

**FLAGELLİN, KİTOSAN VE ABSİSİK ASİT'İN
STOMA KAPANMASI VE ANYON KANALLARI
ÜZERİNE ETKİSİ**

AYŞİN GÜZEL DEĞER

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ
ANA BİLİM DALI**

DOKTORA TEZİ

**MERSİN
KASIM - 2013**

**FLAGELLİN, KİTOSAN VE ABSİSİK ASİT'İN
STOMA KAPANMASI VE ANYON KANALLARI
ÜZERİNE ETKİSİ**

AYŞİN GÜZEL DEĞER

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ
ANA BİLİM DALI**

DOKTORA TEZİ

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Serpil ÜNYAYAR**

**MERSİN
KASIM - 2013**

Ayşin GÜZEL DEĞER tarafından Prof. Dr. Serpil ÜNYAYAR danışmanlığında ve Doç.Dr. Max. R. G. ROELFSEMA eş danışmanlığında hazırlanan “ Flagellin, Kitosan ve Absisik Asit'in Stoma Kapanması ve Anyon Kanalları Üzerine Etkisi ” başlıklı bu çalışma aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından oy birliği ile Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Serpil ÜNYAYAR

Prof. Dr. Gökhan CORAL

Prof.Dr. Füsun YÜREKLİ

Prof.Dr. Yüksel KELEŞ

Doç.Dr. Max. R. G. ROELFSEMA

İmza

Yukarıdaki Jüri kararı Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 14.102/2014 tarih ve 2014.03...../113..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Doç.Dr.Mehmet KUÇUKASLAN
Enstitü Müdürü



Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, şekil, çizelge ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hükümlerine tabidir.

FLAGELLİN, KİTOSAN VE ABSİİK ASİT'İN STOMA KAPANMASI VE ANYON KANALLARI ÜZERİNE ETKİSİ

Ayşin GÜZEL DEĞER

ÖZ

Bitkiler, doğal yaşam alanlarında birçok potansiyel patojenik mikroorganizmanın tehdidi ile karşı karşıyadır. Bitki hücreleri temel savunma yanıtları yürüterek, bu mikroorganizmaların çoğunluğundan kendilerini korurlar. Bu korunma mekanizmalarından biri, patojenlerin girişini engelleyen yaprak yüzeyinde bulunan stoma açıklıklarının kapanmasıdır. Stoma kapanması plazma membranındaki reseptör proteinler tarafından tanınan oldukça iyi korunmuş Mikrop-İlişkili Moleküler Örüntüler (MİMÖ'ler) tarafından tetiklenir. MİMÖ reseptörleri erken bir aşamada, plazma membran iyon taşıma aktivitesi ve elektrik sinyallerindeki değişiklikleri de içeren, çok sayıda yanıtı uyarır. Ancak bu yanıtların altında yatan moleküler mekanizmalar henüz aydınlatılamamıştır. Bu çalışmada, yanıtların moleküler mekanizmasının anlaşılması ve onların Absisik asit (ABA) sinyali ile ilişkisi mikroelektrodlar ve non-invazif nano-infüzyon teknikleri kullanılarak çalışıldı. Öncelikle, stoma kapanması açık stoma aracılığıyla stoma altı boşluğundan kitosanın nano-infüzyonu ile uyarıldı. Stoma kapanmasına neden olan MİMÖ'den fungal elisitör kitosanın bütünlüğü bozulmamış arpa bitkisinin stoma bekçi hücrelerinde plazma membran anyon kanallarını aktive ettiği gösterildi. Bütünlüğü bozulmamış *Arabidopsis* yapraklarında stoma bekçi hücreleri bakteriyel elisitör flg22 veya stres hormonu ABA ile uyarıldı. Flg22'nin nano-infüzyonu 17 dakikalık bir geçikme süresinden sonra stoma kapanmasını uyardı. ABA çok benzer bir yanıtı tetikledi fakat 7 dakikalık bir geçikme süresiyle. Flg22 ve ABA'nın stoma yanıtlarındaki benzerliklerden dolayı her iki sinyal yolağının mutantları çalışıldı (*ost1-2* = Open Stomata 1, *abi-1* = ABscisic acid Insensitive 1). Mikro-elektrot teknikler kullanılarak, bekçi hücrelerinde flg22'nin SLAC1 ve SLAH3 anyon kanallarının her ikisini de uyardığı gösterildi. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, flg22 ve ABA sinyallerinin ilk basamaklarının farklı olduğu, ancak yolağın OST1 protein kinaz seviyesinde birleştiği ve SLAC1 ve SLAH3'ün aktivasyonuna neden olduğu gösterildi.

Anahtar Kelimeler: MİMÖ'ler, bitki savunma cevabı, stoma kapanması, anyon kanalları, elisitör.

Danışman: Prof. Dr. Serpil ÜNYAYAR, Mersin Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Ana Bilim Dalı.

Eş Danışman: Doç. Dr. Max. R. G. ROELFSEMA, Würzburg Üniversitesi, Biyoloji Merkezi, Julius- von-Sachs Enstitüsü Biyolojik Bilimler, Moleküler Bitki Fizyolojisi ve Biyofizik Bölümü.

STOMATAL CLOSURE OF FLAGELLIN, CHITOSAN AND ABSCISIC ACID AND THEIR EFFECT ON ANION CHANNELS

Ayşin GÜZEL DEĞER

ABSTRACT

In their natural environment, plants are facing the threat of a multitude of potential pathogenic microorganisms. Plant cells protect themselves to the majority of these microorganisms, by executing basal defense responses. This is one of the mechanisms of protection, which prevents the entry of pathogens closure of stomatal pores on the surface of leaf. Stomatal closure is triggered by well-conserved Microbe-Associated Molecular Patterns, which are recognized by receptor proteins in the plasma membrane. MAMP receptors are provoking a multitude of responses, including changes in ion transport activity and electrical signals at the plasma membrane, at an early stage. However, the molecular mechanisms underlying these responses remains unclear. In these study, understanding the molecular mechanisms of these responses and its interrelation with the Abscisic acid (ABA) signalling, was studied with microelectrodes and non- invasive nano-infusion techniques. Primarily, stomatal closure was induced by nano-infusion of chitosan via open stomata into the substomatal cavity. We could show that the MAMP fungal elicitor chitosan activates plasma membrane anion channels in guard cells of intact barley, which leads to stomatal closure. Stoma guard cells in intact *Arabidopsis* leaves were either stimulated with the bacterial elicitor flg22, or with the stress hormone ABA. Nano-infusion of flg22 induced stomatal closure after lag time 17 min. ABA triggered a very similar response, but the lag time 7 min. Because of the similarities in stomatal responses to flg22 and ABA, we studied mutants of both signaling pathways (*ost1-1*= Open Stomata 1, *abil*=ABscisic acid Insensitive 1). Using micro- electrode techniques, we could show that flg22 stimulates both SLAC1 and SLAH3 anion channels in guard cells. According to results of this study, the initial steps in flg22- and ABA signaling are different, but pathways they merge at level of OST1 protein kinaz and lead to activation of SLAC1 and SLAH3.

Key Words: MAMPs, plant defence response, stomatal closure, anion channels, elicitor.

Advisor: Prof. Dr. Serpil ÜNYAYAR, Üniversity of Mersin, Faculty of Science and Letters, Department of Biology.

Co-Advisor: Assoc. Prof.Dr. Max. R. G. ROELFSEMA, Üniversity of Würzburg, Julius-von-Sachs Institute for Biosciences Biocenter, Molecular Plant Physiology and Biophysics.

TEŞEKKÜR

Çalışmalarımın her aşamasında yanımda olup yol gösteren, her konuda destek olan, bilgi, görüş ve önerilerini esirgemeyen değerli tez danışman hocalarım Prof.Dr. Serpil ÜNYAYAR'a (Mersin Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü) ve Doç. Dr. Max. R. G. ROELFSEMA'ya (Würzburg Üniversitesi, Biyoloji Merkezi, Julius-von-Sachs Enstitüsü Biyolojik Bilimler, Moleküler Bitki Fizyolojisi ve Biyofizik Bölümü) sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Würzburg Üniversitesinde doktora tez çalışmalarımı gerçekleştirmeme imkan veren ve grubunda çalışma şansı tanıyan sayın Prof.Dr. Rainer HEIDRICH'e (Würzburg Üniversitesi, Biyoloji Merkezi, Julius-von-Sachs Enstitüsü Biyolojik Bilimler, Moleküler Bitki Fizyolojisi ve Biyofizik Bölümü) teşekkür ederim. Würzburg üniversitesi Botanik 1 bölümündeki tüm öğretim üyeleri, doktora öğrencileri, teknik asistanlar ve bahçıvanlara çalışmalarım süresince gösterdikleri kolaylıktan ve destekten dolayı teşekkür ederim.

Çalışmalarım süresinde bilgi ve önerilerini esirgemeyen tez izleme komitesinde bulunan değerli hocalarım Prof.Dr. Yüksel KELEŞ'e (Mersin Üniversitesi, Eğitim Fakültesi) ve Prof.Dr. Gökhan CORAL'a (Mersin Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü) katkılarından dolayı teşekkür ederim. Ayrıca doktora tez savunma sınavı jüri üyelerim Prof.Dr. Füsun YÜREKLİ'ye (İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü) ve Doç.Dr. Rıza BİNZET'e (Mersin Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü) değerli katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Doktora çalışmalarım süresince her zaman destek sağlayan MEU Rektörlüğüne, Fen Edebiyat fakültesi Biyoloji Bölüm Başkanlığına ve Fen bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne teşekkür ederim. Bu çalışmalar süresince desteklerini esirgemeyen bölümdeki hocalarıma ve araştırma görevlisi arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Doktora tez çalışmamın oluşmasına finansal destek sağlayan Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Birimine (BAP), Alman Akademik Değişim Servisi (DAAD)'ye, ERASMUS Koordinatörlüğüne ve Würzburg

Üniversitesi “Collaborative Research Centers (SFB= Sonderforschungsbereiche)” teşekkür ederim.

Çalışmalarım süresince her zaman yanımda olan, desteklerini esirgemeyen eşim Uğur DEĞER'e, benim ile birlikte doktora yapan kızımız LİLA'ya, GÜZEL ve DEĞER ailelerine sonsuz teşekkürlerimi borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZ	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	v
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI	5
2.1. İYONLARIN ZAR ENGELİNDEN GEÇEREK TAŞINMASI	5
2.1.1. Zar Taşıma Sistemleri	6
2.1.1.1. İyon kanalları.....	7
<i>İyon kanal genleri</i>	8
2.2. STOMA BEKÇİ HÜCRELERİNİN İŞLEVİ VE SİNYAL MEKANİZMASI	8
2.2.1. Sinyal Elemanları	10
2.2.2. Stoma Hareketleri	11
2.2.2.1. Stoma açılması	11
2.2.2.2. Stoma kapanması	11
2.2.2.3. ABA sinyali.....	13
2.3. STOMA BEKÇİ HÜCRELERİNDE İYON TAŞINIMI	13
2.3.1. Bekçi Hücre Plazma Zarından K ⁺ Taşınımı.....	13

2.3.1.1. Dışa doğru-düzenlenmiş K^+ -seçici kanalları (K^+ dışarı)	14
2.3.1.2. İçeriye doğru-Düzenlenmiş K^+ -seçici kanalları (K^+ içeri)	15
2.3.2. Bekçi hücre Plazma Zarından Anyon Taşınımı	16
2.3.2.1. R-tip ve alüminyum ile aktive edici anyon kanalları	16
2.3.2.2. S-tip anyon kanalları	17
2.4. ANYON KANALLARININ DÜZENLENMESİ	19
2.4.1. ABA Tarafından Düzenlenmesi	19
2.4.2. Patojenlerle Etkileşimleri	20
2.5. BÜTÜNLÜĞÜ BOZULMAMIŞ BEKÇİ HÜCRELERİNİN İNCELENMESİ	22
2.5.1. Voltaj Kenetleme Tekniği	23
2.6. BİTKİLERİN BAĞIŞIKLIK SİSTEMİ YANITLARI	23
3. MATERİYAL ve YÖNTEM	26
3.1. BİTKİ YETİŞTİRME ve HAZIRLIK KOŞULLARI	26
3.1.1. <i>Arabidopsis thaliana</i> Mutant Hatları.....	28
3.2. KİMYASALLAR ve ÇALIŞMA ÇÖZELTİLERİ	28
3.3. FİZYOLOJİK ve ELEKTROFİZYOLOJİK ÖLÇÜMLERE HAZIRLIK İŞLEMLERİ	30
3.3.1. Fizyolojik ve Elektrofizyolojik Çalışmalar Sırasında Bitkiye Uygulanacak Işık Miktarının Ölçülmesi	30
3.3.2. Epidermal Tabakanın İzolasyonu	31
3.3.3. Mezo fil Tabakasının Hazırlanması	31
3.3.4. Mikroskop ve Elektrofizyolojik Ölçüm Deney Düzenliği.....	32
3.3.5. Mikroelektrot Ölçümleri İçin Tek ve İki-Uçlu Kapillerin Hazırlanışı.....	33
3.4. MİKRO-ELEKTROT ÖLÇÜMLERİ	34

3.4.1. Arpa Bitkisinin Mezofil Hücrelerinde Zar Potansiyeli Ölçümü	35
3.4.2. Epidermis İzolasyonu İle Elde Edilen Stoma Bekçi Hücrelerinde S-Tip Anyon Kanallarının Ölçümü	35
3.4.3. Bütünlüğü Bozulmamış Yaprakların Stoma Bekçi Hücrelerinde İyon Kanallarının Ölçümü	36
3.4.4. Elektrofizyolojik verilerin değerlendirilmesi	37
3.5. NANO-İNFÜZYON.....	37
3.5.1. Nano-İnfüzyon Deneyi İçin Kapiller Hazırlanışı.....	37
3.5.2. Non-invazif Yöntem İle Bitki Apoplastı İçerisine Nanomiktarda Sıvı Enjeksiyonu.....	38
3.5.3. Stoma Açıklıklarının Ölçümü	39
3.5.4. Nano-İnfüzyon Deneyi ve Mikroelektrot Ölçümlerin Kombinasyonu	39
3.6. MOLEKÜLER ANALİZLER.....	40
3.6.1. Stoma Bekçi Hücrelerinin Zenginleştirilmesi	40
3.6.2. Anyon Kanallarının Klonlanması (SLAC1/SLAH3)	40
3.6.2.1. Stoma bekçi hücrelerinden RNA izolasyonu	40
3.6.2.2. Primer dizaynı	41
3.6.2.3. PZR koşulları.....	41
3.6.2.4. Bakteri hücrelerine transformasyon çalışmaları.....	42
3.6.2.5. Komponent hücre hazırlanışı.....	42
3.6.2.6. Plazmid izolasyonu	42
3.6.3. Biyolistik Yöntem İle Arpa Bitkisine Gen Aktarımı (Partikül Bombardımanı)	43
3.6.4. Agrobacterium Aracılığıyla Transient Transformasyon	45
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	46
4.1. BULGULAR	46

4.1.1. Nano-İnfüzyon Ölçümleri	46
4.1.1.1. Bütünlüğü bozulmamış arpa bitkisinde fungal elisitör kitosan tarafından uyarılan stoma kapanması.....	46
4.1.1.2. Bütünlüğü bozulmamış <i>Arabidopsis</i> bitkilerinde flg22 ve ABA tarafından uyarılan stoma hareketliliği.....	49
4.1.2. Mikro-Elektrot Ölçümleri	57
4.1.2.1. Arpa bitkisinin mezo fil hücrelerinde flg22 tarafından uyarılan zar potansiyeli	57
4.1.2.2. Bütünlüğü bozulmamış <i>Arabidopsis</i> stoma bekçi hücrelerinde potasyum kanal kayıtları	58
4.1.2.3. Bütünlüğü bozulmamış <i>Arabidopsis</i> stoma bekçi hücrelerinde S-tip (yavaş) anyon kanal kayıtları	59
4.1.2.4. Epidermal izolasyonda <i>Arabidopsis</i> stoma bekçi hücrelerinde S-tip (yavaş) anyon kanal kayıtları	60
4.1.3. Nano-İnfüzyon ve Mikro-Elektrot Tekniklerinin Kombinasyonu	62
4.1.3.1. <i>Arabidopsis</i> stoma bekçi hücrelerinde flg22 tarafından uyarılan K ⁺ iyon kanalları ve S-tip (yavaş) anyon kanal kayıtları.....	62
4.1.3.2. <i>Arabidopsis</i> stoma bekçi hücrelerinde flg22'nin uyardığı SLAC1 ve SLAH3 S-tip anyon kanal kayıtları.....	63
4.1.3.3. Kitosanın nanoinfüzyonu ile S-tip anyon kanallarının uyarılması.....	64
4.1.4. Moleküler Analizler	65
4.1.4.1. Bekçi hücrelerinin zenginleştirilmesi çalışmaları	66
4.1.4.2. Bekçi hücrelerinden mRNA izolasyonu.....	67
4.1.4.3. Biyolistik yöntem ile Arpa bitkisinin stoma bekçi hücrelerine gen aktarımı.....	67
4.1.4.4. <i>Agrobacterium</i> Aracılığıyla Transient Transformasyon	68
4.2. TARTIŞMA	69
4.2.1. Nano-İnfüzyon Ölçümleri	69

4.2.1.1. Fungal elisitör kitosan tarafından uyarılan stoma kapanması	69
4.2.1.2. Bütünlüğü bozulmamış <i>Arabidopsis</i> bitkilerinde flg22 ve ABA tarafından uyarılan stoma hareketliliği.....	70
4.2.2 Mikro-Elektrot ve Nano-infüzyon Ölçümleri	73
4.2.3.Moleküler Analizler	74
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	75
KAYNAKLAR.....	77
ÖZGEÇMİŞ.....	88

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 3.1. Tez çalışmasında kullanılan <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkilerinin listesi ve özellikleri.....	27
Çizelge 3.2. Uygulanan voltaj protokolü	36
Çizelge 4.1. <i>Arabidopsis</i> ve mutanlarının flg22 ve ABA uygulamasına verdikleri yanıt sürelerinin karşılaştırılması.....	57
Çizelge 4.2. Zenginleştirilmiş bekçi hücrelerinin Axioscop2 mikroskop sonuçları	66

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Zar taşıma proteinleri	7
Şekil 2.2. Mikroskop altında bakıldığında yaprak yüzeyinde (epidermis) stoma açıklığının görüntüsü	9
Şekil 2.3. Stoma hareketliliği sırasında iyon kanalları ve taşıyıcıların model gösterimi	12
Şekil 2.4. Dışadoğru-Düzenlenmiş K^+ -seçici kanallarının kinetiği	14
Şekil 2.5. İçedoğru-Düzenlenmiş K^+ -seçici kanallarının kinetiği.....	15
Şekil 2.6. AtSLAC1 Anyon kanal modeli.....	18
Şekil 2.7. <i>Arabidopsis thaliana</i> SLAC1 protein ailesi ilişkisi.....	19
Şekil 2.8. a) Hücre içi kayıt elektrotu ile zar potansiyelinin ölçümü b) Stoma açılması ve kapanması esnasındaki iyon akışı	22
Şekil 2.9. Kitosan'ın kimyasal yapısı	23
Şekil 2.10. Stoma bekçi hücrelerinde MİMÖ lerin sinyal yolağının şematik diyagramı	25
Şekil 3.1. Bitki yetiştirme dolabında çimlenmekte olan ve büyüyen <i>Arabidopsis</i> bitkileri	27
Şekil 3.2. LI-COR 250 marka ışık ölçer (Light-Meter)	30
Şekil 3.3. Mezofil tabakasının hazırlanması.....	31
Şekil 3.4. Mikroskop ve elektro fizyolojik deney ölçüm düzeneği	32
Şekil 3.5. Elektro fizyolojik ölçüm düzeneğinde kullanılan cihazlar	33
Şekil 3.6. a) Borsilikat filamentli kılcal cam boru, b) dikey pipet yapıcı, c) yatay lazer pipet yapıcı.....	33
Şekil 3.7. a) petri kutusunda %2 Agaroz-tuz köprüsü (300mMKCl) b) iki uçlu cam mikro-elektrot ve Ag/AgCl tel	34
Şekil 3.8. Bütünlüğü Bozulmamış Bitkilerin Stoma Bekçi Hücrelerinde Plazma Zar İletkenliği Ölçümü	35

Şekil 3.9.	Epidermal izolasyon ile elde edilen stoma bekçi hücrelerinde iki uçlu elektrot ile zar potansiyeli ölçümü.....	36
Şekil 3.10.	Bütünlüğü bozulmamış <i>Arabidopsis</i> bitkilerinde iki uçlu elektrot ile iyon kanallarının ölçümü.....	37
Şekil 3.11.	Nano-infüzyon tekniğinin şematik gösterimi	38
Şekil 3.12.	Bütünlüğü bozulmamış <i>Arabidopsis</i> ve Arpa bitkilerinde nano-infüzyon uygulaması ve mikroeletrot ölçüm kombinasyonunun düzeneği.....	39
Şekil 3.13.	Hücre içi iki uçlu mikro-eletrot ile nano-infüzyon tekniğinin şematik olarak kombinasyonu	40
Şekil 3.14.	pSAT1564EU (Kontrol)	43
Şekil 3.15.	Deneyde kullanılan biyolistik cihazı ve parçaları	44
Şekil 3.16.	Lazer tarayıcı mikroskop ve özellikleri.....	45
Şekil 4.1.	Kitosanın nano-infüzyonu ile stoma kapanmasının uyarılması.....	46
Şekil 4.2.	Kitosan ve kontrol uygulamaları sonucunda stoma açıklıklarının ölçümü (9 ⁰⁰ -15 ⁰⁰ saatleri arasında)	47
Şekil 4.3.	Kitosan ve kontrol uygulamaları sonucunda stoma açıklıklarının ölçümü (15 ⁰⁰ -18 ⁰⁰ saatleri arasında)	47
Şekil 4.4.	Kitosan ve kontrol uygulamaları sonucunda zamana bağlı olarak %50 ye ulaşan stoma açıklığı	48
Şekil 4.5.	Kitosan ve kontrol uygulamaları sonucunda zamana bağlı olarak açık ve kapalı stoma sayısı	48
Şekil 4.6.	20nM flg22'nin nano-infüzyonu ile uyarılan <i>Arabidopsis</i> yaprağının epidermisinde stomanın görüntüsü.....	50
Şekil 4.7.	<i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Colombia</i> (Col-0) yabani ekotipinde kontrol, ABA ve flg22 uygulamaları sonucunda stoma açıklıklarının ölçümü.....	51
Şekil 4.8.	<i>Arabidopsis thaliana</i> Landsberg erecta (Ler) yabani ekotipinde kontrol, ABA ve flg22 uygulamaları sonucunda stoma açıklıklarının ölçümü.....	51

Şekil 4. 9.	<i>ost1-2</i> mutantında kontrol, ABA ve flg22 uygulamaları sonucunda stoma açıklıklarının ölçümü	52
Şekil 4.10.	<i>cpk3-5-6-11</i> dörtlü mutantında kontrol, ABA ve flg22 uygulamaları sonucunda stoma açıklıklarının ölçümü	52
Şekil 4.11.	<i>cpk4-5-6-11</i> dörtlü mutantında kontrol, ABA ve flg22 uygulamaları sonucunda stoma açıklıklarının ölçümü	53
Şekil 4.12.	<i>rbohD/F</i> ikili mutantında kontrol, ABA ve flg22 uygulamaları sonucunda stoma açıklıklarının ölçümü	53
Şekil 4.13.	WS-0 bitkisinde kontrol, ABA ve flg22 uygulamaları sonucunda stoma açıklıklarının ölçümü	54
Şekil 4.14.	At-WsFLS2myc mutantında kontrol, ABA ve flg22 uygulamaları sonucunda stoma açıklıklarının ölçümü	54
Şekil 4.15.	<i>abi1-1</i> mutantında kontrol, ABA ve flg22 uygulamaları sonucunda stoma açıklıklarının ölçümü	55
Şekil 4.16.	<i>slac1-3</i> mutantında kontrol, ABA ve flg22 uygulamaları sonucunda stoma açıklıklarının ölçümü	55
Şekil 4.17.	<i>slah3-1</i> mutantında kontrol, ABA ve flg22 uygulamaları sonucunda stoma açıklıklarının ölçümü	56
Şekil 4.18.	<i>slac1-3Xslah3-1</i> mutantında kontrol, ABA ve flg22 uygulamaları sonucunda stoma açıklıklarının ölçümü	56
Şekil 4.19.	Arpa bitkisinin mezofil hücrelerinde flg22 ve kontrol (BSA/DMSO) uygulamaları sonucunda plazma zar potansiyelindeki değişim	58
Şekil 4.20.	Bütünlüğü bozulmamış <i>Arabidopsis</i> Ler ekotipinde <i>Dışadoğru-Düzenlenmiş K⁺ -seçici kanallarının (K⁺ dışarı)</i> kinetiği ve voltaj protokolü	58
Şekil 4.21.	Bütünlüğü bozulmamış <i>Arabidopsis</i> Ler ekotipinde <i>İçedoğru-Düzenlenmiş K⁺ -seçici kanallarının (K⁺ içeri)</i> kinetiği ve voltaj protokolü.....	59
Şekil 4.22.	Bütünlüğü bozulmamış <i>Arabidopsis</i> yabani tip (Col-0) stoma bekçi hücresinde yavaş-tip anyon kanallarının elektrofizyolojik kaydı, voltaj protokolü ve akım-voltaj ilişkisi.....	60

