



Comparison of the Sensitivity of Arabidopsis SOS Pathway Mutants under Salt Stress

Buasimuhan Abudureyimu^{1,a}, Emre Aksoy^{1,b,*}

¹Department of Agricultural Genetic Engineering, Faculty of Agricultural Sciences and Technologies, Niğde Ömer Halisdemir University, Main Campus, 51240 Niğde, Turkey

*Corresponding author

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p>Research Article</p> <p>Received : 19/09/2019 Accepted : 07/10/2019</p> <p>Keywords: Arabidopsis thaliana Mutant Salinity SOS pathway Tolerance</p>	<p>Salinity stress is one of the most important and common abiotic stress factors that cause significant physiological and metabolic changes in plants, negatively affecting plant growth and development, and causing decrease in product quality and quantity. The elucidation of the molecular control mechanisms associated with salt stress tolerance is based on the activation and /or inactivation of various stress-related genes. Salt Overly Sensitive (SOS) tolerance mechanism under salt stress is of great importance in terms of salt tolerance of the plants. Although this mechanism has been studied for many years, the physiological changes that the plants give as a result of mutation of the genes in the pathway under different levels of sodium chloride (NaCl) during development have not been examined comparatively. In this study, we found that the <i>Arabidopsis thaliana sos1-1</i> mutant plant showed sensitivity to 10 mM NaCl while the <i>sos3-1</i> and <i>hkt1-1</i> mutants showed tolerance. The <i>sos1-1</i>, <i>sos3-1</i> and <i>hkt1-1</i> mutants showed increasing sensitivity when NaCl was applied beyond 50 mM of concentration. In addition, plants did not show significant sensitivity for 1 day of stress application, while significant effects were observed in plant root length when exposed to salinity for 3 to 4 days. Col-0, <i>hkt1-1</i> and <i>sos3-1</i> roots treated with low levels of NaCl for a short term were positively affected in length. In the light of these results, the amount and duration of salt stress is very critical in <i>Arabidopsis thaliana</i>'s responses to the stress and determination of molecular tolerance pathways.</p>

Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi 7(11): 1982-1989, 2019

SOS Yolağından Sorumlu Arabidopsis Mutantlarının Tuz Stresi Altındaki Hassasiyetlerinin Karşılaştırılması

MAKALE BİLGİSİ	ÖZ
<p>Araştırma Makalesi</p> <p>Geliş : 19/09/2019 Kabul : 07/10/2019</p> <p>Anahtar Kelimeler: Arabidopsis thaliana Mutant SOS yolağı Tolerans Tuz stresi</p>	<p>Tuz stresi bitkilerde önemli fizyolojik ve metabolik değişimlere yol açarak bitki büyüme ve gelişimini olumsuz şekilde etkileyen, ürün kalitesinin ve miktarının azalmasına neden olan en önemli ve yaygın abiyotik stres faktörlerinden birisidir. Tuz stres toleransı ile ilgili moleküler kontrol mekanizmalarının aydınlatılması stres ile ilişkili çeşitli genlerin aktivasyonu ve/veya inaktivasyonuna dayanmaktadır. Tuz stresi altında Salt Overly Sensitive (SOS) mekanizması bitkinin tuza toleransı açısından büyük önem taşımaktadır. Her ne kadar bu mekanizma uzun yıllardır çalışılmış olsa da, yolda yer alan genlerin mutasyonu sonucunda elde edilen bitkilerin farklı sodyum klorür (NaCl) seviyelerine karşı gelişim süresince vermiş oldukları fizyolojik değişiklikler karşılaştırmalı olarak incelenmemiştir. <i>Arabidopsis thaliana</i>'da yaptığımız bu çalışmada, <i>sos1-1</i> mutant bitkisinin 10 mM NaCl uygulamasına hassasiyet gösterirken <i>sos3-1</i> ve <i>hkt1-1</i> mutant bitkilerinin ise dayanıklılık gösterdiği; 50 mM NaCl ve üstü konsantrasyonlarda ise <i>sos1-1</i>, <i>sos3-1</i> ve <i>hkt1-1</i> mutant bitkilerinin hassas olduğu belirlenmiştir. Ayrıca 1 gün stres uygulanan bitkiler çok hassas değilken, stresin 3 veya 4 gün devam etmesi sonucunda bitkilerin kök uzunluğunda belirgin etkilenme gözlemlenmiştir. Kısa süreli ve düşük seviyede NaCl uygulanan Col-0, <i>hkt1-1</i> ve <i>sos3-1</i> köklerinin gelişiminin pozitif yönde etkilendiği bulunmuştur. Bu sonuçlar ışığında <i>Arabidopsis thaliana</i>'nın tuz stresine karşı göstermiş olduğu tepkilerin detaylı incelenmesi ve moleküler tolerans yollarının belirlenmesinde tuz stres miktarı ve süresinin ne kadar önemli olduğu belirlenmiştir.</p>

^a esma151190@gmail.com ^b <https://orcid.org/0000-0002-4441-8981> | ^b emreaksoy@ohu.edu.tr ^{ib} <https://orcid.org/0000-0002-9410-2715>



Giriş

Tuz stresi özellikle kurak ve yarı kurak bölgelerde bitkisel üretimi sınırlandıran en önemli abiyotik stres faktörlerinden birisidir. Tuzluluk, özellikle kurak ve yarı kurak iklim bölgelerinde yağış, sulama suyuyla yıkanarak yeraltı suyuna karışan çözünbilir tuzların, yüksek taban suyuyla birlikte kapilarite yoluyla toprak yüzeyine çıkması ve suyun buharlaşmasıyla toprak yüzeyinde birikmesi olayıdır (Kuşvuran, 2010). Tuz stresi, dünyadaki arazilerin %7'sini, işlenebilir alanların ise %5'ini etkilemektedir (Hossain, 2019). Türkiye'de ise topraklarının yaklaşık 1,5 milyon hektarı (bunun %32,5'i sulanabilir alanlardır) tuzluluk sorunuyla karşı karşıyadır (Emine ve ark., 2005). 2050'ye kadar, kalitesiz ve kontrolsüz su kullanımı ve iklim değişiklikleri sebebiyle dünya besin ihtiyacının üçte birini karşılayan sürdürülebilir tarım alanlarının %50'sinin artan tuzluluktan etkileneceği tahmin edilmektedir (Munns, 2002; Dhankher ve Foyer, 2018). Tuzluluk özellikle kurak ve yarı kurak iklim şartlarında sulama yapılan arazilerde bitkisel üretimi etkileyen önemli bir sorundur (Hussain ve ark., 2019). Dolayısıyla küresel iklim değişikliklerinin artarak devam edeceği beklentilerinden yola çıkılarak, tuz stresine maruz kalan tarım alanlarında artışın yaşanması kaçınılmazdır.

Uzun süre tuz stresine maruz kalan bitkilerde morfolojik, hücrel, fizyolojik ve moleküler seviyede pek çok aksaklıklar gözlenmektedir (Munns, 2002; Bernstein, 2019). Toprak tuzluluğu kullanabilir su miktarını azaltarak bitkilerde fizyolojik kuraklığın oluşmasına neden olmaktadır. Oluşan bu fizyolojik kuraklık, hücrelerin mitotik aktivitesini engelleyip hücre bölünme oranını azaltarak bitkinin hücre sayısı ve hücre uzamasının yavaşlamasına neden olmaktadır. Buna bağlı olarak tohum çimlenme oranında azalma, bitkinin kök ve gövde uzunluğunda kısalma, kök hacminde azalma, ikincil kök miktar ve uzunluğunda azalma, yapraklarda incelleme ve küçülme, sayılarında azalma ve vasküler doku farklılaşmasında ve gelişiminde azalma meydana gelmektedir (Liang ve ark., 2018). Sodyum klorür (NaCl) tarafından gerçekleşen tuz stresinin bitkiler üzerindeki ikinci etkisi ise sodyum (Na⁺) ve klor (Cl⁻) iyonlarının bitki hücrelerinde birikmesiyle ortaya çıkan iyonik streştir (Isayenkov ve Maathuis, 2019). Toksik seviyede biriken bu iyonlar hücre içi iyon dengesini bozarak, yararlı mineral elementlerin hücre içine alınmasını, suyun sitoplazmada birikimini ve enzimlerin düzgün çalışmasını engellerler (Munns ve Tester, 2008; Roy ve ark., 2014).

