



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**HİDROJEN SÜLFÜR'ÜN (H₂S) KURAKLIK
TOLERANSI SAĞLAMADAKİ ETKİLERİNİN
BİYOKİMYASAL VE GEN İFADESİ
DÜZEYİNDE DOMATES (*SOLANUM
LYCOPERSICUM L.*) BİTKİSİNDE
ARAŞTIRILMASI**

Muhammed ANDİÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

**Temmuz-2020
KONYA
Her Hakkı Saklıdır**

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

Muhammed ANDİÇ
24.07.2020

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİDROJEN SÜLFÜR'ÜN (H₂S) KURAKLIK TOLERANSI SAĞLAMADAKİ ETKİLERİNİN BİYOKİMYASAL VE GEN İFADESİ DÜZEYİNDE DOMATES (*SOLANUM LYCOPERSICUM L.*) BİTKİSİNDE ARAŞTIRILMASI

Muhammed ANDİÇ

Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoteknoloji Anabilim Dalı

I.Danışman :Doç. Dr. Mustafa YÖNTEM

II.Danışman :Dr. Öğr. Üyesi Fatih ERCİ

2020, 45+XIII Sayfa

Jüri

Doç. Dr. Gökhan ZENGİN

Doç. Dr. Mustafa YÖNTEM

Dr. Öğr. Üyesi Ali Tevfik UNCU

H₂S'in bitki büyüme ve gelişimi üzerinde etkileri olduğu uzun zamandır bilinmekle birlikte, sinyal moleküllü fonksiyonlarının araştırılması ancak son birkaç yıla dayanmaktadır. İlgili çalışmalar, bitkilerde abiyotik stres altında H₂S birikiminin arttığını rapor etmekte ve mikro molar düzeyde H₂S uygulamasının abiyotik stres toleransı sağlamada etkili olduğuna göstermektedir. Kuraklık tarımsal üretimde verim kaybına sebep olan büyük etmenlerden biridir ve yakın gelecekte dünya üzerinde kuraklıktan etkilenen alan ve kuraklığın etki derecesinin artacağı ön görülmektedir. H₂S in mevcut literatür ile bildirilen bitkilerde kuraklık toleransı sağlama etkisi ümit vericidir ancak çalışmaların çoğunluğu *Arabidopsis* 'te gerçekleştirilmiş olup majör tarım ürünlerinde molekülün kuraklık cevabına etkisinin incelendiği çalışmalar son derece sınırlıdır. Domates dünya genelinde tüketilen başlıca tarım ürünlerinden biri olup ülkemiz tarım ekonomisi için büyük öneme sahip olması ile birlikte bitki fizyolojisi ile moleküler biyoloji ve genetik çalışmaları için önemli bir model organizmadır.

Çalışma kapsamında H₂S uygulamasının kuraklık koşulları altında abiyotik stres cevabı ile ilişkili gen ifadesine olası etkileri absisik aside duyarlı ve absisik asitten bağımsız yollar göz önüne alınarak ve stres cevabı ile ilişkili mikro RNA ve mikro RNA'ya duyarlı genler de çalışmaya dahil edilerek araştırılmıştır. H₂S uygulamasının hücre zararı markörü bileşikler ve antioksidan enzimlerin birikimine etkileri kimyasal analizler ile belirlenmiştir.

Yapılan çalışmalar sonucunda H₂S'in domates bitkisinde kuraklık toleransı sağlamada etkili olduğu ortaya çıkmıştır. H₂S uygulanan gruplarda MDA birikimi daha az olmuş, antioksidan enzim miktarlarında ise çok fazla artış olmuştur. Gen ekspresyonu çalışmalarının tamamında kuraklık stresi altında NaHS uygulanan gruptaki ekspresyon oranı kontrol grubuna ve kuraklık uygulaması altındaki kontrol grubuna göre daha fazla olduğu gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Abiyotik Stres, Domates, Gen İfadesi, Hidrojen Sülfür, Kuraklık, miRNA

ABSTRACT

MS THESIS

INVESTIGATING THE ROLE OF HYDROGEN SULFIDE (H₂S) TO IMPROVE DROUGHT TOLERANCE AT BIOCHEMICAL AND GENE EXPRESSION LEVELS IN TOMATO PLANT (*SOLANUM LYCOPERSICUM L.*)

Muhammed ANDİÇ

**THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF
NECMETTİN ERBAKAN UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY**

I.Advisor: Assoc. Prof. Dr. Mustafa YÖNTEM

II.Advisor: Assist. Prof. Dr. Fatih ERCİ

2020, 45+XIII Pages

Jury

Assoc. Prof. Dr. Gökhan ZENGİN

Assoc. Prof. Dr. Mustafa YÖNTEM

Assist. Prof. Dr. Ali Tevfik UNCU

While it has been acknowledged for long that H₂S has effects on plant growth and development, its functions as a putative signaling molecule are only recently being investigated. On the other hand, relevant research indicates that H₂S accumulation increases in response to abiotic stress and applications of H₂S in micro molar concentrations display effects of improved drought tolerance. Drought is among the major causes of yield losses in agricultural production and, both the area of affected land and the degree of drought effect are predicted to expand in the near future. Despite promising results regarding the effect of H₂S to confer drought tolerance in plants, majority of relevant work has been conducted in *Arabidopsis* with few such studies conducted in major food crops. Tomato is one of the main agricultural products consumed worldwide, and it is an important model organism for plant physiology and molecular biology and genetic studies, as well as having great importance for our country's agricultural economy.

In the proposed work, the effects of H₂S application under drought stress will be evaluated based on gene expression changes that involve abiotic stress response related genes representing both abscisic acid responsive and independent pathways. Gene expression analyses will also target stress responsive micro RNA and micro RNA regulated genes. Chemical analyses will involve investigating the effects of H₂S application on the accumulation of cell damage markers and antioxidant enzymes.

As a result of the studies, it has been revealed that H₂S is effective in providing drought tolerance in tomato plants. In experimental groups treated with H₂S, MDA accumulation was less, and antioxidant enzyme amounts increased more than another experimental groups. In all gene expression studies, the rate of expression in the group undergoing NaHS under drought stress was significantly higher than the control group and the control group under drought practice.

Keywords: Abiotic Stress, Drought, Gene Expression, Hydrogen Sulfide, miRNA, Tomato

ÖNSÖZ

Gelecek kariyerimi akademi alanında yapmaya karar vermemde gerek üstün bilgi birikimiyle gerek başarılarıyla gerekse öğrencilerine bir baba şefkati ile yaklaşımıyla bana ilham kaynağı olan ve yapmış olduğum bu çalışmamda yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, saygıdeğer danışmanım, Doç. Dr. Mustafa YÖNTEM 'e sonsuz şükranlarımı sunuyorum.

Vermiş olduğu fikirlerle her zaman ufkumuzu açan ve yapmış olduğum tez çalışmamdaki ikinci danışmanım olan Dr. Fatih ERCİ 'ye ve her zaman yoğun olmasına rağmen hiçbir zaman öğrencilerini geri çevirmeyen, alanına olan aşkı ile hepimizin gönlünde taht kurmuş, laboratuvar çalışmalarında desteklerini her zaman hissettiğim Dr. Ali Tevfik UNCÜ hocama da teşekkürleri borç bilirim. Yine gerek lisans dönemindeki öğrencilik zamanlarımızda gerekse yüksek lisans dönemindeki öğrencilik zamanlarımızda ve tez yazım sürecinde içinde düştüğümüz umutsuzluk kuyusundan bizi her zaman çekip çıkaran sevgili hocam Behiç Selman ERDOĞDU 'ya da teşekkür ediyorum.

Son olarak hayatımın bütün dönemlerinde desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili aileme, göstermiş oldukları sabır ve anlayış için sonsuz minnetlerimi sunuyorum.

Muhammed ANDİÇ
KONYA-2020

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
ÖNSÖZ	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
TABLOLAR DİZİNİ.....	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1. Domates (<i>Solanum lycopersicum</i> L.)	3
2.1.1. Domatesin besinsel değerleri	4
2.1.2. Domatesin yetiştiği iklim şartları	5
2.1.3. Domatesin dünya çapındaki dağılımı ile ekonomik önemi	6
2.1.4. Domatesin bilimsel çalışmalarda önemi.....	7
2.2. Küresel ısınma ve kuraklık	8
2.3. Hidrojen sülfür (H ₂ S).....	9
2.3.1. Hidrojen sülfür (H ₂ S)'ün kuraklık stresine olan etkisi	11
2.3.2. Hidrojen sülfür (H ₂ S) ve domates ile ilgili yapılmış çalışmalar.....	13
2.4. PCR(Polimeraz Zincir Reaksiyonu)	14
3. MATERYAL VE YÖNTEM	15
3.1. Materyal.....	15
3.1.1. Bitki Materyali ve Yetiştirilmesi	15
3.2. Yöntem	19
3.2.1. Malondialdehit (MDA) miktarı tayini	19
3.2.2. H ₂ S uygulamasının kuraklık stresine cevaben gen ifadesi, antioksidan kapasite ve bitki fizyolojisine etkilerinin belirlenmesi.....	19
3.2.2.1 Enzim aktivitesi analizleri	20
3.2.2.1.1. SOD aktivitesi	20
3.2.2.1.2. APX aktivitesi	20
3.2.2.1.3. CAT aktivitesi	21
3.2.2.2. RNA izolasyonu, cDNA sentezi (RT-PCR) ve Kantitatif PCR (qPCR)	21
3.2.2.2.1. RNA izolasyonu	21
3.2.2.2.2. cDNA sentezi (RT-PCR).....	22

3.2.2.2.3. Karşılaştırmalı (kantitatif) PCR (qPCR).....	22
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA	24
4.1. Deney gruplarındaki lipid peroksidasyonu oranı	24
4.1.1. Malondialdehit (MDA) miktarı tayini	24
4.2. H ₂ S uygulamasının kuraklık stresine cevaben antioksidan kapasite ve gen ifadesi etkilerinin belirlenmesi	25
4.2.1. Enzim aktivitesi analizleri	25
4.2.1.1. SOD aktivitesi	25
4.2.1.2. APX aktivitesi	25
4.2.1.3. CAT aktivitesi	26
4.2.2. Gen ifadesi analizleri	27
4.2.2.1. ASR geni	27
4.2.2.2. DREB geni.....	28
4.2.2.3. SIPLY1 geni	29
4.2.2.4. miRNA 169 geni.....	30
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	32
5.1 Sonuçlar	32
5.2 Öneriler.....	33
6. KAYNAKLAR.....	34
ÖZGEÇMİŞ	45

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

β	: Beta
$^{\circ}\text{C}$	: Santigrat
$\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6$	: Tartarik asit
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	: Kalsiyum nitrat tetrahidrat
CH_3COONa	: Sodyum asetat
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	: Bakır sülfat penta hidrat
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	: Demir sülfat heptahidrat
γ	: Gamma
g	: Gram
H_2S	: Hidrojen sülfür
H_2O_2	: Hidrojen peroksit
H_3BO_3	: Borik asit
ha	: Hektar
kcal	: Kilokalori
KH_2PO_4	: Mono potasyum fosfat
KNO_3	: Potasyum nitrat
l	: Litre
Mb	: Megabase
mg	: Miligram
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	: Magnezyum sülfat heptahidrat
ml	: Mililitre
$\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	: Mangan iki klorür dihidrat
$\text{MoO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$	: Molibdik asit
mmol	: Milimol
mM	: Milimolar
Na^+	: Sodyum iyonu
NaAC	: Sodyum asetat
Na_2S	: Sodyum sülfür
Na_2SO_3	: Sodyum sülfite
Na_2SO_4	: Sodyum sülfat
NaHS	: Sodyum hidrosülfite
NaHSO_3	: Sodyum bisülfite
NaHSO_4	: Sodyum bisülfat
ng	: Nanogram
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	: Amonyum dihidrojen fosfat
nm	: Nanometre
nmol	: Nanomol
nM	: Nanomolar
NO	: Nitrik oksit
μg	: Mikrogram
μL	: Mikrolitre
μmol	: Mikromol
μM	: Mikromolar

ζ : Zeta
 $\text{ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: Çinko sülfat pentahidrat

Kısaltmalar

ABA	: Absisik asit
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
APX	: Askorbat peroksidaz
ASA	: Askorbik asit
ASR	: Absisik Asit Olgunlaştırıcı Geni
CAT	: Katalaz
cDNA	: Komplementer Deoksiribonükleik Asit
CT	: Döngü eşiği
DCD	: D-sistein desülfidraz
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DREB	: Dehidrasyona Duyarlı Element Bağlayıcı Protein Geni
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
EXP	: Ekspansin Geni
FAO	: Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
HvAACT1	: Alüminyum Aktif Sitrat Taşıyıcı Geni
LCD	: L-sistein desülfidraz
MAS	: Markör destekli seleksiyon
MDB	: Membran Tuz Giderme Tamponu
MDA	: Malondialdehit
miRNA	: Mikro Ribonükleik Asit
NBT	: Nitroblue tetrazolyum
PCR (PZR)	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PME	: Pektin Metil Esteraz Geni
POD	: Guaiakol peroksidaz
qPCR	: Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAPD	: Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA
RFLP	: Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi
RNA	: Ribonükleik asit
RT-PCR	: Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SOD	: Süperoksit Dismutaz
TBA	: Thiobarbitürik asit
TCA	: Trikloroasetik asit
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
USDA	: Amerika Birleşik Devletleri Tarım Departmanı

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa
Tablo 2.1. Domateste bulunan besin öğeleri ve değerleri.....	4
Tablo 2.2. 100g domateste bulunan karotenoidler ve miktarları.....	5
Tablo 3.1. Hoagland besin çözeltisi hazırlamak için oluşturulan stok çözeltileri..	15
Tablo 3.2. Hoagland besin çözeltisi hazırlamak için kullanılan stok miktarları...	16
Tablo 3.3. Oluşturulmuş domates fideleri grupları.....	18
Tablo 3.4. Gen ifadesi ve antioksidan kapasite etkisi ölçümü için oluşturulmuş gruplar.....	19
Tablo 3.5. RT-PCR reaksiyon koşulları.....	22
Tablo 3.6. qPCR reaksiyon döngüsü.....	22
Tablo 3.7. Gen ifadesi analizlerinde kullanılmış primer dizileri.....	23

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
Şekil 2.1.	Solanaceae ailesine ait bazı türler.....	3
Şekil 2.2.	FAO verilerine göre 2018 yılında en çok domates üreten 10 ülke.....	6
Şekil 2.3.	TÜİK verilerine göre ülkemizde 2001 - 2019 yılları arasındaki domates üretimi.....	7
Şekil 3.1.	Çimlendirme torfunda viyolde çimlendirilmiş domates.....	16
Şekil 3.2.	In vitro koşullarda kuraklık uygulaması.....	17
Şekil 3.3.	In vitro koşullarda kuraklık uygulaması altında NaHS uygulaması.....	18
Şekil 4.1.	Deney gruplarındaki beş günlük malondialdehit konsantrasyonu oranları.....	24
Şekil 4.2.	Deney gruplarındaki altı günlük süperoksit dismutaz konsantrasyonu oranları.....	25
Şekil 4.3.	Deney gruplarındaki beş günlük askorbat peroksidaz konsantrasyonu oranları.....	26
Şekil 4.4.	Deney gruplarındaki altı günlük katalaz konsantrasyonu oranları.....	27
Şekil 4.5.	ASR1 ve ASR4 genlerinin deney gruplarındaki ekspresyon oranı.....	28
Şekil 4.6.	DREB2 ve DREB2A genlerinin deney gruplarındaki ekspresyon oranı.....	29
Şekil 4.7.	SIPLY1 geninin deney gruplarındaki ekspresyon oranı.....	30
Şekil 4.8.	miRNA 169 geninin deney gruplarındaki ekspresyon oranı.....	31

1. GİRİŞ

Kuraklık, tarımsal üretimde verim ve sürdürülebilirliği tehdit eden en öncelikli faktörlerden biridir. Bununla birlikte yakın gelecekte ülkemizi de kapsayan bir bölge üzerinde etki derecesinin ve alanının artacağı beklenmektedir (Ximénez-Embún ve ark., 2016). Kuraklığın etki ettiği en önemli bitkilerden biri de domatestir. Domates gerek dünya genelinde sebze olarak tüketilen başlıca tüketim ürünlerinden biri olması, gerek ülkemiz tarım ekonomisi için büyük öneme sahip olması, gerekse bitki fizyolojisi ve moleküler biyolojisi ve genetiği çalışmaları için bir model organizma olması açısından bu proje için model organizma olarak seçilmiştir.