Şekil 4.23.	Epidermal izolasyon ile elde edilen stoma bekçi hücrelerinde S-tip (yavaş) anyon kanal kayıtları	61
Şekil 4.24.	Bütünlüğü bozulmamış bekçi hücrelerinde flg22'nin nano-infüzyonu ile uyarılan Potasyum ve S-tip anyon kanal kayıtları.....	63
Şekil 4.25.	Flg22 hem SLAC1 hemde SLAH3 aktivitesini uyarır	64
Şekil 4.26.	Kitosanın nanoinfüzyonu ile S-tip anyon kanallarının uyarılması	65
Şekil 4.27.	Stoma bekçi hücrelerinde canlılık testi.....	66
Şekil 4.28.	Agaroz jel elektroforez görüntüsü. Aktin primer ile cDNA nın kontrolü.....	67
Şekil 4.29	Arpa bitkisinin stoma bekçi hücrelerine biyolistik yöntem ile gen transferi.....	68
Şekil 4.30.	Agrobacterium aracılığıyla gen transferi.....	68

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

MİMÖler	Mikrop İlişkili Moleküler Örüntüler
PİMÖler	Patojen İlişkili Moleküler Örüntüler
ABA	Absisik Asit
<i>ost1</i>	ing. <u>open stomata 1</u>
<i>ost2</i>	İng. <u>open stomata 2</u>
OST1	İng. <u>Open Stomata 1</u>
<i>abi1</i>	İng. <u>ABscisic acid Insensitive 1</u>
S-tip	Yavaş-tip (İng. <u>Slow-type</u>)
SLAC1	Yavaş Anyon Kanalı (İng. <u>Slow Anion Channel Associated 1</u>)
SLAH3	<u>SLAC1 Homolog 3</u>
RBK	Reseptör-Benzeri Kinazlar
flg22	Flagellin
FLS2	<u>Flagellin-Sensitive 2</u>
CPKs	<u>Calcium dependet Protein Kinaz</u>
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<i>GORK</i>	<u>Guard Cell Outward Rectifier K⁺</u>
<i>rbohD/F</i>	<u>respiratory burst oxidase homolog D/F</u>
SV	<u>Slow Vacuolar</u>
VK	Vacuolar K ⁺
TPK	Two Pore K ⁺ Channel

1. GİRİŞ

Patojenik mikroorganizmalar ev sahibi bitkiye girebilmek için yaprak yüzeyinde bulunan stoma açıklıklarından faydalanırlar. Stomalar karasal bitkilerin epidermisinde bulunan ve bir çift bekçi hücresinden oluşan mikroskobik gözeneklerdir. Stomalar, su kaybının kontrolü ve çevre ile gaz alışverişi için gereklidir. Bu nedenle; bitkiler ışık şiddeti, CO₂ konsantrasyonu, bağıl nem gibi çevresel koşullara yanıt olarak stoma açıklıklarını düzenlerler. Gözenekler yalnızca bu çevresel koşullar için gerekli değil, aynı zamanda mikroorganizmalar için giriş bölgeleri sağlarlar. Yaşamları boyunca bitkiler birçok patojenik mikroorganizma ile karşı karşıya kalmıştır. Bitki hücreleri temel savunma yanıtları yürüterek, potansiyel patojen mikroorganizmalardan kendilerini korurlar. Bitkiler stomalarını kapatarak bu gözenekler aracılığıyla patojen mikroorganizmaların saldırısından korunabilirler [Wilmer ve Fricker 1996, Melotto vd., 2008, Melotto vd., 2006, Schulze-Lefert ve Robatzek 2006]. Bu savunma yanıtları bekçi hücreleri tarafından tanınan oldukça iyi korunmuş Mikrop-İlişkili Moleküler Örüntüler (MİMÖler) olan flagellin ve kitosan gibi elisitörler tarafından tetiklenir [Boller ve Felix, 2009].

Yakın zamana kadar, mikroorganizmaların bitkilerin içine stoma aracılığıyla özgürce girebileceği ve stomaların kesinlikle pasif bir açıklık olduğu öneriliyordu. Ancak Melotto ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarda, kitosan ve flg22 gibi patojen/mikrop ilişkili moleküler örüntülere (PİMÖ/MİMÖler) yanıt olarak *Arabidopsis* bitkisinde stomaların kapandığını bulmuştur [Melotto vd., 2006, Zeng vd., 2010]. Kitosan birçok fungus hücre duvar bileşiminde bulunan kitinin deasetillenmiş türevidir [Bartnicki-Garcia, 1968]. Enfeksiyondan sonra ev-sahibi olmayan savunma cevabı ilk olarak ortaya çıkar ve plazma zar Reseptör-Benzeri Kinazlara (RBK) MİMÖ lerin bağlanması ile tetiklenir [Boller ve Felix, 2009]. En iyi incelenmiş RBK'lardan biri *Pseudomonas syringae* flagellin'in (flg22) 22 aminoasit kalıntılı uzantısı ile tanımlenen *Arabidopsis thaliana* nın FLS2 (Flagellin-Sensitive 2) reseptörüdür [Felix vd., 1999, Gomez-Gomez ve Boller, 2000]. Ev-sahibi olmayan direncin en erken aşaması MİMÖler ile uyarıldıktan sonra 5 dk içinde bir dizi yanıt olarak ortaya çıkar [Boller ve Felix, 2009]. Elektrofizyolojik olarak analiz edilen hücrelerde bu aşama plazma zarının geçici depolarizasyonu ile ilişkilendirilmiştir [Jeworutzki vd., 2010, Kuchitsu vd., 1997, Pelissier vd., 1986].

Bekçi hücreleri hem biyotik hem de abiyotik stres koşullarına yanıt verirler, fakat bu yanıtların benzer moleküler mekanizmalara hangi ölçüde dayandığı bilinmemektedir [Hetherington ve Woodward, 2003]. Kuraklık, stres hormonu Absisik asit'in (ABA) sitosoldeki seviyesinde değişikliklere yol açarken, mikrobiyal enfeksiyonlar flg22 gibi MİMÖ'ler ile tanınır [Melotto vd., 2006, Liu vd., 2009]. Arpa bitkisinin bekçi hücrelerinde fungal MİMÖ kitosanın plazma zar S-tip (İng. Slow=yavaş tip) anyon kanallarını aktive ettiği gösterilmiştir. Arpa bitkisinde daha önce yaptığımız çalışmalarda MİMÖ'ler tarafından uyarıldıktan 10 dk sonra stomaların kapandığı gözlemlenmiştir [Koers vd., 2011]. *Arabidopsis* bitkisinde stoma kapanmasında S-tip anyon kanalları SLAC1 (İng. Slow Anion Channel Associated 1) ve SLAH3'ün (SLAC1 Homolog 3) anahtar bir rol oynaması olasıdır. Çünkü stres hormonu ABA tarafından uyarılan stoma kapanması için her iki kanalın aktivasyonu gereklidir [Roelfsema vd., 2012]. ABA'ye duyarsız *ost1* ve *ost2* (open stomata 1 ve 2) mutantlarının flg22'ye yanıt vermediğinin rapor edilmesinden dolayı her iki sinyal yolağının örtüşmesi beklenmektedir [Liu vd., 2009, Melotto vd., 2006]. ABA yanıtı ile ilgili bekçi hücrelerinde OST1 (Open Stomata 1) protein kinazın fonksiyonu kesin bir şekilde açıklığa kavuşturulmuştur. ABA yanıtlarının aksine, flg22 tarafından bekçi hücre anyon kanallarının hedefleri hakkında ise çok az şey bilinmektedir. OST1 bekçi hücre anyon kanalı SLAC1'i aktive etme ve fosforlama yeteneğine sahiptir [Geiger vd., 2009, Lee vd., 2009, Vahisalu vd., 2010]. SLAH3 bekçi hücrelerinin ikinci S-tip (yavaş tip) anyon kanalları olarak temsil edilir ve OST1 tarafından aktive edilmez [Geiger vd., 2011]. Bununla birlikte SLAH3 birçok CPKs (ing. Calcium dependet Protein Kinazlar) tarafından aktive edilebilir [Geiger vd., 2009, Lee vd., 2009, Vahisalu vd., 2010]. Bunlardan bazıları ayrıca SLAC1 tarafından da aktive edilebilir [Brandt vd., 2012, Geiger vd., 2010]. Yalnızca epidermis ile yapılan çalışmalarda stoma kapanması SLAC1'e bağlıdır fakat SLAH3'ün rolü henüz çalışılmamıştır [Montillet vd., 2013]. Bütünlüğü bozulmamış bitkiler ve epidermis ile yapılan çalışmalardan elde edilen veriler ve farklı çalışmalar arasındaki uyumsuzluktan dolayı bu doktora tez çalışmasında bütünlüğü bozulmamış bitkilerde nano-infüzyon tekniği kullanarak ABA ve elistörlerin (kitosan, flg22) bekçi hücre anyon kanal aktivasyonu ve stoma hareketliliği üzerine etkisinin ortaya çıkarılması hedeflenmiştir.

Bütünlüğü bozulmamış bitkilerde bekçi hücreleri çok uçlu hücre içi mikro-ektrodlar kullanılarak iyon kanal aktivitesini kaydetmek için eşsiz bir imkan sunmaktadır. Bu teknik herhangi bir hücre hazırlık işlemi gerektirmez [Roelfsema ve Hedrich, 2005, Roelfsema vd., 2001]. Ayrıca, stoma hareketliliği ile bağlantılı bu hücrelerdeki iyon akışındaki değişim ışık mikroskobu altında doğrudan görüntülenebilir [Roelfsema vd., 2001, MacRobbie, 1987, Raschke vd., 1988].

Arpa (*Hordeum vulgare* L.) buğdaygillerden taneleri malt ve yem olarak kullanılan önemli bir tahıl bitkisidir. Tarih öncesi devirlerdeki en önemli kültür bitkilerinden biri olmakla birlikte, ekonomik önemi olan bitkilerin başında gelmektedir. Dünyada, tahıllar arasında üretimde 4. sırada yer alan arpa, Türkiye’de ise buğdaydan sonra ikinci sıradadır. Üretimde başı çeken ülkeler arasında Türkiye ve Almanya gelmektedir (<http://tr.wikipedia.org/wiki/Arpa>). *Arabidopsis thaliana*, turpgiller (Brassicaceae) familyasından yaygın bir bitki türüdür. *Arabidopsis* bitki biyolojisi ve genetik çalışmalar için çok popüler olan bir model organizmadır. DNA dizilemesi tamamlanan ilk bitkidir. *Arabidopsis*'in mutant hatları ve karakterize edilen ekotipleri laboratuvar çalışmalarında deneysel materyal olarak yetiştirilmektedir. *Arabidopsis* bitki-patojen ilişkisinin anlaşılması içinde yaygın olarak kullanılmaktadır (http://en.wikipedia.org/wiki/Arabidopsis_thaliana). Bu tez çalışmasında bitki-patojen ilişkisinin anlaşılması temel alındığından dolayı model bitki olan *Arabidopsis*'in farklı ekotipleri ve mutant hatları kullanılmış ayrıca ekonomik önemi olan arpa bitkisinde çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

Patojen savunmasındaki moleküler bileşenlerin belirlenmesi bitki-patojen ilişkisinin anlaşılmasında büyük önem taşımaktadır. Enfeksiyonun erken safhasında bitkiler stomalarını kapatırlar, böylelikle yaprak içine mikrobların girişini engellerler. Stomalar enfeksiyon esnasında kapandıkları için “patojenkapıları” olarak düşünülebilirler [Roelfsema ve Hedrich, 2013, basılmamış].

Stoma kapanmasının MİMÖler tarafından tetiklenen bitki hücrelerinin erken savunma yanıtları ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Ancak bu yanıtların altında yatan moleküler mekanizmalar henüz aydınlatılamamıştır. Bu tez çalışması, yaprak yüzeyinde bulunan stomaların patojenik mikroorganizmalara verdikleri yanıtlar ile ilgilidir. Bu yanıtlar farklı elisitörlerin (kitosan ve flg22) yaprağa enjekte edilmesi ile taklit edilmeye çalışılmıştır.

Bu doktora tez çalışmasının amacı, stoma bekçi hücrelerindeki patojen savunma yanıtlarının erken moleküler bileşenlerini ortaya çıkarmak ve böylelikle bitki-patojen ilişkisinin anlaşılmasını sağlamaktır. Ayrıca MİMÖ'ler ve kuraklık stres hormonu ABA'ye bekçi hücrelerinin yanıtında hangi sinyal bileşenlerinin paylaşıldığının ortaya çıkarılması hedeflenmiştir. Bu hedefler doğrultusunda *Arabidopsis*'in yabani ekotipleri (*Col-0*, *Ler*, *Ws*) ve farklı mutantlarıyla (*ost1-2*, *abi1-1*, *slac1-3*, *slah3-1*, *slac1-3xslah3-1*, *rbohD/F*, *AtWs-FLS2myc*, *cpk3-5-6-11*, *cpk4-5-6-11*) çalışılmıştır. Bu amaçla çalışmamızda, nano-infüzyon tekniği olarak adlandırılan bir teknik ile bitki apoplastı içine nano-miktarda elisitör (kitosan, flg22) ve ABA çözeltilerinin enjekte edildiği bir metod geliştirilmiş ve bu non-invazif metod ile bütünlüğü bozulmamış bitkilerde stoma hareketleri gözlemlenmiştir. Buna ek olarak, bütünlüğü bozulmamış bitki yapraklarında tek bekçi hücrelerinin iyon kanal aktivitesi hücre içi çift uçlu mikroelektrotlar kullanılarak incelenmiştir. Ayrıca bekçi hücrelerinde nano-infüzyon tekniği ve mikro-elektrot tekniklerinin (voltaj-kenetleme) kombinasyonu kullanılarak elisitörlerin potasyum ve anyon kanalları üzerine etkileri incelenmiştir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI

Dünya nüfusu hızla artmaktadır ve bu nedenle tarım alanlarının mümkün olduğunca verimli kullanılması oldukça önem taşımaktadır [Orke vd., 1994]. Bitkiler doğal yaşam alanlarında büyüme, gelişme ve ürün verimini etkileyen birçok biyotik ve abiyotik stres faktörlerine maruz kalırlar [Xiong vd.,2002]. Evrimsel süreçte bitkiler bu stres koşullarına karşı güçlü stratejiler geliştirmek zorundadır. Yaşamları boyunca bitkiler birçok patojenik mikroorganizma ile karşı karşıya gelirler. Bitkilerin bağışıklık mekanizmalarını anlamak toplumlar için büyük önem taşımaktadır [Orke, 1994]. Bitkiler çevresel strese maruz kaldığı zaman stomaların kapanması ve stresle ilgili birçok genin ifadesinin uyarılmasına neden olur.

2.1. İYONLARIN ZAR ENGELİNDEN GEÇEREK TAŞINMASI

Bitki hücreleri, sadece iki lipid (yağ) molekülü kalınlığında olan plazma zarı ile dış çevrelerinden ayrılırlar. Bu ince zar oldukça kararlı olan iç ortamı oldukça değişken olan çevreden ayırır. Plazma zarı hücrenin çevresiyle temasını sağladığından fiziksel çevre ile ilgili bilgileri, diğer hücreler ile ilgili moleküler sinyalleri ve patojen saldırılarıyla ilgili bilgileri iletir. Bu sinyal iletimi ile ilgili işlemler zardan iyon akımı ile düzenlenir [Türkan, 2008, Hedrich, 2012].

Bir bölgeden diğer bir bölgeye olan moleküler ve iyonik hareket “taşınma” olarak adlandırılır. Molekül ve iyonların hücreye girişi veya hücre içindeki taşınmaları esas olarak zarlarla düzenlenir. Bir zarın madde hareketine izin verme derecesi “zar geçirgenliği” olarak tanımlanır. Tuzlar zarda difüzyon yaptıklarında elektriki zar potansiyeli (voltaj) oluşabilir. K^+ ve Cl^- iyonları zardan kendi elektrokimyasal potansiyel farklarına göre geçeceklerdir. Zar potansiyelinin asıl belirleyicisi proton taşınmasıdır. Bitki hücrelerinde zar potansiyelinin iki bileşeni vardır: difüzyon potansiyeli ve elektrojenik iyon taşınmasından gelen bileşen (zar potansiyelinin meydana getirdiği taşınma). Hücrede H^+ 'ların dışarıya doğru taşınımı, K^+ 'ların hücre içine pasif difüzyonla girmesi için itici kuvvet oluşturabilir. Hidrojen iyonlarının plazma zarından elektrojenik olarak taşınması, sadece bitkilerde değil, bakteri, alg, fungus ve böbrek epitel hücrelerindedir gerçekleşir [Spanswick, 1981, Türkan, 2008].

Kasyon ve anyonların zarıdan farklı hızlarda pasif olarak hareket etmesi sırasında oluşan elektrik potansiyeline difüzyon potansiyeli denir. Herbir iyon için zarın her iki yanında oluşan voltaj farkı ile iyonların eşit dağılımı arasındaki ilişki “Nernst eşitliği” ile açıklanabilir. Nernst eşitliği iki bölme arasında iyon konsantrasyonundaki farkın bölmeler arasındaki voltaj farkı ile dengelendiğini göstermektedir. Voltaj farkı yada zar potansiyeli, iyonların hücre içinde ve dışında asimetrik dağılımı nedeniyle tüm canlı hücrelerde görülür [Hille, 1940, Nernst, 1988].

$E_K = K^+$ iyonları için denge potansiyeli

R= Evrensel gaz sabiti

T= Sıcaklık

F= Faraday sabiti=1 mol protonun elektrik yüküne eşittir

\log_{10} = logaritma 10 tabanına göre

$[K]_o$ = Potasyumun dış ortamdaki konsantrasyonu

$[K]_i$ = Potasyumun iç ortamdaki konsantrasyonu

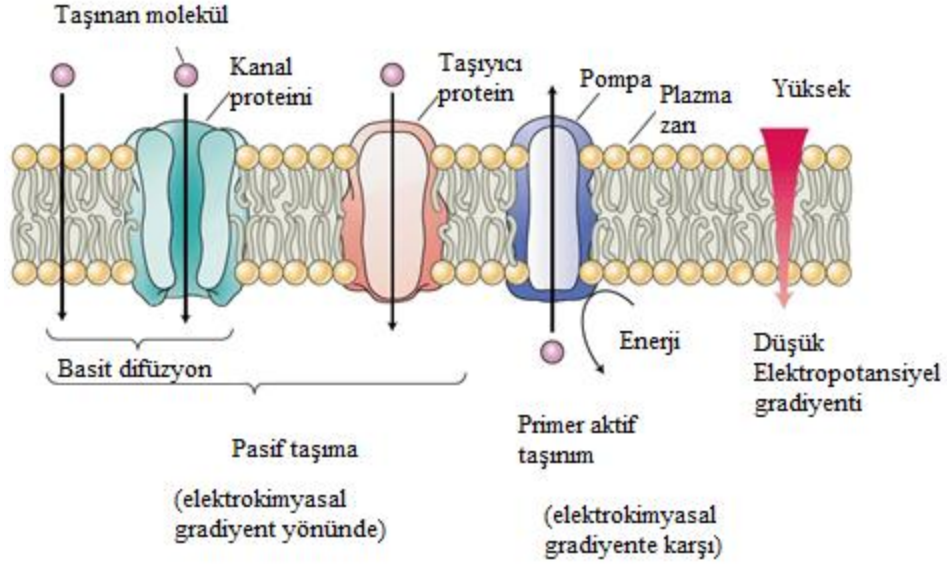
Potasyum iyonları için denge potansiyeli sabiti aşağıdaki formülle verilmiştir [Hille, 1940, Nernst, 1988].

$$E_K = \frac{RT}{F} \ln \frac{[K]_o}{[K]_i} = 2.303 \frac{RT}{F} \log_{10} \frac{[K]_o}{[K]_i}$$

Bir hücre zarında aynı anda difüzyon yapan farklı iyonların elektriksel yükleri “Goldman” eşitliği ile özetlenebilir [Goldman, 1943]. Aktif taşınımında görev alan ve net yük (şarj) oluşturan elektrojenik pompalar, zar potansiyelinin difüzyon ile oluşturulan değerlerini değiştirebilir [Goldman, 1943, Türkan, 2008].

2.1.1. Zar Taşıma Sistemleri

Biyolojik zarlar seçilmiş iyonları ve diğer polar moleküllerin geçişini kolaylaştıran “taşıyıcı proteinleri” bulundurmaktadır (Şekil 2.1). Taşıyıcı proteinler, taşıdıkları çözünenlere karşı özgüllük gösterirler, bu yüzden hücrelerde büyük çeşitlilik sergilerler. *Arabidopsis*'in 849 geni veya tüm genlerinin %4.8'i zarlardan madde taşınmasında görev alan proteinleri şifreler [Türkan, 2008].



Şekil 2.1. Zar taşıma proteinleri [Türkan, 2008].

Zarlarda çözünen hareketini arttıran üç tip membran taşıyıcısı vardır: *kanallar*, *taşıyıcılar* ve *pompalar* (Şekil 2.1). Kanallar ve taşıyıcılar zar da elektrokimyasal potansiyel derecesinin azalması yönünde çözünmüş maddelerin pasif taşınmasını düzenleyebilirler (pasif difüzyon veya kolaylaştırılmış difüzyon). Kanal proteinleri zar porları olarak davranır ve özgüllükleri esas olarak kanalın fiziksel özellikleri tarafından belirlenir. Taşıyıcı proteinler zarın bir tarafından taşınacak moleküle bağlanır ve onu zarın diğer tarafına bırakırlar. Primer aktif taşıma pompalarla dışarıya taşınımıdır. Primer aktif taşımada çözünmüş maddeler genellikle ATP hidrolizinde elde edilen enerji kullanılarak elektrokimyasal potansiyel gradiyentine karşı pompalanırlar [Taiz and Zeiger, 2010].

2.1.1.1. İyon kanalları

Kanallar, zar da molekül ve iyonların difüzyon yapabildikleri seçici delik gibi iş gören zar proteinleridir. Porların boyutları ve iç yüzeylerindeki yük yoğunluğu onların taşıma özgüllüğünü belirler. Kanalla taşınım iyonlar ve suyla sınırlıdır. İyon kanalları tek tek “patch clamp” elektrofizyolojik tekniği ile detaylı olarak çalışılabilir. Bu teknikte, iyonların bir kanaldan geçerken taşıdıkları elektrik akımı tespit edilebilir. Patch clamp (parça çıkarma) tekniği ile yapılan çalışmalar; potasyum gibi bir iyon için, zarın farklı türden kanallara sahip olduğunu göstermiştir. Bu

kanallar, voltaj değişikliklerine, K^+ ve Ca^{+2} konsantrasyonlarına, pH, protein kinaz ve fosfolipaz gibi farklı sinyallere yanıt olarak açılabilir. Bu özgülük, her bir iyonun taşınımının hakim olan koşullara göre incelikle düzenlenmesine olanak sağlar. Dolayısıyla bir zarın iyon geçirgenliği, belirli bir zamanda açık olan tüm iyon kanallarına bağlı olarak farklılık gösterir [Türkan, 2008].

İyon kanal genleri

Taşıyıcı genlerin tanımlanması, izolasyonu ve klonlanması taşıyıcı proteinlerin moleküler özelliklerinin açıklanmasına çok yardımcı olmuştur. Genetik çalışmalar için ideal, küçük bir *Crucifer* olan *Arabidopsis* ve mutantları kullanılmıştır. Bitkideki taşıyıcı genlerin şuanki tablosu, bitki genomunda herbir taşınma işlevi için bireysel genlerden ziyade gen gruplarının bulunduğunu göstermektedir. Taşıma genlerinin tanımlanmasında bitki cDNA (tamamlayıcı DNA) kütüphanelerinin mayalarla karşılaştırılması ile tanımlamalar yapılmıştır.