Tuz stresinin bitkiler üzerindeki etkileri bitkinin tür ve çeşidine, tuz miktarına ve maruz kalma süresine bağlı olarak değişmektedir. Bazı bitkiler strese karşı hassasiyet gösterirken, bazıları geliştirdikleri moleküler cevaplar ile indüklenen tolerans mekanizmaları sayesinde hayatta kalmayı başarırlar (Munns ve Gilliam, 2015). Tuzluluğa karşı bu tolerans mekanizmalarını etkinleştiren sinyal iletim yolları ile çeşitli genlerin aktivasyonu ve / veya inaktivasyonu gerçekleştirilerek, bu moleküler cevapların sonucunda bitkilerde stres dayanıklılığı artırılır (Ashraf, 2004; Carillo ve ark., 2011). Bitkilerde tuz toleransını sağlayan mekanizmalar; iyonların seçici olarak alınması, fazla iyonların hücre içi bölümlerde depolanması ve / veya dışarıya atılması, Salt Overly Sensitive (SOS) yolağının aktifleştirilmesi, antioksidan enzimler ile endojen bitki

hormonlarının sentezinin teşviki, sinyal iletimi, fotosentetik yolağın ve hücrel membranların yapısının değişimi, fonksiyonel ve düzenleyici proteinlerin sentezi ve tuz toleransı ile ilgili genlerin aktifleştirilmesi olarak bilinmektedir (Parida ve Das, 2005; Çulha ve Çakırlar, 2011; Gupta ve Huang, 2014). Bu mekanizmada önemli görevleri bulunan proteinler ve bileşikler; SOS1 plazma membran Na⁺/H⁺ antiportu, SOS2 ve SOS3 protein kinaz kompleksi, yüksek afinite K⁺ taşıyıcısı (HKT1), tonoplast Na⁺/H⁺ antiportu (NHX1), H⁺-pirofosfataz (HVP)'lardır (Isayenkov ve Maathuis, 2019). Sitoplazmada ozmotik koruyucu olarak rol oynayan organik bileşikler ise azotlu bileşikler (prolin, glisin, betain), şekerler (sükroz, trehaloz, fruktanlar) ve çeşitli poliollerdir (Tuteja ve ark., 2007). Bunlara ek olarak, tuz stresine bağlı üretilen reaktif oksijen türlerinin ortadan kaldırılmasına yönelik olarak aktifleştirilen antioksidan enzimler de mevcuttur (Türkan ve Demiral, 2009).

SOS tolerans mekanizması bitkinin tuza toleransı açısından oldukça önemlidir. Bitki hücrelerinin tuz stresine verdiği tepkilerden biri sitozolik Ca²⁺ tarafından uyarılan Ca²⁺ sensörü proteinlerin ekspresyonu ve / veya aktivasyonudur (Ji ve ark., 2013). SOS1, SOS2, SOS3 olmak üzere bitkilerde tuz toleransında rol oynayan üç lokus teşhis edilmiştir. SOS (Salt Overly Sensitive: Tuza Aşırı Duyarlı) genlerinin kontrolündeki SOS sinyal yolağı Na⁺ ve K⁺ iyon dengesini düzenlemektedir ve bu SOS sinyal yolağı, aşırı miktardaki intraselüler veya ekstraselüler Na⁺ etkisiyle sitoplazmik Ca²⁺ sinyalinin tetiklenmesiyle başlatılmaktadır (Yokoi ve ark., 2002).

Bitkilerde tuz stresi altında oluşan ozmotik stresten dolayı absisik asitin (ABA) miktarındaki artış sitoplazmadaki kalsiyum miktarını da artırır. Sitoplazmadaki fazla kalsiyum, kalsiyum sensörü olan SOS3 tarafından algılanır ve bu sayede SOS3 aktifleşir. SOS3, SOS2 kinaza bağlanır ve SOS2'yi aktifleştirir. SOS2-SOS3 kompleksi daha sonra SOS1 ve tonoplastta yer alan Na⁺/H⁺ antiportu NHX1'in fosfatlanarak aktifleşmesini ve SOS1 geninin transkripsiyonunu sağlar (Halfter ve ark., 2000; Liu ve ark., 2000; Qiu ve ark., 2002; Lin ve ark., 2009). Sitoplazmik Ca²⁺'un SOS yolağını indüklediği *Arabidopsis sos* mutantlarının moleküler analizleriyle kanıtlanmıştır. SOS3'ün amino asit dizisi, maya kalsinörin ve hayvan nöronal Ca²⁺ sensörlerinin düzenleyici altbirimine önemli ölçüde benzerlik göstermektedir (Gong ve ark., 2004; Sánchez-Barrena ve ark., 2005). SOS3'ün Ca²⁺ bağlama kapasitesini düşüren bir mutasyon içeren *sos3-1* mutant bitkisi ortamda Ca²⁺'un olmadığı durumlarda tuza aşırı duyarlılık göstermekte ve ortamdaki Ca²⁺'un miktarı arttığında mutantın tuza karşı duyarlılığı baskılanmaktadır (Liu ve Zhu, 1997; Zhu ve ark., 1998). SOS1'in ifadesinin artmasına SOS2-SOS3 yolağının aracılık ettiği SOS2 ve SOS3 genlerine ait mutasyonları içeren bitkilerin analizleriyle saptanmıştır (Qiu ve ark., 2004).

SOS mutant bitkileri (*sos1*, *sos2*, *sos3*) NaCl'ye karşı aşırı duyarlıdır (Quesada ve ark., 2000; Zhu, 2000). *HTK1* allelleri ise *sos3-1*'in NaCl'e duyarlılığını genetik olarak baskılamaktadır (Rus ve ark., 2001; Rus ve ark., 2004). Yapılan çalışmalara göre, *Arabidopsis*'de *hkt1-1* veya *hkt1-2*'in hücre Na⁺ birikimini düzenleyerek *sos3-1* bitkilerin

NaCl'a duyarlılığını baskılayabildiği saptanmıştır (Rus ve ark., 2001). *sos1-1* ve *sos2-2* bitkilerinin *hkt1* tarafından baskılandığı ve NaCl'e duyarlılığının *sos3-1* bitkilerine göre daha az olduğu bilinmektedir. *sos1-1hkt1-1* ve *sos2-2hkt1-1* çifte mutant bitkileri NaCl içeren ortamda yetiştirildiğinde bitkilerde daha az yaprak antosiyanin birikimi ile daha fazla kök büyümesi ve sürgün gelişimi görülmektedir (Rus ve ark., 2001). Ayrıca, *sos1-1*, *sos2-2* veya *sos3-1* bitkilerinde *AtHKT1* mRNA miktarı değişmemiştir, bu da *AtHKT1*'in SOS yolağının bir transkripsiyonel çıktısı olmadığını göstermektedir (Rus ve ark., 2001).

Bugüne kadar *sos1-1*, *sos3-1* ve *hkt1-1* mutantlarının tuz stresine karşı vermiş oldukları tepkiler farklı çalışmalarda incelenmiş olsalar da (Mahajan ve ark., 2008), mutantların kısa süreli stres uygulamasında farklı NaCl dozlarına karşı göstermiş oldukları tepkiler incelenmemiştir. Bu nedenle bu çalışmamızda *sos1-1*, *sos3-1* ve *hkt1-1* mutantlarının farklı NaCl dozlarına karşı göstermiş oldukları çimlenme ve kök uzunluğu tepkileri yabanıl tip Col-0'a kıyasla beş günlük stres çalışmasında incelenmiştir.

