

T.C.
İSTANBUL AYVANSARAY ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



GASTRONOMİK BİR DEĞER OLAN MISIR (*ZEA MAYS L.*)'İN STRES
ALTINDA MİKROTÜBÜL HÜCRE İSKELETİ DAVRANIŞI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Emre KÖSEOĞLU

Gastronomi ve Mutfak Sanatları Anabilim Dalı
Gastronomi ve Mutfak Sanatları Bilim Dalı

Ocak, 2022

T.C.
İSTANBUL AYVANSARAY ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



GASTRONOMİK BİR DEĞER OLAN MISIR (*ZEA MAYS L.*)'İN STRES
ALTINDA MİKROTÜBÜL HÜCRE İSKELETİ DAVRANIŞI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Emre KÖSEOĞLU
(19220102051)

Gastronomi ve Mutfak Sanatları Anabilim Dalı
Gastronomi ve Mutfak Sanatları Bilim Dalı

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Özlem AYTÜRK

OCAK, 2022

KABUL VE ONAY



AKADEMİK DÜRÜSTLÜK BEYANI

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum “ Gastronomik bir değer olan Mısır (*Zea mays* L.)’in stres altında mikrotübül hücre iskeleti davranışı” başlıklı çalışmamın, bilimsel ahlak ve geleneklere uygun olarak tarafımdan yazıldığını, yararlandığım eserlerin tamamının kaynaklarda gösterildiğini ve çalışmanın içinde kullanıldıkları her yerde bunlara atıf yapıldığını belirtir ve onurumla doğrularım.

17.01.2022

Emre KÖSEOĞLU

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezime yaptığı büyük katkılar ve bana gösterdiği destek, teşvik ve ilgi için danışman hocam Sayın Dr. Öğretim Üyesi Özlem AYTÜRK'e teşekkürlerimi sunarım. Tez süresince laboratuvar çalışmalarımı gerçekleştirdiğim Maltepe Üniversitesi Gastronomi-Biyoloji Laboratuvarı, Maltepe Üniversitesi Kanser ve Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi (MÜKKAM) ve Marmara Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde görev yapmakta olan ve bana desteklerini ve yardımlarını eksik etmeyen tüm çalışanlara sonsuz teşekkürler. Yüksek lisans eğitiminin bana kattığı, en güzel ve en zorlu günleri omuz omuza geçirdiğimiz değerli arkadaşlarım Nuray ALTUNTAŞ, Fatma Nur NEGİZÖZEN, Abdüssamet YILMAZ, Gürkan KÖK, Bedia BAŞARAN AKSOY, Mustafa TAN, Nisa ERCİYAS ve Ayşem IŞIK'a her zaman yanımda oldukları ve beni destekledikleri için teşekkür ederim.

Yüksek lisans öğrenciliğim boyunca her türlü destek ve teşvikleri için değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi İlkay YILMAZ'a en içten teşekkürlerimi sunarım. Tez dönemim boyunca desteğini hep üzerimde hissettiğim değerli hocam Prof. Dr. Aziz EKŞİ'ye en içten teşekkürlerimi sunarım.

Beni bu günlere getiren ve her zaman yanımda olan değerli babannem Neriman KÖSEOĞLU'na, cennetteki meleğim canım annem Güler ÇETİNKAYA KÖSEOĞLU'na, babam Birol KÖSEOĞLU'na, beni büyüten bu günlere getiren annem Sema KÖSEOĞLU'na ve okumam için her zaman teşvik eden cennete ki dayım Fahri KARA'ya en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Emre KÖSEOĞLU

İÇİNDEKİLER

Sayfa

KABUL VE ONAY	ii
AKADEMİK DÜRÜSTLÜK BEYANI	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
KISALTMALAR	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
TABLolar LİSTESİ	ix
ÖZET	x
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ	1
1.1 Mısır (<i>Zea mays</i> L.)	2
1.2 Abiyotik Stres	5
1.3 Programlı Hücre Ölümü	9
1.4 Mikrotübüller	10
2. MATERYAL VE YÖNTEM	13
2.1 Bitki Materyali	13
2.2 Floresan Mikroskobu Çalışmaları	15
2.2.1 Parafin yöntemi	15
2.2.1.1 Saklama koşulu	15
2.3 Moleküler Yöntemler	15
2.3.1 DAPI (4-6-diamidino-2-fenilindol) analizi (Schweizer, 1976).....	15
2.3.1.1 Lamellerin hazır hale getirilmesi	15
2.3.1.2 Parafin bloklarından kesit alınması.....	16
2.3.1.3 DAPI boyasının hazırlanması	16
2.3.2 TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling: İn situ uç işaretleme yöntemi) analizi	16
2.3.3 Mikrotübül Etiketleme Analizi	18
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	20
3.1 DAPI (4-6-diamidino-2-fenilindol) Boyama Bulguları	20
3.2 TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling: İn situ uç işaretleme yöntemi) Analiz Bulguları.....	28
3.3 Mikrotübül etiketleme analizi bulguları	35
4. SONUÇ	46
KAYNAKÇA	50
ÖZGEÇMİŞ	56

KISALTMALAR

PHÖ : Programlı Hücre Ölümü
ROS : Reaktif Oksijen Türleri



ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

- Şekil 3.1:** 1.Grup (kontrol) mısır kök dokusu hücrelerinde DAPI boyama ile floresan mikroskop görüntüleri. a. Kök dokusunun genel görünümü, b, c. Nukleusların görüntüsü, d. Dokunun büyütülmüş görüntüsünde düzgün bir küre şeklinde hücreler (oklar). Bar, a,d. 50 µm ve b,c. 10 µm. 21
- Şekil 3.2:** a-f 50 mM tuz konsantrasyonuna maruz bırakılan mısır kök dokusu hücrelerinde DAPI boyama ile floresan mikroskop genel görüntüleri. a. 15 Dakika 50 mM, b. 30 Dakika 50 mM, c. 1 Saat 50 mM, ç. 2 Saat 50 mM, d. 6 Saat 50 mM, e. 12 Saat 50 mM, f. 24 Saat 50 mM, *g. 15 Dakika 50 Mm'da nukleuslarında kromatin yoğunlaşması başlayan hücrelerin durumu (oklar, nukleus), *h. 2 Saat 50 Mm'da hücrelerin durumu : bölgesel bozulmalar tüm dokuya yayılma şeklindedir (oklar), *i. 12 Saat 50 Mm'da hücrelerin durumu : bozulmalar neredeyse 1.5 santimlik dokunun büyük kısmındadır (oklar). Bar, 50 µm (a-i). 23
- Şekil 3.3:** a-f 100 mM tuz konsantrasyonuna maruz bırakılan mısır kök dokusu hücrelerinde DAPI boyama ile floresan mikroskop görüntüleri. a. 15 Dakika 100 mM, b. 30 Dakika 100 mM, c. 1 Saat 100 mM, ç. 2 Saat 100 mM, d. 6 Saat 100 mM, e. 12 Saat 100 mM, f. 24 Saat 100 mM *g. 15 Dakika 100 Mm'da hücrelerin durumu : bölgesel bozulmalar (oklar), *h. 2 Saat 100 Mm'da hücrelerin durumu : bozulmalar dokunun kenar kısmında yoğundur (oklar, nukleus), *i. 12 Saat 100 Mm'da hücrelerin durumu : bozulmalar dokunun büyük kısmındadır (oklar). Bar, 50 µm (a-i). 24
- Şekil 3.4:** a-f 300 mM tuz konsantrasyonuna maruz bırakılan mısır kök dokusu hücrelerinde DAPI boyama ile floresan mikroskop görüntüleri. a. 15 Dakika 300 mM, b. 30 Dakika 300 mM, c. 1 Saat 300 mM, ç. 2 Saat 300 mM, d. 6 Saat 300 mM, e. 12 Saat 300 mM, f. 24 Saat 300 mM Bar 10 µm (a-f). *g. 15 Dakika 300 mM da hücrelerin durumu : bozulmalar kenar ve orta kısımlardadır (oklar, nukleus), *h. 2 Saat 300 mM da hücrelerin durumu : bozulmalar dokunun büyük kısmında yoğundur (oklar), *i. 12 Saat 300 mM da hücrelerin durumu : bozulmalar dokunun tamamındadır (oklar). Bar, 50 µm (a-i). 26
- Şekil 3.5:** a-f 500 mM tuz konsantrasyonuna maruz bırakılan mısır kök dokusu hücrelerinde DAPI boyama ile floresan mikroskop görüntüleri. a. 15 Dakika 500 mM, b. 30 Dakika 500 mM, c. 1 Saat 500 mM, ç. 2 Saat 500 mM, d. 6 Saat 500 mM, e. 12 Saat 500 mM, f. 24 Saat 500 mM Bar 10 µm (a-f). *g. 15 Dakika 500 mM da hücrelerin durumu : bozulmalar kenar ve orta kısımlarda bulunmaktadır (oklar), *h. 2 Saat 500 mM da hücrelerin durumu : bozulmalar dokunun büyük kısmındadır

	(oklar), *i. 12 Saat 500 mM da hücrelerin durumu : bozulmalar dokunun tamamında şiddetlidir (oklar, nukleus). Bar, 50 µm (a-i).	27
Şekil 3.6:	TUNEL boyama ile negatif sonuç veren mısır kök dokusu hücrelerinin floresan mikroskop görüntüsü. Bar, 50 µm.....	28
Şekil 3.7:	a-l. 50 mM tuz konsantrasyonuna maruz bırakılan mısır kök dokusu hücrelerinde TUNEL boyama ile floresan mikroskop görüntüleri. a-f. Kök dokusunun genel görüntüsü, g-l. Üstteki dokudan büyütülen bir kesit görüntüsü. Bar, 50 µm (a-f), 10 µm (g-l).	30
Şekil 3.8:	a-l. 100 mM tuz konsantrasyonuna maruz bırakılan mısır kök dokusu hücrelerinde TUNEL boyama ile floresan mikroskop görüntüleri. a-f. Kök dokusunun genel görüntüsü, g-l. Üstteki dokudan büyütülen bir kesit görüntüsü. Bar, 50 µm (a-f), 10 µm (g-l).	31
Şekil 3.9:	a-l. 300 mM tuz konsantrasyonuna maruz bırakılan mısır kök dokusu hücrelerinde TUNEL boyama ile floresan mikroskop görüntüleri. a-f. Kök dokusunun genel görüntüsü, g-l. Üstteki dokudan büyütülen bir kesit görüntüsü. Bar, 50 µm (a-f), 10 µm (g-l).	33
Şekil 3.10:	a-l. 500 mM tuz konsantrasyonuna maruz bırakılan mısır kök dokusu hücrelerinde TUNEL boyama ile floresan mikroskop görüntüleri. a-f. Kök dokusunun genel görüntüsü, g-l. Üstteki dokudan büyütülen bir kesit görüntüsü. Bar, 50 µm (a-f), 10 µm (g-l).	34
Şekil 3.11:	a-d. Kontrol grubu FITC (flurescein - isothiocyanat) ile işaretlenen mikrotübül proteinlerinin floresan boyama analizi görüntüsü. Oklar : Mikrotübül kümeleri. Bar, 50 µm (a,b), 10 µm (c-d).....	35
Şekil 3.12:	(a-f). 50 mM tuz konsantrasyonuna maruz bırakılan mısır kök dokusu hücrelerinde FITC (flurescein - isothiocyanat) ile işaretlenen mikrotübül proteinlerinin floresan boyama analizi görüntüsü. Oklar : Mikrotübül kümeleri. Bar, 10 µm (a-f).	37
Şekil 3.13:	(a-f). 100 mM tuz konsantrasyonuna maruz bırakılan mısır kök dokusu hücrelerinde FITC (flurescein - isothiocyanat) ile işaretlenen mikrotübül proteinlerinin floresan boyama analizi görüntüsü. Oklar : Mikrotübül kümeleri. Bar, 10 µm (a-f).	38
Şekil 3.14:	(a-f). 300 mM tuz konsantrasyonuna maruz bırakılan mısır kök dokusu hücrelerinde FITC (flurescein - isothiocyanat) ile işaretlenen mikrotübül proteinlerinin floresan boyama analizi görüntüsü. Oklar : Mikrotübül kümeleri. Bar, 10 µm (a-f).	39
Şekil 3.15:	(a-f). 500 mM tuz konsantrasyonuna maruz bırakılan mısır kök dokusu hücrelerinde FITC (flurescein - isothiocyanat) ile işaretlenen mikrotübül proteinlerinin floresan boyama analizi görüntüsü. Oklar : Mikrotübül kümeleri. Bar, 10 µm (a-f).	40

TABLULAR LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1: Tuz stresi oluşturma uygulaması için kullanılan solüsyonların tuz miktarları.	14
Tablo 2.2: Işık mikroskobu için parafine gömme analizinin aşamaları, kullanılan çözeltiler ve süre/sıcaklık.	14
Tablo 2.3: TUNEL analizi.....	17



ÖZET

GASTRONOMİK BİR DEĞER OLAN MISIR (ZEA MAYS L.)'İN STRES ALTINDA MİKROTÜBÜL HÜCRE İSKELETİ DAVRANIŞI

Zea mays L. bitkisinin kökleri sırasıyla 50, 100, 300, 500 mM NaCl ile muamele edilmiş tuz stresine maruz bırakılan mısır bitkisinin 1,5 cm olan kökleri fikse edildi ve % 70 alkolde saklandı. Daha sonra % 70 alkoldeki mısır köklerine kesit alınabilmesi için parafin yöntemi uygulandı ve 3-4 µm boyutunda kesitler elde edildi. Elde edilen kesitlere DAPI (4-6-diamidino-2-fenilindol) boyama yöntemi uygulandı. Floresan mikroskopunda 365 nm dalga boyunda incelenen 50, 100, 300, 500 mM NaCl ile muamele edilen mısır kök doku hücrelerinde kromatin yoğunlaşması, şekilleri bozulan nukleuslar ve sitoplazma büzülmesi görüldü. PHÖ belirtileri gösteren mısır kök dokusu hücrelerine PHÖ sırasında DNA'da gerçekleşen kırıkları in situ olarak gösterebilmek için TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling: İn situ uç işaretleme yöntemi) analizi uygulandı. TUNEL analizi yöntemi uygulanan mısır kök dokusu kesitleri 490 nm dalga boyunda yeşil ışığa veren floresan mikroskopunda fotoğraflandı. DAPI boyama ve TUNEL analizi yönteminde elde edilen bulgular ile mısır kök dokusu hücrelerinin PHÖ'ye uğradığı tespit edildi. PHÖ öncesi ve sonrasında mısır kök dokusu hücrelerinin mikrotübül organizasyonu floresan mikroskop ile incelendi. PHÖ'den önce mikrotübüllerin hücre çeperine paralel uzandıkları, nukleus ve vakuolün etrafında toplandıkları görülürken PHÖ sırasında mikrotübül organizasyonunun nukleus ve vakuolün etrafında kümelenme, bölgesel kalınlaşma ve rastgele bir dağılım sergiledikleri tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: *Mısır (Zea mays L.), Programlı hücre ölümü, Mikrotübül, Floresan mikroskop, TUNEL.*

ABSTRACT

MICROTUBULE CYTOSKELETAL BEHAVIOR OF MAIZE (*ZEA MAYS* L.) AS A GASTRONOMIC VALUE UNDER STRESS.

The roots of *Zea mays* L. plant were treated with 50,100,300,500 mM NaCl, respectively. 1-1.5 cm roots of *Zea mays* L. plant exposed to salt stress were fixed and stored in 70% alcohol. Then, paraffin method was applied to section the corn roots in 70% alcohol and 4 µm sized sections were obtained. DAPI (4-6-diamidino-2-phenylindole) analysis method was applied to the sections obtained. Chromatin condensation, deformed nuclei and cytoplasmic shrinkage were observed in corn root tissue cells treated with 50,100,300,500 mM NaCl, which were examined at a wavelength of 365 nm under fluorescence microscope. TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling: In situ end labeling method) analysis was applied to maize root tissue cells showing PCD symptoms in situ to show DNA breaks during PCD. Corn root tissue sections, on which TUNEL analysis method was applied, were covered with a coverslip and covered with a coverslip, and the sections were photographed under a fluorescent microscope with a green glow at 490 nm. With the findings obtained in the DAPI analysis and TUNEL analysis method, it was determined that the corn root tissue cells were exposed to PCD. Microtubule organization in corn root tissue cells, which was examined with a fluorescent microscope, was examined before and after PCD. It was observed that microtubules extend parallel to the cell wall and gather around the nucleus and vacuole before PCD. It was determined that they exhibited clustering, regional thickening and a random distribution around the nucleus and vacuole in microtubule organization during PCD.

Key words: *Maize (Zea mays L.), Programmed cell death, Microtubule, Floresans microscope, TUNEL*

1. GİRİŞ

Mısır (*Zea mays* L.) dünyada ve ülkemizde ekonomik açıdan yüksek gelir sağlayan önemli bitkilerden birisidir. Türkiye'de en çok yetiştirilen bitki sıralamasında üçüncü sırada gelmektedir (Süzer, 2004). Tuzlu topraklara ekilen bitkilerde yaşanan streslerden dolayı verim kayıpları meydana gelmektedir. Bu kayıpların azaltılması veya tamamen ortadan kaldırılabilmesi için tuzlu topraklarda yetişebilecek ve tuz stresine karşı tolerans gösterebilecek bitkilerin bulunması ve seçilmesi konusunda birçok çalışma yapılmaktadır. Yapılan bu çalışmada mısır bitkisinin tuza verdiği yanıtın ayrıntıları detaylandırılacak, bu konunun aydınlatılmasına ve stres faktörünün getirdiği olumsuz etkilerin sonraki çalışmalarda iyileştirilmesine kaynak oluşturularak katkı sağlanacaktır.

Bitkilerin yaşam döngüleri süresince olumlu fayda sağlayan programlı hücre ölümü (PHÖ), bitkinin gelişiminin düzenli olarak devam etmesini verimli tohumların oluşmasını ve bitkinin üremesinin sağlıklı olmasını sağlayabilen önemli bir süreçtir. Bitkiye bu kadar olumlu fayda sağlayan PHÖ, stres faktörleri ile bir araya geldiğinde bitkideki verimi düşürme konusunda dolaylı bir etkiye sahiptir. Bu durum birçok çalışma konusu olmuştur ve günümüzde hala çalışılmaktadır. Toprakta sabit yaşamak zorunda olmaları nedeniyle bitkiler yaşam döngülerinin devam ettiği süre boyunca abiyotik ve biyotik stres faktörleri ile karşılaşır. Bu durum, bitkide fizyolojik ve biyokimyasal mekanizmaları etkiler. Bu etki bitkideki verimin düşmesine yol açar ve ciddi olumsuz sonuçlara neden olur. Dünya nüfusunun sürekli artıyor olması stres kaynaklı bitki verim kayıplarının önüne geçilmesini zorunlu kılmıştır. Besin olarak tüketilen bitkilerdeki bu verim kayıplarının tersine çevirilmesi, kaliteli bitkilerin arttırılması ve yaşanan kayıpların minimuma indirilmesi için yapılan çabalar birçok çalışmaya konu olmuştur.

Planlanan bu çalışma ile tuz stresinin mısır türü üzerindeki etkileri araştırılacak ve insanların beslenmesi için çözüm aranan stres kaynaklı sorunların çözülmesine destek sağlanacaktır. Literatürde mısır bitkisi konusunda

yapılan çalışma fazladır fakat yapılan çalışmalar çoğunlukta mısırın genetik yapısına dair olmaktadır. Stres kaynaklı PHÖ süreci üzerine yapılan araştırmalar ise sınırlı sayılıdır. Bu araştırma sonunda elde edilecek veriler, bitkilerde özellikle mısır bitkisinde stres ve hücre ölüm sürecinin anlaşılmasına ve aydınlatılmasına bilimsel katkı sağlayacaktır. Konu hakkında sayısı sınırlı çalışmalardan bir tanesi olan bu araştırma ile PHÖ ve mikrotübül düzeni arasındaki ilişkinin detayları ortaya konulacaktır. Yanısıra, gelecekte yapılacak başka çalışmaların yapılmasına da öncü olacaktır.

1.1 Mısır (*Zea mays* L.)

Tek evcikli (monoik) bir bitki olan mısır, Poaceae (buğdaygiller) familyasındandır. Mısır bitkisini familyasından ayıran en belirgin özelliği çiçeklenme şeklidir. Mısır erkek ve dişi çiçekler oluşturmaktadır; bu çiçekler aynı bitkide farklı yerlerde taşınmaktadır. Mısır bitkisi genellikle sıcak ve nem oranı yüksek olan bölgelerde yetiştirilmektedir. Türkiye ılıman iklim şartlarına sahip olduğundan ve mısır bitkisi de toprak konusunda çok fazla seçici olmadığından ülkemizde çok rahat yetişebilmektedir (Tekiş, 2016). Mısır genomu ortaya çıkarılmış olan ilk tahıl türüdür (Köseoğlu, 2019). Mısırın yaşam döngüsünü sağlayabilmesi için topraktaki pH değeri de önemlidir (Lizárraga-Paulí ve ark., 2011). Mısır bitkisi üzerinde genotip çalışmalarının en çok yapıldığı bitkilerin başında gelmektedir.

Yapılan tarihsel araştırmalar ve çalışmalar neticesinde mısırın en eski kalıntıları Meksika'nın Tehuacan vadisinde bulunmuştur. Mısırın tarihinin 8.000 ila 10.000 yıla dayandığı tespit edilmiştir. Dünyada mısır bitkisi hem tüketim hem de endüstriyel amaçla kullanılmaktadır. Türkiyede en fazla yetiştirilen 3. tarım ürünü olmakla beraber dolaylı ve doğrudan 4.000 civarında farklı ürün türü olduğu bilinmektedir (1000ciftci1000bereket, 2021). Dünya nüfusunun artması ve tarımsal arazilerin azalması gıdaya erişim konusunda bazı sıkıntılara yol açmaktadır. İnsanların gıdaya kolay erişebilmesi ve artan nüfusa yetecek kadar gıdanın üretilmesi konusunda çalışmalar yoğun olarak yapılmaktadır. 1970'li yıllardan itibaren dünyada ve Türkiye'de mısır üretimi artarak devam etmektedir. Bu artışın nedenlerinden ikisi 1980'li yıllardan itibaren

kullanılmaya başlanan hibrit tohumun üretim aşamasında uygulanan yeni teknikler ve politikada yapılan değişikliklerdir.