H₂S'in bitki büyüme ve gelişimi üzerinde etkilerinin olduğu uzun yıllardır bilinmesine rağmen sinyal molekülü fonksiyonlarının araştırılması son birkaç yıllık sürece dayanmaktadır. Var olan çalışmalar, bitkilerde abiyotik stres koşullarında H₂S birikiminin arttığını bildirmekte ve mikro molar düzeyde H₂S uygulamasının abiyotik stres toleransı sağlamada etkili rol oynadığını rapor etmektedir. Yaptığımız bu tez çalışmasında H₂S'in kontrol koşullarında abiyotik stres cevabı ile ilişkili gen ifadesine etki edip etmediği de araştırılmış ve domateste stres hormonu absisik aside (ABA) olan hassasiyeti incelenmiştir. ABA, başta stoma açıklığının kontrolü olmak üzere bitkilerde kuraklık stresi cevabının düzenlenmesinde görevli hormon olarak bilinmektedir (Jin ve ark., 2013; Lisjak ve ark., 2011). H₂S üretiminin ABA sinyal yolağı kontrolünde olup olmadığı ve/veya H₂S birikiminin strese cevaben ABA sentezini ve moleküler hormon algı mekanizmasını tetikleyip tetiklemediği de araştırılmış, ayrıca H₂S'in ABA idaresindeki kuraklık cevabı genlerinin ifadesinde kontrolü olup olmadığına da bakılmıştır.

Yapılmış çalışmalarda H₂S, kuraklık toleransı dâhil olmak üzere abiyotik stres toleransı sağlamada etkili bir sinyal molekülü olarak önerilmekte ve bitki fizyolojisi tarafından tolere edilebilen düşük konsantrasyonlarda kolay şekilde uygulanabilmektedir. Dolayısı ile bu molekülün olası etkilerinin majör tarım ürünlerinde incelenmesi ve stres cevabı sinyal yolları ile etkileşimlerinin belirlenmesi, tarımsal üretimde kuraklığa bağlı verim kayıplarının yakın gelecekte basit uygulamalar ile en aza indirilmesi için potansiyel vaat etmektedir (Dooley ve ark., 2013).

Yapılmış olan çalışma ile birlikte H_2S 'in kuraklık cevabına etkileri, domates bitkisinde ve içinde domates ile birlikte patates, patlıcan, biber gibi pek çok önemli tarım bitkisini de bünyesinde barındıran Solanaceae ailesinde, hem metabolik hem de gen ifadesi düzeyinde kapsamlı bir şekilde araştırılmış olup ve ileride yapılacak olan benzer çalışmalara kaynak teşkil edecektir. Bununla birlikte H_2S 'in bir sinyal molekülü olarak henüz ortaya konmamış olan moleküler etki mekanizmasının aydınlatılmasına temel oluşturması da öngörülmektedir. Çalışmanın bilimsel yönünün yanı sıra, elde edilecek bulguların yakın gelecekte tarımsal üretimde verim ve kalitenin arttırılmasına yönelik pratik uygulama alanlarına yol açma potansiyeli de öngörülmektedir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Domates (*Solanum lycopersicum* L.)

Domates (*Solanum lycopersicum* L) bitkisi içinde 3000 den fazla tür barındıran Solanaceae ailesine mensuptur. Bu geniş aile domates, patates, biber, patlıcan gibi ekonomik açıdan önemli türler; kara banotu, ölümcül itüzümü, boru otu gibi tıbbi değeri olan türler ile petunya gibi süs amaçlı bitkileri içinde barındırır (Knap ve ark., 2004).



Şekil 2.1. Solanaceae ailesine ait bazı türler (public pictures from <https://www.needpix.com/>)
a)domates; b)patates; c)patlıcan; e)petunya; f)ölümcül itüzümü; g)kara banotu; h)boru otu)

Neredeyse her habitatta yıllık ve çok yıllık olarak yetişebilen, kapalı tohumlu ve çift çenekli olan domatesin kökeninin Güney Amerika olduğu düşünülür ve ismini yerlilerin kullandığı yerel dilde bu sebzeye xitomate / zitotomate demelerinden geldiğine inanılır (Colvine ve Branthôme, 2016; Güvenç, 2019). Meksika domates bitkisinin bir tarım ürünü olarak ekildiği ilk yer olmakla birlikte domates bitkisinin Avrupa ya ilk giriş noktası olarak kabul görülür (Blanca ve ark., 2012; Knapp ve Peralta, 2016).

Domates 12 haploit kromozoma sahip olmakla birlikte referans genomu 2012 yılında Domates Genom Konsorsiyumu'nun yaptığı çalışma sonucu NCBI veri tabanına yüklenmiş olup büyüklüğü yaklaşık 900 Mb'dir ve 34,727 protein kodlayan gen içermektedir (Sato ve ark., 2012). Domates, bir tarım ürünü olarak önemine ilaveten bitki fizyolojisinin pek çok yönü ile araştırılmasına olanak veren yaygın bir model organizmadır (Carvalho ve ark., 2011). Kültüre alınmış domates pek çok farklı iklim

koşuluna adapte olmuş olmakla birlikte, abiyotik stres koşullarına duyarlı olup, büyüme ve gelişimi kuraklık, yüksek sıcaklık, tuzluluk gibi stres faktörlerinden olumsuz etkilenmektedir (Foolad, 2007).

2.1.1. Domatesin besinsel değerleri

Domates, dünya genelinde sebze olarak tüketilen başlıca tarım ürünlerinden biri olmasıyla birlikte, işlenmiş ürünleri ile büyük bir endüstri oluşturmaktadır (Foolad, 2007). Domates ve domatesten elde edilen ürünler vitamin A, vitamin C, folat ve potasyum açısından zengin, düşük kalorili ve bol lifli bir besindir (Tablo 2.1.) (USDA, Tomatoes Raw).

Tablo 2.1. Domateste bulunan besin öğeleri ve değerleri (USDA Nutrient Database, Tomatoes Raw)

Besinsel bileşen	100 g servis başına miktar
Su	94.52 g
Kalori	18 kcal
Protein	0.88 g
Toplam lipit (yağ)	0.2 g
Toplam doymuş yağ asitleri	0.028 g
Toplam doymamış yağ asitleri (tekli)	0.031 g
Toplam doymamış yağ asitleri (çoklu)	0.083 g
Kolesterol	0 mg
Karbonhidrat	3.89 g
Toplam lif	1.2 g
Kalsiyum	10 mg
Demir	0.27 mg
Magnezyum	11 mg
Fosfor	24 mg
Potasyum	237 mg
Sodyum	5 mg
Çinko	0.17 mg
Bakır	0.059 mg
Selenyum	0 mg
Folat	15 µg
Vitamin C	13.7 mg
Vitamin A	42 µg
Vitamin D (D2+D3)	0 µg
Vitamin E	0.54 mg
Vitamin K	7.9 µg
Vitamin B1	0.037 mg
Vitamin B2	0.019 mg
Vitamin B3	0.594 mg
Vitamin B6	0.08 mg
Vitamin B12	0 µg

Doğada çoğunlukla kırmızı renkte bulunan domatesler yapılarında renk verici pigment olarak bol miktarda karotenoid bulundururlar. Bu maddeler insanlar için hayati öneme sahip antioksidan grubuna girerler. Tonucci ve ark., (1995) tarafından yapılmış olan çalışmaya göre domates bitkisinde bulunan karotenoidler ve oranları Tablo 2.2. 'de verilmiştir.

Tablo 2.2. 100g domateste bulunan karotenoidler ve miktarları

Karotenoid	mg /100 g
β-Karoten	0.23
γ-Karoten	1.50
ζ-Karoten	0.21
Phytoene	1.86
Phytofluene	0.82
Neurosporene	1.10
Lutein	0.07
Likopen	9.27

Bu karotenoidler arasından üzerinde en dikkat çekici olan likopendir. Bu madde domatese kırmızı rengi veren pigment olmakla birlikte insan sağlığı açısından birçok fayda sağlamaktadır. Literatürde kardiyovasküler sistem hastalıklarında; deri, karaciğer, özofagus, meme ve özellikle prostat kanserine önleyici etkisi ile ilgili birçok çalışma mevcuttur (De ve Das, 2001; Eliassen ve ark., 2012; Friedman, 2013; Ge ve ark., 2013; Jian ve ark., 2007; Park ve ark., 2013; Sesso ve ark., 2003). Bir başka çalışmaya göre likopen; deri yaşlanmasının başlıca nedeni olan tekli (singlet) oksijeni etkisizleştiren en güçlü karotenoid olarak raporlanmıştır (Di Mascio ve ark., 1989).

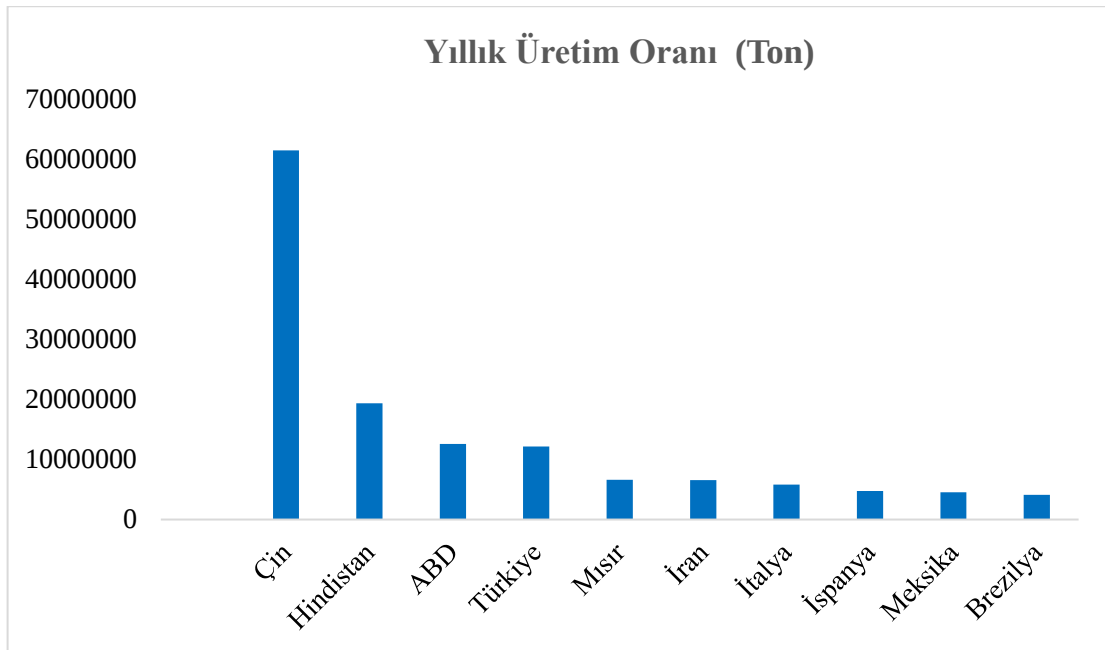
2.1.2. Domatesin yetiştiği iklim şartları

Tropikal iklimi seven bir bitki olmasının yanında seracılığın da yaygınlaşmasıyla domates dünyanın hemen hemen her köşesinde yetiştirilebilmektedir (Foolad, 2007). Domates üretimi için en iyi gelişimin gözlendiği sıcaklık 14°C ile 26°C arası olarak kaydedilmiştir. 26°C ve yukarısında yetişen bitkilerin zayıf yapılı, çekirdeksiz veya düşük tohum sayısına sahip olduğu rapor edilirken 14°C ve aşağısındaki sıcaklıklarda yetişen bitkilerin ise küçük, sert ve çekirdeksiz bir yapıya sahip oldukları rapor edilmiştir (Adams ve ark., 2001).

2.1.3. Domatesin dünya çapındaki dağılımı ile ekonomik önemi

Anavatanı Orta ve Güney Amerika olan domates ilk başlarda zehirli olduğu düşünüldüğünden tüketimi ve yaygınlaşması gecikmiştir. 19. Yüzyılda pişirilerek yemek olarak tüketilmeye başlanılmış ve Osmanlı döneminde ilk olarak Halep'e getirilmiştir. Halep'ten güney bölgelerimize ve daha sonra da diğer bölgelere yayılmıştır (Güvenç, 2019). Domates doğrudan çiğ olarak yenilebilen, yemeklere katılan bir mahsul olmakla birlikte işlenmiş olarak ketçap, salça, domates suyu, domates sosu, domates püresi gibi birçok farklı formlarda da önemli ölçüde tüketilmektedir (Turhan ve Şeniz, 2009).

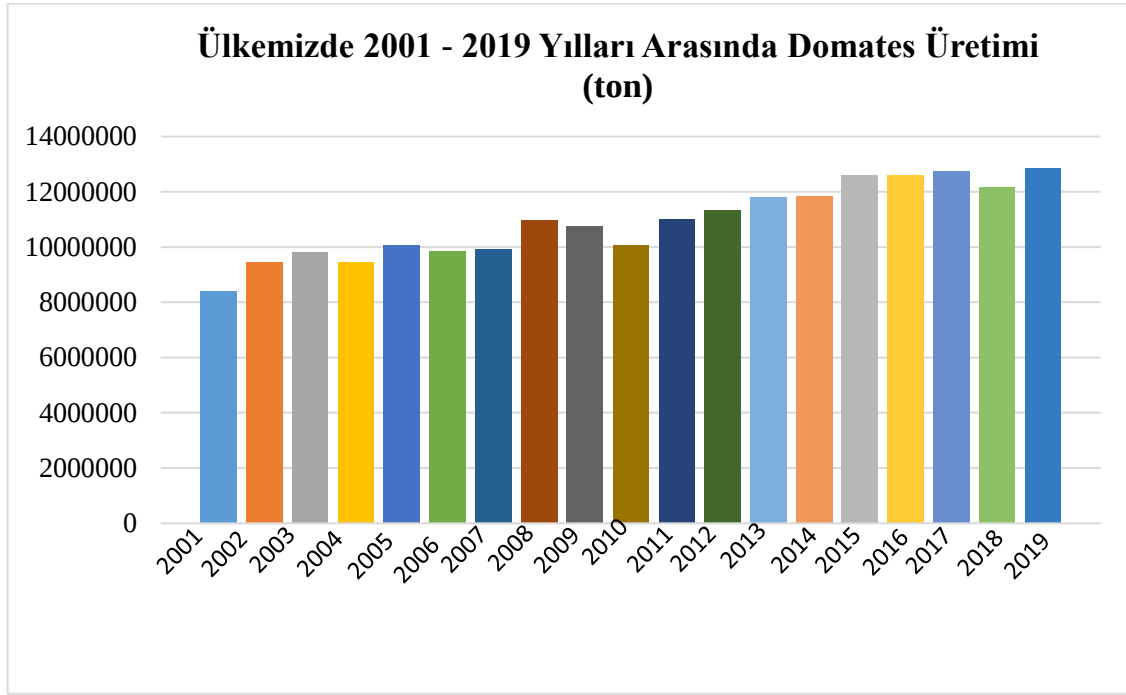
Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO, Food and Agriculture Organization of The United Nations) verilerine göre dünyada 2018 yılında 182 milyon tondan fazla domates üretilmiştir. Şekil 2.2. de belirtildiği üzere ülkemiz 2018 yılındaki yıllık domates üretimi açısından 12.150.000 ton mahsul ile kayıtlara geçerek ABD (Amerika Birleşik Devletleri)'nin ardından dünyada dördüncü sırada yer almıştır (FAOSTAT, 2018).



Şekil 2.2. FAO verilerine göre 2018 yılında en çok domates üreten 10 ülke

TÜİK (Türkiye İstatistik Kurumu) verilerine göre Türkiye'deki domates üretimi 2001 yılında 8 425 000 ton iken 2019 yılında bu oran 12 841 990 tona çıkmıştır (Şekil 2.3.) (TÜİK, 2019).

Tarım ve Orman Bakanlığı, Ocak 2020 de yayınladığı Domates Tarım Ürünleri Piyasa raporunda sırasıyla Antalya, Bursa, İzmir, Manisa, Mersin, Şanlıurfa, Çanakkale, Balıkesir, Muğla ve Tokat, ülkemizde en çok domates ekilen ve üretilen şehirler olmuştur. %75,6 ile Rusya Federasyonu ve % 9,3 ile Irak en çok domates ithalatı yaptığımız ülkeler olurken; %1,5 ile İsrail ve %1,8 ile Belarus ise en az domates ithalatı yaptığımız ülkeler olmuştur.



Şekil 2.3. TÜİK verilerine göre ülkemizde 2001 - 2019 yılları arasındaki domates üretimi

2.1.4. Domatesin bilimsel çalışmalardaki önemi

Domates, tarımsal öneminden ve uzun üretim tarihine sahip olduğundan üzerinde en çok çalışma yapılmış organizmalardan biridir. Literatürlerde domates bitkisi için yaygın olan kültür domatesinden farklı olarak 13 tane yabancı türün daha olduğu kaydedilmiştir (Peralta ve ark., 2005; Spooner ve ark., 2005). Bu yabancı türler Tamamı ($2n=24$) diploid olan bu türlerin bilinmesi ve bunların kültür domatesi ile çaprazlanması; verim, meyve kalitesi, patojenik ve abiyotik streslere karşı direnci arttırabilir (Kimura ve Sinha, 2008).

Domatesin etli bir meyveye sahip olması, simpodial sürgün göstermesi ve bileşik yapraklara sahip olması onu pirinç ve *Arabidopsis* gibi diğer model organizmalardan farklı bir yere koyar. İçinde bulunduğu Solanaceae ailesinin geniş tür barındırması ile

yaygın tarım ürünlerini içermesi domatestede yapılmış olan bir çalışmayı ailedeki diğer türlerde de uygulanabilir kılar (Kimura ve Sinha, 2008).