Materyal ve Yöntem

Homozigot Mutant Tohumların Eldesi

Çalışmada kullanılan homozigot *Arabidopsis thaliana* *sos1-1*, *sos3-1* ve *hkt1-1* mutant tohumları Nottingham Üniversitesi Arabidopsis Stok Merkezi'nden (Nottingham,

Birleşik Krallık) elde edilmiştir. *hkt1-1* T-DNA ekleme mutanı olup (Rus ve ark., 2001), *sos1-1* (Wu ve ark., 1996; Shi ve ark., 2000) ve *sos3-1* (Ishitani ve ark., 2000) mutantları ise nokta mutasyonu içermektedir. Mutantlar ile ilgili bilgiler Çizelge 1'de verilmiş olup mutantların homozigot olmaları Çizelge 2'de listelenen primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi ile doğrulanmıştır. Bu kapsamda bitkilerin yapraklarından genomik DNA izolasyonu gerçekleştirildikten sonra (Krysan ve ark., 1999), PCR karışımına son konsantrasyonları belirtilen miktarda olacak şekilde 1X PCR tampon çözeltisi (100 mM Tris-HCl pH 8,8; 500 mM KCl ve 0,8% Nonidet P40), 1,5 mM MgCl₂, ileri ve ters primerler (her biri 250 nM), Taq DNA polimeraz (0,5 U/μL) (ThermoFisher), dNTP karışımı (her bir NTP'den 200 μM) ve 100 ng genomik DNA eklenerek reaksiyonun toplam hacmi su ile 20 μL'ye tamamlanmıştır. Akabinde PCR reaksiyonları 94°C'de 3 dk. inkübe edildikten sonra, 30 döngü olacak şekilde 94°C'de 30 sn., *sos1-1*, *sos3-3* ve *hkt1-1* PCRLarı için sırasıyla 51, 44 ve 48°C'de 30 sn. ve 72°C'de *sos1-1* ve *sos3-3* PCRLarı için 30 sn., *hkt1-1* PCRLarı için ise 70 sn. inkübe edilmiştir. Son olarak reaksiyon 72°C'de 5 dk. inkübe edilmiştir. PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde 80 watt altında 45 dk. yürütüldükten sonra etidyum bromür ile boyanarak amplikon büyüklükleri belirlenmiştir (Şekil 1). Bütün mutantlar Colombia-0 (Col-0) ekotipinde geliştirildiğinden, çalışmada Col-0 kontrol bitkisi olarak kullanılmıştır.

Çizelge 1 Çalışmada kullanılan Arabidopsis mutantlarının özellikleri

Table 1 Properties of Arabidopsis mutants used in the study

Mutant ismi	NASC stok numarası	AGI kodu ^a	Mutasyon çeşidi	Referans
<i>sos1-1</i>	N3862	AT2G01980	Nokta	Shi ve ark., 2000
<i>sos3-1</i>	N3864	AT5G24270	Nokta	Zhu ve ark., 1998
<i>hkt1-1</i>	N6529	AT4G10310	T-DNA ekleme	Rus ve ark., 2001

^a İlgili genin The Arabidopsis Information Resource (TAIR) (www.arabidopsis.org) numarası.

Çizelge 2 Arabidopsis mutantlarının homozigot olmalarının doğrulanmasında kullanılan PCR primerleri

Table 2 PCR primers used in homozygosity confirmation of Arabidopsis mutants

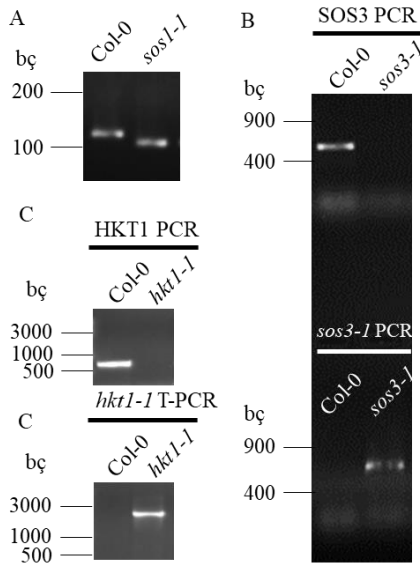
Mutant	PCR çeşidi	İleri primer (5' – 3')	Ters primer (5' – 3')	AU
<i>sos1-1</i>	Mutant PCR ₁	GGCATTGCATCAGTATTTGG	GGICTACAGAAAGACGTACAG	101
	Yabanıl tip PCR ₁			115
<i>sos3-1</i>	Mutant PCR ₁	GCTGIGCTTTCAAGTACG	TTTATCTTTCTTGCATGGC	713
	Yabanıl tip PCR ₁	ATGIGCTTTCAAGTGTACG	TTTATCTTTCTTGCATGGC	725
<i>hkt1-1</i>	T-DNA PCR ₁ (SAIL LB1)	GCCTTTTCAGAAATGGATAAATAGCCTTG	TFACTTCTCAATCCATGGGAG	~ 1100
	Yabanıl tip PCR ₁	AGTAGACCTCTCTACACTTTCC	TFACTTCTCAATCCATGGGAG	665

AU: Amplikon uzunluğu (bp),

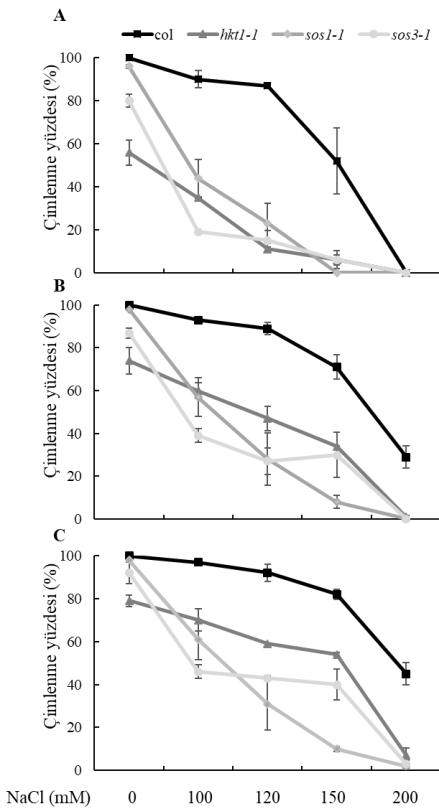
Artan Tuz Stresi Altında Tohum Çimlenme Yüzdelerinin Belirlenmesi

Çalışmalar steril besiyeri ortamında petripler içerisinde gerçekleştirilmiştir. Tuzun tohum çimlenmesine olan etkisini anlamak için Col-0, *sos1-1*, *sos3-1* ve *hkt1-1* tohumları %70 etanol ile 30 sn. çalkalandıktan sonra 3 kez steril saf su ile 10 sn. çalkalanarak yıkanmıştır. Ardından bitkilerin çimlenmesinde dörtte bir oranda mukavemetli Murashige and Skoog (1/4 X MS) besiyeri (Murashige ve Skoog, 1962) kullanılmış olup, besiyerine takviye olarak %0,5 (w/v) sükröz, %0,8 (w/v) agar (Sigma E) ve tuz stresi uygulamalarında deneye bağlı olarak 0, 100, 120, 150, 200 mM sodyum klorür (NaCl) ilave edilmiştir (Zhu, 2000).