Mısır bitkisinin birçok alanda kullanımı mevcuttur; taze tüketim, konserve, mısır unu, mısır nişasta, cips, çerez, hayvan yemi, yağ, tatlandırıcı, şekerleme, çikolata, bebek mamaları, soslar, mısır şurubu, etanol, temizlik malzemesi gibi bir çok alanda kullanımı mevcuttur. Mısırın bu kadar tüketilmesi ekonomik bir değerdir. Enerji Piyasası Düzenleme Kurulunun 27 Eylül 2011 tarihinde çıkardığı yönetmelikte 2013 yılından itibaren başlayarak %2 oranda, 2015 yılından itibaren de her yıl %1 oradan artmak kaydıyla benzinde biyoetanol karışımının bulunması ve bunun yurt içinde bulunan kaynaklardan sağlanması zorunluğu mısırdaki endüstriyel kullanımı direkt olarak etkilemiş ve mısır açısından yeni bir pazar alanı doğmuştur. Türkiye’de mısır üretiminin çok olması ihracatın da olumlu yönde etkilenmesine neden olmuştur. Mısır ihracatında arasıra dalgalanmalar görülsede yem piyasasındaki talep özellikle Ortadoğu ülkelerinin Türkiye ile yaptığı mısır ve mısır türevleri ihracatı bu konudaki ticaretin gelişimine katkı sağlamaktadır (Bayramoğlu ve Bozdemir, 2018).

Mısır bitkisinin Türk mutfağına girişinin 1600’lü yıllarda Suriye üzerinden olduğu bilinmektedir. Osmanlı İmparatorluğu döneminde avrupalı tüccarlar tahıl ve tohum alışverişlerini Türk veya Araplar ile yapmışlardır. Bu ticaret, mısırın avrupaya girişini sağlamış isminin İtalyanlar tarafından “Grano Turco” (Türk tohumu) ve Fransızlar tarafından ise “Bléturc” (Türk buğdayı) olarak konulmasına yol açmıştır. Bu yıllarda mısırın ülkemize girmesi ile hem saray mutfağında hem de halk mutfağında mısırın yaygın olarak kullanıldığı, özellikle ekmek olarak tandırda pişirilerek tüketildiği bilinmektedir. Bazlama, mısır ve buğday ununun karıştırılması ile elde edilen ve ülkemizde yaygın olarak yapılan bir ekmek çeşitidir. Mısır ununun kullanımı tüm Anadolu coğrafyasında yaygın olsa da Karadeniz Bölgesi'nde üretimin fazla olması sebebiyle daha revaçtadır ve mısır unu denilince akla ilk gelen bu bölge olmaktadır. Karadeniz Bölgesinde mısır unu birçok amaçla kullanılmaktadır. Özellikle balık kızartma, muhlama, kuymak, çorba çeşitleri, et yemekleri ve çeşitli soslarda kullanımı yaygındır (1000ciftci1000bereket, 2021). Ülkemizde olduğu gibi Dünyada da mısır ile yapılan çok çeşitte yemek mevcuttur. Japonya'da yakitori usulü mısır,

Fransa'da mısır velouté, Latin Amerika'da mısır-peynir ve acı biberli empanada, Meksika'da peynir-biber ve limonlu mısır, mısır ve patatesli casserole (Arjantin). (1000çifti1000bereket, 2021).

Ülkemizde yetiştirilen mısır çeşitleri tatlı mısır, cin mısır, sert mısır, at dişi mısırdır. Ülkemizde üretimi yapılan ve ekonomik getirisi yıldan yıla artmakta ve dikkat çekmekte olan mısır bitkisinin %35'i insani gıda, %30'u hayvan yemi, %20'si hammadde, %10'u içerdiği glikoz ve nişasta miktarından dolayı sanayide, %5'i tohum olarak kullanılmaktadır. Mısır bitkisinin uygun koşullarda yetiştirme süresi 120 ile 180 gün civarındadır. Mısır bitkisi 4 ay gibi sürede 2,5 ila 4,5 metre boyuna ulaşmakta ve 600 ila 1000 kadar tohum üretmektedir. Mısırın en önemli özelliklerinden biri koçan etrafında bulunan yaprakların C3, diğer kısımlarda bulunan yaprakların C4 bitkisi özelliği göstermesidir. Diğer tahıl bitkileri ile kıyaslandığında güneş ışığı ve karbondioksit daha çok ihtiyaç duymaktadır, geniş yapraklarından dolayı en çok fotosentez yapan tahıldır (Öztürk, 2017). Endosperm yapısına göre 5 farklı mısır çeşidi vardır. Bunlar; patlak mısır (*Zea mays everta*), çakmak taşı mısır (*Zea mays indurata*), göçük mısır (*Zea mays intendata*), unlu mısır (*Zea mays amylaceae*) ve şeker mısırı (*Zea mays saccharata*) olarak bilinmektedir. Mısır tohumu, kurutmaya ve düşük sıcaklıklara toleranslı, optimum koşullarda birkaç yıl süre ile depolanabilen ve nem içerikleri düşük olan tohumlardandır (Macar, 2017). Bir mısır tanesinde % 70 nişasta, % 10 protein, % 5 yağ, % 2 şeker, % 2 kül, vitamin A ve pentozanlar bulunmaktadır. Mısır üretiminin artırılması için ekim yapılacak bölgenin ekolojik koşulları, çevresel faktörlere dayanıklı çeşidin seçilmesi ve kaliteli tohum kullanımı çok önemlidir. Türkiye'de iklim koşullarının uygun olmasından dolayı birçok bölgede mısır üretilmektedir. Çevresel faktörler (kuraklık, tuzluluk, yüksek sıcaklık vb.) dünya genelinde ve ülkemizde mısırın verimini etkileyen en önemli etkenlerin başında gelmektedir. Mısır bitkisinin gelişim sürecinde özellikle çiçeklenme zamanı ortaya çıkan kuraklık stresinin çok ciddi kayıplara yol açtığı bilinmektedir (Kılınç, 2016).

Mısır bitkisi hakkında yaptığımız literatür taraması, mısır bitkisine dair yapılan araştırmaların genellikle genom ve morfolojik çalışmalar hakkında olduğunu göstermiştir. Mısırdaki stres, programlı hücre ölümü ve mikrotübüller üzerine araştırmaların ise oldukça kısıtlı ve hatta yetersiz olduğu için bu

çalışma; mısır bitkisinde stres ilişkili PHÖ süreci üzerine ve aynı zamanda PHÖ ve mikrotübül dağılımı arasındaki ilişkinin anlaşılmasına ve aydınlatılmasına önemli derecede bilimsel katkı sağlayacaktır.

1.2 Abiyotik Stres

Bitkiler yaşadıkları ortamda birçok stres faktörü ile karşı karşıya kalırlar. Bu stres faktörleri; tuzluluk, UV ışını, sıcaklık, su, ışık vb. durumlardır, bu stres faktörleri PHÖ sürecinin başlamasına neden olmaktadır (Petrov ve ark., 2015). Yaşadıkları ortamda bitkileri olumsuz olarak etkileyen her türlü biyotik ve abiyotik durum bitkilerde stres olarak kabul edilmektedir. Bitki herhangi bir stres faktörü ile karşılaştığında hücrelerinde bir takım bozulmalar başlar, bu bozulmalardan dolayı bitkinin organları hasar görür, bitki verimsizleşir ve hatta ölebilir (Aydın ve Atıcı, 2016). Bitki hücrelerinin yaşadıkları stres düzeyine göre verecekleri tepkiler farklıdır. Stres düzeylerine göre; az stres hücre onarımını, orta stres ise PHÖ başlatır (Sychta ve ark., 2021). Literatürde ki yapılan bir çok çalışmaya bakıldığında stresin PHÖ'ye neden olabileceği anlaşılmaktadır.

İnsanların dünyaya verdikleri olumsuz zararlar iklimlerin değişmesine neden olmuş ve iklim değişiklikleri bitkiler de stres kaynaklı olumsuz durumlara yol açmıştır (Petrov ve ark., 2015). Mısır bitkisi hakkında literatürde yapılan çalışmalara bakıldığında su stresi ve kuraklık stresi mısırın sürgün boyunda önemli değişikliklere yol açtığı tespit edilmiştir. Kuraklık stresinin bitkilerde başka stres türlerini de tetiklediği yapılan gen mikrodizileri yoluyla tespit edilmiştir (Ahanger ve ark., 2017) Stres bir çok genle kontrol edilen süreç olduğu için dayanıklı mısır çeşidi geliştirilmeye çalışılsa da istenilen aşamaya gelmemiştir. Bitkinin stres faktörlerine yeterli tepkiyi vermesi bitkinin durumuna bağlıdır (Aydınoğlu ve Akgül, 2021).

Bitkileri strese sokan bir diğer unsur olan tuz, araştırma konumuz olarak seçilmiştir. Stres faktörlerinden biri olan tuz, bitkiyi strese uğrattığında bitkinin ilk olarak değişikliğe uğrayan yeri yapraklarıdır. Yapraklarda stresten kaynaklı yaşlama artarken bu durum bitkinin yaprak yenileme hızını olumsuz etkilemektedir. Bu durumda bitki hayatına devam edemez ve tohum üretemez. Bitkinin sağlıklı bir şekilde gelişimine devam etmesi için ölümü gerçekleştiren

yapraktan daha fazla yaprak üretmesi gerekir ki fotosentez işlemi gerçekleşsin ve tohum üretmeye devam etsin (Köseoğlu, 2019). Tuz stresi bitkinin biyokütlesine negatif etki yapmakta, tuzlu su protein üretimi ile fotosentez konusunda bitkinin geride kalmasına, kuvvetsiz tohumun yeşillenmesine ve bitkinin gelişmesinde verimsizliğe sebep olmaktadır (Ali ve ark., 2021). Literatür çalışmaları tuz stresine dayanabilen bitkilerin varlığını tespit etmiştir. Bu bitkiler gliofitler ve halofitler olarak 2 ayrı grup olarak incelenmektedir. Glikofitler, halofitler kadar olmasa da tuz stresinin etkilerine cevap verebilen bitkilerdir. Halofitler ise 300-400 mM kadar yoğun tuz içeren topraklarda yaşam döngülerini devam ettirebilmektedir (Sönmez, 2019).

Buğday bitkisinde tuz stresinin olumsuz etkilerini ortaya çıkarmak için yapılan çalışmada tuzdan kaynaklı olarak buğdayın çimlenme oranı %21, fide boyu %42,5, kök uzunluğu ise %74,4 oranında azalma olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Bitkilerin hassas genotiplerde tuza karşı oluşturduğu tolerans seviyesi 50-75 mM kadar, dayanıklı genotiplerde ise 125-150 mM olarak tespit edilmiştir. Yapılan araştırmalar neticesinde 17 farklı mısır çeşidinin 150 mM dan sonra ki tüm seviyelerde ciddi şekilde etkilendiği tespit edilmiştir (Aydınoğlu ve Akgül, 2021).

Bitkide tuz stresinden kaynaklı ozmotik potansiyelde değişimler meydana gelir ve bitki kök dokusu hücreleri aracılığıyla gerekli mineralleri ve suyu topraktan alamaz bu durum bitkinin gelişiminin olumsuz olarak etkilenmesine neden olur (Çiçek ve Çakırlar 2002). Yapılan bir çalışma tuza maruz kalan bitkinin gelişmeye devam etmesi ve maruz kaldığı tuza karşı dirençli cevap verebilmesi için kökleri aracılığıyla su ve iyon emilimi yapmaya devam etmesinin önemini ortaya çıkarmıştır. Bitki tuz stresi şartları altında güneş enerjisini fotosentez için kullanamaz (Carrasco-ríos ve Pinto, 2014). Mısır bitkisini 25 mM tuz seviyesi ciddi anlamda etkiler, mısır bitkisinin gelişimi engellenir ve büyüme yavaşlar. Mısır bitkisinin tuz stresine maruz kaldığı süre çok önemlidir. Kısa süre maruz kalırsa büyüme ozmatik stres nedeniyle olumsuz olarak etkilenir. İleri evrede, mısır bitkisinin kökünde tuz stresi kaynaklı sodyum birikmesi meydana gelir bu durum ozmatik potansiyeli etkiler ve düşürür, böylece tohum yeteri kadar su emilimi yapamaz ve zamanında çimlenme gerçekleşmez (Farooq ve ark., 2016).

Bitkide tuz stresinin etkileri bir çok yerde görülür. Metabolik aşamalarda denge kaybı görülür, oksidatif stresle beraber aşırı ROS oluşumu başlar ve bitkide ozmotik stres ve iyon toksisitesi gerçekleşir. Ozmatik stres bitkinin köklerinde ki kapasiteyi düşürür bu durum bitkinin topraktan gerekli olan suyu alamamasına ve kaybolan suyu yerine koyamamasına neden olur. İyon toksisitesinde ise bitkide Na^+ ve Cl^- iyonları birikir, bu birikim bitkinin fotosentetik bileşenlerini etkiler ve bitkinin hücrelerinde kontrolsüz ve aşırı ROS birikmesine neden olarak hücre ölümüne sebep olur. Oksidatif stres şartlarının negatif durumunu olumluya çevirmek için bitkiler enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar kullanırlar (Akyol ve ark., 2020). Bitkiler tuz stresine karşı durabilmek için biyokimyasal mekanizmalar geliştirir. Bu mekanizmalar; seçici biriktirme, iyon alımının kökler tarafından kontrollü yapılması, hücre seviyesindeki iyonların bölümlere ayrılması, çözünen maddelerle sentez, fotosentetik değişiklik, zar yapısının değişmesi, antioksidatif enzimlerde değişiklik ve bitki hormonlarının indüksiyonlanmasıdır. Bitkide iyon alımının yapılması ve alınan iyonların bölümlendirilmesi sınırlı bir seviyeye kadar işe yaramaktadır, çünkü bitkinin stres koşullarında büyümeye devam etmesi iyon dengesini bozmaktadır. Tuz stresinin etkisi türe göre değişiklik göstermektedir. Tuz toleransına dayanıklı olan euholafit bitkilerinin yetiştiği yerler genelde yüksek tuz miktarlarının bulunduğu yerlerdir. Bitkiler, tuzun olumsuz etkilerine karşı metabolik reaksiyonlar başlatırlar ve bu reaksiyonlar sitoplazmadaki enzimlerin bozulma ihtimaline karşı tuzları vakole pompalar. Bu durum bitkide ki verimliliği artırır. *Atriplex triangularis* bitkisi bu şekilde metabolik reaksiyon başlatan bir bitki türüdür, tuz stresine karşı toleransını arttırmak için kendisinde bulunan tuzları protoplazmada biriktirerek hücre ozmatik potansiyelini negatif tutar (Korkmaz ve Durmaz, 2017). Akay ve ark., (2019)'nın yaptığı bir çalışmada; tuz seviyesi arttıkça kök uzunluğunun negatif etkilendiği ve karşılaştırma yapıldığında bu oranın %82'yi bulduğu, tuz seviyesi yükseldikçe çimlenme oranında da azalma olduğu, tuz seviyesi arttıkça fide gücünün ve kök ve gövde oranının da azaldığı ortaya konulmuştur.

Günümüzde stresin etkilerinin azaltılması yönünde yapılan çalışmalar artmaya başlamıştır Lizárraga-Paulí ve ark., (2011)'nin yaptığı deneysel çalışmada polisakkarit olan kitosanın bazı türlerde ve mısır bitkisi üzerinde stres

şartlarında bitkinin normal şekilde gelişmesini ve hastaliksız büyümesini desteklediği görülmüştür. Ekonomik ve çevre dostu olan Rizobakteriler mısır bitkisinin gelişimi ve veriminin yükselmesinde çok faydalıdır. Mısır bitkisi başta olmak üzere buğday, pirinç gibi bakliyat olmayan ürünlerin gelişiminde de fayda sağladığı tespit edilmiş rizobakterilerin mısır bitkisinin tuz stresi şartlarında çimlenme hızı ve oranında negatif olan tüm durumları pozitif olarak değiştirdiği tespit edilmiştir (Ali ve ark., 2021). Biyokömür ile mısır bitkisi üzerine yapılan deneysel çalışmada tuz stresini azalttığı ve mısır bitkisinin gelişimini olumlu anlamda etkilediği görülmüştür. Mısır bitkisi stress koşullarında topraktan yeterli minarelleri alamamaktadır fakat biyokömürün bu olumsuz durumu olumlu yönde değiştirdiği görülmüştür (Soothar ve ark., 2021).

Patojen saldırısında birçok bitki türü Salisilik Asit (SA)'i bitkinin patojene karşı savunulmasında kullanır (Szalai ve ark., 2005). Salisik Asit uygulanan iyileştirme sonucunda mısır bitkisinin tuz stresine karşı da tolerans gösterdiği ve klorofil değerinin yükseldiği ortaya çıkarılmıştır (Fahad ve Bano, 2012). Toprakta bulunan ve bitkiler için önemli bir bileşen olan Silikon (Si) ise tuzluluk, sıcaklık, metal gibi stress faktörlerinin olumsuz etkilerini etkisiz hale getirmektedir. Tuz stresi konusunda yapılan çalışmalar da silikonun arpa, ıspanak, pirinç, domates, mısır, asma ağacı ve salatalık bitkilerindeki iyileştirici etkileri bildirilmiştir (M. Ali ve ark., 2021). Wang ve ark., (1999)'a göre *Hordeum vulgare* L. bitkisinde yapılan tuz stresi ve ozmotik strese karşı anter ön iyileştirme çalışmalarında mikrosoporların açlık ve ozmotik strese karşı direnç göstererek bu şartları ortadan kaldırdığı görülmüştür.

Bu iyileştirme çalışmalarına ek olarak stres mekanizmasının anlaşılabilir olarak kayıpların önüne geçilmesinde önem arz eder, o nedenle bu konu üzerine yapılacak olan çalışmaların planlanması önemlidir. Bu önem gözetilerek araştırma konumuz ve amacımız belirlenmiş, stres - PHÖ - mikrotübül organizasyonu değişimi ilişkisinin irdelenmesi hedeflenmiştir.

Yapılan çalışmalar bitkilerin stres koşullarında bir takım morfolojik değişikliklere uğradığını göstermektedir. Bitkinin strese uğramasını sağlayan faktörlerin değiştiği ve bitkinin genellikle birden çok stress faktörü ile başa çıktığını göstermektedir. Araştırma konumuz olan tuz stresi, mısır bitkisi

üzerinde bir çok olumsuz duruma yol açmaktadır, bu olumsuz durumlardan biri olan PHÖ bu çalışmada derinlemesine incelenecektir.

1.3 Programlı Hücre Ölümü

Programlı hücre ölümü (PHÖ), yapısı itibari ile kontrol edilebilen ve fizyolojik olan bir mekanizmadır. Bitkinin yaşam döngüsü devam ettiği sürece PHÖ görülmektedir (Rocha ve Hernandez, 2017). Literatüre PHÖ terimini kazandıran ilk kişi Richard Lockshin'dir ve bu terimi ilk defa 1960 yılında kullanmıştır (Zamyatnin, 2015). Bitkilerde PHÖ'yü ayırt edici özellikler; DNA'da parçalanma meydana gelmesi, vakuolizasyonun oluşması, proplast ile çekirdeğin bozulması, hücrelerde kromatin yoğunlaşması şeklinde sıralanabilir (Sychta ve ark., 2021). Literatüre bakıldığında bitkilerin yaşamları boyunca maruz kaldığı nekrotik hücre ölümü ve vakuolar hücre ölümü olmak üzere 2 farklı ölüm vardır. Nekrotik hücre ölümü, bitkinin ansızın ve çok yoğun stres şartlarına maruz kaldığı zamanlarda gerçekleşebilir ve patolojiktir. Vakuoler hücre ölümü ise bitkinin yaşadığı stres şartları yanısıra gelişmeye devam etmesi aşamasında da gerçekleşebilir ve fizyolojiktir (Gölge, 2018). Bitkilerde gerçekleşen PHÖ'nün ayırt edilmesinde sistein kaspazlar aynı aktiviteye sahip proteazlar, papain benzeri sistein proteazlar ve vakuolar işleme enzimleri, önemli biçimde yer alırken PHÖ'yü ani ölüm olan nekrozdan ayıran testler olarak TUNEL testi, COMET testi, kaspaz benzeri aktivite enzim analizi testleri uygulanır. TUNEL testi ile PHÖ'nün yaygın bir sonucu olan nükleozamlar arası parçalanma tespit edilebilmektedir (Petrov ve ark., 2015). PHÖ süreci bitkinin gelişim aşamalarında önemli bir yere sahiptir. Dokunun ve organların gelişimi, embriyo kesesinde yer alan hücrelerin döllenme aşaması ve gelişimleri, tohum oluşturulması, tohumun dışında bulunan tohum tabakası, anter açılması ve birçok gelişim aşaması PHÖ'ye uğrar ve tüm bu aşamalar düzenli bir şekilde gerçekleşir. Gelişimsel olarak ortaya çıkan PHÖ'ye verilebilecek diğer bir örnek tek eşeyli çiçeklerin oluşumudur (Gunawardena, 2008).

Tuz stresi ile başlayan PHÖ'nün en belirgin özelliğinin hızlı bir şekilde ilerlemesidir. Bunun nedeni iyon dengesizliğinden kaynaklı olarak sodyumun sitozole girmesidir. Fotosentetik olmayan bitkilerin tuzdan kaynaklı yaşadığı PHÖ sürecinde en önemli yer mitokondridir ve bu durumun en temel sebebi

ROS (reaktif oksijen türleri)'un mitokondride üretiliyor olmasıdır. Bitkide aşırı şekilde ROS üretimi gerçekleşirse bitkinin yaşama ihtimali güçsüzleşir (Petrov ve ark., 2015). ROS, bitkinin yaşam döngüsünü pozitif yada negatif şekilde etkiler ve PHÖ sürecinde önemli yere sahiptir (Aydınoglu ve Akgül, 2021; Choudhury ve ark., 2017; Rocha ve Hernandez, 2017).

Programlı hücre ölümü bitkinin yaşam döngüsünün devamı için önem arz etse de stres koşullarında bitkiye ciddi zarar veren bir sürece dönüşebilir. Bu süreç hakkında literatürde yeterli araştırma çok az olmakla beraber bu sürecin mikrotübülleri nasıl etkilediği hakkında bilgi ise neredeyse yok denecek düzeydedir. Bu çalışmada PHÖ ve mikrotübül dağılımı arasında ilişki detaylandırılacaktır.