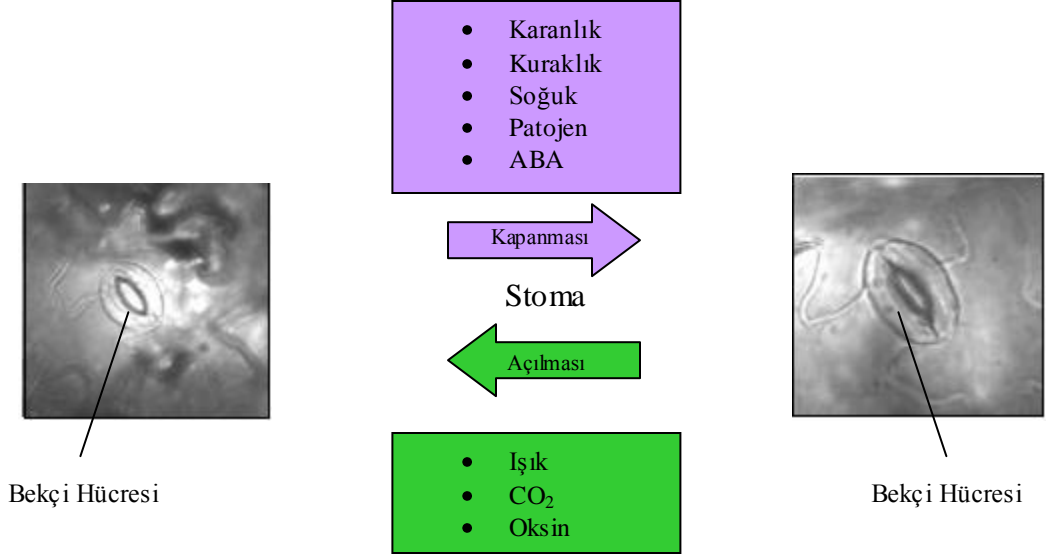
Araştırmacılar kanal proteinlerinin davranışlarını, kara kurbağasının (*Xenopus*) oositlerinde ifade edilen genleri kullanarak çalışmışlardır. Bu kurbağalar büyüklükleri nedeniyle elektrofizyolojik çalışmalar için uygundur. İçe-dışa doğru yönlendirici K^+ kanalları için bu genler bu yolla klonlanmış ve incelenmiştir. Şuana kadar tanımlanmış, içe doğru yönlendirici K^+ kanal genlerinden biri stoma bekçi hücrelerinde, diğeri köklerde ve üçüncüsü ise yapraklarda kuvvetle ifade edilmektedir .

Genetik çalışmalar pek çok geni ve bu genlerin kodladığı bitkilerde çok yönlü taşınımından sorumlu taşıyıcı proteinleri ortaya çıkarmıştır. Patch clamp, iki elektrot elektrofizyolojisi (Two-Electrode Voltage Clamp (TEVC) , impalement) iyon kanalları ile ilgili eşsiz bilgiler vermekte ve geçirgenliğin ölçülmesini sağlamaktadır [Türkan, 2008].

2.2. STOMA BEKÇİ HÜCRELERİNİN İŞLEVİ VE SİNYAL MEKANİZMASI

Stomalar bitki ve çevre ile gaz alışverişine imkan veren yaprak yüzeyinde bulunan küçük gözeneklerdir. Stomalar bekçi hücreleri olarak adlandırılan özel bir

çift epidermis hücrelerinden oluşur. Stomalar fotosentezde CO₂' in alınımı için önemli bir rol oynar, fakat aynı zamanda terleme ile su kaybına da olanak verir. Bitkiler sadece ışık, nem, CO₂ gibi çeşitli çevresel faktörlere ve ABA gibi hormonlara yanıt vermezler, aynı zamanda patojenlere yanıt olarak da stoma açıklıklarını ayarlayabilirler (Şekil 2.) [Bartnicki-Garcia, 1968, Blatt, 1988, Blume vd., 2000].



Şekil 2.2. Mikroskop altında bakıldığında yaprak yüzeyinde (epidermis) stoma açıklığının görüntüsü. Merkezi stoma açıklığı bir çift bekçi hücreleri ile çevrelenmiştir. Çevresel koşullara bağlı olarak stomalar ya açılabilir (sağ) veya kapanabilir (sol). (http://en.wikipedia.org/wiki/Guard_cell).

Bekçi hücreleri sadece abiyotik sinyalleri algılamazlar, aynı zamanda bitkilerin mikroorganizmalara yanıt verme yeteneğini artırırlar. Birçok çalışma, savunma yanıtları sırasında stomaların kapandığını rapor etmiştir. Bununla birlikte bu yanıtın altında yatan mekanizmalar henüz aydınlatılmamıştır [Boller ve Felix, 2009, Boudsocq vd., 2010].

Bekçi hücreleri izole olarak çalıştığı için "patch-clamp" ölçümlerinde ilk tercih edilen sistemler olarak temsil edildi. Stoma bekçi hücreleri, iyon alımına bağlı olarak hacimlerini düzenleyerek yaprakların su kaybını kontrol eder. Stoma hareketliliğinin düzenlenmesi ve iyon kanallarının fonksiyonları hakkında iki tür çalışma yapılmaktadır: bunlardan biri tek bekçi hücreleri ile yapılan elektrofizyolojik çalışmalar (patch-clamp, implament, voltage-clamp) ve mutantlarla yapılan stoma

performanslarıdır [Hedrich, 2012]. Bekçi hücrelerinde yapılan çalışmalarda çok çeşitli mutantlar (*aba1*, *ost1*, *ost2* ve *abi1*) kullanılmıştır [Merlot, 2007, Mustilli vd., 2002, Xie vd., 2006]. Stoma kapanma yeteneği bozulan bitkiler mutasyona uğramış tohumların populasyonundan belirlenebilirler. Bu açık stoma fenotipleri infrared kameralar kullanılarak oldukça kolay tespit edilebilir çünkü, bu mutantlar yüksek transpirasyondan dolayı yabancı tiplere göre daha soğuktur [Mustilli vd., 2002, Wang vd., 2004]. Açık stoma mutantlarının avantajlarından faydalanılarak bekçi-hücre iyon kanalları, bekçi-hücre spesifik sinyalleri ve sinyal yolları analiz edilmiştir [Hedrich, 2012].

2.2.1.Sinyal Elemanları

- a) ABA sentezi: *aba2* ve *aba3* olarak tanımlanan ilk solma mutantlarının su stres hormonu ABA'nın sentezindeki kusurlar ile ilgili olabileceği gösterilmiştir [Koorneef vd., 1982,1984]. Toprak kuruluğu veya bağıl nemdeki düşüş ABA sentezini tetikler [Sharp ve LeNoble, 2002, Wilkinson ve Davies, 2010]. ABA bekçi hücreleri tarafından algılandığında potasyum tuzları serbest bırakılır ve su kaybına neden olur, bekçi hücre hacminin azalmasından dolayı stoma kapanması meydana gelir [Raschke,1988]. Sonuç olarak transpirasyonel su kaybı sona erer [Hedrich, 2012].
- b) ABI protein fosfataz: Gen ifadesi aracılığı ile ABA, bitki gelişimini kontrol eder. Bu durum hem uzun vadede çevresel değişimlere stomaların adaptasyon performanslarını hemde sinyal gücünde ani değişimlere hızlı stoma hareketini gösterir. *abi1* ve *abi2* stoma kapanmasının ciddi bir şekilde bozulduğu ABA-duyarsız mutantlardır [Hedrich, 2012].
- c) OST1 (Open Stomata1) Protein Kinaz: Açık stoma mutantı *ost1* SnRK-tip (OST1/SnRK2.6/SnRK2E) protein kinazdan yoksundur [Assmann, 2003, Mustilli vd., 2002].
- d) ABA reseptörü: ABA reseptörü iki yaklaşım ile keşfedilmiştir; bunlardan birincisi, ABI1 ile ilişkili proteinler için tarama [Ma vd., 2009] ve ikincisi ise kimyasal genetik taramadır [Park vd., 2009]. PYR/RCAR-PP2C kompleks oluşumu PP2C'nin [Cutler vd., 2010, Joshi-Saha vd., 2011] aktivitesinin

inhibisyonuna yol açar, böylece S_nRK2s 'ların [Fujii vd.,2009] aktivasyonuna izin verir.

2.2.2. Stoma Hareketleri

Stomaların açılma ve kapanması çarpıcı bir şekilde gazların içeri girişi veya salınımı için bir direnç oluşturabilir. Fakat bu gözeneklerin seçiciliğinde herhangi bir değişiklik yapmaz. Çevredeki değişimlere yanıt olarak stoma açıklığındaki değişim ile bitkiler karbon alınımları ve su kaybını (etkin su kullanımı) optimize edebilirler [Hedrich, 2012].

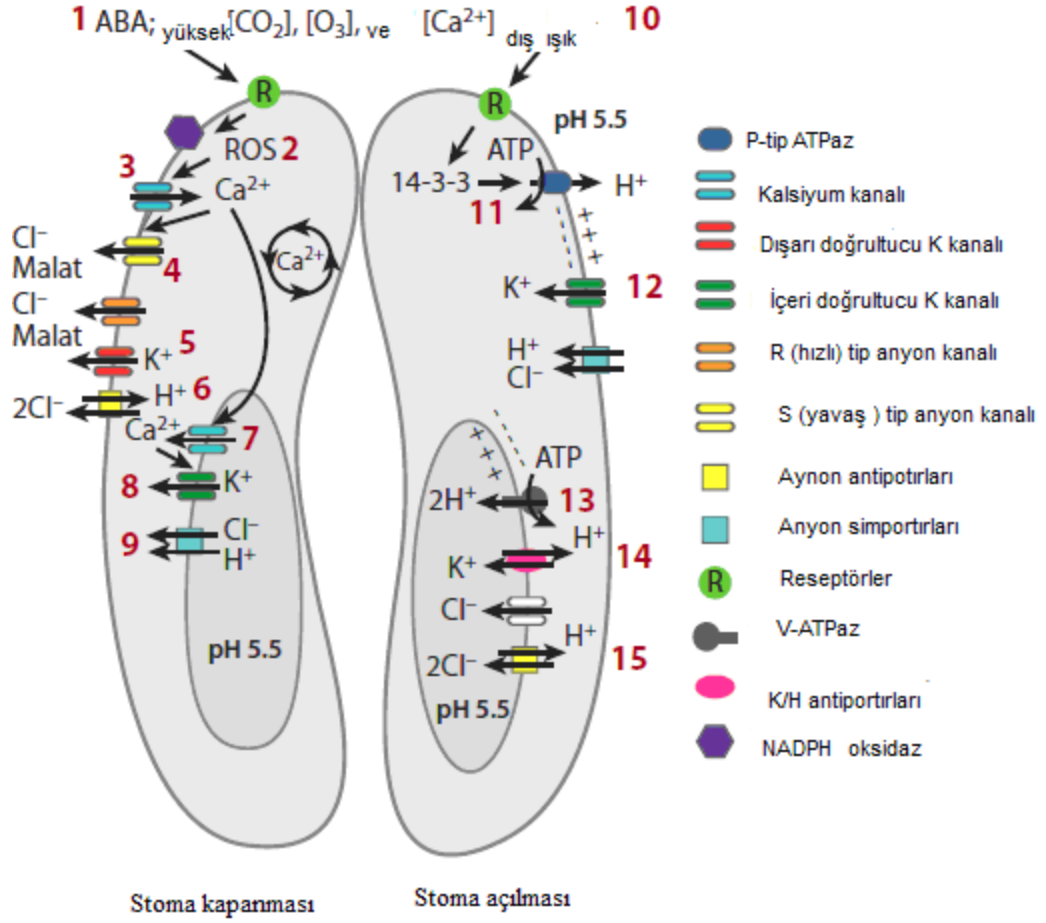
2.2.2.1. Stoma açılması

Stoma açılmasını tetikleyen iki tip sinyal vardır:1) güneş ışığı yoğunluğu ve spektral yoğunluk 2) yaprak içinde CO_2 'i tutan hücrelerin fotosentetik aygıtının durumu. Bekçi hücreleri bağımsız bir şekilde mavi ve kırmızı ışığı algılar. Mavi ışıktaki değişimler bekçi hücrelerinde bir çift fitotropin tarafından doğrudan algılanır [Kinoshita vd., 2001]. Gece ve gündüz arasında meydana gelen kırmızı ışık yoğunluğundaki dalgalanmalar yapraklarda CO_2 fiksasyonunu doğrudan etkiler. Şekil 2.3.'te görüldüğü üzere; düşük CO_2 seviyesi stoma açılmasını tetikler. Mavi ışık, fitotropinleri (reseptör/ kinazlar) aktifleştirir ve bu durum stoma açılmasına yol açar (10). Plazma zarı proton pompalarına bağlanır (11), bu durum hiperpolarizasyona ve hücre dışı ortamın asitleşmesine yol açar. Hiperpolarizasyon içe-doğru düzenlenmiş K^+ kanallarını (12) harekete geçirir. Vakuolar zarda, proton pompaları (13) vakuol lümenini asitleştirir ve K^+/H^+ antiportörlerini harekete geçirir (14). Cl^- ve malat anyon kanalları ve anyon antiportörleri aracılığıyla vakuollerde biriktirebilir (15) [Ward vd. 2009]. Böylelikle stoma açılması sağlanmış olur (Şekil 2.3).

2.2.2.2. Stoma kapanması

İyon hareketleri açısından stoma kapanması, stoma porunun açılması sırasındaki işlemlerin tersi olarak meydana gelir. Bu bağlamda, aydınlık-karanlık

geçışı ve hücre içi CO_2 konsantrasyonundaki artış kapanma sinyalleridir. "Fotosentez yoksa niçin su kaybı olsun" stratejisini takiben, bekçi hücre çiftlerinin büzülmesi stoma kapanmasına neden olur. Toprak kuruluğu sırasında, ulaşılabilir sınırlı su durumu stres hormonu ABA aracılığıyla bekçi hücrelerine bildirilir [Hedrich, 2012, Sharp ve Lenoble, 2002, Wilkinson ve Davies, 2010].



Şekil 2.3: Stoma hareketliliği sırasında iyon kanalları ve taşıyıcıların model gösterimi [Ward vd., 2009].

Şekil 2.3'te görüldüğü gibi; ABA, yüksek $[\text{CO}_2]$, yüksek hücre dışı $[\text{CO}_2]$, ve ozon $[\text{O}_3]$ stoma kapanmasını uyaran sinyallerdir. İlk olarak sinyaller reseptörler tarafından algılanır (1). Stomalar özellikle K^+ , Cl^- ve malat gibi çözünenlerin hücre dışına net akışıyla kapanır. ABA Reaktif Oksijen Türlerini (ROS) üretir (2), ve bu da Ca^{2+} -geçirgen iyon kanallarını (I_{Ca} kanalları) aktifleştirir (3). Sitoplazmik Ca^{2+} konsantrasyonu ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{syt}}$) bekçi hücrelerinin taşıma mekanizmalarının merkezi

düzenleyicileridir ve yavaş tip (S-tip) anyon kanallarını (4), yavaş vakuolar SV (Slow Vacuolar) (TPC) kanalları (7) ve vakuolar potasyum kanallarını (VK=Vacuolar K⁺) (TPK=Two Pore K⁺ Channel) (8) aktifleştirir. Cl⁻ ve malat S-tip ve R- tip anyon kanallarından dışarıya doğru geçer ve olası Cl⁻/H⁺ antiportörleri (6) depolarizasyona neden olur. Dışa doğru-Düzenlenmiş K⁺ -seçici kanallarından K⁺ dışarı doğru akar (5). Vakuol membranında, SV (TPC1) kanallar (7) Ca²⁺-geçirgen voltaj-bağımlı kanalları ve Ca²⁺-u- aktifleştirir. VK (TPK) kanallar (8) Ca²⁺ tarafından aktive edilir ve K⁺ için oldukça seçicidir ve stoma kapanması sırasında K⁺'un salınımı için önerilmiştir. Böylelikle stoma kapanması sağlanmış olur (Şekil 2.3) [Ward vd., 2009].

2.2.2.3. ABA sinyali

ABA sitoplazmada bulunan Pyr/Pyl/RCAR adlı bir reseptör tarafından (R_{ABA} olarak adlandırılır) tanınır [Ma vd., 2009, Park vd., 2009, Joshi-Saha vd., 2011]. Bekçi hücreleri, kök ve yapraklarından alınan sinyal yoğunluğundaki değişiklikleri tanıyabilir fakat ABA plazma zarını geçmek ve bekçi hücre reseptörü R_{ABA} ile buluşmak zorundadır [Kang vd., 2010, Kuromori vd., 2010]. Mikroelektrot (impalament) çalışmalarında, dışarıdan hormon uygulamasının bu süreci geçiktirdiği, ABA'in sitoplazmik uygulamasının bekçi hücre anyon kanallarını geçikmeden aktifleştirdiği belirlenmiştir [Hedrich. 2012].

2.3. STOMA BEKÇİ HÜCRELERİNDE İYON TAŞINIMI

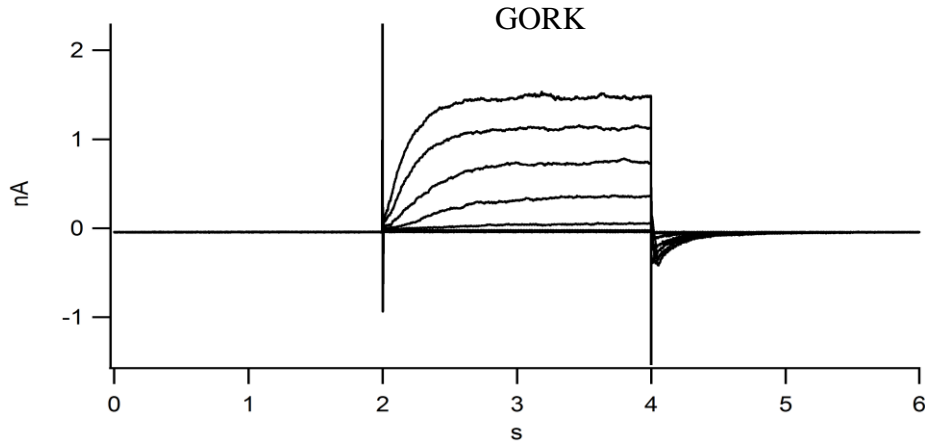
2.3.1. Bekçi Hücre Plazma Zarından K⁺ Taşınımı

Potasyum, stoma hareketliliği için gerekli olan osmotik bir elementtir. Stomanın hareketi bekçi hücreleri ve apoplast arasında K⁺'un hızlı dağılımına bağlıdır. Bekçi hücrelerinde K⁺'un içeri ve dışarı taşınımı için ana yol plazma membranında bulunan iyon seçici kanallardır. K⁺ bekçi hücreleri plazma zarından üç grup kanal ile taşınır [Geiger vd. 2010]. Bunlar :

- Dışa doğru-Düzenlenmiş (Dışarı doğrultucu) K^+ -seçici kanalları
- İçeriye doğru-Düzenlenmiş (İçeriye doğrultucu) K^+ -seçici kanalları
- Seçici olmayan voltaj-bağımsız iyon kanallarıdır.

2.3.1.1. Dışa doğru-düzenlenmiş K^+ -seçici kanalları (K^+ dışarı)

Stoma kapanması esnasında bekçi hücrelerinden potasyum kaybı plazma zarında Dışa doğru-düzenlenmiş K^+ -seçici kanalları (K^+ dışarı) aracılığıyla gerçekleşir. Dışa doğru-düzenlenmiş K^+ -seçici kanallarının en karakteristik özelliği voltaj bağımlı olmalarıdır. Voltaj-kenetleme deneyleri ile -100mV dinlenme potansiyelinden daha depolarize (örneğin 0 mV) değere kademeli olarak çıkmak K^+ dışarı akımının sigmodial kinetiğine neden olur ve voltaj uyguladıktan sonra yaklaşık 1-2 sn yeterlidir [Geiger vd., 2009]. Dışa doğru-Düzenlenmiş K^+ -seçici kanallarını aktive edecek eşik fizyolojik koşullar yaklaşık olarak -60mV olarak belirlenmiştir [Gomez-Gomez ve Boller 2000].



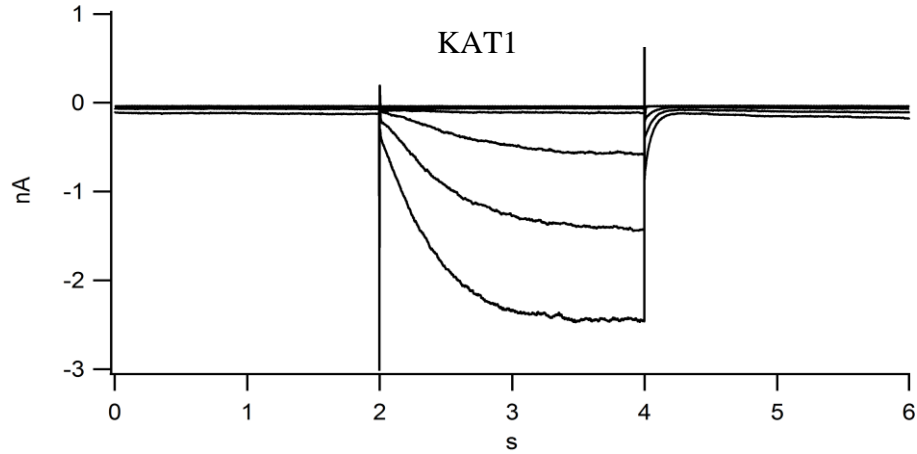
Şekil 2.4. Dışadoğru-Düzenlenmiş K^+ -seçici kanallarının kinetiği

Arabidopsis bitkisinin bekçi hücre plazma zarında bulunan Dışadoğru-Düzenlenmiş K^+ -seçici kanalları *GORK* (İng. Guar Cell Outward Rectifier K⁺) olarak adlandırılan tek bir gen tarafından kodlanır. Bu gen R. Hedrich'in grubu tarafından klonlanmıştır [Hedrich ve Marten, 1993]. Zar depolarizasyonu üzerinde yapılan çalışmalarda patch pipetleri kullanılarak bugüne kadar çalışılan bütün hücre tiplerinde

Dışadoğru-Düzenlenmiş K^+ -seçici kanal akımları izlenmiştir. Elde edilen bulgulara göre GORK geninin bekçi hücre dışarıya doğrultucu K^+ -seçici kanallarını kodladığı gösterilmiştir [Hedrich, 2012, Hedrich vd.,1995].

2.3.1.2. İçeriye doğru-Düzenlenmiş K^+ -seçici kanalları (K^+ içeri)

K^+ iyonlarının alınımı stomaların açılması için gereklidir. Bu durum bekçi hücresi plazma zarındaki İçeriye doğru-düzenlenmiş K^+ -seçici kanalları (K^+ içeri) aracılığıyla gerçekleşmektedir. İçeriye doğru-Düzenlenmiş K^+ -seçici kanalları ancak plazma zarının hiperpolarizasyona ulaşması ile aktif hale gelir (-100mV'dan daha negatif) [Gomez-Gomez ve Boller, 2000, Gudesblat, 2009]. İçeriye doğru-düzenlenmiş K^+ -seçici kanalları K^+ dışarı kanalları ile karşılaştırıldığında tek değerlikli katyonların çeşitliliğinde oldukça seçici olduğu belirlenmiştir [Hedrich vd., 1990].



Şekil 2.5. İçedoğru-Düzenlenmiş K^+ -seçici kanallarının kinetiği

İçeriye doğru-düzenlenmiş K^+ -seçici kanalları yüksek bitkilerde klonlanmış ilk iyon kanal örneğidir. *KATI* [Anderson vd., 1992] ve *AKTI* [Sentenac vd., 1992] neredeyse aynı zamanda klonlanmış *Arabidopsis*'in İçeriye doğru-düzenlenmiş K^+ -seçici kanallarıdır. Hayvanlar aleminin Voltaj-bağımlı K^+ -seçici kanallarının bir grubuyla yapısal benzerlik gösterdiğinden dolayı bu kanallar "Sahaker-like" kanallar olarak adlandırılır [Geiger,2010].

2.3.2. Bekçi hücre Plazma Zarından Anyon Taşınımı

Stoma kapanmasına önderlik eden merkezi mekanizma bekçi hücrelerinden apoplasta anyonların salınımıdır [Koncz ve Schell 1986, Koers vd., 2011]. Anyonların içeriye doğru akışı elektronötral bir işlemdir, çünkü K^+ 'un salınımı ile paralel bir şekilde gerçekleşir. Plazma zar anyon kanalları aracılığıyla bekçi hücrelerinden anyonların pasif salınımı küçük anyonların herbiri için seçici olarak karakterize edilir [Kuchitsu vd., 1997, Langer vd., 2004]. Bekçi hücre protoplastında patch-clamp kayıtlarıyla yapılan ilk çalışmalar, bitki plazma zarında en az iki tip anyon kanalının olduğunu göstermiştir [Schroeder ve Keller, 1992, Schroeder and Hagiwara, 1989]. Bu iki tip kanal farmakolojik özellikleri ve akım-voltaj karakteristikleriyle farklı özellikler sergilerler [Lecourieux vd.,2005]. Bu kanallar, voltaj-bağımlı aktivasyon ve deaktivasyon hızındaki farklılıklara göre hızlı R-tip ve yavaş S-tip olarak ifade edilir. Kanallar ya yavaş (S-tip) voltaj-bağımsız veya hızlı (R-tip) voltaj-bağımlı aktivasyon ve deaktivasyon kinetiği gösterir. R ve S-tip anyon kanallarının her ikisi de negatif membran potansiyellerinde ($V_m < -150$ mV) aktivitenin en düşük derecesini gösterir, ancak plazma zarı daha pozitif (depolarize) olduğunda aktif hale gelir. R-tip kanal aktivasyon hızı S-tip kanalların aktivasyonundan yaklaşık olarak 1000 kat daha hızlıdır (5-50ms R-tip için, 5-50s S-tip için) [Linder ve Raschke, 1992, Kolb vd., 1995].