Bitki moleküler genetiği çalışmalarının birçoğu ilk önce domates üzerinde gerçekleştirilmiştir. RFLP (Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi) kullanılarak oluşturulan tam bir bitki genomunun bağlantı haritası ilk domates üzerinde gerçekleştirilmiştir (Bernatzky ve Tanksley, 1986). Agronomik olarak ilgili lokuslarda harita tabanlı yürümeyi kolaylaştırmak için RAPD (Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA)'in allelik varyasyonunun kullanımı ilk olarak *Solanum lycopersicum* L. 'da yapılmıştır (Martin ve ark, 1991; Wing ve ark., 1994) . Bitkilerdeki ilk defa 1000'den fazla markörden oluşan yüksek yoğunluklu moleküler bağlantı haritasının oluşturulması ve karşılaştırmalı genomiklerin kullanımı Tanksley ve ark., (1992) tarafından domates ve patates genomları için yapılmıştır.

2.2. Küresel ısınma ve kuraklık

Giderek artan dünya nüfusu ve dolayısıyla meydana gelen kontrolsüz tüketim, ormanlık alanların azalması, fosil yakıt tüketiminin artması, sanayi faaliyetlerinin artması ve daha birçok insan kaynaklı faaliyetler atmosferde sera gazı birikimini arttırarak küresel ısınmanın meydana gelmesine sebep olmuştur. Küresel ısınma ile birlikte yağışlar azalmış, sıcaklık seviyesi birçok yerde iklim şartlarının üzerinde seyretmiştir. Küresel ısınmadan en çok etkilenen sektörlerin başında tarım sektörü gelmektedir. Tarım sektörü dünya çapında 1 milyardan fazla istihdam seviyesi ile ikinci sırada gelmektedir (Temur, 2017). İklim şartlarında oluşan olumsuz değişiklikler işsizliğe sebep olabileceği gibi çeşitli stres koşullarının oluşmasına da sebep olmaktadır.

Küresel ısınma; tarımsal üretimi artan sıcaklıklar ve yağış rejimindeki değişiklikler ile doğrudan etkileyebileceği gibi yağın yağmur ve kar oranlarının düşmesi sonucu yeraltı ve yerüstü su kaynaklarının azalmasıyla sulama suyu hacminde düşüşe sebep olarak dolaylı yoldan da etkileyebilmektedir. Bunların yanı sıra toprağın nem oranını ve verimliliğini de etkileyerek alanların tarımsal üretime elverişsiz veya daha az elverişli hale gelmesine sebep olmaktadır (Temur, 2017).

Tarımsal üretimde artış giderek artan dünya nüfusunun beslenmesinin garanti altına alınması bakımından bir zorunluluk olmakla birlikte, biyotik ve abiyotik stres koşulları, tarımsal üretimde sürdürülebilirliği tehlikeye sokmaktadır. Kuraklık, tarım

ürünü üretiminde verim kaybına sebep olan etmenlerin başına yer almakta (Boyer, 1982), dolayısı ile gıda güvenliğinin global ölçekte planlanmasında kritik rol oynamaktadır. Önümüzdeki yıllarda iklim değişikliğine bağlı olarak kuraklığın etkilediği alan ve derecesinin artacağı öngörülmekte, ülkemizin de içinde bulunduğu Akdeniz coğrafyası, daha yoğun seviyede kuraklık beklenen bölgelere dahil edilmektedir (Ximénez-Embún ve ark., 2016). Bitkilerde kuraklık stresine toleransın moleküler mekanizmalarının aydınlatılması, tarım ürünlerinin sürdürülebilir üretiminin garanti altına alınması için gereklidir.

2.3. Hidrojen sülfür (H_2S)

Renksiz, suda çözünen, kötü kokulu ve toksik bir gaz olan hidrojen sülfür (H_2S), son yıllarda gerçekleştirilen bazı araştırmalar sonucu bitki ve hayvanlarda endojen bir sinyal molekülü olarak tanımlanmaktadır (Lisjak ve ark, 2013; Paul ve Snyder, 2015; Wang, 2002). Memeliler ve bitkilerde H_2S 'in fizyolojik olarak üretildiği, ilgili enzimlerin de tespit edilmesi ile ortaya konmuş (Lisjak ve ark., 2013; Zhang ve ark., 2013) olmakla birlikte, bitkilerde hidrojen sülfür konsantrasyonunun toksik düzeye çıkmaksızın ayarlanmasında O-asetilserin liyaz enziminin görev yaptığı tespit edilmiştir (Tai ve Cook, 2000; Youssefian ve ark., 1993). Hayvanlarda hidrojen sülfürün elektron kaynağı olarak mitokondri tarafından metabolize edildiği bildirilmiştir (Bouillaud ve ark., 2013). Canlılar tarafından sistein metabolizması esnasında fizyolojik olarak üretilmekte oluşu hidrojen sülfürün bir sinyal molekülü olarak görev yaptığı görüşünü yaygınlaştırmakta (Jin ve Pei, 2015; Lisjak ve ark., 2010), hücre içi konsantrasyonunun ayarlanmasına ilişkin mekanizmaların tespit edilmesi, bu görüşü kuvvetlendirmektedir (Lisjak ve ark., 2013). Moleküler etki mekanizmaları henüz kesin olarak ortaya konmamış olmakla birlikte, hidrojen sülfürün memelilerde kardiyovasküler ve sinir sistemi üzerindeki koruyucu ve hastalık önleyici etkileri gösterilmiştir (Mani ve ark., 2013; Zhang ve ark., 2013). Var olan çalışmada, kardiyovasküler sistemde H_2S üretimini sağlayan sistatasyonin gama liyaz eksikliğinde damar sertliği oluşumu rapor edilmiş (Mani ve ark., 2013), tip 2 diyabet ve obezite hastalıklarına bağlı vasküler sistem zararları, plazmada düşük H_2S seviyesi ile ilişkilendirilmiştir (Jain ve ark., 2010). Parkinson ve Huntington hastalıkları sürecinde görülen nörodejenerasyonda, H_2S metabolizmasında meydana gelen bozuklukların önemli rol oynadığı yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir (Paul ve Snyder,

2015). Benzer şekilde bitkilerde gerçekleştirilen çalışmalar, hidrojen sülfürün pek çok fizyolojik süreçte görev aldığına ve stres toleransı sağlamadaki rolüne işaret etmektedir.

Rapor edilmiş çalışmalarda, uygun konsantrasyonlarda H_2S donörü NaHS ile ön muamelenin, bitkilerde herhangi bir toksisite semptomuna sebep olmaksızın (Zhang ve ark., 2009b) çeşitli stres koşullarına toleransı arttırdığı ve büyüme ve gelişimi desteklediği rapor edilmektedir. Düşük konsantrasyonlarda H_2S donörü NaHS çözeltisi ile muamelenin, buğday, fasulye, mısır ve bezelyede tohum çimlenmesini desteklediği gösterilmiştir (Dooley ve ark., 2013). Tatlı patates, soya ve Çin söğüdü ile gerçekleştirilen çalışma sonucunda H_2S 'in yan köklenmenin kontrol edilmesinde oksin sinyal yolağının üzerinde görev yaptığı önerilmiştir (Zhang ve ark., 2009b). Diğer kükürt ve Na^+ içeren bileşiklerin (Na_2S , Na_2SO_3 , Na_2SO_4 , $NaHSO_3$, $NaHSO_4$ ve NaAC) uygulanması, yan kök oluşum ve gelişimini desteklememiştir. Ancak oksin- H_2S ilişkisinin tanımlanması bakımından aksi yönde bir rapor da mevcut olup, söz konusu çalışmada oksin birikiminin H_2S üretiminde görevli temel enzim L-sistein desülfidraz (LCD) gen ifadesini arttırarak yan kök oluşumunu tetiklediği bildirilmiştir (Fang ve ark., 2014). Düşük dozlarda H_2S donörü NaHS uygulamasının ıspanakta klorofil içeriği ve fotosentetik enzimlerin gen ifadesini arttırarak net fotosentez hızını arttırdığı yapılmış çalışmalarla ispatlanmıştır (Chen ve ark., 2011).

Meyve ve süs bitkilerinde hasat sonrası depolama ömrünün H_2S uygulamasına bağlı olarak arttığına rapor edildiği çeşitli çalışmalar yakın zamanda gerçekleştirilmiştir (Hu ve ark., 2012; Li ve ark., 2016; Sun ve ark., 2015; Zhang ve ark., 2011b). Depolama ömründeki artış, hücrenin antioksidan kapasitesinin artması ile ilişkilendirilmekte, H_2S donörü NaHS ile muamelenin, antioksidan enzim [katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APX), guaiakol peroksidaz (POD)] aktivitesinde artış, H_2O_2 ve malondialdehit (MDA) miktarlarında azalmaya sebep olduğu bildirilmektedir (Zhang ve ark., 2010a; Zhang ve ark., 2011b).

Mevcut literatür incelendiğinde, H_2S 'in bitkilerde en belirgin rolünün abiyotik stres toleransı sağlama olduğu görülmekle birlikte, sinyal molekülü olarak fonksiyonunun anormal koşullar altında fizyolojiyi normale döndürmeyi sağlayan bir moleküler şalter benzeri olduğu önerilmektedir (Hancock ve Whiteman, 2014). H_2S uygulamasının abiyotik stres toleransına etkisinin incelendiği çalışmaların hatırı sayılır bölümü buğdayda çimlenme kabiliyetinin izlenmesi üzerinedir. H_2S 'in buğdayda bakır stresi (H.

Zhang ve ark., 2008), krom stresi (Zhang ve ark., 2010a), osmotik stres (Zhang ve ark., 2010b) ve alüminyum stresi (Zhang ve ark., 2010c) altında çimlenme oranını arttırdığı gösterilmiştir. Bahsi geçen çalışmalarda stres koşulları altında hücre zarında oksidatif zararın markörü niteliğindeki malondialdehit ve majör reaktif oksijen türü H_2O_2 'nin birikimlerinin NaHS uygulaması sonucu belirgin derecede azaldığı görülmüştür. Ayrıca H_2S ile muamelenin CAT, SOD ve APX enzim aktivitelerinde artışa sebep olduğu bildirilmiş, H_2S donörü NaHS hariç diğer Na^+ ve kükürt içeren bileşikler ile (Na_2S , Na_2SO_3 , Na_2SO_4 , $NaHSO_3$, $NaHSO_4$, CH_3COONa) benzer şekilde muamele, abiyotik stres altında çimlenme becerisine etki etmemiştir. Yonca bitkisinde tuz stresi altında çimlenme ve fide gelişiminin incelendiği çalışmada, H_2S 'in antioksidan cevabı kuvvetlendirmek ve hücre iyon homeostasisini yeniden sağlamak yolu ile çimlenme ve gelişimi desteklediği bildirilmiştir. Ayrıca H_2S uygulamasının diğer bir sinyal molekülü olarak tanımlanan nitrik oksit (NO) üretimini arttırdığı tespit edilmiş ve H_2S 'in tuz toleransını NO sinyal yolağı üzerinden geliştirdiği önerilmiştir (Wang ve ark., 2012). Bununla birlikte, abiyotik stres uygulaması öncesi H_2S ile muamelenin NO üretimini düşürdüğü yönünde çalışmalar da mevcuttur (Christou ve ark., 2013).

H_2S 'in bor stresi toleransına etkisini incelendiği bir çalışma mevcut olup, bu çalışmada bor stresine maruz bırakılan hıyar fidelerinde kök uzamasının baskılanması, H_2S uygulaması ile hatırı sayılır seviyede azalmış, bor stresi altında kökte gözlemlenen fenotipten sorumlu olduğu bildirilen pektin metil esteraz (PME) ve ekspansin (EXP) genlerinin ifade düzeylerinin H_2S uygulaması sonucu düştüğü gözlemlenmiştir. Çalışma sonucunda H_2S 'in PME ve EXP genlerinin ifadelerini düzenleyerek bor stresinin kök büyümesine olan etkilerini hafiflettiği önerilmiştir (Wang ve ark., 2010). Benzer şekilde, H_2S ile muamelenin, arpada alüminyum stresine bağlı kök büyümesinin baskılanmasını hafiflettiği, kök ve yapraklarda alüminyum birikimini azalttığı, alüminyum stresine cevaben ifadelenen HvAACT1 (Aluminum activated citrate transporter) geninin ifade düzeyini arttırdığı, köklerde H_2O_2 ve MDA birikimini düşürdüğü rapor edilmiştir (Chen ve ark., 2013).

2.3.1. Hidrojen sülfür (H_2S)'ün kuraklık stresine olan etkisi

H_2S 'in, bitkilerde kuraklık stresine toleransı arttırdığına ilişkin raporlar mevcuttur. Tatlı patates fideleri üzerinde gerçekleştirilen çalışmada, osmotik stres altındaki fidelere spreyleme ile uygulanan NaHS çözeltisinin yapraklarda kloroz

oluşumunu engellediği gözlenmiş, osmotik stres uygulanan kontrol bitkilerine kıyasla yapraklarda antioksidan enzim aktivitesinin (SOD, CAT ve APX) NaHS uygulaması sonucu belirgin miktarda arttığı rapor edilmiştir. NaHS uygulaması sonucu osmotik strese bağlı lipid oksidasyonu düzeyindeki azalma, yapraklarda düşük H_2O_2 ve MDA birikimi ve yine kontrole oranla düşük miktarda ölçülen lipoksigenaz (LOX) enzim aktivitesi ile gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2009a). Soya bitkisi üzerinde gerçekleştirilen benzer bir çalışmada, 21 gün süre ile gerçekleştirilen kuraklık stresi uygulaması sonucu hayatta kalma oranının NaHS ile spreyleme sonucu arttığı, yanı sıra biyokütlede kontrol bitkilere oranla daha fazla artış gerçekleştiği bildirilmiş, H_2S 'in kuraklığa bağlı oksidatif zararı düşürerek kuraklık toleransı sağladığı rapor edilmiştir (Zhang ve ark., 2010d).

H_2S 'in kuraklık toleransına etkilerinin model organizma *Arabidopsis* 'te incelendiği çalışmada, kuraklık stresine cevaben bitkide H_2S üretiminin arttığı bulunmuştur. Kuraklık stresine cevaben ifadelendiği bilinen genler ile benzer şekilde H_2S üretiminde görevli enzimler L-sistein desülfidraz (LCD) ve D-sistein desülfidraz (DCD) kodlayan genlerin ifade düzeyleri stres uygulaması altında artış göstermiştir. İki hafta süre ile kuraklık uygulaması sonucu NaHS ile muamelenin yapraklarda solma miktarını düşürdüğü ve bitkilerin hayatta kalma oranını arttırdığı gözlenmiştir. Çalışmada H_2S 'in stoma açıklığını kontrolde rol alıp almadığı araştırılmış, NaHS uygulamasının stomaların kapanmasını indüklediği rapor edilmiştir (Jin ve ark., 2011). *Arabidopsis* 'te gerçekleştirilen bir başka çalışmada ise H_2S üretiminden sorumlu temel enzim LCD'yi üretemeyen mutant bitkilerin kontrol bitkilere oranla kuraklık toleransının belirgin derecede azaldığı gözlenmiştir (Jin ve ark., 2013). Mutant bitkilerde stoma açıklığı kontrol bitkilere oranla daha yüksek ölçülmüş, temel reaktif oksijen türü H_2O_2 birikimi de artış göstermiştir. Çalışmada LCD mutantlarında absisik asit (ABA) uygulamasının stomaların kapanmasını indüklemeye yetersiz kaldığı bulunmuş, ABA sentezi (*aba3*) ve ABA 'ya duyarlılık (*abi1*) bakımından mutant bitkilerde LCD ifadesi düşük bulunmuştur. Bu bulgular ışığında kuraklık stresi altında stomaların H_2S ve ABA arasında bir etkileşim mekanizması ile kontrol edildiği ve absisik asitin H_2S üreten enzimlerin transkripsiyonu üzerinde kontrolü bulunduğu önerilmiştir. Ancak H_2S 'in stoma açıklığı üzerindeki kontrolüne ilişkin çelişkili raporlar mevcut olup, NaHS uygulaması sonucu stoma açıklığının arttığı da araştırmacılarca rapor edilmektedir (Lisjak ve ark., 2010; Lisjak e ark., 2011).

H₂S'in stres toleransı sağlamadaki rolünün araştırıldığı çalışmaların nerede ise tamamında bitkilerin antioksidan kapasitesinin arttığı ve strese bağlı oksidatif zararın düştüğü rapor edilmekte, dolayısı ile eldeki bulgular H₂S'in bitki fizyolojisini anormal koşullar altında normale döndürmedeki önemli bir fonksiyonunun reaktif oksijen türlerinin aşırı birikiminin engellenmesi olduğuna işaret etmektedir. Çilek fideleri ile gerçekleştirilen çalışma sonucunda H₂S uygulamasının kuraklık stresi altında antioksidan enzim kodlayan genlerin ifade düzeylerini arttırmanın yanı sıra, abiyotik stres toleransı sağlamada anahtar rol oynayan transkripsiyon faktörü DREB (Dhydration-Responsive Element Binding Protein)'in ifade düzeyini de arttırdığı rapor edilmiş, bu sebeple abiyotik strese cevaben gen ifadesinin kontrolünde önemli rolü olduğu önerilmiştir (Christou ve ark., 2013). Bununla birlikte H₂S'in stres cevabı ile ilişkili mikro RNA ifadesini de düzenlemek yolu ile gen ifadesini kontrolde rol oynadığını öneren bir rapor mevcuttur (Shen ve ark., 2013).