1.4 Mikrotübüller

Dinamik yapılar olan mikrotübüller, dönüşebilen mükemmel donanıma sahip yapılardır (Mollinedo ve Gajate, 2003). Mikrotübüller hücre içindeki hareketin sağlanması, hücre içinde taşıma, çoğalma gibi çeşitli hücreysel görevlerde önemli rolleri olan dinamik bileşenlerdir. Antimitotik ve proapoptotik etkilerinden dolayı en yararlı kemoterapötik sınıflardan bir tanesidir (Borowiak ve ark., 2015). Mikrotübüller silindirik polimerlerdir. Bir mikrotübül ortalama 21 nm çapındadır ve 10 µm'ye kadar uzayabilmektedir. Mikrotübüller çapraz köprü oluşturmak ve etkileşime girebilmek için üst üste gelebilmektedirler. Mikrotübüller, yeni oluşan bitki hücrelerinin çekirdeklerinde yoğunlaşan kromatin etrafında demet şeklini almış olarak görülürler. Mikrotübüller sitokinetik yapının bir parçasıdır ve mikrotübüller aktif taşınma ve sitoplazmik akışta görev alırlar. Mikrotübüller dört ayrı grupta incelenmektedir; kortikal, ön faz bandı, fragmoplast ve mitotik iğ. Kortikal mikrotübüller bitkiler için çok önemlidir; bitkinin morfogenezini ve hücre bölünme eksenini etkilerler. Bitki mikrotübülleri embriyo, gelişme, organ oluşumu ve stomatal hareket dahil bir çok önemli işlev için gereklidir ve bitkinin organizasyonel durumu ile bağlantılıdır. Plazmoliz, mikrotübül hücre iskeletinin bütünlüğünü ve görüntüsünü yok eden önemli durumlardan biridir (Lü ve ark., 2007). Lü ve ark., (2007) tarafından mısır bitkisinin kökleri üzerinde yapılan deneysel çalışmada absisik asit kullanılarak immünofloresan

boyama ile immünosorbent testi uygulanmış ve sonuç olarak absisik asitin ozmotik strese yol açarak mısır bitkisinin köklerinde mikrotübül dinamiğini değiştirdiği tespit edilmiştir. Blancaflor ve ark., (1998)'nin yaptıkları deneyde mısır bitkisinin köklerinin alüminyum stresine maruz bırakıldığında mikrotübüllerin duyarlılıklarının azaldığı ve dizilimlerinin bozulduğu tespit edilmiştir. Alüminyum muamelesi sonucu stres belirtileri gösteren mısır bitkisinin kökleri floresan mikroskobu ile incelenmiş ve mikrotübüllerin iç kortekste, dış kortekste ve epidermiste tekrardan organize olmalarının engellendiği tespit edilmiştir. 50 mM alüminyum stresine maruz bırakılan mısır köklerinde immünoflorasan görüntülerine bakıldığında kortikal mikrotübüllerin hücrelerde mısır köküne dik olarak uzadığı görülmüş, 2 saatten sonra kökteki mikrotübül organizasyonu değişmeye başlamış ve üçüncü saatte kökten 4 - 5 mm uzaklıkta rastgele organize ve eğik bir şekilde oldukları tespit edilmiştir. Konsantrasyonun artması ile birlikte mikrotübüllerdeki değişiklik devam etmiştir. Mikrotübüllerin morfogenezde rolleri olduğu gibi hücre iskeletini korumak gibi önemli görevlerinin de oldukları bilinmektedir. İmmünolokalizasyon sonuçlarına bakıldığında antimikrotübül ilaçların stomalarda bulunan hücre iskeletini bozduğu görülmüştür (Marcus ve ark., 2001). Mikrotübüller ile ilgili son araştırmalardan bazıları mikrotübül ile ilişkili proteinlerin bulunmasıdır, bu proteinler mikrotübüllerin bitkilerde düzenlenmesi için gereklidir (Wasteneys, 2002).

Dinamik bir yapı olan bitkideki kortikal mikrotübüller yapısal özellikleri ile tek polimerlerdir ve devamlı yıkılırlar, sonra yeniden inşa olurlar ve yeniden konumlandırılırlar. Kortikal mikrotübüllerin hücre korteksinde hangi vakitte, hangi yerde ve ne şekilde göründüklerinin kurulum dinamikleri aracılığı ile kontrol edilerek düzenlendiği görülmüştür. Sitoplazmik akışın kontrol edilmesi için kortikal mikrotübüller ayrıcalıklı bir konumda bulunurlar ve böylece hücre duvarının yönetilmesi konusunda etki uygularlar (Aytürk, 2016). Bitkinin gelişimi boyunca kortikal mikrotübüller, çeşitli ajanlar, depolimerize edici ilaçlar ve etilen gibi etkenlerden etkilenir (Muratov ve Baulin, 2015).

Bitkilerin hücre içindeki dönüşümlerinde mikrotübüller önemli bir yere sahiptir. Stres dışında farklı bir çok etken mikrotübül organizasyonunu etkileyebilmektedir. Örneğin simbiyotik ve patojenik olmayan mantarların bitki

hücrelerinde bulunan mikrotübüllerin dizilimlerini değiştirdikleri bilinmektedir (Uetake ve Peterson, 1998). Birçok virüs viral proteinlerini, nükleik asitlerini ve virüs parçacıklarını etkili bir şekilde taşımak için bitkideki mikrotübül hücre iskeletini ele geçirmektedir. Bitkilerde nadir de olsa mikrotübül virüslerine rastlanır, bunun en iyi örneği mozaik virüsü ile tütün bitkisinin hareket protein arasındaki etkileşimdir, virüsün yayılmasında mikrotübüllerin ve aktin filamentlerin etkili olduğu düşünülmektedir (Martinière ve ark, 2009).

Yukarıdak özetlenen çalışmaların sonuçlarından yola çıkarak bu çalışmanın temel amacı; 50 mM,100 mM, 300 mM ve 500 mM tuz konantrasyonuna sahip solüsyonlar ile strese maruz bırakıldığında mısır (*Zea mays* L.) bitkisinin stres sonucu gördüğü hasarın ve uğradığı değişikliklerin ortaya konulmasıdır. Bu stres uygulamaları nedeniyle bitkide oluşan tepkiyi veya değişimi ortaya çıkarmak amacıyla TUNEL analizi ile PHÖ'ye uğrayıp uğramadığı tespit edilmiş ve literatürde çok yeni bir kavram olan PHÖ – stres - mikrotübül organizasyonu değişimi belirlenmiştir. Mikrotübül Etiketleme Analizi ile birlikte PHÖ ve mikrotübül düzeni arasındaki ilişkinin detaylarını da ortaya konulmuştur. Bu çalışmanın konunun anlaşılmasına ve daha sonraki araştırma konularının belirlenmesine fayda ve katkı sağlayacaktır.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 Bitki Materyali

Bu tez kapsamında inceleme yapılan materyal Poaceae (Buğdaygiller) familyasına dahil olan monoik mısırdır (*Zea mays* L.). Mısır bitkisinin alem, bölüm, tür gibi sınıfsal bilgileri aşağıdaki gibidir (Köseoğlu, 2019).

Alem:	Plantae
Bölüm:	Magnoliophyta
Sınıf:	Liliopsida
Takım:	Cyperales
Aile:	Poaceae
Cins:	<i>Zea</i>
Tür:	<i>Zea mays</i>

Tez kapsamında yapılan laboratuvar ve floresan mikroskobu çalışmaları büyük oranda Maltepe Üniversitesi Gastronomi - Biyoloji Laboratuvarı'nda, çalışmanın diğer bir bölümü Maltepe Üniversitesi Kanser ve Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi (MÜKKAM)'nde ve Marmara Üniversitesi, Fen - Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nün bünyesinde yer alan Genel Biyoloji Araştırma Laboratuvarı'nda yürütülmüştür.

Araştırma, mısır bitkisi tohumları kullanılarak laboratuvar koşullarında beş grup üzerinde ve herbir gruba üç tekrarlı deneme şeklinde yürütülmüştür.

Tablo 2.1: Tuz stresi oluşturma uygulaması için kullanılan solüsyonların tuz miktarları.

Gruplar	1. grup	2. grup	3. grup	4. grup	5. grup
Tuz konsantrasyonu	Kontrol (0 mM)	50 mM	100 mM	300 mM	500 mM
Tuz ile muamele süresi			15 dakika 30 dakika 1 saat 2 saat 6 saat 12 saat 24 saat		

Tablo 2.2: Işık mikroskobu için parafine gömme analizinin aşamaları, kullanılan çözeltiler ve süre/sıcaklık.

Uygulama	Çözelti	Süre/Ortam sıcaklığı
Dehidratasyon	%80 alkol	30 dk
	%96 alkol	30 dk
	%100 alkol	30 dk x2
Şeffaflaştırma	%100 alkol: ksilol (2:1)	30 dk
	%100 alkol: ksilol (1:1)	30 dk
	%100 alkol: ksilol (1:2)	30 dk
	Ksilol	30 dk x3
Parafin infiltrasyonu	Ksilol: parafin (1:1)	24 saat 56°C'de etüvde
	Parafin	24 saat 56°C'de etüvde
	Parafin	24 saat 56°C'de etüvde
Deparafinizasyon	Ksilol	10 dk x2
	Ksilol: %100 alkol (2:1)	10 dk
	Ksilol: %100 alkol (1:1)	10 dk
	Ksilol: %100 alkol (1:2)	10 dk
	%100 alkol	10 dk x2
	%96 Alkol	10 dk
	%70 Alkol	10 dk
	%50 Alkol	10 dk
	%35 Alkol	10 dk
Distile su	10 dk	

2.2 Floresan Mikroskobu Çalışmaları

Floresan boyama uygulamaları, programlı hücre ölümü (PHÖ) tespiti için uygulanan DAPI ve TUNEL analizi sonuçlarının ve mikrotübül proteinlerinin gösterilmesi için kullanıldı.

2.2.1 Parafin yöntemi

Mısır (*Zea mays* L.) bitkisinin tuz stresine maruz bırakılan ve 1,5 cm olan kökleri FAA (formalin -asetik - alkol) fiksativisi ile fikse edildi ardından % 70 alkolde saklandı. Bu aşamadan sonra % 70 alkoldeki mısır köklerine parafine gömme yöntemi uygulanarak 3-4 µm boyutunda kesitler alındı. Elde edilen kesitlere kullanılacak yöntem uygun boyalar ile boyama işlemi yapılarak floresan mikroskop gözlemleri yapıldı.

- FAA (formalin -asetik - alkol); 35 ml distilite su içerisine : 50 ml etil alkol, 5 ml glasiyel asetik asit, 10 ml formaldehit (% 37 - 40) eklenerek hazırlandı
- 0.025 M fosfat tamponu (pH 7):
- 22.6 ml 0.1M NaH₂PO₄.2H₂O (sodyum dihidrojen fosfat) ve 77,4 ml 0.1M Na₂HPO₄.7H₂O (sodyum hidrojen fosfat) eklenerek 200 ml distile su ile tamamlanır.

2.2.1.1 Saklama koşulu

Fiske edilen mısır kök dokusunun 24 saat süresince havası alınır. Hava alma işlemi tamamlanan mısır kök dokusu aşamalı olarak % 100, % 96, % 80 etil alkol içinde en az 1 kere , %70 etil alkol içinde en az 2 kere çakalandı ve % 70 alkol içinde buzdolabında +4⁰C de saklandı.

2.3 Moleküler Yöntemler

2.3.1 DAPI (4-6-diamidino-2-fenilindol) analizi (Schweizer, 1976)

2.3.1.1 Lamellerin hazır hale getirilmesi

Lamlar kullanılmadan önce aseton ile çalkalandı ve 1 saat süresince daha önce hazırlanan 1 mg / ml poly-L - lysine konularak bekletildi. Bekletilen

lameller süzöldü ve ph 7.4 distilite su ile yıkanarak kuruması için 37⁰C'lik etüvde en az 1 gece bekletildi.

2.3.1.2 Parafin bloklarından kesit alınması

Floresan boya olan DAPI hücrede bulunan nukleusların boyanmasında kullanılmaktadır. DAPI boyasının uygulanması için tuz stresi ile muamele görmüş kökler kullanıldı. Tablo 2.2'de anlatılan şekilde parafine gömülen mısır kök dokusundan Leica RM 2125 RT el mikrotomu aracılığı ile 3-4 µm kalınlığında kesitler alınarak L- lysine ile kaplanmış olan lamlara konuldu. Alınan kesitler 40⁰C'lik ısıtma tablasında 24 saat süresince tutuldu ve kesitlerden parafini ayırmak için Tablo 2.2' de yer alan deparafinizasyon işlemi uygulandı.

2.3.1.3 DAPI boyasının hazırlanması

Stok çözelti: 1mg DAPI/ 1ml 0,05 M fosfat tamponu (pH 7.4) içinde çözölerek hazırlandı, - 20⁰C'de buzdolabında saklandı.

Boya: 1µg DAPI /1ml (1000 µg) stok çözelti.

Boyama Kesitlere parafinden kurtarma işlemi uygulandı ve sonra 30 dk karanlıkta 1µg /1ml DAPI ile boyama yapıldı. Preperatlar fosfat tamponunda çalkalandıktan sonra 1 damla gliserin jelatin damlatılarak kapatıldı ve floresan mikroskobunda 365 nm dalga boyunda incelendi. Nukleuslar mavi renkli floresan gösterir.

2.3.2 TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling:

İn situ uç işaretleme yöntemi) analizi

PHÖ sürecinde DNA'da gerçekleşen kırıkları in situ olarak gösterebilmek için TUNEL analizi uygulandı. 3-4µm kalınlığında alınan kesitler poly - L - lysine kaplı lamlara konuldu. Hazırlanan kesitler bir gece boyunca 37⁰C'ye ayarlanan etüvde bekletildi. Bir gece etüvde bekletilen kesitlere Tablo 2.3'de anlatılan TUNEL analizi uygulandı.

Lamellerdeki proteinlerin sindirilmesi için proteinaz K enzimi ile inkübe edildi. Lameller daha önce hazır edilen dengeleyici tampon ile yıkandı ve DNA parçalarının 3'OH uçları fluorescein işaretleli, dUTP'yi bağlayan TdT enzimiyle ve dUTP içeren bir reaktif ile muamele edildi. Doğru sonuçların elde

edilebilmesi için pozitif ve negatif kontrol hazırlandı. Bunun için daha süttten kesilesi 3 yada 5 gün olan sıçana ait meme dokusundan hazırlanan lameller kullanıldı. Negatif kontrol olarak hazırlanan lamellere TdT enzimi yerine ph 7.4 olan distilite su kullanıldı. TUNEL uygulanan kesitlerin üzerine tampon konularak lamel ile kapatıldı ve kesitler 490 nm dalga boyunda yeşil ışığa veren floresan mikroskobunda incelenerek fotoğraflandı.

Tablo 2.3: TUNEL analizi.

	Çözelti	Süre	sıcaklık
Deparafinizasyon	Ksilol	5 dk x3	
	%100 alkol	5 dk x2	
	%96 alkol	3 dk	
	%70 alkol	3 dk	
	Fosfat tamponu	5 dk	
Proteinlerin sindirilmesi	20 µg/ml Proteinaz K Yani 0.02 mg / 100 ml	15 dk	
	PBS	2 dk x2	
	Kurutma kağıdı	Lameli hafifçe vur	
	75µg/5cm ² dengeleme tamponu	30 dk	
	Kurutma kağıdı	Lameli hafifçe vur	
Digoxigenin işaretli dUTP bağlama	55 µg/5cm ² TdT enzim	1 saat	37 °C, nemli
	Durdurma - yıkama tamponu	10 dk	
	PBS	1 dk x3	
	Kurutma kağıdı	Lameli hafifçe vur	
	65 µg/5cm ² Anti digoxigenin conjugate	30 dk, nemli, karanlıkta	
	PBS	2 dk x4	

2.3.3 Mikrotübül Etiketleme Analizi

Mısır aıt hücrelerin hücre içi iskelet sistemi özellikleri belirlendi. Bu amaçla bu hücrelere ait mikrotübül proteinleri floresan boyama analiziyle görüntüledi ve kök dokusu kesitlerinde boyama yapıldı. FITC (flurescein - isothiocyanat) ile mikrotübüller işaretlenerek değişimleri takip edildi ve sonuçlar elde edildi. Gözlemler floresan mikroskop ile takip edildi; sitoplazma, çekirdek ve hücre çeperindeki mikrotübüllerin değişimi (ilişkisi, yerleşimi) üzerine veriler elde edildi.

Aseton ile çalkalanan lamalar kullanımdan hemen önce taze hazırlanmış 1 mg/ml poly-L-lysine çözeltisinde 1 saat boyunca bekletildi, çözelti süzöldü, lameller distile su ile yıkandı ve kuruması için 37⁰C'lik etüvde 1 gece bekletildi.

Tampon 1: % 3.7 paraformaldehid.

Tampon 2: % 1 Triton X - 100, 0.1 M PİPES, 2 mM EGTA, 1 mM MgS04 ve 0.4 M mannitol (pH 6.9).

Lamellerin Hazırlanması Tüm floresan işaretli uygulamalar sırasında DM LB2 model Olympus BX - 51 marka floresan mikroskobu kullanıldı.

PROTOKOL

Fiksatifte çalışma;

* fiksatif	(FAA)	1 saat	25 ⁰ C
vakumda			

Saklama;

* fiksatif	1 gece	+4 ⁰ C
* tampon1	30'	x1
* % 35 alkol	30'	x1
* % 50 alkol	30'	x1
* % 70 alkol	yıkama	x2
* % 70 alkolde saklanır	+4 ⁰ C	

Uygulama;

fiksatiften alınan ya da % 70 alkolde saklanmış materyal

* Tampon 1	30'	x1
------------	-----	----

0.4 M manitol içinde çözülmüş hücre çeperini sindiren enzimlerle muamele edildi

- * % 0.5 selülaz 25'
- * Tampon 1 5' x1
- * % 2.0 driselase 15'
- * Tampon 1 5' x1
- * % 1.0 cellulysin 15'
- * Tampon 1 5' x1
- * Poly-L-lysin ile kaplı lam lamel arasında ezildi

* Büyük parçalar tampon1 ile temizlendi

* Lamlar havada kurutuldu

- * Tampon 1 1' x3
- * Metanol 10' (-20 °C de soğutulmuş)
- * Tampon 2 30' x1
- * Anti - Tubulin antikoru 1saat (37°C, karanlık, nemli ortamda)

(1 µg IgG/20 µl tampon 2)

- * Tampon 2 1' x1
- * Fluorescein Goat Anti - Rabbit IgG 30' (37°C, karanlık, nemli ortamda) (10 µg IgG /240 µl tampon 2)
- * Tampon 2 2' x3

* Kontrol: PBS ile 1:10 seyreltme yapıldığında tubulin içeren yapıların boyanmadığı normal tavşan serumu kullanıldı.

- * *DABCO* (2 *DABCO*/98 *Tampon 2*).

(1.4-diazabisiklo-(2,2,2) oktan; Solmayı önler)

* Floresan mikroskopu gözlemleri yapıldı

Kesitler anlatıldığı gibi boyandıktan sonra 420 - 490 nm dalga boyunda floresan mikroskopunda incelendi ve fotoğrafları çekildi.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

Mısır kök dokusu hücrelerinde tuz stresi kaynaklı hücrel bozuklukların olup olmadığının anlaşılabilmesi için literatür çalışmalarının sonuçları gözetilerek ilk olarak mısır kök dokusu farklı tuz konsantrasyonlarına maruz bırakıldı; kontrol grubu (1. grup) ve sırası ile 50 Mm (2. grup) ardından 100 (3. grup), 300 (4. grup) ve 500 Mm (5. grup) olmak üzere beş grup oluşturuldu.

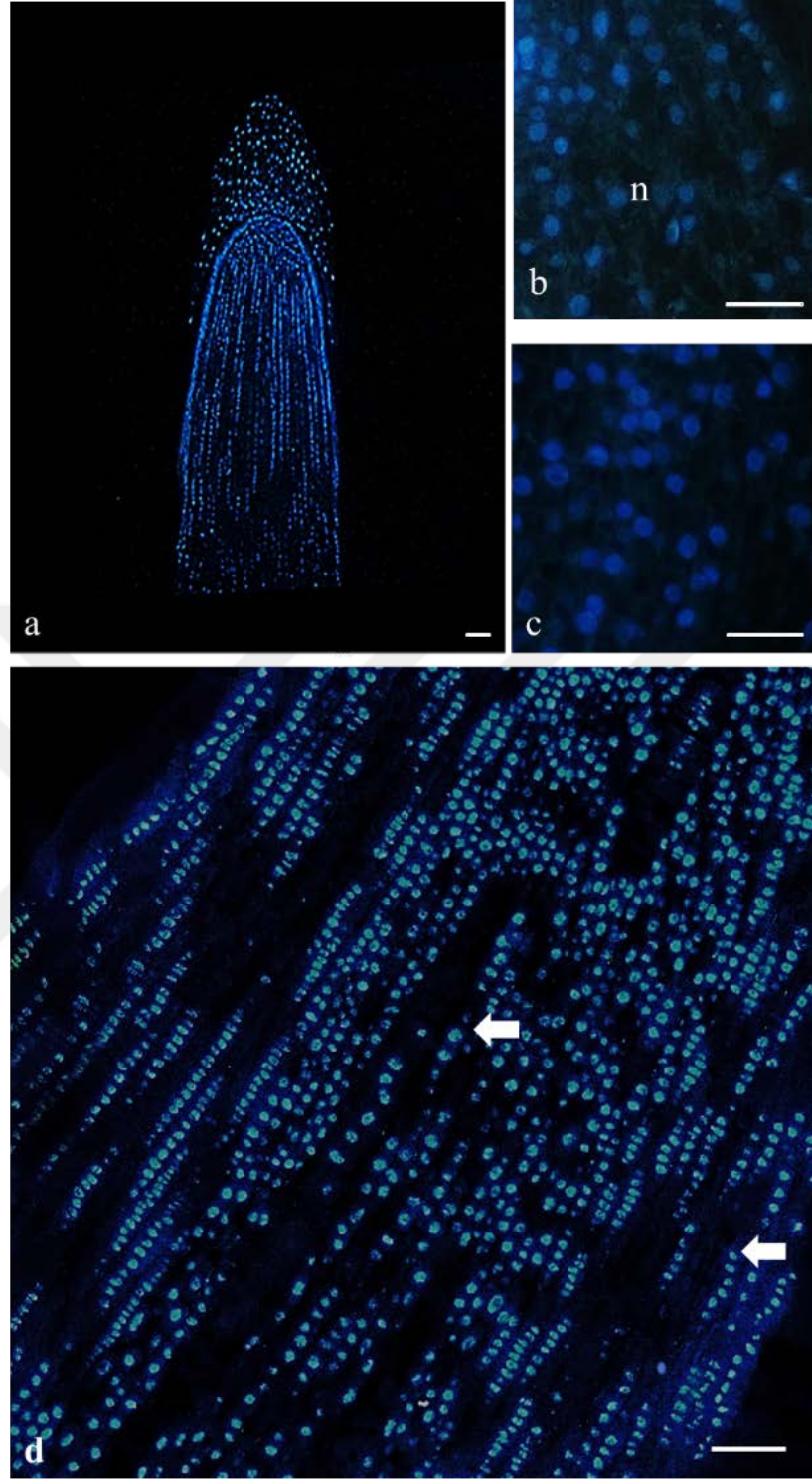
Bu beş grubun preparatlarına stres kaynaklı nukleustaki morfolojik değişiklikleri detaylandırabilmek için DAPI (4-6-diamidino-2-fenilindol) boyama uygulandı ve elde edilen görüntü analizlerinde bu doku hücrelerinde programlı hücre ölümü (PHÖ) belirtileri görüldüğünden dokulara TUNEL analizi uygulanarak mısır kök dokusu hücrelerinin PHÖ'ye uğradığı tespit edildi. Bu hücrelerde stres, dolayısıyla PHÖ kaynaklı mikrotobül değişimlerinin olup olmadığının tespiti için dokulara mikrotobül etiketleme analizi yapıldı ve tüm bulgular tartışılarak aşağıda sıralandı.