Yüzey sterilizasyonu yapılan tohumlar mikropipet ucu yardımıyla her bir petride 60 tohum olacak şekilde besiyerine yerleştirilmiş ve ardından stratifikasyon için 3 gün 4°C'de bekletilmiştir. Stratifikasyonun akabinde tohumlar, uzun gün fotoperiyodunda (16 saat ışık/8 saat karanlık) 24°C'de kontrollü bir iklim dolabında %60 nem ve 110-120 μmol m⁻¹ s⁻¹ ışık şiddeti altında yatay olarak çimlendirilmiştir. Petriplerin iklim dolabına aktarılmasını takiben 5, 7 ve 10. günlerde çimlenen tohum sayıları alınarak, çimlenme yüzdeleri belirlenmiştir. Her bir petrinin bir biyolojik tekrar olarak değerlendirildiği deney, 3 biyolojik tekrar şeklinde (toplam 180 tohum kullanılarak) gerçekleştirilmiştir.



Şekil 1 Homozigot Arabidopsis mutantlarının PCR yöntemiyle doğrulanması. A. *sos1-1*. B. *sos3-1*. C. *hkt1-1*
 Figure 1 Confirmation of homozygous Arabidopsis mutants by PCR. A. *sos1-1*. B. *sos3-1*. C. *hkt1-1*



Şekil 2 Artan tuz stresi altında tohum çimlenme yüzdelerindeki değişim

(A. 5 günlük çimlenme. B. 7 günlük çimlenme. C. 10 günlük çimlenme. Her bir petrinin bir biyolojik tekrar olarak değerlendirildiği deney, 3 biyolojik tekrar şeklinde (toplam 180 tohum kullanılarak) gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar, ortalama \pm SEM olarak verilmiştir)

Figure 2 Change in seed germination under increasing NaCl concentrations

(A. 5-day germination. B. 7-day germination. C. 10-day germination. Experiment was repeated three times where, each petri plate represented one biological replicate (Total of 180 seeds were used). Results are presented as mean \pm SEM)

Artan Tuz Stresi Altında Kök Uzunluklarının Belirlenmesi

Artan tuz derişiminin kök gelişimine olan etkilerinin belirlenmesi için tohumlar yukarıda bahsedilen yüzey sterilizasyonuna maruz bırakılmıştır. Tohumların çimlendirilmesi ve bitkilerin büyütülmesinde dörtte bir mukavemetli Murashige and Skoog (1/4 \times MS) besiyeri kullanılmış olup, besiyerine takviye olarak %3 (w/v) sükröz ve %1,5 (w/v) agar ilave edilmiştir (Bu besiyeri bazal besiyeridir). Stres uygulamalarının kolay yapılabilmesi için petri büyüklüğünde kesilen selofan membranlar (Sigma, Almanya) otoklavda steril edildikten sonra besiyerinin üzerine yerleştirilmiştir (Aksoy ve ark., 2013). Membran üzerine her bir genotip için 16 tohum yerleştirilmiştir. Petriler streç film ile üçlü olarak sarılıp 4°C'de 3 gün stratifiye edildikten sonra yukarıda bahsi geçen büyütme koşullarında dikey olarak 4 gün büyütülmüştür. Bazal besiyerinde 4 gün çimlendirip büyütülen bitkiler selofan membran aracılığıyla steril ortamda 0, 10, 25, 30, 50, 75, 90, 100 mM NaCl içeren besiyerlerine aktarılmıştır ve tuz ortamına aktarılmalarını takiben 5 gün boyunca her gün kök uzunlukları markör kalem ile işaretlenmiştir. Deneyin tamamlanmasını takiben bitkiler dijital kamera ile fotoğraflanmış ve Aksoy ve ark. (2013)'da anlatıldığı gibi kök uzunlukları ImageJ yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. Her bir petrinin bir biyolojik tekrar olarak değerlendirildiği deney 6 biyolojik tekrar şeklinde (toplam 96 tohum kullanılarak) gerçekleştirilmiştir.

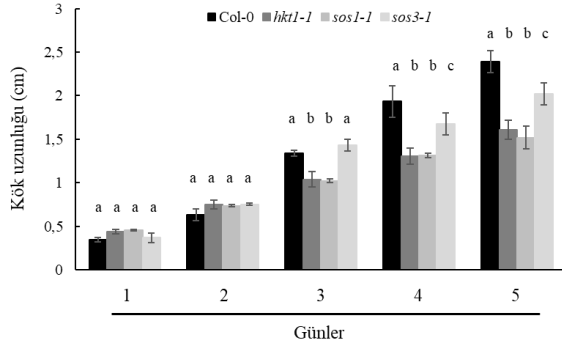
İstatistiksel Analizler

Elde edilen veriler Minitab 18 (Minitab Inc., ABD) istatistik yazılımı kullanılarak tek yönlü varyans analizini (ANOVA) takiben Tukey çoklu karşılaştırma (post-hoc) yöntemi kullanılarak %5 seviyesinde analiz edilmiştir.

Bulgular ve Tartışma

Homozigot Arabidopsis mutantlarının PCR yöntemiyle doğrulanması

Tuz stresi deneylerine başlanmadan önce mutant tohumları petrilerde çimlendirilmiş ve bütün bitkiler kullanılarak genomik DNA izole edilmiştir. Mutantların homozigot olup olmadıklarının kontrol edilebilmesi için elde edilen genomik DNA kullanılarak her bir mutant lokun için dizayn edilen primerler aracılığıyla mutant ve yabanıl tip PCR'ları gerçekleştirilmiştir. Şekil 1'de gösterildiği üzere *sos1-1*, *sos3-1* ve *hkt1-1* mutantlarından yapılan mutant PCR'da beklenen büyüklüklerde çoğalma (*sos1-1* için 101 bç, *sos3-1* için 713 bç ve *hkt1-1* için 1100 bç) gerçekleşmiş, ancak yabanıl tip Col-0'da bir çoğalma gerçekleşmemiştir. Aynı genotiplerle gerçekleştirilen yabanıl tip PCR'ında ise sadece Col-0'da beklenen büyüklüklerde (*sos1-1* için 115 bç, *sos3-1* için 725 bç ve *hkt1-1* için 665 bç) çoğalma gerçekleşmiştir. *sos1-1* ile *sos3-1* nokta mutasyonlarıyken, *hkt1-1* T-DNA ekleme mutasyonudur. Elde edilen bu sonuçlar mutant tohumlarının homozigot olduğunu göstermektedir. *sos1-1* mutantında *SOS1* geninin ifade seviyesinin az olduğu, *sos3-1* mutantında *SOS3* geninin susturulduğu ve *hkt1-1* mutantında da *HKT1* gen ifade seviyesinin bir hayli azaldığı önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Qiu ve ark., 2004). Bu nedenle, ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere bu tohumların kullanılabilceği doğrulanmıştır.



Şekil 3 Normal şartlarda büyütülen genotiplerin kök uzunlukları

(Bitkiler 4 gün bazal besiyerinde büyütüldükten sonra kök uzunlukları ölçülmeye başlanmış olup, ek 5 gün süresince ölçüm alınmıştır. Sonuçlar, ortalama \pm SEM olarak verilmiştir (n = 60). Aynı gün içindeki farklı harfler genotipler arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir (P<0,05))

Figure 3 Root growth of genotypes under normal conditions.