2.3.2. Hidrojen sülfür (H₂S) ve domates ile ilgili yapılmış çalışmalar

Yakın zamanda bitki ve hayvanlarda bir sinyal molekülü olarak görev yaptığı ile ilgili birçok çalışma olan H₂S'in abiyotik stres toleransı sağlamadaki etkileri temelde tahıl ve baklagil türlerinde araştırılmış, kuraklık stresine tolerans sağlamadaki rolüne ilişkin en kapsamlı çalışmalar, *Arabidopsis* bitkisinde gerçekleştirilmiştir. Bu molekül gerek tarla koşullarında büyüme ve gelişiminin desteklenmesi ve verim artışı, gerekse hasat sonrası depolamada ürün kalitesinin korunması için gelecekte kullanımı öngörülen bir bileşik olmakla birlikte (Dooley ve ark., 2013; Lisjak ve ark., 2013), domatestte veya üyesi olduğu pek çok önemli tarımsal ürünü barındıran Solanaceae ailesinde H₂S'in en temel stres koşulu olan kuraklık stresine tolerans sağlamada etkili olup olmadığı ile ilgili henüz bir çalışma mevcut değildir.

Domates bitkisinde H₂S'in fizyolojik rolüne ilişkin mevcut olan bir çalışmada yan kök oluşumu incelenmiş, oksin yoksunluğunda yan kök gelişiminin baskılandığı ve H₂S üretiminden sorumlu temel enzim LCD'nin aktivitesinin düştüğü bildirilmiştir. Harici H₂S uygulaması, yan kök gelişimini yeniden tetiklemiş, H₂S ve naftalin asetik asitinin birlikte uygulanması sonucu, yan kök gelişiminde aditif etki gözlemlenmemiştir. Çalışma sonucunda H₂S'in oksin sinyal yolağında görev yaparak yan kök gelişimini kontrol ettiği bildirilmiştir (Fang ve ark., 2014). Yapılan bir başka çalışmada da H₂S'in

domates bitkisinin yumuşamasını ve bozulmasını geciktirdiği, yumuşamasına sebep olan enzimlerin aktivitesini inhibe ettiği raporlanmıştır (Hu ve ark., 2019).

Domates bitkisinde gerçekleştirilen bu çalışmalar ile elde edilen bulgular, ilgili literatür ile paralellik göstermekte ve H₂S'in domateste gelişim evrelerinde rol alan endojen bir molekül olarak görev yaptığına işaret etmektedir. Mevcut literatür ışığında, H₂S'in bu önemli tarım ürününde stres toleransı sağlama potansiyeline sahip olduğu öngörülmektedir.

2.4. PCR(Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

Amerikalı Biyokimya uzmanı Karry Mullis tarafından geliştirilen PCR, DNA üzerinde belirlenmiş bir nükleotit dizisinin çoğaltılması amacıyla kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem belli bir DNA parçasının kopyalarının primerler yardımıyla enzimatik olarak sentezlenmesi olarak ta tanımlanan in vitro bir yöntemdir (Maşlak ve Bağcıgil, 2018; Yöntem ve Ünaldı, 2018).

Genetik klonlama, dizileme, gen ifadesi analizleri için vazgeçilmez olan PCR'ın sayısız birçok kullanım alanı vardır. Tıp alanında ister tek bir patojen ister bağırsak mikrobiyotasını oluşturan çeşitli organizma popülasyonu olsun, mikropları kesin olarak tanımlamak için kullanılır. Ayrıca insan DNA'sındaki mutasyon ve polimorfizm analizleri ile doku ve kan tiplendirmesi analizlerinde kullanılan başlıca yöntemdir. Bilim ve tıp dışında da birçok kullanım alanı vardır mesela PCR tabanlı 'DNA Parmak İzi' analizleri son 50 yılda adli olayları çözmede olası en büyük ilerlemeyi sağlamıştır (Kaunitz, 2015) .

PCR tekniği Denatürasyon (çift iplikli kalıp DNA'nın 90 -95 °C de 3-5 dakika ısıtılarak birbirinden ayrılması); Hibridizasyon (kalıp DNA'dan ayrılan iplikçiklerin herbirinin 3' uçlarına 37-65°C de oligonükleotitlerin bağlanması) ve Amplifikasyon (70-75 °C de DNA Polimeraz enzimi ile ipliğin 5' → 3' yönüne doğru uzaması) olmak üzere üç aşamada gerçekleşir (Yöntem ve Ünaldı, 2018).

Klasik PCR dışında qPCR, RT-PCR, Real Time PCR, Nested PCR, Anchored PCR, Multiplex PCR, İmmuno PCR, Rapid PCR... birçok farklı PCR çeşidi mevcuttur.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Bitki Materyali ve Yetiştirilmesi

Yapılan tez çalışmasında yerli bir domates çeşidi kullanılmıştır. Çimlendirme torfunda viyolde çimlendirilen domates tohumları ilk gerçek yaprakların gelişiminin ardından 250 ml hacimli drenajsız pet bardaklara aktararak gelişimleri sağlanmış sonrasında daha büyük kaplara aktarılmıştır. Her gün 100 ml su ile sulanmıştır. Örnekler haftada bir kez olmak üzere Hoagland besin çözeltisi ile gübrelenmiştir. Bu çözelti Hoagland ve Arnon, (1950) çalışması referans alınarak hazırlanmıştır. Çözeltiyi hazırlamak için ilk önce Tablo 3.1. de verilen kimyasallar ile verilen oranlarda stok çözeltiler hazırlanmış ve bu stok çözeltilerinin tamamı ayrı ayrı şişelerde kapakları kapalı bir şekilde buzdolabında muhafaza edilmiştir.

Tablo 3.1. Hoagland besin çözeltisi hazırlamak için oluşturulan stok çözeltileri

Kimyasal Maddenin Adı	Kullanılan Miktar (g)	Hazırlanmış Stok Çözeltinin Hacmi (ml)
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	59.00	250
KNO_3	60.66	600
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	61.60	250
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	28.75	250
$\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6$	0.4	100
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5	100
H_3BO_3	3,09	50
$\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4.0475	50
$\text{ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.4377	50
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.248	50
$\text{MoO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.7195	50

Hazırlanan stok çözeltilerinden Hoagland besin çözeltisi hazırlanmak istendiği zaman çözeltiler buzdolabından çıkarılarak Tablo 3.2. de verilen oranlarda, büyük bir kap içerisinde karıştırılmıştır ve saf su ile son hacim 1000 ml ye tamamlanmıştır. Her karışımdan sonra çözelti KOH kullanılarak ph:6 olarak ayarlanmıştır. Bu karışım çok

daha büyük bir bidona alınarak saf su ile son karışım 30 litreye tamamlanmıştır. Sonuç olarak 30 litre tam Hoagland besin çözeltisi elde edilmiştir.

Tablo 3.2. Hoagland besin çözeltisi hazırlamak için kullanılan stok miktarları

Kimyasal Maddenin Adı	Hazırlanmış Stok Çözeltisinden Çekilen Miktar (ml)
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	90
KNO_3	300
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	60
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	60
$\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6$	9
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	9
H_3BO_3	1.5
$\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.6
$\text{ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.23
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.1
$\text{MoO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.15



Şekil 3.1. Çimlendirme torfunda çimlendirilmiş domates

Bitkilerin yetiştirilmesi ve kuraklık ortamı üniversitemizde (Necmettin Erbakan Üniversitesi) uygun laboratuvar olmadığı için Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü laboratuvarlarında yapılmıştır. Biyokimyasal ve gen ifadesi analizleri ise hem Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü laboratuvarlarında hem de Necmettin Erbakan Üniversitesi, Fen Fakültesi laboratuvarlarında yapılmıştır.



Şekil 3.2. In vitro koşullarda kuraklık uygulaması

Tez çalışması kapsamında ilk önce domates fidelerine uygulanmış olan NaHS konsantrasyonları belirlenmiştir. İlgili literatürde var olan çalışmalar bitkiler için H_2S 'in fizyolojik konsantrasyonunun 1-100 μM arasında değiştiği rapor edilmektedir (Jin ve ark., 2011). Bununla birlikte üzerinde çalışılmış bitki türü için uygun, hücreye zarar vermeyecek şekilde uygulama konsantrasyonu aralığı belirlenmiştir. Örneğin Zhang ve ark., (2009b) tatlı patates (*Ipomoea batatas*) bitkisinde gerçekleştirmiş oldukları bir çalışmada, hidroponik (toprak kullanılmadan sulama suyu içerisinde bitkinin ihtiyacı olan besin maddelerine ait çözümlerin bitkiye verilerek bitkinin yetiştirilmesi) ortamda 100 μM NaHS konsantrasyonu yapraklarda hafif sararmaya sebep olmuş ve 50 μM 'a kadar NaHS konsantrasyonunun bu bitki için uygun aralık olduğunu rapor etmişlerdir. Yine başka bir çalışmada, *Arabidopsis* 'te hidroponik ortamda uygulanmış NaHS konsantrasyonunun belirlenmesinde, hücre zararı markörü olan MDA içeriği markör olarak kullanılmıştır (Shen ve ark., 2013).

Bu projede NaHS, toprakta yetiştirilmiş olan bitkilere sulama yolu ile uygulanmıştır. Altı haftalık domates fideleri aşağıdaki tabloda belirtildiği şekilde ve 15'er adet bitkiden oluşan toplam 3 gruba ayrılmıştır.

Tablo 3.3. Oluşturulmuş domates fideleri grupları

Grup 1:	Kontrol grubu
Grup 2:	50 μ M NaHS
Grup 3:	100 μ M NaHS

Grup 1 (Kontrol grubu) iki hafta süre ile her gün sulanmış, diğer gruplar ise yukarıda belirtilen konsantrasyonlardaki NaHS çözeltileri ile sulanmıştır. Uygulama süresinde bitki büyüme ve gelişimi gözlemlenmiş olup uygulamanın 8. ve 14. günlerinde her bir gruptan 5'er adet bitkide yaprak MDA miktarları ölçülmüştür.



Şekil 3.3. In vitro koşullarda kuraklık uygulaması altında NaHS uygulaması

Benzer yöntem ile NaHS uygulamasının gerçekleştirildiği bir çalışmada, sulama suyunda 500 μM 'a kadar NaHS konsantrasyonunun buğday fidelerinde büyüme ve gelişimi desteklediği Dooley ve ark., (2013) tarafından rapor edilmektedir. Yapılmış olan çalışmada 10-500 μM aralığında 5 farklı NaHS konsantrasyonu 6 haftalık domates fidelerine uygulanmış, uygulama süresince bitki büyüme ve gelişimi izlenerek, kontrol grubu ve uygulama gruplarının yaprak MDA içerikleri belirlenmiştir. Deney sonucunda kontrol grubuna benzer büyüme ve gelişim gösteren, ve yanı sıra benzer MDA miktarının ölçüldüğü konsantrasyon aralığı belirlenmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Malondialdehit (MDA) miktarı tayini

MDA miktarı, Yan ve ark., (2010) tarafından yapılmış çalışmada tarif edildiği üzere TBA (Thiobarbitürik asit) reaksiyonu yöntemi ile belirlenmiştir. Doku örnekleri (0.2 g) 1 ml 50 mM KH_2PO_4 tamponu (pH 7.8) ile öğütülüp, 4°C'de 15 dakika 10.000g'de santrifüj işlemine tabi tutularak üst faz alınmıştır. Alınan üst faz (0.8 ml) ve %0.5 TBA içeren 1.3 ml %20'lik TCA (Trikloroasetik asit)'dan oluşan reaksiyon çözeltisi su banyosunda 95°C'de 20 dakika bekletilip, buzda soğutulmuştur. Reaksiyon karışımı 4°C/10.000 g'de 5 dakika süre ile santrifüjlenmiş olup üst faz alınmıştır. 532 nm'de yapılan spektrometrik ölçümler, 600 ve 450 nm'deki absorbanslar çıkarılarak düzeltilmiştir.

MDA konsantrasyonları, $\text{MDA } (\mu\text{M}) = 6.45 (A_{532} - A_{600}) - 0.56A_{450}$ formülüne göre hesaplanacaktır.

3.2.2. H_2S uygulamasının kuraklık stresine cevaben gen ifadesi, antioksidan kapasite ve bitki fizyolojisine etkilerinin belirlenmesi

Bitkiler, daha önce tarif edildiği üzere yetiştirilmiş, fideler 6 haftalık olduklarında kuraklık stresi ve NaHS uygulamasına tabi tutulmuştur. Uygulama öncesi fideler Tablo 3.2. 'de belirtildiği üzere 50'şer adet bitkiden oluşmuş 3 gruba ayrılmıştır.

Tablo 3.4. Gen ifadesi ve antioksidan kapasite etkisi ölçümü için oluşturulan gruplar

Grup 1	Kontrol grubu
Grup 2	Kuraklık uygulaması, kontrol grubu
Grup 3	Kuraklık ve NaHS uygulaması

Kuraklık uygulamasına başlamadan hemen önce 3 gün boyunca Grup 3, daha önce de belirtildiği üzere belirlenmiş olan konsantrasyonda NaHS çözeltisi ile sulanmıştır. Kuraklık uygulamasına başlamadan (Gün 0), son sulamayı takiben 6 saat sonra Grup 3 ve Kontrol grubu bitkilerinden 5'er adet örnek alınmış ve H₂S uygulamasının etkisi araştırılmıştır.

3.2.2.1 Enzim aktivitesi analizleri

Var olan H₂S uygulamasının abiyotik stres toleransına etkilerinin araştırıldığı çalışmalar sonucunda, H₂S'in bitki antioksidan kapasitesini arttırıp, lipid peroksidasyonunu azaltarak strese bağlı oksidatif zararı indirgediği rapor edilmektedir (Zhang ve ark., 2009b; Zhang ve ark., 2010d). Önerilen çalışmalarda H₂S'in kuraklık stresi altında domates bitkisinde antioksidan kapasite ve lipid peroksidasyonu üzerindeki etkisi, SOD, APX ve CAT enzim aktiviteleri tayin edilerek belirlenmiştir.

Yaprak ve kök dokuları 4 °C'de 1 mM Askorbik Asit (ASA) ve 1 mM EDTA içeren 1 ml 50 mM KH₂PO₄ tampon çözeltisi ile buz banyosunda homojonize edilmiştir. 4°C'de 15 dakika 15,000 g'de santrifüj edilerek elde edilen üst faz deney çalışmalarında kullanılacaktır. Bradford, (1976) 'daki metoda göre protein miktarı belirlenmiştir.

3.2.2.1.1. SOD aktivitesi

Toplam Süperoksit dismutaz (SOD, EC 1.15.1.1) aktivitesi Nitroblue tetrazolyum (NBT) 'nin fotokimyasal indirgenmesini inhibe etme yeteneği ölçülerek belirlenmiştir. Beuchamp ve Fridovich (1971)'de rapor edilen yönteme göre çalışma yürütülmüş, toplam 3 ml hacimde 20 µM riboflavin, 150 mM L-metiyonin, 600 µM NBT, 550 µL H₂O ve 50 µL enzim ekstraktı içeren reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Reaksiyon, riboflavinin karışıma eklenmesi ile başlatılmış ve beyaz floresan ışığı altında 20 dakika süre ile yürütülmüştür. Enzim ekstraktı içermeyen karışım, negatif kontrolü oluşturmuştur. Bir birim SOD aktivitesi, 560 nm 'de ölçüldüğü zaman NBT (Nitroblue tetrazolyum)'nin indirgenmesinin %50 inhibe edilmesi için gerekli enzim miktarı olarak hesaplanmıştır.

3.2.2.1.2. APX aktivitesi

Askorbat peroksidaz (APX, EC 1.11.1.11) aktivitesi ölçümleri, Nakano ve Asada, 2017 'de anlatılanlar referans tutularak yapılmıştır. Reaksiyon karışımı 50 mM KH₂PO₄

tampon çözeltisi (pH 7.0) ve 1 mM sodyum askorbat ve 150 – 200 µL enzim ekstraktı ile hazırlanmıştır. Reaksiyon, 0.5 mM H₂O₂ ilavesi ile başlatılarak 290 nm’de askorbat (absorpsiyon katsayısı 2.8 mM⁻¹ cm⁻¹) absorbansındaki azalma grafiğe geçirilerek hesaplanmıştır.

3.2.2.1.3. CAT aktivitesi

Katalaz (CAT, EC 1.11.1.6) aktivitesi, 1 ml % 0.1’lik H₂O₂ ve 200 µL enzim ekstraktı içeren 1.9 ml 50 mM KH₂PO₄ tampon çözeltisi (pH 7) içerisinde 240 nm’de ölçülmüştür. Enzim aktivitesi reaksiyonun başlangıç hızından H₂O₂’nin 240 nm ’deki yok olma katsayısı (absorpsiyon katsayısı 40 M⁻¹ cm⁻¹) kullanılarak hesaplanmıştır (Dhindsa ve ark, 1981).