Tüm bu süreçte preparatlar floresan mikroskobu ile fotoğraflandı.

3.1 DAPI (4-6-diamidino-2-fenilindol) Boyama Bulguları

1.Grup bulguları

Kontrol olarak belirlediğimiz bu grupta, bitki kökleri sadece saf su ile muamele edildi. Hücrelerde DAPI boyamasının floresan mikroskop gözlemleri nukleus morfolojilerin büyük çoğunlukta düzgün bir küre şeklinde olduğunu gösterdi (Şekil 3.1a-c).

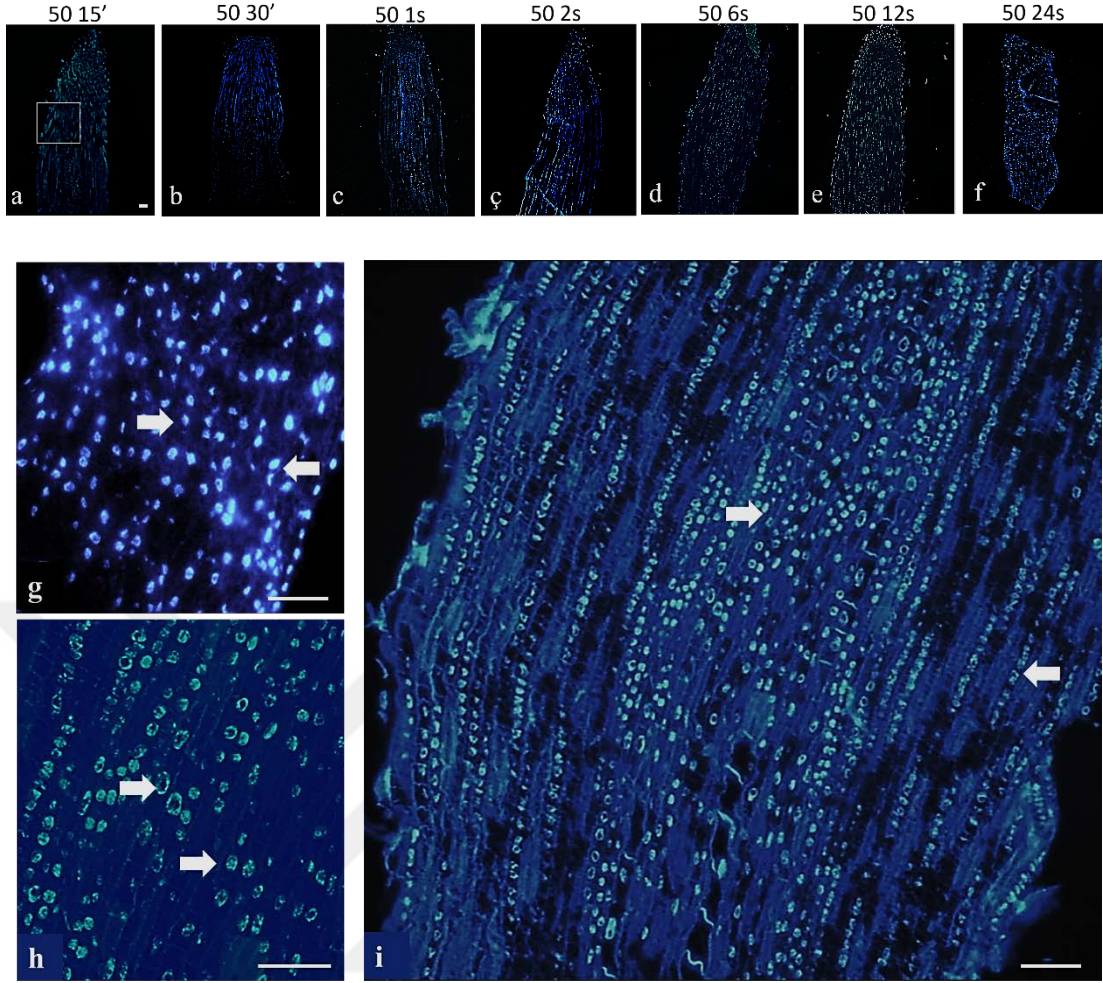


Şekil 3.1: 1.Grup (kontrol) mısır kök dokusu hücrelerinde DAPI boyama ile floresan mikroskop görüntüleri. **a.** Kök dokusunun genel görünümü, **b, c.** Nukleusların görüntüsü, **d.** Dokunun büyütülmüş görüntüsünde düzgün bir küre şeklinde hücreler (oklar). Bar, a,d. 50 µm ve b,c.10 µm.

2. Grup bulguları

15 Dakika süresince **50 mM** tuz konsantrasyonuna maruz bırakılan mısır kök dokusu hücrelerinde DAPI boyama ile floresan mikroskop görüntülerine bakıldığında kontrol doku hücrelerine oranla kök dokusunda hücrelerin küre şeklini kaybetmediği fakat dokunun kenar hattındaki az sayıda hücrenin nukleuslarında kromatin yoğunlaşması başladığı görüldü (Şekil 3.2a, 3.2g). Süre

30 dakikaya çıkarıldığında, kök dokusu hücrelerinde 15 dakikaya benzer şekilde bozulmaların kenar bölgede devam ettiği ve orta kısımda da morfolojik bozukluk gösteren az sayıda hücrelerin olduğu belirlendi. Kenar bölgede hücresel bozuklukların 15 dakikaya göre neredeyse iki katına çıktığı görüldü (Şekil 3.2b). Süre 1 saate uzatıldığında, bölgesel bozulmaların orta bölgede de çoğaldığı, fakat bozulmaların kenar bölgeye göre hala görece daha az olduğu ve bozulmanın dokunun geneline yayılmadığı görüldü. Bozulmanın izlendiği bu hücrelerde kromatinin düzgün bir şekilde dağılmadığı kısmen yoğunlaştığı belirlendi (Şekil 3.2c). Süre 2 saate kadar devam ettirildiğinde kök dokusu hücrelerinde bölgesel bozulmaların tüm dokuya yayılma şeklinde olduğu, fakat kök dokusunun uç kısmının çok fazla etkilenmediği gözlemlendi (Şekil 3.2ç, 3.2h). Süre 3 kat arttırıldığında yani 6 saat boyunca tuz konsantrasyonuna maruz bırakıldığında, mısır kök dokusu hücrelerinde bozulmaların dokunun uç kısmı hariç birçok yerinde devam ettiği (Şekil 3.2d), hücre gruplarında nukleusların parçalanmaya başladığı ve kromatinin hücre içinde dağıldığı görüldü. Süre daha da uzatıldığında, 12 saate çıkarıldığında, hücrelerde bozulmaların neredeyse 1.5 santimlik dokunun büyük kısmına yayıldığı (Şekil 3.2e, 3.2i), hücrelerin bozukluk derecesinin dokunun tüm hücrelerinde bariz olduğu ve bu hücrelerde nukleusların küresel şekillerini kayb ettikleri görüldü. Son olarak 24 saat tuz konsantrasyonuna maruz bırakılan mısır kök dokusunda kök uç bölgesi hariç 12 saate benzer bir görünümün hakim olduğu belirlendi. Kök uç bölgesinde ise diğer saatlere göre hücrelerde hasar fazlaca artmıştı (Şekil 3.2f).



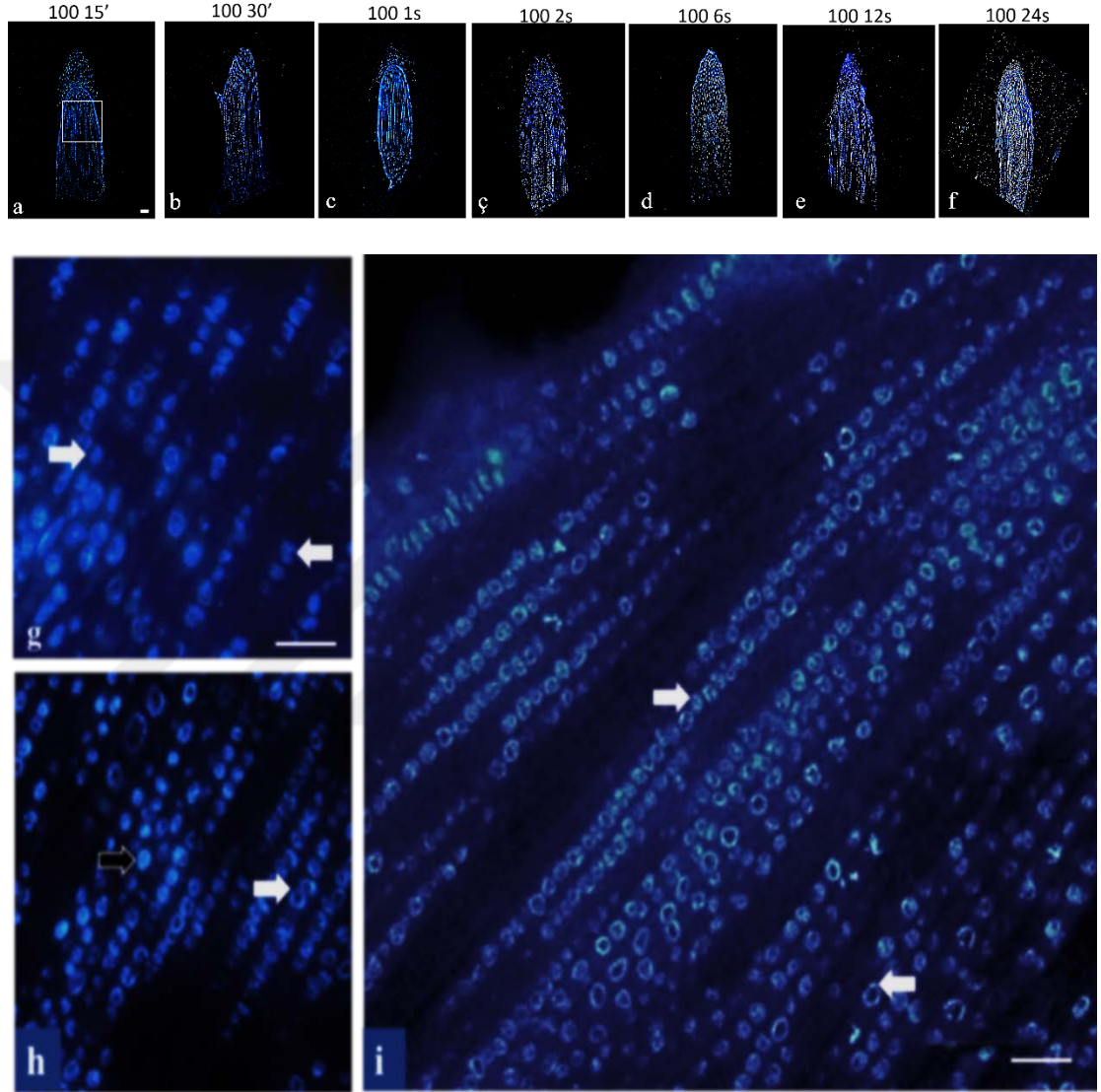
Şekil 3.2: a-f 50 mM tuz konsantrasyonuna maruz bırakılan mısır kök dokusu hücrelerinde DAPI boyama ile floresan mikroskop genel görüntüleri. a. 15 Dakika 50 mM, b. 30 Dakika 50 mM, c. 1 Saat 50 mM, ç. 2 Saat 50 mM, d. 6 Saat 50 mM, e. 12 Saat 50 mM, f. 24 Saat 50 mM, *g. 15 Dakika 50 Mm'da nukleuslarında kromatin yoğunlaşması başlayan hücrelerin durumu (oklar, nukleus), *h. 2 Saat 50 Mm'da hücrelerin durumu : bölgesel bozulmalar tüm dokuya yayılma şeklindedir (oklar), *i. 12 Saat 50 Mm'da hücrelerin durumu : bozulmalar neredeyse 1.5 santimlik dokunun büyük kısmındadır (oklar). Bar, 50 μ m (a-i).

**not: Benzerlik gösteren evrelerde tekrardan kaçınmak amacıyla sadece 3 grubun görüntüleri ile durum ifade edilmiştir.*

3.Grup bulguları

15 Dakika süresince **100 mM** tuz konsantrasyonuna maruz bırakılan mısır kök dokusu hücrelerinde DAPI boyama ile floresan mikroskop görüntülerine bakıldığında kök dokusunda bölgesel bozulmaların olduğu; 2. gruptakine benzer durumun olduğu belirlendi. Orta bölgedeki hücrelerde bozulmalar nadir biçimde gözlenirken daha çok kenar bölgede bozulmaların başladığı ve 2. grubun 15 dakikasından farklı olarak birçok hücrede var olduğu (Şekil 3.3a,

3.3g) gözlemlendi. Bozulmanın olduğu bu hücrelerde kromatinin düzgün bir şekilde dağılmadığı kısmen yoğunlaştığı görüldü. Süre 24 saate doğru 30 dakika 1, 2, 6, 12 ve 24 saat biçiminde ilerletildiğinde 1. gruptakine benzeyen fakat daha hızlı ve yoğun bozulmaların olduğu bir doku değişimi gözlemlendi (Şekil 3.3b-f, 3.3h-i).

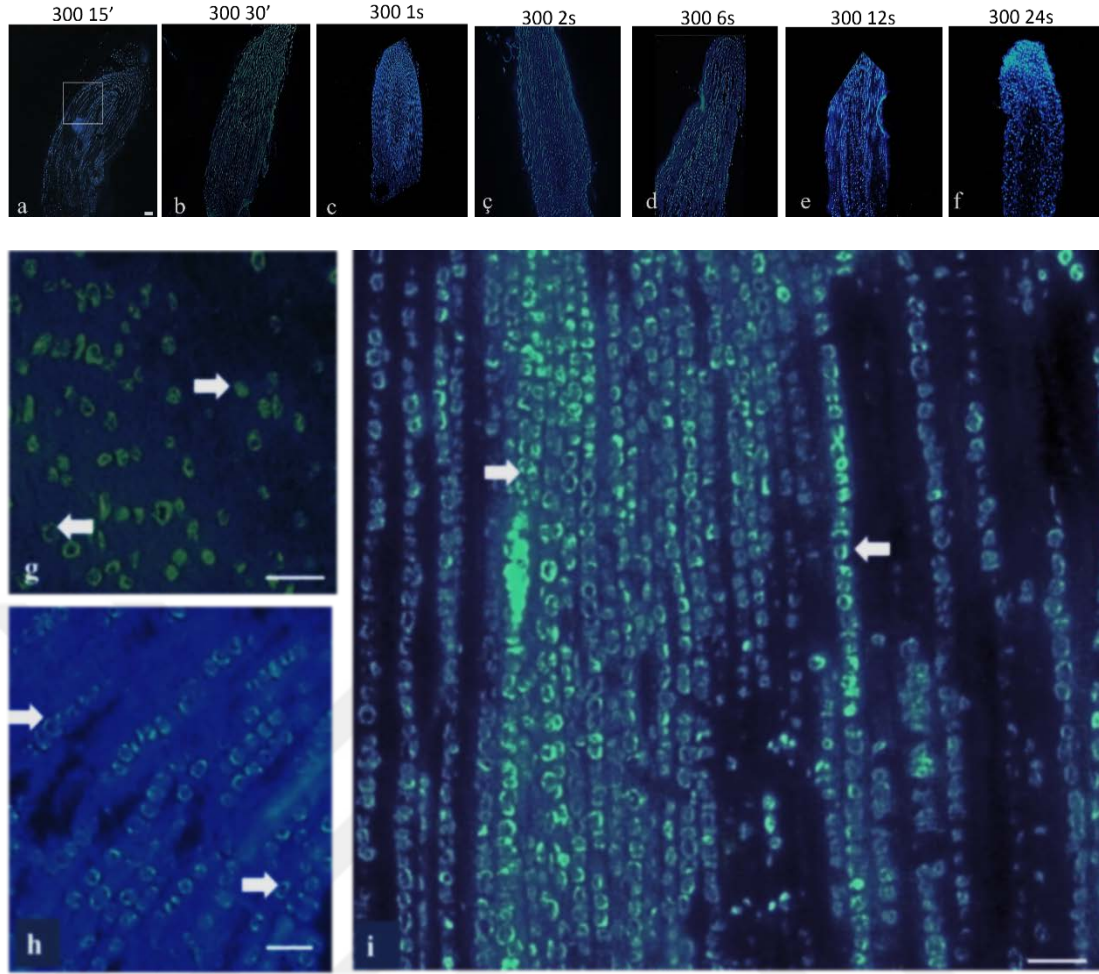


Şekil 3.3: a-f 100 mM tuz konsantrasyonuna maruz bırakılan mısır kök dokusu hücrelerinde DAPI boyama ile floresan mikroskop görüntüleri. a. 15 Dakika 100 mM, b. 30 Dakika 100 mM, c. 1 Saat 100 mM, ç. 2 Saat 100 mM, d. 6 Saat 100 mM, e. 12 Saat 100 mM, f. 24 Saat 100 mM *g. 15 Dakika 100 Mm'da hücrelerin durumu : bölgesel bozulmalar (oklar), *h. 2 Saat 100 Mm'da hücrelerin durumu : bozulmalar dokunun kenar kısmında yoğun (oklar, nukleus), *i. 12 Saat 100 Mm'da hücrelerin durumu : bozulmalar dokunun büyük kısmındadır (oklar). Bar, 50 µm (a-i).

**not: Benzerlik gösteren evrelerde tekrardan kaçınmak amacıyla sadece 3 grubun görüntüleri ile durum ifade edilmiştir.*

4.Grup bulguları

15 Dakika süresince **300 mM** tuz konsantrasyonuna maruz bırakılan mısır kök dokusu hücrelerinde DAPI boyama ile floresan mikroskop görüntülerine bakıldığında, 1 saat 100 mM tuz konsantrasyonuna maruz bırakılmış mısır kök dokusu hücrelerine benzer bir durumda oldukları fakat hasarın çok erken evrede ilerlemiş olduğu (Şekil 3.4a-ç) gözlemlendi. 15 dakikadan 30 dakika, 1, 2, 6, 12 ve 24 saat şeklinde süre ilerletildiğinde kenar ve orta bölgede görülen bozulmaların yoğun olarak arttığı kök ucu dokusu hücrelerinde ise daha az olarak ilerlediği belirlendi. Bozulma görülen hücrelerde kromatinin düzgün bir şekilde dağılmadığı kısmen yoğunlaştığı, hücrelerin küre hallerini kayb ettikleri görüldü (Şekil 3.4a-f). 2 ve 3. gruptan farklı olarak tüm evrelerde özellikle 1. saatten sonra bozulan dokularda boyanmaların yoğun olduğu, dokunun bütünlüğünde de zayıf bozulmaların meydana geldiği ve yalancı parlamaların önceki 2 gruba göre yoğun oluştu gözlemlendi.



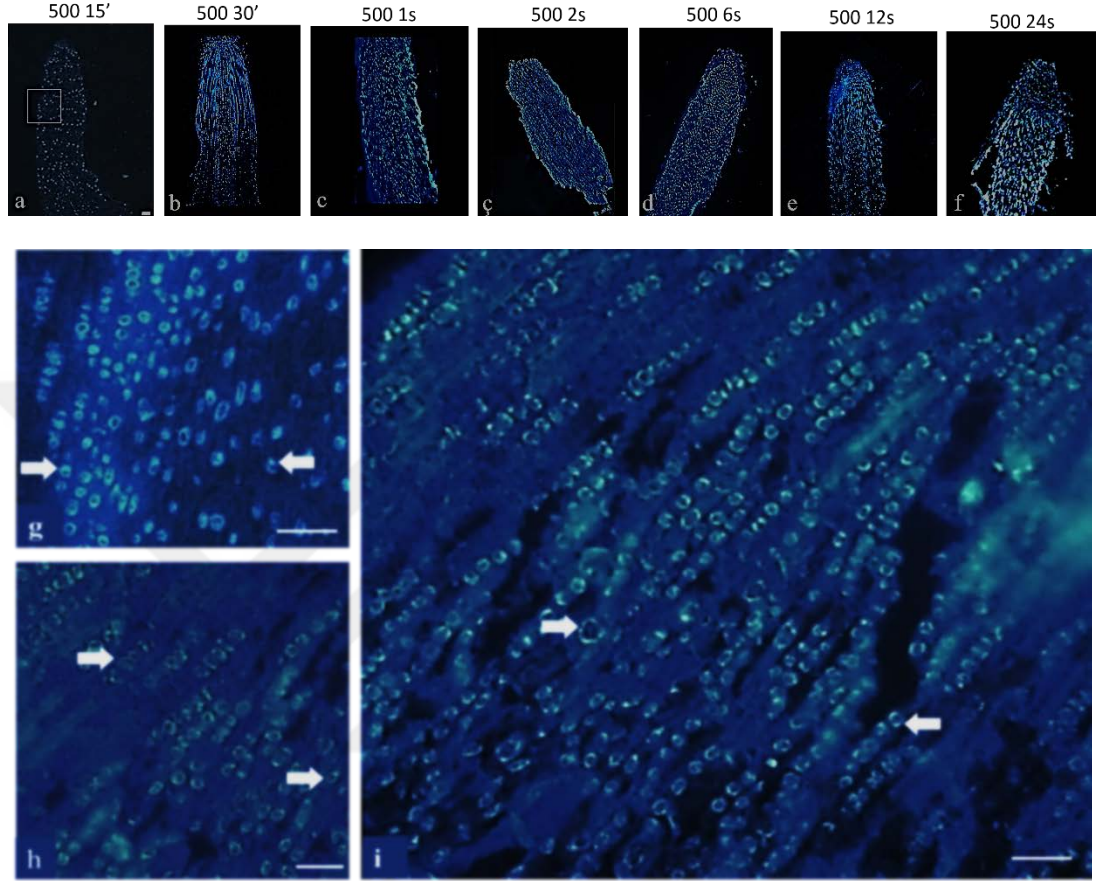
Şekil 3.4: a-f 300 mM tuz konsantrasyonuna maruz bırakılan mısır kök dokusu hücrelerinde DAPI boyama ile floresan mikroskop görüntüleri. a. 15 Dakika 300 mM, b. 30 Dakika 300 mM, c. 1 Saat 300 mM, ç. 2 Saat 300 mM, d. 6 Saat 300 mM, e. 12 Saat 300 mM, f. 24 Saat 300 mM Bar 10 μ m (a-f). *g. 15 Dakika 300 mM da hücrelerin durumu : bozulmalar kenar ve orta kısımlardadır (oklar, nukleus), *h. 2 Saat 300 mM da hücrelerin durumu : bozulmalar dokunun büyük kısmında yoğunudur (oklar), *i. 12 Saat 300 mM da hücrelerin durumu : bozulmalar dokunun tamamındadır (oklar). Bar, 50 μ m (a-i).