(Root measurements were taken for additional 5 days after the plants were grown for 4 days on basal medium. Results are presented as mean \pm SEM (n = 60). Different letters on same day represent for statistical differences between the genotypes (P<0.05))

Artan Tuz Stresi Altında Tohum Çimlenme Yüzdelerindeki Değişim

İlk olarak, 0, 100, 120, 150 ve 200 mM sodyum klorür (NaCl) ilave edilmiş çeyrek mukavemetli (1/4 \times) MS besiyeri kullanılarak çimlenme deneyi gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda ilk kök çıkartan bütün bitkiler çimlenmiş olarak kabul edilip, deneyin başlamasını takiben 5., 7. ve 10. günlerde perilerdeki çimlenen tohumlar sayılmış ve çimlenme yüzdesi hesaplanmıştır. On günlük çimlenmeyi takiben NaCl içermeyen kontrol koşullarında Col-0, *sos1-1* ve *sos3-1* tohumlarının neredeyse tamamına yakının çimlendiği; ancak, *hkt1-1* tohumlarının sadece %80'inin çimlenebildiği gözlenmiştir. Her ne kadar tohumlar yeni hasat edilmiş olsalar da mutasyondan kaynaklı bazı mutant tohumlarda çimlenme sorunlarının yaşandığı bilinmektedir (Strasser ve ark., 2010; Barrero ve ark., 2019). Bu nedenle normal koşullardaki çimlenme sorunları gözardı edilerek, NaCl konsantrasyonundaki artışın çimlenme yüzdesi üzerine olan olumsuz etkisine odaklanılmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda genel olarak, ilerleyen günlerde tuz stresinden etkilenmenin daha az olduğu ve tuz stresinden en az etkilenen genotipin Col-0 olduğu anlaşılmaktadır. Mutant genotiplerin tuz stresine olan hassasiyet trendleri karşılaştırıldığında *sos1-1* ve *sos3-1* mutantlarının özellikle 7. ve 10. günlerdeki çimlenmelerinin tuz stresinden daha çok etkilendiği; buna karşın, *hkt1-1* mutantının geç stres döneminde diğer iki mutanta oranla biraz daha toleransının yüksek olduğu görülmektedir (Şekil 2). İlginç bir şekilde *hkt1-1* mutanı kısa süreli tuz stresi altında diğer mutantlarla karşılaştırıldığında daha az çimlenme göstermiş gibi görünse de aslında normal koşullardaki çimlenmesi de düşük olduğundan diğer mutantlara benzer bir şekilde tuz stresinden etkilendiği anlaşılmaktadır. Tuz stresinin çimlenme üstündeki etkileri incelendiğinde mutantlar ile Col-0 arasındaki en büyük farkların özellikle kısa süreli tuz stresi sırasında gözlemlendiği, mutantlar arasındaki en büyük farkların ise uzun süreli tuz stresi ile ortaya çıktığı anlaşılmaktadır. Bu sonuca göre, ileride *Arabidopsis thaliana* ile tuz stresi

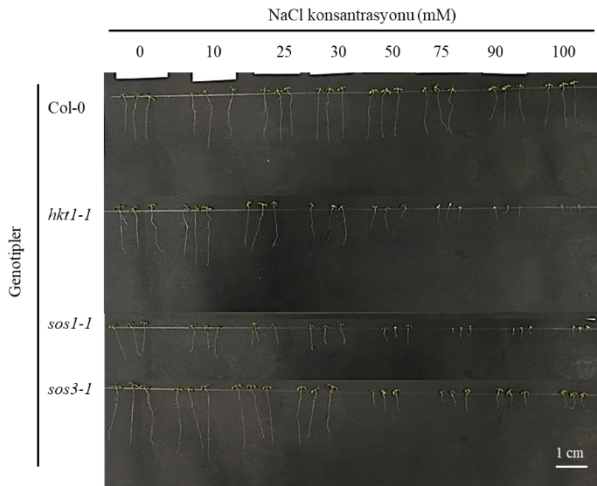
altında yapılacak çimlenme çalışmalarında hassasiyetin belirlenmesi için uzun süreli çimlenme deneylerinin gerçekleştirilmesi önemli olacaktır.

SOS yolağında görev alan proteinler tuz stresine toleransta pozitif olarak etki ettiklerinden, mutantlarının tuz stresine aşırı hassas olması beklenen bir sonuçtur (Wu ve ark., 1996; Ishitani ve ark., 2000; Shi ve ark., 2000; Rus ve ark., 2001). Lakin mutantlar arasında farklı tuz konsantrasyonları arasındaki hassasiyetin karşılaştırılması ilk kez bu çalışmada gerçekleştirilmiştir. Önceki çalışmalarda *hkt1-1* mutantının *sos3-1* mutanı ile melezlenmesi sonucunda elde edilen *sos3-1hkt1-1* çifte mutantlarının tuz hassasiyetlerinin *sos3-1* mutantından daha az olduğu, dolayısıyla da *HKTI*'in *sos3-1* mutantında gözlenen tuz hassasiyetini ortadan kaldırmada negatif bir etkisinin olabileceği bildirilmiştir (Rus ve ark., 2001; Rus ve ark., 2004). Bu sonuçlara paralel olarak, bizim çalışmamızda da *hkt1-1*'nin neredeyse bütün tuz konsantrasyonlarında *sos1-1* ve *sos3-1* mutantlarına kıyasla tuz stresine daha dayanıklı olduğu belirlenmiş olup, ileriki yapılacak transgenik çalışmalarda hücre zarı üzerinde bulunan Na⁺ taşıyıcısı *HKTI*'in susturulması ile tuza hassasiyeti bulunan bitkilerin hassasiyetlerinin kısmen de olsa ortadan kaldırılabilirliği anlaşılmaktadır.

Normal Koşullarda sos Mutantları Col-0'a Kıyasla Daha Yavaş Gelişim Gösterir

SOS mutantları ile yapılan önceki çalışmalarda sadece tuz stresinin etkilerine odaklanıldığından dolayı, normal koşullarda yetiştirilen mutantlar arasındaki fizyolojik farklılıklar önemsenmemiştir. Bu farklılıkların ortaya çıkartılması SOS yolağında görevli genlerin tuz stres toleransı haricindeki görevlerinin anlaşılması açısından da önem taşımaktadır. Bu nedenle yapmış olduğumuz kök uzunluk deneyinde normal koşullarda yetiştirilen Col-0, *hkt1-1*, *sos1-1* ve *sos3-1* genotipleri arasında mutasyondan kaynaklı olarak kök fenotipinde farklılıklar belirlenmiştir (Şekil 3). Bu bağlamda altı gün süresince bazal besiyerinde yetişen genotiplerin ana kök uzunlukları arasında herhangi bir fark gözlenmemiştir. Buna karşın, yedinci günde Col-0 ile *hkt1-1* ve *sos1-1*'in kök uzunlukları arasında %23'lük bir fark oluşmuştur. *sos3-1* kök uzunluğu ile Col-0 arasında ise herhangi bir fark gözlenmemiştir. Gelişimin sekizinci gününde Col-0 ile *hkt1-1* ve *sos1-1*'in kök uzunlukları arasındaki fark %32'ye ulaşırken, Col-0 ile *sos3-1* kök uzunlukları arasındaki fark da %13 olarak belirlenmiştir. Kök uzunluk analizlerinin yapıldığı son gün olan dokuzuncu günde, genotipler arasındaki farklar daha da belirgin bir hal almıştır. Buna göre, Col-0'ın kök uzunluğu ile *hkt1-1* arasındaki fark %32'ye, *sos1-1* ile arasındaki fark %36'ya ve *sos3-1* ile arasındaki fark da %16'ya ulaşmıştır. Bu çalışmadan da anlaşılabilirliği üzere, normal büyüme koşullarında dahi mutantların kök gelişimleri Col-0'a kıyasla daha yavaş kalmıştır. Mutantlar arasında da özellikle *sos1-1*'in en yavaş geliştiği belirlenmiştir. *sos1-1*'in tuz stresinden en çok etkilenen fenotipe sahip olduğu düşünüldüğünde (Shi ve ark., 2000), elde ettiğimiz bu sonucun pek de şaşırtıcı olmadığı tahmin edilebilir. *SOS1*'in yüksek seviyede ifade edilmesi durumunda dokulara biriken Na⁺ miktarının azalmasına bağlı olarak transgenik bitkiler tuz stresine dayanıklı hale gelmektedir (Shi ve ark., 2002). Hücrede biriken aşırı sodyumun reaktif oksijen türlerinin üretimini tetiklediği ve

bu nedenle de bitkilerin strese dayanıklılığının ortadan kalktığı da bilinmektedir (Jiang ve ark., 2013). Ayrıca, *sos2* mutantının hassasiyetinin özellikle reaktif oksijen türlerinin birikimine bağlı olmasından dolayı (Quan ve ark., 2017), *sos1-1*, *hkt1-1* ve *sos3-1* mutantlarının da mutasyondan kaynaklı normal koşullarda dahi bazal besiyerinde bulunan Na^+ gibi elementleri Col-0'a oranla daha fazla biriktirebilecekleri tahmin edilebilir. Bu nedenle de SOS yolağında yer alan genlerin mutasyona uğratılması durumunda, reaktif oksijen türlerinin olumsuz etkilerinden korunmayı sağlayacak mekanizmalarının yeterli çalışmamasından kaynaklı mutant köklerinin gelişimlerinin yavaşlaması beklenebilir. Bu durum ileride detaylı olarak incelenmelidir.