3.2.2.2. RNA izolasyonu, cDNA sentezi (RT-PCR) ve Kantitatif PCR (qPCR)

3.2.2.2.1. RNA izolasyonu

Domates yaprak ve kök dokularından total RNA izolasyonu, NucleoSpin® RNA Plant kit (Macherey-Nagel) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İzolasyon aşamalarını özetleyecek olursak; sıvı azotta havan ile öğütülmüş olan 100 mg doku örneği, 350 µl kite ait liziz tamponu ve 3.5 µl β-merkaptoetanol ile karıştırılmıştır.

Daha sonra filtreli tüpte 11,000 g’de 1 dakika santrifüjlenmiş ve filtrelenenmiş sıvı yeni bir tüpe alınmıştır. Doku örneği 350 µl %70 etanol ile karıştırılarak tekrar kite ait bir diğer filtreli tüpe alınmış ve 30 saniye süre ile 11,000 g ‘de santrifüjlenmiştir. Temiz bir 2 ml’lik tüpe alınan filtre üzerine 350 µl tuzdan arındırıcı MDB (Membran tuz giderme tamponu) konulmuş, kurutmak üzere 11,000 g’de 1 dakika santrifüjlenmiştir. Filtreye 95 µl DNase eklenerek 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiş, filtre iki kez, birinci yıkamada 200 µl RAW2 tamponu, ikinci yıkamada 600 µl RA3 tamponu eklenip 11,000 g’de 30 saniye süre ile santrifüjlenerek yıkanmış, üçüncü ve son yıkama 250 µl RA3 tamponunun eklenmesi ve 11,000 g’de 2 dakika santrifüjlemeyi içermiştir.

Filtre son olarak kit içeriğinde sağlanan nükleaz içermeyen bir 1.5 ml’lik tüpe alınıp, 60 µl RNase içermeyen su eklenmiş ve 11,000 g’de 1 dakika süre ile santrifüjleme ile RNA çözeltisi elde edilmiştir. RNA konsantrasyon ve saflığı, spektrometre ile belirlenmiş, RNA örnekleri, üreticinin tavsiyesi doğrultusunda sonraki analiz basamaklarında kullanılmak üzere -80°C’de saklanmıştır.

3.2.2.2.2. cDNA sentezi (RT-PCR)

RNA örneklerinden cDNA sentezi, SuperScript™ IV VILO™ Master Mix (Invitrogen) kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ters transkripsiyon PCR (RT-PCR) reaksiyon karışımı, buz üzerinde 4 µl SuperScript™ IV VILO™ Master Mix, kalıp RNA (10 pg-2 µg arası), ve reaksiyon karışımını 20 µl'ye tamamlamak üzere nükleaz içermeyen su ile hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımı, Tablo 3.3. 'te belirtilen koşullarda PCR cihazında inkübe edilmiş ve elde edilen cDNA, kantitatif PCR reaksiyonlarında kullanılmak üzere -20°C'de saklanmıştır.

Tablo 3.5. RT-PCR Reaksiyon Koşulları

Primerlerin bağlanması	25°C / 10 dakika
RNA'nın ters transkripsiyonu	50°C / 20 dakika
Enzim inaktivasyonu	85°C / 5 dakika

3.2.2.2.3. Karşılaştırmalı (kantitatif) PCR (qPCR)

qPCR reaksiyonları, toplam hacim 20 µL olacak şekilde nükleaz içermeyen su, 10 µL 2X Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QPCR karışımı (Agilent Technologies), 200-500 nM ileri ve geri primer karıştırılarak hazırlanmış, konsantrasyonu 50 ng/µl'e ayarlanmış 1 µl cDNA karışıma eklenmiştir. Reaksiyon döngüsü Tablo 3.4. 'teki gibi ayarlanmış, Stratagene MX3000P Real-Time PCR (Agilent Technologies) cihazında gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.6. qPCR reaksiyon döngüsü

Döngü	Döngü Süresi	Sıcaklık
1	3 dakika	95°C
40	15 saniye	95°C
	20 saniye	60°C

Gen ifadesi düzeyindeki değişim, MxPro QPCR yazılımının 'karşılaştırmalı kantitatif' analiz modülü ile CT (döngü eşiği) değerleri baz alınarak belirlenmiştir. Tüm gen ifadesi analizlerinde normalizasyon için aktin geni (SIActin) kullanılmıştır.

Gen ifadesi analizlerinde kullanılmış primer dizileri (5'>3') aşağıda Tablo 3.5. 'te listelenmektedir.

Tablo 3.7. Gen ifadesi analizlerinde kullanılmış primer dizileri

Gen Adı	Primer
1- ASR1: (Golan ve ark., 2014)	ASR1-F- GGGACACCACCATCTCTTCTAAA
	ASR1-R- CCAAATATGGAAATTCACGAATAT
2- ASR4: (Golan ve ark., 2014)	ASR4-F- GGTAATGAGGAAGGTGGCTATGG
	ASR4-R- TGGTTCCACTATCATCATTCTCTTCA
3- NCED: (Porcel ve ark., 2014)	NCED-F- ACAGCCGACCCACGAGTCCA
	NCED-R- GGTGTCCGGCGGTTGGTTCA
4- DREB2: (Guo ve Wang., 2011)	DREB2-F-ATGATAATAATGTCTACAGAGCAA
	DREB2-R-CTAATGTTGCCATAAAAACTCTC
5- DREB2A: (212 bp; AF500012)	DREB2A-F- AAAAGCCGCTCACATGGATC
	DREB2A-R- GCAGCTCCACTATCTCACTCA
6- SIPLY1: (Sun ve ark., 2011)	SIPYL1-F- TATGCCGGTCCTTCTCGATCTCA
	SIPYL1-R- AAGCTCAATTCACGCACAGCCAC
7- miRNA169c: (Zhang ve ark., 2011a)	miRNA169-F ATAGCTACATGAACTTGTGATCCATAATAC
	miRNA169-R-TTAATTGGGTTGTGATTGCATGTG
8- Actin: (Porcel ve ark., 2014)	Actin-F- TCACCACCACTGCTGAACGGGA
	Actin-R- TGGGCAACGGAACCTCTCAGC

Primer çiftleri No.5 cDNA klon dizilerinden Primer3 Ver. 4.0.0. kullanılarak tarafımızca dizayn edilmiştir. Beklenen ampikon uzunlukları ve GenBank kayıt numaraları parantez içinde verilmektedir. No:5 dışındaki tüm primer çiftleri ise tabloda verilen ilgili referanslardan alınmıştır.

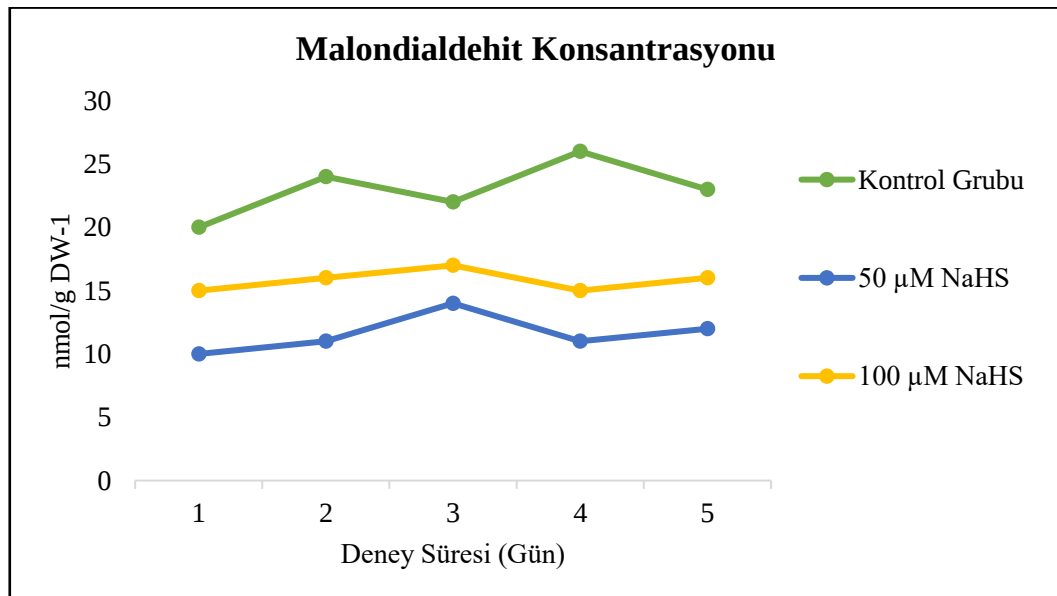
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. Deney gruplarındaki lipid peroksidasyonu oranı

4.1.1. Malondialdehit (MDA) miktarı tayini

Kontrol grubunda MDA içeriği deneyin ikinci günü yükselmiş olup sonrasında inişli-çıkışlı bir seyir izlemiştir. Beşinci günün sonunda MDA içeriğinde 3 nmol/g DW^{-1} lik artış olmuştur (şekil 4.1.). $50 \mu\text{M}$ ve $100 \mu\text{M}$ NaHS uygulanan deney gruplarının her ikisi de deneyin üçüncü gününe kadar düzenli bir artış sergilemiş olup deneyin sonunda $50 \mu\text{M}$ NaHS uygulanan grupta 2 nmol/g DW^{-1} lik artış olmuş; $100 \mu\text{M}$ NaHS uygulanan grupta ise 1 nmol/g DW^{-1} lik artış olmuştur.

MDA, doğal veya stres koşullarında hücrelerin doymamış yağ asitlerinin enzimatik parçalanması ve oksidasyonu sonucu oluşmakla birlikte Membran lipidlerinin peroksidasyonunun son ürünü olarak bilinmektedir. Bitkiler oksidatif strese maruz kaldıkları zaman MDA birikimi gerçekleşir. Bu nedenle MDA içeriği lipid peroksidasyonunun belirleyicisi olarak kabul edilmektedir. Burada yaptığımız deneyde gözlemlediğimiz kadarıyla MDA içeriği; kontrol grubundaki değerler ile deney gruplarındaki değerlere nazaran daha yüksek bir seviyededir. Hu ve ark., (2012) 'nın yaptığı çalışmada belirtildiği gibi deney gruplarındaki artış kontrol gruplarına göre daha az olması gerekirdi. Buradan yola çıkarak sonuçlarımız için şunu söyleyebiliriz; kuraklık stresi altında hidrojen sülfür lipid peroksidasyonunu azaltmaktadır.



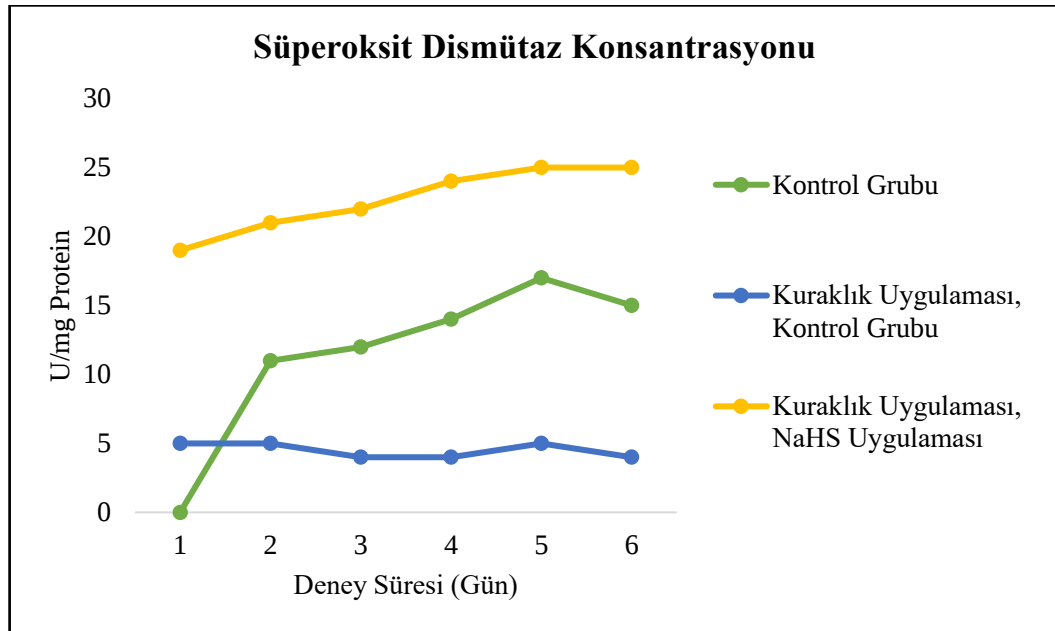
Şekil 4.1. Deney gruplarındaki beş günlük malondialdehit konsantrasyonu oranları

4.2. H₂S uygulamasının kuraklık stresine cevaben antioksidan kapasite ve gen ifadesi etkilerinin belirlenmesi

4.2.1. Enzim aktivitesi analizleri

4.2.1.1. SOD aktivitesi

Kontrol grubu ile kuraklık uygulaması altında NaHS uygulanan deney gruplarında deneyin beşinci gününe kadar düzenli bir artış gözlenirken bu günden sonra kontrol grubu düşüşe geçmiş; kuraklık uygulaması altında NaHS uygulanan deney grubu ise sabit kalmıştır. Kuraklık uygulaması altındaki kontrol grubunda ise dördüncü güne kadar bir düşüş gözlenmiş olup beşinci günde tekrardan bir artış olmuş ve sonraki gün yine düşüş gerçekleşmiştir.

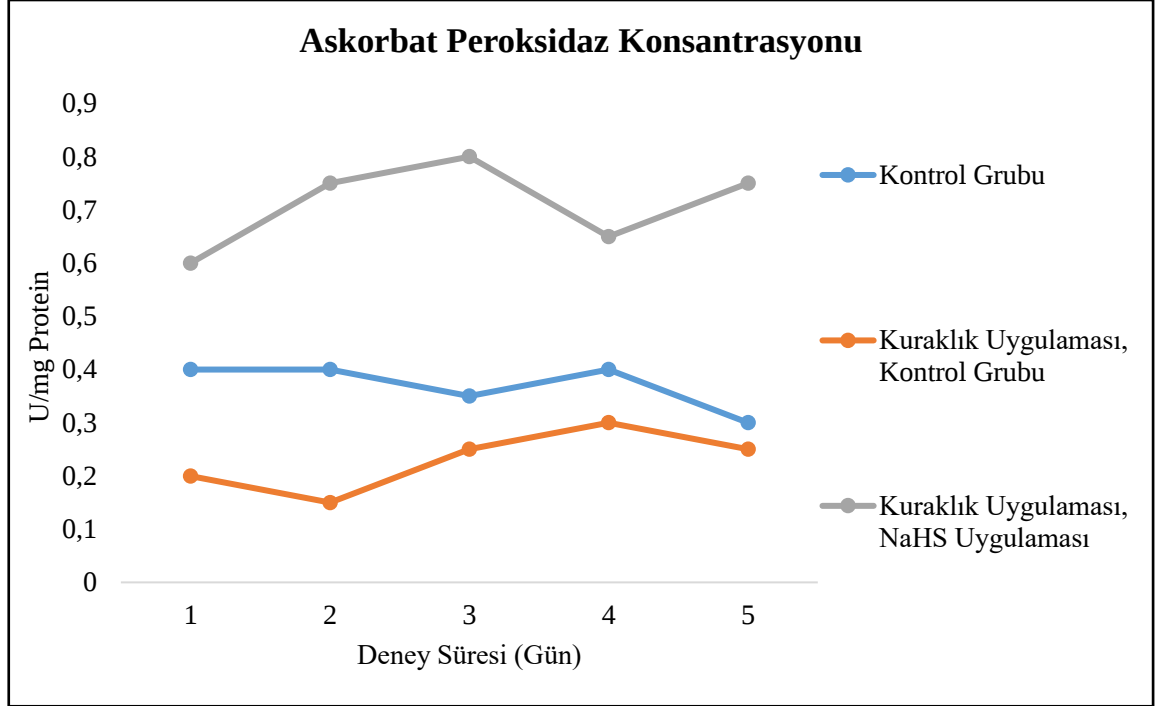


Şekil 4.2. Deney gruplarındaki altı günlük süperoksit dismütaz konsantrasyonu oranları

4.2.1.2. APX aktivitesi

Sonuçlardan da anlayacağımız üzere kontrol grubunda deneyin başlangıç gününden son gününe kadar olan süreçte az da olsa bir azalma kaydedilirken; kuraklık uygulaması altındaki kontrol grubu ile kuraklık uygulaması altında NaHS uygulanan gruplarda deneyin son günündeki durum ilk gününe nazaran daha yüksek olarak kaydedilmiştir. Daha önce var olan Literatürde de belirtildiği üzere stres altında APX seviyesindeki artış olağan bir durum. Stres altındaki grupları karşılaştırdığımız zaman

kuraklık altında NaHS uygulanan grupta görülen artış kuraklık uygulaması altındaki kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Buradan yola çıkarak diyebiliriz ki NaHS APX seviyesini arttırmaktadır.