**not: Benzerlik gösteren evrelerde tekrardan kaçınmak amacıyla sadece 3 grubun görüntüleri ile durum ifade edilmiştir.*

5.Grup bulguları

15 Dakika süresince **500 mM** tuz konsantrasyonuna maruz bırakılan mısır kök dokusu hücrelerinde DAPI boyama ile floresan mikroskop görüntülerine bakıldığında, 30 dakika 300 mM tuz konsantrasyonuna maruz bırakılmış mısır kök dokusu hücrelerine benzer görüntünün oluştuğu (Şekil 3.5a), hücresel bozuklukların artık dokunun yarısından fazlasında olduğu görüldü (Şekil 3.5b). Süre 30 dakika, 1, 2, 6, 12 ve 24 saat olacak şekilde ilerletildiğinde

bozuklukların önceki tüm gruplarda olduğu gibi kenar ve orta bölgede başladığı fakat çok erken evrede ve hızlı biçimde dokunun yarısından fazlasına yayıldığı belirlendi. Yalancı parlamaların 1. saatten itibaren daha da yoğunlaştığı (Şekil 3.5c-f), doku bütünlüğünde şiddetli hasarların olduğu tespit edildi.



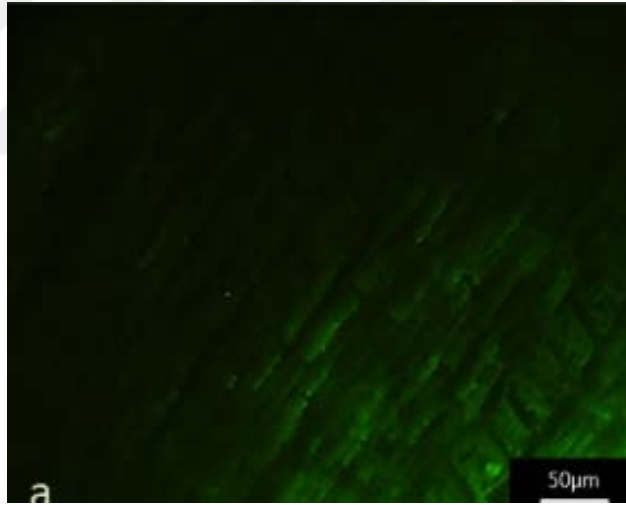
Şekil 3.5: a-f 500 mM tuz konsantrasyonuna maruz bırakılan mısır kök dokusu hücrelerinde DAPI boyama ile floresan mikroskop görüntüleri. a. 15 Dakika 500 mM, b. 30 Dakika 500 mM, c. 1 Saat 500 mM, ç. 2 Saat 500 mM, d. 6 Saat 500 mM, e. 12 Saat 500 mM, f. 24 Saat 500 mM Bar 10 µm (a-f). *g. 15 Dakika 500 mM da hücrelerin durumu : bozulmalar kenar ve orta kısımlarda bulunmaktadır (oklar), *h. 2 Saat 500 mM da hücrelerin durumu : bozulmalar dokunun büyük kısmındadır (oklar), *i. 12 Saat 500 mM da hücrelerin durumu : bozulmalar dokunun tamamınında şiddetlidir (oklar, nukleus). Bar, 50 µm (a-i).

**not: Benzerlik gösteren evrelerde tekrardan kaçınmak amacıyla sadece 3 grubun görüntüleri ile durum ifade edilmiştir.*

Tüm gruplar değerlendirildiğinde **50 mM** tuz konsantrasyonuna maruz bırakılan mısır kök dokusu hücrelerinde bozulmanın **100, 300 ve 500 mM** tuz konsantrasyonuna maruz bırakılan dokulara göre daha az olduğunu söylenebilir. Bozulmanın ilerleme hızı ve tüm dokuya yayılma durumu ise **300 ve 500 Mm** tuz konsantrasyonlarında diğer gruplardan bariz olarak farklı olarak yoğundu.

3.2 TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling: İn situ uç işaretleme yöntemi) Analiz Bulguları

Kontrol grubundan başlayarak sırası ile 50 mM ardından 100, 300, 500 mM gruplarına uygulanan tuz stresine 15 ve 30 dakika ve 1, 2, 6, 12 ve 24 saat maruz bırakılan mısır bitkisi kök dokusunun DAPI boyamalarının floresan mikroskop görüntüleri incelendiğinde bu doku hücrelerinde görülen hızlı vakuolleşme, hücrelerin genişlemesi ve uzaması gibi olağan olmayan farklılıklar, boyanırılıklarının artması, nukleus şekillerinde düzensizlik ve kromatinde yoğunlaşma gibi değişimler bu dokularda stres ilişkili olarak programlı hücre ölümünün (PHÖ) olabileceğini düşündürdü. Bu düşüncüyü doğrulamak amacıyla dokulara TUNEL analizi uygulandı ve hücre ölümünü gösteren ayrıntılı bir çalışma yapıldı. TUNEL reaksiyonu DNA kırılmalarının oluşumunu ve bu hücrelerde PHÖ'nün gerçekleştiğini floresan işaretleme ile doğrular.



Şekil 3.6: TUNEL boyama ile negatif sonuç veren mısır kök dokusu hücrelerinin floresan mikroskop görüntüsü. Bar, 50 μ m.

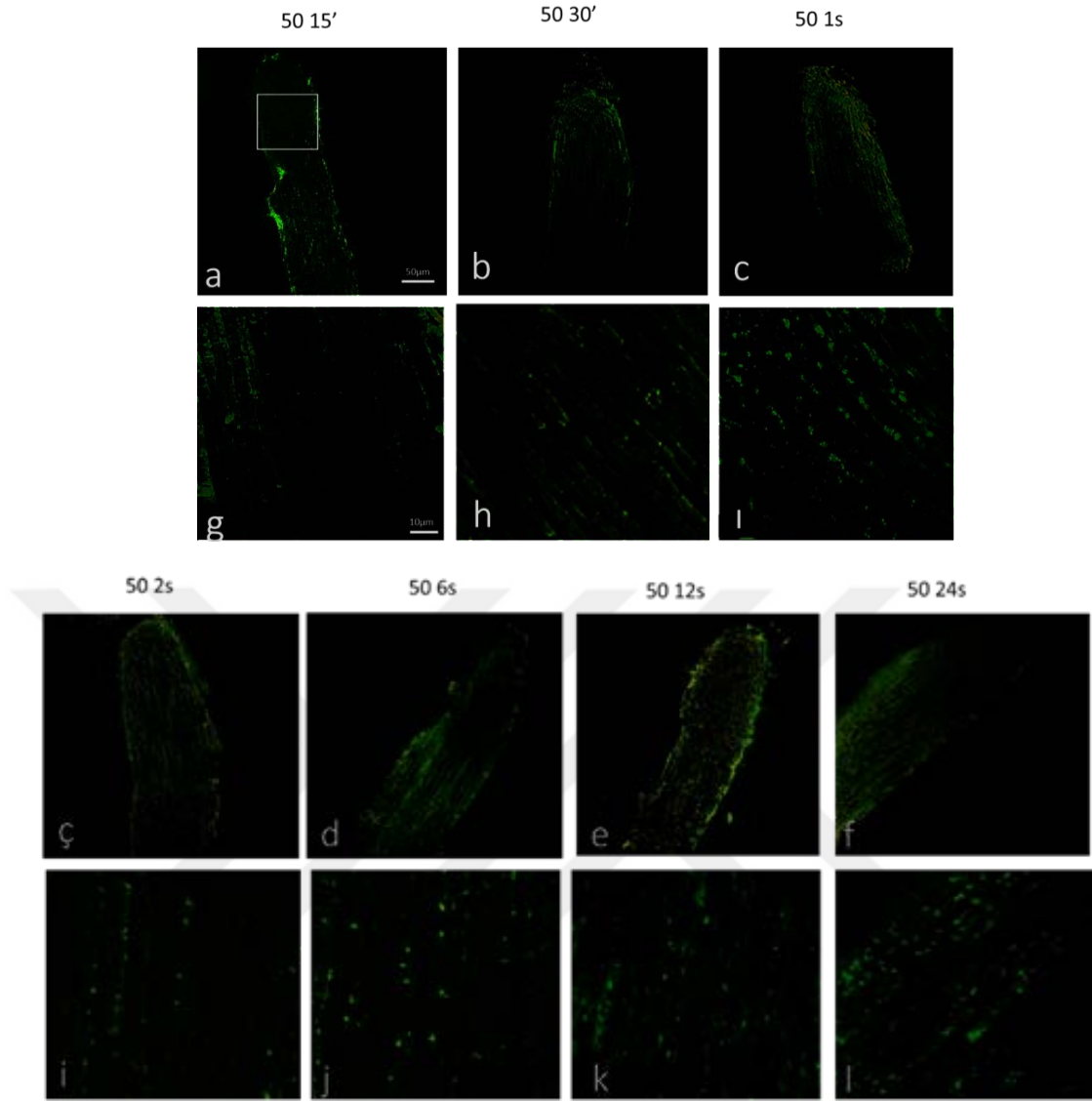
- **1.Grubun inceleme bulguları**

Mısır bitkisinin TUNEL boyamalarının floresan mikroskop görüntüsü incelendiğinde kontrol grubundaki kök dokusu hücrelerinde TUNEL boyama negatif sonuç verdi. Hücrelerde herhangi bir işaretlenme belirlenmedi.

- **2.Grubun inceleme bulguları**

15 dakika süresince **50 mM** tuz konsantrasyonuna maruz bırakılan mısır kök dokusu hücrelerinin TUNEL analizinin floresan mikroskop görüntüleri

incelendiğinde işaretlenmelerin dokunun kenar kısımlarında başladığı ve dokuda hafif şiddette pozitif sonuç oluştuğu belirlendi (Şekil 3.7a,g). Süre 30 dakikaya çıkarıldığında işaretlenmelerin dokunun kenarlarına ek olarak orta kısımlarında da oluşmaya başladığı, işaretlenen hücre sayısının 15 dakikaya göre görece yaklaşık bir katı kadar daha arttığı izlendi (Şekil 3.7b,h). Süre iki katına çıkarılarak 1 saat tuz stresi uygulandığında, dokuda bölgesel işaretlenmelerin orta şiddette devam ettiği, orta bölümde önceki aşamalarda daha az olan işaretlenmelerin çoğaldığı ve dokunun pozitifliğinin arttığı tespit edildi (Şekil 3.7c,ı). Süre 2, 6, 12 ve 24 saate kadar sürekli arttırıldığında işaretlenmelerin 2 saatten sonra mısır kök dokusunun geneline yayıldığı, yani kenar ve orta bölümlerin dışında düşük seviyede de olsa kök ucu ve kök dokusunun üst kısımlarında ışıma şiddetinin 24 saat grubuna kadar arttığı ve PHÖ'ye uğrayan hücrelerin çoğaldığı tespit edildi. (Şekil 3.7ç-1). Sürenin 24 saate çıkarıldığı aşamada, ışıma gösteren hücre sayısının yüksek oranda arttığı fakat dokudaki stresin sebep olduğu hasar nedeniyle nukleusların yapılarını kaybetmiş olduğu gözlemlendiğinden bu ışımaların bir kısmının yalancı ışıma olabileceği düşünüldü. Hiçbir evrede, kök dokusunda bütünüyle bariz otofloresanlara rastlanmadı.

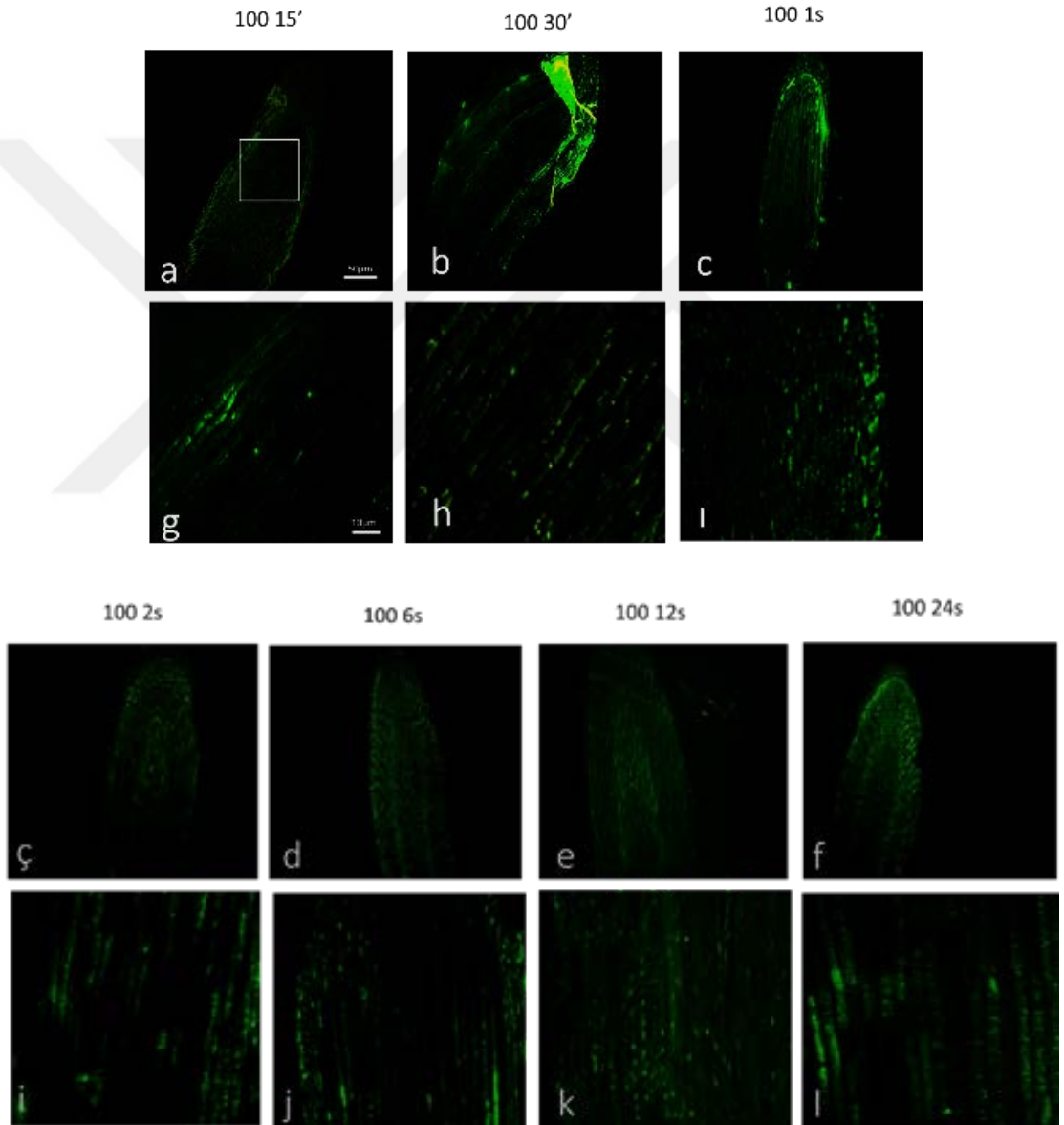


Şekil 3.7: a-l. 50 mM tuz konsantrasyonuna maruz bırakılan mısır kök dokusu hücrelerinde TUNEL boyama ile floresan mikroskop görüntüleri. a-f. Kök dokusunun genel görüntüsü, g-l. Üstteki dokudan büyütülen bir kesit görüntüsü. Bar, 50 µm (a-f), 10 µm (g-l).

- **3.Grubun inceleme bulguları**

15 dakika süresince **100 mM** tuz konsantrasyonuna maruz bırakılan mısır kök dokusu hücrelerinin TUNEL analizinin floresan mikroskop görüntüleri incelendiğinde işaretlenmelerin 2.grupta olduğu gibi dokunun kenar kısımlarında, orta kısımlara göre daha bariz olduğu ve dokuda hafif şiddette pozitif sonuç olduğu belirlendi (Şekil 3.8a,g). Süre 30 dakika ve sonra 1 saate çıkarıldığında, kenar bölümdeki ışımalarda bariz olarak hızlı bir artışı izlendi (Şekil 3.8 b-c, g-h). Süre 2, 6, 12 ve 24 saate kadar sürekli arttırıldığında işaretlenmelerin 2. gruptan farklı olarak 1 saatten sonra mısır kök dokusunun

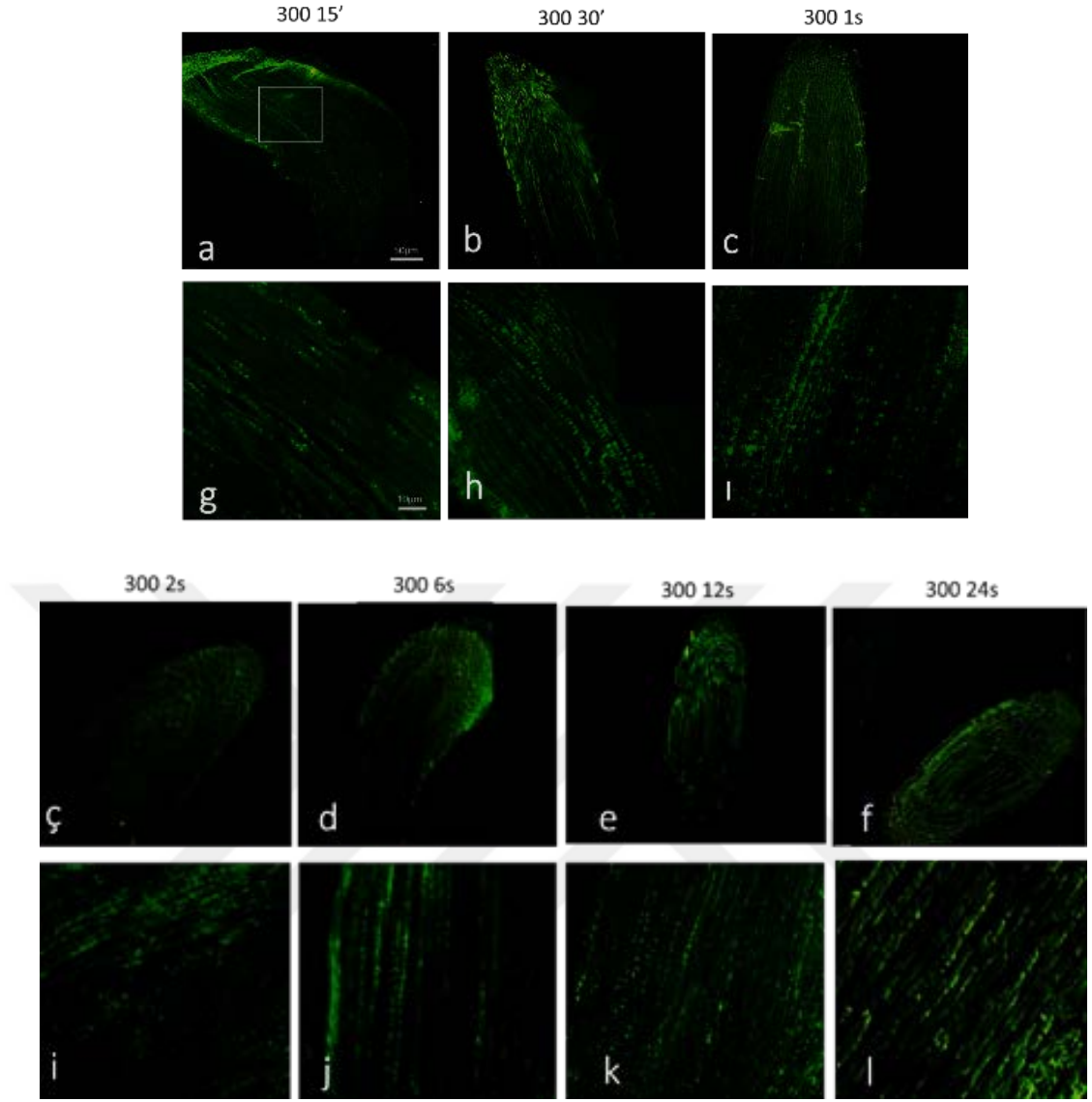
geneline yayıldığı, yani kenar ve orta kısımlar ile kök ucu ve kökün üst kısımlarında işaretlenmelerin olduğu gözlemlendi (Şekil 3.8ç-1). Işıma şiddetinin 24 saat grubunda, 2. grupta olduğu gibi, dokudaki stresin sebep olduğu hasar nedeniyle nukleusların yapılarını kaybetmiş olduğu gözlemlendiğinden bu ışımaların bir kısmının yalancı ışıma olabileceği düşünüldü. Sonuç olarak, **100 mM** tuz konsantrasyonunun oluşturduğu bozulmanın **50 mM** tuz konsantrasyonunun oluşturduğu bozulmadan daha kısa sürede bir bozulma yarattığı fakat hasarın derecesinin bu iki grupta benzer olduğu tespit edildi.



Şekil 3.8: a-l. 100 mM tuz konsantrasyonuna maruz bırakılan mısır kök dokusu hücrelerinde TUNEL boyama ile floresan mikroskop görüntüleri. a-f. Kök dokusunun genel görüntüsü, g-l. Üstteki dokudan büyütülen bir kesit görüntüsü. Bar, 50 µm (a-f), 10 µm (g-l).

- **4.Grubun inceleme bulguları**

15 dakika süresince **300 mM** tuz konsantrasyonuna maruz bırakılan mısır kök dokusu hücrelerinin TUNEL analizinin floresan mikroskop görüntüleri incelendiğinde dokunun 2 ve 3. gruba göre daha yüksek derecede pozitif sonuç verdiği işaretlenmelerin orta bölüme oranla kenar bölümde daha fazla olduğu belirlendi (Şekil 3.9a,g). Süre 30 dakikaya çıkarıldığında ışımaların kenar bölümlerin haricinde orta bölümlerde de hızlıca oluştuğu ve PHÖ'ye uğrayan nukleuslarda işaretlenmelerin 2 ve 3. gruba göre daha çok olduğu görüldü (Şekil 3.9b,h). Süre 1 saate çıkarıldığında ışımaların 3. grupta olduğu gibi kökün tüm bölümlerine yayıldığı fakat ve PHÖ'ye uğrayan nukleuslarda ki işaretlenmelerin daha fazla olduğu arttığı tespit edildi (Şekil 3.9c,ı). Süre kademeli olarak 2, 6, 12 ve 24 olacak şekilde arttırıldığında mısır kök dokusundaki ışımaların şiddetinin tüm bu sürelerde benzer biçimde yüksek olduğu, nukleusların yapılarını kaybettiği, işaretlenmelerin bütün kök geneline yayıldığı, doku yapısının yüksek oranda hasarlı görüldüğü belirlendi. Işıma şiddetinin 24 saat grubunda, 2 ve 3. grubun 24 saatine göre daha pozitif bir görüntünün hakim olduğu ve hasar derecesinin bariz yüksek olduğu gözlendi (Şekil 3.9ç-1) . Sonuç olarak, **300 mM** tuz konsantrasyonunun oluşturduğu bozulmanın **50 ve 100 mM** tuz konsantrasyonlarının oluşturdukları bozulmalardan farklı olarak hasarın 1. saatten itibaren çok daha yoğun olduğu tespit edildi.