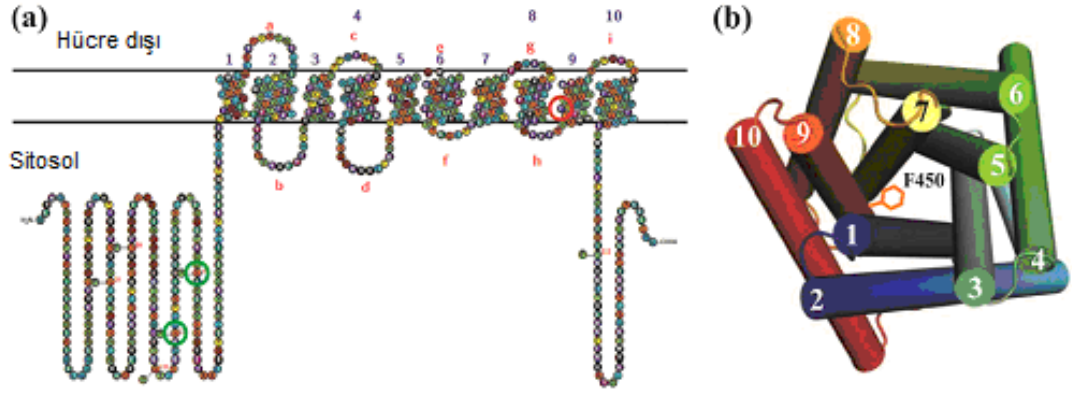
2.3.2.1. R-tip ve alüminyum ile aktive edici anyon kanalları

R-tip anyon kanalları iki değerlikli anyonları da içeren geniş çeşitlilikte anyonların geçişine göre ayarlanır [Dietrich ve Hedrich, 1998, Diatloff vd., 2004]. Bekçi hücrelerinde malat'a R-tipi anyon kanallarının özel bir duyarlılığı olduğu gözlenmiştir ve malat taşınımı ve malat-bağımlı CO_2 algılanmasında R-tip anyon kanalının rolü olduğu bildirilmiştir [Hedrich ve Marten, 1993, Hedrich vd., 1995]. Malat'ın güçlü etkisiyle uyumlu olarak, son yıllardaki çalışmalar R-tip anyon kanallarının alüminyum aktive edici-malat taşınımı (ALMTs= Alimunium-activated malate transporters) ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Bir ALMT geninin kaybı bekçi hücrelerinde R tipi anyon akımlarında bir azalmaya yol açar ve uyaran-bağlı stoma

kapanmasını yavaşlatır [Meyer vd., 2010, Sasaki vd., 2010]. Bununla birlikte, bekçi hücreleri alimunyuma duyarlı değildir ve orjinal adı *AtALMT12* yanlış anlaşılmalara yol açabilir. Bu nedenle bekçi hücrelerindeki rolü ve Klaus Rachke [Linder ve Racker, 1992] tarafından önerilen terminolojiye uygun olarak isminin hızlı anyon kanalı olarak değiştirilmesi (QUAC1= quick anion channel 1) önerilmiştir [Meyer vd., 2010]. R-tip kanalların üç-boyutlu yapısının eksikliği nedeniyle özelliklerini açıklamak oldukça zordur [Motoda vd., 2007].

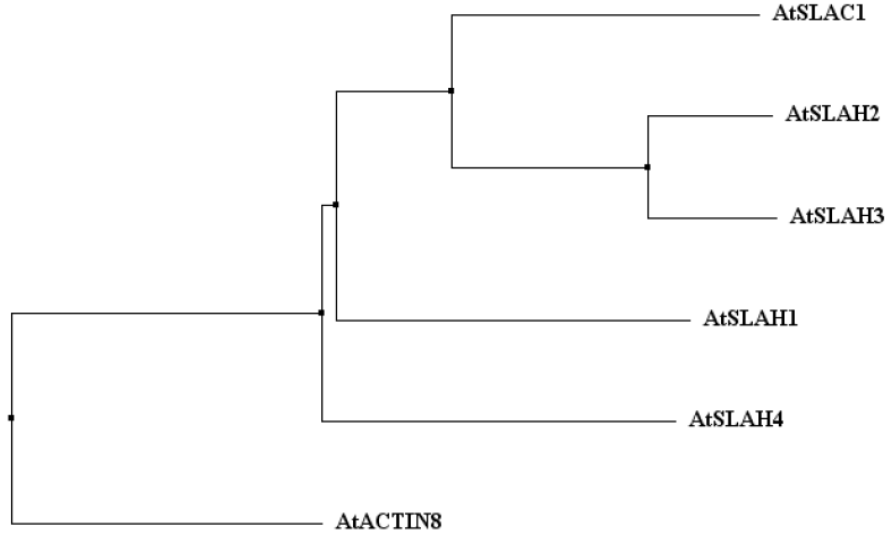
2.3.2.2. S-tip anyon kanalları

S-tip (İng. Slow=yavaş) anyon kanalları birçok alemde bulunan taşıyıcılara homolog olan küçük bir gen ailesi tarafından kodlanır [Negi vd., 2008, Vahisalu vd., 2008, Grobler vd., 1995, Chen vd., 2010]. SLAC1 (Slow Anion Channel 1), S-tip anyon kanallarını kodlayan ilk genidir ve sinyal bağımlı stoma kapanması eksik *Arabidopsis* mutantlarında belirlenmiştir [Negi vd., 2008, Vahisalu vd., 2008]. Stomalarda SLAC1 eksikliği sonucunda yüksek CO₂ ve düşük nem koşullarına yanıt olarak stomaların kapanmadığı, buna karşın karanlıkta çok yavaş kapandığı gözlenmiştir [Geiger vd., 2009, Lee vd., 2009, Geiger vd., 2010]. SLAC1 tercihen klorit ve nitratla ilişkilidir, buna karşın malat için iletkenliği ihmal edilebilir [Chen vd., 2010, Geiger vd., 2009]. SLAC1'in aksine SLAC1 homolog 3 (SLAH3) kanalı nitrat için en yüksek geçirgenliğe sahiptir; SLAH3 aynı zamanda hücre dışı nitratın etkinliğini uyararak için de gereklidir [Geiger vd., 2011]. Bekçi hücrelerinde bulunan, SLAC1 ve SLAH3'ün her ikisinin de birlikte stoma kapanması sırasında klorür ve nitratın salınımına katkıda bulunduğu düşünülmektedir [Roelfsema vd., 2012]. Son yıllarda, SLAC/SLAH kanallarının üç boyutlu yapısı, *Haemophilus influenzae* TehA (HiTehA) protein ile homolojilerine dayalı olarak modellenmiştir (Şekil 2.6) [Chen vd., 2010].



Şekil 2.6. *AtSLAC1* Anyon kanal modeli [Chen vd., 2010].

SLAC1 Arabidopsis bitkisinde, *SLAC1* ve dört *SLAC1*-homoloğundan (*SLAHs*) oluşan küçük bir gen ailesi ile temsil edilir (Şekil 2.7) [Negi vd., 2008, Vahisalu vd., 2008]. *SLAH3*: bekçi hücrelerinde ifade edilen *SLAH3* ve *SLAC1* arasında mutant fenotiplerini kurtarabilme yeteneğindedir. Bu *SLAC1* homologları, *SLAC1*'e benzer olarak uygun bir taşıma için fosforilasyona bağımlıdır. Ayrıca *SLAH3* belirgin farklılıklar sergiler. Bunlar; 1) Seçicilik: *SLAH3* ağırlıklı olarak nitrat geçirgendir. 2) Çalışma: *SLAH3* sadece nitrat iletken değil, çalışması için 3mM azotlu gübreye de ihtiyaç duyar [Geiger, 2011]. 3) Voltaj-bağımlılığı: *SLAC1*'in akım-voltaj eğrisinin aksine, *SLAH3* hiperpolarize potansiyelerde oldukça inaktiftir ve pozitif voltajlar ile açılır. Yarı aktivasyon eşiği, nitrat konsantrasyonuna bağlıdır. Gelecekte bu iki bekçi hücre anyon kanalının voltaj bağımlılığı ve seçiciliğindeki farklılıklarının yapısal temeli hakkında bilgi almak ilgi çekici olacaktır [Hedrich, 2012].



Şekil 2.7. *Arabidopsis thaliana* SLAC1 protein ailesi ilişkisi [Koers, 2013]

2.4. ANYON KANALLARININ DÜZENLENMESİ

Büyümekte olan hücreler, hücre turgorunu devam ettirmek için osmolitleri biriktirmek durumundadır ve bu nedenle sessiz anyon kanallarına ihtiyaç duyarlar. Aktif anyon kanalları iyon sızıntısına neden olabilir ve böylece iyon alımı sistemleri ile bir akım döngüsü yaratır. Çeşitli uyarıcılar anyon kanallarını etkinleştirir ve turgor kaybına yol açan osmolitlerde hızlı bir azalmaya yol açmaktadır. Anyon kanalının düzenlenmesi altında yatan moleküler mekanizmalar bekçi hücreleri için çok ayrıntılı bir şekilde çalışılmaktadır. Anyon kanal aktivitesini kontrol eden sinyal yolları hücre tiplerine göre önemli farklılıklar gösterse bile, bekçi hücrelerindeki olayların gelecekte bu alandaki çalışmalara rehberlik etmesi olasıdır [Roelfsema vd., 2012].

2.4.1. ABA Tarafından Düzenlenmesi

Kuraklık hormonu olan ABA bekçi hücreleri plazma zarında R- ve S-tip anyon kanallarının her ikisini de aktive edebilir [Roelfsema vd., 2005]. Kuraklık esnasında, bekçi hücrelerinden anyonların dışarı akışı ve potasyumun salınımı stoma kapanmasına neden olur. ABA yanıtında bitkiler aşırı su kaybından kaçınmaya çalışır

ve bu durumda OST1'in merkezi bir rol oynadığı görülmektedir [Mustilli vd, 2002, Yoshida vd., 2002]. OST1 fonksiyonları-eksik mutantlarda, ABA stoma kapanmasını tetikleyemez ve bekçi hücreleri S-tip anyon kanallarının aktivitesi en düşük seviyeye iner [Geiger vd., 2009]. Bu fenotipe paralel olarak OST1'in S-tip anyon kanalı SLAC1'in N-ucunun fosforilasyonu aktifleştirdiği bulunmuştur [Geiger vd., 2009, Lee vd., 2009, Vahisalu vd., 2010]. ABA böylece OST1 aktivasyonu ile koruma-hücre anyon kanallarını uyarabilir [Roelfsema vd., 2012]]. Sitosolik ABA, ABA-duyarsız (ABI) -1 ve ABI2 dahil, 2C ailesinin protein fosfatazları ve PYR/PYL/RCAR (R_{ABA}) gen ailesi üyelerinden oluşan bir protein kompleksine bağlanır [Ma vd., 2009, Park vd., 2009]. Düşük ABA seviyelerinde, ABI1 ve ABI2 OST1'i inhibe eder ve böylece SLAC1 kanallarının aktivasyonu engellenir [Geiger vd., 2009, Lee vd., 2009, Yoshida vd., 2006]. Bununla birlikte, ABA konsantrasyonunda ki artış R_{ABA} ile etkileşim sonucu ABI protein fosfatazları inhibe eder. Bunun bir sonucu olarak, OST1 inhibisyonu sona erer ve SLAC1'i aktive eder. R_{ABA} ve ABI protein fosfatazlar sadece OST1 değil, aynı zamanda çok sayıda kalsiyum-bağımlı protein kinazları (CPKs) düzenler. CPK21 ve CPK23 gibi bu protein ailesinin bazı üyeleri, aynı zamanda SLAC1 kanalını aktive etme yeteneğine sahiptir. Ayrıca, her iki CPKs bekçi hücrelerinde ifade olan ikinci bir plazma zarı anyon kanalı SLAH3'ü de aktifleştirir [Geiger vd., 2011]. SLAH3 sadece CPKs ile uyarılırken, ABA'in OST1 ve CPKs ile doğrudan etkileşimi yolu ile SLAC1'i aktive ettiği görülmektedir [Roelfsema vd., 2012].

2.4.2.Patojenlerle Etkileşimleri

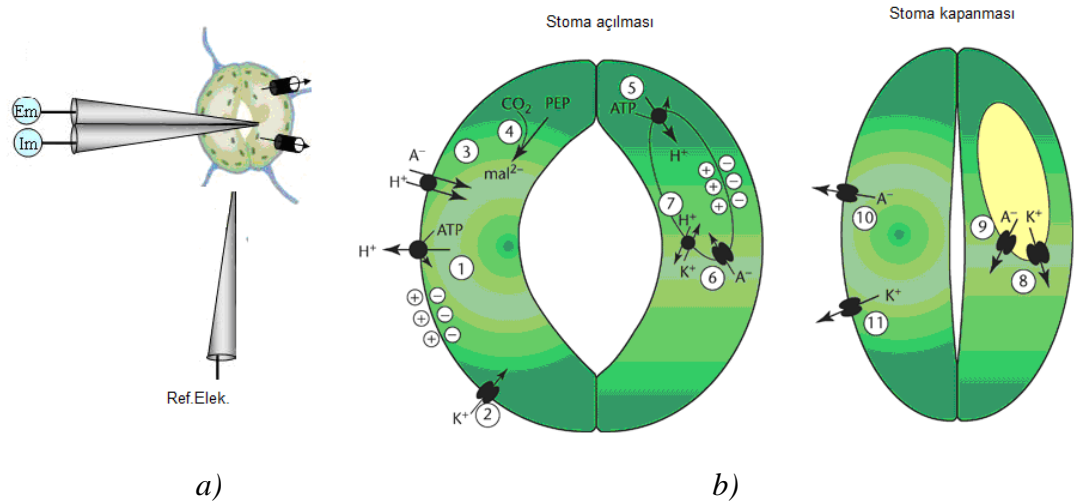
Bitkiler sadece abiyotik stres koşulları ile değil, aynı zamanda patojenik mikroorganizmaların saldırılarıyla da başa çıkmak zorundadır [Jones ve Dangl, 2006, Schulze-Lefert ve Panstruga, 2011]. Bu biyotik stres koşulları doğuştan gelen bağışıklık veya temel direnç uygulanmasına katkıda bulunan, anyon kanallarını içerir [Roelfsema vd., 2012]. Doğal bağışıklık, plazma zarı reseptörleri tarafından mikrop-ilişkili moleküler örüntülerin (MİMÖler) tanınması üzerine uyarılır. MİMÖler'in

sinyali muhtemelen iki reseptör proteini içerir, bunlardan biri MİMÖ'ye bağlanan hücre dışı kısım, diğeri ise MİMÖ'nün bağlanma bölgesini tanıyan aktif kısımdır [Boller ve Felix, 2009, Chinchilla vd., 2007]. Bitki hücreleri P-tipi ATPaz proton pompaları nedeni ile asidik bir ortamda yaşarlar. Bitki hücreleri patojenle karşılaştığında proton pompalarının deaktivasyonu ile hücre dışı daha alkali olur ve patojen için istenmeyen bir durum oluşur [Felle vd., 2004]. Erken sinyal basamakları, konakçı hücrenin depolarizasyonu ve sitosolik kalsiyumun artışı ile ilişkilidir [Jiang vd., 2003]. Depolarize edici iyonik iletkenlik büyük bir olasılıkla bir anyon kanalını ifade eder. Sitolizmik serbest kalsiyum konsantrasyonundaki artıştan dolayı, birçok CPKs MİMÖler tarafından uyarılır [Boudsocq vd., 2010]. MİMÖler tarafından aktive edilen CPKs sadece gen transkripsiyonunu etkilemez, aynı zamanda plazma zarı NADPH oksidazlar aracılığıyla reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretimini tetikler [Boudsocq vd., 2010]. Muhtemelen bu CPKs'den CPK23 ve CPK21, SLAC1 ve SLAH3'ü aktive edebilir [Geiger vd., 2011, Geiger vd., 2009]. Bu varsayım doğrultusunda fungal MİMÖ kitosan arpa (*Hordeum vulgare*) bekçi hücrelerinde S-tipi anyon kanallarının aktivasyonunu tetikler [Koers vd., 2011]. Benzer bir "elisitör - tarafından uyarılan kanal tipi", uzama faktörü Tu nun bir aktif epitopu olan Elf18 ve hasar-ilişkili moleküler örüntüler (DAMP=Damage-Associated Molecular Pattern) peptid1 ve 2 (PEP1 ve PEP2) tarafından tetiklenir [Krol vd., 2010]. Diğer hücre tiplerinin birçoğunda da zar depolarizasyonuna neden olur [Krol vd., 2010, Kuchitsu vd., 1997, Pelissier vd. 1986, Jeworutzki vd., 2010, Felle vd. 2000].

2.5. BÜTÜNLÜĞÜ BOZULMAMIŞ BEKÇİ HÜCRELERİNİN İNCELENMESİ

Roelfsema ve Hedrich'in yaptıkları araştırma makalesinde çevresel sinyallere bitkilerin yanıtlarında bütünlüğü bozulmamış bekçi hücrelerinin yanıtlarının epidermis izolasyonu ve protoplast çalışmalarından farklı olduğu vurgulanmıştır [Roelfsema ve Hedrich, 2002]. Bu farklılıklar aşağıda belirtildiği gibidir;

- Bütünlüğü bozulmamış bekçi hücreleri fiziksel olarak epidermis hücreleri ile bağlantılıdır ve bu durum stoma açılmasının hızını artırmaktadır.
- Bununla birlikte apoplastta normal olarak bulunan maddelerin birçoğu deneysel çözeltilerde eksiktir.
- Muhtemelen iyonların değişimi ışığa bağımlıdır ve epidermis izolasyonunda stoma açılması ışık uygulanarak zorlanmaktadır.
- Apoplasttaki pH ve hormon değişimleri bitki yanıtını etkileyebilir.
- Sonuç olarak, organik maddelerin bütünlüğü bozulmamış yaprak içinde bekçi hücrelerinin düzgün fonksiyon göstermeleri için önemli olabilir [Roelfsema ve Hedrich 2002].



Şekil 2.8. a) Hücre içi kayıt elektrotu ile membran potansiyelinin ölçümü, b) stoma açılması ve kapanması esnasındaki iyon akışı [http://www.uni-wuerzburg.de, M.Rob G. Roelfsema ve Rainer Hedrich].

Yukarıdaki şekilde bütünlüğü bozulmamış bitkilerin bekçi hücrelerinde elektrofizyolojik ölçüm metodunun şematik gösterimi bulunmaktadır. Bekçi hücreleri plazma membran iyon kanallarının aktivitelerinin ölçümü iki-uçlu elektrod ile

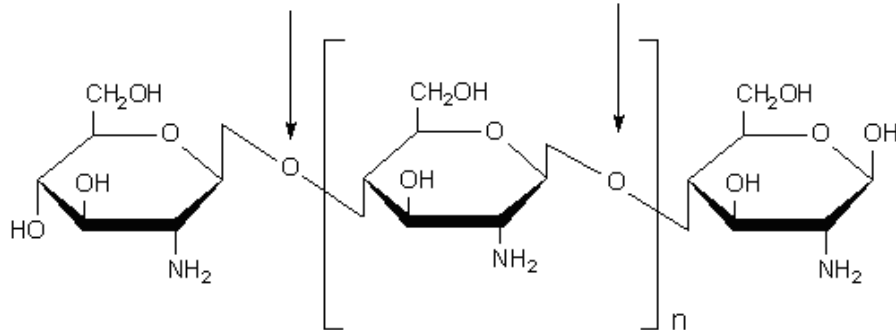
kenetlenerek yapılır. Buna bağlı olarak stomaların açılma- kapanma (b) mekanizmaları elektrofizyolojik olarak ölçülür (Şekil 2.8) [Roelfsema ve Hedrich, 2002].

2.5.1 Voltaj Kenetleme Tekniği

Voltajın, voltaj kapılı kanalların açılışı ve kapanışına etkisini ölçmek için kullanılan bir araştırma yöntemidir. Voltaj-kenetleme tekniği ilk kez Cole tarafından 1949 yılında tanımlanmıştır. 1952 yılında Hodgking, Huxley ve Katz tarafından geliştirilmiştir. Hodgkin ve Huxley voltaj-kenetleme tekniği ile 1963 yılında Nobel Tıp ve Fizyoloji ödülünü almıştır. Hodgkin ve Huxley bu teknik sayesinde voltaj kapılı sodyum ve potasyum kanallarının, zar potansiyelinin farklı değerlerindeki iletkenliklerini saptamışlar ve bu değerlerden de aksiyon potansiyelinin genliğini (voltajı, amplitüdü=genliği) ve zamansal yapısını matematiksel olarak türetebilmiştir [Cole, 1949, Hodgking vd., 1952].

2.6. BİTKİLERİN BAĞIŞIKLIK SİSTEMİ YANITLARI

Yakın zamana kadar, bakterilerin açık stomalar aracılığıyla özgür bir şekilde bakteri saldırısına maruz kaldığı ve stomalara giriş için pasif olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte, Melotto ve arkadaşları *Arabidopsis* bitkisinde canlı bakteriler ve kitosan, flg22 gibi saflaştırılmış Patojen/Mikrob İlişkili Moleküler Örüntülere (P/MİMÖler) yanıt olarak stomaların kapandığı belirlendi [Melotto vd., 2006, Zeng vd., 2010].

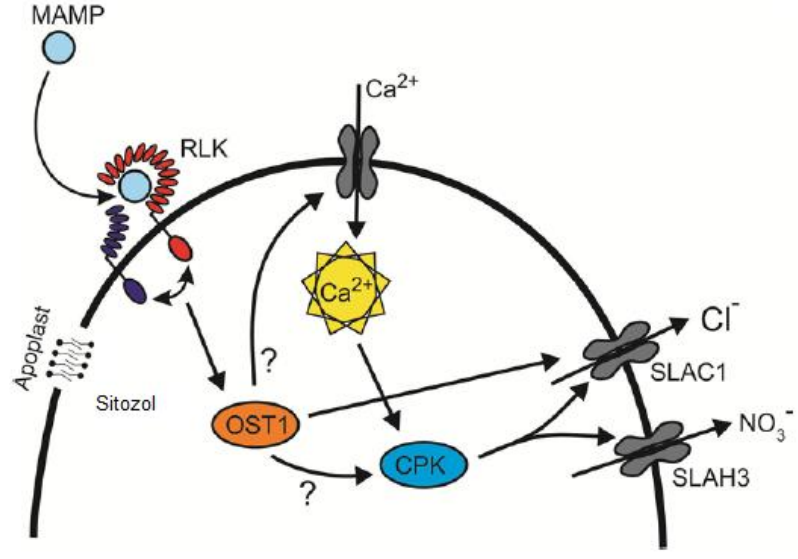


Şekil 2.9. Kitosan'ın kimyasal yapısı (β -1,4 glükozamin bağlantılı polimer). [http://www.sigmaaldrich.com]

Kitosan (β -1,4 glükozamin bağlantılı polimer), pekçok mantar hücre duvarının bileşiminde bulunan kitinin deasetillenmiş bir türevidir (şekil 2.9) [Bartnicki-Garcia, 1968]. MİMÖler den bir diğeri ise FLS2 reseptörü tarafından tanınan 22 aminoasitten oluşan oldukça iyi korunmuş *Pseudomonas*'ın kamçısının epitopu olarak bilinir [Felix vd.,1999].

Bu tez çalışmasında Arpa bitkisinin stoma bekçi hücrelerinde fungal hücre duvar bileşeni olan kitosanın infüzyonu ile stomaların kapanması gösterildi [Koers vd., 2012]. Model bitki olan *Arabidopsis*' te yaptığımız çalışmalarda *Pseudomonas syringae*' nin kamçı proteinlerinin flg22 peptidinin stoma kapanmasını uyardığını gösterdik. *Arabidopsis*'in seçilmiş mutantlarını kullanarak bekçi hücrelerinde ABA ve patojen-uyartılı sinyal yollarının moleküler bileşenlerini incelemeye çalıştık.

