere karşı koruyucu mekanizmaları tetiklediğini göstermiştir (Zeevaart ve Creelman, 1988; Giraudat, vd., 1994; Leung ve Giraudat, 1994; Ward ve Lawlor, 1990). Buna ek olarak, normal koşullarda bitki hücrelerinde ABA seviyesi çok düşüktür ve bu düşük ABA seviyesi bitki hücrelerinin büyümesi için gerekli hücresel süreçlerde görev almaktadır.



**Şekil 2.2.** ABA biyosentezinin düzenlenmesi. (ZEP: zeaksantin epoksidaz, NCED: 9-cis-epoksikarotenoid dioksijenaz, AAO: ABA-aldehit oksidaz, MCSU: MoCo sulfuraz) ( Xiong ve Zhu, 2003).

Fotosentetik yeşil alglerin evrimsel süreçte yüksek bitkilerin kökeni olabileceği düşünülmektedir. Öyle ki yeşil algler ve karasal yüksek bitkilerin çevre koşulları farklı olsa da metabolizmaları arasında çok büyük bir fark bulunmamaktadır (Yoshida, vd., 2003). Bu yüzden çevresel streslere karşı verilen yanıtlar birbirine benzemektedir

(Mendez, vd., 1999). Her ne kadar yeşil alglerde içsel ABA varlığı kanıtlanmış olsa da, bitkiler kadar çalışma yapılmamıştır. *C. reinhardtii*' de ABA'nın oksidatif strese karşı toleransta birçok antioksidan enzim aktivitesinde artış sağlayarak rol oynayabileceği gösterilmiştir (Yoshida, vd., 2004; Tillberg, 1970). Buna karşın, çeşitli çevresel stres koşullarında ABA' ya bağlı yanıtlar üzerinde daha çok araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

### 2.3. Fotosistem II Tamir Mekanizması

Fotosentezin tilakoid reaksiyonları kloroplastların tilakoidler denilen özelleşmiş iç membranlarında gerçekleşmektedir. Tilakoid reaksiyonlarının son ürünleri yüksek enerjili bileşikler olan ATP ve NADPH' dir. Işık enerjisi klorofillerde bulunan ışık toplama komplekslerinde (LHC) absorbe edildikten sonra *klorofil a* molekülü uyarılır ve bir dizi elektron transferi gerçekleşir.

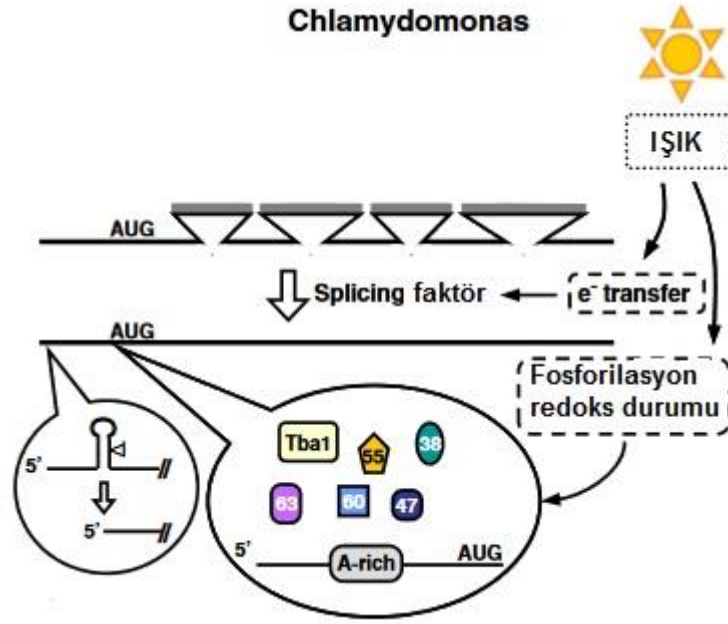
Tüm ökaryotik fotosentetik organizmalarda fotosistem I ve II (PSI ve PSII) olmak üzere iki farklı fotosistem merkezi bulunur. PSI genel olarak kırmızı ışığın kızıl ötesine yakın bölgesindeki (> 700 nm) ışığı absorbe ederken, PSII tercihen kırmızı ışığı (680 nm) absorbe eder. İki sistem arasındaki diğer bir fark PSI kuvvetli bir redüktan (indirgeyici) ve zayıf bir oksidan üreterek NADP<sup>+</sup> yi indirgerken, PSII zayıf bir redüktan ve suyu okside edebilen oldukça kuvvetli bir oksidan üretir (Taiz ve Zeiger, 2008). PSII reaksiyon merkezi; klorofilleri ve bağlı elektron transfer zinciri ile grana lamellerinde bulunur. PSI reaksiyon merkezi; bağlı pigmentleri, elektron transfer zinciri ve ATP sentaz sistemi ile tilakoidlerde (stromaya bakan yüzeylerinde) konumlanmıştır.

Yüksek bitkiler, algler ve siyanobakterilerin fotosentetik birimlerinin yapıları yüksek derecede korunmuştur. PSII anten proteinleri, D1 ve D2, ve bu proteinlere bağlı olan, PSII'den elektron transferinde iş gören, redoks-aktif bileşenlerden meydana gelir. D1 ve D2 proteinlerine ek olarak, PSII klorofil-bağlı anten proteinleri CP43 ve CP47, ve Cytb<sub>559</sub> proteinleri PsbE ve PsbF'yi içermektedir (Mulo, vd., 2012). Ayrıca, birçok düşük molekül kütleli proteinler PSII dimerinin oluşması ve fonksiyonu için gereklidir

Fotosentez sırasında doğal olarak meydana gelen yüksek oksidatif ortamdan dolayı tüm fotosentetik organizmalardaki PSII oksidatif hasara meyillidir. D1 proteini hasarın öncül hedefidir ve PSII'nin tamamıyla inaktif olması ve yapısının bozulmasından kaçınmak için feda edilmektedir (Nixon, vd., 2010; Mulo, vd., 2012). Bu yüzden normal fotosentetik büyüme koşullarında *psbA* geni tarafından kodlanan D1 proteini sürekli

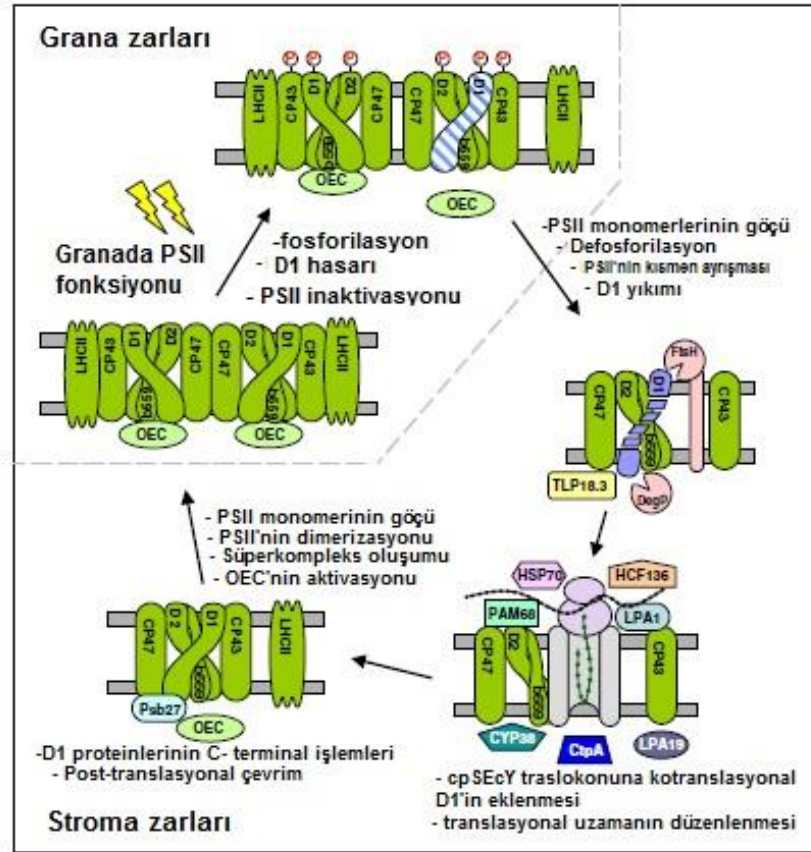
olarak yıkılır ve PSII tamir mekanizması adı verilen birçok adımlı süreçler ile yeniden sentezlenir. Yüksek bitki ve alglerin D1 proteini kloroplast genomundan kodlanmasına rağmen, tamir süreçleri birçok nükleer kodlanan proteinlerin yardımına gerektirmektedir ve bu yüzden iki genetik sistemin düzenlenmesinin koordinasyonu zorunludur (Mulo, vd., 2012).

Birçok fotosentetik organizmada olduğu gibi *C. reinhardtii*' de, PSII esas olarak D1 ve D2 olmak üzere iki temel proteinden oluşur (Mulo, vd., 2012). Tilakoid membrandaki en hassas protein D1 proteindir ve bu proteini kodlayan *psbA* geninin ifadesi farklı çevresel stresler tarafından düzenlenmektedir (Giardi, vd., 1997; Marin-Navarro, vd., 2007). Buna ek olarak D1 protein sentezinin translasyonel düzeyde regülasyonu 4 ana proteinden oluşan RNA bağlanma protein kompleksi tarafından sağlanır (Şekil 2.3.), bu kompleksteki proteinler sırasıyla kloroplast poly-A bağlayıcı protein (cPAB1), protein disülfid izomeraz (cPDI), 38 kDa'lık RNA bağlayıcı protein ve 55 kDa'lık proteindir (Danon ve Mayfield, 1994; Yohn, vd., 1998; Barnes, vd., 2004; Kim ve Mayfield, 1997). cPDI proteini cPAB1'i indirgeyerek kloroplast redoks potansiyeli yoluyla *psbA* mRNA' sının translasyonunun başlaması kontrol edilir. Ayrıca *psbA* mRNA' sının translasyonunun başlaması için *tba1* mRNA' sının ifadesi şarttır. Çünkü *tba1*, cPAB1 RNA bağlanma aktivitesi ve D1 proteininin translasyonu için gerekli translasyon faktörlerini kodlamaktadır (Somanchi, vd., 2005). Bu proteinlerin *psbA* mRNA'sına bağlanması, ışık ve protein fosforilasyonuna bağlıdır. Karanlıkta cPDI proteini bir ADP bağımlı kinaz vasıtasıyla fosforile edilir ve bu da protein kompleksinin *psbA* mRNA' sının 5 'UTR' sinden salınmasına ve translasyonun kesilmesine neden olur (Danon ve Mayfield, 1994).



**Şekil 2.3.** *C. reinhardtii*'de *psbA* gen ifadesinin temel basamaklarını gösteren model (Mulo, vd., 2012).

PSII fotohasarı düşük ışık da bile görülür ve bundan dolayı hasarın büyüklüğü ışık şiddeti ile orantılıdır. Nitekim, hasar gören D1 proteinini tüm ışık şiddetlerinde tamir edilmelidir, bu yüzden tüm fotosentetik aktivite sadece ışık hasarının oranı tamir oranını geçtiğinde azalır. PSII anten proteinlerinin fosforilasyonu hasarlı D1 proteinin yıkımı ve değiştirilmesinin birlikte olması için grana lamellerinde bulunan fotohasarlı PSII anten kompleksin stroma lamellerine göçü için sinyal olarak fonksiyon gördüğü düşünülmektedir (Mulo, vd., 2012). Fotohasarlı D1 proteinin birikimini engellemek için, fotosentetik organizmalarda PSII tamir döngüsü olarak bilinen çok basamaklı süreçler gelişmiştir. Şekil 2.4.' de görüldüğü gibi, özellikle D1 proteinini içeren hasarlı PSII anten proteinlerinin yenilenmesi için, bunların PSII tamir döngüsünün yüksek organize olmuş basamaklarını takip etmeleri zorunludur; (1) PSII anten proteinlerinin sırasıyla STN8 kinazlar ve PBCP fosfatazlar tarafından geri dönüşümlü fosforilasyonu ve defosforilasyonu, (2) PSII kompleksinin monomerizasyonu ve çıkarılması (3) hasarlı D1 proteinin proteolitik yıkımı, (4) D1 proteininin de novo sentezi ve özellikle çıkarılan PSII kompleks yerine konması, (5) PSII kompleksinin yenilenmesi.



**Şekil 2.4.** PSII Tamir döngüsünde meydana gelen süreçlerin şeması (Mulo, vd., 2012).

Fotoinbitör koşulları altında, çok sayıda reaktif oksijen türevleri (ROS) meydana gelerek, oksidatif hasara ve sonunda fotoinhibizasyon boyunca PSII'nin tamirini içeren PSII'nin iki merkez proteininden biri olan D1 proteininin yıkımına yol açar. ROS aynı zamanda yeni D1 kopyalarının, de novo sentezini de baskılar. Buna ek olarak, proteinler ROS'un dahil olduğu birçok reaksiyon tarafından modifiye edilir ve bunların karboksilasyonu yapılarında geri dönüşümsüz değişikliklere neden olur. ROS'un uzaklaştırılması için fotosentetik organizmalar iyi düzenlenen antioksidan ağına sahiptirler. Biyotik ve abiyotik stres şartları altında, ROS üretimi ve süpürülmesi arasında bir denge görülmektedir ve biriken ROS meydana geldiği alanın yakınlarındaki hücrelerde hasara neden olmaktadır. ROS çeşitli enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma bileşikleri tarafından uzaklaştırılmasına rağmen, ROS'un seviyesi çevresel değişimleri takiben hızla artar. ROS seviyesinde meydana gelen bu hızlı artış PSII tamir mekanizmasının inhibizasyonuna neden olur.

Bugüne kadar yapılan çalışmalar ROS'un PSII tamir mekanizması üzerine etkilerini ortaya koymasına rağmen, poliaminlerin PSII tamir mekanizmasında

üstlendikleri roller ile ilgili tam açıklayıcı bir model bulunmamaktadır (Allakhverdiev, vd., 2002; Nishiyama, vd., 2004). Antioksidan enzimlerin aktivitelerini artırabilmeleri ya da ROS ile bağ yaparak ortamdan uzaklaştırabilme kapasitelerinden dolayı poliaminlerin PSII tamir mekanizmasında iş görebileceği rapor edilmiştir (Hu, vd., 2015; Sen, vd., 2014). Buna karşın, bu konuda daha fazla araştırmaya gerek duyulmaktadır.

#### 2.4. Isı Şoku Proteinleri

Bazı çevresel stresler varlığında hücreler metabolizmalarını ya durdururlar ya da hücrenin temel fonksiyonları olan DNA, RNA, protein sentezi ve madde alışverişinde kısıtlamaya gitmektedirler. Hücreler bu stres koşullarına tolerans geliştirebilmek için stres proteinleri olarak adlandırılan bazı protein gruplarını sentezlemektedirler. Stres proteinlerinin en çok bilinen grubu Ritossa (1962) tarafından ısı şoku proteinleri (HSP) olarak tanımlanmıştır. HSP' ler birçok çevresel stres faktörü tarafından indüklenmekle birlikte hücrelerin homeostazisini sağlamak ve çeşitli çevresel streslerle başa çıkabilmek için gereklidir. Isı şoku proteinlerinin birçoğu moleküler şaperon olarak işlev görmektedirler. Şaperonlar sentezlenen proteinlerin stabilizasyonundan, stabil olmayan proteinlerin korunmasından, sentezlenen proteinlerin doğru konformasyonu almasından ve hatalı sentezlenen protein peptidlerinin yıkımından sorumludurlar (Hartl, 1996).

Isı şoku proteinleri genelde protein boyutuna göre isimlendirilmektedir. Örneğin HSP90 protein ailesi 90 kDa, HSP70 protein ailesi de 70 kDa boyutundadır (Menoret, vd., 1999).

**Çizelge 2.1.** Temel moleküler şaperonlar ve protein aileleri.

Şaperon Ailesi	Temel Fonksiyonları
HSP60	Protein katlanmalarına ve hatalı katlanmış proteinlerin yeniden doğru bir şekilde katlanmasına yardımcı olmak.
HSP70	Protein katlanmalarına ve hatalı katlanmış proteinlerin yeniden doğru bir şekilde katlanmasına yardımcı olmak.
HSP90	Proteinlerin stabilizasyonu ve aktivitelerinin korunması, degrades edilen protein artıklarının toplanması.

Şaperonlar (örneğin HSP' ler) evrimsel süreçte oldukça korunmuş proteinlerdir ve çevresel stresler sonucu oluşan protein hasarında hücre için oldukça gereklidir.

Ökaryotik organizmalarda HSP'lerin mRNA'larının ifadesi HSF (Heat Shock Factor)'ler tarafından gerçekleştirilmektedir. Isı şoku yanıtında HSF I anahtar rol oynamaktadır. HSF ailesinin diğer üyeleri de uzun süreli stres altında eksprese olmaktadır (Csermely, 1997).

HSP'ler, yüksek sıcaklığa maruz kalan organizmaların bu sıcaklığa tepki olarak sentezlediği proteinler olarak bilirse de günümüzde birçok çalışma HSP'lerin düşük sıcaklıkla olan ilişkisi üzerine yoğunlaşmıştır. Bu da HSP'lerin, düşük sıcaklık altında şaperon görevi görebileceğine işaret etmektedir (Sung, vd., 2003; Wang, vd., 2004; Mamedov ve Shono, 2008).

Önceden *C. reinhardtii*'de yapılan bir çalışmada kloroplast stromasında bulunan HSP70 sentezinden sorumlu olan *hsp70B* geninin, PSII fotoinhibisyonuna ve fotohasarına karşı koruyucu ve onarıcı bir rol üstlendiği kesin olarak gösterilmiştir (Schroda, vd., 1999). *hsp70B*'nin aşırı ifadesinin PSII fotoinaktivasyonunu baskıladığı, az ifadesinin ise tamamen ters etki yarattığı gösterilmiştir. Ayrıca *hsp70B*'nin hem inaktif edilmiş reaksiyon merkezlerinin tahrip edilmesini önleyip hem de yeni reaksiyon merkezlerinin sentezlenmesini teşvik ettiği ileri sürülmüştür.

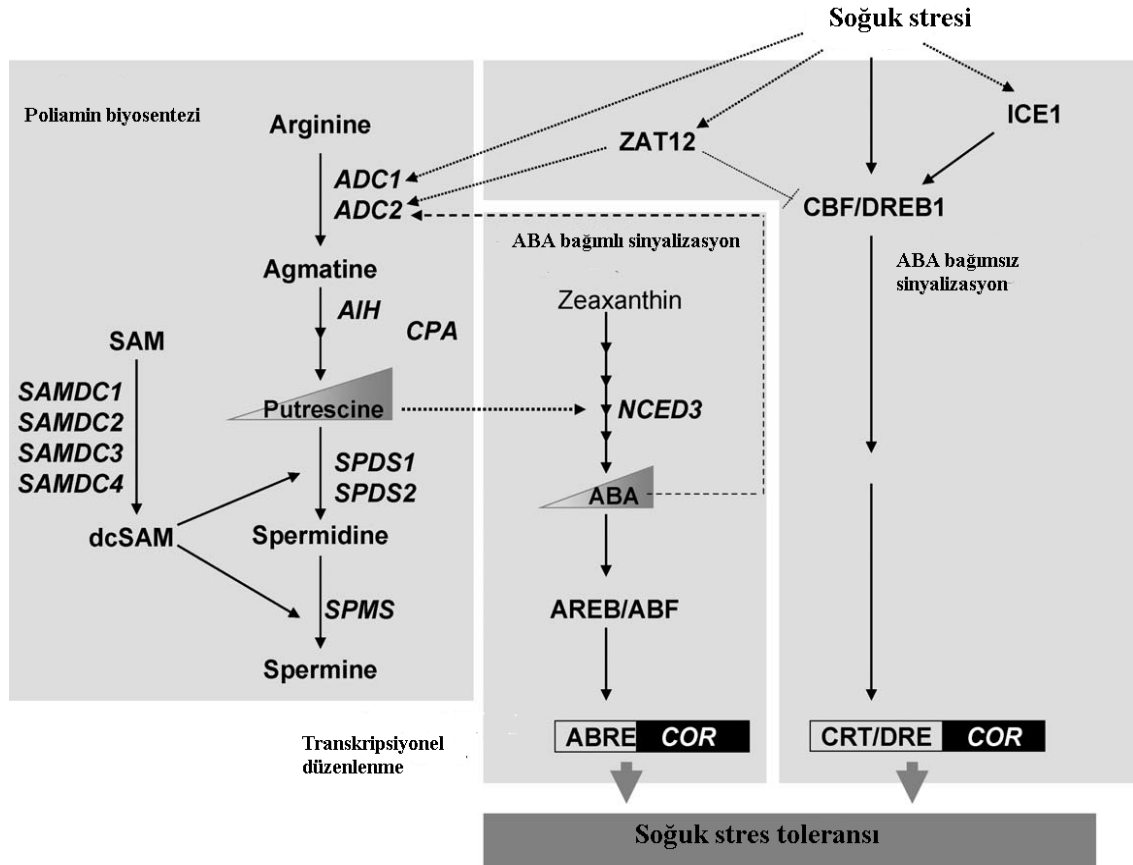
Bitkilerde çevresel stresler sonucu ROS'lar ve özellikle de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> birikimi meydana gelmekte ve bu sayede HSP'lerin sentezi indüklenmektedir. Stres sonucu artan HSP'ler (çoğunlukla HSP70, HSP90, HSP100) stres toleransında ve hücre korunmasında belirgin bir artışa neden olduğu ve biyotik/ abiyotik streslere karşı bitki korunmasında şaperon görevlerinin büyük rol oynadığı kabul görmektedir (Hu, vd., 2010; Sung ve Guy 2003; Rizhsky, vd., 2004; Chen, vd., 2008).