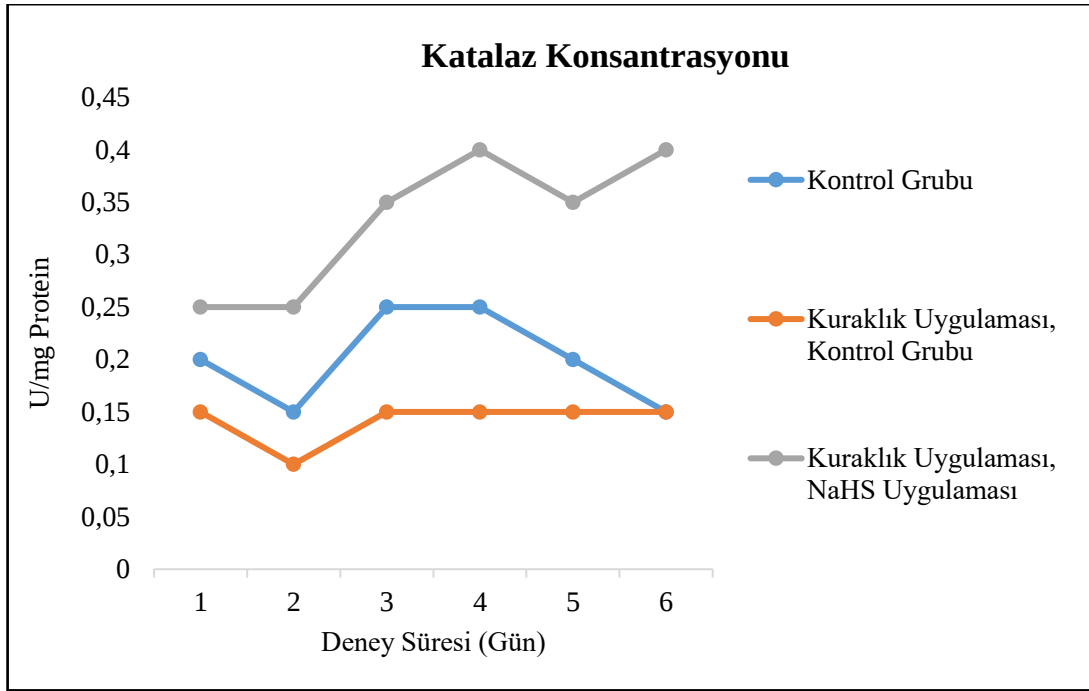


Şekil 4.3. Deney gruplarındaki beş günlük askorbat peroksidaz konsantrasyonu oranları

4.2.1.3. CAT aktivitesi

Katalaz aktivitesi ile ilgili yaptığımız deneyin sonucuna baktığımız zaman gerek kontrol grubu gerekse kuraklık uygulaması altındaki kontrol grubunda deneyin hemen ikinci gününde küçük bir düşüş yaşanmış olup kontrol grubunda bu değer sonrasında artıp deneyin altıncı gününde çok daha düşük bir seviyeye gelmiştir; kuraklık uygulaması altındaki kontrol grubunda ise ikinci günden sonra bir artış görülmüştür ancak bu artış deneyin son (altıncı) gününe kadar sabit kaldığı gözlenmiştir.

Kuraklık uygulaması altında NaHS uygulanan deney grubunda ise deneyin ikinci gününden itibaren bir artış başlamış olup deneyin ilk günü ile son günü arasında çok yüksek bir değer farkı oluşmuştur. Hu ve ark., (2012); Sun ve ark., (2015); Zhang ve ark., (2011b) çalışmalarında da belirtildiği üzere bu durum beklenen bir durumdur.



Şekil 4.4. Deney gruplarındaki altı günlük katalaz konsantrasyonu oranları

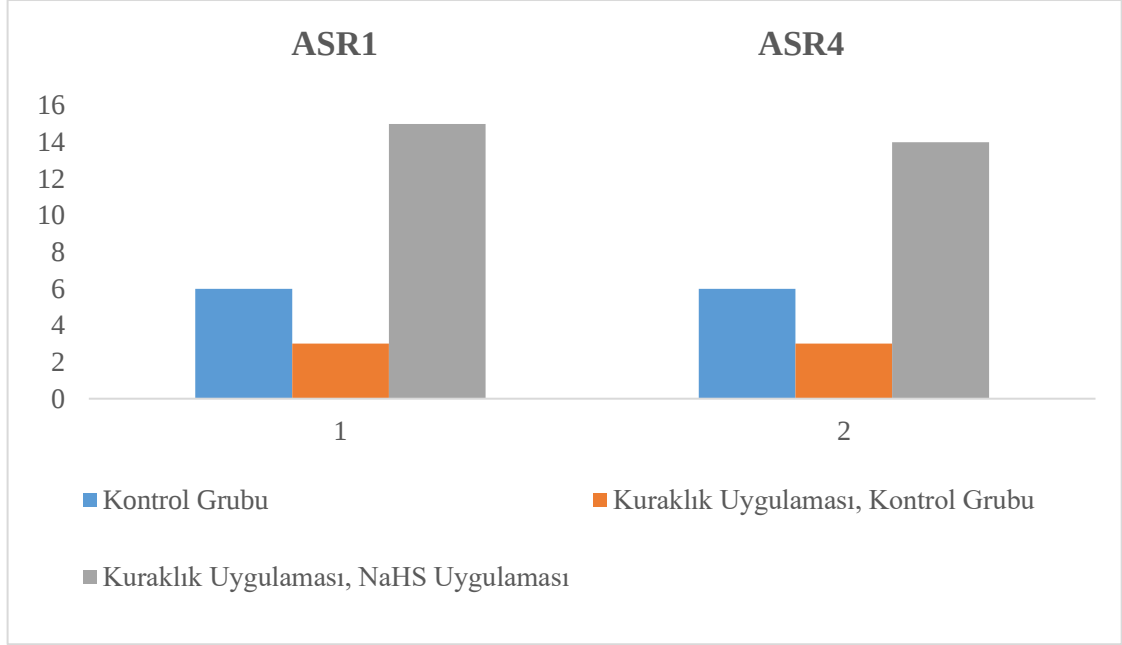
4.2.2. Gen ifadesi analizleri

4.2.2.1. ASR geni

ASR (Absisik Asit Olgunlaştırıcı) geni, tüm bitkiler içerisinde ilk olarak domateslerde klonlanmıştır (ASR1). Daha sonraki zamanlarda yapılan çalışmalarda başka bitkilerden de klonlanan ASR geni bu bitkilerde tuzluluk, kuraklık, susuzluk gibi abiyotik streslerde veya meyvenin olgunlaşmasında yanıt olarak rol oynamışlardır (Golan ve ark., 2014). Mevcut literatürde de belirtildiği üzere bu gen ailesi içinde ekspresyon oranı en fazla olan genler ASR1 ve ASR4'tür. Bu yüzdendir ki biz de bu çalışmamızda bu gen ailesinden sadece bu iki geni kullandık. ASR1 tüm bitki organları arasında en çok kökte ekspresyona uğrarken; ASR4 ise fotosentetik organlarda, çanak yapraklarda ve taç yaraklarda ekspresyona uğradığı tespit edilmiştir.

Şekil 4.5. 'te de görüldüğü gibi kontrol grubunda her iki genin ekspresyon oranı kuraklık uygulaması altındaki kontrol grubundan fazla iken kuraklık uygulaması altındaki NaHS uygulaması yapılmış ola grupta her iki genin ekspresyon oranı diğer gruplara oranla çok fazladır ve bu gruptaki ASR1'in ekspresyon oranı ASR4'e göre biraz daha fazladır. Bizim bu bulgumuz, Golan ve ark., (2014)'nın yaptığı çalışmada belirtilen sonuçlar ile doğru oranda örtüşme göstermektedir.

Sonuçlardan da anlaşılacağı üzere NaHS uygulanan gruptaki gen ekspresyonları fazla olduğundan, bu grup kuraklığa diğerlerine oranla daha fazla dayanıklıdır. Absisik Asit diğer gruplara oranla bu grupta daha fazla rol üstlenecek, stomalar oldukça kapalı olacak, terleme azalacak böylece su kaybı minimum düzeye düşecektir.



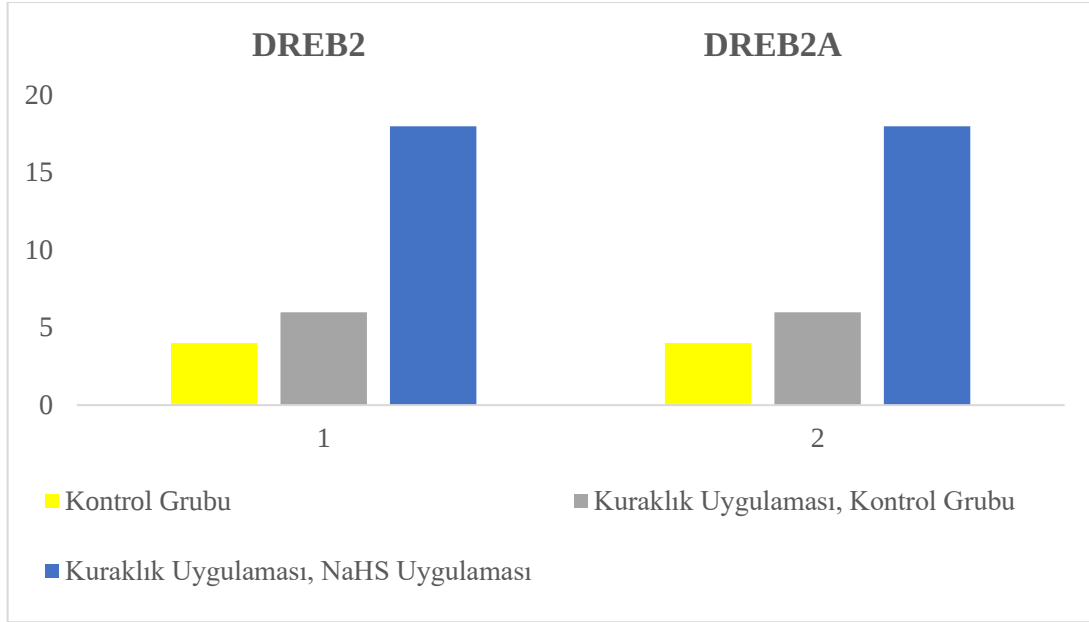
Şekil 4.5. ASR1 ve ASR4 genlerinin deney gruplarındaki ekspresyon oranı

4.2.2.2. DREB geni

DREB; içinde DRE (Dehidrasyondan sorumlu element) içeren bağlayıcı protein geni ailesine verilen isimdir. Bu gen grubu stres toleransı ile ilgili çeşitli gen grubunu kontrol eder (Shinozaki ve Shinozaki, 2002). Daha önce özellikle *Arabidopsis*, soya fasulyesi ve farklı bitki çeşitlerinde yapılan çalışmalar göstermektedir ki bu grup soğuğa karşı, sıcaklığa karşı, kuraklık ve yüksek tuzluluk toleransı gibi abiyotik stresler ile ilgili genlerin ekspresyonunda önemli rol oynamaktadır (Kidokoro ve ark., 2015).

Yapmış olduğumuz çalışmada hem (Guo ve Wang, 2011) çalışması referans alınarak kullanılan primer (DREB2) çiftlerinde hem de kendimiz tarafından dizayn ettiğimiz primer çiftlerinin her ikisinde Şekil 4.6. 'da görüldüğü üzere benzer sonuçlar elde edilmiştir. Kuraklık uygulaması olan gruplardaki gen ekspresyonu oranı kontrol grubuna göre oldukça fazla olmakla birlikte kuraklık uygulaması altında NaHS uygulanan gruptaki ekspresyon oranı hem kuraklık uygulaması altındaki kontrol grubuna göre hem de normal koşullardaki kontrol grubuna göre oran diğerlerinin iki katından fazladır.

Kuraklık uygulaması altında bu genlerdeki ekspresyon oranının yüksek olması var olan literatüre göre beklenen bir durum olmasıyla birlikte kuraklık uygulaması altındaki NaHS uygulanan gruptaki büyük artış gösteriyor ki H₂S bitkinin kuraklık durumundaki toleransını olumlu yönde arttırmaktadır.

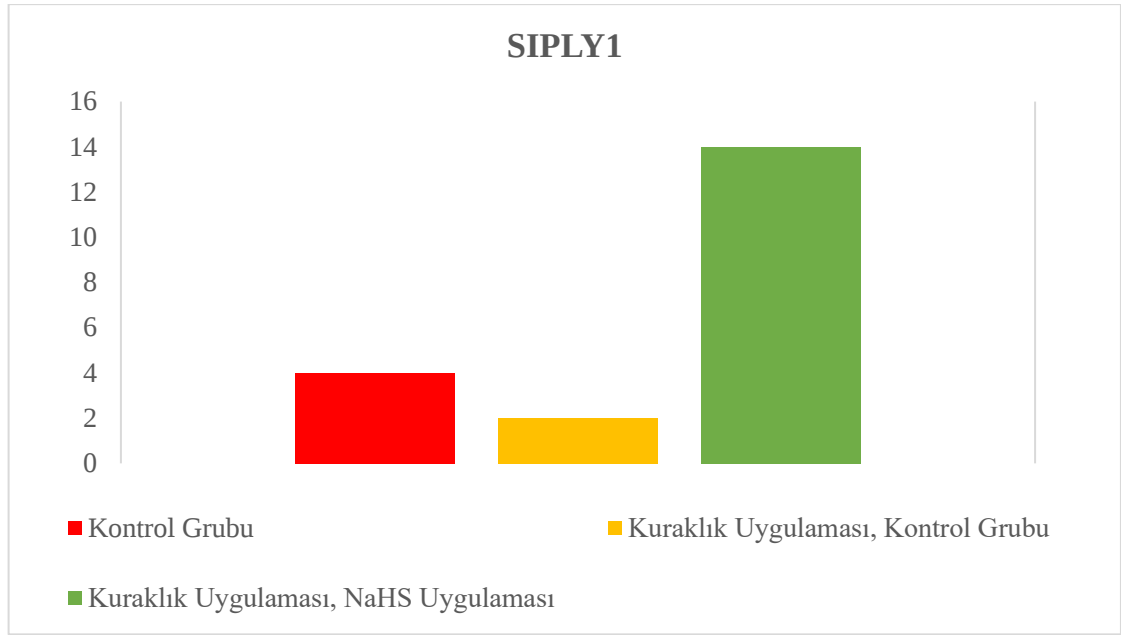


Şekil 4.6. DREB2 ve DREB2A genlerinin deney gruplarındaki ekspresyon oranı

4.2.2.3. SIPLY1 geni

SIPLY1 geni SIPLY gen ailesine mensup olup meyve gelişimi ve olgunlaşmasında yüksek oranda ekspresyona uğrayan genlerin başında gelmektedir. Bu gen bütün vejetatif organlarda ekspresyona uğrayabilir. Bu gen grubundaki bütün genler dehidrasyon durumunda aşağı doğru regülasyon gösterirken sadece SPLY1 geni yukarı doğru regülasyon gösterir. Bu gen ailesinden sadece bu gen üzerindeki ekspresyon durumuna bakmamızın nedeni de budur. Ayrıca bu genin domates gibi etli meyvelerde ABA reseptörlerini kodladığı da düşünülmektedir (Sun ve ark., 2011).

Yaptığımız çalışmada Kontrol grubundaki SIPLY1 ekspresyon oranı kuraklık uygulaması altındaki kontrol grubundaki ekspresyon oranından fazladır. Buna karşın kuraklık uygulaması altındaki NaHS uygulanan gruptaki ekspresyon oranı diğerlerine oranla 3 katından fazladır. Bu durum H₂S 'in kuraklık altında bitkinin kendi içinde daha fazla su tutmasını sağlamakla birlikte bitkinin kuraklığa olan toleransını da olumlu yönde etkilediğini göstermektedir.