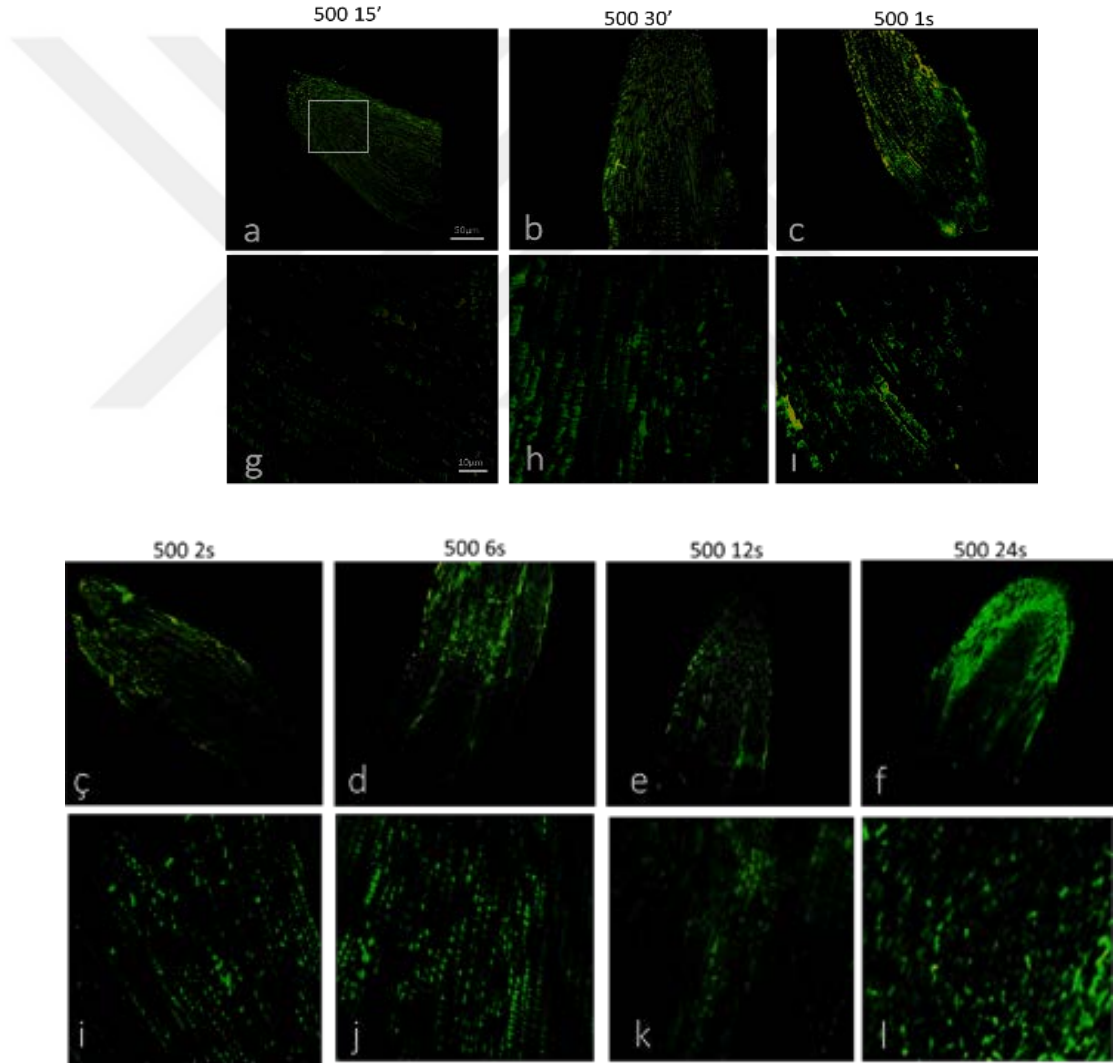


Şekil 3.9: a-l. 300 mM tuz konsantrasyonuna maruz bırakılan mısır kök dokusu hücrelerinde TUNEL boyama ile floresan mikroskop görüntüleri. a-f. Kök dokusunun genel görüntüsü, g-l. Üstteki dokudan büyütülen bir kesit görüntüsü. Bar, 50 µm (a-f), 10 µm (g-l).

• 5.Grubun inceleme bulguları

15 dakika süresince **500 mM** tuz konsantrasyonuna maruz bırakılan mısır kök dokusu hücrelerinin TUNEL analizinin floresan mikroskop görüntüleri incelendiğinde doku düşük şiddette pozitif sonuç verdiği ışımının önceki gruplara göre kök dokusunun daha bütününe yayıldığı ama şiddetinin zayıf olduğu görüldü (Şekil 3.10a,g). Süre 30 dakikaya çıkarıldığında ışımaların kökün çoğu bölgesinde devam ettiği görüldü (Şekil 3.10b,h). Süre 2 katına yani 1 saate çıkarıldığında kök genelinde yalancı ışımaların başladığı ve yapılarının tespit edilemediği yani bütünlüğü bozulmuş hücrelerin olduğu görüldü (Şekil

3.10c,ı). Bu durum 2 ve 3. grupta en son aşamalarda ortaya çıkmış olarak gözlenmişti. 4. grupta ise 5. gruptan farklı olarak yine daha sonra, neredeyse 12 saat itibariyle izlenmişti. Süre kademeli olarak 2, 6, 12 ve 24 saat olarak arttırıldığında kökün, kenar ve orta kısımlarında yalancı ışımaların daha bariz olduğu, PHÖ'ye uğrayan nukleuslarında yoğun olduğu ve bu ışımaların şiddetli pozitif olduğu tespit edildi (Şekil 3.10ç-l). 24 saatte ışıma şiddetinin devam ettiği, yanısıra şekilsiz hücrelerin ve nukleusların varlığı nedeniyle kökün çoğunun ışımaların yalancı ışıma olduğu gözlendi. Mısır kök dokusu yapısının 4. grubun 12 ve 24 saatine benzer biçimde, fakat biraz daha hasarlı bir görünümde olduğu belirlendi. (Şekil 3.10e-f,k-l).



Şekil 3.10: a-l. 500 mM tuz konsantrasyonuna maruz bırakılan mısır kök dokusu hücrelerinde TUNEL boyama ile floresan mikroskop görüntüleri. a-f. Kök dokusunun genel görüntüsü, g-l. Üstteki dokudan büyütülen bir kesit görüntüsü. Bar, 50 μm (a-f), 10 μm (g-l).

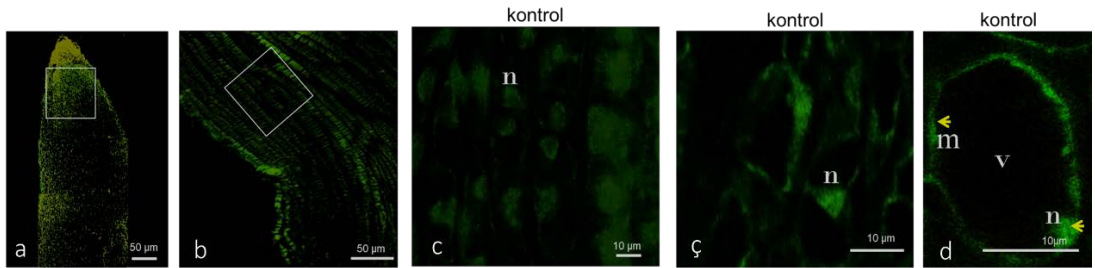
3.3 Mikrotübül etiketleme analizi bulguları

Çalışmamızda mısır kök dokusuna ait hücrelerin, stres ve programlı hücre ölümü (PHÖ) ilişkili mikrotübül değişimlerinin özellikleri belirlendi. Bu amaçla mısır kök dokusu kesitleri alındı. Bu doku hücrelerine ait mikrotübül proteinleri FITC (flurescein - isothiocyanat) ile işaretlenerek floresan boyama analiziyle görüntülendi ve aşağıda ifade ettiğimiz sitoplazma ile beraber çekirdek ardından hücre çeperindeki mikrotübüllerin tuz stresine karşı değişimi (ilişkisi, yerleşimi) üzerine veriler elde edildi.

50, 100, 300 ve 500 mM tuz stresine 15 ve 30 dakika ardından 1, 2, 6, 12 ve 24 saat maruz bırakılan mısır bitkisi kök dokusunun DAPI boyama ve TUNEL analizi ile PHÖ geçirdikleri tespit edilen kök dokusu hücrelerinde mikrotübüllerin yerleşimlerinde değişiklikler tespit edildi.

• 1.Grubun inceleme bulguları

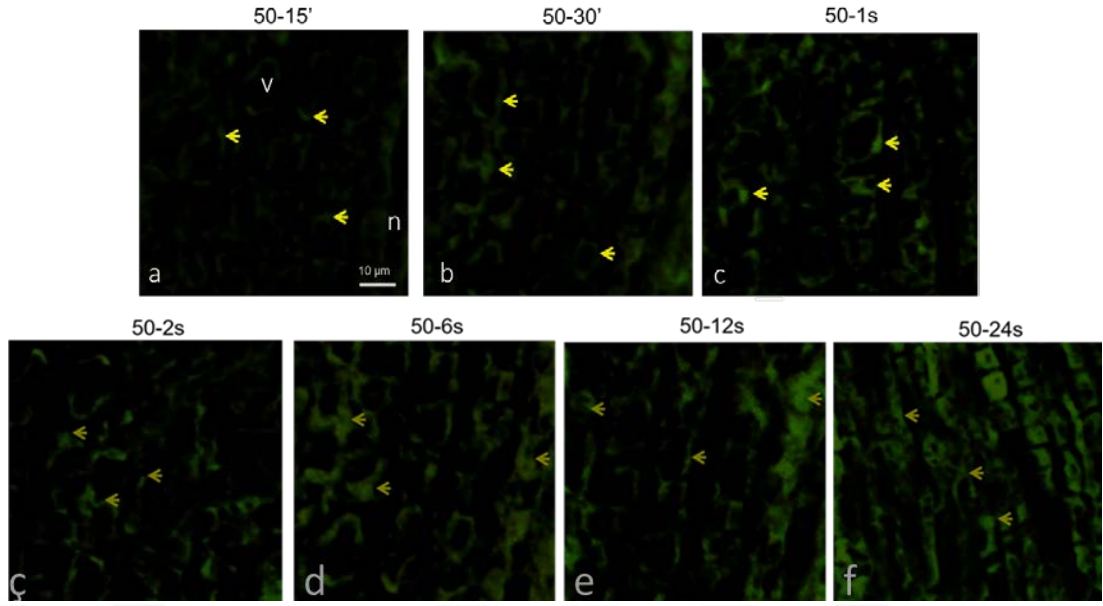
Kontrol olarak belirlediğimiz 1.grupta, kök dokusu hücrelerinde mikrotübüllerin, daha çok nukleus etrafında ve hücre çeperi altında yoğunlaştığı, az sıklıkta nukleustan hücre çeperine doğru kısa uzantılar oluşturdukları gözlemlendi. Hücre çeperi altındaki mikrotübüllerin paralel düzende ince bir tabaka oluşturdukları aksine nukleus etrafındakilerin nukleusu yoğun bir şekilde sardıkları izlendi. Vakuollerin etrafında da buldukları ve sitoplazmada genel olarak homojen olarak dağıldıkları belirlendi (Şekil 3.11a-d).



Şekil 3.11: a-d. Kontrol grubu FITC (flurescein - isothiocyanat) ile işaretlenen mikrotübül proteinlerinin floresan boyama analizi görüntüsü. Oklar : Mikrotübül kümeleri. Bar, 50 µm (a,b), 10 µm (c-d).

- **2. Grubun inceleme bulguları**

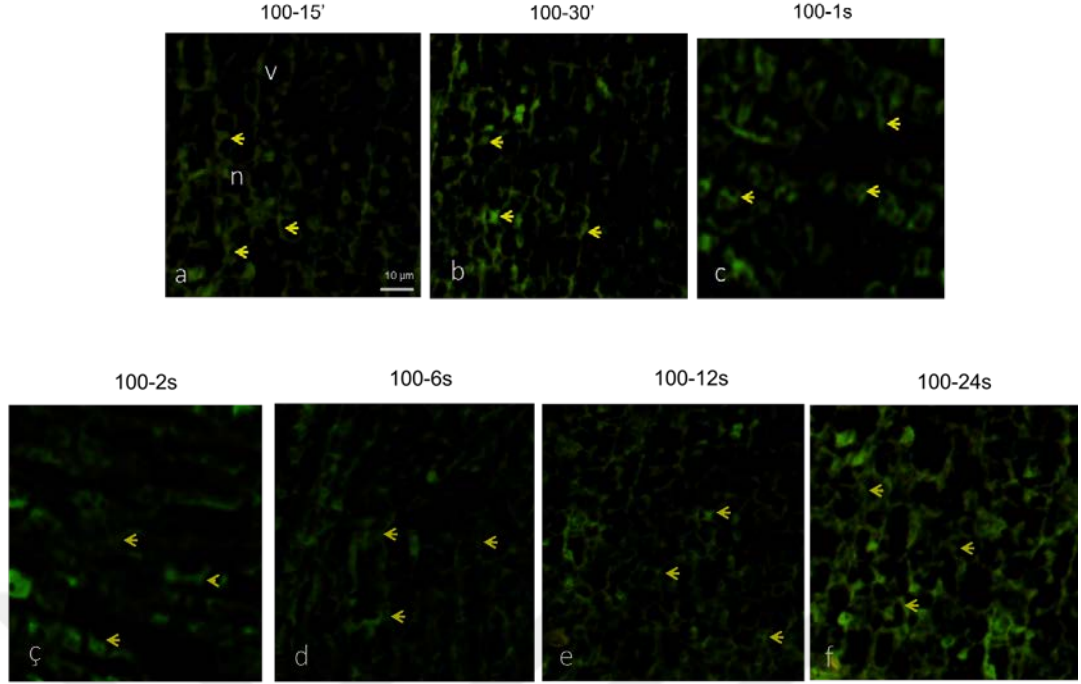
15 dakika süresince **50 mM** tuz konsantrasyonuna maruz bırakılan mısır kök dokusu hücrelerinin mikrotübül etiketleme analizinin floresan mikroskop görüntüleri incelendiğinde PHÖ'nün zayıf pozitif olarak izlendiği bu evrede mikrotübüllerin hücre duvarı altındaki düzenli hallerinin düşük seviyede bozulduğu ve çok zayıf kümelenmelerin olduğu gözlemlendi. Mikrotübüllerin, sitoplazmada ve nukleus etrafında ki yoğunluğunda da belli belirsiz bir artış olduğu izlendi (Şekil 3.12a). Sürenin 30 dakikaya ve sonrasında 1 saate uzatıldığında mikrotübüllerin yoğunluğunun artışı haricinde, 15 dakikaya benzer bir durum izlendi (Şekil 3.12b,c). Oysa ki süre 2 saate ilerletildiğinde mikrotübül düzensizliklerinin, kümelenmelerinin ve yoğunlaşmalarının daha bariz bir artış gösterdiği tespit edildi (Şekil 3.12c). PHÖ sürecinde ortaya çıkan hızlı vakuolleşmenin nukleus etrafındaki ve sitoplazmadaki yoğunlaşmayı tetiklediği düşünüldü. Bu aşamada, nukleus çevresindeki mikrotübüllerin yerleşimindeki düzenliliğinin yerini rastgele organizasyona bırakmaya başladığı görüldü. Süre 2 saate ve sonrasında 6 saate kadar uzatıldığında, 1 saate izlenen mikrotübül değişimlerinin orta hızda ilerlediği (Şekil 3.12ç,d). 6 saatten sonra ki değişimin daha çok mikrotübül yoğunlaşmaları şeklinde gerçekleştiği, düzensizliklerin ve kümelenmelerin artışının sürenin 2 saatteki duruma benzediği belirlendi (Şekil 3.12e). 12 saat ve 24 saat sonrasında mikrotübüllerin görüntüsünün, nukleusun ve vakuollerin sarıldığı bir bant görünümüne dönüştükleri ve PHÖ'nün ileri düzeyde pozitif olduğu bu evrelerde mikrotübül demetlerinin bir çok yerde yoğun ve düzensiz olarak şekillendiği, kümelenmelerin artışının bariz olduğu gözlemlendi (Şekil 3.12e,f).



Şekil 3.12: (a-f). 50 mM tuz konsantrasyonuna maruz bırakılan mısır kök dokusu hücrelerinde FITC (flurescein - isothiocyanat) ile işaretlenen mikrotübül proteinlerinin floresan boyama analizi görüntüsü. Oklar : Mikrotübül kümeleri. Bar, 10 µm (a-f).

- **3.Grubun inceleme bulguları**

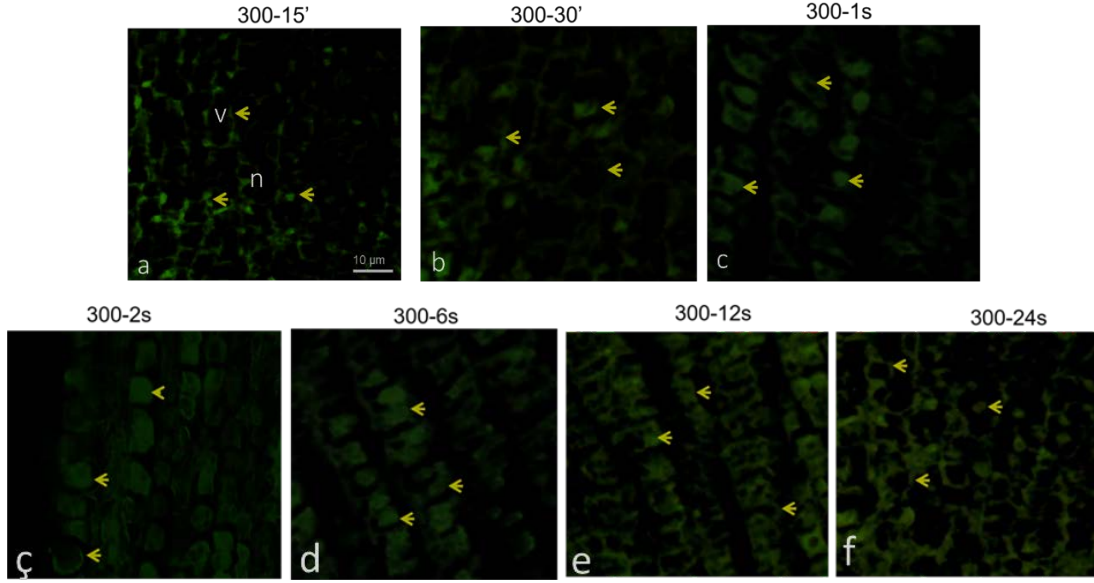
15 dakika süresince **100 mM** tuz konsantrasyonuna maruz bırakılan mısır kök dokusu hücrelerinin mikrotübül etiketleme analizinin floresan mikroskop görüntüleri incelendiğinde PHÖ'nün düşük şiddette pozitif olarak izlendiği bu evrede mikrotübüllerin hücre duvarı altındaki düzenli hallerinin az seviyede bozulduğu ve kümelenmelerin olduğu gözlemlendi. Mikrotübüllerin, sitoplazmada ve nukleus etrafında ki yoğunluğunda da belirli bir artış olduğu izlendi (Şekil 3.13a). Süre 30 dakikaya uzatıldığında 15 dakikada ki az seviye kümelenmenin arttığı, süre 1 saate uzatıldığında mikrotübüllerin yoğunluğunun artışı ve mikrotübül düzensizliklerinin oldukça ilerlediği gözlemlendi (Şekil 3.13b,c). Süre 2 saate ve ardından 6 saate ilerletildiğinde mikrotübül düzensizliklerinin, kümelenmelerinin ve yoğunlaşmalarının dahada çok arttığı (Şekil 3.13c,ç) ve nukleus çevresindeki mikrotübüllerin yerleşimindeki rastgele organizasyonun başladığı tespit edildi. Süre 6, 12 ve 24 saate uzatıldığında değişimin mikrotübül yoğunlaşmaları şeklinde gerçekleştiği belirlendi (Şekil 3.13d). 24 saatte mikrotübüllerin görüntüsünün oldukça düzensizleştiği, nukleusun ve vakuollerin etrafında yoğunlaştıkları gözlemlendi (Şekil 3.13e,f)



Şekil 3.13: (a-f). 100 mM tuz konsantrasyonuna maruz bırakılan mısır kök dokusu hücrelerinde FITC (flurescein - isothiocyanat) ile işaretlenen mikrotübül proteinlerinin floresan boyama analizi görüntüsü. Oklar : Mikrotübül kümeleri. Bar, 10 µm (a-f).

• 4. Grubun inceleme bulguları

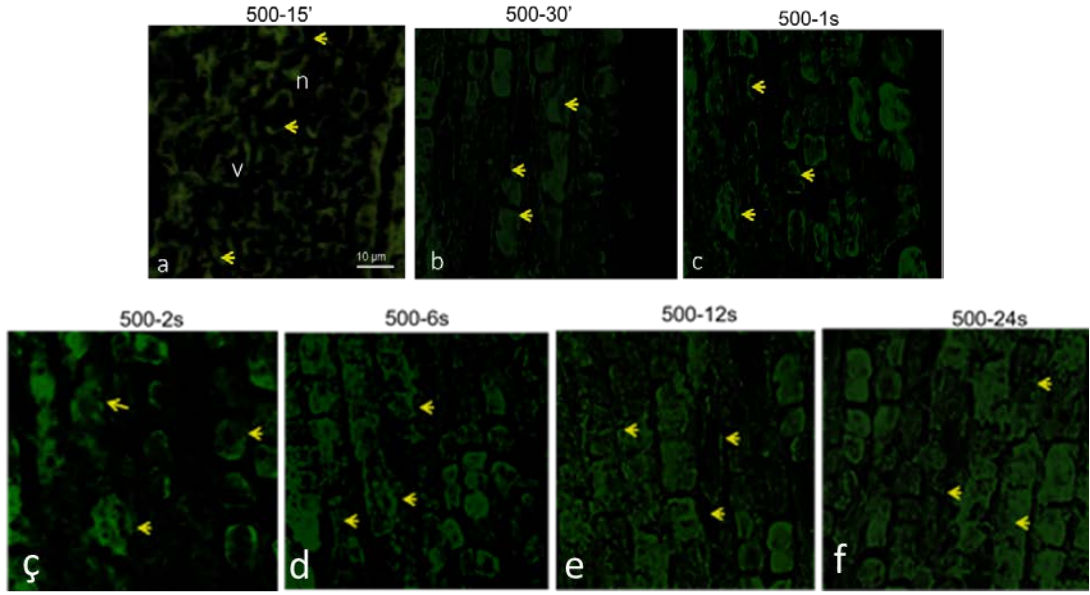
15 dakika süresince **300 mM** tuz konsantrasyonuna maruz bırakılan mısır kök dokusu hücrelerinin mikrotübül etiketleme analizinin floresan mikroskop görüntüleri incelendiğinde PHÖ'nün orta şidette pozitif olarak izlendiği bu evrede mikrotübüllerin hücre duvarı altındaki düzenli hallerinin orta seviyede bozulduğu ve kümelenmelerin arttığı gözlemlendi. Mikrotübüllerin, sitoplazmada ve nukleus etrafında ki yoğunluğunda da hızlı bir artış olduğu izlendi (Şekil 3.14a). Süre 30 dakikaya ve ardından 1 saate uzatıldığında **50 ve 100 mM** tuz konsantrasyonlarından farklı olarak bu aşamalarda yüksek kümelenmenin olduğu ve mikrotübüllerin düzenli hallerinin yüksek seviyede bozulduğu görüldü. Süre kademeli olarak 2, 6, 12 ve 24 saat olarak uzatıldığında mikrotübüllerin görüntüsünün yoğun bir bant görünümüne dönüştükleri ve PHÖ'nün ileri düzeyde pozitif olduğu bu evrelerde mikrotübül demetlerinin bir çok yerde düzensiz olarak şekillendiği, kümelenmelerin artışının ise bariz olduğu gözlemlendi (Şekil 3.14.b-f).