## 2.5. Düşük Sıcaklık Stresi

Düşük sıcaklık stresi bitki büyümesi, gelişimi ve verimini sınırlayan en önemli çevresel faktörlerden biridir. Düşük sıcaklık stresi hücre membran yapısına hasar vererek membrana bağlı enzimlerin aktivitesinde değişikliklere neden olup, membran stabilitesini ortadan kaldırabilmektedir (Kim, vd, 2002; Lyons, 1973). Ayrıca serbest şeker konsantrasyonu ve çözülebilir protein içeriğinde de değişikliklere neden olabilmektedir (Sakai ve Larcher, 1987). Bu yapısal değişikliklere ek olarak düşük sıcaklık fotosistem I'in fotoinhibisyonu, donmuş yapraklarda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> birikiminin artması gibi bir dizi fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler değişikliklerle sonuçlanabilir (Kudoh ve Sonoike, 2002 ). Dahası, düşük sıcaklık stresinin ribuloz-1,5-bisfosfat karboksilazın aktivitesinde

azalmayı indüklediği bildirilmiştir (Zhou, vd., 2006). Düşük sıcaklık stresi yeşil alglerde, yüksek bitkilerle benzer özellikte etkiler göstermektedir. Bununla birlikte düşük sıcaklık stresi yeşil alglerde hücre başına düşen klorofil miktarını yaklaşık olarak 6 kat düşürmektedir (Norman, vd.,1998). Karbon metabolizması dengesizleşmekte ve elektron transport mekanizmasında da bozulmalar meydana gelerek düşük sıcaklık stresi etkisiyle alg kültürleri sarı bir renk almaya başlamaktadırlar.

ABA yüksek bitkilerde soğuk, ozmotik ve kuraklık stresine yanıtta ana düzenleyici bitki stres hormonudur (Kim, vd., 2002). Bugüne kadar birçok çalışma düşük sıcaklığa uyumda ABA'nın poliaminlerle birlikte çalışarak olumlu etkileri olduğunu göstermiştir (Şekil 2.5.) (Cuevas, vd., 2008).



**Şekil 2.5.** Yüksek Bitkilerde soğuk strese karşı toleransta iş gören poliaminler ile ABA'nın birbirleriyle olağan ilişkisini gösteren model (Altabella, vd., 2010).

## 2.6. Tuzluluk Stresi

Tuzluluk stresi ilk başta su açığı ve  $K^+/Na^+$  oranlarındaki değişikliklerden kaynaklanan spesifik iyon streslere neden olmaktadır. Böylece  $Na^+$  ve  $Cl^-$  konsantrasyonları artarak hücrelerin fizyolojik süreçleri sekteye uğrar ve bitki büyüme ve gelişimi olumsuz yönde etkilenir. Ayrıca tuz stresi stoma kapanması, Rubisco aktivitesinin inhibasyonu ve fotosentetik cihazdaki membran proteinlerinin degradasyonuna neden olur ve böylece fotosentetik verimin düşmesine yol açmaktadır (Meloni, vd., 2003.; Sudhir ve Murthy, 2004.; Brugnoli ve Björkman, 1992). Tuz stresi PSII maksimum kuantum verimi ( $F_v / F_m$ ), net fotosentetik oranı, stoma geçirgenliği, hücreler arası  $CO_2$  konsantrasyonu ve fotokimyasal aktarım katsayısını azaltmaktadır. Ayrıca, tuz stresi PSII tamir mekanizmasını da inhibe etmektedir (Allakheverdiev, vd., 2002).

Dışsal poliamin uygulamalarının tuzluluk stresi altında fotosentetik verimdeki azalmayı düşürebileceği bugüne kadar yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Özellikle de putresinin fotosentetik cihazla ilgili fotokimyasal aktarımın geliştirilmesini güçlü bir şekilde etkilediği bildirilmiştir (Zhang, vd., 2009). Fakat bu iyileştirmeler poliaminin çeşidine ve stres derecesine bağlıdır. Bazı yayınlar içsel poliaminlerin düzeyi ve formlarındaki değişikliklerin tuz stresli bitkilerin fotokimyasal verimliliği düzenlenmesinde yer aldığını ve poliamin metabolizması ile ilgili enzimlerin fotosentez ile yakından ilişkili olduğunu rapor etmişlerdir. Buna karşın, tuz stresinde poliaminlerin PSII tamir mekanizması ile ilişkisi üzerine literatürde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

## 2.7. Literatür Özeti

Düşük sıcaklık stresi altında strese yanıt olarak dokularda ve hücrelerde ABA birikiminde artış olduğu rapor edilmiştir (Chen, vd., 1983; Daie ve Campbell, 1981).

Düşük sıcaklık stresi altında ABA'nın katalaz (CAT) enzim aktivitesinde ve *cat3*, *car30* ve *car757* gibi antioksidan enzimleri kodlayan genlerin transkript seviyelerinde artış gözlenmiştir (Anderson, vd., 1994).

ABA uygulaması, mısır fidelerinde süperoksit dismutaz (SOD), CAT, askorbat peroksidaz (APX) ve glutatyon peroksidaz (GPX) antioksidan enzimlerin daha yüksek

aktivitelerini ve normal kültür sıcaklığında ve ısı stresinde düşük seviyede lipid peroksidasyonunu sürdürmesini sağlamıştır (Gong, vd., 1998).

Cuevas, vd., (2008), yaptıkları çalışmada putresinin ABA gen ifadesini düzenlediğini ve soğuk stresi altında ABA seviyesini kontrol ettiğini göstermiştir.

İçsel ABA seviyesi bitkilerin soğuk stresine karşı adaptasyonunu artırmak için poliaminleri, poliaminlerin biyosentetik veya yanıt genlerini modüle ettiği bildirilmiştir (Anderson, vd., 1994; Shen, vd., 2000; Cuevas, vd., 2008; Groppa ve Benavides, 2008).

Düşük sıcaklık stresi altında *Arabidopsis thaliana*' da *ADC1* gen ifadesinin indüklendiği ve putresin birikiminin arttığı bildirilmiştir (Hummel, vd., 2004).

Tuzluluk stresi altında yetiştirilen tütün bitkilerinin ABA uygulamasıyla APX ve SOD antioksidan enzimlerin aktivitesinde artış meydana gelmiştir (Bueno, vd., 1998).

Tuzluluk stresi altında dışsal putresin uygulaması, fotosentetik aparatın karşılıklı olarak yeniden düzenlenmesini başlatıp, yüksek tuz konsantrasyonlarında bile hücre büyümesine olanak sağladığı rapor edilmiştir (Demetriou, vd., 2007).

Dışsal ABA uygulaması *C. reinhardtii*' de tuzluluk stresi altında ROS üretiminde azalma ve antioksidan enzimlerin gen ifadelerinde artış sağlayarak bu enzimlerin aktivitelerinde gelişme gözlemlendiği rapor edilmiştir (Yoshida, vd., 2004).

Poliaminlerin çevresel streslere karşı fotosentetik aparatın yapısını ve işlevini koruduğu bildirilmiştir (Demetriou, vd., 2007; Shu, vd., 2012).

Dışsal putresinin, *Cucumis sativus* türünde tilakoid membranlarda toplam poliamin miktarını artırarak, tuzluluk stresine karşı tilakoid membranları koruduğu, fotokimyasal verimi dengede tuttuğu ve PSII aktivitesinin zarar görmesini engellediği bildirilmiştir (Shu, vd., 2012).

Alüminyum stresi altında *Xanthoria parietina*' da yapılan bir çalışmada *psbA* gen ifadesinin düzeyinde azaldığı, dışsal spermidin uygulamasıyla ise arttığı rapor edilmiştir (Sen, vd., 2014).

Hu, vd., (2015), yaptıkları çalışmada tuzluluk stresine maruz bırakılan domates fidelerinde, kontrol grubuna ve spermidin eklenmiş fidelere göre western blot analizi sonucu D1 protein miktarının daha az olduğu, spermidin eklenmeyen grupta *psbA* gen ifadesinin tuz stresi tarafından inhibe edildiği gösterilmiştir.

Sun, vd., (2010), yaptıkları çalışmada, ısı şokuyla muamele edilen erik meyvelerini düşük sıcaklık stresine maruz bıraktıklarında ilk 10 gün boyunca sHSP mRNA' larında artış gözlemlendiğini rapor etmişlerdir.

Domates, avokado, greyfurt ve elmada sHSP mRNA' larının ısı şokuyla uyarıldığı düşük sıcaklığa alındıklarında belirlenmiştir (Kadyrzhanova, vd., 1998; Woolf, vd., 1999; Porat, vd., 2000; Wang, vd., 2001).

Mısır bitkisinde yapılan bir çalışmada HSP70' in ABA kaynaklı antioksidan savunma sisteminde sıcaklık ve kuraklık stresine karşı rol oynayabileceği rapor edilmiştir (Hu, vd., 2010).

Schroda, vd., (1999), *C. reinhardtii* hücrelerini yüksek ışık stresine maruz bıraktıktan sonra *hsp70B* geninin ifadesinin artmasıyla PSII inaktivasyonunun baskılandığını ve tamir mekanizmasına katkıda bulunduğunu bildirmişlerdir.

Königshofer ve Lechner, (2002), yonca bitkisinde putresin biyosentezini inhibe ederek yüksek sıcaklık stresine maruz bırakılan örneklerde HSP protein sentezinin büyük miktarda azaldığını rapor etmişlerdir. Ayrıca aşırı putresin sentezleyen tütün BY2 hücre hattında da yüksek sıcaklık altında aşırı putresinin membran bütünlüğünü bozması ve stres sinyal iletimini dengesizleştirilmesi sonucu HSP kodlayan genlerin ifade seviyelerini etkilediği bildirilmiştir.

Cheng, vd., (2012), olgunlaşmış domates meyvesinde yaptıkları çalışmada yüksek sıcaklık stresinin HSP genlerinin (AY128100.1, U66300.1 ve BG129203) ifadesini aşırı miktarda artırdığını, fakat dışsal spermidinin yüksek sıcaklık stresi altında sentezlenen bu aşırı miktarda HSP genlerini baskıladığını bildirmişlerdir.

### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Kültür Koşulları

*C. reinhardtii*, Chlamydomonas Araştırma Merkezi kültür koleksiyonundan elde edildi. *C. reinhardtii* TAP (Tris–acetate phosphate, Çizelge 3.1.) ortamında 250 ml' lik erlenlerde,  $60 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  ışık yoğunluğunda, 16:8 saat aydınlık:karanlık periyodunda ve 25 °C sıcaklıkta (Panasonic Cooled Incubator, MR-154) kültüre alındı (Harris, 1989).

**Çizelge 3.1.:** TAP ortamı (pH=7) içeriği.

Stok Solüsyon	Hacim	İçerik	Solüsyondaki Konsantrasyon	Ortamdaki Konsantrasyon
Tris base	2.42 gr	$\text{H}_2\text{NC}(\text{CH}_2\text{OH})_3$		$2.00 \cdot 10^{-2} \text{ M}$
TAP-tuzları Solüsyonu	25 mL	$\text{NH}_4\text{Cl}$ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	15 gr. $\text{L}^{-1}$ 4 gr. $\text{L}^{-1}$ 2 gr. $\text{L}^{-1}$	$7.00 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ $8.30 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ $4.50 \cdot 10^{-4} \text{ M}$
Fosfat Solüsyonu	1 mL	$\text{K}_2\text{HPO}_4$ $\text{KH}_2\text{PO}_4$	28.8 gr. 100 $\text{mL}^{-1}$ 14.4 gr. 100 $\text{mL}^{-1}$	$1.65 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ $1.05 \cdot 10^{-3} \text{ M}$
İz element Solüsyonu	1 mL	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $\text{H}_3\text{BO}_3$ $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ $(\text{NH}_4)_6\text{MoO}_3$	5.00 gr. 100 $\text{mL}^{-1}$ 2.20 gr. 100 $\text{mL}^{-1}$ 1.14 gr. 100 $\text{mL}^{-1}$ 0.50 gr. 100 $\text{mL}^{-1}$ 0.50 gr. 100 $\text{mL}^{-1}$ 0.16 gr. 100 $\text{mL}^{-1}$ 0.16 gr. 100 $\text{mL}^{-1}$ 0.11 gr. 100 $\text{mL}^{-1}$	$1.34 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ $1.36 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ $1.84 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ $4.00 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ $3.29 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ $1.23 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ $1.00 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ $4.44 \cdot 10^{-6} \text{ M}$
Glasiyal Asetik Asit	1 mL	$\text{CH}_3\text{COOH}$		



Şekil 3.1. *C. reinhardtii* hücresinin genel görünümü (Rochaix, vd., 1998).

Çizelge 3.2. *C. reinhardtii*' nin taksonomisi (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, Taxonomy ID: 906914).

Süper alem	<i>Eukaryota</i>
Alem	<i>Plantae</i>
Alt Alem	<i>Viridiplantae</i>
Şube	<i>Chlorophyta</i>
Alt Şube	<i>Chlorophytina</i>
Sınıf	<i>Chlorophyceae</i>
Takım	<i>Chlamydomonadales</i>
Aile	<i>Chlamydomonadaceae</i>
Cins	<i>Chlamydomonas</i>
Tür	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>

### 3.2. Stres Denemeleri

Düşük sıcaklık stresi için ön denemeler sonucu belirlenen 1 mM putresin uygulanan örnekler 3 saat boyunca inkübe edildi. Putresin eklenen ve eklenmeyen örnekler inkübatörde  $60 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  ışık yoğunluğunda, 16:8 saat aydınlık:karanlık periyodunda ve 10 °C sıcaklıkta 24 saat, 48 saat ve 72 saat olmak üzere 3 farklı zaman periyodu olmak üzere inkübe edilmiştir.

Tuzluluk stresi için 1 mM putresin uygulanan örnekler 3 saat boyunca inkübe edildi. Putresin eklenen ve eklenmeyen örnekler inkübatörde  $60 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  ışık yoğunluğunda, 16:8 saat aydınlık:karanlık periyodunda ve 25 °C sıcaklıkta 1. gün, 3. gün ve 7. gün olmak üzere 3 farklı zaman periyodunda inkübe edilmiştir. Tuz konsantrasyonları yapılan ön çalışmalar sonucunda 5 mM, 30 mM ve 75 mM NaCL olarak belirlenip 3 farklı konsantrasyon ile deneme kuruldu.

### 3.3. Hücre Büyüme Ölçümü

Klorofil içeriği, hücre büyümesinin belirteci olarak da kullanılmaktadır (Yoshida, vd., 2004). Bu yüzden düşük sıcaklık stresi, tuzluluk stresi ve putresinin *C. rehidratii* büyümesi üzerine etkisini göstermektedir. Düşük sıcaklık stresine ait gruplar ve tuzluluk stresine ait gruplardan örnekler alındıktan sonra hücreleri toplamak için örnekler 2.9 g' de 10 dk santrifüj (Centurion Scientific K3 Series) edildi. Santrifüjden sonra süpernatant kısım olan TAP ortamı uzaklaştırıldı. Çöken hücreler 1 ml %80' lik metanolle pipetaj yapıp yeşil ışık ortamında 65°C sıcaklıkta 30 dk inkübe edildikten sonra +4°C 4:30 dk 5.2 g' de santrifüj edildi. Santrifüjden sonra süpernatant kısım spektrofotometre (Optizen UV/VIS, Optizen POP) kuvvetlerine alınıp 650 ve 665 nm' de ölçüm alındı ve sonuçlar büyüme formülüyle hesaplandı(Mackinney, 1941). Tuzluluk stresinde, farklılık daha çok belli olduğu için klorofil analizi yerine hücre sayımı yapılmış ve sonuçları verilmiştir. Her örnek 3 tekrarlı olacak şekilde ölçüm alınmıştır. Büyüme formülü;  $(0.0255 \times \text{OD}_{650} \text{ nm}) + (0.0040 \times \text{OD}_{665} \text{ nm}) = \text{total klorofil içeriği (mg/ml)}$  şeklindedir.

### 3.4. Lipit Peroksidasyonu Analizi

Lipit peroksidasyon miktarı lipit peroksidasyonun belirteci olan Malondialdehit (MDA) miktarının ölçülmesi ile tespit edilmiştir.

Her örnekten 1,5 ml' lik iki ependorf tüp 2900 g' de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant kısım uzaklaştırılıp pellet kısım 2 ml % 0.1' lik TCA ile homojenize edildi. Ekstrat 6300 g' de 10 dk boyunca 10 °C' de santrifüj edildi. Süpernatant kısım toplanıp üstüne 4 ml %0.5' lik TBA (%20' lik TCA içinde çözülmüş) eklendi. Su banyosunda (JEIO TECH BS-11) 25 dk 95 °C' de inkübe edildi. Su banyosundan alınan örnekler hızlı bir şekilde buz içinde soğutuldu. 6300 g' de 10 dk boyunca 10 °C' de santrifüj edildi. 532 ve 600 nm' de ölçüm alındı (Heath ve Packer, 1968).

### 3.5. Rubisko Enzim Analizi

Rubisko enzim analizi MyBioSource Plant Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO) ELISA Kit (Katalog Numarası: MBS705973) ile yapıldı. Her örnekten 1,5 ml' lik ependorf tüp 2900 g' de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant kısım uzaklaştırılıp pellet kısım 1 ml örnek ekstraksiyon tamponu ile havanda öğütüldü. Tekrar ependorfa alınan homojenat, 30 dk boyunca 4°C' de inkübe edildi. Ardından 10 dk boyunca 5000 rpm' de santrifüj edildi. Süpernatant kısım analiz süresine kadar 4°C' de muhafaza edildi. Kullanılacak örnekler, örnek seyreltme tamponu ile 5 kat seyreltikten sonra elisa plate kuyucuklarına 50 µl örnek ve standartlar eklendi. Örneklerin üstüne de 50 µl antikor eklendi. Ardından 60 dk boyunca 37°C' de inkübe edildi. İnkübasyon işleminden sonra kuyucuklar aspire edildi ve her bir kuyucuk 3 defa 200 µl yıkama solüsyonu ile yıkandı. Her bir kuyucuğa 100µl HRP-conjugate solüsyonu eklendi ve 60 dk boyunca 37°C' de inkübe edildi. İnkübasyon işleminden sonra kuyucuklar aspire edildi ve her bir kuyucuk 3 defa 200 µl yıkama solüsyonu ile yıkandı. Her kuyucuğa 90µl TMB substrat eklendi ve karanlıkta 37°C' de 20 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyon işleminden sonra her kuyucuğa 50µl durdurma solüsyonu eklendi ve Eliza Okuyucu (Thermo Multiskan Go Microplate Spectrophotometer) cihazında 450 nm' de ölçüm alındı.

### 3.6. Prolin Analizi

Her örnekten 1,5 ml' lik ependorf tüp 2900 g' de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant kısım uzaklaştırılıp pellet kısım %3' lük sülfosalisilik asit ile homojenize edildi. Homojenat filtre kağıdı ile süzüldükten sonra 2 ml süzüntü üzerine 2 ml glacial asetik asit ve 2 ml ninhidrin çözeltisi eklenip 1 saat 100 °C inkübe edildi. (Ninhidrin çözeltisi 50 ml için: 1,25 gr ninhidrin, 30 ml glacial asetik asit, 20 ml 6 M fosforik asit).

Su banyosundan alınan örnekler hızlı bir şekilde buzda soğutuldu. Her örneğe 4 ml toluen eklenip 15-20 sn çalkalandı. Toluen fazı toplanıp kuvars küvetlerde 520 nm’ de spektrofotometrede ölçüm alındı.

### 3.7. Total Protein İzolasyonu

Her örnekten 1,5 ml’ lik iki ependorf tüp 2900 g’ de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant kısım uzaklaştırılıp pellet kısım sıvı azot ile öğütüldükten sonra 1,5 ml 50 mM fosfat tamponu (PBS) ile homojenize edildi. 14500 g’ de 15 dk santrifüj edildi. Süpernatant kısım yeni ependorf tüplere alınıp analize kadar -80 °C’ de (Panasonic MDF-US3865-PE) muhafaza edildi.

**Çizelge 3.3.** 50 mM fosfat tamponu (pH= 7,5) içeriği.

50 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
50 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
%8	Polyvinylpyrrolidone (PVP)
%0,01	TritonX-100
1 mM	EDTA

### 3.8. CAT Enzim Analizi

Bir ependorfa 1 ml CAT reaksiyon tamponu konulup, izole edilmiş total proteinden 10 µl eklenip çalkalandı. Tüpteki karışım kuvars küvete boşaltıldı. Spektrofotometrede 240 nm’ de 3 dk boyunca 15 sn aralıklarla kinetik ölçüm yapıldı (Bergmeyer,1970).

**Çizelge 3.4.** CAT reaksiyon tamponu (pH= 7,5) içeriği.

50 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
50 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
%0,3	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
0,1 mM	EDTA

### 3.9. APX Enzim Analizi

Bir ependorfa 1 ml APX reaksiyon tamponu konulup üstüne izole edilmiş total proteinden 10 µl eklenip çalkalandı. Tüpte bulunan karışım kuvars küvete boşaltıldı.