Şekil 4 Beş günlük tuz stresi uygulanan bitkilerin genel görünümü

Figure 4 Image of plants after 5 days of NaCl application

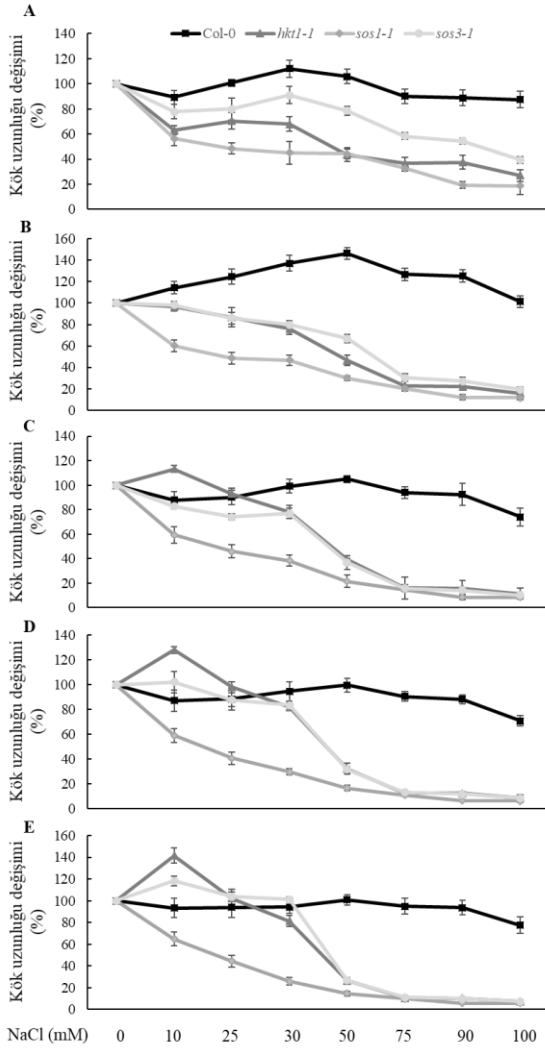
Artan Tuz Stresi sos Mutantlarının Kök Gelişimini Farklı Şekillerde Etkiler

SOS mutantlarının tuz stresine karşı göstermiş oldukları hassasiyet uzun yıllardır bilinmektedir (Alqahtani ve ark., 2019). Buna ek olarak, *hkt1-1* mutantının da tuz stresine hassasiyet gösterdiği, ancak *sos1-1* veya *sos3-1* mutantlarına *hkt1-1* mutantının eklenmesiyle elde edilen çifte mutant köklerinin ise tuz stresine tekil mutantlara kıyasla daha dayanıklı olduğu gösterilmiştir (Rus ve ark., 2001; Rus ve ark., 2004). Bu mutantlar ile yapılan çalışmalar farklı gruplar tarafından gerçekleştirildiğinden dolayı, deneylerin gerçekleştirilmesinde ufak farklılıklar bulunmaktadır. Dolayısıyla *sos1-1*, *sos3-1* ve *hkt1-1* mutantlarının artan NaCl stresine karşı farklı günlerde göstermiş oldukları kök gelişim tepkileri bugüne kadar karşılaştırılmamıştır. Bu karşılaştırılmanın sağlıklı bir şekilde yapılabilmesi için öncelikle bütün mutantlar Col-0 ile birlikte bazal besiyerinde 4 gün süresince yetiştirilmiştir. Akabinde bitkiler 0, 10, 25, 30, 50, 75, 90, 100 mM NaCl içeren besiyerlerine aktarılmıştır ve tuz ortamına aktarılmalarını takiben 5 gün boyunca her gün kök uzunlukları belirlenmiştir. Beşinci günün sonunda bitkiler fotoğraflanarak, genel bitki görünümleri karşılaştırılmalı olarak Şekil 4'te gösterilmiştir. Genotipler arasındaki gelişimsel farklılıklar bilindiğinden, genotiplerin tuz stresine vermiş oldukları tepkiler aynı genotipin kontrol (0 mM NaCl) koşulunda yetiştirilen bireylerine kıyaslanarak yüzde değişim olarak

hesaplanmıştır. Buna göre, stresin süresinden bağımsız olarak Col-0'ın köklerinin 100 mM NaCl konsantrasyonunda etkilenmeye başladığı gözlenmiştir. Elde edilen bu sonuç önceki yapılan çalışmalarla paralellik göstermekte olup, Col-0'ın yabani ekotip olarak kullanıldığı çalışmalarda tuz hassasiyetinin kökteki uzunluğundaki fizyolojik etkilerinin 120-150 mM NaCl uygulamasında gözlenebileceği belirtilmiştir (Quesada ve ark., 2000; Wang ve ark., 2013). Yaptığımız bu çalışmada ise özellikle tuza aşırı hassas olan *sos* mutantlarının kök fenotiplerinin daha iyi anlaşılabilmesi için 100 mM'dan daha düşük NaCl konsantrasyonları kullanılmıştır. Arabidopsis gibi glikofit bitkilerin köklerinin düşük tuz konsantrasyonlarında uzamaya başladığı bildirilmiştir (Zolla ve ark., 2009). Bu çalışmamızda da benzer bir sonuç elde edilmiştir. Düşük tuz konsantrasyonlarına (25, 30, 50, 75 ve 90 mM NaCl) kısa süreli (1 ve 2 gün) maruz kalan Col-0'ın ana kök uzunlukları 0 mM'daki uzunluğuna kıyasla artmıştır (Şekil 5A ve B). Bu artış trendi ikinci günde daha belirgin bir hal almış olup, maksimum kök uzunluğuna 50 mM NaCl altında ulaşılmıştır (kontrolle kıyasla %38 artış) (Şekil 5B). Buradan da anlaşılacağı üzere, kısa süreli düşük tuz konsantrasyonları ana kök gelişimini pozitif yönde etkilemektedir. Dolayısıyla bitki gelişimi ve veriminin artırılmasında kısa süreli düşük doz tuz uygulaması kullanılabilir (Hajiboland ve ark., 2009).