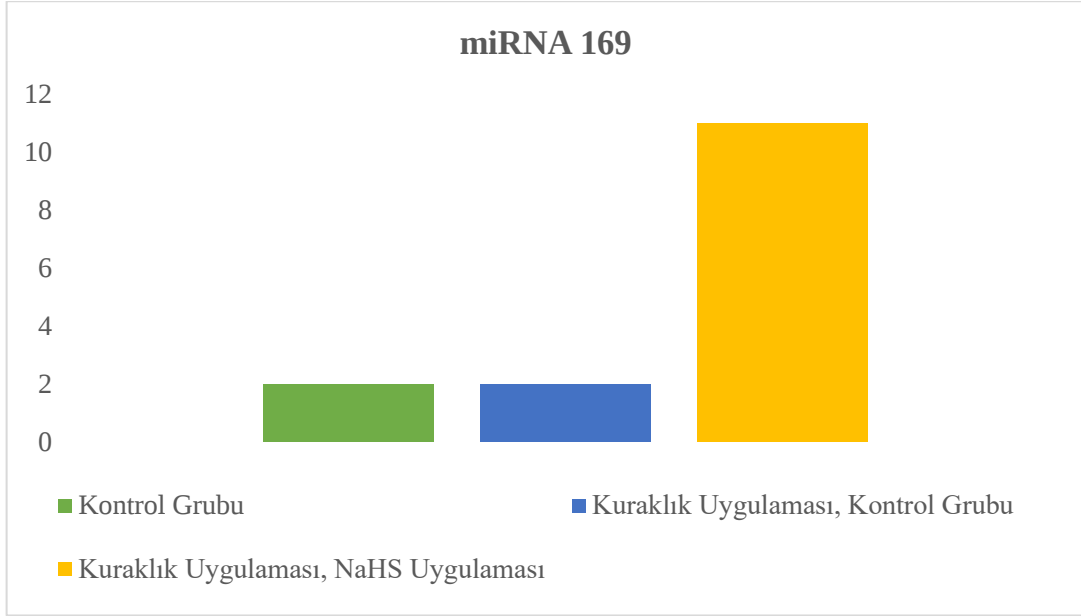
Şekil 4.7. SIPLY1 geninin deney gruplarındaki ekspresyon oranı

4.2.2.4. miRNA 169 geni

miRNA'lar bitkilerde, fizyolojik ve gelişimsel birçok süreçte rol oynarlar. miRNA 169 geni ile birçok çalışma yapılmış ve bu çalışmalarda bu genin yüksek sıcaklık altında ekspresyonunun arttığı kaydedilmiştir. Bu çalışmalardan Zhao ve ark., (2007)'nın pirinç üzerinde yaptıkları deneylerde köklerde gözlemledikleri indüklenmenin sürgünlerdeki indüklenmelerden daha fazla olduğunu belirtilmiştir. Türkiye'de şeftali üzerine yapılan bir çalışmada kuraklık altında bu genin ekspresyonu çok yüksek iken kuraklıktan hemen sonra ekspresyonunun düştüğü rapor edilmiştir (Eldem ve ark., 2012). Xin ve ark., (2010) 'da yaptıkları çalışmada yüksek ısı altında birçok miRNA ile birlikte miRNA 169'un da up regülasyon gösterdiğini gözlemlemiştir. Yine *Arabidopsis thaliana* üzerinde yapılan bir çalışmada NFYA5 transkripsiyon faktörünün ABA'ya bağımlı bir şekilde kurak ortamda kuvvetle indüklendiği kaydedilmiş ve yaprak su kaybını azaltarak kuraklığa toleransı arttırmıştır. miRNA169 ise kuraklık altında down regülasyona uğramaktadır. Yapılan deneylerden belirtildiği üzere miRNA 169'un down regülasyonu hedefi olan NFYA5 'in yüksek düzeyde indüksiyonuna katkıda bulunduğu ve böylece kuraklığa dirençte önemli rol oynadığı kaydedilmiştir (Li ve ark., 2008).

Yapılan çalışmada kuraklık uygulaması ile kontrol gruplarındaki miRNA 169 geni ekspresyonları aynı iken; kuraklık uygulaması altında NaHS uygulanan grupta ise diğer grupların beş katından fazla bir oranda artış görülmüştür. Mevcut literatürde kuraklık

altında bu genin *Solanum lycopersicum* da stoma açıklığını azaltması, terleme oranını ve yaprak su kaybını düşürmesi ile bitkide kuraklık toleransını arttırdığı rapor edilmiştir (Zhang ve ark., 2011a). Dolayısıyla kuvvetle söyleyebiliriz ki hidrojen sülfür domates bitkisinin kuraklığa olan toleransını büyük oranda arttırmaktadır.



Şekil 4.8. miRNA 169 geninin deney gruplarındaki ekspresyon oranı

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1 Sonuçlar

Domates dünyada 4.751.530 ha (hektar alan) 'da 159.347.031 ton üretilmektedir. Dünya geneli üretiminin 50.125.000 ton ile %31'ni Çin, 17.500.000 ton ile %10,98'ni Hindistan, 13.207.000 ton ile %8,28'ni Amerika Birleşik Devletleri ve 328.000 ha alanda 11.003.433 ton üretimle 4. sırada bulunan Türkiye %6,9'u karşılamaktadır. Değişen tüketim alışkanlıkları yeni talepler doğurmakta insanlar hem kaliteli hem de sağlıklı ürünleri tercih etmektedir. Değişen iklim koşulları öncelikle kuraklık başata olmak üzere çok sayıda çevresel stresin tarımsal üretimi direk olarak etkilemekte aynı zamanda nüfus artışı, verimli tarım arazilerinin azalması gibi birçok etken daha verimli tohumların üretilmesi, tarıma elverişliliği az arazilerde yüksek verimli ürünlerin üretilmesi gereksinimini doğurmaktadır. Bu amaç doğrultusunda toleransı yüksek çeşitlerin geliştirilmesi ve aynı zamanda toleransı arttırmak üzere moleküler ve metabolik tanımlamalar yapılması önem arz etmektedir.

Domates klimakterik (dalından koparıldıktan sonraki süreçte olgunlaşmasını devam ettirebilen meyveler) meyve olgunlaşması konusunda model organizmadır. Bu sebeple çok sayıda moleküler genetik çalışma yapılmıştır. Gerçekleştirilen tez çalışması kapsamında hidrojen sülfür uygulamalarının domatesteki kuraklık stresine olası etkileri moleküler ve metabolik düzeyde araştırılmıştır. Literatürde daha önce arabidopsis ve buğday gibi bitkilerde kuraklık stresine toleransı H₂S uygulamaları ile arttığı rapor edilmiştir. Çalışma kapsamında H₂S uygulamalarının domatesteki biyo-markör olarak kuraklık stresinde kullanılabilecek olan hedef genlerin ifade düzeyleri ölçülmüş olup. Kuraklık stresine cevapta rol aldığı bilinen bu genlerin ifade düzeylerinin arttığı görülmüştür. Ayrıca H₂S uygulanan bitkilerde kuraklık toleransını arttırdığı gözlemlenmiş olup, abiyotik stres toleransı ile ilişkili metabolitlerin ölçümleri bu sonucu destekler niteliktedir. Çalışma sonucunda H₂S sulama suyunda ortama eklenmesinin bitkileri daha vigorus (güçlü, enerjik, endamlı, çabuk büyüyen bitki) yaptığının ön gözlemleri alınmış ancak daha ileri çalışmalar ile desteklenmesi gerekmektedir. Tez çalışması sonucunda H₂S uygulamalarının abiyotik strese karşı tolerans sağlamada görevli bazı hedef genleri indükleyerek olası kuraklık stresine toleransı arttırmada etkili olacağı düşünülmektedir.

5.2 Öneriler

Domates bitkisi moleküler genetik anlamda iyi karakterize edilmiş ekonomik değerinden kaynaklı çok sayıda, piyasa ihtiyaçları doğrultusunda; çeşitlerin ıslah edildiği en önemli bahçe bitkilerinden biridir. Domates markör destekli ıslah (MAS) çalışmalarının uygulandığı ilk bahçe bitkisidir ve yaklaşık 30 yıllık bir geçmişe sahiptir (Labate ve Baldo, 2005; Rick ve ark., 1974; Tanksley ve Rick, 1980; Tanksley, 1983). Günümüze kadar, domates de çok sayıda dayanıklılık sağlayan gen yabani domates türlerinden belirlenmiş ve kültür domates çeşitlerine ıslah yöntemleri ile aktarılmıştır (Labate ve Baldo, 2005) ve hemen hemen tamamı domates genomunda haritalanmıştır (Grube ve ark., 2000). Oluşturulan bu genom haritaları ticari ıslah programlarında kullanılmış ve bu teknolojinin agronomik olarak arzu edilen karakterleri çeşit ve hibritlere etkili ve hızlı aktarılması değişik örneklerle gösterilmiştir.

Tez kapsamında H₂S uygulamalarının belirli hedef genler ve metabolitlerin üzerine etkisi ölçülmüş ve umut var sonuçlar elde edilmiştir. Çalışmanın bir sonraki adımı için;

- Daha geniş bir deneme kurulup domatesin farklı dönemlerinden ve farklı dokularında global transkriptome düzeyinde yeni nesil sekanslama teknolojileri ile araştırılmalıdır. Tüm transkriptome çalışmaları H₂S uygulamalarının ve kuraklık tolerans cevabının moleküler genetik temellerine daha bütünlükçü bir bakış açısı sağlayacaktır.
- Ayrıca H₂S'in sulama suyuna katkısının toprak fizyolojisine etkisi bir diğer araştırma önerisidir.
- Bitkiye H₂S uygulamalarının tablet gübre formunda temini araştırılmalıdır, böylece çevre sağlığı açısından bir diğer önemli etkende araştırılmış olabilecektir.
- Ayrıca abiyotik farklı stres koşullarına H₂S uygulamalarının etkileri yine tüm genom / transkriptome düzeyinde araştırılması ve bu çalışmaların farklı bitkilerde uygulamasının önemli bir çalışma alanı olabileceği kanaatine varılmıştır.

6. KAYNAKLAR

- Adams, S. R., Cockshull, K. E., & Cave, C. R. J., 2001, Effect of temperature on the growth and development of tomato fruits. *Annals of Botany*, 88(5), 869–877.
- Beauchamp, C., and Friodvich, I., 1971, Superoxide Dismutase: Improved Assays and an Assay Applicable to Acrylamide Gels. *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY* 44, 276–287.
- Bernatzky, R., & Tanksley, S. D., 1986, Toward a saturated linkage map in tomato based on isozymes and random cDNA sequences. *Genetics*, 112(4), 887–898.
- Blanca, J., Cañizares, J., Cordero, L., Pascual, L., Diez, M. J., & Nuez, F., 2012, Variation Revealed by SNP Genotyping and Morphology Provides Insight into the Origin of the Tomato. *PLoS ONE*, 7(10).
- Bouillaud, F., Ransy, C., Andriamihaja, M., & Blachier, F., 2013, PL11 Sulfide and mitochondrial bioenergetics. *Nitric Oxide*, 31(2013), S15–S16.
- Bradford, M. M., 1976, A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- Boyer, J. S., 1982, Plant productivity and Environment, *Science*, 218(October), 443–448.
- Carvalho R.F., Campos, M. L., L. E., Pino, L. E., Zsögön, A., Lima, J. E., Benedito, V. A., Peres, L. E., 2011, Convergence of developmental mutants into a single tomato model system: “Micro-Tom” as an effective toolkit for plant development research. *Plant Methods*, 1–14.
- Chen, J., Wang, W. H., Wu, F. H., You, C. Y., Liu, T. W., Dong, X. J., He, J. X., and Zheng, H. L., 2013, Hydrogen sulfide alleviates aluminum toxicity in barley seedlings. *Plant and Soil*, 362(1–2), 301–318.
- Chen, J., Wu, F. H., Wang, W. H., Zheng, C. J., Lin, G. H., Dong, X. J., He, J. X., Pei, Z. M., and Zheng, H. L., 2011, Hydrogen sulphide enhances photosynthesis through promoting chloroplast biogenesis, photosynthetic enzyme expression, and thiol redox modification in *Spinacia oleracea* seedlings. *Journal of Experimental Botany*,

62(13), 4481–4493.

- Christou, A., Manganaris, G. A., Papadopoulos, I., & Fotopoulos, V., 2013, Hydrogen sulfide induces systemic tolerance to salinity and non-ionic osmotic stress in strawberry plants through modification of reactive species biosynthesis and transcriptional regulation of multiple defence pathways. *Journal of Experimental Botany*, 64(7), 1953–1966.
- Colvine, S., and Branthome, X., 2016, The Tomato: A Seasoned Traveller. *The Tomato Genome*. Compendium of Plant Genomes. 1–5.
- De, S., & Das, S., 2001, Protective effects of tomato juice on mouse skin carcinogenesis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 2(1), 43–47.
- Dhindsa, R. S., Plumb-dhindsa, P., & Thorpe, T. A., 1981, Leaf Senescence : Correlated with Increased Levels of Membrane Permeability and Lipid Peroxidation , and Decreased Levels of Superoxide Dismutase and Catalase content in a trusted digital archive . We use information technology and tools to increase produ. *Journal of Experimental Botany*, 32(126), 93–101.
- Di Mascio, P., Kaiser, S., & Sies, H., 1989, Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 274(2), 532–538.
- Dooley, F. D., Nair, S. P., & Ward, P. D., 2013, Increased Growth and Germination Success in Plants following Hydrogen Sulfide Administration. *PLoS ONE*, 8 (4), 1–5.
- Eldem, V., Çelikkol Akçay, U., Ozhuner, E., Bakir, Y., Uranbey, S., & Unver, T., 2012, Genome-Wide Identification of miRNAs Responsive to Drought in Peach (*Prunus persica*) by High-Throughput Deep Sequencing. *PLoS ONE*, 7(12).
- Eliassen, A. H., Hendrickson, S. J., Brinton, L. A., Buring, J. E., Campos, H., Dai, Q., ... Hankinson, S. E., 2012, Circulating carotenoids and risk of breast cancer: Pooled analysis of eight prospective studies. *Journal of the National Cancer Institute*, 104(24), 1905–1916.

- Fang, T., Cao, Z., Li, J., Shen, W., & Huang, L., 2014, Auxin-induced hydrogen sulfide generation is involved in lateral root formation in tomato. *Plant Physiology and Biochemistry*, 76, 44–51.
- FAOSTAT, 2018, www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize , [Ziyaret Tarihi : 5 Nisan 2020]
- Foolad, M. R., 2007, Genome mapping and molecular breeding of tomato. *International Journal of Plant Genomics*, 2007.
- Friedman, M., 2013, Anticarcinogenic, cardioprotective, and other health benefits of tomato compounds lycopene, α -tomatine, and tomatidine in pure form and in fresh and processed tomatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(40), 9534–9550.
- Ge, X. X., Xing, M. Y., Yu, L. F., & Shen, P., 2013, Carotenoid intake and esophageal cancer risk: A meta-analysis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 14(3), 1911–1918.
- Golan, I., Guadalupe Dominguez, P., Konrad, Z., Shkolnik-Inbar, D., Carrari, F., & Bar-Zvi, D., 2014, Tomato ABSCISIC ACID STRESS RIPENING (ASR) gene family revisited. *PLoS ONE*, 9(10), 1–8.
- Grube, R., Radwanski, E. R., & Jahn, M. K., 2000, Comparative analysis of disease resistance within the Solanaceae. *Genetics*, 155(June 2000), 873–887.
- Guo, J., & Wang, M. H., 2011, Expression profiling of the DREB2 type gene from tomato (*Solanum lycopersicum* L.) under various abiotic stresses. *Horticulture Environment and Biotechnology*, 52(1), 105–111.
- Güvenç, İ., 2019, Türkiye’de Domates Üretimi, Dış Ticareti ve Rekabet Gücü. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, 2(1), 57–61.
- Hancock, J. T., & Whiteman, M., 2014, Hydrogen sulfide and cell signaling: Team player or referee? *Plant Physiology and Biochemistry*, 78, 37–42.
- Hoagland, D.R., Arnon, D.I., 1950, The Water-Culture Method for Growing Plants Without Soil. *California College Agricultural Experiment Station Cire. Berkeley*,

Circular 347.