Spektrofotometrede 290 nm' de 3 dk boyunca 15 sn aralıklarla kinetik ölçüm yapıldı (Nakano ve Asada, 1981).

**Çizelge 3.5.** APX reaksiyon tamponu (pH= 7,8) içeriği.

0,2 M	Tris/HCl
0,25 mM	Askorbik asit
0,5 mM	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

### 3.10. ABA Analizi

ABA analizi için CUSABIO Plant hormone abscisic acid (ABA) ELISA Kit (Katalog Numarası: CSB-E09159PI) kullanıldı. 0,5 g alg örneği 4,5 ml örnek ekstraksiyon tamponu içinde öğütüldü ve 4° C' de bir gece boyunca karanlıkta çalkalayıcı ile alt üst edildi. Elisa plate kuyucuklarına 50µl öğütülmüş alg örnekleri ve standartlar eklendi. Ardından her kuyucuğa 50µl Antikor eklenerek 37 ° C' de 30 dk inkübe edildi. İnkübasyondan sonra kuyucuklar aspire edilip 3 kez 200 µl yıkama solüsyonu ile yıkandı. Her kuyucuğa 100µl HRP-konjugat eklendi ve sonra 37 ° C'de 30 dk inkübe edildi. İnkübasyondan sonra her kuyucuk aspire edilip 3 kez 200 µl yıkama solüsyonu ile yıkandı. Her kuyucuğa 90µl TMB substrat solüsyonu eklendi ve karanlıkta 37 ° C' de 20 dk inkübe edildi. Ardından her kuyucuğa 50µl stop solüsyonu eklendi ve 450 nm' ye ayarlanmış Eliza Okuyucu cihazında absorbans değerleri ölçüldü.

### 3.11. RNA İzolasyonu ve cDNA Eldesi

Her örnekten 1,5 ml' lik iki ependorf tüp 2900 g' de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant kısım uzaklaştırılıp pellet kısım 1 ml Trizol ile homojenize edildi. Homojenize edilen örnekler 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Homojenat üstüne 200 µl kloroform eklenip çalkalandı ve 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. 11.300 rpm' de 15 dk boyunca 4°C' de santrifüj edildi. Üst faz yeni ependorflara alındıktan sonra üstüne 500 µl isopropanol eklendi ve ependorf el yardımıyla yavaş bir şekilde 5 defa alt üst edildi. 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. 12.000 rpm.' de 10 dk boyunca 4°C' de santrifüj edildi. Süpernatant kısım uzaklaştırıldıktan sonra pellet 1 ml soğuk % 75' lik etanol ile yıkandı. 9.100 rpm' de 5 dk boyunca 4°C' de santrifüj edildi. Süpernatant kısım atıldıktan sonra ependorflar 15 dk boyunca oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Kuruyan örnekler 100 µl DEPC su ile çözüldü. RNA'dan cDNA elde etmek için Applied Biosystems High-Capacity-cDNA RT Kit (Katalog Numarası: 4368814) kullanıldı (BIO-RAD T100 Thermal Cycler).

**Çizelge 3.6.** RT-PZR reaksiyonu için örnek başına kullanılan mix içeriği.

RNA	10 µl
10X RT Buffer	2 µl
25X dNTP Mix (100 mM)	0.8 µl
10X RT Random Primers	2 µl
Multiscribe RT	1 µl
Nükleaz içermeyen H <sub>2</sub> O	4.2 µl

**Çizelge 3.7.** RT-PZR protokolü.

25 °C	10 dk
37 °C	120 dk
85 °C	5 dk

### 3.12. Kantitatif Gerçek Zamanlı-PZR

PROMEGA GoTaq® qPCR Master Mix (Katalog Numarası: A6001) ile Gerçek Zamanlı-PZR (Agilent AriaMx RealTime PCR System G8830A) reaksiyonu kuruldu.

**Çizelge 3.8.** Gerçek Zamanlı-PZR reaksiyon içeriği.

0.5 µL	İleri primer
0.5 µL	Geri primer
1 µL	Master mix
10 µL	cDNA
8 µL	Nükleaz içermeyen H <sub>2</sub> O

**Çizelge 3.9.** Kullanılan primer dizileri.

Gen adı	İleri iplik	Geri iplik
<i>psbA</i>	TTCCTACTCAGTCTTCACCTC	GATAAGCGTTACCGTTTCCC
<i>odc2</i>	GTAACCCTCTCGCATACTC	GCAATTCCTTCCATCCCA
<i>tba1</i>	CTCTTTCTCGCACTCAAGTC	GTTCTTAACAAAGTCCTCGCC
<i>hsp70C</i>	GCCTACTTCAACGACTCCCA	CTCCTCATCGTCTTCCGCTG
<i>hsp90A</i>	CTTATCTCCAACGCCTCCGA	GACCATGACCTTCTCCACCT
<i>hsp90C</i>	TTCTCCTCCATCCTCTACATCC	GTTGATCTCCATAATCTTGCGG
<i>18SrRNA</i>	ACTGCTCTGCTCCACCTTCC	TATTCAGAGCGTAGGCCTGC

### **3.13. İstatistiksel Analiz**

Bu tezde control grubu ve uygulama grupları arasındaki farklılıkları istatistiksel olarak göstermek için ANOVA-One Way ve t-student testi kullanılmıştır. Ayrıca, poliamin gen ifadesinde meydana gelen değişimlerin diğer gen ifadeleri ve fizyolojik parametreler ile olası ilişkileri Pearson Korelasyon Testi ile saptanmıştır.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Düşük Sıcaklık Stresine Ait Bulgular

#### 4.1.1. Büyüme sonuçları

**Çizelge 4.1.** Düşük sıcaklık stresi hücre büyüme (mg klorofil/mL kültür) sonuçları. X; grubun değeri, Std; standart sapma, \*; ANOVA testi sonucunda  $p < 0.05$ .

Deney Grupları	n	0 h X±SD	24 h X±SD	48 h X±SD	72 h X±SD
Kontrol	3	5.96±0.017	8.7±0.057	9.84±0.015	13.45±0.006
10°C	3	5.87±0.014	5.13±0.06*	4.85±0.015*	4.03±0.009*
10°C+ put	3	5.78±0.05	7.12±0.024	10.26±0.02	10.85±0.002

Düşük sıcaklık stresinin etkisiyle 3. günde hücre büyümesinde kademeli olarak azalma gerçekleşmiştir. En düşük hücre yoğunluğuna sahip olan grup 72 saatlik düşük sıcaklık stresine maruz kalan örnekte görüldü.

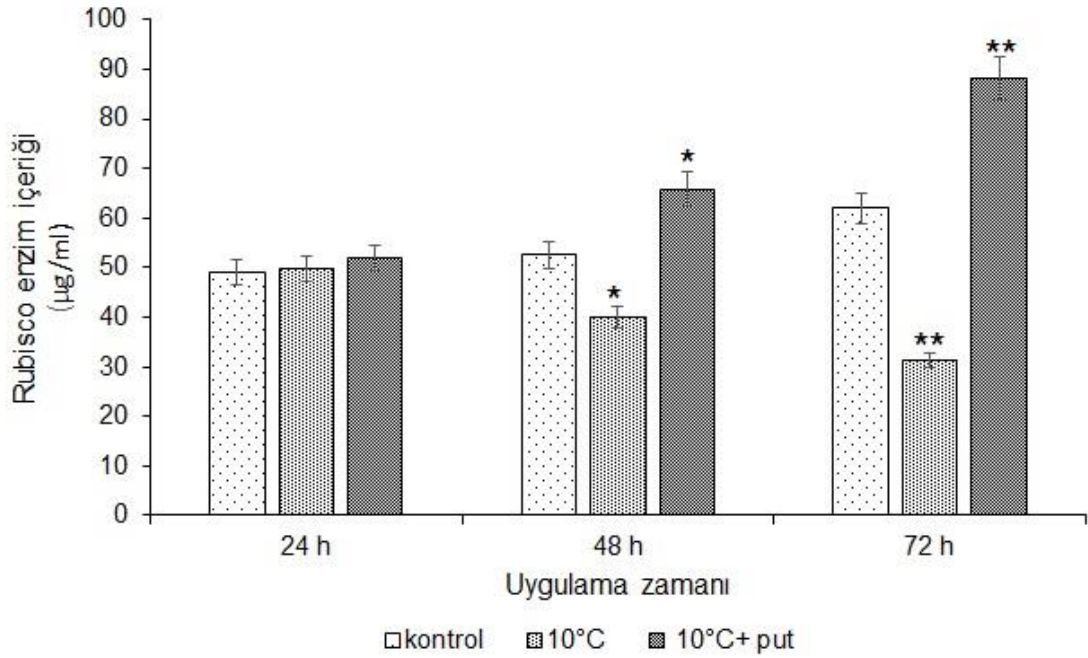
#### 4.1.2. Lipit peroksidasyonu

**Çizelge 4.2.** Düşük sıcaklık stresi MDA içeriği ( $\text{nmol} \cdot 10^{-6} \text{ hücre}^{-1}$ ), X; grubun değeri, Std; standart sapma, \*; ANOVA testi sonucunda  $p < 0.05$ .

Deney Grupları	n	24 saat X±Std	48 saat X±Std	72 saat X±Std
Kontrol	3	0.083±0.02	0.089±0.04	0.092±0.01
10°C	3	0.13±0.042*	0.199±0.05*	0.28±0.08*
10°C+ put	3	0.079±0.02	0.083±0.09	0.095±0.012

Düşük sıcaklık stresinde total MDA içeriği 48 ve 72. saatlerde önemli derecede artmıştır. Stres sırasında artan MDA içeriği hücre membranının hasara uğradığının göstergesidir. MDA içeriği putresin uygulanan ve uygulanmayan gruplar arasında önemli farklılıklar gözlenmiştir. Putresin uygulanan gruplardaki MDA içeriği uygulanmayan gruplara göre daha düşük seviyede bulunmuştur. Sonuçlar putresinin düşük sıcaklık stresi altında hücreleri yüksek lipit peroksidasyondan koruduğunu göstermiştir.

#### 4.1.3. Rubisko enzim aktivitesi

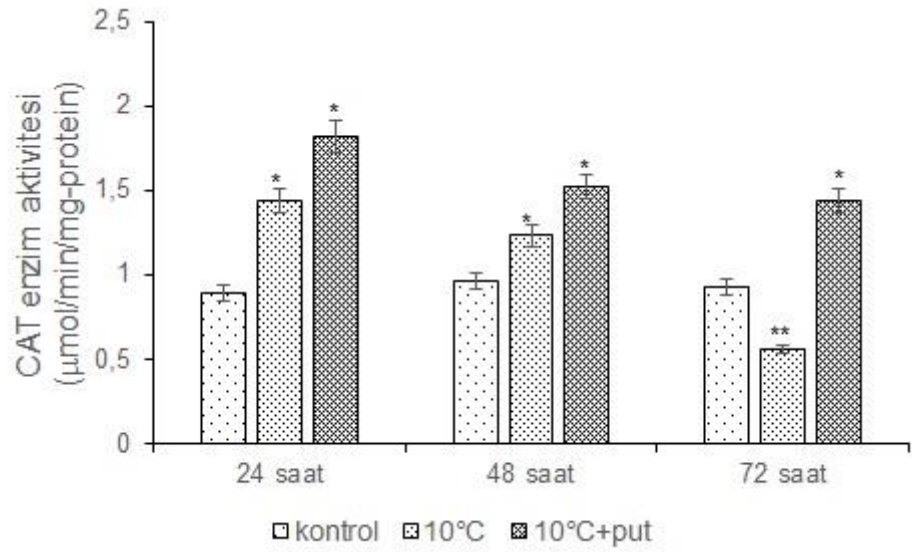


**Şekil 4.1.** Düşük sıcaklık uygulaması yapılmış putresinli ve putresin içermeyen grupların Rubisko enzim içeriği, \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ .

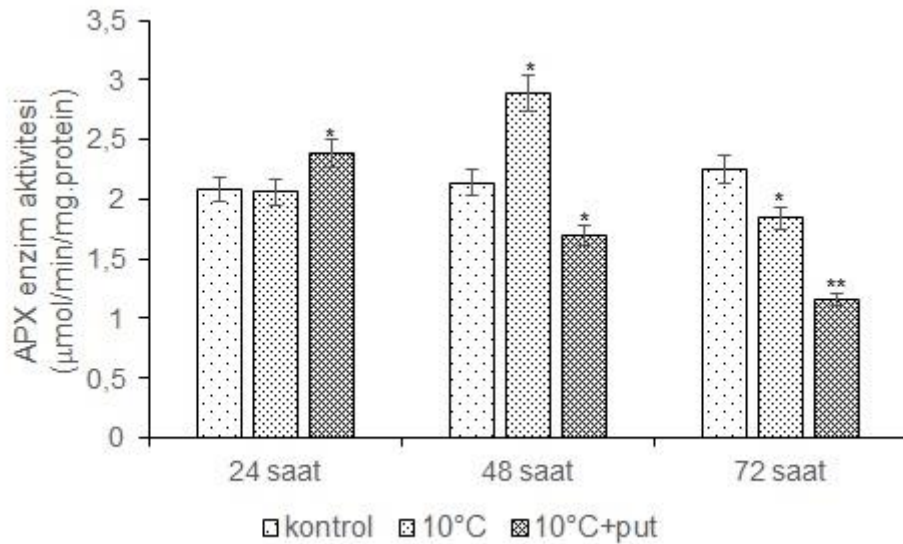
Rubisko enzim aktivitesi düşük sıcaklık stresi (Şekil 4.1.) uygulanan gruplarda kademeli olarak azalmıştır. İlk 24 saatte Rubisko enzim içeriğinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlenmemiştir. 48. saatten itibaren putresin uygulaması yapılmayan kültürlerde Rubisko enzim içeriği yaklaşık 1.34 kat azalırken, putresin uygulanan kültürlerde 1.5 katlık artış meydana gelmiştir. Özellikle 72. saatte putresin uygulaması yapılmayan kültürlerde 2 katlık bir düşüş gözlenmiştir ( $p<0.01$ ). Buna karşın, putresin uygulanan kültürlerde uygulanmayan örneklere göre yaklaşık olarak 1.5 kat daha fazla Rubisko enzim içeriği belirlenmiştir.

#### 4.1.4. Antioksidan enzim aktiviteleri

CAT aktivitesi 24 saat düşük sıcaklık stresi uygulanan grupta önemli derecede artış göstermiştir. 72 saatlik grupta ise kontrol grubuna göre CAT aktivitesinde yaklaşık 1.65 kat azalma gözlenmiştir (Şekil 4.2.,  $p<0.05$ ). Putresin uygulanan gruplarda 24, 48 ve 72 saatlik örneklerde sırasıyla 2.04, 1.59 ve 1.56 kat artış gözlenmiştir.



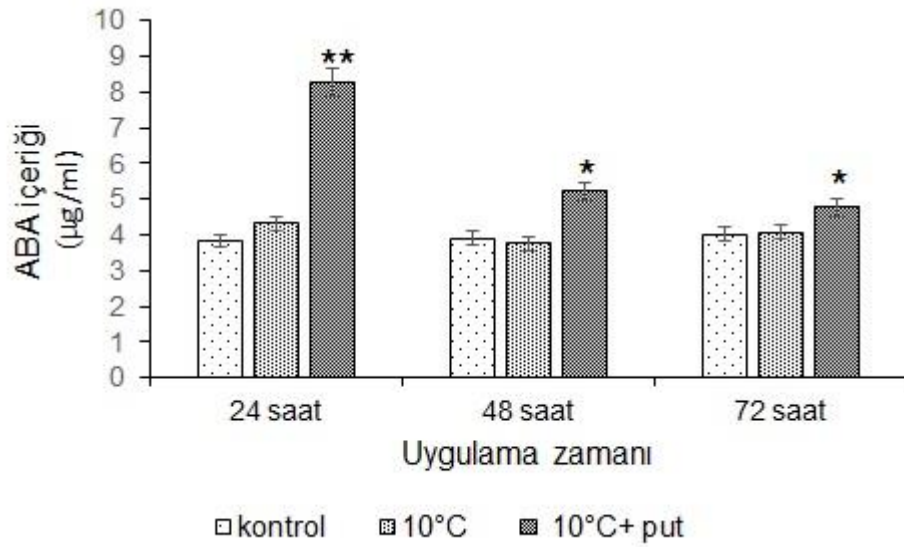
**Şekil 4.2.** Düşük sıcaklık uygulaması yapılmış putresinli ve putresin içermeyen grupların CAT enzim aktivitesi, \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ .



**Şekil 4.3.** Düşük sıcaklık uygulaması yapılmış putresinli ve putresin içermeyen grupların APX enzim aktivitesi, \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ .

Düşük sıcaklık koşullarında APX enzim aktivitesinde 48. saatte 1.35 katlık artış gözlenirken, 72. saatte 1.25 kat azalmıştır ( $p<0.05$ ). Putresin uygulanan gruplarda, ilk 24 saatte APX aktivitesinde istatistiksel olarak kontrole göre önemli bir artış saptanmamıştır. Buna karşın, 48 ve 72. saatlerde APX aktivitesinin önemli derecede azaldığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.3.).

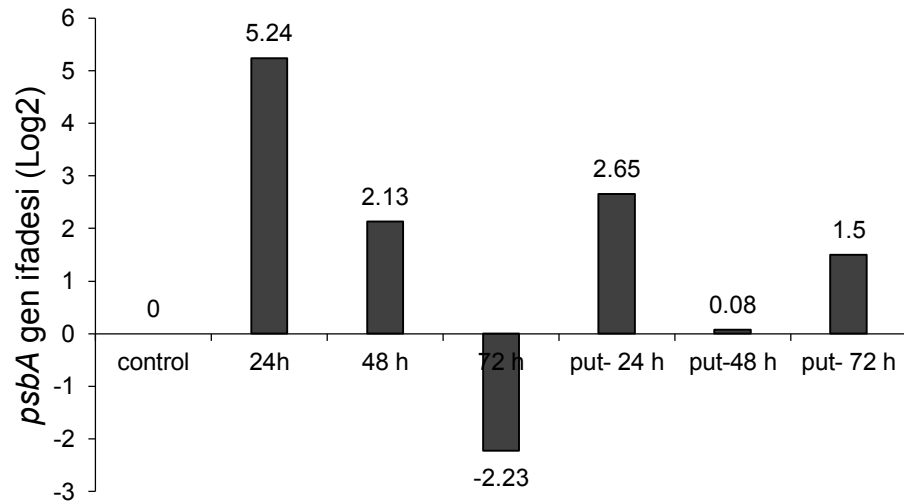
#### 4.1.5. İçsel ABA seviyesi



**Şekil 4.4.** Düşük sıcaklık uygulaması yapılmış putresinli ve putresin içermeyen grupların içsel ABA seviyesi, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

ABA seviyesinde, düşük sıcaklık stresine maruz bırakılan hücrelerde önemli bir değişiklik görülmezken, putresin uygulanan gruplardan 24 saatlik örneklerde içsel ABA miktarında 2.16 katlık bir artış gözlenmiştir.

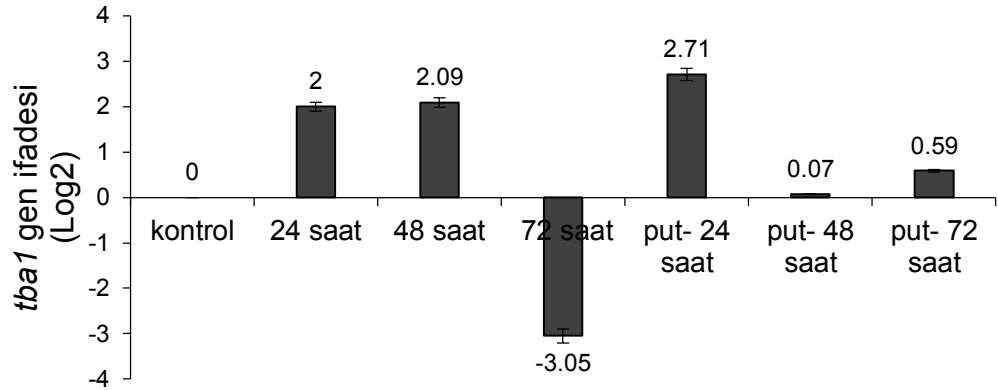
#### 4.1.6. Fotosentezle ilişkili genlerin ifade değişimleri



**Şekil 4.5.** Düşük sıcaklık uygulaması yapılmış putresinli ve putresin içermeyen grupların *psbA* genin ifade değişimleri.

Düşük sıcaklık stresi altında PSII D1 protein geni (*psbA*) ifadesinde hem artış hem azalış gözlenmiştir. 24 ve 48 saatlik grupta 5.24 ve 2.13 katlık bir artış gözlenirken

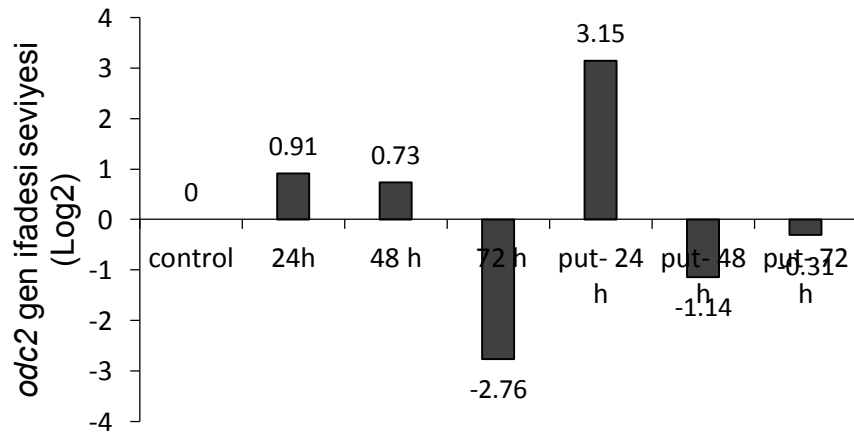
72 saatlik grupta 2.23 katlık bir azalış gözlenmiştir. Putresin uygulanan örneklerde 24, 48 ve 72 saatlik gruplarda sırasıyla 2.65, 0.08 ve 1.5 katlık bir artış gözlenmiştir.