Mutantların artan NaCl stresine vermiş oldukları tepkiler incelendiğinde genel olarak *sos1-1*'in *sos3-1* ve *hkt1-1*'den daha hassas olduğu görülmektedir (Şekil 5). Bir gün boyunca 10 mM gibi düşük bir NaCl konsantrasyonunda dahi *sos1-1* mutantının ana kök uzunluğu kontrole göre %40 oranında azalmıştır (Şekil 5A). Bu azalış ortamdaki NaCl konsantrasyonunun artışı ve stres süresinin uzamasına bağlı olarak daha belirgin olmuştur. Özellikle 75 mM NaCl konsantrasyonu ve fazlalığında (1 günlük uygulama hariç) *sos1-1* kök uzunluğu kontrol uygulamasına kıyasla %20'nin altına düşmüştür. Öte yandan *sos3-1* ve *hkt1-1* mutantları artan tuz konsantrasyonuna karşı benzer tepkiler vermiş ve genel olarak ana kök uzunlukları artan tuz konsantrasyonuna ve süresine bağlı olarak kontrole göre kısa kalmıştır. Mutantlar arasındaki bu benzerlik bir günlük stres uygulamasında gözlenmemiştir. Dolayısıyla, *sos3-1* ve *hkt1-1* gibi tuz stresine daha az hassasiyet gösteren mutantların vermiş oldukları tepkilerin birbirinden daha rahat ayrılabilmesi açısından kısa süreli stres uygulamasının yapılması gerekmektedir. Şekil 5A'da görüldüğü üzere, bir günlük NaCl uygulaması sonucunda Col-0'dan sonra en dayanıklıdan hassasa doğru genotipler *sos3-1*, *hkt1-1* ve *sos1-1* olarak sıralanmaktadır. İlginç bir şekilde, *hkt1-1* mutantına 3, 4 veya 5 gün süresince 10 mM NaCl uygulanması sonucunda mutantın ana kök uzunluğu kontrole kıyasla sırasıyla %13, 28 ve 41 oranlarında artmış ve bu artış sayesinde tuz uygulamasına Col-0'dan dahi daha iyi tepki vermiştir (Şekil 5C, D ve E). Ayrıca, *hkt1-1*'e benzer şekilde, *sos3-1* mutantına 4 veya 5 gün süresince 10 mM NaCl uygulanması sonucunda mutantın ana kök uzunluğu kontrole kıyasla sırasıyla %2 ve 18 oranlarında artmış ve bu artış sayesinde tuz uygulamasına Col-0'dan dahi daha iyi tepki vermiştir (Şekil 5D ve E). Bu sonuçlardan da anlaşılacağı üzere, mutasyon, uygulanan tuz konsantrasyonu ve uygulama süresine bağlı olarak bitkilerin tuz stresine karşı sanki bir halofit gibi

tepkiler verdikleri gözlenmiştir. Bu ve benzer sonuçlar tuz stresine dayanıklılıkla alakalı mutantlarda da gözlenmiş olup (Quesada ve ark., 2000), kısa süreli ve düşük seviyedeki tuz stres uygulamalarında gözlenen bu sonuçların halofitler ile kıyaslanamayacağı aşikârdır. Lakin *Arabidopsis thaliana* gibi model glikofitlerin tuz stres toleransının moleküler mekanizmalarının daha iyi anlaşılabilmesi için ve özellikle de stres uygulamasının erken döneminde aktifleşen transkripsiyon faktörleri ile stres sinyallerinin belirlenebilmesi için kısa süreli ve düşük konsantrasyonda tuz uygulamalarının yapılması gerekmektedir.



Şekil 5 Artan tuz stresi altında kök uzunluklarının değişimi.

(Bitkiler 4 gün bazal besiyerinde yetiştirildikten sonra farklı NaCl içeren besiyerlerine aktarılmıştır. Aktarılmamın ardından uzunluklar ölçülerek kontrol besiyerine göre yüzde değişim hesaplanmıştır. A. 1 gün. B. 2 gün. C. 3 gün. D. 4 gün. E. 5 gün. Her bir petrinin bir biyolojik tekrar olarak değerlendirildiği deney 6 biyolojik tekrar şeklinde (toplam 96 tohum kullanılarak) gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar, ortalama \pm SEM olarak verilmiştir.)

Figure 5 Change in root lengths under increasing NaCl concentrations.

(Plants were transferred to media with different NaCl concentrations after grown for 4 days on basal medium. After transfer, the root lengths were measured and given as percentage change against control medium.

A. 1 day. B. 2 days. C. 3 days. D. 4 days. E. 5 days. Experiment was repeated six times where, each petri plate represented one biological replicate (Total of 96 seeds were used). Results are presented as mean \pm SEM.)

Sonuç

Arabidopsis thaliana gibi glikofitler her ne kadar yüksek tuz stresine karşı hassasiyet gösterse de düşük tuz stresine karşı geliştirmiş oldukları dayanıklılık mekanizmaları bulunmaktadır. Bu mekanizmaların en önemlisi SOS yolağıdır. SOS yolağında yer alan proteinleri kodlayan genlerde meydana gelen mutasyonlar bitkilerin düşük tuz konsantrasyonlarına dahi aşırı hassas olmalarını sağlamaktadır. Sos mutantları ile ilgili yapılan çalışmalarda genellikle 50 mM ve üstündeki NaCl uygulamaları dikkate alındığından bu yolla ilgili mutant fenotipleri genellikle aşırı hassasiyetle sonuçlanmaktadır. Yapmış olduğumuz bu çalışmada, kontrollü koşullarda yetiştirilen *sos1-1*, *sos3-1* ve *hkt1-1* mutantları ile Col-0 yabancı ekotipinin 1-5 gün süreyle gerçekleştirilen 0 ile 100 mM arasındaki NaCl uygulamalarına vermiş olduğu tepkiler belirlenmiştir. Buna göre, normal koşullarda dahi mutantların Col-0'a kıyasla daha yavaş gelişim gösterdiği; *sos1-1* mutantının 10 mM'lık NaCl uygulamasında dahi ana kök gelişiminin büyük bir oranda etkilendiği; *sos3-1* ve *hkt1-1* mutantlarının tuz stresinden *sos1-1*'e kıyasla daha az etkilendikleri belirlenmiştir. Ayrıca, kısa süreli ve düşük seviyede NaCl uygulanan Col-0, *hkt1-1* ve *sos3-1* köklerinin gelişiminin pozitif yönde etkilendiği bulunmuştur. Bu sonuçlar ışığında *Arabidopsis thaliana*'nın tuz stresine karşı göstermiş olduğu tepkilerin detaylı incelenmesi ve moleküler tolerans yollarının belirlenmesinde tuz stres miktarı ve süresinin ne kadar önemli olduğu belirlenmiştir.

Teşekkür

Bu çalışma Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (Proje No: GTB 2018/07-BAGEP) tarafından desteklenmiştir.

Kaynaklar

- Aksoy E, Jeong IS, Koiwa H. 2013. Loss of function of Arabidopsis C-terminal domain phosphatase-like1 activates iron deficiency responses at the transcriptional level. *Plant Physiol.* 161(1): 330-345.
- Alqahtani M, Roy SJ, Tester M. 2019. Increasing Salinity Tolerance of Crops. In: Savin R., Slafer G. (eds) *Crop Science. Encyclopedia of Sustainability Science and Technology Series.* 245-267. Springer, New York, NY.
- Ashraf M. 2004. Some important physiological selection criteria for salt tolerance in plants. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants.* 199: 361-376.
- Barrero JM, Dorr MM, Talbot MJ, Ishikawa S, Umezawa T, White RG, Gubler F. 2019. A role for PM19-Like 1 in seed dormancy in Arabidopsis. *Seed Sci. Res.* 1-13.
- Bernstein N. 2019. Plants and salt: Plant response and adaptations to salinity. In Seckbach J,
- Rampelotto P. (eds) *Model Ecosystems in Extreme Environments.* 101-112. Academic Press.
- Carillo P, Annunziata MG, Pontecorvo G, Fuggi A, Woodrow P. 2011. Salinity stress and salt tolerance. In Shanker A, Venkateswarlu B. *Abiotic Stress in Plants-Mechanisms and Adaptations. Biochemistry, Genetics and Molecular Biology.* InTechOpen. 978:953-307-394.
- Çulha Ş, Çakırlar H. 2011. Tuzluluğun bitkiler üzerine etkileri ve tuz tolerans mekanizmaları. *Afyon Kocatepe University Journal of Sciences.* 021002: 11-34.