Şekil 3.14: (a-f). 300 mM tuz konsantrasyonuna maruz bırakılan mısır kök dokusu hücrelerinde FITC (flurescein - isothiocyanat) ile işaretlenen mikrotübül proteinlerinin floresan boyama analizi görüntüsü. Oklar : Mikrotübül kümeleri. Bar, 10 µm (a-f).

• 5. Grubun inceleme bulguları

15 dakika süresince **500 mM** tuz konsantrasyonuna maruz bırakılan mısır kök dokusu hücrelerinin mikrotübül etiketleme analizinin floresan mikroskop görüntüleri incelendiğinde PHÖ'nün orta şiddetli pozitif olarak izlendiği bu evrede mikrotübüllerin mikrotübüllerin, sitoplazmada ve nukleus etrafında ki yoğunluğunda da hızlı bir artış olduğu gözlemlendi. (Şekil 3.15a). Süre 30 dakikaya uzatıldığında **50 ve 100 mM** tuz konsantrasyonlarından farklı olarak ve **300 mM** tuz konsantrasyonuna benzer olarak bu aşamada hücre duvarı altındaki düzenli hallerinin hızlıca bozulduğu ve kümelenmelerinde hızlıca olduğu izlendi (Şekil 3.15b) Süre 1, 2 ve 6 saate uzatıldığında mikrotübüllerin nukleusun ve vakuollerin etrafında kalın bir bant görünümüne dönüştükleri ve PHÖ'nün ileri düzeyde pozitif olduğu bu evrelerde sonra mikrotübül demetlerinin bir çok yerde yoğun ve düzensiz olarak şekillendiği, kümelenmelerin daha da çoğaldığı gözlemlendi (Şekil 3.15c). 12 ve 24. saatlerde benzer bir görünümün olduğu mısır kök dokusu hücrelerinin çoğunluğu bozulduğu için mikrotübülleri gözleminin zorlaştığı belirlendi. Bu aşamalarda hücrelerin çoğu yeri düzensiz mikrotübül kümeleri ile kaplanmıştı (Şekil 3.15d-f).



Şekil 3.15: (a-f). 500 mM tuz konsantrasyonuna maruz bırakılan mısır kök dokusu hücrelerinde FITC (flurescein - isothiocyanat) ile işaretlenen mikrotübül proteinlerinin floresan boyama analizi görüntüsü. Oklar : Mikrotübül kümeleri. Bar, 10 µm (a-f).

Khedr ve ark., (2003)'ün yaptığı bir araştırmada tuz stresine maruz bırakılan *Pancratium maritimum* bitkisinde, maruz kalınan stresle birlikte kuru ve taze ağırlığında orantısal olarak bir azalma tespit edilmiştir. 300 mM tuz stresinde prolin ile muamele edilen *Pancratium maritimum* bitkisinde, prolin tuz stresinin etkilerini azaltmış ve strese maruz kalan bitkinin kök içeriğinde ki suyu arttırmıştır. Benzer bir çalışmayı yürüten Niknam ve ark., (2004)'ün araştırmasında *Nicotiana tabacum* bitkisi tuz stresine maruz bırakıldığında fide ve kuru ağırlıklarda azalma meydana gelmiştir. Yaprak eksplantlarında oluşan büyüme değişkenleri 50 mM tuz konsantrasyonlarında azalma 150 mM'de yükselme göstermiştir. Fide ve yapraklarda prolin miktarı artış göstermiş tuz konsantrasyonu çoğaldıkça polisakkarit miktarı azalma göstermiştir. Esasen bu konularla yapılan çalışmalar çoğunluktadır. Bunlardan bir diğeri olan Amor ve ark., (2005), *Crithmum maritimum* bitkisi ile yaptıkları çalışmada 50 mM tuz uygulamasında kök biyokütlesinin arttığı, 200 mM lik uygulamada ise önemli ölçüde azalmaya sebep olduğunu saptamışlardır. Benzer sonuçlarda kök uzunluğu ve yaprak ölçülerinde de azalma saptanmıştır. Gola ve ark., (2018)'ün dört bitki üzerinde yapmış oldukları çalışmalarda tuzluluğun çimlenme yüzdesinde ciddi bir azalmaya sebep olduğu, çimlenme değeri ile kök ve sürgün

uzunluklarında incelemelere göre oluşumun durakladığı, taze kök ve sürgün ağırlıklarında değişikliklerin olduğu saptanmıştır.

Parida ve ark., (2004)'nin yaptığı bir çalışmada *Bruguiera parviflora* bitkisinin fideleri 100, 200 ve 400 mM tuz stresine maruz bırakılmış, stres sonucu protein bantlarının ağırlıklarının 17, 23, 32, 33 ve 34 kDa kadar azaldığı belirlenmiştir. Bu bitki 45 gün süresince 400 mM tuz stresinin etkisinde kaldığında SSP-23 isimli proteinin tuz stresi sonucunda kaybolduğu bitkinin tuz stresinden arındırıldığında ise tekrardan ortaya çıktığı görülmüştür.

Bajji ve ark., (1998)'nin *Atriplex halimus* bitkisinde yaptıkları önceki çalışmalara göre farklı hedefli bir çalışmada ise tuz stresi seviyesinin arttıkça ozmotik potansiyelinin düştüğü, köklerde çözünen şeker miktarının da stres ilişkili belirli oranda arttığı görülmüştür. 450 ve 600 mM gibi çok yüksek tuz kontrasyonlarında çözünen şeker miktarının kontrole oranla önemli miktarda düştüğü, tam tersine prolin miktarının ise köklerde ve yaşlı yapraklarda arttığı tespit edilmiştir.

Parida ve Das (2005)'in yaptığı bir araştırma *Salicornia rubrada* bitkisinin tuz stresine maruz bırakıldığında ağırlığının 50 mM da arttığı, 100 ve 200 mM da azaldığı tespit edilmiştir. *Raphanus sativus* bitkisinde ise yüksek tuzluluk durumunda kuru ağırlıkta azalma görülür ve bu yüksek tuzluluğun büyüme azalmasının yaklaşık %80 lik kısmında yaprak genişlemesinin azalması, %20 lik kısımda ise stomal iletkenliğin azalması olarak görülmüştür. *Alhagi pseudoalhagi* bitkisinde 50 mM tuz konsantrasyonu kuru ağırlığı arttırırken 100 mM ve üzeri tuz kuru ağırlıkta azalmaya neden olmuştur. *Halopyrum mucronatum* bitkisi sırasıyla 0, 90, 180 360 mM tuz stresinin etkisinde kaldığında 90 mM'da taze ve kuru kök ile sürgün kütlelerinde en yüksek artışa ulaştığı, tuzluluğun çokça artması halinde de büyümenin engellendiği ve bunun neticesinde bitkinin ölümüne sebep olduğu saptanmıştır.

Ciniglia ve ark., (2010)'nin planladığı deneysel çalışma sonuçlarına göre bitkilerdeki PHÖ hayvanlardaki apoptozla nükleer parçalanma, kromatin yoğunlaşması gibi benzer özellikler göstermektedir. Diğer sonuçlarına göre de bitkilerde PHÖ'nün erken aşamalarında bitki belirli bir seviyeye kadar iyileşme aşamasına geçebilir; kromatin yoğunlaşmasına uğrayan hücreler, erken onarım mekanizmalarını devreye sokarak iyileştirme çalışmaları yürütebilir. Pennell ve

Lamb, (1997) aleuron hücrelerinde yaptıkları bir çalışmada PHÖ sonrasında hücrelerin küçüldüğünü ve sitoplazmanın yoğunlaştığını tespit etmişlerdir. Yapılan TUNEL deneyinin bulguları ile hücrelerde meydana gelen değişiklikler ortaya çıkarılmıştır. Hücrelerin şişmesi ve ardından parçalanması, DNA'nın parçalanması ve farklı büyüklükte ölü hücrelerin meydana gelmesi bu değişiklikleri oluşturmaktadır. Bir hücrenin apoptoza uğrayıp uğramadığı konusunda terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) analizi (TUNEL) yapılır. DNA 3' OH uçları bu analiz ile etiketlenir, dUTP analizi ile hücrede parçalanma olup olmadığı ortaya konulur ve ölmüş veya ölmek üzere olan çekirdekler işaretlenir. (Havel ve Durzan, 1996).

Zhu ve Rost, (2000) *Arabidopsis thaliana* bitkisine TUNEL analiz yöntemini uygulayarak kromatin yoğunlaşması, stopmazik vakuolasyon ve organel yıkımı tespit etmişlerdir. Joshi ve Kumar, (2012) deneysel çalışmalarında strese maruz kalan hücrede kromatin yoğunlaşması, membran bozulması ve parçalanması tespit etmişler yaptıkları TUNEL analizi sonucunda PHÖ gerçekleştiğini bulmuşlardır.

Ölü hücrelerde plazma zarının hücre duvarından ayrıldığı ve proplastın yoğunlaşarak küçüldüğü de saptanmıştır. Gunawardena, (2008) yaptığı TUNEL analizinde hücrelerde kromatin yoğunlaşması ve sitoplazmik değişiklikler tespit etmiştir. PHÖ'ye uğrayan hücrelerde ilk olarak hücre zarının bozulduğunu, ardından hücresel yoğunlaşmanın başladığını bildirmiştir. Yazdani ve Mahdieh, (2012)'in yaptıkları incelemelerde pirinç bitkisinin kök dokusu hücrelerine gerçekleştirilen farklı aşamalarda tuz stresi çalışmaları yapılmış ve hücrede ortaya çıkan hasarın saptanması için TUNEL analiz yöntemi uygulanmıştır.

Williams ve Dickman, (2008)'a göre PHÖ'de, hücre apoptozda görülen klasik değişikliklere uğrar. Bu değişiklikler kromatin yoğunlaşması, hücre büzülmesi ve DNA bölünmesi olup TUNEL analiz yöntemine göre pozitif olarak sonuçlanmaktadır. Sodyum ve bunun gibi yüksek konsantrasyonların etkisinde kalan bitki kök dokusu hücrelerine yapılan TUNEL analizi pozitif sonuç vermiştir. Bitki yüksek ölçüde tuz stresinin etkisinde kaldığında PHÖ'yü başlatarak daha fazla hücreyi korumak için birkaç hücreyi feda etmektedir. Gladish ve ark., (2006) yaptıkları deneysel uygulamada apoptoz benzeri programlı hücre ölümü bulguları saptamışlar, TUNEL analizi ve DNA agaroz jel

elektroforezi deneyi yapılmışlar, DAPI boyama sonucunda kontrol grubunda bulunan görüntülerde hücreler yuvarlak ve oval bir biçimdeyken 6, 12, 24 saat süresince su stresinin etkisinde kalan bezelyenin kök dokusu hücrelerinde kromatin yoğunlaşması ve bozulan hücrelerde kümelenmeler belirlenmişlerdir. Bu hücrelerin görüntüleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hasar alan hücrelerde parlamalar ve bozulmuş kromatinlerin dağıldığı görülmüş, hasar alan hücrelerin küçülmüş olduğu ve düzensiz şekillerinin olduğu tespit edilmiştir.

Ning ve ark., (2001)'nin deneysel çalışmalarında mısır kökleri sitototik reaktiflere maruz bırakılmış ve sonuç olarak kromatin yoğunlaşmaları, çekirdek düzensizliği, kromatinlerin defarmasyonları ve nükleollerin kaybı görülmüştür. TUNEL analizi ve DNA agaroz jel elektroforezi yapılmış, incelemeler sonucunda bitki hücrelerinde nükleus yuvarlak veya hilal şeklinde ve DNA parçalanmış şekilde görülmüştür. Wang ve Bostock, (1996) toksin ile muamele edilen domates bitkisinde PHÖ'yü araştırmak için TUNEL analizi yaparak pozitifliği göstermiş ve %50 hücrenin PHÖ'ye uğradığı TUNEL testi ile tespit edilmiştir. Başka bir incelemede *Vicia faba* bitkisi kafein stresine maruz bırakılmış ve hücrelerde görülen farklılaşmalar PHÖ oluşumunu akla getirmiştir. PHÖ oluşumunun ortaya konulması için COMET ve TUNEL testleri uygulanmış pozitif sonuç alınmıştır. Yapılan bu deneysel çalışmada kromatin yoğunlaşması, organellerin bozulması ve hücrelerin dejenerasyona uğradığı tespit edilmiştir (Rybaczek ve ark., 2015).

200, 300, 400 ve 500 mM tuz stresinin etkisinde kalan pirinç kök dokusu hücrelerinde dört saatin ardından PHÖ başlamış, hücre çekirdeklerinin küçüldükleri ve yoğunlaştıkları görülmüştür. Pirinç kök dokusu 500 mM tuz konsantrasyonuna 4 saat maruz bırakıldığında hücrelerin yoğunlaştığı ve dokunun TUNEL pozitif sonuç verdiği görülmüştür. Yazdani ve Mahdieh, (2012)'in yürüttüğü araştırmada pirinç bitkisinin köklerine uygulanan 500 mM tuz stresi sonucunda kök dokusunda kromatin yoğunlaşması ve hücre sel defarmasyon tespit edilmiş; DNA agaroz jel elektroforezi yapılarak kırıklar gözlenmiş ve TUNEL analizi pozitif sonuç vermiş, bitkinin PHÖ'ye uğradığı saptanmıştır.

Yapılan bir başka araştırmada mısırın kök dokularındaki mikrotübüller incelenmiş, 8 farklı grup oluşturularak meristematik hücrelerin interfaz

aşamasında aktif hücrelerdeki mikrotübül dizilerinin daha hızlı uzadığı ve genellikle enine diziler oluşturduğu görülmüştür. Yüksek oranda vakuolasyon oluşan ksilem dokusu incelenerek, mikrotübüllerin küme şeklinde organize oldukları tespit edilmiştir. Ksilemde hücre duvarı hasarıyla mikrotübül belirli bölgelerde yoğunlaştıkları ve sürekli yer değiştirdikleri de tespit edilmiştir (Baluska ve ark., 1992). Mısır kök dokusunda bisfenol kullanılarak yapılan stres çalışmasının sonucunda bisfenolün mikrotübül dizilerini ve mitoz bölünmeyi bozduğu; mikrotübül dizilerinin düzensizleştiği, hücre bölünmesinin bozulduğu veya tamamen durduğu görülmüştür. 1 saat 100 mg bisfenol uygulanan köklerde değişiklikler başlamış ve 2 saat sonunda halka benzeri kortikal aktin filamentler tespit edilmiştir. Uygulanan bisfenol miktarı arttıkça mikrotübüllerin şekilleri ve yönleri değişikliğe uğramıştır (Stavropoulou ve ark., 2018). Bir başka çalışmada, hücrenin genişleme yönü değiştiğinde mikrotübüllerin de hizalanma şekillerinde değişikliğin olduğu görülmüştür. Kortikal mikrotübüller genelde enine doğru dizelenirken yavaş büyüyen dokularda uzunlamasına dizelere değiştikleri belirlenmiştir (Himmelspace ve Nick, 2001).

Kortikal mikrotübüller hücre duvarının altında bulunabilirler. Mısır bitkisinde yapılan çalışmada hızlı büyüyen hücrelerde kortikal mikrotübüllerin enine, daha yavaş büyüyenlerde ise uzunlamasına bir yönde dizildikleri görülmüştür (Himmelspace ve Nick, 2001). Bitki morfogenezinde oksin önemli bir bitki hormonudur. Çalışmalar oksinin bitkideki mikrotübül şekillenmesini ve yönünü etkilediğini kanıtlamıştır. Mısır bitkisinde mekanik stres ve oksin uygulaması kaynaklı değişiklikler tespit edilmiş, mikrotübüllerin hücrenin şekillenmesinde ve selülozun uzunluğunda etkin oldukları belirlenmiştir (Landrein ve Hamant, 2013). Bir diğer çalışmada, oksin ile muamele edilen mısır bitkisinin koleoptil dokusu hücrelerinde mikrotübüller enine, kök dokusu hücrelerinde ise uzunlamasına yönlendirilmiştir. Mikrotübüller uzama aşamasındaki tepkilere hızlı reaksiyon verir ve bükülme gerçekleştirir. Plazma membranına bakıldığında ilişkili olan mikrotübüllerin mekanik strese büyümeyi değiştirdiği görülmüştür. (Fischer ve Schopfer, 1997). Yapılan bir deneysel çalışmada *Arabidopsis thaliana*'nın köklerinde, mikrotübülün etkileri incelenmiş ve tüm konsantrasyonlarda mikrotübüllerin düzensiz olduğu,

parçalandığı, kortikal dizilerin düzensiz olduğu ve membran akışkanlığının etkilendiği görülmüştür (Baskin ve ark., 1994).



4. SONUÇ

Gerçekleştirilen bu çalışmada mısır (*Zea mays* L.) bitkisinin tuz stresine maruz kaldığında yaşadığı hücresel değişikliklerden mikrotübül değişimleri florasan mikroskop ile araştırıldı. Ülkemiz açısından ekonomik değeri olan mısır türü üzerinde birçok çalışma yapılmaktadır. Bu çalışmaların çoğu türün genetik yapısı üzerine kurulu olup, stres ilişkili programlı hücre ölümü (PHÖ) süreci üzerine ayrıntılı ve özellikle stresin yarattığı PHÖ ilişkili mikrotübül değişiklikleri hemen hemen hiç araştırma yapılmamıştır. Tezimizde tuz stresinin yol açtığı değişimin derecesi ortaya çıkarılmıştır. Çok az çalışmadan biri olan bu çalışmada PHÖ ve mikrotübül dağılımı arasında ilişki detaylandırılmıştır.

50 mM, 100 mM, 300 mM, 500 mM tuz stresine 15 ve 30 dakika, 1, 2, 6, 12 ve 24 saat boyunca maruz kalan mısır kök dokusunun, parafin metodu uygulanarak Leica RM 2125 RT el mikrotomu ile kesitleri alındı. Alınan kesitlere DAPI (4-6-diamidino-2-fenilindol) boyama, TUNEL ve mikrotübül etiketleme analizleri uygulandı ve florasan mikroskopu ile incelendi. DAPI boyama ile elde edilen bulgularda 50 mM dan itibaren mısır kök dokusu hücrelerinin tuz stresine tepki verdiği, bu tepkilerin kromatin yoğunlaşması, düzensiz şekilli nukleuslar ve sitoplazma büzülmesi olduğu tespit edildi. Maruz kaldığı tuz seviyesi arttıkça 30 dakika, 1 ve 2 saat uygulama sürelerinde verilen tepkilerle 6, 12 ve 24 saatte verilen tepkilerin birbirlerine daha benzer olduğu belirlendi. 100 mM da kenar bölgelerin haricinde orta bölgedeki hücrelerde de bozulmaların başladığı ve süre uzatıldıkça bozulmaların hızlandığı ve yoğunlaştığı tespit edildi. 300 mM da oluşan hasarın 15 dakikadan itibaren hızlı başladığı ve hücrelerin hızlı bir şekilde yoğunlaştığı 30 dakikadan itibaren hücrelerin küre hallerini kaybettikleri ve 1 saatten sonra yalancı parlamaların oluştuğu tespit edildi. 500 mM da 30 dakikadaki görüntünün 300 mM tuz konsantrasyonuna maruz bırakılmış mısır kök dokusu hücrelerinin görüntüsüne

benzer olduğu, hücresel bozuklukların artık kök dokusunun bütününe yayıldığı yalancı parlamanın 1. saatten itibaren dahada yoğunlaştığı tespit edildi

DAPI analizi ile elde edilen bulgular neticesinde mısır kök dokusu hücrelerinde programlı hücre ölümü (PHÖ) olup olmadığını tespit etmek için TUNEL analizi uygulandı ve hücrelerin PHÖ'ye uğradığı tespit edildi. Edilen bulgularda 50 Mm dan itibaren mısır kök dokusu hücrelerinin tuz stresine tepki verdiği, bu tepkilerin zayıf, orta ya da şiddetli parlamalar şeklinde ve kök dokusunda özellikle kenar ve ilerleyen evrelerde orta kısımdaki dokularda bölgesel oldukları gözlemlendi. Maruz kaldığı tuz seviyesi arttıkça DAPI boyamada olduğu gibi 30 dakika, 1 ve 2 saat uygulama sürelerinde verilen tepkilerle 6, 12 ve 24 saatte verilen tepkilerin birbirlerine daha benzer olduğu belirlendi. 100 mM da kenar kısımlardaki parlamanın orta kısımlara göre daha belirgin olduğu, 30 dakika ve 1 saat görüntüsünün benzer olduğu, 1 saatten sonra kökün bütününde parlamaların arttığı ve süre ilerledikçe oluşan parlamalarda yalancı parlamaların artmaya başladığı tespit edildi. 300 mM da dokunun yüksek derece pozitif sonuç verdiği, özellikle süre 1 ve 2 saate uzatıldığında parlamaların kenar kısımlar haricinde orta kısımlarda da hızlıca yayıldığı, sürenin 6, 12 ve 24 saatlere ilerledikçe nukleusların yapılarını kaybettiği ve doku yapısının genel itibari ile yüksek oranda hasarlı olduğu tespit edildi. 500 mM da başlangıçta parlama şiddetinin zayıf ama pozitif olduğu süre ilerledikçe bu bozulmanın önceki uygulamalara göre (50, 100, 300 mM) daha kısa sürede hızlandığı, 1 saate dokunun genelinde parlamaların oluştuğu ve hücrenin bütünlüğünü kaybettiği, süre ilerletildikçe kenar ve orta hatta yalancı parlamaların bariz olduğu ve ışımaların genel itibari ile şiddetli pozitif olduğu tespit edildi.