**Şekil 4.6.** Düşük sıcaklık uygulaması yapılmış putresinli ve putresin içermeyen grupların *tba1* genin ifade değişimleri.

cPAB1' in RNA bağlanma aktivitesini düzenleyen *tba1* ifadesi düşük sıcaklık stresine karşı yanıtta uyarılmıştır. 24 ve 48 saatlik grupların *tba1* ifadesini kontrol grubuna göre sırasıyla 2 ve 2,09 kat artarken 72 saatlik grupta 3,05 katlık bir azalma gözlenmiştir. Bu sonuçlar *psbA* gen ifadesi sonuçlarıyla uyusmaktadır. Putresin uygulanan örneklerden 24 saatlik grupta 2,71 katlık bir artış gözlenmiştir.

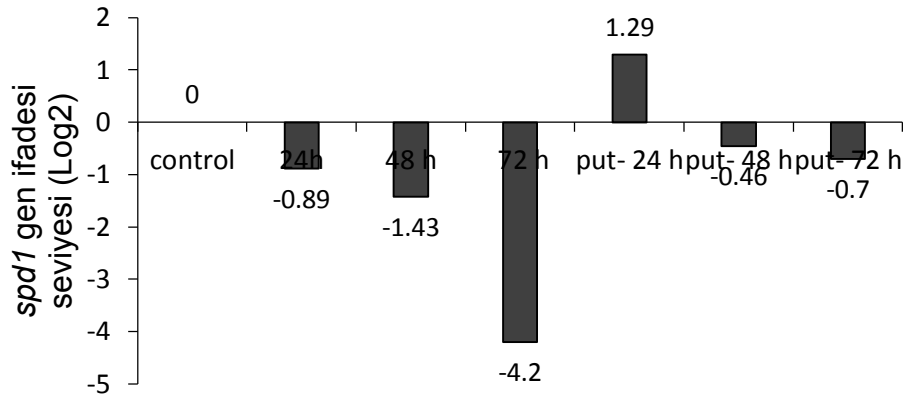
#### 4.1.7. Poliamin biyosentez genlerinin ifadesi (*odc2* ve *spd1*)



**Şekil 4.7.** Düşük sıcaklık uygulaması yapılmış putresinli ve putresin içermeyen grupların *odc2* genin ifade değişimleri.

Düşük sıcaklık stresi altında *odc2* gen ifadesinde artış gözlenmiştir. Kontrol grubuna göre 24 ve 48 saatlik uygulamalarda *odc2* gen ifadesini sırasıyla 0,91 ve 0,73 kat artmıştır. 72 saatlik grupta ise yaklaşık olarak 2.76 katlık bir azalma gözlenmiştir.

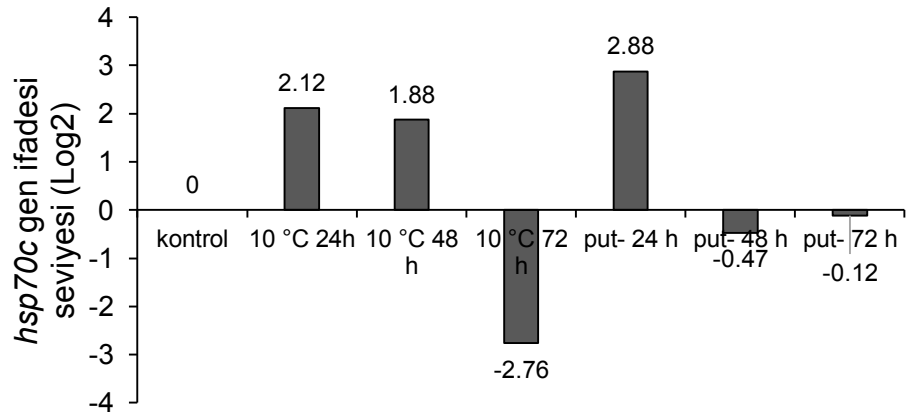
Putresin uygulanan örneklerde 24 saatlik grupta putresinin *odc2* gen ifadesinin 3.15 katlık bir artış gözlemlenmiştir.



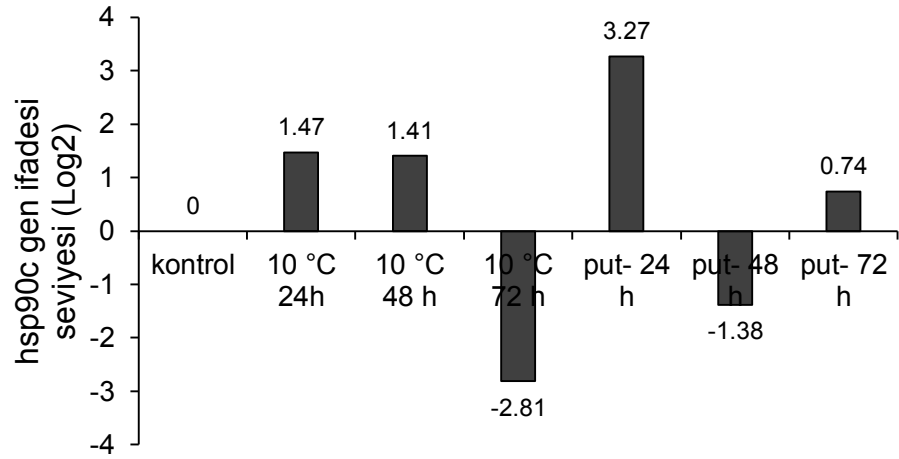
**Şekil 4.8.** Düşük sıcaklık uygulaması yapılmış putresinli ve putresin içermeyen grupların *spd1* genin ifade değişimleri.

*spd1* genin ifadesi düşük sıcaklık stresi altında 24, 48 ve 72. saatlerde sırasıyla 0.89, 1.43 ve 4.2 kat azalırken, putresin uygulanan örneklerde 24. saatte 1.29 kat artmıştır. Gen ifadesi sonuçları *spd1* genin düşük sıcaklıklarda down-regülasyonuna işaret etmektedir.

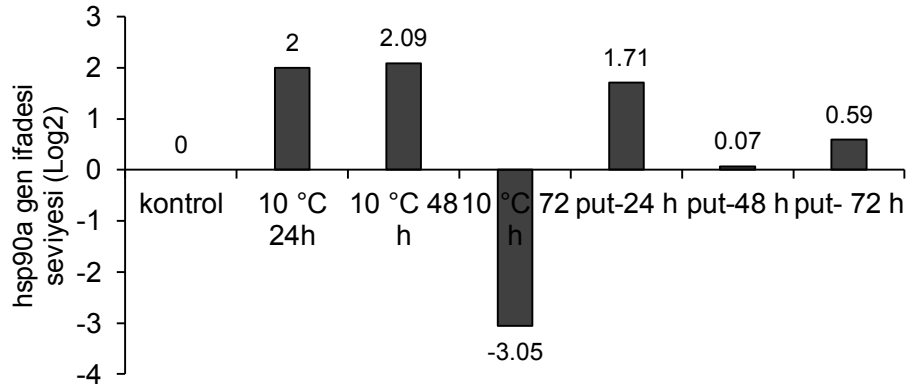
#### 4.1.8. Isı şoku proteinlerine ait genlerin ifade değişimleri



**Şekil 4.9.** Düşük sıcaklık uygulaması yapılmış putresinli ve putresin içermeyen grupların *hsp70c* genin ifade değişimleri.



**Şekil 4.10.** Düşük sıcaklık uygulaması yapılmış putresinli ve putresin içermeyen grupların *hsp90c* genin ifade değişimleri.



**Şekil 4.11.** Düşük sıcaklık uygulaması yapılmış putresinli ve putresin içermeyen grupların *hsp90a* genin ifade değişimleri.

Soğuk stresine bağlı olarak 24 ve 48. saatlerde *hsp70c*'nin gen ifadesinde 2.12 ve 1.88 katlık bir artış gözlemlenirken, 72. Saatte -2.76 katlık bir azalış gözlemlenmiştir. *Hsp90c* ve *hsp90a* genlerin ifadesinde 24 ve 48 saatlerde *hsp70c*'ye benzer bir artış saptanmıştır. Putresin uygulanan gruplarda özellikle *hsp70c* ve *hsp90c* genlerinin ifadelerinde, sırasıyla 2.88 ve 3.27'lik bir artış gözlemlenmiştir.

#### 4.1.9. Pearson korelasyon testi

**Çizelge.4.3.** Poliamin biyosentez genlerinin diğer genlerin ifadesi ile ilişkisini gösteren Pearson korelasyon test sonuçları.

	<i>psbA</i>	<i>tba1</i>	<i>hsp70c</i>	<i>hsp90a</i>	<i>hsp90c</i>
<i>odc2</i>	0.7462	0.9198	0.9519	0.8403	0.9742
<i>spd1</i>	0.2744	0.5948	0.5334	0.5084	0.5682

Pearson korelasyon testi sonuçlarımıza göre *odc2* gen ifadesindeki artışlar *psbA* ve *tba1* gen ifadesindeki değişimlerle pozitif korelasyon göstermiştir. Ayrıca, ısı şoku proteinlerinin gen ifadesi ile *odc2* gen ifadesi arasında güçlü bir pozitif korelasyon bulunmuştur. *Spd1* genin ifadesi ile *psbA* gen ifadesi arasında zayıf bir korelasyon olduğu gözlemlenmiştir. *Spd1* genin ifade değişimlerinin bu tezde çalışılan diğer genlerin ifade değişimleri ile olan ilişkilerinde ise orta derecede bir korelasyon gösterdiği Pearson korelasyon testi ile saptanmıştır (Çizelge.4.3.).

**Çizelge.4.4.** Bazı fizyolojik parametreler ve poliamin biyosentez gen ifadeleri arasındaki Pearson korelasyon test sonuçları.

	<i>cat</i>	<i>apx</i>	<i>Rubisko</i>	<i>odc2</i>	<i>spd1</i>
<i>ABA içeriği</i>	0.8024	0.1543	0.3744	0.6789	0.6447
<i>Lipid peroksidasyonu</i>	-0.6796	0.1017	-6757	-0.4899	-0.8907
<i>Rubisko</i>	0.7120	0.6878	-	0.2599	0.6722
<i>cat</i>	-	0.1706	0.7120	0.7855	0.8090
<i>apx</i>	0.1706	-	0.6878	0.0341	0.7922

Pearson korelasyon testi sonuçlarımıza göre içsel ABA içeriğindeki değişimlerin, CAT aktivitesi ve poliamin gen ifadesi değişimleri ile pozitif korelasyon gösterdiği bulunmuştur. Ayrıca, lipid peroksidasyon oranındaki artış ile CAT aktivitesi, içsel Rubisko enzim miktarı, ve *spd1* gen ifadesi arasında negatif bir korelasyon bulunmuştur. İçsel Rubisko enzim içeriği ile CAT enzim aktivitesi, APX enzim aktivitesi ve *spd1* gen ifadesi arasında pozitif korelasyon gözlemlenmiştir. Bunun yanı sıra, CAT enzim aktivitesi *odc2* ve *spd1* gen ifadeleri ile güçlü bir korelasyon gösterirken, APX enzim aktivitesinin *spd1* genin ifadesi ile pozitif korelasyon gösterdiği saptanmıştır (Çizelge 4.4.)

## 4.2. Tuzluluk Stresine Ait Bulgular

### 4.2.1. Büyüme sonuçları

**Çizelge 4.5.** Farklı konsantrasyonlarda tuz stresine maruz bırakılmış ve putresin uygulanmış grupların büyüme (mgklorofil/mL kültür) oranı  $X$ ; grubun değeri, Std; standart sapma, \*; ANOVA testi sonucunda  $p < 0.05$ .

Deney grupları	n	1.gün X±Std	3. gün X±Std	7. gün X±Std
kontrol	3	2,99± 0,4	3,87± 0,3	3,52± 0,1
Put-kontrol	3	3,07± 0,3	4,27± 0,4*	4,24± 0,5*
5 mM NaCL	3	3,100± 0,5	3,97± 0,5*	3,98± 0,5*
30 mM NaCL	3	3,05± 0,3	3,84± 0,4	3,86± 0,1*
75 mM NaCL	3	2,70± 0,4*	3,34± 0,2*	3,01± 0,1*
5 mM NaCL+put	3	3,14± 0,2*	4,32± 0,2*	3,90± 0,5*
30 mM NaCL+put	3	3,16± 0,1*	4,02± 0,2*	3,98± 0,3*
75 mM NaCL+put	3	3,09± 0,2	3,55± 0,3*	3,06± 0,1*

Tuzluluk stresi altında stres düzeyi arttıkça hücre sayısı kademeli olarak azalmıştır. Tuzluluk stresi altında en çok düşüş görülen grup beklenildiği gibi 75mM NaCL-7. Gün' lük örneklerdir.

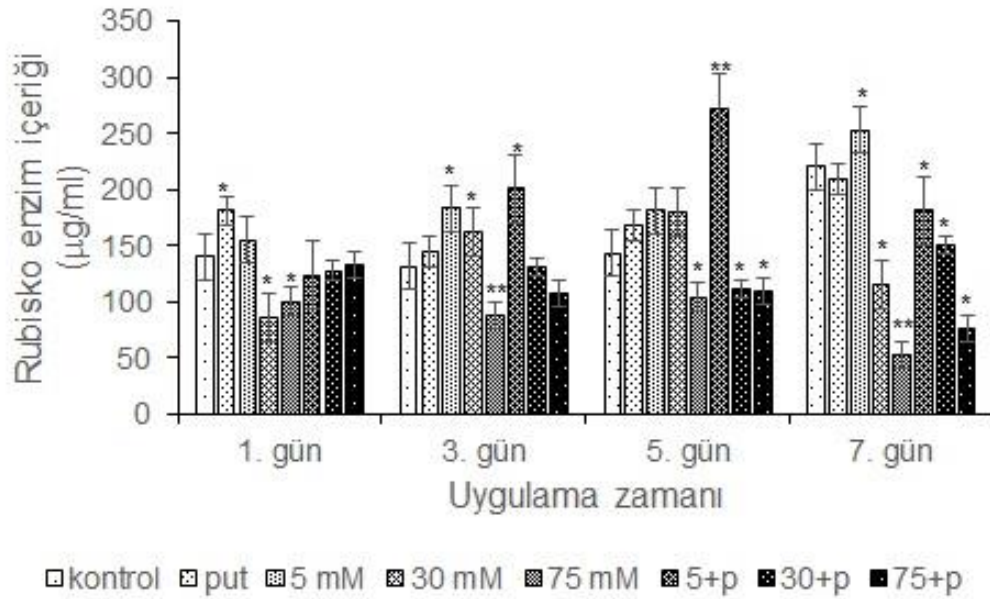
### 4.2.2. Lipid peroksidasyonu

**Çizelge 4.6.** Farklı konsantrasyonlarda tuz stresine maruz bırakılmış ve putresin uygulanmış grupların MDA içeriği ( $\text{nmol}10^{-6}$  hücre<sup>-1</sup>),  $X$ ; grubun değeri, Std; standart sapma, \*; ANOVA testi sonucunda  $p < 0.05$

Deney grupları	n	1. gün X±SD	3. gün X±SD	7. gün X±SD
kontrol	3	0,181± 0,001	0,161± 0,002	0,195± 0,02
Put-kontrol	3	0,184± 0,002	0,148± 0,003*	0,161± 0,01*
5 mM NaCL	3	0,161± 0,003*	0,171± 0,03	0,198± 0,05
30 mM NaCL	3	0,162± 0,002*	0,190± 0,01*	0,248± 0,01*
75 mM NaCL	3	0,145± 0,02*	0,206± 0,02*	0,271± 0,03*
5 mM NaCL+put	3	0,181± 0,01	0,097± 0,02*	0,181± 0,01
30 mM NaCL+put	3	0,135± 0,02*	0,148± 0,01*	0,216± 0,01
75 mM NaCL+put	3	0,187± 0,03	0,174± 0,01	0,220± 0,01*

Tuzluluk stresinde genelde bütün grupların 7. gününde oldukça büyük bir artış gözlenmekte gün sayısı arttıkça kademeli olarak MDA seviyesi artmakta özellikle en yüksek tuz derişimi uygulanan 75 mM' lık grupta en yüksek MDA değeri gözlenmiştir.

### 4.2.3. Rubisko içeriği

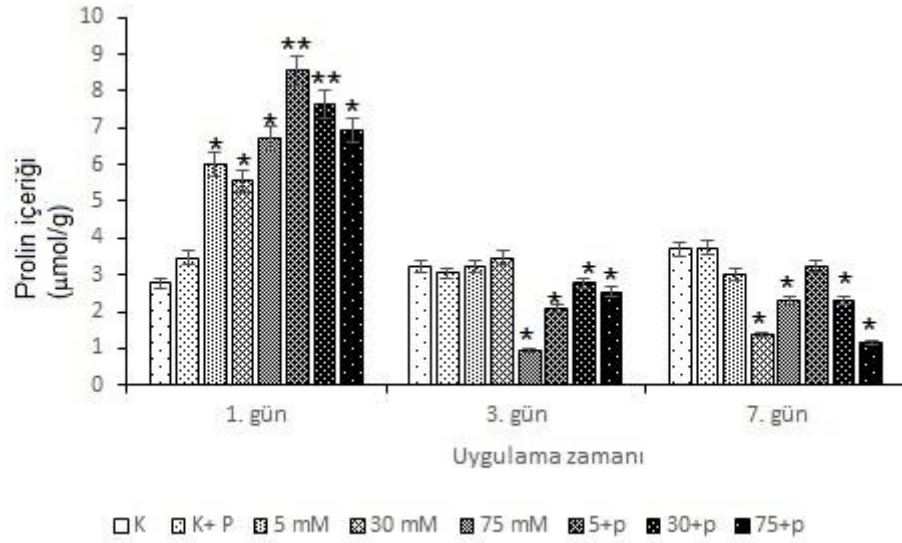


**Şekil 4.12.** Farklı konsantrasyonlarda tuz stresine maruz bırakılmış ve putresin uygulanmış grupların Rubisko enzim içeriği, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

Tuzluluk stresi uygulanan gruplarda tuzluluk derişimi arttıkça Rubisko enzim aktivitesinde azalış meydana gelmiştir. 5 mM ve 30 mM NaCl uygulaması yapılan kültürlerde 3. ve 5. günlerde Rubisko enzim içeriği kontrole göre yaklaşık 1.4, 1.23, 1.27 ve 1.26 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir. Buna karşın, 75 mM NaCl uygulaması yapılan kültürlerde Rubisko enzim içeriğinde 1. günden itibaren uygulama zamanına bağlı olarak azalma gözlemlenmiştir.

Putresin uygulamasını takiben ilk 24 saatte kontrol gruplarında 1.29 katlık bir artış gözlenmiştir. Farklı konsantrasyonlarda tuz uygulaması ve putresin uygulaması yapılan gruplarda Rubisko enzim içeriğinde zamana bağlı olarak değişimler saptanmıştır. 75 mM NaCl uygulanan kültürlerin 7. gününde Rubisko içeriği kontrole göre 2.94 kat azalırken, putresin uygulanmayan 75 mM NaCl uygulaması yapılan kültürlere göre Rubisko içeriğinde 1.48 katlık bir artış gözlenmiştir.

#### 4.2.4. Prolin içeriği

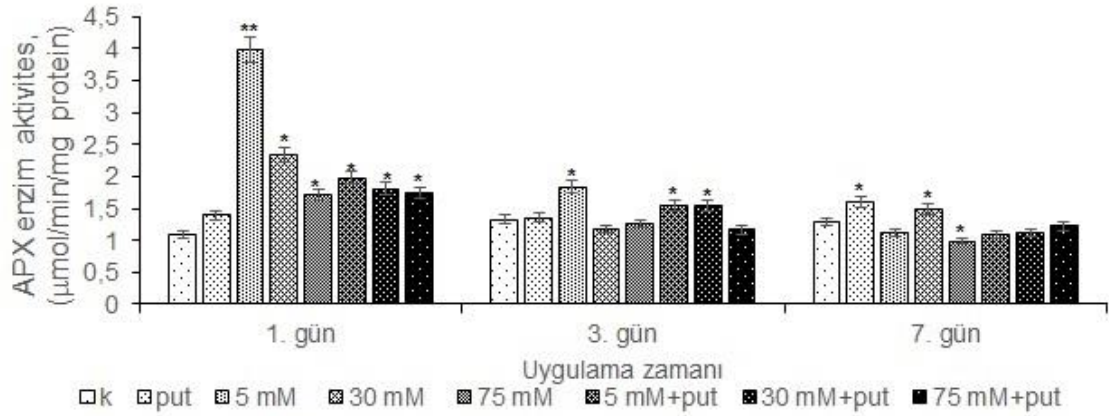


**Şekil 4.13.** Farklı konsantrasyonlarda tuz stresine maruz bırakılmış ve putresin uygulanmış grupların içsel prolin içeriği, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

Tuzluluk stresinde ise strese tepki olarak ilk 24 saatteki bütün gruplarda prolin miktarı artmış ve diğer günlerde azalma meydana gelmiştir. Tuz derişimi en yüksek olan 75 mM NaCl uygulanan 7 günlük kültürlerde prolin seviyesinde 1.6 katlık bir azalış meydana gelmiştir. Putresin uygulaması yapılan kültürlerde hem kontrole hem de 75 mM NaCl uygulanan kültürlere oranla daha fazla bir azalış olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.13.).