Aşağıdaki şekilde (Şekil 2.10) bekçi hücrelerinin MİMÖler'in sinyal zinciri görülmektedir. Hipotetik olarak MİMÖ sinyal yolağının gen ifadesini değiştirdiği ve yavaş tip anyon kanallarını aktive ettiği düşünülmektedir. Bekçi hücreleri MİMÖler'i tanıyabilecek hücre dışı reseptörler ile donatılmıştır. Örnek olarak arpa bitkisinde kitosani ve *Arabidopsis* bitkisinde flg22'yi verebiliriz. MİMÖler Reseptör-Benzeri Kinazlar'a (Reseptör-Like-Kinazlara=RLK) bağlanır ve bunlarda BAK1 ve SERK ko-reseptörleri ile ilişkilidir. Her iki reseptörün etkileşimi bilinmeyen bir mekanizmayla OST1 aktivasyonuna neden olabilir. OST1 doğrudan SLAC1'i aktive edebilir ve bekçi hücre duvarından anyonların salınımını uyarabilir. OST1, Ca^{2+} kanalını da aktive edebilir ve buda sitoplazmik kalsiyum sinyaline neden olabilir. Sitoplazmik kalsiyum sinyali CPKleri aktive edebilir ve böylece CPKler de SLAC1 ve SLAH3 kanallarını aktive edebilir. Ayrıca bunlara alternatif olarak OST1 belirli CPKleri Ca^{2+} bağımsız mekanizma ile aktive edebilme yeteneğinde olabilir [Roelfsema vd., 2012].



Şekil 2.10. Stoma bekçi hücrelerinde MİMÖ lerin sinyal yolağının şematik diyagramı [Roelfsema vd., 2012].

3. MATERİYAL ve YÖNTEM

3.1. BİTKİ YETİŞTİRME ve HAZIRLIK KOŞULLARI

Hordeum vulgare (L.) cv. Ingrid bitkileri $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foton akış yoğunluğunda ışık veren floresan tüpler (L36W/25; Osram, <http://www.osram.de>) ile donatılmış iklim dolabında yetiştirilmiştir. Bitkiler %70 torf %30 kil içeren saksılarda, 22/16 °C gündüz/gece sıcaklığında, 12/12 saat gündüz/gece ışık koşullarında, 60 ± 5 nemde iklimlendirme dolabında yetiştirildi. Tohumların çimlenme aşamasında kurumaması için üst kısmına kum serildi. Arpa bitkisinin tohumları R. Panstruga MPI'dan (Max Planck Institute for Plant Breeding Research, Cologne, Germany) elde edildi. Elektrofizyolojik kayıt ve nano-infüzyon işlemi için bütünlüğü bozulmamış bir haftalık bitkiler kullanıldı ve ilk gelişen yapraklarda ölçümler yapıldı.

Arabidopsis thaliana bitkisinin *Col-0* (Columbia), *Ler* (Landsberg erecta), WS-0 (Wassilewskija) ekotipleri ve onlardan elde edilen mutant hatları (Çizelge 3.1) % 80 torf, %20 kil içeren karışımda saksılarda 2-3 hafta süreyle yetiştirildi. Toprağı havalandırmak için karışıma hindistan cevizi lifi eklendi. Hazırlanan karışım 100 °C 1 atm basınç altında 20 dk otoklavda (Systec) steril edildi. Uygun büyüklüğe gelen bitkiler yine steril toprak karışımı içeren uç kısmı (27mm) ve tepe kısmı kesilmiş santrifüj tüplerinin (35mm) içine aktarıldı ve tüpler içinde yetiştirildi. *Arabidopsis* bitkileri 22/16 °C gündüz/gece sıcaklığında, 12/12 saat gündüz/gece ışık, %50 nemde, $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddeti koşullarında iklimlendirme dolabında (BİNDER KBF 720) yetiştirildi (Şekil 3.1). Elektrofizyolojik kayıt ve nano-infüzyon işlemi için bütünlüğü bozulmamış 5-6 haftalık *Arabidopsis* bitkileri kullanıldı. Ölçümlere karanlık büyüme fazı bitiminde başladı (sabah erken saatlerde).



Şekil 3.1. Bitki yetiştirme dolabında çimlenmekte olan ve büyüyen *Arabidopsis* bitkileri

Çizelge 3.1. Tez çalışmasında kullanılan *Arabidopsis thaliana* bitkilerinin listesi ve özellikleri

	Genel bilgiler	Bilimsel adı
<i>Col-0</i>	Yabani tip	<i>Arabidopsis thaliana</i> ekotip <i>Colombia</i>
<i>Ler</i>	Yabani tip	<i>Arabidopsis thaliana</i> ekotip <i>Landsberg erecta</i>
<i>WS-0</i>	Yabani tip doğal FLS2 mutanıtı	<i>Arabidopsis thaliana</i> ekotip <i>Wassilewskija</i>
<i>ost1.2</i>	Tekli mutant- <i>Ler</i> 'den elde edildi	<u>o</u> p <u>e</u> n <u>s</u> t <u>o</u> m <u>a</u> <u>1</u> . <u>2</u>
<i>slac1-3</i>	Tekli mutant- <i>Col-0</i> 'dan elde edildi	<u>s</u> l <u>o</u> w <u>a</u> n <u>i</u> o <u>n</u> <u>c</u> h <u>a</u> n <u>n</u> e <u>l</u> <u>1</u>
<i>slah3-1</i>	Tekli mutant- <i>Col-0</i> 'dan elde edildi	<u>S</u> l <u>a</u> c <u>1</u> <u>h</u> o <u>m</u> o <u>l</u> o <u>g</u> <u>3</u>
<i>slac1-3Xslah3-1</i>	İkili mutant- <i>Col-0</i> 'dan elde edildi	<u>s</u> l <u>o</u> w <u>a</u> n <u>i</u> o <u>n</u> <u>c</u> h <u>a</u> n <u>n</u> e <u>l</u> <u>1</u> X <u>s</u> l <u>a</u> c <u>1</u> <u>h</u> o <u>m</u> o <u>l</u> o <u>g</u> <u>3</u>
<i>rbohD/F</i>	İkili mutant- <i>Col-0</i> 'dan elde edildi	<u>r</u> e <u>s</u> p <u>i</u> r <u>a</u> t <u>o</u> r <u>y</u> <u>b</u> u <u>r</u> s <u>t</u> <u>o</u> x <u>i</u> d <u>a</u> s <u>e</u> <u>h</u> o <u>m</u> o <u>l</u> o <u>g</u> <u>D</u> / <u>F</u>
<i>cpk3-5-6-11</i>	Dörtlü mutant- <i>Col-0</i> 'dan elde edildi	<u>c</u> a <u>l</u> c <u>i</u> u <u>m</u> <u>p</u> r <u>o</u> t <u>e</u> i <u>n</u> <u>k</u> i <u>n</u> a <u>s</u> e <u>3</u> - <u>5</u> - <u>6</u> - <u>11</u>
<i>cpk4-5-6-11</i>	Dörtlü mutant- <i>Col-0</i> 'dan elde edildi	<u>c</u> a <u>l</u> c <u>i</u> u <u>m</u> <u>p</u> r <u>o</u> t <u>e</u> i <u>n</u> <u>k</u> i <u>n</u> a <u>s</u> e <u>4</u> - <u>5</u> - <u>6</u> - <u>11</u>
<i>AtWS-FLS2myc</i>	Tekli mutant- <i>WS-0</i> 'dan elde edildi	<i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Was</i> silewskija <u>F</u> L <u>A</u> G <u>E</u> L <u>L</u> I <u>N</u> <u>S</u> E <u>N</u> S <u>I</u> T <u>I</u> V <u>E</u> 2 <u>m</u> y <u>c</u> protein
<i>abi1-1</i>	Tekli mutant- <i>Ler</i> 'den elde edildi	<u>A</u> B <u>s</u> c <u>i</u> s <u>i</u> c <u>a</u> c <u>i</u> d <u>I</u> n <u>s</u> e <u>n</u> s <u>i</u> t <u>i</u> v <u>e</u> <u>1</u>

3.1.1. *Arabidopsis thaliana* Mutant Hatları

Çizelge 3.1'de görüldüğü üzere; *ost1-2* ve *abi1-1* tekli mutantları *Landsberg erecta* (*Ler*) ekotipinden elde edilmiştir. *cpk3/5/6/11* ve *cpk4/5/6/11* dördümlü mutantları, *rboh-D/F* ikili mutantı, *slac1-3* ve *slah3-1* tekli mutantları *Columbia 0* (*Col0*) ekotipinden elde edilmiştir. *FLS2* ise *Wassilewskija* (*WS-0*) ekotipinden elde edilmiştir [Zipfel vd., 2004]. *WS-0* doğal bir mutant olup, hücre zarında *FLS2* reseptörünü içermez. *slac1-3* (*SALK_099139*) ve *slah3-1* (*GK-371G03*) tohumları *NASC*'dan (*Arabidopsis* Stock Centre) (<http://arabidopsis.info/>) elde edilmiştir. *slac1-3Xslah3-1* ikili mutantı standart çaprazlama, *F2* ve *F3* jenerasyonlarının genotiplenmesi kullanılarak elde edilmiştir: *slac1-3* LP *AACTTCTTCTTCGCTCCTTGG*, *slac1-3* RP *GACCATTTCCTTGCCTGTTTG*, *Salk* *Lba* *TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG*, *LB-GK2* *CCCATTGGACGTGAATGTAGACAC*, *SLAH3* C (ucu) terminus rev *GGATAATGGTGGTCACGAGCAG*, *SLAH3* N (ucu) terminus *ACCCATTTCACCTTCGGTATG*. *cpk3/5/6/11* dördümlü mutant *cpk3* (*SALK_022862* [Mori vd., 2006]) ve *cpk5/6/11*'in çaprazlanmasıyla elde edilmiştir. *cpk4/5/6/11* dördümlü mutantı *cpk4* ve *cpk5/6/11*'in [Boudsocq vd., 2010] çaprazlanmasıyla elde edilmiştir.

3.2. KİMYASALLAR ve ÇALIŞMA ÇÖZELTİLERİ

Çalışma Çözeltisi 1: Epidermis izolasyonu deneyinde stomaların açılması için kullanılan tampon çözelti.

50 mM KCl

0,05 mM CaCl₂

1 mM MES/BTP pH=6.0

Çalışma çözeltisi 2: İzole edilen epidermislerde bekçi hücrelerinde iki uçlu elektrod kullanılarak S-tip anyon kanallarının ölçümü için hazırlanan tampon çözelti.

50 mM KCl

1 mM CaCl₂

1 mM MES/BTP pH=6.0

Çalışma Çözeltisi 3: Mezofil hücrelerinde tek uçlu elektrod kullanılarak membran potansiyelinin ölçümü için kullanılan tampon çözelti.

5 mM KCl

1 mM CaCl₂

5 mM MES pH:6.0

Çalışma Çözeltisi 4: Mezofil hücrelerinde flg22 uygulaması için kullanılan çözelti

5 mM KCl,

1 mM CaCl₂

5 mM MES (pH:6.0),

10 nM flg22 (DMSO stok içinde hazırlandı)

1 mg/mL BSA

Çalışma Çözeltisi 5: Mezofil hücrelerinde kontrol uygulaması için kullanılan çözelti

5 mM KCl,

1 mM CaCl₂

5 mM MES (pH:6.0),

DMSO

1 mg/mL BSA

Çalışma Çözeltisi 6: Nano-infüzyon deneyleri için kullanılan çözeltiler

flg22 stok çözelti: 1 mM flg22, DMSO için de çözüldü.

flg22 nano-infüzyon: 10 mM KMES (pH:6.0), 20 nM flg22, 1 mg/mL BSA

flg22 için kontrol çözeltisi: 10 mM KMES (pH:6.0), DMSO, 1 mg/mL BSA

Kitosan stok çözelti: Kitosan (yengeç kabuklarından elde edilmiştir, Sigma) 1M asetat içinde 1 mg/mL konsantrasyonda hazırlandı. Çözülmesinde yaşanan güçlükten dolayı çözelti 1 gece karıştırıcı ile karıştırıldı ve sonra 20 dk 24,000g ultrasantrüfuj yapıldı ve çözülmeyen materyal uzaklaştırıldı [Young vd., 1982].

Kitosan nano-infüzyon: 1 mL içinde, 10 µg/mL kitosan(1M asetat), 10 mM KMES pH:6.0.

Kitosan için kontrol çözeltisi: 1 mL içinde 10 µL (1M asetat), 10 mM KMES pH:6.0

Çalışma Çözeltisi 7: Mikro-elektrot ölçümleri ve nano-infüzyon deneylerinin görüntülenmesi için kullanılan çözelti

5 mM KCl,

0.1 mM CaCl₂

5 mM K/Sitrat (pH:5.0 veya pH:6.0),

3.3. FİZYOLOJİK ve ELEKTROFİZYOLOJİK ÖLÇÜMLERE HAZIRLIK İŞLEMLERİ

3.3.1. Fizyolojik ve Elektrofizyolojik Çalışmalar Sırasında Bitkiye Uygulanacak Işık Miktarının Ölçülmesi

Stomaların ışık altında açılma yeteneğinin test edilmesi ve ışık altında uygulamalar sonucunda iyon kanal aktivitelerinin gözlenmesi için gerekli ışık yoğunluğu LI-COR 250 Light-Meter (Şekil 3.2) kullanılarak ölçüldü ve ışık yoğunluğu yaklaşık 300 µmol m⁻² s⁻¹ olarak belirlendi. Mikroskop altında yapılan tüm deneysel çalışmalarda belirtilen ışık şiddeti kullanıldı.



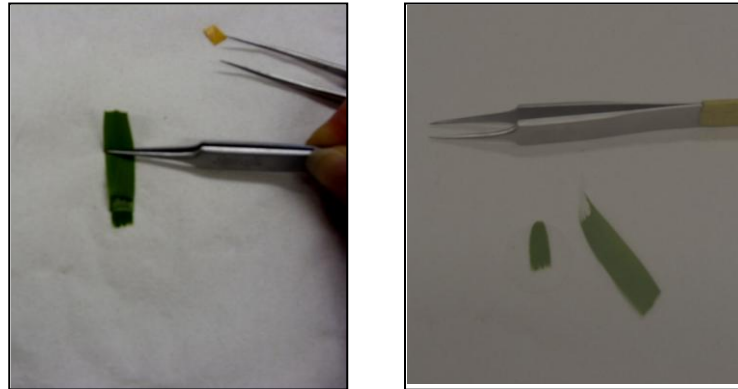
Şekil 3.2. LI-COR 250 marka ışık ölçer (Light-Meter).

3.3.2. Epidermal Tabakanın İzolasyonu

Epidermis tabakasının izolasyonu için 5 haftalık *Arabidopsis* (*Col-0, slac1-3, slah3-1, slac1-3Xslah3-1*) bitkilerinin yaprakları kullanıldı. Bir yaprak alındı ve orta damarı jilet yardımıyla çıkartıldı. Daha sonra yapışkan bir bant kullanılarak epidermis tabakası dikkatlice soyuldu. Hızlı bir şekilde daha önceden ince bir tabaka halinde tıbbi yapıştırıcı (Medical Adhesive B Liquid, ULRICH Swiss) sürülmüş lamelin (18 mm) üzerine yapıştırıldı ve havayla temas etmeden petri kutusunda bulunan çalışma çözeltisi 1'in içine konuldu ve 250 μ E ışık şiddeti altında stomaların açılması beklendi. İzole epidermis tabakası ölçümlere başlamadan en az 3-4 saat önce hazırlandı ve kapalı petri kutusunda çalışma çözeltisi içinde tutuldu. Daha sonra elektrofizyolojik ölçümler için kullanıldı.

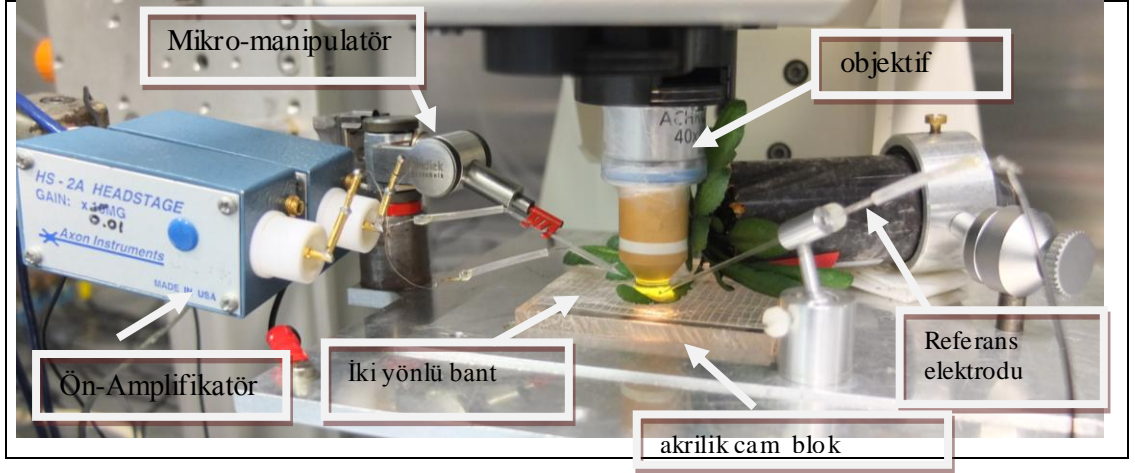
3.3.3. Mezo fil Tabakasının Hazırlanması

Bir haftalık *Hordeum vulgare* (*ingrid*) bitkisinin yaprakları kullanıldı. İnce bir tabaka halinde tıbbi yapıştırıcı sürülen lamel üzerine yaprağın alt kısmı gelecek şekilde yerleştirildi ve üst epidermis tabakası dikkatlice soyuldu (Şekil 3.3). Havayla temas etmeden çalışma çözeltisi 3'ün içine yerleştirildi. Bu şekilde en az 12 saat iklimlendirme dolabında bekletilerek hücrelerin yenilenmesi sağlandı. Daha sonra elektrofizyolojik ölçümler için kullanıldı.



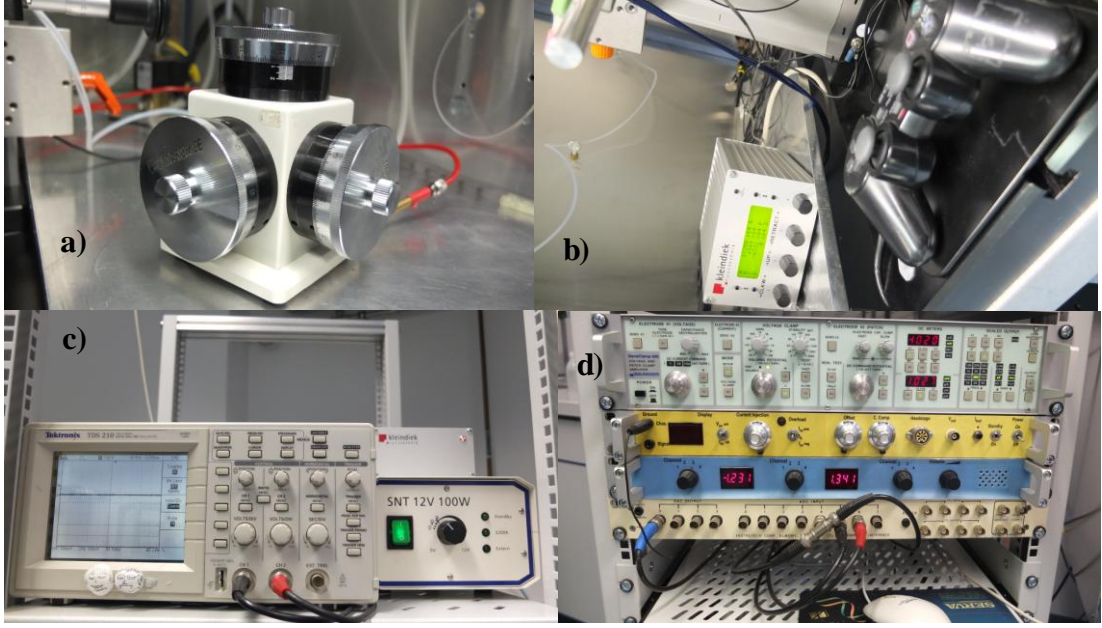
Şekil 3.3. Mezo fil tabakasının hazırlanması

3.3.4. Mikroskop ve Elektrofizyolojik Ölçüm Düzeneği



Şekil 3.4. Mikroskop ve elektrofizyolojik deney ölçüm düzeneği

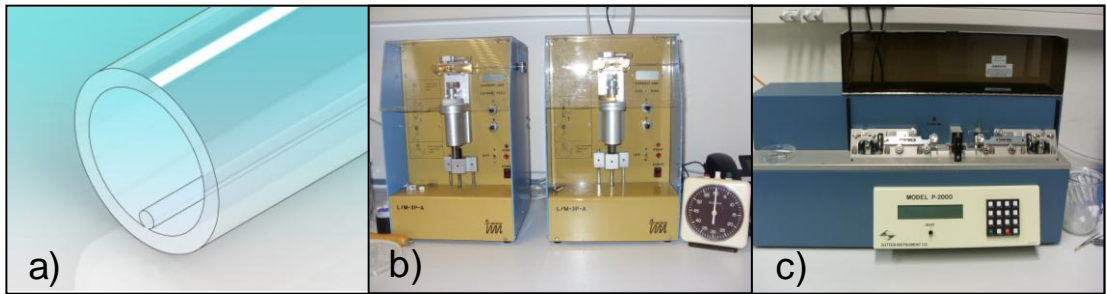
Bütünlüğü bozulmamış bitkiler (Arpa veya *Arabidopsis*) dikey mikroskobun mikroskop tablası üzerine belli bir eğimde yerleştirildi (Axioskop 2FS, Zeiss, <http://microscopy.zeiss.com>) (Şekil 3.4). Bitki yapraklarının üst yüzeyi iki yönlü yapıştırıcı bant kullanılarak akrilik cam blok üzerinde sabitlendi. Beyaz ışık yoğunluğu yaklaşık $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ olan mikroskop lambasından (HAL 12/100 W; Zeiss) sağlandı. Yüksek kaliteli görüntüler sulu-immersiyon objektif (Achromplan 40x/0.8 W, Zeiss) kullanılarak elde edildi. Yaprak yüzeyi ve objektif arasında 1 damla çalışma çözeltisi kullanıldı. Bekçi hücre elektrofizyolojik ölçümü iki-uçlu mikro-elektrodu taşıyan MM3A mikromanipulatör (Kleindiek Nanotechnik) kullanılarak gerçekleştirildi. Elektrodların her ikisinde iki-elektrod voltaj- kenetleme amplifikatörüne (Şekil x.) (Geneclamp 500; Axon Instruments) bağlı olan ara-yüz ile (HS-2A x 0.01; Axon Instruments, Molecular Devices) Ag/AgCl kullanılarak bağlandı. Referans elektrod da objektif ve kütikula arasında çalışma çözeltisinin içine yerleştirildi. Bu deney düzeneği mikro-elektrod ölçümleri için kullanıldı.



Şekil 3.5. Elektrofizyolojik ölçüm düzeneğinde kullanılan cihazlar: a ve b) mikro-manipulör c) Osiloskop d) Amplifikatör

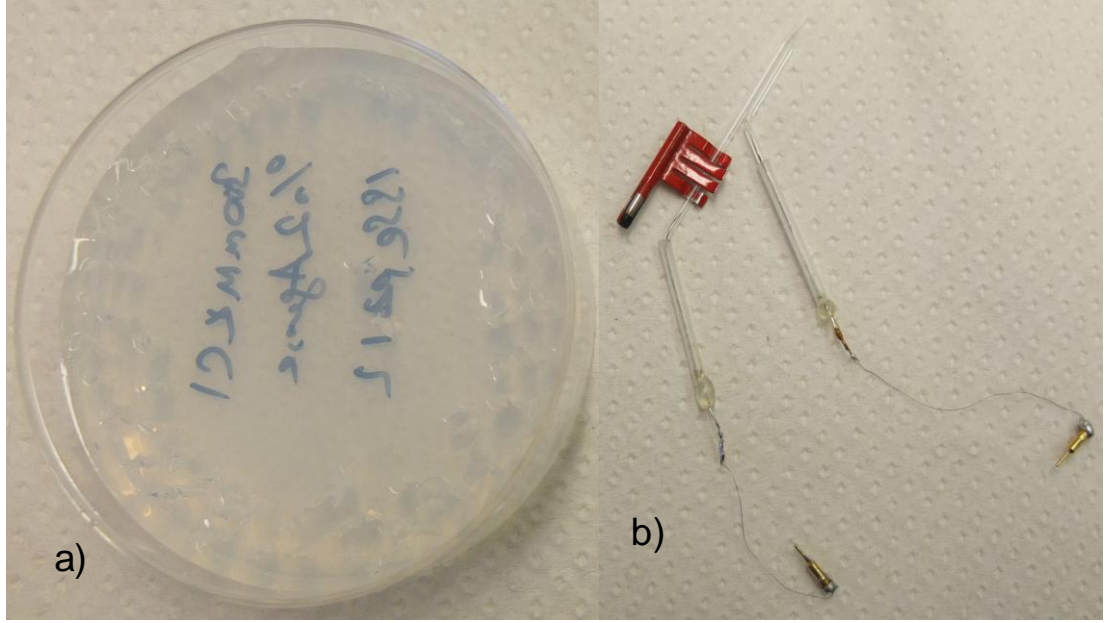
3.3.5. Mikroelektrot Ölçümleri İçin Tek ve İki-Uçlu Kapiller Hazırlanışı

Mikro-elektrot ölçümleri için gerekli olan tek ve iki-uçlu cam pipetler, borsilikat filamentli kılcal cam borular (Şekil 3.6.a) (iç/dış çap 0.56/1.0 mm, Hilgenberg, <http://www.hilgenberg-gmbh.de>) kullanılarak elde edildi. Öncelikle iki cam kapiller dikey elektrot pipet yapıcıda ısıtıldı ve 360 °C döndürüldü (L/M-3PA; HEKA, <http://www.heka.com>) ve böylece birbirine yapışık iki kapiller elde edildi (Şekil 3.6.b). İki-uçlu kapiller yatay lazer pipet yapıcıda çekilerek (puller) (P2000, Sutter, <http://www.sutter.com>) keskin uçlu pipetler elde edildi. Tek uçlu cam pipetler direk yatay lazer pipet yapıcıda çekilerek elde edildi (Şekil 3.6.c).