- Hu, K. Di, Zhang, X. Y., Wang, S. S., Tang, J., Yang, F., Huang, Z. Q., Deng, J. Y., Liu, S. Y., Zhao, S. J., Hu, L. Y., Yao, G. F., and Zhang, H. (2019). Hydrogen Sulfide Inhibits Fruit Softening by Regulating Ethylene Synthesis and Signaling Pathway in Tomato (*Solanum lycopersicum*). *HortScience*, 54(10), 1824–1830.
- Hu, L. Y., Hu, S. L., Wu, J., Li, Y. H., Zheng, J. L., Wei, Z. J., Liu, J., Wang, H. L., Liu, Y. S., and Zhang, H., 2012, Hydrogen sulfide prolongs postharvest shelf life of strawberry and plays an antioxidative role in fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(35), 8684–8693.
- Jain, S. K., Bull, R., Rains, J. L., Bass, P. F., Levine, S. N., Reddy, S., McVie, R., and Bocchini, J. A., 2010, Low Levels of Hydrogen Sulfide in the Blood of Diabetes Patients and Streptozotocin-Treated Rats Causes Vascular Inflammation? *Antioxidants & Redox Signaling*, 12(11), 1333–1337.
- Jian, L., Lee, A. H., & Binns, C. W., 2007, Tea and lycopene protect against prostate cancer. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 16(SUPPL.1), 453–457.
- Jin, Z., & Pei, Y., 2015, Physiological implications of hydrogen sulfide in plants: Pleasant exploration behind its unpleasant odour. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015.
- Jin, Z., Shen, J., Qiao, Z., Yang, G., Wang, R., & Pei, Y., 2011, Hydrogen sulfide improves drought resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 414(3), 481–486.
- Jin, Z., Xue, S., Luo, Y., Tian, B., Fang, H., Li, H., & Pei, Y., 2013, Hydrogen sulfide interacting with abscisic acid in stomatal regulation responses to drought stress in *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 62, 41–46.
- Kaunitz, J. D., 2015, The Discovery of PCR: ProCuRement of Divine Power. *Digestive Diseases and Sciences*, 60(8), 2230–2231.
- Kidokoro, S., Watanabe, K., Ohori, T., Moriwaki, T., Maruyama, K., Mizoi, J., Myint, N., Htwe, P. S., Fujita, Y., Sekita, S., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K.,

- 2015, Soybean DREB1/CBF-type transcription factors function in heat and drought as well as cold stress-responsive gene expression. *Plant Journal*, 81(3), 505–518.
- Kimura, S., & Sinha, N., 2008, Tomato (*Solanum lycopersicum*): A model fruit-bearing crop. *Cold Spring Harbor Protocols*, 3(11).
- Knapp, S., Bohs, L., Nee, M., & Spooner, D. M., 2004, Solanaceae — a model for linking genomics with biodiversity. *Comparative and Functional Genomics*. 5, 285–291.
- Knapp, S., & Peralta, I. E., 2016, The Tomato (*Solanum lycopersicum* L., Solanaceae) and Its Botanical Relatives. *The Tomato Genome*. Compendium of Plant Genomes. 7–21.
- Labate, J. A., & Baldo, A. M., 2005, Tomato SNP discovery by EST mining and resequencing. *Molecular Breeding*, 16(4), 343–349.
- Li, D., Limwachiranon, J., Li, L., Du, R., & Luo, Z., 2016, Involvement of energy metabolism to chilling tolerance induced by hydrogen sulfide in cold-stored banana fruit. *Food Chemistry*, 208, 272–278.
- Li, W. X., Oono, Y., Zhu, J., He, X. J., Wu, J. M., Iida, K., Lu, X. Y., Cui, X., Jin, H., Zhu, J. K., 2008, The Arabidopsis NFYA5 transcription factor is regulated transcriptionally and posttranscriptionally to promote drought resistance. *Plant Cell*, 20(8), 2238–2251.
- Lisjak, M., Srivastava, N., Teklic, T., Civala, L., Lewandowski, K., Wilson, I., Wood, M. E., Whiteman, M., Hancock, J. T., 2010, A novel hydrogen sulfide donor causes stomatal opening and reduces nitric oxide accumulation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 931–935.
- Lisjak, Miroslav, Teklic, T., Wilson, I. D., Whiteman, M., & Hancock, J. T., 2013, Hydrogen sulfide: Environmental factor or signalling molecule? *Plant, Cell and Environment*, 36(9), 1607–1616.
- Lisjak, Miroslav, Teklic, T., Wilson, I. D., Wood, M. E., Whiteman, M., & Hancock, J. T., 2011, Hydrogen sulfide effects on stomatal apertures. *Plant Signaling and Behavior*, 6(10), 1444–1446.

- Mani, S., Li, H., Untereiner, A., Wu, L., Yang, G., Austin, R. C., Dickhout, J. G., Lhotak, S., Meng, Q. H., Wang, R., 2013, Decreased endogenous production of hydrogen sulfide accelerates atherosclerosis. *Circulation*, 127(25), 2523–2534.
- Martin, G. B., Williams, J. G. K., & Tanksley, S. D., 1991, Rapid identification of markers linked to a *Pseudomonas* resistance gene in tomato by using random primers and near-isogenic lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(6), 2336–2340.
- Maşlak, B., ve Bağcıgil, A. F., 2018, Polimeraz zincir reaksiyonu inhibitörleri. *İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi*, (1)1, 31-36.
- Nakano, Y., & Asada, K., 2017, Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 22(May), 867–880.
- Park, E., Stacewicz-Sapuntzakis, M., Sharifi, R., Wu, Z., Freeman, V. L., & Bowen, P. E., 2013, Diet adherence dynamics and physiological responses to a tomato product whole-food intervention in African-American men. *British Journal of Nutrition*, 109(12), 2219–2230.
- Paul, B. D., & Snyder, S. H., 2015, H₂S: A Novel Gasotransmitter that Signals by Sulfhydration. *Trends in Biochemical Sciences*, 40(11), 687–700.
- Peralta, I. E., Knapp, S., & Spooner, D. M., 2005, New Species of Wild Tomatoes (*Solanum* Section *Lycopersicon*: Solanaceae) from Northern Peru. *Systematic Botany*, 30(2), 424–434.
- Porcel, R., Zamarreño, Á. M., García-Mina, J. M., & Aroca, R., 2014, Involvement of plant endogenous ABA in *Bacillus megaterium* PGPR activity in tomato plants. *BMC Plant Biology*, 14(1), 1–12.
- Public pictures from needpix, <https://www.needpix.com/> , [Ziyaret Tarihi: 10 Mayıs 2020]
- Rick, C. M., Zobelt, R. W., & Fobes, J. F., 1974, *Four Peroxidase Loci in Red-Fruited Tomato Species: Genetics and Geographic Distribution (allozymic polymorphism /*

electrophoresis / Lycopersicon /phylogeny). 71(3), 835–839.

- Sato, S., Tabata, S., Hirakawa, H., Asamizu, E., Shirasawa, K., Isobe, S., Kaneko, T., Nakamura, Y., Shibata, D., Aoki, K., Egholm, M., Knight, J., Bogden, R., Li, C., Shuang, Y., Xu, X., Pan, S., Cheng, S., Liu, X., Ren, Y., Wang, J., Alberio, A., Dal Pero, F., Todesco, S., Eck, J. V., Buels, R. M., Bombarely, A., Gosselin, J. R., Huang, M., Leto, J. A., Menda, N., Stricker, S., Mao, L., Gao, S., Tecle, I. Y., York, T., Zheng, Y., Vrebalov, J. T., Lee, J. M., Zhong, S., Mueller, L. A., Stiekma, W. J., Ribeca, P., Alioto, T., Yang, W., Huang, S., Du, Y., Zhang, Z., Gao, J., Guo, Y., Wang, X., Li, Y., He, J., Li, C., Cheng, Z., Zuo, J., Ren, J., Zhao, J., Yan, L., Jiang, H., Wang, B., Li, H., Li, Z., Fu, F., Chen, B., Han, B., Feng, Q., Fan, D., Wang, Y., Ling, H., Xue, Y., Ware, D., McCombie, W. R., Lippman, Z. B., Chia, J. M., Jiang, K., Pasternak, S., Gelley, L., Kramer, M., Anderson, L. K., Chang, S. B., Royer, S. M., Shearer, L. A., Stack, S. M., Rose, J. K. C., Xu, Y., Eannetta, N., Matas, A. J., McQuin, R., Tanksley, S. D., Camara, F., Guigu, R., Rombauts, S., Fawcett, J., De Peer, Y. V., Zamir, D., Liang, C., Spannagl, M., Gundlach, H., Bruggmann, R., Mayer, K., Beasley, H., McLaren, K., Nicholson, C., Riddle, C., Srl, Y., Gianese, G., 2012, The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature*, 485(7400), 635–641.
- Sesso, H. D., Liu, S., Gaziano, J. M., & Buring, J. E., 2003, Dietary Lycopene, Tomato-Based Food Products and Cardiovascular Disease in Women. *The Journal of Nutrition*, 133(7), 2336–2341.
- Shen, J., Xing, T., Yuan, H., Liu, Z., Jin, Z., Zhang, L., & Pei, Y., 2013, Hydrogen Sulfide Improves Drought Tolerance in *Arabidopsis thaliana* by MicroRNA Expressions. *PLoS ONE*, 8(10), 4–11.
- Shinozaki, K., and Shinozaki, K. Y., 2002, Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology*, 3(3), 217–223.
- Spooner, D. M., Peralta, I. E., & Knapp, S., 2005, Comparison of AFLPs with other markers for phylogenetic inference in wild tomatoes [*Solanum* L. section *Lycopersicon* (Mill.) Wettst.]. *Taxon*, 54(1), 43–61.

- Sun, L., Wang, Y. P., Chen, P., Ren, J., Ji, K., Li, Q., Li, P., Dai, S. J., Leng, P., 2011, Transcriptional regulation of SlPYL, SlPP2C, and SlSnRK2 gene families encoding ABA signal core components during tomato fruit development and drought stress. *Journal of Experimental Botany*, 62(15), 5659–5669.
- Sun, Y., Zhang, W., Zeng, T., Nie, Q., Zhang, F., & Zhu, L., 2015, Hydrogen sulfide inhibits enzymatic browning of fresh-cut lotus root slices by regulating phenolic metabolism. *Food Chemistry*, 177, 376–381.
- Tai, C.H., and Cook, P. F., 2000, 0-acetylserine sulfhydrylase. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, Volume 74, 185-238.
- Tarım ve Orman Bakanlığı, Ocak 2020, <https://arastirma.tarimorman.gov.tr/tepge/Belgeler/PDF%20Tar%C4%B1m%20%C3%9Cr%C3%BCnleri%20Piyasalar%C4%B1/2020-Ocak%20Tar%C4%B1m%20%C3%9Cr%C3%BCnleri%20Raporu/Domates%20Tar%C4%B1m%20%C3%9Cr%C3%BCnleri%20Piyasa%20Raporu%202020%20Ocak.pdf> , [Ziyaret Tarihi: 3 Temmuz 2020].
- Tanksley, S. D., Ganai, M. W., Prince, J. P., De Vicente, M. C., Bonierbale, M. W., Broun, P., Fulton, T. M., Giovannoni, J. J., Grandillo, S., Martin, G. B., Messguer, R., Miller, J. C., Miller, L., Paterson, A. H., Pineda, O., Röder, M. S., Wing, R. A., Wu, W., Young, N. D., 1992, High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics*, 132(4), 1141–1160.
- Tanksley, S. D., & Rick, C. M., 1980, Genetics of esterases in species of *Lycopersicon*. *Theoretical and Applied Genetics*, 56(5), 209–219.
- Tanksley, Steven D., 1983, Molecular markers in plant breeding. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1(1), 3–8.
- Temur, B., 2017, Küresel ısınmanın Türkiye'de tarım sektörü üzerine etkisi: bir ARDL modeli uygulaması. Yüksek Lisans Tezi, *Anadolu Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü*, Eskişehir, 2-62.
- Tonucci, L. H., Holden, J. M., Beecher, G. R., Khachik, F., Davis, C. S., & Mulokozi, G., 1995, Carotenoid Content of Thermally Processed Tomato-Based Food

- Products. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 43(3), 579–586.
- Turhan. A., ve Şen, V., 2009, Türkiye'de yetiştirilen bazı domates gen kaynaklarının verim, meyve ve morfolojik özelliklerinin belirlenmesi. *Selçuk Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 23 (50), 52-59.
- TÜİK, 2019, <http://www.tuik.gov.tr/UstMenu.do?metod=temelist> , [Ziyaret Tarihi: 8 Haziran 2020].
- USDA Nutrient Database, Tomatoes Raw, <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/787683/nutrients> , [Ziyaret Tarihi: 10 Mart 2020].
- Wang, B. L., Shi, L., Li, Y. X., & Zhang, W. H., 2010, Boron toxicity is alleviated by hydrogen sulfide in cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings. *Planta*, 231(6), 1301–1309.
- Wang, R., 2002, Two's company, three's crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? *The FASEB Journal*, 16, 1792–1798.
- Wang, Y., Li, L., Cui, W., Xu, S., Shen, W., & Wang, R., 2012, Hydrogen sulfide enhances alfalfa (*Medicago sativa*) tolerance against salinity during seed germination by nitric oxide pathway. *Plant and Soil*, 351(1–2), 107–119.
- Wing, R. A., Zhang, H. Bin, & Tanksley, S. D., 1994, Map-based cloning in crop plants. Tomato as a model system: I. Genetic and physical mapping of jointless. *MGG Molecular & General Genetics*, 242(6), 681–688.
- Ximénez-Embún, M. G., Ortego, F., & Castañera, P., 2016, Drought-stressed tomato plants trigger bottom-up effects on the invasive *Tetranychus evansi*. *PLoS ONE*, 11(1), 1–19.
- Xin, M., Wang, Y., Yao, Y., Xie, C., Peng, H., Ni, Z., & Sun, Q., 2010, Diverse set of microRNAs are responsive to powdery mildew infection and heat stress in wheat (*Triticum aestivum* L.). *BMC Plant Biology*, 10.
- Yan, K., Chen, W., Zhang, G., Xu, S., Liu, Z., He, X., & Wang, L., 2010, Elevated CO₂ ameliorated oxidative stress induced by elevated O₃ in *Quercus mongolica*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 32(2), 375–385.

- Youssefian, S., Nakamura, M., Sano, H., 1993, Tobacco plants transformed with O-acetylserine (thiol) lyase gene of wheat are resistant toxic levels of hydrogen sulphide gas. *The Plant Journal*, 5(4), 759–769.
- Yöntem M., ve Ünalı M., 2018, Biyokimya, İstanbul Tıp Kitapevi Yayınları, 1.Baskı.
- Zhang, H., Hu, L. Y., Li, P., Hu, K. D., Jiang, C. X., & Luo, J. P., 2010a, Hydrogen sulfide alleviated chromium toxicity in wheat. *Biologia Plantarum*, 54(4), 743–747.
- Zhang, H., Wang, M. J., Hu, L. Y., Wang, S. H., Hu, K. D., Bao, L. J., & Luo, J. P., 2010b, Hydrogen sulfide promotes wheat seed germination under osmotic stress. *Russian Journal of Plant Physiology*, 57(4), 532–539.
- Zhang, Hua, Hu, L. Y., Hu, K. Di, He, Y. D., Wang, S. H., & Luo, J. P., 2008, Hydrogen sulfide promotes wheat seed germination and alleviates oxidative damage against copper stress. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50(12), 1518–1529.
- Zhang, Hua, Hu, S. L., Zhang, Z. J., Hu, L. Y., Jiang, C. X., Wei, Z. J., Liu, J., Wang, H. L., Jiang, S. T., 2011b, Hydrogen sulfide acts as a regulator of flower senescence in plants. *Postharvest Biology and Technology*, 60(3), 251–257.
- Zhang, Hua, Jiao, H., Jiang, C. X., Wang, S. H., Wei, Z. J., Luo, J. P., & Jones, R. L., 2010d, Hydrogen sulfide protects soybean seedlings against drought-induced oxidative stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 32(5), 849–857.
- Zhang, Hua, Tan, Z. Q., Hu, L. Y., Wang, S. H., Luo, J. P., & Jones, R. L., 2010c, Hydrogen Sulfide Alleviates Aluminum Toxicity in Germinating Wheat Seedlings. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52(6), 556–567.
- Zhang, Hua, Tang, J., Liu, X. P., Wang, Y., Yu, W., Peng, W. Y., Fang, F., Ma, D. F., Wei, L. Y., Hu, L. Y., 2009b, Hydrogen sulfide promotes root organogenesis in Ipomoea batatas, Salix matsudana and Glycine max. *Journal of Integrative Plant Biology*, 51(12), 1086–1094.
- Zhang, Hua, Ye, Y. K., Wang, S. H., Luo, J. P., Tang, J., & Ma, D. F., 2009a, Hydrogen sulfide counteracts chlorophyll loss in sweetpotato seedling leaves and alleviates oxidative damage against osmotic stress. *Plant Growth Regulation*, 58(3), 243–250.

- Zhang, X., Zou, Z., Gong, P., Zhang, J., Ziaf, K., Li, H., Xiao, F., Ye, Z., 2011a, Over-expression of microRNA169 confers enhanced drought tolerance to tomato. *Biotechnology Letters*, 33(2), 403–409.
- Zhang, Y., Tang, Z.-H., Ren, Z., Qu, S.-L., Liu, M.-H., Liu, L.-S., & Jiang, Z.-S., 2013, Hydrogen Sulfide, the Next Potent Preventive and Therapeutic Agent in Aging and Age-Associated Diseases. *Molecular and Cellular Biology*, 33(6), 1104–1113.
- Zhao, B., Liang, R., Ge, L., Li, W., Xiao, H., Lin, H., Ruan, K., Jin, Y., 2007, Identification of drought-induced microRNAs in rice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 354(2), 585–590.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Muhammed ANDİÇ
Uyruğu : Türkiye Cumhuriyeti
Doğum Yeri ve Tarihi : İstanbul 1994
Telefon : +90 545 229 04 20
E-mail : muhammedandic@gmail.com

EĞİTİM

Derece	Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	: Yahya Kemal Beyatlı Lisesi, Bakırköy, İstanbul	2012
Üniversite	: Necmettin Erbakan Üniversitesi, Meram, Konya	2017
Yüksek Lisans	: Necmettin Erbakan Üniversitesi, Meram, Konya	
Doktora	:	

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görevi
2019	Max Planck Moleküler Bitki Fizyolojisi Enstitüsü	Erasmus+ Stajyer
2016	Valensiya Üniversitesi ICBIBE	Erasmus+ Stajyer
2015	Biyans Biyolojik Ürünler Ar-Ge Şirketi	Gönüllü Stajyer

YABANCI DİLLER

İngilizce (B2)

YAYINLAR

Sultanova, Z., Andic, M., and Carazo, P. 2018. The “unguarded-X” and the genetic architecture of lifespan: Inbreeding results in a potentially maladaptive sex-specific reduction of female lifespan in *Drosophila melanogaster*.” *Evolution*, 1-13.