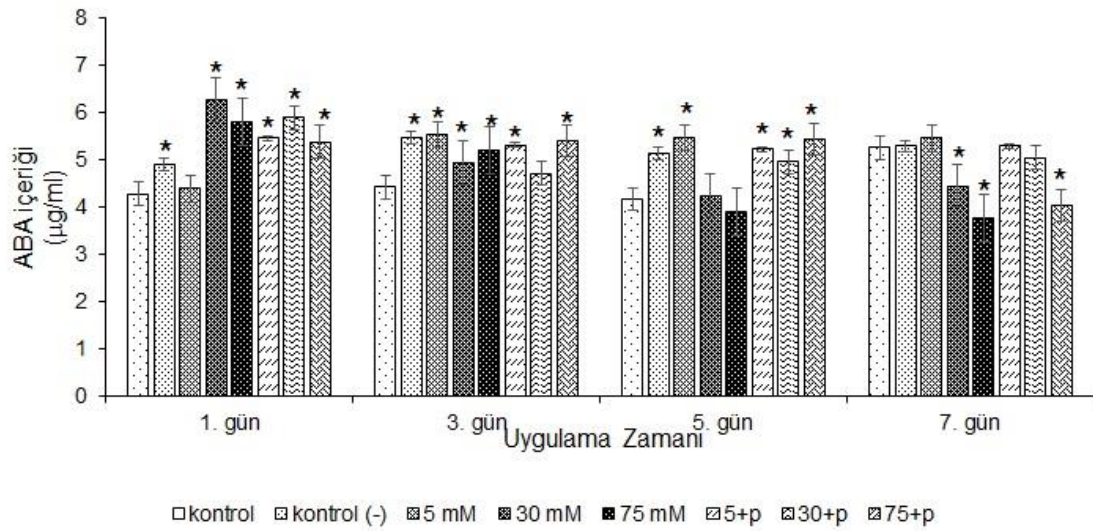
#### 4.2.5. APX aktivitesi

Putresin uygulaması yapılan kontrol gruplarında ilk 24 saatte APX enzim aktivitesinde 1.26 katlık bir artış gözlemlenmiştir. Farklı konsantrasyonlarda tuz uygulanan ve putresin uygulaması yapılan kültürlerde ilk 24 saatte kontrole göre önemli artış meydana gelmiştir (Şekil 4.14.). Buna karşın 7. günde 75 mM NaCl uygulaması yapılan kültürlerde APX enzim aktivitesi 1.3 kat azalırken, putresin uygulaması yapılan tüm konsantrasyonlarda kontrole göre önemli bir değişim gözlemlenmemiştir.



**Şekil 4.14.** Farklı konsantrasyonlarda tuz stresine maruz bırakılmış ve putresin uygulanmış grupların APX enzim aktivitesi, \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ .

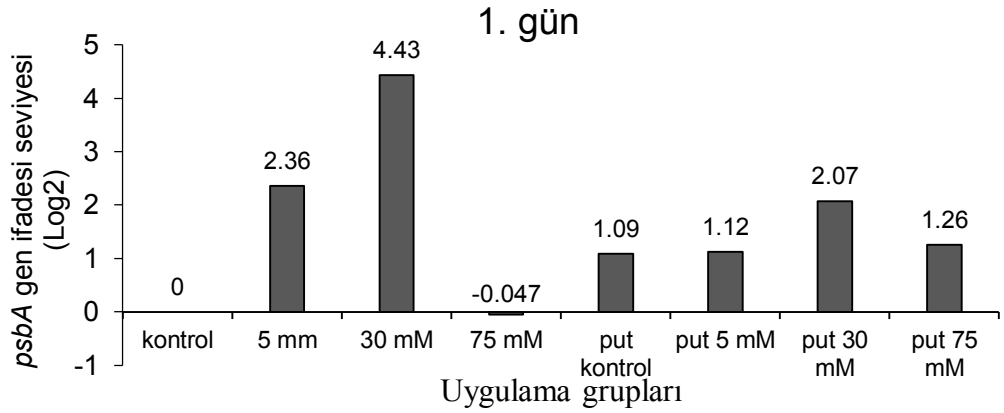
#### 4.2.6. İçsel ABA seviyesi



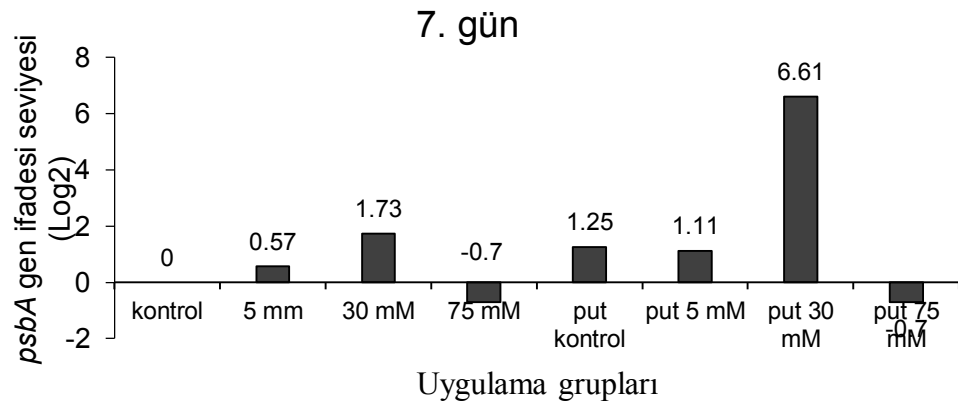
**Şekil 4.15.** Farklı konsantrasyonlarda tuz stresine maruz bırakılmış ve putresin uygulanmış grupların içsel ABA seviyesi, \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ .

İçsel ABA miktarı kontrol gruplarında putresin uygulamasını takiben ilk 24 saatte 1.2 kat artmıştır (Şekil 4.15.). Farklı tuz konsantrasyonuna ve uygulama süresine bağlı olarak içsel ABA miktarında istatistiksel olarak önemli değişimler gözlenmiştir. İlk 24 saatte 30 mM ve 75 mM NaCl uygulanan kültürlerde içsel ABA miktarı yaklaşık olarak 1.49 ve 1.38 kat artarken, 7 günlük kültürlerde sırasıyla yaklaşık 1.2 ve 1.4 kat azalmıştır. Putresin uygulaması yapılan farklı tuz konsantrasyonlarındaki kültürlerde 1., 3. ve 5. günlerde kontrole oranla içsel ABA miktarında artış meydana gelirken, 7 günlük 75 mM NaCl uygulanan kültürlerde kontrole göre 1.3 katlık bir azalış saptanmıştır.

#### 4.2.7. Fotosentezle ilişkili genlerin ifade değişimleri

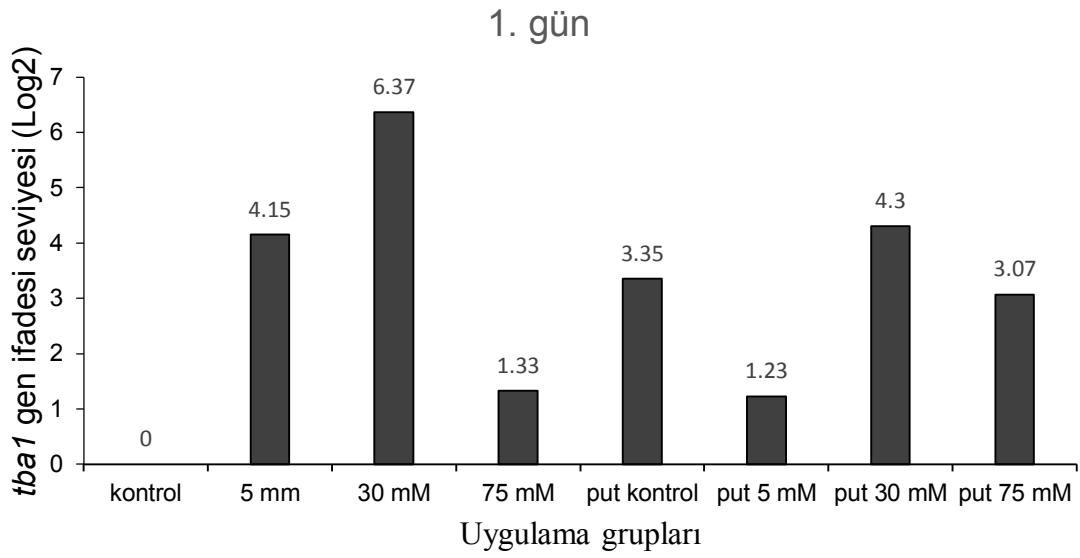


Şekil 4.16. Farklı konsantrasyonlarda tuz stresine maruz bırakılmış ve putresin uygulanmış grupların *psbA* genin 1. gün ifadesi.

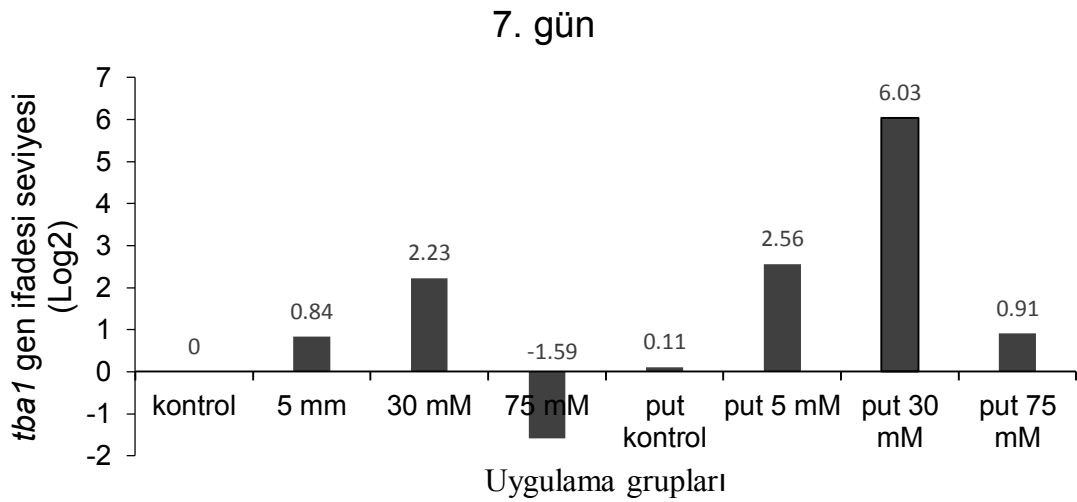


Şekil 4.17. Farklı konsantrasyonlarda tuz stresine maruz bırakılmış ve putresin uygulanmış grupların *psbA* genin 7. gün ifadesi.

Farklı konsantrasyonlarda tuz uygulaması yapılan *C. reinhardtii* kültürlerinde *psbA* gen ifadesinin zamana bağlı değişimleri saptanmıştır. İlk 24 saatte özellikle 30 ve 75 mM NaCl uygulanan kültürlerde 2.36 ve 4.43 katlık bir artış gözlenirken, 7. günde gen ifadesinde meydana gelen artışın daha az olduğu tespit edilmiştir. Putresin uygulaması yapılan kültürlerde 7. günde 30 mM tuz konsantrasyonunda *psbA* gen ifadesinde yaklaşık 6 katlık önemli bir artış belirlenmiştir.



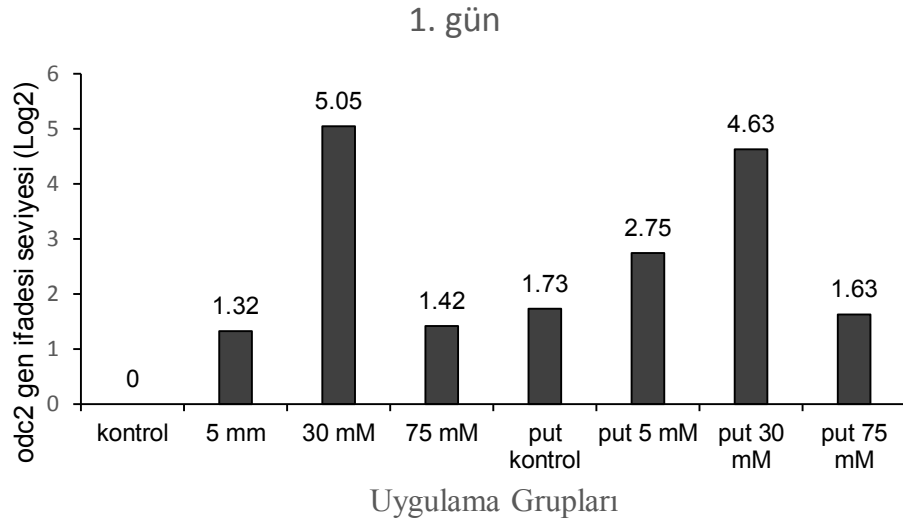
**Şekil 4.18.** Farklı konsantrasyonlarda tuz stresine maruz bırakılmış ve putresin uygulanmış grupların *tba1* genin 1. gün ifadesi.



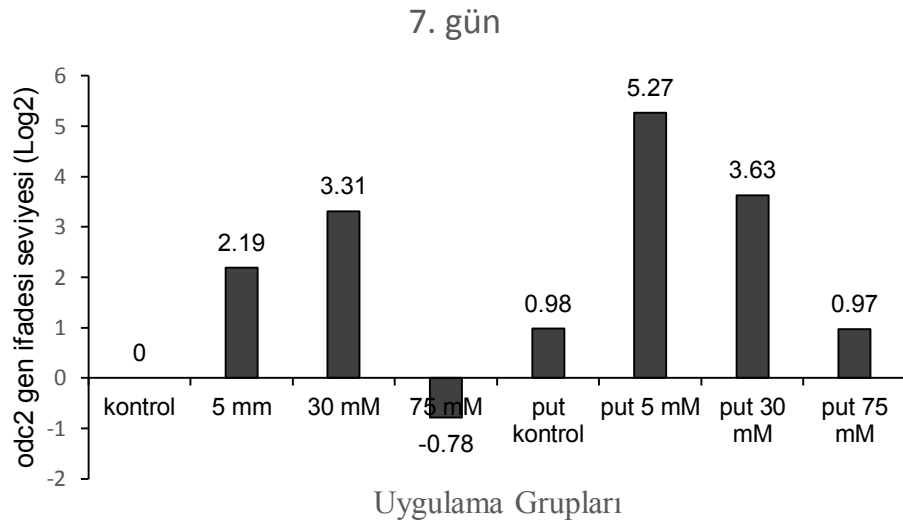
**Şekil 4.19.** Farklı konsantrasyonlarda tuz stresine maruz bırakılmış ve putresin uygulanmış grupların *tba1* genin 7. gün ifadesi.

Tuzluluk stresi altında büyütülen *C. reinhardtii* kültürlerinde *tba1* genin ifadesinde konsantrasyona ve zamana bağlı değişimler saptanmıştır. *tba1* ifadesi ilk 24 saatte tüm kültürlerde artarken, 7. günde 75 mM konsantrasyonda NaCl uygulanan kültürlerde 1.59 kat azalmıştır. Putresin uygulanan kültürlerde ise *psbA* gen ifadesine benzer şekilde 7. günde 30 mM NaCl uygulaması yapılan kültürlerde 6 katlık bir artış belirlenmiştir.

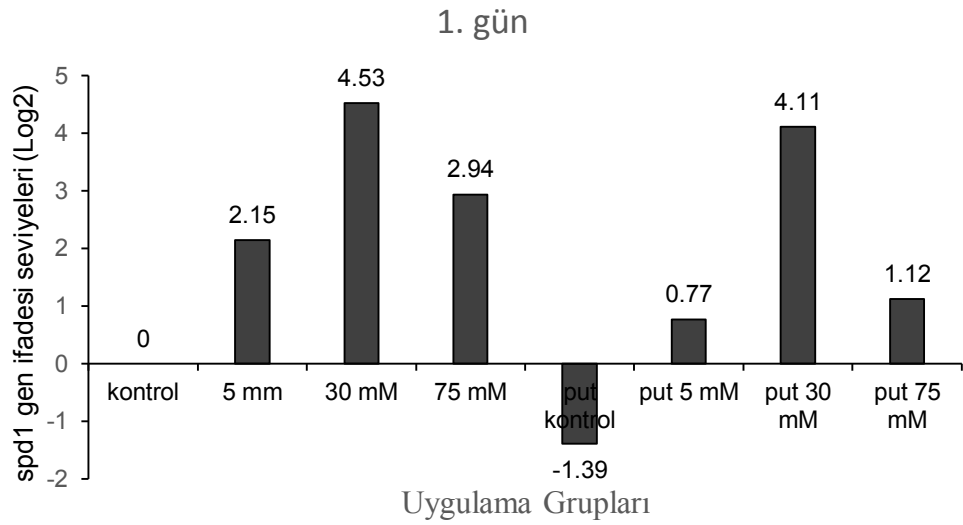
#### 4.2.8. Poliamin biyosentez genlerinin ifade değişimleri



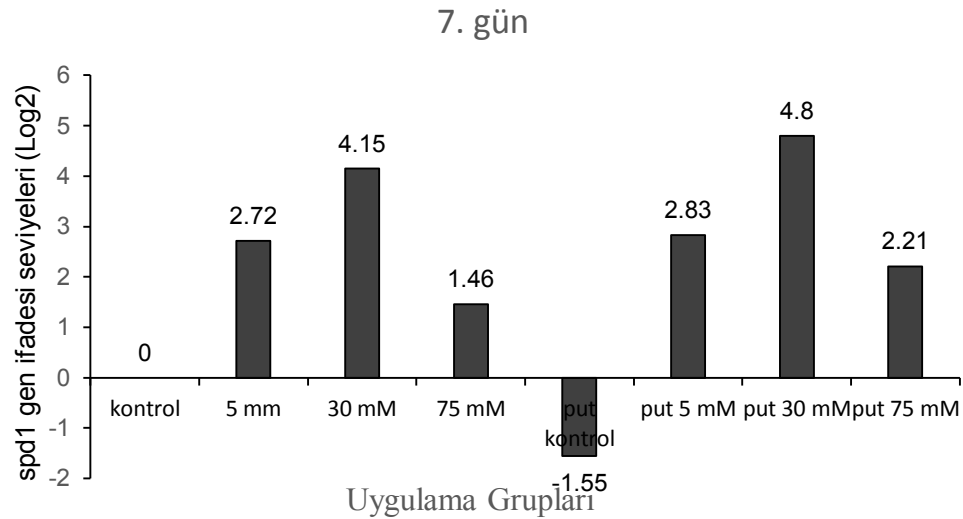
**Şekil 4.20.** Farklı konsantrasyonlarda tuz stresine maruz bırakılmış ve putresin uygulanmış grupların *odc2* genin 1. gün ifadesi.



**Şekil 4.21.** Farklı konsantrasyonlarda tuz stresine maruz bırakılmış ve putresin uygulanmış grupların *odc2* genin 7. gün ifadesi.



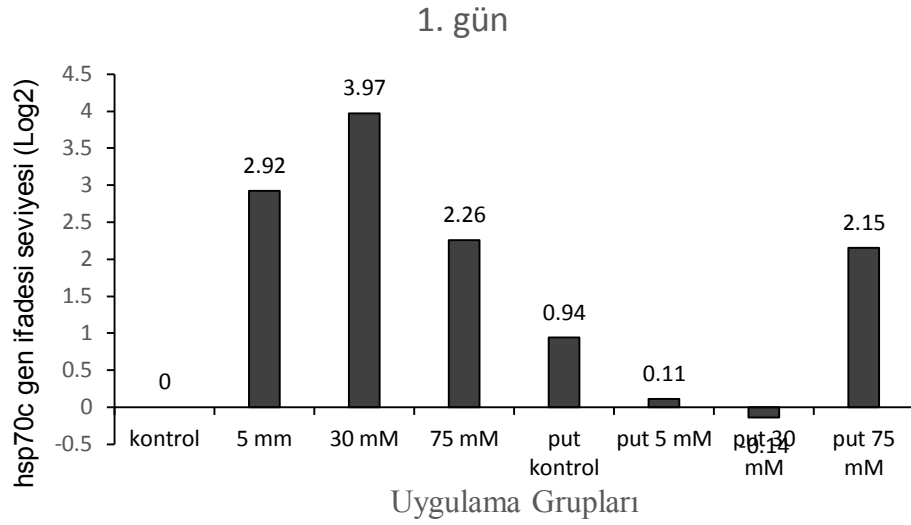
**Şekil 4.22.** Farklı konsantrasyonlarda tuz stresine maruz bırakılmış ve putresin uygulanmış grupların *spd1* genin 1. gün ifadesi.