PHÖ'ye uğrayan hücrelerde mikrotübül organizasyonunun incelenmesi için mikrotübül etiketleme analizi uygulandı ve PHÖ'ye uğrayan mısır kök dokusu hücrelerinde PHÖ'den önce mikrotübüllerin hücre çerçevesine paralel uzandıkları, nukleus ve vakuolün etrafında toplandıkları görüldü. Elde edilen sonuçlar 50 mM dan itibaren mısır kök dokusu hücrelerinin tuz stresine verdiği tepki sonucu görülen PHÖ sürecinde mikrotübül organizasyonunda nukleus ve vakuolün etrafında kümelenme, bölgesel kalınlaşma ve rastgele bir dağılım sergiledikleri maruz kaldığı tuz seviyesi arttıkça nukleus çevresinde mikrotübüllerin düzensizliğinde artışların olduğu, hücre duvarına paralel mikrotübül uzantıları

oluştugu ve bu görüntülerinde belirli bir zaman sonra nukleusun ve vakuollerin sarıldığı bir bant görünümüne dönüştüğü izlendi. PHÖ'nün çok ilerlediği evreler olan 6, 12 ve 24 saat uygulama sürelerinde mikrotübül demetlerinin birden fazla yerde yoğun ve düzensiz olduğu sonucuna ulaşıldı. 100 mM da mikrotübüllerin az seviyede bozularak nukleus etrafında kümelenmelerin başladığı, süre kademeli olarak ilerletildikçe nukleus etrafındaki kümelenmelerin yoğunlaşarak devam ettiği ve mikrotübüllerin düzensizliklerinin oldukça ilerdiği özellikle süre 12 ve 24 saate uzatıldığında mikrotübül yoğunlaşmalarının arttığı ve vakuollerin etrafında yoğunlaştıkları tespit edildi. 300 mM da mikrotübül demetlerinin düzenli hallerinin başlangıçtan itibaren yüksek seviyede bozulduğu, sürenin kademeli olarak artırıldığında ileri düzeyde potizif olarak mikrotübül demetlerinin bir çok yerde düzensiz şekilde kümelendiği tespit edildi. 500 mM da mikrotübül demetlerinin orta şiddetli olarak bozulmaya başladığı ve süre arttırıldıkça bu bozulmanın hızlanarak mikrotübüllerin nukleusun ve vakuollerin etrafında kalın bir bant görünümüne dönüştükleri ve bozulmanın ileri düzeyde olduğu 12 ve 24 saate benzer görüntünün oluştuğu ve mısır dokusundaki mikrotübülleri gözlemenin zorlaştığı ve hücrelerin çoğu yerinde düzensiz mikrotübül kümelenmelerinin olduğu sonucuna ulaşıldı.

Bu araştırmada elde edilen önemli bulgular neticesinde dikkate değer sonuçlar elde edilmiştir. Bu sonuçlar maddeler halinde aşağıda açıklanmıştır.

[1] Mısır bitkisi tuz stresine karşı toleranslı bir bitki değildir ve bitkinin yaşadığı stres koşulları ne kadar yüksek olursa hücrede oluşan hasarda o kadar yüksek olmaktadır. Mısır bitkisinin maruz kaldığı tuz miktarı 50 mM, 100 mM, 300 mM, 500 mM şeklinde arttırıldıkça bitkinin aldığı hasar 15 dakikadan 2 saate kadar daha oranlı, 2 saatten 24 saate doğru ise orantısız bir artış gösterdiği ve 12 ve 24 saatin benzer bir sonuç verdiği belirlendi.

[2] Mısır bitkisinin aldığı hasar sonucunda ortaya çıkan PHÖ, DAPI boyama ve TUNEL analizi yöntemleriyle ayrıntılı bir biçimde gösterilmiştir. Mısır bitkisi etkisinde kaldığı tuz stresinden dolayı kök dokusu hücrelerinde kromatin yoğunlaşması, düzensiz şekilli nukleuslar ve stoplazma büzülmesi gibi hücresel değişiklikler gösterdiği DAPI analiz metodu ile saptanmıştır. Hücresel

değişiklikler saptanan mısır kök hücrelerine PHÖ'nün saptanması için TUNEL analiz yöntemi uygulanmış ve elde edilen sonuç pozitif olarak saptanmıştır.

[3] PHÖ'nün mısır kök dokusu hücrelerindeki mikrotübül organizasyonuna etkisi incelenmiş ve PHÖ'nün hücredeki mikrotübül organizasyonunu etkilediği saptanmıştır.



KAYNAKÇA

- Ahanger, M. A., Akram, N. A., Ashraf, M., Alyemeni, M. N., Wijaya, L., ve Ahmad, P. (2017). Plant responses to environmental stresses—from gene to biotechnology. *AoB Plants*, 9(4). 17 pages
- Akay, H., Öztürk, E., Sezer, İ., ve Bahadır, M. C. (2019). Effects of Different Salt Concentrations on Germination and Early Seedling Growth in Sugar Maize (*Zea mays* L. Var. *sacharata* sturt.) Cultivars. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 7(sp2), 103-108.
- Akyol, T. Y., Yilmaz, O., Uzilday, B., Özgür Uzilday, R., ve Türkan, İ. (2020). Plant response to salinity: An analysis of ROS formation, signaling, and antioxidant defense. *Turkish Journal of Botany*, 44(1), 1–13.
- Ali, M., Afzal, S., Parveen, A., Kamran, M., Javed, M. R., Abbasi, G. H., Malik, Z., Riaz, M., Ahmad, S., Chattha, M. S., Ali, M., Ali, Q., Uddin, M. Z., Rizwan, M., ve Ali, S. (2021). Silicon mediated improvement in the growth and ion homeostasis by decreasing Na⁺ uptake in maize (*Zea mays* L.) cultivars exposed to salinity stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 158(September 2020), 208–218.
- Ali, Q. (2021). Rhizobial consortium improves germination attributes and salinity tolerance in maize (*Zea mays* L.). *Plant and Environment*, 1(02), 130-137.
- Amor, N. B., Hamed, K. B., Debez, A., Grignon, C., ve Abdelly, C. (2005). Physiological and antioxidant responses of the perennial halophyte *Crithmum maritimum* to salinity. *Plant Science*, 168(4), 889-899.
- Aydın, İ. (2015). Tuz stresinin bazı kültür bitkilerinde çimlenme ve fide gelişimi üzerine etkileri. *Muş Alparslan Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 3(2). 360-366.
- Aydinoğlu, F., & Akgül, B. Mısır (*Zea mays* L.) bitkisinin üşüme stresine toleransı sırasında yaprak büyüme bölgelerinde mikroRNA aracılıklı redoks regülasyonunun incelenmesi. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, 34(2), 172-183.
- Aydinoğlu, F., ve Akgül, B. (2021). Mısır (*Zea mays* L.) bitkisinin üşüme stresine toleransı sırasında yaprak büyüme bölgelerinde mikroRNA aracılıklı redoks regülasyonunun incelenmesi. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi* 34(2) 172 - 183,
- Aytürk, Ö., DİÖİK *Ficus caria* L. (İNCİR)'De Dişi, Gal Ve Erkek Çiçek Gelişiminin Mikroskopik Ve Moleküler Yöntemlerle, Yayınlanmamış Doktora Tezi, Marmara Üniversitesi, 2016
- Bajji, M., Kinet, J. M., ve Lutts, S. (1998). Salt stress effects on roots and leaves of *Atriplex halimus* L. and their corresponding callus cultures. *Plant science*, 137(2), 131-142.
- Ballaré, C. L., Caldwell, M. M., Flint, S. D., Robinson, S. A., ve Bornman, J. F. (2011). Effects of solar ultraviolet radiation on terrestrial ecosystems.

- Patterns, mechanisms, and interactions with climate change. *Photochemical and Photobiological Sciences*, *10*(2), 226–241
- Baluska, F., Parker, J. S., ve Barlow, P. W. (1992). Specific patterns of cortical and endoplasmic microtubules associated with cell growth and tissue differentiation in roots of maize (*Zea mays* L.). *Journal of Cell Science*, *103*(1), 191–200.
- Baskin, T. I., Wilson, J. E., Cork, A., ve Williamson, R. E. (1994). Morphology and microtubule organization in arabidopsis roots exposed to oryzalin or taxol. *Plant and Cell Physiology*, *35*(6), 935–942.
- Bayramoğlu, Z., ve Bozdemir, M. (2018). Türkiye’de üretilen mısırın ekonomik gelişim seyri. *Türk Tarım-Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi*, *6*(8), 1092–1100.
- Biancaflor, E. B., ve Hasenstein, K. H. (1993). Organization of cortical microtubules in graviresponding maize roots. *Planta*, *191*(2), 231–237.
- Blancaflor, E. B., Jones, D. L., ve Gilroy, S. (1998). Alterations in the cytoskeleton accompany aluminum-induced growth inhibition and morphological changes in primary roots of maize. *Plant Physiology*, *118*(1), 159–172.
- Borowiak, M., Nahaboo, W., Reynders, M., Nekolla, K., Jalinot, P., Hasserodt, J., Rehberg, M., Delattre, M., Zahler, S., Vollmar, A., Trauner, D., ve Thorn-Seshold, O. (2015). Photoswitchable Inhibitors of Microtubule Dynamics Optically Control Mitosis and Cell Death. *Cell*, *162*(2), 403–411.
- Carrasco-ríos, L., ve Pinto, M. (2014). Effect of salt stress on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in leaves in two contrasting corn , ‘ Lluteño ’ and ‘ Jubilee .’ *74*(March).
- Choudhury, F. K., Rivero, R. M., Blumwald, E., ve Mittler, R. (2017). Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *Plant Journal*, *90*(5), 856–867.
- Çiçek, N., ve Çakırlar, H. (2002). The effect of salinity on some physiological parameters in two maize cultivars. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*, *28*, 66–74.
- Ciniglia, C., Pinto, G., Sansone, C., ve Pollio, A. (2010). Acridine orange/Ethidium bromide double staining test: A simple In-vitro assay to detect apoptosis induced by phenolic compounds in plant cells. *Allelopathy Journal*, *26*(2), 301–308.
- Doğru, A. (2020). Bitkilerde Aktif Oksijen Türleri ve Oksidatif Stres. *International Journal of Life Sciences and Biotechnology*, *3*(2), 205–226.
- Fahad, S., ve Bano, A. (2012). Effect Of Salicylic Acid On Physiological And Biochemical Characterization Of Maize Grown In Saline Area. *44*(4), 1433–1438.
- Farooq, M., Hussain, M., Wakeel, A., Kadambot, H. M., Farooq, M., Hussain, M., Wakeel, A., Siddique, K. H. M., Farooq, M., Hussain, M., ve Wakeel, A. (2016). Salt stress in maize : effects , resistance mechanisms , and management . A review To cite this version : HAL Id : hal-01284306 Salt stress in maize : effects , resistance mechanisms , and management . A review.
- Fischer, K., ve Schopfer, P. (1997). Interaction of auxin, light, and mechanical stress in orienting microtubules in relation to tropic curvature in the epidermis of maize coleoptiles. *Protoplasma*, *196*(1–2), 108–116.
- Ge, T., Sui, F., Bai, L., Tong, C., ve Sun, N. (2012). Effects of water stress on

- growth, biomass partitioning, and water-use efficiency in summer maize (*Zea mays* L.) throughout the growth cycle. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34(3), 1043–1053.
- Gladish, D. K., Xu, J., ve Niki, T. (2006). Apoptosis-like programmed cell death occurs in procambium and ground meristem of pea (*Pisum sativum*) root tips exposed to sudden flooding. *Annals of Botany*, 97(5), 895–902.
- Gola, A. Q., Baloch, M. N., Mahesar, M. A., Abro, J. A., Mastoi, M. S., & Aziz, T. (2019). 59. Effect of salt (NaCl) stress on germination and early seedling growth of muskmelon (*Cucumis melo* L.). *Pure and Applied Biology (PAB)*, 8(1), 572-579.
- Gölge, B., ARPA (*Hordeum vulgare* L.) Köklerinde Alüminyum İle Uyarılmış Programlı Hücre Ölümünün İmmünohisto Kimyasal Analizi, Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi, 2018.
- Gunawardena, A. H. L. A. N. (2008). Programmed cell death and tissue remodelling in plants. 59(3), 445–451.
- Havel, L., ve Durzan, D. J. (1996). Apoptosis in plants. *Botanica Acta*, 109(4), 268–277.
- Himmelspach, R., ve Nick, P. (2001). Gravitropic microtubule reorientation can be uncoupled from growth. *Planta*, 212(2), 184–189.
- Joshi, R., ve Kumar, P. (2012). Lysigenous aerenchyma formation involves non-apoptotic programmed cell death in rice (*Oryza sativa* L.) roots. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 18(1), 1–9.
- Khedr, A. H. A., Abbas, M. A., Abdel Wahid, A. A., Quick, W. P., ve Abogadallah, G. M. (2003). Proline induces the expression of salt-stress-responsive proteins and may improve the adaptation of *Pancreaticum maritimum* L. to salt-stress. *Journal of Experimental Botany*, 54(392), 2553–2562.
- Kılınç, Sevde, Mısır'da (*Zea mays* L.) Bazı Fiyolojik Parametreler İle Verim Ve Verim Unsurları Arasındaki İlişkilerin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Siirt Üniversitesi, 2016
- Korkmaz, H., ve Durmaz, A. (2017). Bitkilerin Abiyotik Stres Faktörlerine Verdiği Cevaplar Responses of Plants to Abiotic Stress Factors. *Gufbed*, 7(2), 192–207.
- Köseoğlu, S., Tuz Stresi Altındaki Mısır (*Zea mays* L.) Bitkisinde Salisilik Asit Uygulamalarının Fizyolojik Ve Biyokimyasal Etkisinin Araştırılması, Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi, 2019
- Landrein, B., ve Hamant, O. (2013). How mechanical stress controls microtubule behavior and morphogenesis in plants: History, experiments and revisited theories. *Plant Journal*, 75(2), 324–338.
- Lizárraga-Paulí, E. G., Torres-Pacheco, I., Moreno-Martínez, E., ve Miranda-Castro, S. P. (2011). Chitosan application in maize (*Zea mays*) to counteract the effects of abiotic stress at seedling level. *African Journal of Biotechnology*, 10(34), 6439–6446.
- Lü, B., Gong, Z., Wang, J., Zhang, J., ve Liang, J. (2007). Microtubule dynamics in relation to osmotic stress-induced ABA accumulation in *Zea mays* roots. *Journal of Experimental Botany*, 58(10), 2565–2572.
- Lü, B., Gong, Z., Wang, J., Zhang, J., ve Liang, J. (2007). Microtubule dynamics in relation to osmotic stress-induced ABA accumulation in *Zea mays* roots. *Journal of Experimental Botany*, 58(10), 2565–2572.
- Macar, Tuğçe, Genetiği Değiştirilmiş (Trasgenik) Mısır (*Zea mays* L.) Tohumlarında Bazı Biyokimyasal ve Fizyolojik Parametrelerin Araştırılması, Doktora

Tezi, Giresun Üniversitesi, 2017

- Marcus, A. I., Moore, R. C., ve Cyr, R. J. (2001). The role of microtubules in guard cell function. *Plant Physiology*, 125(1), 387–395.
- Martinière, A., Gargani, D., Uzest, M., Lautredou, N., Blanc, S., ve Drucker, M. (2009). A role for plant microtubules in the formation of transmission-specific inclusion bodies of Cauliflower mosaic virus. *Plant Journal*, 58(1), 135–146.
- Mollinedo, F., ve Gajate, C. (2003). Microtubules, microtubule-interfering agents and apoptosis. *Apoptosis*, 8(5), 413–450.
- Muratov, A., ve Baulin, V. A. (2015). Mechanism of dynamic reorientation of cortical microtubules due to mechanical stress. *Biophysical Chemistry*, 207, 82–89.
- Niknam, V., Bagherzadeh, M., Ebrahimzadeh, H., ve Sokhansanj, A. (2004). Effect of NaCl on biomass and contents of sugars, proline and proteins in seedlings and leaf explants of *Nicotiana tabacum* grown in vitro. *Biologia Plantarum*, 48(4), 613–615.
- Ning, S. B., Wang, L., Li, Z. Y., Jin, W. W., ve Song, Y. C. (2001). Apoptotic cell death and cellular surface negative charge increase in maize roots exposed to cytotoxic stresses. *Annals of Botany*, 87(5), 575–583.
- Öztürk, Nevin, Ülkemizde Yaygın Olarak Yetiştirilen Şeker Mısır (*Zea mays* L. var. saccharata) Varyetelerinin Genetik Çeşitlilik Ve Filogenetik İlişkilerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi, 2017
- Parida, A. K., Das, A. B., Mitra, B., ve Mohanty, P. (2004). Salt-stress induced alterations in protein profile and protease activity in the mangrove *Bruguiera parviflora*. *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, 59(5–6), 408–414.
- Parida, A. K., ve Das, A. B. (2005). Salt tolerance and salinity effects on plants: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60(3), 324–349.
- Pennell, R. I., ve Lamb, C. (1997). Programmed cell death in plants. *Plant Cell*, 9(7), 1157–1168.
- Petrov, V., Hille, J., Mueller-Roeber, B., & Gechev, T. S. (2015). ROS-mediated abiotic stress-induced programmed cell death in plants. *Frontiers in plant science*, 6, 69.589-600
- Rahman, M., Ahmad, I., Rahman, M. U., ve Gul, S. (2014). Effects of Water Stress on Growth and Photosynthetic Pigments of Corn (*Zea mays* L.) Cultivars Production of proteases View project Effects of Water Stress on Growth and Photosynthetic Pigments of Corn (*Zea mays* L.) Cultivars. December 2014.
- Rocha, G. L., Fernandez, J. H., Oliveira, A. E. A., & Fernandes, K. V. S. (2017). Programmed cell death-related proteases in plants. *Enzyme Inhibitors and Activators*, 70(7): 1991–1995.
- Rybackek, D., Musialek, M. W., ve Balcerczyk, A. (2015). Caffeine-induced premature chromosome condensation results in the apoptosis-like programmed cell death in root meristems of *Vicia faba*. *PLoS ONE*, 10(11), 1–33.
- Schweizer D (1976). Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. *Chromosoma*, 58, 307-324.
- Seleiman, M. F., Al-Suhaibani, N., Ali, N., Akmal, M., Alotaibi, M., Refay, Y., ... ve Battaglia, M. L. (2021). Drought stress impacts on plants and different approaches to alleviate its adverse effects. *Plants*, 10(2), 259-274

- Sönmez, E., Tuz Stresi Altındaki Mısır (*Zea mays* L.) Bitkisinde Potasyum Uygulamalarının Fizyolojik Ve Biyokimyasal Etkisinin Araştırılması, Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi, 2019
- Soothar, M. K., Kader, A., Hamani, M., ve Sootahar, M. K. (2021). Assessment of Acidic Biochar on the Growth, Physiology and Nutrients Uptake of Maize (*Zea mays* L.) Seedlings under Salinity Stress. *Sustainability*, 13(6), 3150..
- Stavropoulou, K., Adamakis, I. D. S., Panteris, E., Arseni, E. M., ve Eleftheriou, E. P. (2018). Disruption of actin filaments in *Zea mays* by bisphenol A depends on their crosstalk with microtubules. *Chemosphere*, 195, 653–665.
- Süzer, S., 2004. Mısır tarımı, Trakya Tarımsal Enstitüsü Yay.Edirne.
- Sychta, K., Słomka, A., & Kuta, E. (2021). Insights into plant programmed cell death induced by heavy metals—discovering a terra incognita. *Cells*, 10(1), 65–86.
- Szalai, G., Páldi, E., ve Janda, T. (2005). Effect of salt stress on the endogenous salicylic acid content in maize (*Zea mays* L.) plants. 49(1993), 47–48.
- Škalamera, D., ve Heath, M. C. (1998). Changes in the cytoskeleton accompanying infection-induced nuclear movements and the hypersensitive response in plant cells invaded by rust fungi. *Plant Journal*, 16(2), 191–200.
- Tekiş, A., Kuraklık Stresi Altındaki Mısır Fidelerine (*Zea Mays* L.) Dışarıdan Selenyum (Se) Uygulamalarının Büyüme Parametreleri, Su Durumu Ve Lipid Peroksidasyonu Üzerine İyileştirici Etkilerinin Belirlenmesi, Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi, 2016
- Uetake, Y., ve Peterson, R. L. (1998). Association between microtubules and symbiotic fungal hyphae in protocorm cells of the orchid species, *Spiranthes sinensis*. *New Phytologist*, 140(4), 715–722.
- Vernoud, V., Hajdich, M., Khaled, A. S., Depège, N., ve Rogowsky, P. M. (2005). Maize embryogenesis. *Maydica*, 50(3–4), 469–483.
- Wang, H., Li, J., Bostock, R. M., ve Gilchrist, D. G. (1996). Apoptosis: a functional paradigm for programmed plant cell death induced by a host-selective phytotoxin and invoked during development. *The Plant Cell*, 8(3), 375–391.
- Williams, B., ve Dickman, M. (2008). Plant programmed cell death: Can't live with it; Can't live without it. *Molecular Plant Pathology*, 9(4), 531–544.
- Wang, M., Hoekstra, S., Van Bergen, S., Lamers, G. E. M., Oppedijk, B. J., Van Der Heijden, M. W., De Priester, W., ve Schilperoort, R. A. (1999). Apoptosis in developing anthers and the role of ABA in this process during androgenesis in *Hordeum vulgare* L. *Plant Molecular Biology*, 39(3), 489–501
- Wasteneys, G. O. (2002). Microtubule organization in the green kingdom: Chaos or self-order? *Journal of Cell Science*, 115(7), 1345–1354.
- Yazdani, M., ve Mahdieh, M. (2012). Salinity Induced Apoptosis in Root Meristematic Cells of Rice. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, July 2015, 40–43.
- Zamyatnin, A. A. (2015). Plant Proteases Involved in Regulated Cell Death. *Biochemistry (Moscow)*, 80(13), 1701–1715.
- Zhu, T., ve Rost, T. L. (2000). Directional cell-to-cell communication in the Arabidopsis root apical meristem III. Plasmodesmata turnover and apoptosis in meristem and root cap cells during four weeks after

germination. *Protoplasma*, 213(1–2), 99–107.

1000çiftçi1000bereket web sitesi:

<https://www.1000ciftci1000bereket.com/duyurular-etkinlikler-blog/blog/turk-mutfaginda-misirin-yeri>

Erişim Tarihi: 17.01.2022.



ÖZGEÇMİŞ

1. Adı Soyadı: Emre KÖSEOĞLU

2. Öğrenim Durumu: Yüksek Lisans

Derece	Alan	Üniversite	Yıl
Lisans	Gastronomi ve Mutfak Sanatları	Maltepe Üniversitesi	2019
Y. Lisans	Gastronomi ve Mutfak Sanatları	İstanbul Ayvansaray Üniversitesi	2022

3. Yönetilen Yüksek Lisans ve Doktora Tezleri:

3.1. Bitirilen Yüksek Lisans Tezleri

1. KÖSEOĞLU, Emre (2022). GASTRONOMİK BİR DEĞER OLAN MISIR (ZEA MAYS L.)'İN STRES ALTINDA MİKROTÜBÜL HÜCRE İSKELETİ DAVRANIŞI