Şekil 3.6. a) Borsilikat filamentli kılcal cam boru, b) dikey pipet yapıcı, c) yatay lazer pipet yapıcı.

Bekçi hücrelerinin zar potansiyelini kaydetmek ve voltaj kenetleme protokolü ile ölçümleri gerçekleştirmek için çift paralel mikroelektrotlar kullanıldı.



Şekil 3.7. a) petri kutusunda %2 Agaroz-tuz köprüsü (300mMKCl) b) iki- uçlu cam mikro-elektrot ve Ag/AgCl tel

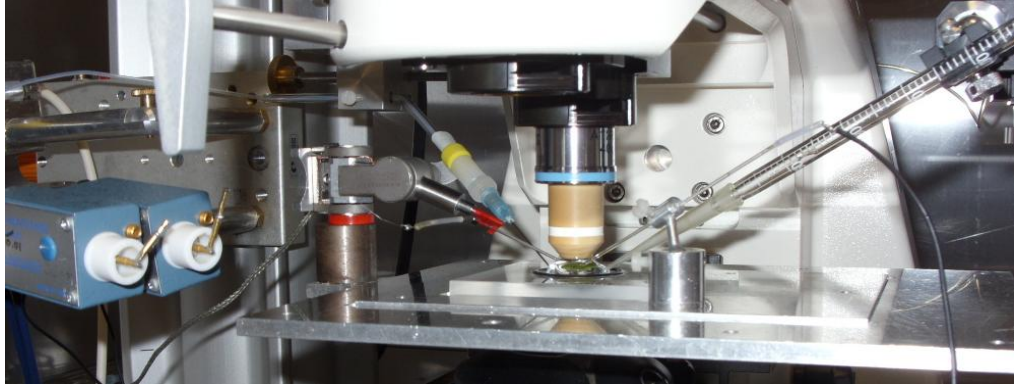
3.4. MİKRO-ELEKTROT ÖLÇÜMLERİ

Bütünlüğü bozulmamış bitkinin yaprağı mikroskop tablası üzerine çift taraflı yapışkan bant ve medikal yapıştırıcı kullanılarak tespit edildi. Mikroelektrot ölçümleri için “sulu-immersiyon objektif” kullanılarak bekçi hücreleri görüntülendi. Yapraklar mikroskop tablasından gelen $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık yoğunluğu ile aydınlatıldı ve böylece stomaların açılması sağlandı. Bekçi hücrelerinde zar potansiyeli ve iletkenliği ölçümleri çift-paralel mikroelektrot kullanılarak gerçekleştirildi. Mikroelektrot yapımı için gerekli ince cam mikropipetler laboratuarda bulunan dikey ve yatay pipet çekme makineleri kullanılarak elde edildi. Mikropipetin içi 300 mM KCl çözeltisi ile dolduruldu. Mikropipetten, mikroelektrodun yapılması için Ag/AgCl telin pipet içerisine geçmesi sağlandı. Kullanılan Ag/AgCl tel (şekily-b), saf gümüş telin, klor kaynağı olan (0,5M) KCl içerisine daldırılıp 30sn bekletilmesiyle elde edildi. Referans elektrot 300mMKCl çözeltisi, %2 Agaroz-tuz köprüsü (300mMKCl) (Şekil 3.7 a) ile Ag/AgCl bağlantısı (Şekil 3.7 b) kurularak objektif ve kutikula arasına yerleştirildi. Elde edilen

mikroelektrot, mikromanipulatörün uygun başlığına yerleştirildi ve kayıt işlemine geçildi.

3.4.1. Arpa Bitkisinin Mezofil Hücrelerinde Zar Potansiyeli Ölçümü

Arpa bitkisinde önceden tanımlandığı gibi elde edilen mezofil hücreleri tek uçlu mikro-elektrot ile ölçüldü. Şekilde görüldüğü gibi lamel üzerine sabitlenmiş mezofil tabakası mikroskop altında akrilik cam tabakaya sabitlendi ve perfüzyon sistemi kullanılarak sırasıyla çalışma çözeltisi 4 (10nM flg22) ve çalışma çözeltisi 5 (kontrol) uygulamaları yapıldı (Şekil 3.8). Tek uçlu mikro elektrot 300mM KCl ile dolduruldu ve uç direnci 60 ile 100 MΩ arasında olanlar kullanıldı. Kayıt işlemi için kullanılan referans elektrot da 300mMKCl ile dolduruldu ve uç kısmı %2 agaroz/300mM KCl içeren katı dolgu maddesiyle kapatıldı. Kapillerler önceden tanımlandığı şekilde hazırlandı. Flg22 ve kontrol uygulamalarının etkisi Arpa bitkisinin mezofil hücrelerinde zar potansiyeli üzerine etkisi kaydedildi.



Şekil 3.8. Bütünlüğü Bozulmamış Bitkilerin Stoma Bekçi Hücrelerinde Plazma Zar İletkenliği Ölçümü

3.4.2. Epidermis İzolasyonu İle Elde Edilen Stoma Bekçi Hücrelerinde S-Tip Anyon Kanallarının Ölçümü

Arabidopsis bitkilerinden (*Col0*, *slac1-3*, *slah3-1*, *slac1-3Xslah3-1*) elde edilen epidermis tabakasında stoma bekçi hücrelerinde S-tip anyon kanalları çift uçlu mikro-elektrotlar kullanılarak test edildi (Şekil 3.9). Epidermis tabakası mikroskop tablasına sabitlendi ve objektif ile epidermis tabakası arasında çalışma çözeltisi 2

kullanıldı. S-tip anyon kanallarının ölçümünü gerçekleştirmek için elektrotlar 300mMCsCl çözeltisi ile dolduruldu. Ölçümleri gerçekleştirmek için çizelge 3.2'de belirtilen voltaj protokolü uygulandı.



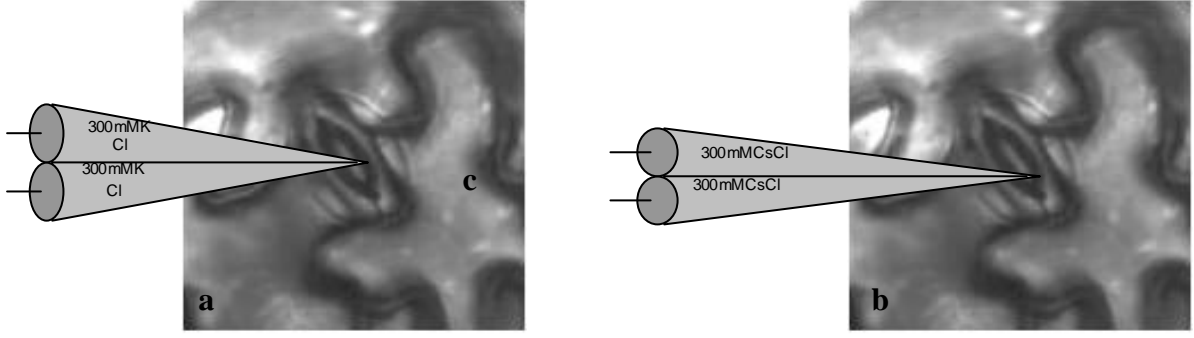
Şekil 3.9. Epidermal izolasyon ile elde edilen stoma bekçi hücrelerinde iki uçlu elektrot ile zar potansiyeli ölçümü

Çizelge 3.2. Uygulanan voltaj protokolü

Elektrod çözeltisi	Voltaj kenetleme (mV)	Maksimum Voltaj (mV)	Minimum Voltaj (mV)	Test akımları arasındaki fark (mV)
300mMKCl	-100	+40	-220	± 20
300mMCsCl	0	+60	-120	± 20

3.4.3. Bütünlüğü Bozulmamış Yaprakların Stoma Bekçi Hücrelerinde İyon Kanallarının Ölçümü

Mikro-elektrot ölçümleri ile bütünlüğü bozulmamış Arpa ve *Arabidopsis* bitkilerinin (yabani tip ve mutantlar) stoma bekçi hücrelerinde potasyum kanalları ve anyon kanalları incelendi (Şekil 3.10). Bütünlüğü bozulmamış bitkiler (Arpa, *Arabidopsis*) mikroskop deney düzeneğinde açıklandığı şekilde sabitlendi ve mikro-elektrot ölçümlerine geçildi. Objektif ve bitki arasına 1 damla çalışma çözeltisi 7 eklendi. Potasyum kanallarının ölçülmesi için mikro-elektrotlar içinde 300mM KCl çözeltisi kullanıldı. S-tip (yavaş tip) anyon kanallarının ölçümü için 300mMCsCl çözeltisi kullanıldı. Referans elektrot 300mMKCl çözeltisi içermektedir ve elektrodun uç kısmında sızıntıyı engellemek için 300mMKCl/ %2 Agaroz karışımıyla tıkandı. İki uçlu mikroelektrotların uç direnci 160-240 MΩ arasında olanlar kullanıldı. Ölçümleri gerçekleştirmek için çizelge 3.2'de belirtilen voltaj protokolü uygulandı.



Şekil 3.10. Bütünlüğü bozulmamış *Arabidopsis* bitkilerinde iki uçlu elektrot ile iyon kanallarının ölçümü a) 300 mM KCl b) 300 mM CsCl

3.4.4. Elektrofizyolojik verilerin değerlendirilmesi

Voltaj kenetleme protokolleri ITC-16 arayüzü (HEKA, <http://www.heka.com>) kullanılarak uygulanmış ve PULSE (HEKA) yazılımı ile kontrol edilmiştir. Akım protokolleri patch clamp yazılımı ile uygulanmış ve veriler 200 veya 20 Hz te düşük gerilim uygulanarak filtre edildi ve 1 ile 0.1 kHz'de örneklendi. Elektrofizyolojik veriler IGOR programı kullanılarak grafik haline dönüştürüldü.

3.5. NANO-İNFÜZYON

Stomaların davranışları üzerine kimyasalların etkisini test etmek için sıvıların apoplasta nano-infüzyonu gerçekleştirildi (Hanstein and Felle, 2004, Koers vd., 2011). Bu yöntem ile bütünlüğü bozulmamış bitkilerde stoma davranışları incelendi.

3.5.1. Nano-İnfüzyon Deneyi İçin Kapiller Hazırlanışı

Nano-infüzyon deneyi için gerekli olan cam pipetler, borsilikat filamentli kılcal cam borular (Şekil 3.6.a) (iç/dış çap 0.56/1.0 mm) kullanılarak yatay lazer pipet yapıcıda çekilerek (puller) (Şekil 3.6.c) elde edildi. Cam pipet ucu *Arabidopsis* bitkilerinin stoma çalışmaları için yaklaşık 1 μ m, arpa bitkisi için ise 2 μ m lik bir açıklık elde edecek şekilde kırıldı. Hazırlanan cam kapillerler nano-infüzyon deneyleri için kullanıldı.

3.5.2. Non-invazif Yöntem İle Bitki Apoplastı İçerisine Nanomiktarda Sıvı Enjeksiyonu

Arpa ve *Arabidopsis* bitkilerinin yaprakları mikroskop tablası üzerine mikroskop düzeneğinde tanımlandığı şekilde tespit edildi. Bekçi hücreleri daha net bir görüntü elde etmek için “sulu-immersiyon objektif” (X40) kullanılarak görüntülendi. Yaprak yüzeyi ve objektif arasına 1 damla çalışma çözeltisi 7 (5mMKCl, 0.1mM CaCl₂ ve 5mM K/Sitrat pH 5) konularak stomalar görüntülendi. Yapraklar mikroskop tablasından gelen 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık yoğunluğu ile aydınlatıldı ve böylece stomaların açılması sağlandı. Nano-infüzyon deneyinde kullanılacak mikrokapillerler uygulama çözeltileriyle (kitosan, flg22, ABA, kontrol) dolduruldu. Şekil A da gösterildiği gibi mikro-kapiller açık stoma içine mikromanipülatör (MHW-3, Narishige, <http://narishige-group.com>) aracılığıyla yerleştirildi. Nano-infüzyondan önce stomalar 10dk süreyle görüntülendi ve böylece mekanik etkiden kaynaklı stoma kapanmasının önüne geçildi. Uygulama çözeltileri *Arabidopsis* bitkileri için 0.1-2.5 sn, arpa bitkisi için 2-4 sn süre ile 140kPa basınç uygulayan basınçlı enjektör (PEDS-02; NPI Electronics, <http://www.npielectronic.com>) kullanılarak apoplast içine enjekte edildi.



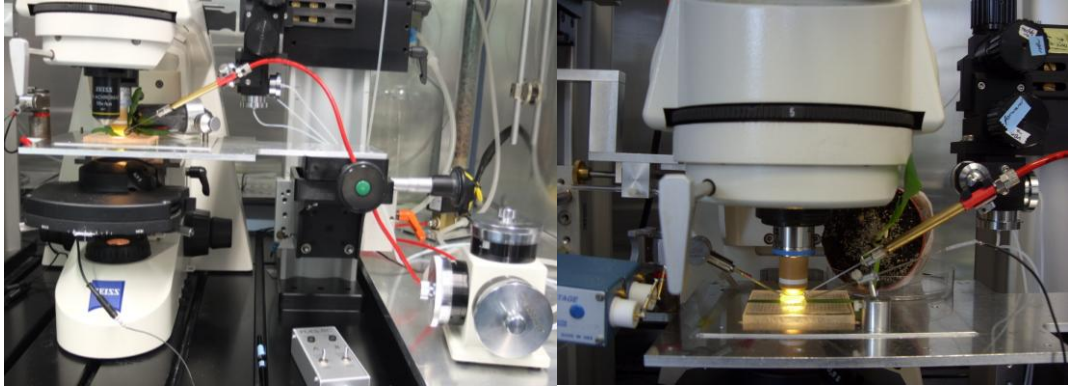
Şekil 3.11. Nano-infüzyon tekniğinin şematik gösterimi. Kitosan, flg22 ve ABA'in uyardığı stoma kapanması. Mikrokapiller açık stoma aracılığıyla stoma altı boşluğunun içine yerleştirildi ve hücre içi boşlukların içine solüsyon basınç yardımıyla enjekte edildi. Komşu stomanın hareketleri mikroskop altında gözlemlendi ve stoma açıklıkları ölçüldü [Güzel Değer vd., 2013 İncelemede].

Arabidopsis bitkilerinin stoma bekçi hücresine non-invazif yöntem ile bitki apoplastı içerisinden nanomiktarda ABA (10 μM), ve flg22 (20nM) ve bunların

kontrol enjeksiyonları gerçekleştirildi (Şekil 3.11). Arpa bitkisinin stoma bekçi hücrelerine ise kitosan (10 µg/mL) ve kontrol enjeksiyonları gerçekleştirildi. Başarılı nano-İnfüzyon deneyleri, epidermiste hücrelerin transparan şekilde değişimiyle belirlendi. Enjeksiyon sonuçları Axioscop2 (ZEISS) mikroskobuna bağlı Kappa kamerayla her 30sn de bir kaydedildi.

3.5.3. Stoma Açıklıklarının Ölçümü

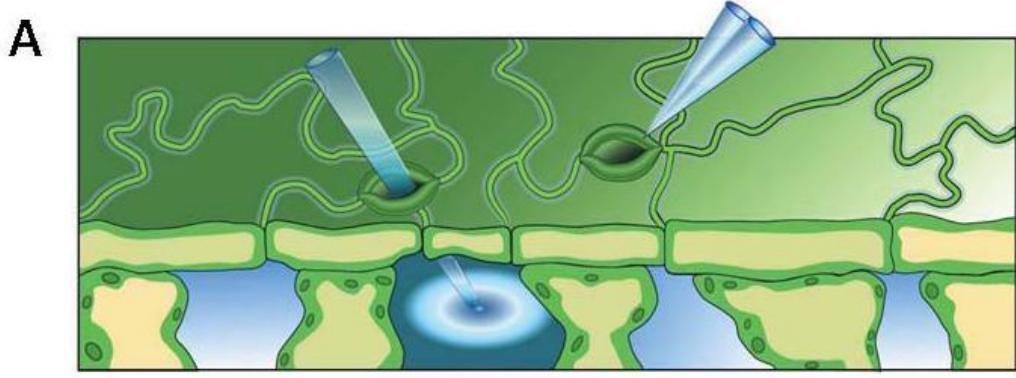
Stoma hareketliliği CCD marka (IMAG-K4, Walz, www.walz.com) kamera ile her 30 sn de bir Kappa Kamera (Kappa Camera Control, <http://www.kappa.de>) yazılımı kullanılarak kaydedildi. Stoma hareketliliği zamana bağlı olarak çalışıldı ve ImageJ programı kullanılarak stoma açıklıkları ölçüldü. Excel ve IGOR programları kullanılarak ölçümler grafik haline dönüştürüldü.



Şekil 3.12. Bütünlüğü bozulmamış *Arabidopsis* ve Arpa bitkilerinde nano-İnfüzyon uygulaması ve mikroelettrot ölçüm kombinasyonunun düzeneği

3.5.4. Nano-İnfüzyon Deneyi Ve Mikroelettrot Ölçümlerin Kombinasyonu

Bu yöntem ile bütünlüğü bozulmamış bitkilerde (Arpa ve *Arabidopsis*) stoma davranışları incelendi ve elektrofizyolojik ölçümlerle kombine edilerek test edildi (Şekil 3.13). Nano-İnfüzyon (kitosan, flg22, kontrol) deneyi ile uyarılan komşu stoma hücresi iki uçlu mikro-elettrot kullanılarak test edildi. Komşu stomanın stoma açıklığındaki değişimler veya bekçi hücrelerinin iyon kanal aktivitesindeki değişimler yukarıda daha önce açıklandığı şekilde kaydedildi.



Şekil 3.13. Hücre içi iki uçlu mikro-elektrot ile nano-infüzyon tekniğinin şematik olarak kombinasyonu. Bütünlüğü bozulmamış bitkiler enjeksiyon ve voltaj-kenetleme deneyleri için kullanıldı.

Bütünlüğü bozulmamış Arpa ve *Arabidopsis* bitkilerinin stoma bekçi hücrelerinde nano-infüzyon uygulaması sonucunda mikro-elektrot deneyleri ile potasyum kanalları ve S-tip (yavaş tip) anyon kanalları ölçüldü. Ayrıca kontrol uygulamalarıyla aralarındaki farklar karşılaştırmalı olarak kaydedildi.

3.6. MOLEKÜLER ANALİZLER

3.6.1. Stoma Bekçi Hücrelerinin Zenginleştirilmesi

Stoma bekçi hücrelerinin elde edilmesi için 7-10 günlük arpa bitkilerinin genç yapraklarından 10-15 yaprak toplandı ve deionize buz-su karışımında yapraklar parçalandı. Parçalanan yaprak dokuları 300 μm ' lik filtreden geçirildi, yıkandı ve toplandı. Örnekler hemen sıvı-azot içinde donduruldu. Ayrıca canlı boyama ile hücreler kontrol edildi. Canlı hücrelerin belirlenmesi için doğal kırmızı boyası (natural red) ve 2',7'-Dichlorofluorescein Diacetate kullanıldı. Kontrol işlemi Axioskop2 mikroskop altında gerçekleştirildi. Dondurulan örnekler RNA izolasyonu için kullanıldı.

3.6.2. Anyon Kanallarının Klonlanması (SLAC1/SLAH3)

3.6.2.1. Stoma bekçi hücrelerinden RNA izolasyonu

Bekçi hücrelerinden RNA izolasyonu Omega Plant RNA Mini ticari kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Nükleik asit saflığı ve konsantrasyonu NanoDrop ND-

1000 spektrofotometre ile belirlendi. Ters transkripsiyon reaksiyonuna başlamadan önce DNA; DNazI (DNase I Digestion Protocol) kullanılarak uzaklaştırıldı. Daha sonra RNA çöktürülerek Ters Transkriptaz (Revers Transkriptaz) polimeraz zincir reaksiyonu işlemi için kullanıldı (2.5µg). Bekçi hücreleri cDNA kalitesi aktin primerler kullanılarak Normal-PZR yöntemi ile kontrol edildi. Elde edilen PZR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile belirlendi. Bu işlemler sonunda elde edilen cDNA -80°C de depolandı [Szyroki vd., 2001].

3.6.2.2. Primer dizaynı

Moleküler çalışmalarda kullanılacak programlar ve yöntemler ile ilgili araştırmalar gerçekleştirildi. Primer dizaynı için “INVITROJEN, Vector NTI Advence 10” (www.invitrogen.com) bilgisayar programı kullanıldı. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) kuralları ve primer dizaynı öğrenilerek, farklı PZR teknikleri için primer dizaynı yapıldı. Primer dizaynında dejeneratif primer dizayn edildi ve homolog dizilerin belirlenmesinde kullanıldı. Bu işlem protein dizileri baz alınarak yapıldı. Ayrıca Aktin primerler, Gen spesifik Primerler (GSP=Gen spesifik primerler) ve NGSP'ler (Nested Gene Specific Primer) dizayn edildi.

3.6.2.3. PZR koşulları

Normal PZR programı kullanarak elde etmiş olduğumuz cDNA'nın kalitesi kontrol edildi. Tütün ve arpa bitkisi için aktin primerler dizayn edildi ve kontrol amaçlı kullanıldı. PZR sonuçlarının değerlendirilmesi için elde edilen örnekler uygun markırlar kullanılarak Etidyum bromid ile boyalı % 3'lük agaroz jel elektroforezine tabi tutulup UV transimulatör ile görünür hale getirildi ve sonuçlar değerlendirildi.

Agaroz jel elektroforezi Maniatis ve arkadaşlarına göre yapıldı [Maniatis vd., 1989]. Amaca göre farklı konsantrasyonlarda (% 1-% 1,2-% 2-% 3) jel solüsyonu 1X TBE içinde hazırlandı.

Daha önceden elde edilmiş olan cDNA ve dejeneratif primerler kullanılarak PZR amplifikasyonu “MWG Biotech Primus Thermal Cyclers” da gerçekleştirildi.

Elde edilen PZR ürünleri %1 ve %3 agaroz gel elektroforezinde yürütüldükten sonra bantlar kesildi ve kesilen bantlar QIGEN marka ticari jel ekstraksiyon kiti (QIAquick Gel Extraction Kit Protocol) kullanılarak istenen PZR ürünü elde edildi.

Bu çalışmalar süresince farklı PZR ve Elektroforez teknikleri incelendi ve denendi. Normal PZR, TAIL (Termal asymmetric interlaced) PCR, TOUCHDOWN PCR ve RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)-PCR teknikleri kullanıldı. Dizi analizlerinin incelenmesi için "NCBI" programında "BLAST" analizi yapıldı ve ayrıca "Multiple Sequence Alignment by CLUSTALW" programı ile incelemeler gerçekleştirildi.

RACE-PCR için spesifik cDNA eldesi "SMART™ RACE cDNA Amplification Kit" kullanılarak yapıldı.

3.6.2.4. Bakteri hücrelerine transformasyon çalışmaları

Ligasyon ve transformasyon çalışmaları için Promega (pGEM®-T ve pGEM®-T Easy Vector Systems) vektör sistemi kullanıldı. Bu vektör sistemi DH5 α 'ya (E.coli) transfer edildi.