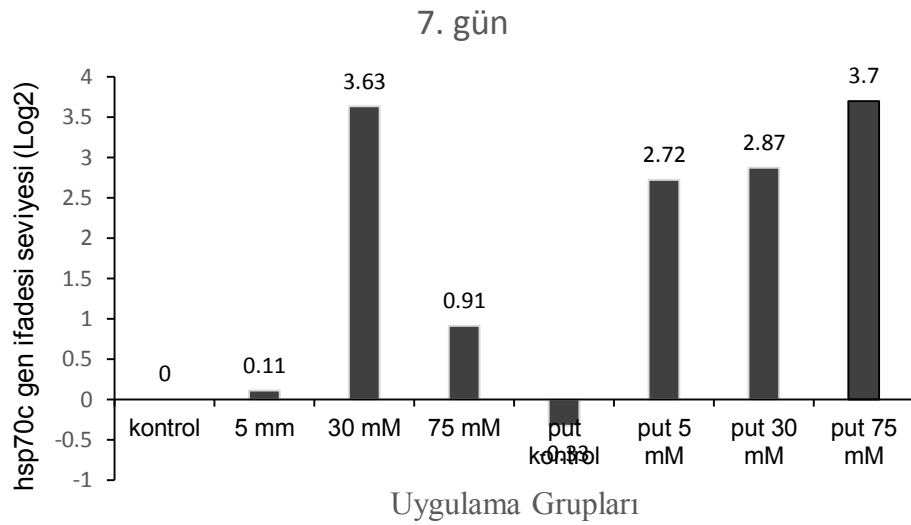
**Şekil 4.23.** Farklı konsantrasyonlarda tuz stresine maruz bırakılmış ve putresin uygulanmış grupların *spd1* genin 7. gün ifadesi.

Poliamin biyosentez genlerinin (*odc2* ve *spd1*) ifadeleri farklı tuz konsantrasyonu ve uygulama zamanına bağlı olarak değişim göstermiştir. *odc2* genin ifadesi ilk 24 saatte tüm uygulama gruplarında artarken, 7 günlük zaman periyodunda 75 mM NaCl uygulanan gruplarda azalmıştır. Buna karşın, *spd1* genin ifadesi sadece putresin uygulaması yapılan örneklerde 1. ve 7. günde 1.39 ve 1.55 katlık bir azalış göstermiştir.

#### 4.2.9. Isı şoku proteinlerinin gen ifadesi değişimi



**Şekil 4.24.** Farklı konsantrasyonlarda tuz stresine maruz bırakılmış ve putresin uygulanmış grupların *hsp70c* genin 1. gün ifadesi.



**Şekil 4.25.** Farklı konsantrasyonlarda tuz stresine maruz bırakılmış ve putresin uygulanmış grupların *hsp70c* genin 7. gün ifadesi.

Farklı tuz konsantrasyonu uygulanmış *C. reinhardtii* kültürlerinde ilk 24 saatte *hsp70c* genin ifadesinde artış meydana gelmiştir. Putresin uygulaması yapılan kültürlerde ise 75 mM tuz konsantrasyonunda 2.15 katlık belirgin bir artış tespit edilmiştir. 7 günlük

uygulama periyodu sonucunda *hsp70c* genin ifadesi özellikle putresin uygulanan gruplarda sırasıyla 2.72, 2.87 ve 3.7 kat artmıştır.

#### 4.2.10. Pearson korelasyon testi

**Çizelge 4.7.** Poliamin biyosentez genlerinin diğer gen ifadeleri ile olan ilişkisini gösteren Pearson korelasyon test sonuçları.

	<i>psbA</i>	<i>tba1</i>	<i>hsp70c</i>
<i>odc2</i>	0.6291	0.7457	0.3818
<i>spd1</i>	0.54	0.5778	0.6087
<i>ABA</i>	0.024	0.2348	-0.3469

Pearson korelasyon testi sonuçlarımıza göre *odc2* gen ifadesindeki değişimler, *psbA* ve *tba1* gen ifadesindeki değişimler ile pozitif korelasyon göstermektedir. Ayrıca, *spd1* geninin ifadesindeki değişimler *tba1* ve *hsp70c* gen ifadesi değişimleri ile orta derecede pozitif korelasyon göstermiştir.

**Çizelge 4.8.** Bazı fizyolojik parametreler ve poliamin biyosentez gen ifadeleri arasındaki Pearson korelasyon test sonuçları.

	<i>apx</i>	Rubisko	prolin	<i>ABA</i>	<i>odc2</i>	<i>Spd1</i>
<i>ABA içeriği</i>	0.5831	0.6289	0.8397	-	0.6026	-2097
<i>Lipid perosidasyon</i>	-0.4125	-0.5162	-0.5663	-0.6986	-0.3472	0.0134
<i>apx</i>	-	0.2794	0.6323	0.5831	0.1227	0.1036
<i>proline</i>	0.6323	0.3254	-	0.8397	0.2357	0.0274
<i>Rubisko</i>	0.2794	-	0.3254	0.6289	0.0121	-0.4478

Pearson korelasyon testi sonuçlarına göre, içsel ABA miktarı prolin biyosentezi ile güçlü pozitif korelasyon gösterirken, APX enzim aktivitesi ve *odc2* gen ifadesi ile orta derecede korelasyon göstermiştir. Ayrıca, içsel prolin miktarı APX enzim aktivitesi ile pozitif korelasyon gösterdiği saptanmıştır. Rubisko enzim içeriği ile ABA biyosentezi arasında da orta derecede pozitif korelasyon bulunmuştur.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Düşük sıcaklık stresi ve tuzluluk stresi fotosentetik organizmaların büyümesini ve diğer fizyolojik süreçleri sınırlayan önemli çevresel faktörlerdendir. Bu çalışmada, putresinin çevresel streslere karşı toleransı artırmadaki rollerini araştırmak için putresin uygulanmış *C. reinhardtii* kültürlerinin düşük sıcaklık ve tuz stresine verdikleri yanıtlar incelenmiştir.

Alglerde, düşük sıcaklık gelişimsel süreçleri ya direkt olarak inhibe ederek ya da oksidatif stresi teşvik ederek büyüme oranını düşürürler (Hema, vd., 2007). Daha önce yapılan araştırmalar, *C. reinhardtii* kültürlerinde düşük sıcaklığın yavaş büyüme hızına yol açtığını göstermiştir (Valledor, vd., 2013). Benzer şekilde, bu çalışmamızda düşük sıcaklık uygulamasının 25 °C'deki kontrol grubuna göre daha yavaş oranda olduğu ve uygulama süresine bağlı olarak önemli ölçüde düştüğü belirlenmiştir. Buna karşın, putresin yapılan örneklerde büyüme oranındaki baskılanmanın daha az olduğu belirlenmiştir.

Tuz stresi, yüksek bitkilerde olduğu gibi yeşil algler içinde büyüme engelleyen ve yüksek konsantrasyonlarda programlanmış hücre ölümüne yol açan bir stres faktörüdür. *C. reinhardtii* kültürlerinde yapılan bir çalışmada 0.1 M NaCl uygulamasının büyüme belirgin bir biçimde engellediğini gösterilmiştir (Yoshida, vd., 2004). Benzer şekilde, bu çalışmada yüksek konsantrasyonlarda NaCl uygulaması büyüme üzerinde engelleyici etki göstermiştir. Dışsal putresin uygulaması yapılan gruplarda ilk üç gün boyunca büyümede belirgin bir artış olmasına rağmen, stres denemelerinin süresi arttıkça özellikle 75 mM NaCl uygulanan kültürlerde önemli derecede azalış saptanmıştır. Putresinin yüksek tuz stresi koşullarında büyüme üzerindeki koruyucu etkisinin daha kısa dönemde olduğu gözlenmiştir.

Düşük sıcaklık ve tuzluluk stresi fotosentetik organizmalarda lipit peroksidasyonunu indüklemektedir. MDA lipit peroksidasyonu ürünü olup membran hasarının bir belirtecidir. Daha önceki araştırmalar düşük sıcaklık stresi ve tuzluluk stresinin lipit peroksidasyonunu indüklediğini ve putresinin oksidatif stres hasarının engellenmesinde rol oynayabileceğine işaret etmektedir (Türkan, vd., 2005; Byrd, vd., 1995). Benzer şekilde, lipid peroksidasyon analiz sonuçlarımız, düşük sıcaklık ile meydana gelen oksidatif stresin putresin uygulaması ile azaldığına işaret etmektedir.

Buna karşın, tuzluluk stresinde uygulama süresi arttıkça putresinin lipid peroksidasyonu azaltmada yeterli olmadığı belirlenmiştir.

Düşük sıcaklık stresinin karbon indirgenme döngüsü de dahil olmak üzere birçok fotosentetik süreç üzerinde etkisi vardır (He, vd., 2002; Byrd, vd., 1995). Zhou ve arkadaşları (2006), düşük sıcaklık stresinin yüksek bitkilerde Rubisko enzim miktarında bir azalmaya neden olduğunu rapor etmişlerdir. Sonuçlarımız, bu çalışmada elde edilen Rubisko enzim miktarı sonuçlarıyla uyum göstermektedir. Ayrıca, elde ettiğimiz verilerimize göre lipid peroksidasyon oranı ile Rubisko enzim miktarı arasında negatif bir korelasyon söz konusudur. Bu veriler, meydana gelen oksidatif hasardan dolayı karbon indirgenme tepkimesinin gerçekleştiği kalvin döngüsünün olumsuz etkilenebileceğine işaret etmektedir.

Daha önceki çalışmalar yüksek bitkilerde ozmotik stres koşullarında, dışsal poliaminlerin Rubisko enzim aktivitesinin düşmesini engellediğini göstermiştir (Besford, vd., 1993). He, vd.,(2002), düşük sıcaklık stresi altında SAMDC aktivitesinin inhibisyonu ile Rubisko aktivitesinde bir azalma olduğunu göstermişlerdir. Bu tezde de dışsal putresin uygulanan *C. reinhardtii* kültürlerinde Rubisko enzim miktarında kontrole göre daha fazla artış olduğu gözlemlenmiştir. Dışsal putresin uygulaması düşük sıcaklığın meydana getirdiği oksidatif hasarın engellemesinden dolayı Rubisko enzim miktarının artmasına neden olabileceğini önermekteyiz. Tuz stresi fotosentez ile ilişkili süreçlerini inhibe edebildiğinden dolayı Rubisko enzim aktivitesi üzerinde olumsuz etkileri bulunmaktadır. *Atriplex lentiformis*' de tuzluluk stresi altında net CO<sub>2</sub> asimilasyon oranı ve fosfoenol piruvat karboksilaz (PEPC)/Rubisko oranının azaldığı bildirilmiştir (Yoshida, vd., 2004; Meinzer, vd., 1999). Yüksek bitkilerde tuz stresine bağlı olarak CO<sub>2</sub> asimilasyonundaki azalmadan dolayı Rubisko aktivitesi azalmaktadır. Yüksek bitkilere benzer şekilde *C. reinhardtii* kültürlerinde tuz konsantrasyonuna ve uygulama süresine bağlı olarak Rubisko enzim içeriğinde değişimler saptanmıştır. Dışsal uygulanan putresin Rubisko enzim içeriği üzerinde büyüme sonuçlarımıza benzer şekilde yanıt vermiştir. Sonuçlarımız kısa süreli yanıtlarda putresin uygulamasının Rubisko enzim aktivitesi üzerinde olumlu bir yanıt vermesine karşın, stres süresinin uzaması ile Rubisko miktarındaki azalışı engellemede yetersiz kaldığını işaret etmektedir.

Düşük sıcaklık ve tuz stresine yanıt ve uyumda antioksidan mekanizması ile ilişkili enzimler önemli rol oynamaktadırlar. Birçok stres faktörü meydana gelen ROS' u

azaltmak amacı ile CAT ve APX gibi enzimlerin aktivitesini artırmaktadır (Yoshida, vd., 2004; Prasad, 1997; Willekens, vd., 1997). Daha önce mısır bitkisinde yapılan bir araştırma, CAT' in soğuk stresine karşı toleransta önemli bir rol oynadığını göstermektedir (Prasad, 1997). Gechev ve arkadaşları (2003), *Nicotiana tabaccum* bitkisinde düşük sıcaklık stresinin CAT aktivitesinde önemli azalmaya neden olduğunu rapor etmişlerdir. Bununla birlikte, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> birikimi ile CAT aktivitesinin azalması arasında korelasyon olduğu birçok çalışmada tespit edilmiştir (Chamnongpol, vd., 1998; Anderson, vd., 1995; Prasad, vd., 1994). Benzer şekilde çalışmamızda, düşük sıcaklık stresine bağlı olarak artan lipid peroksidasyon seviyesi oksidatif zararın artışına yol açmış ve CAT enzim aktivitesinde kademeli olarak bir azalışa neden olmuştur. Tuz stresi denemelerimizde ilk 24 saatte APX miktarında önemli derecede artış bulunurken, stres süresinin uzamasına bağlı olarak APX enzim aktivitesinin düştüğü görülmüştür. APX' de meydana gelen bu düşüş, putresinin etkisinin CAT ya da POX (Peroksidaz) üzerinden olabileceğine işaret etmektedir.

Poliaminler farklı stres koşulları altında antioksidan enzim aktivitelerinde değişikliğe sebep olabilmektedir (Shu, vd., 2012; Shen, vd., 2000; Sen, vd., 2014; Groppa, vd., 2001; Verma ve Mishra, 2005). Verma ve Mishra (2005), *Brassica juncea*' da putresinin tuz stresi altında antioksidan enzim aktivitelerine olan etkisinin sırasıyla APX, GR, CAT, SOD ve POX şeklinde olabileceğini rapor etmişlerdir. Buna karşın, bu çalışmada putresin uygulaması APX enziminden ziyade özellikle CAT aktivitesi üzerinde indükleyici etki göstermiştir. Ayrıca, gen ifadesi sonuçlarımız *odc2* ve *spd1* genlerinin ifadesindeki değişimler ile CAT aktivitesi arasında pozitif korelasyon gösterirken, *spd1* gen ifadesi değişimleri ile sadece APX enzimi arasında pozitif bir korelasyon olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar ayrıca, poliaminlerin antioksidan enzimler üzerindeki etkisinin organizmaya göre farklılık gösterebileceğine işaret etmektedir.

Prolin bitkilerin çoğunda abiyotik streslere karşı savunmada önemli bir rol oynamaktadır. Çevresel streslerin çoğu fotosentetik organizmalarda prolin sentezini indükleyerek hücrenin membran stabilizasyonuna katkı sağlamak ve oksidatif hasara karşı daha dayanıklı olmasını sağlamaktadır. Hücre içi prolin birikiminin artması, hücrenin strese girdiğinin bir göstergesi olabileceği gibi koruma amaçlı üretilen ozmolitlerdendir. Ruiz ve arkadaşları (2004), yaptıkları çalışmada çeltik bitkisine uyguladıkları tuz stresi ile kontrol grubuna göre 25 kat daha fazla prolin birikiminin

olduğunu rapor etmişlerdir. Roychoudhury ve arkadaşları (2011), pirinç bitkisinde tuz stresinin prolin birikimini arttırdığı belirtmiştir. Bu tez çalışmasında, yapılan tuz stresi denemelerinde prolin miktarı ilk 24 saatte önemli bir artış gösterirken, 7. gün de önemli ölçüde azalmıştır. Kısa süreli periyotlarda prolin miktarında meydana gelen bu artış, APX aktivitesi ve ABA içeriğindeki artış ile pozitif korelasyon göstermiştir.

Yüksek bitkilerde stres koşullarında poliamin biyosentetik yolak genlerinden, *adc1* ve *adc2* meydana gelen strese karşı yanıtı düzenleyici rol oynamaktadırlar. Buna karşın, *C. reinhardtii*' de yapılan çalışmalarda putresin biyosentezinin ODC aktivitesi üzerinden kontrol edildiği, ADC biyosentez yolunun kullanılmadığı rapor edilmiştir (Voigt, vd., 2000; Theiss, vd., 2004). Bundan dolayı, bu çalışmada *C.reinhardtii*' de, düşük sıcaklık ve tuz stresi altında putresin biyosentezinde *odc2* ve *spd1* genlerinin ifadelerindeki değişimler araştırılmıştır.

Yüksek bitkilerde soğuk stresi altında *adc1* transkript seviyesinde meydana gelen artış strese uyum açısından önemlidir (Urano, vd., 2003). Heyer ve arkadaşları (1999), *Arabidopsis*' de yaptıkları çalışmada, ozmotik strese yanıtta *adc2* gen ifadesinin artarak ADC aktivitesini artırdığını göstermişlerdir. Benzer şekilde, bu yapılan araştırmada putresin uygulaması yapılan kültürlerde *odc2* geninin ilk 24 saatte önemli ölçüde teşvik edildiği saptanmıştır. *spd1* genin ifadesi düşük sıcaklık stresi boyunca azalırken, putresin uygulanan örneklerin ilk 24 saatinde önemli bir artış göstermiştir. Gen ifadesi sonuçlarımız ilk 24 saatte meydana gelen bu değişimin düşük sıcaklığa uyumda önemli olabileceğine işaret etmektedir. Buna zıt olarak, tuz stresi denemelerimiz *odc2* ve *spd1* geninin hem putresin uygulanan hem de uygulanmayan kültürlerde strese bağlı olarak arttığı saptanmıştır. Her iki genin ifadesi özellikle 30 mM NaCl uygulaması yapılan kültürlerde daha fazla teşvik edilmektedir.

Düşük sıcaklık ve tuz stresi gibi çevresel stres koşullarına verilen cevapta hem stres tarafından teşvik edilen sinyal yollarının olduğu hem de ABA' ya bağımlı sinyal yollarının rol oynadığı bilinmektedir. Daha önce yapılan çalışmalar ABA' nın soğuk stresine karşı yanıtta önemli bir sinyal yolağı olduğunu göstermiştir (Anderson, vd., 1994; Kim, vd., 2002). Sonuçlarımıza göre soğuk stresi altında gruplar arasında ABA seviyelerinde önemli bir farklılık gözlenmemiştir. Buna karşın, putresin uygulanan kültürlerde ilk 24 saatte ABA içeriğinde önemli bir artış meydana gelmiştir. Yüksek bitkilerde yapılan çalışmalar, poliaminler ve ABA arasında etkileşimlerin soğuk stresine

uyum için önemli olduğunu ortaya koymaktadır (Cuevas, vd., 2008; Kim, vd., 2002; Lee, vd., 1997). Bu etkileşim soğuk stresi altında ABA içeriğinin artmasıyla putresin içeriğindeki artışa sebep olduğu ve ABA içeriğindeki azalışın ADC aktivitesinde ve putresin sentezinde azalmaya neden olduğu rapor edilmiştir (Urano, vd., 2003, Cuevas, vd., 2008). Espasandin ve arkadaşları (2014), *Lotus tenuis* bitkisinde kuraklık stresine yanıtta putresinin ABA biyosentezini kontrol ettiğini bildirmiştir. Cuevas ve arkadaşları (2008), soğuk stresi altında *adc1* ve *adc2* mutant bitkilerde putresinin yokluğu ABA düzenleyici genlerin ifadesinde azalmaya yol açtığı gösterilmiştir. Benzer şekilde, *odc2* gen ifade seviyesi ABA seviyesindeki değişikliklerle pozitif korelasyon göstermiştir. Ayrıca, ABA seviyesindeki artışın dışsal putresin tarafından sağlandığını ve böylece *C. reinhardtii*'nin soğuk stresine karşı toleransta ABA ile karşılıklı etkileşim içinde olabileceğine işaret etmektedir.

Çevresel stres faktörleri ROS üretimini artırmasından dolayı *psbA* transkripsiyonunu baskılamaktadır. Hahn ve Walbot (1989), düşük sıcaklık stresi altında *psbA* transkript seviyesinde küçük değişiklikler olduğunu rapor etmiştir. Buna karşın, Sippola ve arkadaşlarının (1998), yaptıkları çalışmada *Synechococcus* sp. PCC794' de düşük sıcaklık stresi altında *psbA* transkript seviyesinde önemli derecede bir artış olduğunu göstermişlerdir. Benzer şekilde, bu tez çalışmasında 24 ve 48 saat düşük sıcaklığa maruz bırakılan kültürlerde *psbA* mRNA transkript seviyelerinde artış gözlenmiştir. Fakat 72. saatte *C. reinhardtii* kültürlerinin *psbA* gen ifadesi seviyesinde önemli bir azalış belirlenmiştir. Daha önce yapılan araştırmalar tuz stresinin PSII inaktivasyonunu artırdığını göstermiştir (Neale ve Melis, 1989; Lu ve Zhang, 1999). Murata ve arkadaşları (2002), *Synechocystis*' de 1 M NaCl uygulaması yaparak southern blot analiziyle, NaCl' nin *psbA* transkripsiyonunu inhibe ederek transkript birikimini ortadan kaldırdığını göstermişlerdir. Benzer şekilde, bu çalışmada *psbA* genin yüksek konsantrasyonuna bağlı olarak ifadesinin azaldığı belirlenmiştir.