- Dhankher, OP, Foyer CH. 2018. Climate resilient crops for improving global food security and safety. *Plant Cell Environ.* 41(5): 877-884.
- Emine E, Apan M, Kara T. 2005. Tuzluluğun bitki gelişimine etkisi. *J. of Fac. of Agric. Omu.* 20: 118-125.
- Gong D, Guo Y, Schumaker KS, Zhu JK. 2004. The SOS3 family of calcium sensors and SOS2 family of protein kinases in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 134(3): 919-926.
- Gupta B, Huang B. 2014. Mechanism of salinity tolerance in plants: physiological, biochemical, and molecular characterization. *Int. J Genomics.* 701596: 18.
- Hajiboland R, Joudmand A, Fotouhi K. 2009. Mild salinity improves sugar beet (*Beta vulgaris* L.) quality. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B-Soil and Plant Science*, 59(4): 295-305.
- Halfter U, Ishitani M, Zhu JK. 2000. The *Arabidopsis* SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium-binding protein SOS3. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(7): 3735-3740.
- Hossain S. 2019. Present scenario of global salt affected soils, its management and importance of salinity research. *Int. J. Biol. Sci.*, 1(1): 13.
- Hussain S, Shaikat M, Ashraf M, Zhu C, Jin Q, Zhang J. 2019. Salinity Stress in Arid and Semi-Arid Climates: Effects and Management in Field Crops. In Hussain S., Shaikat M., Ashraf M., Zhu C., Jin Q, Zhang J. *Climate Change and Agriculture*. IntechOpen.
- Isayenkov SV, Maathuis FJ. 2019. Plant Salinity Stress: Many Unanswered Questions Remain. *Front. Plant Sci.* 10: 80.
- Ishitani M, Liu J, Halfter U, Kim CS, Shi W, Zhu JK. 2000. SOS3 function in plant salt tolerance requires N-myristoylation and calcium binding. *The Plant Cell*, 12(9): 1667-1677.
- Ji H, Pardo JM, Batelli G, Van Oosten MJ, Bressan RA, Li X. 2013. The Salt Overly Sensitive (SOS) pathway: established and emerging roles. *Mol. Plant*, 6(2): 275-286.
- Jiang Z, Zhu S, Ye R, Xue Y, Chen A, An L, Pei ZM. 2013. Relationship between NaCl-and H₂O₂-induced cytosolic Ca²⁺ increases in response to stress in *Arabidopsis*. *PLoS one* 8(10): e76130.
- Krysan PJ, Young JC, Sussman MR. 1999. T-DNA as an insertional mutagen in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 11(12): 2283-2290.
- Kuşvuran Ş. 2010. Kavunlarda kuraklık ve tuzluluğa toleransın fizyolojik mekanizmaları arasındaki bağlantılar. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Adana.
- Liang W, Ma X, Wan P, Liu L. 2018. Plant salt-tolerance mechanism: A review. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 495(1): 286-291.
- Lin H, Yang Y, Quan R, Mendoza I, Wu Y, Du W, Zhao S, Schumaker KS, Pardo JM, Guo Y. 2009. Phosphorylation of SOS3-LIKE CALCIUM BINDING PROTEIN8 by SOS2 protein kinase stabilizes their protein complex and regulates salt tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 21(5): 1607-1619.
- Liu J, Zhu JK. 1997. An *Arabidopsis* mutant that requires increased calcium for potassium nutrition and salt tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 94(26): 14960-14964.
- Liu J, Ishitani M, Halfter U, Kim CS, Zhu JK. 2000. The *Arabidopsis thaliana* SOS2 gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 97(7): 3730-3734.
- Mahajan S, Pandey GK, Tuteja N. 2008. Calcium-and salt-stress signaling in plants: shedding light on SOS pathway. *Arch. Biochem. Biophys.*, 471(2): 146-158.
- Munns R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ.* 25:239-250.
- Munns R, Gilliam M. 2015. Salinity tolerance of crops—what is the cost?. *New Phytol.*, 208(3): 668-673.
- Munns R, Tester M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59: 651-681.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15(3): 473-497.
- Parida AK, Das AB. 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 60: 324-349.
- Qiu QS, Guo Y, Dietrich MA, Schumaker KS, Zhu JK. 2002. Regulation of SOS1, a plasma membrane Na⁺/H⁺ exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by SOS2 and SOS3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 99(12): 8436-8441.
- Qiu QS, Guo Y, Quintero FJ, Pardo JM, Schumaker KS, Zhu JK. 2004. Regulation of vacuolar Na⁺/H⁺ exchange in *Arabidopsis thaliana* by the salt-overly-sensitive (SOS) pathway. *J. Biol. Chem.*, 279(1): 207-215.
- Quan R, Wang J, Yang D, Zhang H, Zhang Z, Huang R. 2017. EIN3 and SOS2 synergistically modulate plant salt tolerance. *Sci. Rep.*, 7: 44637.
- Quesada V, Ponce MR, Micol JL. 2000. Genetic analysis of salt-tolerant mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, 154(1): 421-436.
- Roy SJ, Negrão S, Tester M. 2014. Salt resistant crop plants. *Curr. Open Biotech.*, 26: 115-124.
- Rus A, Lee BH, Muñoz-Mayor A, Sharkhuu A, Miura K, Zhu JK, Bressan RA, Hasegawa PM. 2004. AtHKT1 facilitates Na⁺ homeostasis and K⁺ nutrition in planta. *Plant Physiol.*, 136(1): 2500-2511.
- Rus A, Yokoi S, Sharkhuu A, Reddy M, Lee BH, Matsumoto TK, Koiwa H, Zhu JK, Bressan RA, Hasegawa PM. 2001. AtHKT1 is a salt tolerance determinant that controls Na⁺ entry into plant roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 98(24): 14150-14155.
- Sánchez-Barrena MJ, Martínez-Ripoll M, Zhu JK, Albert A. 2005. The structure of the *Arabidopsis thaliana* SOS3: molecular mechanism of sensing calcium for salt stress response. *J. Mol. Biol.*, 345(5): 1253-1264.
- Shi H, Ishitani M, Kim C, Zhu JK. 2000. The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene *SOS1* encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 97(12): 6896-6901.
- Shi H, Quintero FJ, Pardo JM, Zhu JK. 2002. The putative plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter SOS1 controls long-distance Na⁺ transport in plants. *Plant Cell*, 14(2): 465-477.
- Strasser B, Sánchez-Lamas M, Yanovsky MJ, Casal JJ, Cerdán PD. 2010. *Arabidopsis thaliana* life without phytochromes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 107(10): 4776-4781.
- Tuteja N. 2007. Mechanisms of high salinity tolerance in plants. In *Methods in enzymology* (Vol. 428, pp. 419-438). Academic Press.
- Türkan I, Demiral T. 2009. Recent developments in understanding salinity tolerance. *Environ. Exper. Bot.*, 67(1): 2-9.
- Wang Y, Yang L, Zheng Z, Grumet R, Loescher W, Zhu JK, Yang P, Hu Y, Chan Z. 2013. Transcriptomic and physiological variations of three *Arabidopsis* ecotypes in response to salt stress. *PLoS one*, 8(7): e69036.
- Wu SJ, Ding L, Zhu JK. 1996. *SOS1*, a genetic locus essential for salt tolerance and potassium acquisition. *Plant Cell*, 8(4): 617-627.
- Yokoi S, Bressan RA, Hasegawa PM. 2002. Salt stress tolerance of plants. *JIRCAS working report*, 23(1): 25-33.
- Zhu JK. 2000. Genetic analysis of plant salt tolerance using *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 124(3): 941-948.
- Zhu JK, Liu J, Xiong L. 1998. Genetic analysis of salt tolerance in *Arabidopsis*: evidence for a critical role of potassium nutrition. *Plant Cell*, 10(7): 1181-1191.
- Zolla G, Heimer YM, Barak S. 2009. Mild salinity stimulates a stress-induced morphogenic response in *Arabidopsis thaliana* roots. *J. Exp. Bot.*, 61(1): 211-224.