3.6.2.5. Komponent hücre hazırlanışı

Stok DH5 α 'dan 2-3 ml alındı ve 100ml SOB içerisine aktarıldı ve 1 gece çalkalayıcıda 37 °C de bekletildi. Daha sonra kültür ortamına sırasıyla TFB1 ve TFB2 solüsyonları eklenerek santrifüj edildi. Elde edilen pellet 2ml TFB2 içinde tekrar süspansiyon edildiikten sonra ependorf tüplere 50 μ l olacak şekilde aktarıldı [Inoue vd., 1990].

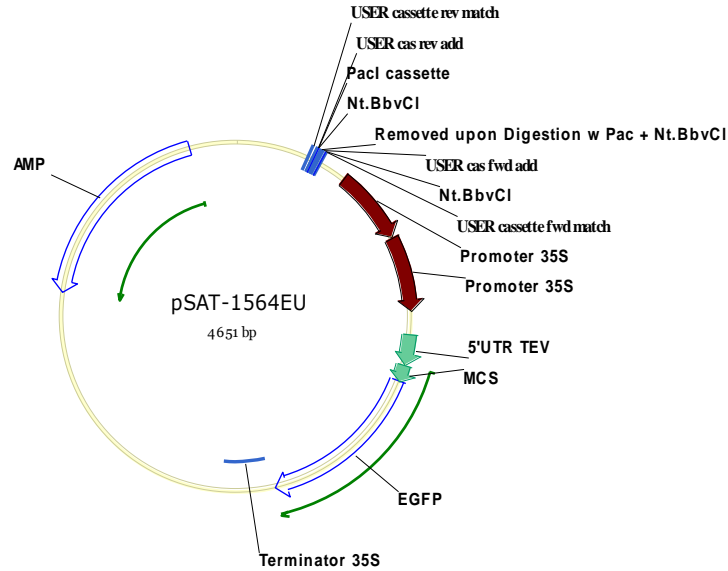
3.6.2.6. Plazmid izolasyonu

İlgilendiğimiz plazmidi içeren 1 gece bekletilen bakteri kültürü TENS tampon sistemi, 3M Na-asetat, izopropanol ve % 70 lik alkol kullanılarak çöktürüldü. Elde edilen pellet 50 μ L TE içerisinde yeniden süspansiyon edildi.

3.6.3. Biyolistik Yöntem İle Arpa Bitkisine Gen Aktarımı (Partikül Bombardımanı)

S-tip anyon kanallarının aktivasyonunu belirlemek için, SLAC1-benzeri genler ve ABA sinyalini içeren genler arpa bitkisinin stoma bekçi hücrelerine geçici transformasyon yöntemi ile aktarıldı. Bu yaklaşım için ilgili genlerin sens veya antisens yapıları partikül bombardman tekniği ile bekçi hücrelerine gönderildi. Arpa bitkisinin stoma bekçi hücrelerinde partikül bombardman tekniği ile Biyolistik (The Particle Delivery System Biolistic PDS 100/He-Biorad) cihazı (Şekil 3.15) kullanılarak 5 farklı konstrakt ile transformasyon gerçekleştirilmeye çalışıldı. Transformasyonda kullanmak amacıyla Promega Wizard Plus MidiPrep DNA Saflaştırma Sistemi kullanarak plazmid izolasyonu gerçekleştirildi. Plazmid izolasyonu 5 farklı konstrakt için yapıldı.

- pSAT1564EU (Kontrol)
- Slac1 prom::Slac1(WT) /pSAT1564EU
- Slac1 prom::Slac1 (S513D)/pSAT1564EU (Mutant)
- 2x35S Slac1 prom:: Slac1 (WT)/pSAT1564EU
- 2x35S Slac1 prom:: Slac1 (S513D)/pSAT1564EU (Mutant)



Şekil 3.14. pSAT1564EU (Kontrol)

Partikül bombardıman tekniği ile yapılan gen aktarımı sonucunda, transformant stoma bekçi hücreleri Lazer Tarayıcı Mikroskop (LSM 5 Pascal) (Şekil 3.16) ve Axioscop2 (ZEISS) mikroskopları kullanılarak incelendi. Gen aktarımında

GFP (yeşil floresan protein) reporter geni kullanıldı. Stomaların bombardıman sonucunda fizyolojik cevapları (stomaların açılma yeteneği) kontrol edildi. Transformasyona uğramış bekçi hücrelerinde, anyon kanallarının aktivitesi çift paralel hücre içi mikro elektrotlar kullanılarak tek hücre ölçümlerinin yapılması hedeflendi.

GFP (Yeşil florasan protein) kullanarak hücre ve doku içi işaretlenebilen protein, gen gibi yapıları ve onların hareket ve pozisyonları görüntülendi.

Çalışmalar sırasında

- Pırasa (kontrol olarak) ve *Hordeum vulgare* ingrid (6-8 günlük)
- Altın (Alfa Aesar, Gold powder, 0,5-0,8 mikron)
- Altın Biorad 1 mikron
- Tungsten M17 (Biorad) Biolistic 1,1 mikron

kullanıldı.



Şekil 3.15. Denede kullanılan biyolistik cihazı va parçaları. Biyolistik, biyolojik ve balistik kelimelerinin kısaltmalarının birleştirilmesi şeklinde adlandırılan, hücrelerin DNA ile kaplı hızlandırılmış mikro taşıyıcılarla transfer edilmesinde kullanılan bir cihazdır.

Gen aktarımında etkili faktörler

1. Partikül hızlandırmada kullanılan helyum gazının basıncı
2. Mikro taşıyıcının boyutu, tipi ve sayısı
3. Makro taşıyıcı ile hedef doku arasındaki uzaklık
4. DNA'nın mikro taşıyıcı partiküllere yapışması için kullanılan spermidin ve CaCl_2 'ün konsantrasyonu



LSM 5 Pascal'ın özellikleri

- Laser Tarama sistemi
- Dar uyarılma aralığı
- Daha iyi çözünürlük
- 3 boyutlu çalışma olanağı

Şekil 3.16. Lazer tarayıcı mikroskop ve özellikleri

3.6.4. Agrobacterium Aracılığıyla Transient Transformasyon

Tütün (*Nicotiana bentamiana*) ve arpa (*Hordeum vulgare ingrid.*) bitkisine Agrobacterium infiltrasyonu ile gen transferi çalışmaları gerçekleştirildi. *Agrobacterium* GV3101 (pMP90) [Koncz ve Schell, 1986] kullanıldı.

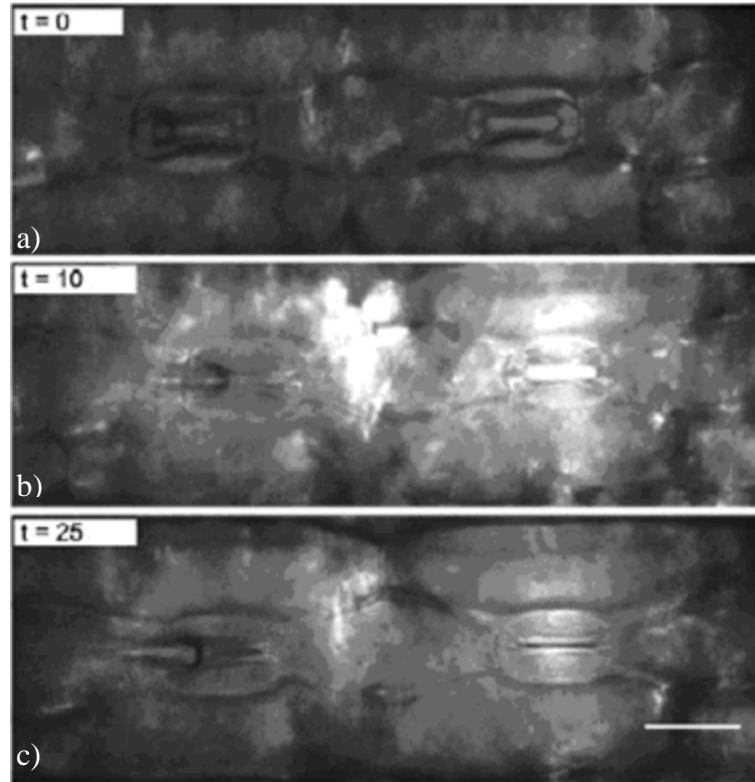
4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. BULGULAR

4.1.1. Nano-İnfüzyon Ölçümleri

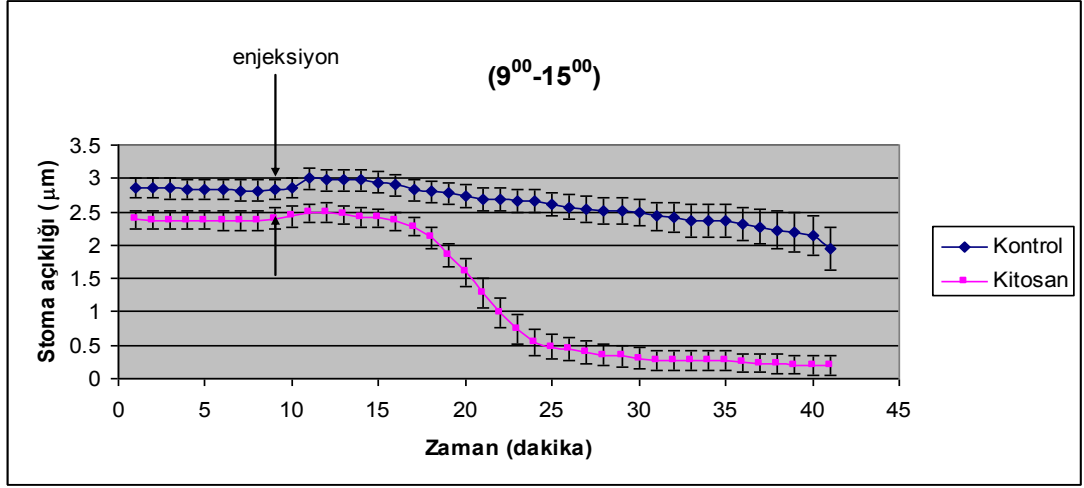
4.1.1.1. Bütünlüğü bozulmamış arpa bitkisinde fungal elisitör kitosan tarafından uyarılan stoma kapanması

Non-invasif yöntem ile arpa bitkisinin apoplastı içine nano miktarda kitosan enjeksiyonu gerçekleştirildi ve zamana bağlı olarak stoma açıklıkları incelendi (Şekil 4.1). Stoma hareketliliği kamera ile her 30 sn de bir kaydedildi. ImageJ programı kullanılarak stoma açıklıkları ölçüldü. Her bir uygulama en az 8 tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Excel veya IGOR programları kullanılarak ölçümler grafik haline dönüştürüldü.

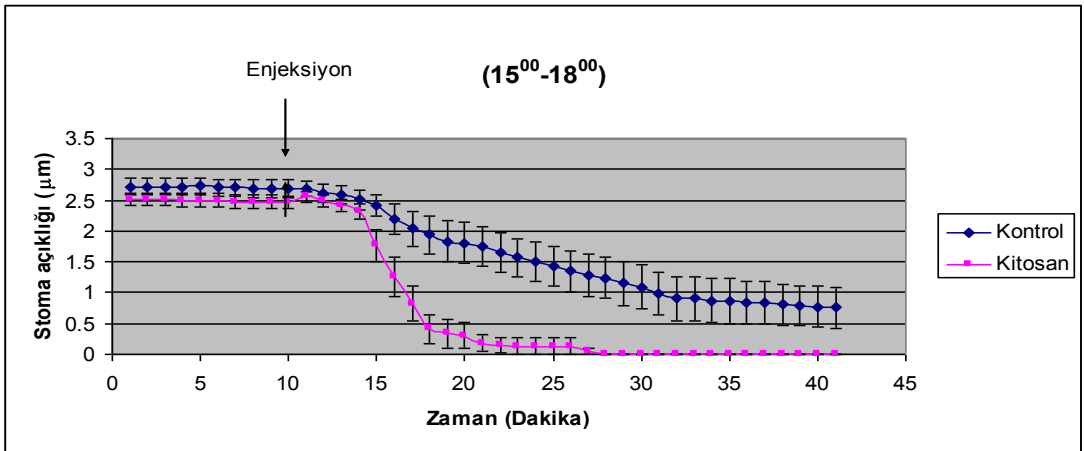


Şekil 4.1. Kitosanın nano-İnfüzyonu ile stoma kapanmasının uyarılması. a) enjeksiyondan önce, b) enjeksiyon esnasında, c) enjeksiyondan sonra stoma kapanması.

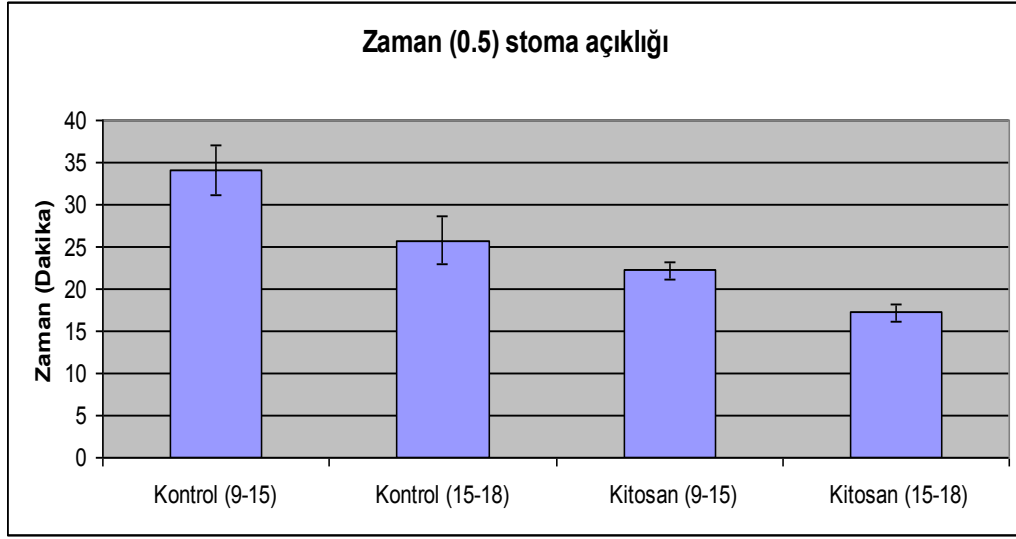
Mikro-kapiller açık stoma içine yerleştirildi ve stoma altı boşluğu kullanılarak kitosan enjekte edildi ve komşu stomanın davranışı incelendi (Şekil 4.1). Yapılan çalışmalarda kitosan uygulamasından sonra stoma açıklıklarında önemli bir düşüş olduğu gözlemlendi. Kitosanın enjeksiyonu hızlı bir stoma kapanmasına neden oldu. Bu çalışmada, özellikle 9⁰⁰-15⁰⁰ saatleri arasında kontrole göre kitosan uygulanan gruplarda stoma açıklıklarının önemli ölçüde azaldığı belirlendi ve stomaların 15dk içinde kapandığı belirlendi (Şekil 4.2). Bununla birlikte, 15⁰⁰ -18⁰⁰ saatleri arasında enjeksiyondan sonra hem kontrol hemde kitosan uygulanan gruplarda stoma açıklıklarında düşüş olduğu gözlemlendi (Şekil 4.3). Zamana bağlı olarak kitosan uygulamalarının stoma açıklıkları üzerine etkisi olduğu belirlendi (Şekil 4.4, 4.5).



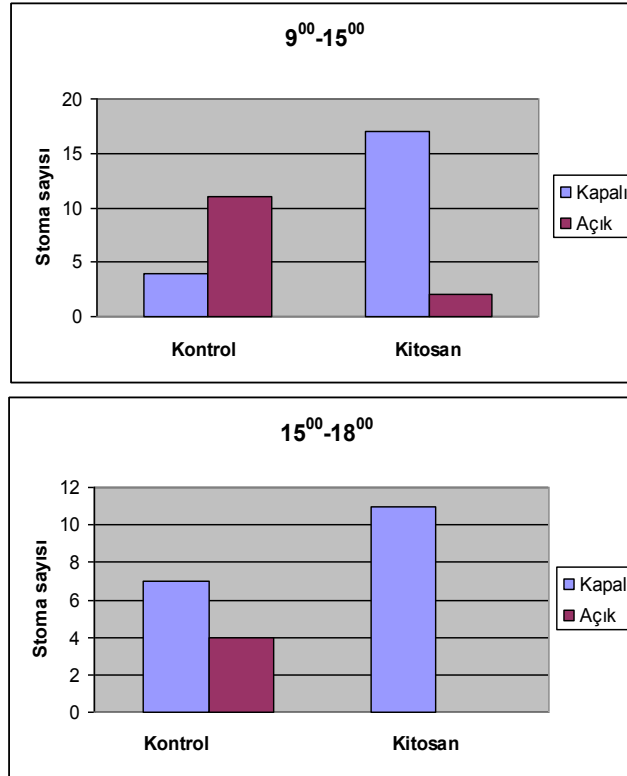
Şekil 4.2. Kitosan ve kontrol uygulamaları sonucunda stoma açıklıklarının ölçümü (9⁰⁰-15⁰⁰ saatleri arasında).



Şekil 4.3. Kitosan ve kontrol uygulamaları sonucunda stoma açıklıklarının ölçümü (15⁰⁰-18⁰⁰ saatleri arasında).



Şekil 4.4. Kitosan ve kontrol uygulamaları sonucunda zamana bağlı olarak %50 ye ulaşan stoma açıklığı.



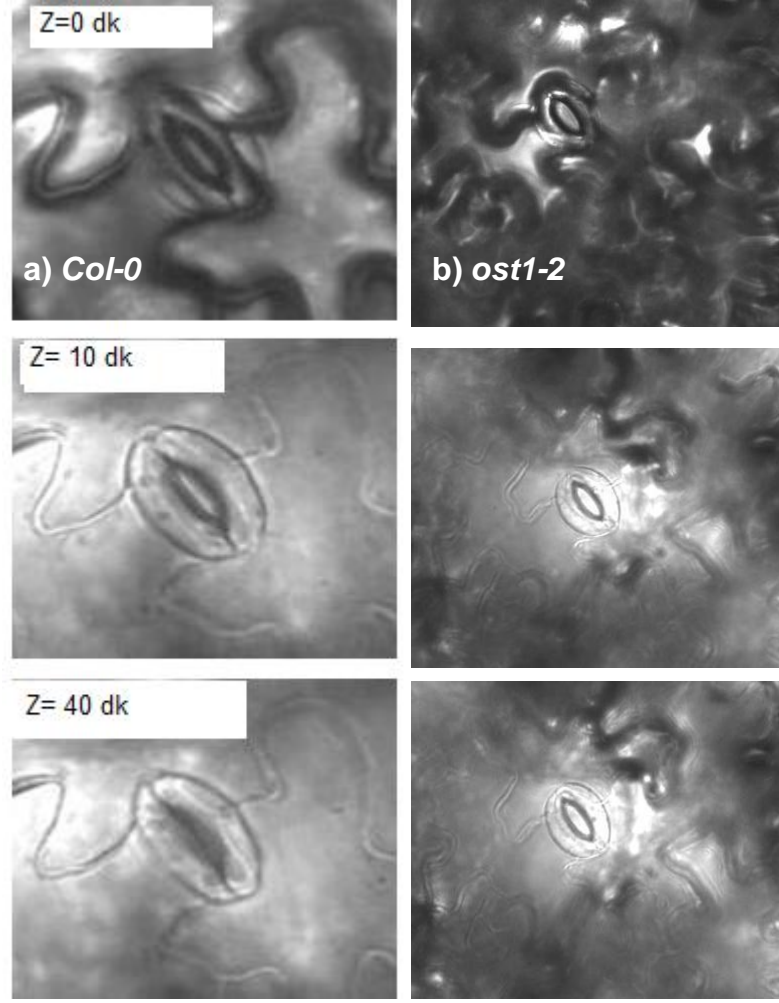
Şekil 4.5. Kitosan ve kontrol uygulamaları sonucunda zamana bağlı olarak açık ve kapalı stoma sayısı.

9⁰⁰-15⁰⁰ saatleri arasında kitosan uygulaması sonucunda 19 stomadan 17 sinin kapandığı belirlendi. Bununla birlikte bu saatler arasında yapılan kontrol uygulamalarında 16 stomadan sadece 5'nin etkilendiği saptandı. 15⁰⁰ -18⁰⁰ saatleri arasında kitosan uygulaması sonucunda bütün stomaların kapandığı gözlemlendi buna karşın kontrol uygulamalarında da stomaların çoğunun kapanma eğiliminde olduğu belirlendi.

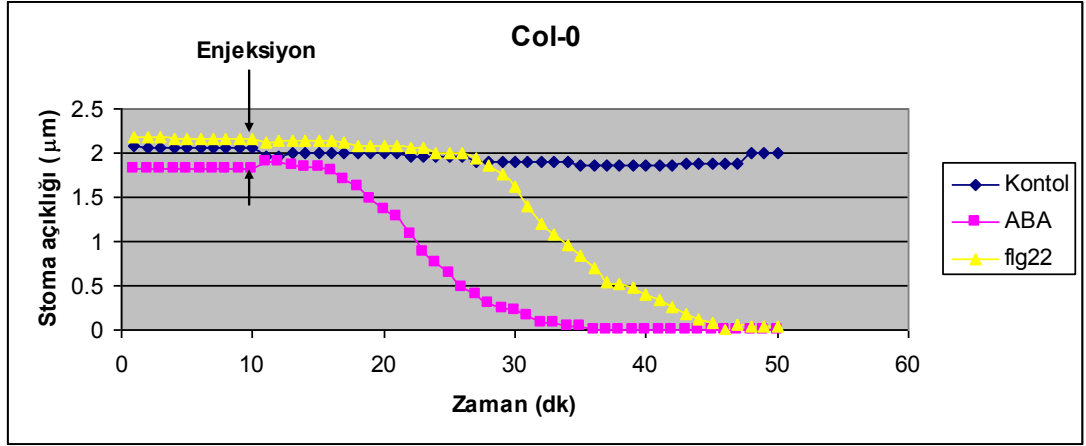
4.1.1.2. Bütünlüğü bozulmamış *Arabidopsis* bitkilerinde flg22 ve ABA tarafından uyarılan stoma hareketliliği

Bakteriyel elisitör flg22 ve kuraklık stres hormonu ABA'e stomaların yanıtları nano-infüzyon tekniği ile çalışıldı. Bütün uygulama grupları için kontrol deneyleri yapıldı. Her bir uygulama en az 8 tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Açık stoma içine yerleştirilen mikro-kapiller (uç kısmı yaklaşık 1 µm açıklığında) basınçlı enjeksiyon ile stoma-altı boşluğu kullanarak incelenmek istenen çözeltinin infüzyonu sağlandı. Yaprak yüzeyinin optik özelliği ile nano-infüzyona uğrayan epidermis hücrelerinin ve bekçi hücrelerinin transparan ve daha iyi görünen bir renk değişikliğine uğradığı gözlemlendi. Bu değişime uğrayan bekçi hücrelerindeki stoma hareketleri ölçüldü (Şekil 4.6).

MİMÖler ve stres hormonu ABA arasında stoma yanıtlarındaki benzerliklerden dolayı her iki sinyal yolağının mutantları ve yabancı tipleriyle çalışıldı. Kontrol, ABA ve flg22 enjeksiyonları; *Arabidopsis*'in *Col-0*, *Ler*, *Ws* yabancı tipleri ve *ost1-2*, *cpk3-5-6-11*, *cpk4-5-6-11*, *abi1-1*, *rbohD/F*, *At-WsFLS2myc*, *slac1-3*, *slah3-1*, *slac1-3Xslah3-1* mutantlarıyla çalışmalar gerçekleştirildi.

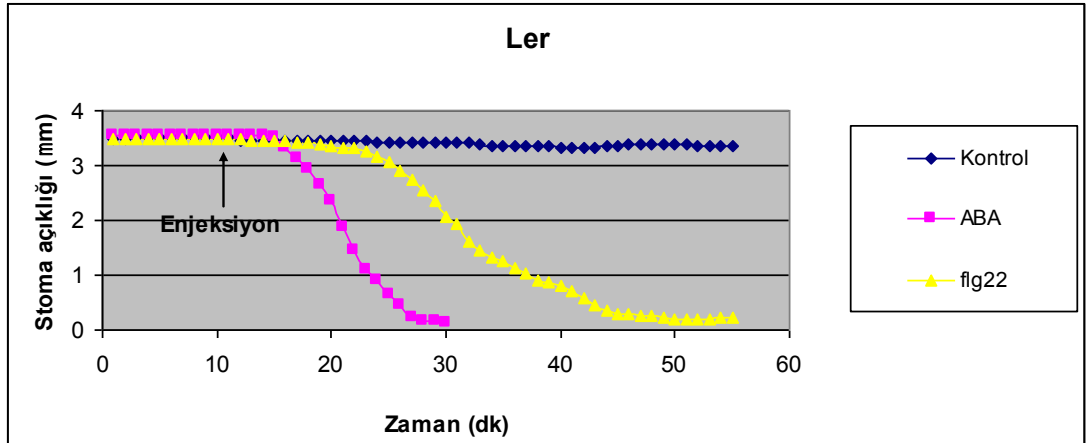


Şekil 4.6. 20nM flg22'nin nano-infüzyonu ile uyarılan *Arabidopsis* yaprağının epidermisinde stomanın görüntüsü. Bütünlüğü bozulmamış *Arabidopsis thaliana* acc. *Colombia* (*Col-0*) (a) ve *ost1-2* mutantının (b) stoma hareketleri. Üstteki görüntü enjeksiyondan önce, orta kısımdaki görüntü enjeksiyon sırasında ve alttaki görüntü enjeksiyondan sonra. Not: Uygulama çözeltisi hücre içi boşluklara enjekte edildiğinde yaprakta transparan bir görüntü oluşmaktadır.