*tba1* ifadesi *psbA* mRNA' sının translasyonu için gereklidir. Yaptığımız çalışmada 24 ve 48 saatlik gruplarda *tba1* geninin ifadesinde artış gözlenmiştir. Ancak 72 saatlik grupta bu ifade miktarı önemli derecede azalış göstermiştir. Lipit peroksidasyon ve büyüme sonuçları düşük sıcaklık stresinin 72 saatte negatif etkiye neden olduğunu ve düşük sıcaklık stresine karşı tolerans kapasitesinin azaldığını göstermektedir. Böylece *psbA* ve *tba1* ifadesindeki azalış oksidatif hasarının artmasına yol açmaktadır. Önceki

çalışmalarda poliaminlerin *psbA* mRNA düzeyi üzerine etkileri belirtilmiş özellikle de dışsal spermidinin *psbA* ifade seviyesini indüklediği gösterilmiştir (Sen, vd., 2014; Hu, vd., 2016). Benzer şekilde dışsal putresinin dışuk sıcaklık stresi ve tuzluluk stresine yanıtta *psbA* ve *tba1* genlerinin ifadesini artırmıştır. Ayrıca, pearson korelasyon testi sonuçlarımıza göre *odc2* gen ifadesi *psbA* ve *tba1* gen ifadesi ile pozitif korelasyon göstermektedir. Dışsal putresin uygulamasının içsel ABA miktarını artırması ve antioksidan mekanizmayı güçlendirmesinden dolayı PSII tamir mekanizmasında önemli rol oynayan bu iki genin ifadelerinin ROS'un baskılayıcı etkisinden kurtulmuş olabileceğini öne sürmekteyiz.

Dışuk sıcaklık ve tuz stresine yanıtta ısı şoku proteinleri önemli roller üstlenmektedir. Bu tez çalışmasında, dışuk sıcaklığa bağlı *hsp70c*, *hsp90a* ve *hsp90c* genlerinin ve tuz stresine bağlı *hsp70c* gen ifadelerindeki değişimler saptanmıştır. Dışuk sıcaklık birçok proteinin yanlış katlanmasına ve denaturasyonuna neden olmaktadır. Neven ve arkadaşları (1992), ıspanakta yaptıkları bir araştırmada HSP70'lerin soğuk stresine yanıt olarak iki kat artıkları ve bu meydana gelen birikimin bir kaç günün üzerinde devam ettiğini göstermişlerdir. Zhang ve Guy (2006), dışuk sıcaklığa uyumda HSP70'lerin protein homeostazisinin sağlanması önemli roller üstlendiklerini ileri sürmüşlerdir. Thomashow (1993), yaptığı araştırmada HSP90'ların da dışuk sıcaklığa uyumda iş gördüklerini belirtmiştir. Benzer şekilde, Krishna ve arkadaşları (1995), HSP90'ların HSP70'ler kadar soğuk stresi koşullarında normal protein katlanmasını sürdürülebilmesi için gerekli olduğunu ortaya koymuşlardır. Bu tez çalışmasında elde ettiğimiz gen ifadesi sonuçlarımıza göre, ilk 24 ve 48 saatte *hsp70c*, *hsp90a* ve *hsp90c*'de önemli bir artış meydana gelmiştir. Lipid peroksidasyonun artması ve büyüme oranındaki dışuşün gözlenmesine takiben gen ifadelerinde önemli bir azalış saptanmıştır. Ayrıca, ısı şoku proteinlerin gen ifadelerinde meydana gelen bu azalış CAT enzim aktivitesinin dışmesi ile de paralellik göstermektedir. Soğuk stresine verilen yanıtta olduğu gibi tuz stresine verilen yanıtta HSP70'lerin protein homeostazisini sağlamada önemli roller bulunmaktadır (Wang, vd., 2004). Tuz stresi denemelerimizde ısı şoku proteinlerinden *hsp70c*'nin gen ifadesinin ilk 24 saatte önemli derecede ifade edildiği ve 7. günde sadece 30 mM NaCl uygulanan örneklerde belirgin bir artış olduğu saptanmıştır. Putresin uygulaması yapılan kùltürlerde ısı şoku proteinlerinin gen ifadelerinin dışuk sıcaklığa yanıtta ilk 24 saatte teşvik edildiği, tuz stresine yanıtta ise 7. günde tüm

konsantrasyonlarda önemli bir artışın meydana geldiği belirlenmiştir. Königshofer ve Lechner (2002), yaptıkları bir çalışmada poliaminlerin ısı şoku proteinlerinin gen ifadesinin ve sentezini artırdıklarını göstermişlerdir. Sagor ve arkadaşları (2013), dışsal spermin uygulamasının *hsp101*, *hsp90*, *hsp70* ve *hsp17.6* genlerinin ifadesini artırdığını saptamışlardır. Benzer şekilde, bu çalışmamızda *odc2* ve *spd1* gen ifadesindeki değişimler ısı şoku proteinlerinin gen ifadelerindeki değişimler ile güçlü pozitif korelasyon göstermiştir. Elde ettiğimiz verilere dayanarak poliaminlerin ısı şoku proteinlerini ve antioksidan mekanizmayı etkileyerek özellikle düşük sıcaklığa uyumu sağlayabileceğini öne sürmekteyiz.

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında elde edilen veriler dışsal putresin uygulamasının düşük sıcaklığa uyumu artırdığı ve kısa süreli tuzluluğa toleransın geliştirilmesini sağlayabileceğini işaret etmektedir. Poliamin biyosentez yolunun kalvin döngüsü, antioksidan mekanizması ve ABA ile pozitif korelasyon göstermesinin yanısıra, PSII tamir mekanizması ile de ilişkili olabileceği literatürde ilk defa bu tez çalışmasında ortaya konulmuştur. PSII tamir mekanizması ile olan bu ilişkinin poliaminlerin antioksidan mekanizmayı güçlendirerek mi, ya da ABA sinyal yolağı ile karşılıklı çalışarak mı olduğunu söylemek için daha fazla detaylı araştırmaya gereksinim duyulmaktadır. İleride PSII tamir mekanizmasında ABA'ya bağımlı sinyal yolakları ve poliaminler ile olası ilişkilerin çalışılması planlanmaktadır.

## KAYNAKLAR

- Adam, S., Murthy, S.D.S., “Role of Polyamines and Their Effect on Photosynthesis in Plants”, *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 4 (3): 596-605 (2013).
- Alcázar, R., Marco, F., Cuevas, J.C., Patron, M., Ferrando, A.; Carrasco, P., Tiburcio, A.F., Altabella, T., “Involvement of polyamines in plant response to abiotic stress”, *Biotechnology Letters*, 28 :1867–1876 (2006).
- Allakhverdiev, S.I.; Nishiyama, Y., Miyairi, S., Yamamoto, H., Inagaki, N., Kanesaki, Y., Murata, N., “Salt stress inhibits the repair of photodamaged photosystem II by suppressing the transcription and translation of *psbA* genes in *Synechocystis*”, *Plant Physiology*, 130:1443-1453 (2002).
- Alcázar, R., Cuevas, J. C., Planas, J., Zarzab, X., Bortolotti, C., Carrasco, P., Salinas, J., Tiburcio, A. F., Altabella, T., “Integration of polyamines in the cold acclimation response.”, *Plant Science*, 180: 31-38 (2011).
- Anderson, M.D., Prasad, T.K., Martin, B.A., Stewart, C.R., “Evidence for Chilling-Induced Oxidative Stress in Maize Seedlings and a Regulatory Role for Hydrogen Peroxide.”, *The Plant Cell*, 6 (1): 65-74 (1994).
- Anderson, M.D., Prasad, T.K., Martin, B.A., Stewart, C.R., “Differential gene expression in chilling acclimated maize seedlings and evidence for the involvement of abscisic acid in chilling tolerance”, *Plant Physiology*, 105:331-339 (1994).
- Anderson, M.D., Prasad, T.K., Stewart, C.R., “Changes in Isozyme Profiles of Catalase, Peroxidase, and Glutathione Reductase during Acclimation to Chilling in Mesocotyls of Maize Seedlings”, *Plant Physiology*, 109 (4): 1247-1257(1995).
- Bais, H.P., Ravishankar, G.A ., “Role of polyamines in the ontogeny of plants and their biotechnological applications”, *Plant Cell, Tissue & Organ Culture* , 69: 1-34 (2002).
- Barnes, D., Cohen, A.B., Brucik, R.K., Kantardjieff, K., Fowler, S., Efelet, E., Mayfield, S.P., “Identification and characterization of a novel RNA binding protein that associates with the 5'-untranslated region of the chloroplast *psbA* mRNA”, *Biochemistry*, 43:8541-8550 (2004).
- Bergmeyer, N., “Methoden der enzymatischen analyse.”, *Akademie Verlag*, Berlin 1: 636–664 (1970).

### KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

- Besford, R.T., Richardson, C.M., Campos, J.L., Tiburcio, A.F., “Effect of polyamines on stabilization of molecular complexes in thylakoid membranes of osmotically stressed oat leaves”, *Planta*, 189 (2): 201-206 (1993).
- Bibi, A.C., Oosterhuis, D.M., Gonias, E.D., “Exogenous application of putrescine ameliorates the effect of high temperature in *Gossypium hirsutum* L. Flowers and fruit development”, *Journal of Agronomy and Crop Science*, 196: 205–211 (2010).
- Bouchereau, A., Azis, A. Larher, F., Martin-Tanguy, J., “Polyamines and environmental challenges: recent development”, *Plant Science*, 140:103–125 (1999).
- Bruce, T.J.A., Matthes, M.C., Napier, J.A., Pickett, J.A., “Stressful “memories” of plants: evidence and possible mechanisms.”, *Plant Science*, 173(6): 603–8 (2007).
- Brugnoli, E, Björkman, O., “Chloroplast movements in leaves: Influence on chlorophyll fluorescence and measurements of light-induced absorbance changes related to  $\Delta$ pH and zeaxanthin formation”, *Photosynthesis Research*, 32(1): 23-35 (1992).
- Bueno, P., Piqueras, A., Kurepa, J., Savouire, A., Verbruggen, N.; Montagu, M.V., Inze, D., “Expression of antioxidant enzymes in response to abscisic acid and high osmoticum in tobacco BY-2 cell cultures.”, *Plant Science*, 138: 27–34 (1998).
- Byrd, G.T., Ort, D.R., Ogren, W.L., “The Effects of Chilling in the Light on Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase Activation in Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.)”, *Plant Physiology*, 107 (2): 585-591 (1995).
- Chamnongpol, S., Willekens, H., Moeder, W., Langebartels, C., Sandermann, H., Montagu, M.V., Inze, D., Camp, W.V., “Defense activation and enhanced pathogen tolerance induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in transgenic tobacco”, *Plant Biology*, 95: 5818-5823 (1998).
- Chen, H.H., Li, P.H., Brenner, M.L., “Involvement of abscisic acid in potato cold acclimation.”, *Plant Physiology*, 71: 362-365 (1983).
- Chen, Z., Zhou, T., Wu, X., Hong, Y., Fan, Z., Li, H., “Influence of cytoplasmic heat shock protein 70 on viral infection of *Nicotiana benthamiana*.”, *Molecular Plant Pathology*, 9(6): 809–817 (2008).

### KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

- Cheng, L., Sun, R., Wang, F., Peng, Z., Kong, F., Wu, J.; Cao, J., Lu, G., “Spermidine affects the transcriptome responses to high temperature stress in ripening tomato fruit.”, *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology)*, 13(4): 283-297 (2012).
- Csermely, P., Yahara, I., “Molecular Pathomechanisms and New Trends in Drug Research”, *CRC Press*, 6: 65-75 (2002).
- Csermely, P., “Proteins, RNA-s, chaperones and enzyme evolution: A folding perspective.”, *Trends in Biochemical Sciences*, 22: 147–149 (1997).
- Cuevas, J.C., López-Cobollo, R., Alcázar, R., Zarza, X., Koncz, C., Altabella, T., Salinas, J., Tiburcio, A.F., Ferrando, A.,” Putrescine is involved in Arabidopsis Freezing Tolerance and Cold Acclimation by regulating Abscisic acid levels in response to low temperature”, *Plant Physiology*, 148:1094-1105 (2008).
- Çavuşoğlu, K., Kılıç, S., Kabar, K., “Effects of some plant growth regulators on stem anatomy of radish seedlings grown under saline (NaCl) conditions”, *Plant Soil and Environment*, 53: 524-528 (2007).
- Daie, J., Campbell, W.F., “Response of tomato plants to stressful temperatures.”, *Plant Physiology*, 67: 26-69 (1981).
- Danon, A., Mayfield, S.P., “ADP-dependent phosphorylation regulates RNA-binding in vitro: implications in light-modulated translation”, *THE EMBO Journals*, 13: 2227-2235 (1994).
- Del-Duca, S., Tidu, V., Bassi, R., Esposito, C., Serafini-Fracassini, D.,” Identification of transglutaminase activity and its substrates in isolated chloroplast of *Helianthus tuberosus*”, *Planta*, 193: 283–289 (1994).
- Della Mea, A., Di Sandro, L., Dondini, S., Del Duca, F.; Vantini, C.; Bergamini, R.; Bassi, D.; Serafini-Fracassini, “A *Zea mays* 39-kDa thylakoid transglutaminase catalyses the modification by polyamines of light-harvesting complex II in a light-dependent way.” *Planta*, 219: 754–764 (2004).
- Demetriou, G., Neonaki, C., Navakoudis, E., Kotzabasis, K., “Salt Stress Impact on the Molecular Structure and Function of the Photosynthetic Apparatus—The Protective Role of Polyamines.”, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1767: 272–280 (2007).

### KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

- Duan, H.G., Yuan, S., Liu, W.J., Xi, D.H., Qing, D.H., Liang, H.G., Lin, H.H., “Effects of exogenous spermidine on photosystem II of wheat seedlings under water stress”, *Journal of Integrative Plant Biology*, 48: 920–927 (2006).
- Espasandin, F.D., Maiale, S.J., Calzadilla, P., Ruiz, O.A., Sansberro, P.A., “Transcriptional regulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED) gene by putrescine accumulation positively modulates ABA synthesis and drought tolerance in *Lotus tenuis* plants.”, *Plant Physiology and Biochemistry*, 76: 29–35 (2014).
- Galston, A.W., Sawhney, R.K., Altabella, T., Tiburcio, A. F., “Plant Polyamines in Reproductive Activity and Response to Abiotic Stress”, *Botanica Acta*, 110(3): 197-207 (1997).
- Galston, A.W., Sawhney, R.K., “Polyamines in plant physiology”, *Plant Physiology*, 94: 406–410 (1990).
- Gechev, T., Willekens, H., Montagu, M.V., Inzé, D., Camp, W.V., Toneva, V., Minkov, I., “Different responses of tobacco antioxidant enzymes to light and chilling stress”, *Journal of Plant Physiology*, 160 (5): 509-515 (2003).
- Giardi, M.T., Masojidek, J., Godde, D., “Effects of abiotic stresses on the turnover of the D1 reaction center II protein”, *Physiologia Plantarum*, 101: 635-642 (1997).
- Giraudat, J., Parcy, F., Bertauche, N., Gosti, F., Leung, J., Morris, P.- C., Bouvier-Durand, M., Vartanian, N., “Current advances in abscisic acid action and signalling”, *Plant Molecular Biology*, 26: 1557–1577 (1994).
- Gong, M., Li, Y.J., Chen, S.Z., “Abscisic acid-induced thermotolerance in maize seedlings is mediated by calcium and associated with antioxidant systems”, *Journal of Plant Physiology*, 153: 488-496 (1998).
- Groppa, M.D., Tomaro, M.L., Benavides, M.P., “Polyamines as protectors against cadmium or copper-induced oxidative damage in sunflower leaf discs”, *Plant Science*, 161 (3): 481-488 (2001).
- Groppa, M.D., Benavides, M.P., “Polyamines and abiotic stress: recent advances”, *Amino Acids*, 34: 35-45 (2008).
- Hahn, M., Walbot, V., “Effects of Cold-Treatment on Protein Synthesis and mRNA Levels in Rice Leaves”, *Plant Physiology*, 91 (3): 930-938 (1989).

### KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

- Harris, E.H., "The *Chlamydomonas* source book", *Academic Press*, San Diego, 780 (1989).
- Harris, E.H., "The *Chlamydomonas* Sourcebook: Introduction to *Chlamydomonas* and its laboratory use", *Academic Press*, 1: 780 San Diego (2009).
- HARTL, F. U., "Molecular chaperones in cellular protein folding", *Nature*, 381: 571-580 (1996).
- He, L., Nada, K., Kasukabe, Y., S. Tachibana, "Enhanced Susceptibility of Photosynthesis to Low-Temperature Photoinhibition due to Interruption of Chill-Induced Increase of S-Adenosylmethionine Decarboxylase Activity in Leaves of Spinach (*Spinacia oleracea* L.)", *Plant and Cell Physiology*, 43 (2): 196-206 (2002).
- Heath, R.L., Packer, L., "Photoperoxidation in Isolated chloroplast: 1. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation.", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125: 189-198 (1968).
- Heby, O., Persson, L., "Molecular genetics of polyamine synthesis in eukaryotic cells", *Trends in Biochemical Sciences*, 15: 153- 158 (1990).
- Hema, R., Senthil-Kumar, M., Shivakumar, S., Chandrasekhara Reddy, P., Udayakumar, M., "Chlamydomonas reinhardtii, a model system for functional validation of abiotic stress responsive genes", *Planta*, 226:655–670 (2007).
- Heyer, A.G., Soyka, S., "Arabidopsis knockout mutation of ADC2 gene reveals inducibility by osmotic stress", *FEBS Letters*, 458: 219-223 (1999).
- Hu, X., Liu, R., Li, Y., Wang, W., Tai, F., Xue, R., Li, C., "Heat shock protein 70 regulates the abscisic acid-induced antioxidant response of maize to combined drought and heat stress.", *Plant Growth Regulation*, 60: 225–235 (2010).
- Hu, X.H., Hu, L., Xiang, L., Li, S., Zou, Z., "Beneficial role of spermidine in chlorophyll metabolism and D1 protein content in tomato seedlings under salinity–alkalinity stress.", *Physiologia Plantarum*, 156: 468–477 (2016).
- Hummel, I., Bourdais, G., Gouesbet, G., Couee, I., Malmberg, R.L., El Amrani, A., "Differential gene expression of arginine decarboxylase ADC1 and ADC2 in *Arabidopsis thaliana*: characterization of transcriptional regulation during seed germination and seedling development.", *New Phytologist*, 163: 519–531 (2004).

### KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

- Inoue, H., Li, M., Schnell, D. J., “An essential role for chloroplast heat shock protein 90 (Hsp90C) in protein import into chloroplasts.”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110 (8): 3173–3178 (2012).
- Jablonka, E., Lamb, M. J., “Transformations of Lamarckism: From Subtle Fluids to Molecular Biology.”, *Journal of Theoretical Biology*, 139: 69–83 (1989).
- Jantaro, S., Mäenpää, P., Mulo, P., Incharoensakdi, A., “Content and biosynthesis of polyamines in salt and osmotically stressed cells of *Synechocystis* sp. PCC 680”, *FEMS Microbiology Letters*, 228: 129–135 (2003).
- Kadyrzhanova, D.K., Vlachonasios, K.E., Ververidis, P., Dilley, D.R., “Molecular cloning of a novel heat induced/chilling tolerance related cDNA in tomato fruit by use of mRNA differential display.”, *Plant Molecular Biology*, 36: 885–895 (1998).
- Kim J., Mayfield S.P., “Protein disulfide isomerase as a regulator of chloroplast translational activation” *Science*, 278: 1954-1957 (1997).
- Kim T.E., Kim S.K., Han T.J., Lee J.S., Chang S.C., “ABA and polyamines act independently in primary leaves of cold-stressed tomato (*Lycopersicon esculentum*)” *Physiologia Plantarum*, 115: 370-376 (2002).
- Kotzabasis, K., Fotinou, C., Roubelakis-Angelakis, K.A., Ghanotakis, D.,” Polyamines in the photosynthetic apparatus”, *Photosynthesis Research*, 38: 83–88 (1993).
- Königshofer, H., Lechner, S., “Are polyamines involved in the synthesis of heat-shock proteins in cell suspension cultures of tobacco and alfalfa in response to hightemperature stress?”, *Plant Physiology and Biochemistry*, 40:51–59 (2002).
- Krishna, P., Sacco, M., Cherutti, J. F., Hill, S., “Cold-Induced Accumulation of hsp90 Transcripts in *Brassica napus*.”, *Plant Physiology*, 107(3): 915–923 (1995).
- Kudoh, H., Sonoike, K., “Irreversible damage to photosystem I by chilling in the light: cause of the degradation of chlorophyll after returning to normal growth temperature”, *Planta*, 215: 541–548 (2002).
- Lee, T.M., Lur, H.S., Chu, C., “Role of abscisic acid in chilling tolerance of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. II. Modulation of free polyamines levels”, *Plant Science*, 126: 1-10 (1997).

### KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

- Leung, J., Giraudat, J., “Abscisic acid signal transduction”, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49: 199–222 (1998).
- Liu, J.H., Nada, K., Honda, C., Kitashiba, H., Wen, X.P., Pang, X.M., Moriguchi, T., “Polyamine biosynthesis of apple callus under salt stress: importance of the arginine decarboxylase pathway in stress response”, *Journal of Experimental Botany*, 57: 2589–2599 (2006).
- Logothetis, K., Dakanali, S., Ioannidis, N., Kotzabasis, K., “The impact of high CO<sub>2</sub> concentrations on the structure and function of the photosynthetic apparatus and the role of polyamines”, *Journal of Plant Physiology*, 161: 715–724 (2004).
- Lu, C.M., Zhang, J.H.,” Effects of salt stress on PSII function and photoinhibition in the cyanobacterium *Spirulina platensis*”, *Journal of Plant Physiology*, 155: 740–745 (1999).
- Lutz, C., Navakoudis, E., Seidlitz, H.K., Kotzabasis, K., “Simulated solar irradiation with enhanced UV-B adjust plastid- and thylakoid-associated polyamine changes for UV-B protection”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1710(1): 24-33 (2005).
- Lyons, J.M., “Chilling injury in plants”, *Annual Review of Plant Biology*, 24: 445-466 (1973).
- Mamedov, T.G., Shono, M., “Molecular chaperone activity of tomato (*Lycopersicon esculentum*) endoplasmic reticulum-located small heat shock protein.”, *Journal of Plant Research*, 121: 235–243 (2008).
- Marín-Navarro, J., Manuell, A.L., Wu, J., Mayfield, S.P., “Chloroplast translation regulation”, *Photosynthesis Research*, 94: 359-374 (2007).
- Meinzer, F.C., Zhu, J., “Efficiency of C<sub>4</sub> photosynthesis in *Atriplex lentiformis* under salinity stress”, *Australian Journal of Plant Physiology*, 26(1): 79 – 86 (1999).
- Meloni, D.A., Oliva, M.A., Martinez, C.A., Cambraia, J. , “Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress”, *Environmental and Experimental Botany*, 49: 69-76 (2003).

### KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

- Mendez-Alvarez, S., Leisinger, U., Eggen, R.I.L., “Adaptive responses in *Chlamydomonas reinhardtii*”, *International Microbiology*, 2: 15–22 (1999).
- Menoret, A., Peng, P., Srivastava, P.K.,” Association of peptides with heat shock protein gp96 occurs in vivo and not after cell lysis.”, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 262: 813–818 (1999).
- Mulo, P., Sakurai, I., Aro, E.-M., “Strategies for *psbA* gene expression in cyanobacteria, green algae and higher plants: From transcription to PSII repair.”, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1817: 247–257 (2012).
- Munzi, S., Pirintsos, S.A., Loppi, S., ”Chlorophyll degradation and inhibition of polyamine biosynthesis in the lichen *Xanthoria parietina* under nitrogen stress”, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72: 281–285 (2009).
- Murata, N., Allakhverdiev, S. I., Nishiyama, Y., Miyairi, S., Yamamoto, H., Inagaki, N., Kanasaki, Y., “Salt Stress Inhibits the Repair of Photodamaged Photosystem II by Suppressing the Transcription and Translation of *psbA* Genes in *Synechocystis*”, *Plant Physiology*, 130: 1443–1453 (2002).
- Nakano, Y., Asada, K.,” Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts.”, *Plant and Cell Physiology*, 22: 867-880 (1981).
- Navakoudis, E., Lütz, C., Langebartels, C., Lütz-Meindl, U., Kotzabasis, K., “Ozone impact on the photosynthetic apparatus and the protective role of polyamines”, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1621: 160–169 (2003).
- Neale, P.J., Melis, A., ”Salinity-stress enhances photoinhibition of photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii*”, *Journal of Plant Physiology*, 134: 619–622 (1989).
- Neven, L.G., Haskell, D.W., Guy, C.L., Denslow, N., Klein, P.A., Green, L.G., Silverman, A., “Association of 70-Kilodalton Heat-Shock Cognate Proteins with Acclimation to Cold”, *Plant Physiology*, 99 (4): 1362-1369 (1992).
- Nishiyama, Y., Allakhverdiev, S.I., Yamamoto, H., Hayashi, H., Murata, N., “Singlet oxygen inhibits the repair of Photosystem II by suppressing translation elongation of the D1 protein in *Synechocystis* sp. PCC 6803”, *Biochemistry*, 43: 11321-11330 (2004).

### KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

- Nixon, P.J., Michoux, F., Yu, J., Boehm, M., Komenda, J., “Recent advances in understanding the assembly and repair of photosystem II”, *Annals of Botany*, 106: 1–16 (2010).
- Norman, P.A., Gunnar, Ö., Fathey, S., “Energy balance and acclimation to light and cold”, *Trends in Plant Science*, 98: 1360-1385 (1998).
- Pang, X.M., Zhang, Z.Y., Wen, X.P., Ban, Y., Moriguchi, T., “Polyamines, all-purpose players in response to environment stress in plants”, *Plant Stress*, 1(2): 173–188 (2007).
- Parida, A.K., Das, A.B., Mitra, B., “Effects of NaCl Stress on the Structure, Pigment Complex Composition, and Photosynthetic Activity of Mangrove *Bruguiera parviflora* Chloroplasts”, *Photosynthetica*, 41: 191–200 (2003).
- Parida, A.K., Das, A.B., “Salt tolerance and salinity effects on plants: a review”, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60: 324- 349 (2005).
- Phillips, J., Artsaenko, O., Fiedler, U., Horstmann, C., Mock, H.P., Müntz, K., Conrad, U., “Seed-specific immunomodulation of abscisic acid activity induces a developmental switch”, *EMBO Journal*, 16: 4489–4496 (1997).
- Porat, R., Pavoncello, D., Peretz, J., Ben-Yehoshua, S., Lurie, S., “Effects of various heat treatments on the induction of cold tolerance and on the postharvest qualities of ‘Star Ruby’ grapefruit.”, *Postharvest Biology and Technology*, 18: 159–165 (2000).
- Prasad, T.K., “Role of Catalase in Inducing Chilling Tolerance in Pre-Emergent Maize Seedlings”, *Plant Physiology*, 114 (4): 1369-1376 (1997).
- Qian, H., Li, J., Sun, L., Chen, W., Sheng, G.D., Liu, W., Fu, Z., “Combined effect of copper and cadmium on *Chlorella vulgaris* growth and photosynthesis-related gene transcription”, *Aquatic Toxicology*, 94: 56-61 (2009).
- Ritossa, F., “A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*.”, *Experientia*, 18: 571–573 (1962).
- Rizhsky, L., Liang, H., Shuman, J., Shulaev, V., Davletova, S., “When defense pathways collide. The response of Arabidopsis to a combination of drought and heat stress.”, *Plant Physiology*, 134:1683– 1696 (2004).

### KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

- Rochaix, J.D., Goldschmidt-Cermont, M., Merchant, S., “The Molecular Biology of Chloroplasts and Mitochondria in *Chlamydomonas*.”, ***Kluwer Academic Publishers***, ISBN 10: 0792351746 / ISBN 13: 9780792351740 (1998).
- Roychoudhury, A., Basu, S., Sengupta, D.N., “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: 317–328 (2011).
- Ruiz, O. A., Maiale, S., Sánchez, D. H., Guirado, A., Vidal, A., “Spermine accumulation under salt stress”, ***Journal of Plant Physiology***, 161: 35–42 (2004).
- Sagor, G. H. M., Berberich, T., Takahashi, Y., Niitsu, M., Kusano, T., “The polyamine spermine protects Arabidopsis from heat stress-induced damage by increasing expression of heat shock-related genes.”, ***Transgenic Research***, 22: 595–605 (2013).
- Sakai, A., Larcher, W., “Frost Survival of Plants. Responses and Adaptation to Freezing Stress.”, ***Springer-Verlag***, Berlin/Heidelberg/New York (1987).
- Schroda, M., Vallon, O., Wollman, F.A., Becka, C. F., “A Chloroplast-Targeted Heat Shock Protein 70 (HSP70) Contributes to the Photoprotection and Repair of Photosystem II during and after Photoinhibition.”, ***The Plant Cell***, 11: 1165–1178 (1999).
- Sen, G., Eryilmaz, I.E., Ozakca, D., “The effect of aluminium-stress and exogenous spermidine on chlorophyll degradation, glutathione reductase activity and the photosystem II D1 protein gene (*psbA*) transcript level in lichen *Xanthoria parietina*”, ***Phytochemistry***, 98: 54–59 (2014).
- Sfakianaki, M., Sfichi, L., Kotzabasis, K.,” The involvement of LHCII-associated polyamines in the response of the photosynthetic apparatus to low temperature”, ***Journal of Photochemistry and Photobiology B***, 84: 181–188 (2006).
- Sfichi, L., Ioannidis, N., Kotzabasis, K., “Thylakoid-associated polyamines adjust the UV-B sensitivity of the photosynthetic apparatus by means of light-harvesting complex II changes”, ***Photochemistry and Photobiology***, 80: 499–506 (2004).

### KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

- Sfichi-Duke, L., Ioannidis, N.E., Kotzabasis, K., “Fast and reversible response of thylakoid-associated polyamines during and after UV-B stress: a comparative study of the wild type and a mutant lacking chlorophyll *b* of unicellular green alga *Scenedesmus obliquus*”, *Planta*, 228: 341–353 (2008).
- Sharma, S.S., Dietz, K.J., “The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress”, *Journal of Experimental Botany*, 57: 711–726 (2006).
- Shen, W., Nada, K., Tachibana, S., “Involvement of polyamines in the chilling tolerance of cucumber cultivars”, *Plant Physiology*, 124: 431–439 (2000).
- Shinozaki, K., Yamaguchi, K., “Gene Expression and Signal Transduction in Water-Stress Response”, *Plant Physiology*, 11 (5): 327-334 (1997).
- Shu, S., Guo, S.R., Sun, J., Yuan, L.Y., “Effects of salt stress on the structure and function of the photosynthetic apparatus in *Cucumis sativus* and its protection by exogenous putrescine.” *Physiologia Plantarum*, 146: 285–296 (2012).
- Shu, S., Guo, S.R., Yuan, L.Y., "A Review: Polyamines and Photosynthesis", *Advances in Photosynthesis – Fundamental Aspects*, Mohammad Mahdi Najafpour (Ed.), *INTECH*, DOI: 10.5772/26875 (2012).
- Sippola, K., Kanervo, E., Murata, N., Aro, E.M., “A genetically engineered increase in fatty acid unsaturation in *Synechococcus* sp. PCC 7942 allows exchange of D1 protein forms and sustenance of photosystem II activity at low temperature”, *European Journal of Biochemistry*, 251:6412648 (1998).
- Somanchi, A., Barnes, D., Mayfield, S.P., “A nuclear gene of *Chlamydomonas reinhardtii*, *Tba1*, encodes a putative oxidoreductase required for translation of the chloroplast *psbA* mRNA”, *The Plant Journal*, 42: 341-352 (2005).
- Stewart, K.D., Gray, T.A., “Survey of the DNA binding properties of natural and synthetic polyamino compounds”, *Journal of Physical Organic Chemistry*, 5: 461- 466 (1992).
- Sudhir, P., Murthy, S.D.S., “Effects of salt stress on basic processes of photosynthesis”, *Photosynthetica*, 42: 481-486 (2004).

### KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

- Sun, J., Chen, J., Kuang, J., Chen, W., Lu, W., ” Expression of sHSP genes as affected by heat shock and cold acclimation in relation to chilling tolerance in plum fruit.”, *Postharvest Biology and Technology*, 55: 91–96 (2010).
- Sung, D.Y., Guy, C.L., “Physiological and molecular assessment of altered expression of Hsc70–1 in Arabidopsis. Evidence for pleiotropic consequences.”, *Plant Physiology*, 132: 979–987 (2003).
- Sung, D.Y., Kaplan, F., Lee, K.J., Guy, C.L., “Acquired tolerance to temperature extremes.”, *Trends in Plant Science*, 8: 179–187 (2003).
- Taiz, L., Zeiger, E., “Fotosentez: Işık Reaksiyonları”, Bitki Fizyolojisi, İsmail Türkan (Ed.), *Palme*, Ankara, 112-142 (2008).
- Tekin, F., “*Helianthus annuus* L. Tohumlarının Çimlenmesi ve Fide Gelişimi Üzerine Tuz ve Ekzojen Poliaminlerin Etkisi”, Bilim Uzmanlığı Tezi, *Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara (1996).
- Theiss, C., Bohley, P., Bisswanger, H., Voigt, J., “Uptake of polyamines by the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* and their effect on ornithine decarboxylase activity”, *Journal of Plant Physiology*, 161 (1): 3-14 (2004).
- Thomas, T., Thomas, T. J., “Polyamine in Cell Growth and Cell Death: Molecular Mechanisms and Therapeutic Applications”, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58: 244–258 (2001).
- Thomashow, M.F., “Genes induced during cold acclimation in higher plants”, Advances in Low Temperature Biology, (Steponkus P.L. ed.), 807–834, *JAI Press*, London, UK (1993).
- Tiburcio, A.F., Besford, R.T., Capell, T., Borrell, A., Tes-tillano, P.S., Risueno, M.C., “Mechanism of polyamine action during senescence responses induced by osmotic stress”, *Journal of Experimental Botany*, 45: 1789–1800 (1994).
- Tillberg, J.-E., “Effects of abscisic acid, salicylic acid and trans-cinnamic acid on phosphate uptake, ATP-level and oxygen evolution in *Scenedesmus*”, *Physiologia Plantarum*, 23: 647–653 (1970).
- Türkan, I., Demiral, T., “Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance”, *Environmental and Experimental Botany*, 53: 247–257 (2005).

### KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

- Unal, D., Tuney, I., Sukatar, A., “The Role of External Polyamines on Photosynthetic Responses, Lipid Peroxidation, Protein and Chlorophyll a Content under the UVA (352-nm) Stress in *Physcia semipinnata*”, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 90: 64–68 (2008).
- Urano, K., Yoshiba, Y., Nanjo, T., Igarashi, Y., Seki, M., Sekiguchi, F., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., “Characterization of Arabidopsis genes involved in biosynthesis of polyamines in abiotic stress responses and developmental stages”, *Plant, Cell and Environment*, 26: 1917-1926 (2003).
- Ünsal-Palavan, N., “Bitki Büyüme Maddeleri”, *İstanbul Üniversitesi Yayınları*, İstanbul (1993).
- Valledor, L., Furuhashi, T., Hanak, A.M., Weckwerth, W., “Systemic Cold Stress Adaptation of *Chlamydomonas reinhardtii*”, *Molecular & Cellular Proteomics*, 12: 2032-2047 (2013).
- Verma, S., Mishra, S.N., “Putrescine alleviation of growth in salt stressed *Brassica juncea* by inducing antioxidative defense system”, *Journal of Plant Physiology*, 162 (6): 669-677 (2005).
- Voigt, J., Deinert, B., Bohley, P., “Subcellular localization and light-dark control of ornithine decarboxylase in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*”, *Physiologia Plantarum*, 108: 353–360 (2000).
- Wallace, H.M., “The polyamines: past, present and future”, *Essays in Biochemistry*, 46:1-9 (2009).
- Wang, C.Y., Brown, J.H., Weir, I.E., Allan, A.C., Ferguson, I.B., “Heat induced protection against death of suspension cultures of apple fruit cells exposed to low temperature.”, *Plant, Cell & Environment*, 24: 1199–1207 (2001).
- Wang, J., Sun, P.P., Chen, C.L., Wang, Y., Fu, X.Z., Liu, J.H., ” An arginine decarboxylase gene PtADC from *Poncirus trifoliata* confers abiotic stress tolerance and promotes primary root growth in *Arabidopsis*”, *Journal of Experimental Botany*, 62(8): 2899-2914 (2011).

### KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

- Wang, W.X., Vinocur, B., Shoseyov, O., Altman, A., “Role of heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response.”, *Trends in Plant Science*, 9: 245–251 (2004).
- Ward, A.W., Lawlor, D.W., “Abscisic acid may mediate the rapid thermal acclimatization of photosynthesis in wheat”, *Journal of Experimental Botany*, 41: 309–314 (1990).
- Willekens, H., Chamnongpol, S., Davey, M., Schraudner, M., Langebartels, C., Montagu, M.V., Inzé, D., Camp, W.V., “Catalase is a sink for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and is indispensable for stress defence in C3 plants”, *The EMBO Journal*, 16: 4806-4816 (1997).
- Williams, L.J., Barnett, G.R., Ristow, J.L., Pitkin, J., Perriere, M., Davis, R.H., “Ornithine Decarboxylase Gene of *Neurospora crassa*: Isolation, Sequence, and Polyamine-Mediated Regulation of Its mRNA”, *Molecular and Cellular Biology*, 12: 347-359 (1992).
- Woolf, A.B., Bowen, H.J., Ferguson, I.B., “Preharvest exposure to the sun influences postharvest responses of ‘Hass’ avocado fruit.”, *Postharvest Biology and Technology*, 15: 143–153 (1999).
- Xiong, L., Zhu, K.J., “Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress”, *Plant, Cell & Environment*, 25: 131–139 (2002).
- Xiong, L., Zhu, K.J., “Regulation of Abscisic Acid Biosynthesis”, *Plant Physiology*, 133: 29–36 (2003).
- Yamaguchi, K., Takahashi, K.Y., Berberich, T., Imai, A., Takahashi, T., Michael, A.J., Kusano, T., “A protective role for the polyamine spermine against drought stress in *Arabidopsis*”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 352: 486–490 (2007).
- Yohn, C.B., Cohen, A., Danon, A., Mayfield, SP., “A poly(A) binding protein functions in the chloroplast as a message-specific translation factor”, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 95: 2238-2243 (1998).
- Yoshida, K., Igarashi, E., Mukai, M., Hirata, K., Miyamoto, K., “Induction of tolerance to oxidative stress in the green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*, by abscisic acid”, *Plant, Cell and Environment*, 26: 451–457 (2003).

**KAYNAKLAR (Devam Ediyor)**

- Yoshida, K., Igarashi, E., Wakatsuki, E., Miyamoto, K., Hirata, K.,” Mitigation of osmotic and salt stresses by abscisic acid through reduction of stress-derived oxidative damage in *Chlamydomonas reinhardtii*.”, *Plant Science*, 167: 1335-1341 (2004).
- Zapata, P. J., Serrano, M., Pretel, M. T., Botella, M. A., “Changes in free polyamine concentration induced by salt stress in seedlings of different species”, *Plant Growth Regulation*, 56: 167–177 (2008).
- Zeevaart, J.A.D., Creelman, R.A., “Metabolism and physiology of abscisic acid”, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 39: 439–473 (1988).
- Zhang, C., Guy, C.L., “In vitro evidence of Hsc70 functioning as a molecular chaperone during cold stress.”, *Plant Physiology and Biochemistry*, 44: 844–850 (2006).
- Zhang, R.H., Li, J., Guo, S.R., Tezuka, T., “Effects of exogenous putrescine on gasexchange characteristics and chlorophyll fluorescence of NaCl-stressed cucumber seedlings”, *Photosynthetic Research*, 100: 155–162 (2009).
- Zhou, Y.H., Yu, J.Q., Mao, W.H., Huang, L.F., Song, X.S., Nogue's, S., “Genotypic variation of Rubisco expression, photosynthetic electron flow and antioxidant metabolism in the chloroplasts of chill-exposed cucumber plants”, *Plant and Cell Physiology*, 47: 192–199 (2006).

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Müslüm Süleyman İNAL

Doğum Yeri ve Tarihi : HATAY/15.03.1992



### Eğitim Durumu

Lisans Öğrenimi : B.Ş.E.Ü. Moleküler Biyoloji ve Genetik

### İş Deneyimi

Stajlar : İYTE Bitki Genetiği Laboratuvarı

Projeler :

- 1) TÜBİTAK 2209A Öğrenci projesi, Araştırmacı (2012-2013) .*Chlorella sp.* Kültüründe Farklı Stres Koşullarına Bağlı Olarak Fotosistem I ve Fotosistem II'e ait Gen İfadelerindeki Değişimlerin Araştırılması.
- 2) BAP 2014-02.BIL.04-03, Araştırmacı (2015-devam ediyor).

### İletişim

Tel : 05072713783

E-Posta Adresi : muslumsuleyman@hotmail.com

### Akademik

#### 1. SCI-SCI-Expanded Kapsamındaki Yayınlar

Çekiç, F.Ö.; Ekinci, S.; İnal, M.S.; Özakça, D., Silver nanoparticles induced genotoxicity and oxidative stress in tomato plants, *Turkish Journal of Biology*, 2017 (Basımda).

#### 2. Uluslararası Kongreler

-Eryılmaz E.I., İNAL M.S. ; Ozakca D., Effect of UV-C radiation on transcription level of polyketide synthase gene (pksI) and photosystem II D1 protein gene (*psbA*) in *Evernia prunastri*, *International conference on environmental science and technology, June, 18-21, 2013, Nevşehir-TÜRKİYE.*

#### 3. Ulusal Kongreler

-Ünal-Özakça, D.; İnal, M. S., Düşük Sıcaklık Koşullarında *Chlamydomonas reinhardtii*' de Putresinin Bazı Isı Şoku Proteinlerinin Gen İfadesi Üzerindeki Etkileri, II. Ulusal Bitki Fizyolojisi Sempozyumu 31 ağustos-3 Eylül 2016, Mersin.

-Şen E., İnal M.S., Akarsu Ş., Akçay D., Alkoç M.E., Özakça D., PCR-RFLP Yöntemi ile *Xanthoria parietina*, *Evernia prunastri*, *Pseudevernia furfuraceae* ve *Cladonia sp.* Türlerine ait P700 klorofil a-apoprotein (*psA2*) Gen Bölgesi Arasındaki Polimorfizmin Belirlenmesi, 2. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi ,15-18 Kasım, 2012, ANTALYA.

-Bağcı E., Kekeç M., İnal M. , Özakça D., *Evernia prunastri* türünde spermidinin Manganez stresi altında total glutatyon içeriği üzerine etkisi, Marmara Üniversitesi 19. Öğrenci Biyoloji Kongresi 2011.

Tarih: 09/01/2017