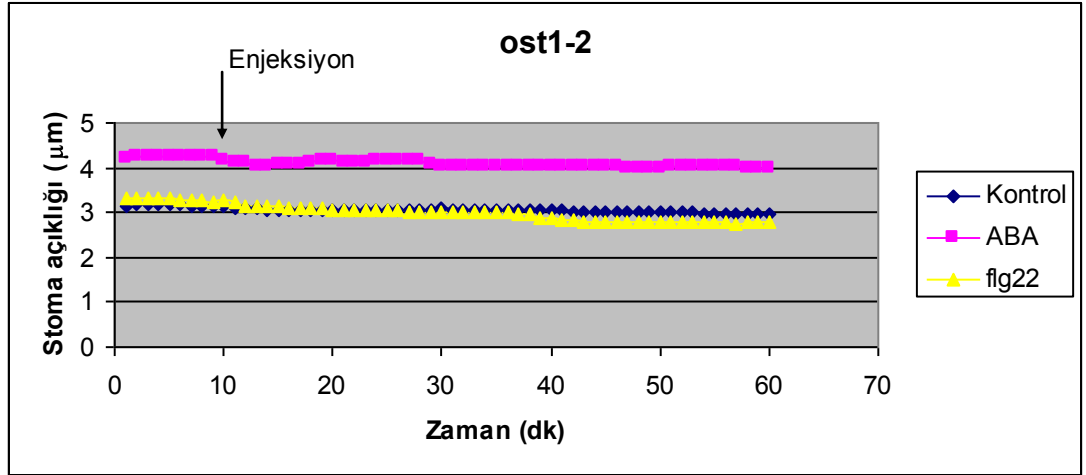


Şekil 4.7. *Arabidopsis thaliana* Colombia (Col-0) yabani ekotipinde kontrol, ABA ve flg22 uygulamaları sonucunda stoma açıklıklarının ölçümü

Arabidopsis'in Col-0 ve Ler yabani ekotipinde 20 nM flg22 ve 10 µM ABA uygulamalarının stoma kapanmasına neden olduğu bulunmuştur. Kontrol uygulamaları sonucunda stomalar açık kalmıştır. flg22 uygulanan bitkilerde stoma kapanmasının ABA uygulanan gruplara göre daha yavaş olduğu ve geç başladığı belirlenmiştir (Şekil 4.7, 4.8).

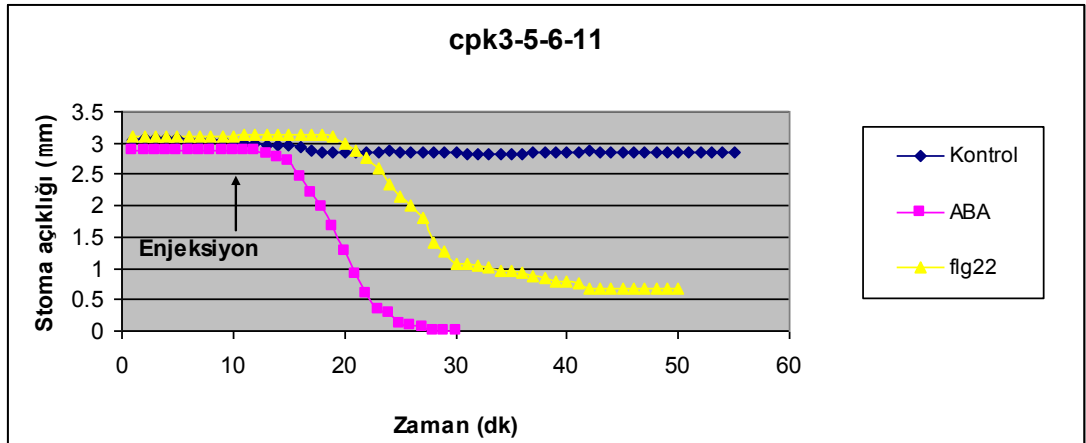


Şekil 4.8. *Arabidopsis thaliana* Landsberg erecta (Ler) yabani ekotipinde kontrol, ABA ve flg22 uygulamaları sonucunda stoma açıklıklarının ölçümü



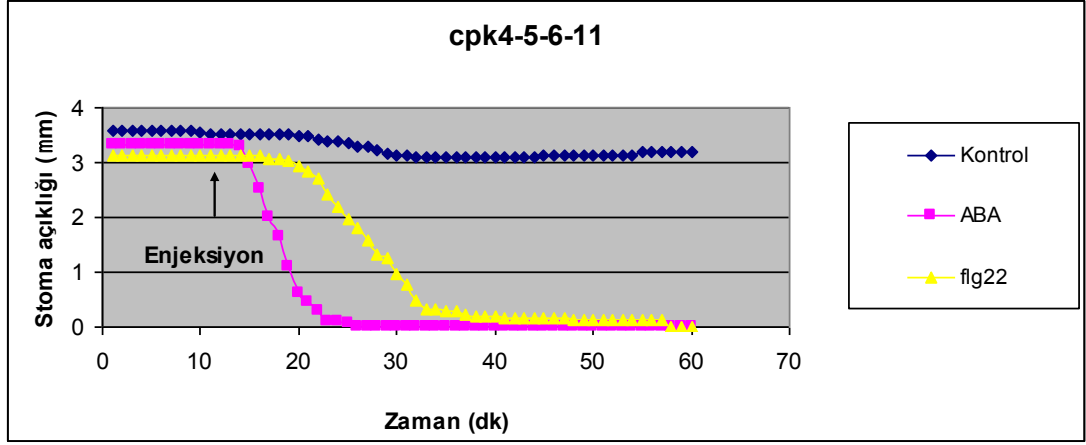
Şekil 4.9. *ost1-2* mutantında kontrol, ABA ve flg22 uygulamaları sonucunda stoma açıklıklarının ölçümü

ost1-2 mutant bitkisinin yaprakları içine açık stoma aracılığıyla ABA, flg22 ve kontrol uygulamalarının stoma kapanmasına neden olmadığı bulunmuştur (şekil 4.9)



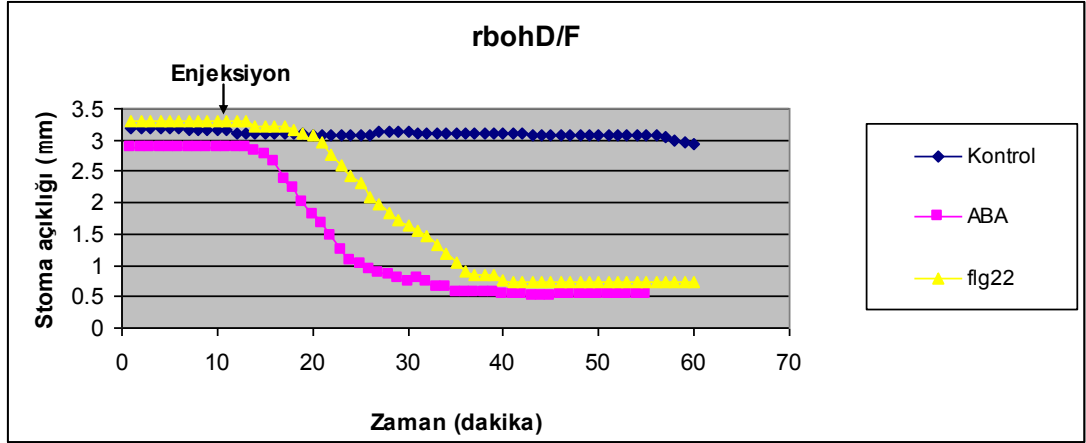
Şekil 4.10. *cpk3-5-6-11* dörtlü mutantında kontrol, ABA ve flg22 uygulamaları sonucunda stoma açıklıklarının ölçümü

cpk3-5-6-11 ve *cpk4-5-6-11* dörtlü mutantlarında ABA ve flg22 uygulamalarının stoma kapanmasına neden olduğu bulunmuştur (Şekil 4.10, 4.11). Böylece bu dört kalsiyum bağımlı protein kinazın (CPKs) flg22 ve ABA'in uyardığı stoma kapanması için elzem olmadığı bulunmuştur.

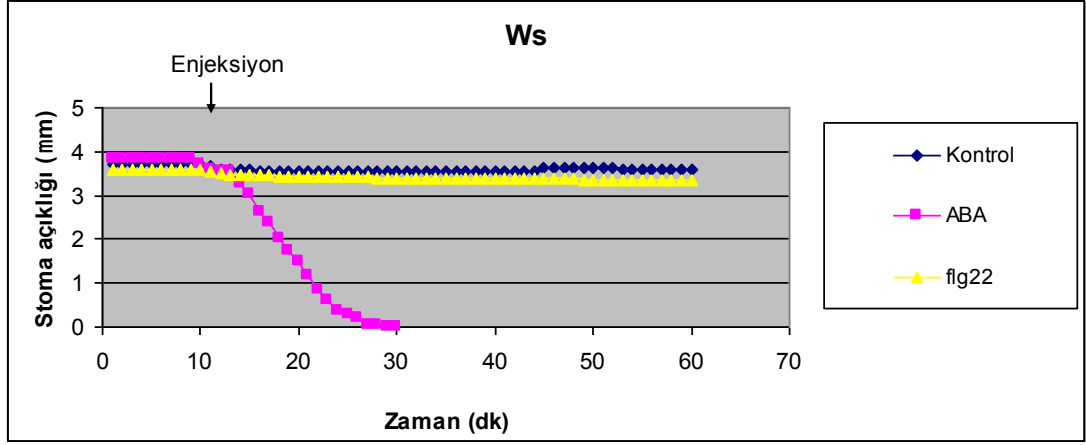


Şekil 4.11. *cpk4-5-6-11* dördlü mutantında kontrol, ABA ve flg22 uygulamaları sonucunda stoma açıklıklarının ölçümü

Yapraklarda Reaktif Oksijen Türlerinin (ROT) üretimine karıştığı düşünülen NADPH oksidazın *AtRBOH-D* ve *F* ikili mutantı test edildi. Fakat RBOH-D/F fonksiyonunun eksikliğinde, flg22 ve ABA uyarılı stoma kapanmasının önlenemediği bulunmuştur (şekil 4.12).

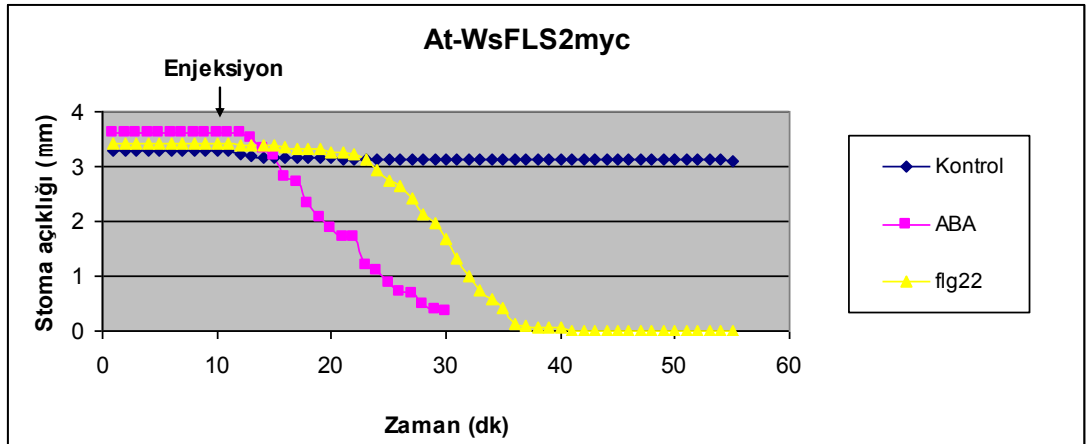


Şekil 4.12. *rbohD/F* ikili mutantında kontrol, ABA ve flg22 uygulamaları sonucunda stoma açıklıklarının ölçümü

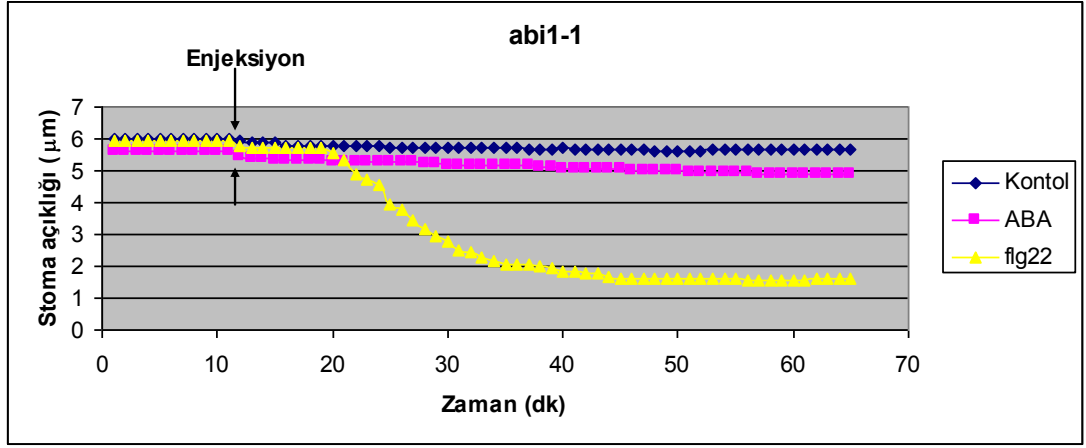


Şekil 4.13. WS-0 bitkisinde kontrol, ABA ve flg22 uygulamaları sonucunda stoma açıklıklarının ölçümü

Arabidopsis'in WS-0 ekotipinde doğal olarak FLS2 reseptörü fonksiyonel değil bu özelliğinden dolayı nano-infüzyon yöntemiyle bu ekotip test edildi. flg22'nin nano-infüzyonundan sonra stomaların kapanmadığı, fakat ABA duyarlılığının devam ettiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.13). At-WsFLS2myc mutantında ise hem flg22 hemde ABA duyarlılığının olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.14).

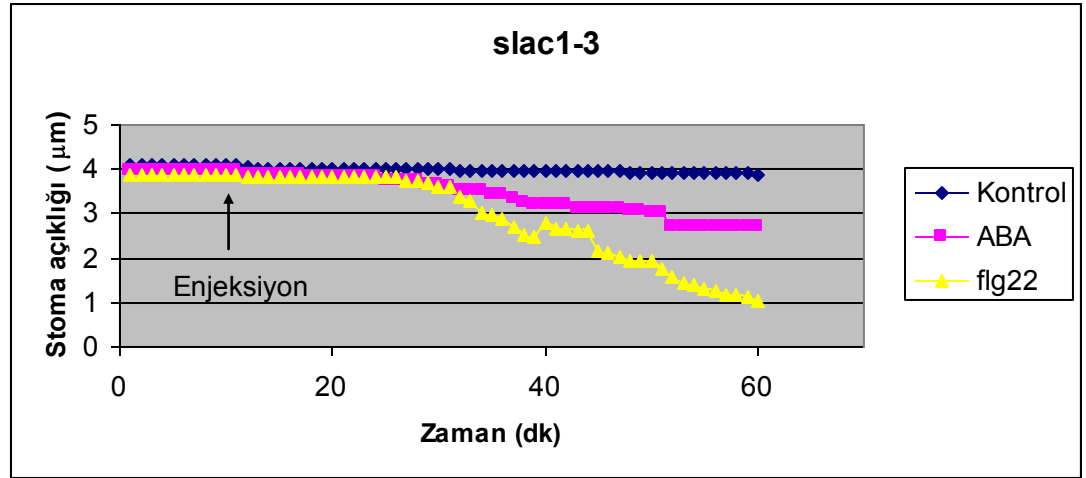


Şekil 4.14. At-WsFLS2myc mutantında kontrol, ABA ve flg22 uygulamaları sonucunda stoma açıklıklarının ölçümü



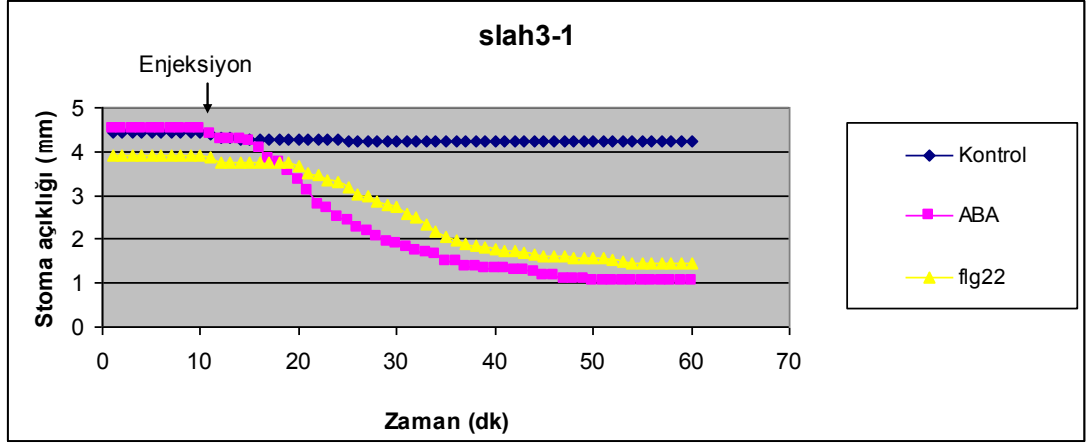
Şekil 4.15. *abi1-1* mutantında kontrol, ABA ve flg22 uygulamaları sonucunda stoma açıklıklarının ölçümü

Beklenildiği üzere ABA ile uyarıldıktan sonra *abi1-1* mutantının stoması kapanmadı. Bununla birlikte ABA-duyarsız olmasına rağmen, *abi1-1* mutantının stomasının flg22'ye karşı duyarlı olduğu bulunmuştur (Şekil 4.15).

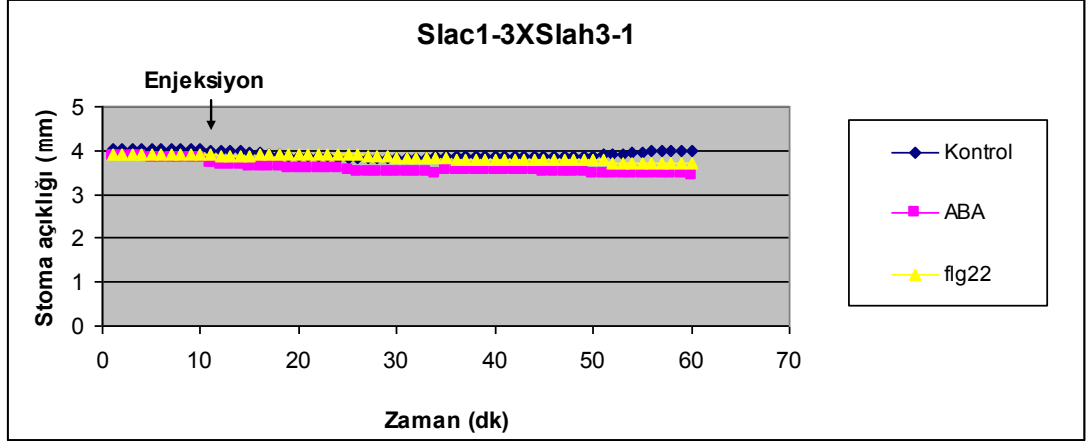


Şekil 4.16. *slac1-3* mutantında kontrol, ABA ve flg22 uygulamaları sonucunda stoma açıklıklarının ölçümü

slac1-3 ve *slah3-1* tekli mutantlarının ABA ve flg22 uygulamalarına yanıt verdiği bulunmuştur (Şekil 4.16,17). Bununla birlikte *slac1-3Xslah3-1* ikili mutantında, her iki anyon kanalının eksik olduğu mutantta flg22 ve ABA ile uyarıldıktan sonra stomanın kapanmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.18).



Şekil 4.17. *slah3-1* mutanında kontrol, ABA ve flg22 uygulamaları sonucunda stoma açıklıklarının ölçümü



Şekil 4.18. *slac1-3Xslah3-1* mutanında kontrol, ABA ve flg22 uygulamaları sonucunda stoma açıklıklarının ölçümü

Çizelge 4.1'de görüldüğü üzere *ost1-2* mutanını hariç diğer mutantların ve yabani tiplerin ABA ve flg22 uygulamalarına yanıt verdiği belirlenmiştir. Fakat bu yanıt hızı ve sürelerinin farklı olduğu gözlemlenmiştir.

- *Arabidopsis* yabani tipinde (Col-0 ve Ler) ABA ve flg22 stoma kapanmasına neden olmuştur. Fakat ABA'ye stomaların yanıtı daha hızlıdır.
- *Arabidopsis*'in *ost1-2* mutanında ABA ve flg22 uygulaması sonucu stomalar açık kalmıştır. Bu durum ABA ve flg22 uygulamasında stoma kapanması için OST 1 proteinin gerekli olduğunu göstermektedir.

- *Arabidopsis*'in *rbohD/F* (respiratory burst oxidase homolog D/F) ikili mutantında ABA ve flg22 stoma kapanmasına aynı hızda neden olmuştur.
- *Arabidopsis*'in *cpk3-5-6-11* ve *cpk4-5-6-11* dörtlü mutantlarında ABA ve flg22 stoma kapanmasına farklı hızlarda neden olmuştur.

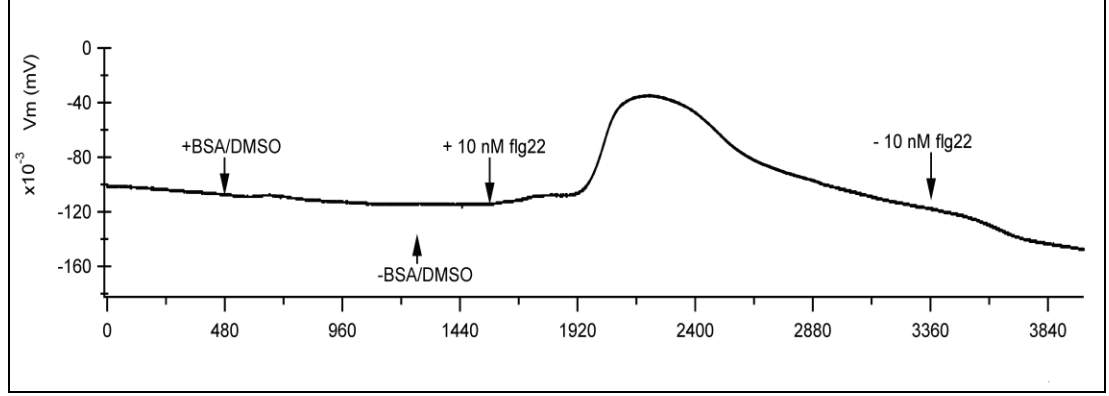
Çizelge 4.1 *Arabidopsis* ve mutanlarının flg22 ve ABA uygulamasına verdikleri yanıt sürelerinin karşılaştırılması.

	flg22	Hız/Süre	ABA	Hız/süre
<i>Wt (yabani Tip)</i>	✓	+	✓	++
<i>ost1-2</i>	—	—	—	—
<i>rbohD/F</i>	✓	++	✓	+++
<i>cpk3-5-6-11</i>	✓	++	✓	+++
<i>cpk4-5-6-11</i>	✓	+	✓	+++

4.1.2. Mikro-Elektrot Ölçümleri

4.1.2.1. Arpa bitkisinin mezofil hücrelerinde flg22 tarafından uyarılan zar potansiyeli

Tek uçlu mikro-elektrot tekniği kullanarak flg22'nin arpa bitkisinin mezofil hücrelerinde zar potansiyeli üzerine etkileri test edildi. Arpa bitkisinin mezofil hücrelerinde membran potansiyelinin -100 ile -150 mV arasında değiştiği kaydedildi. 10 nM flg22 uygulandığında arpa bitkisinin mezofil hücrelerinde geçici bir zar depolarizasyonunun (~60mV) olduğu gözlemlendi (şekil 4.19).

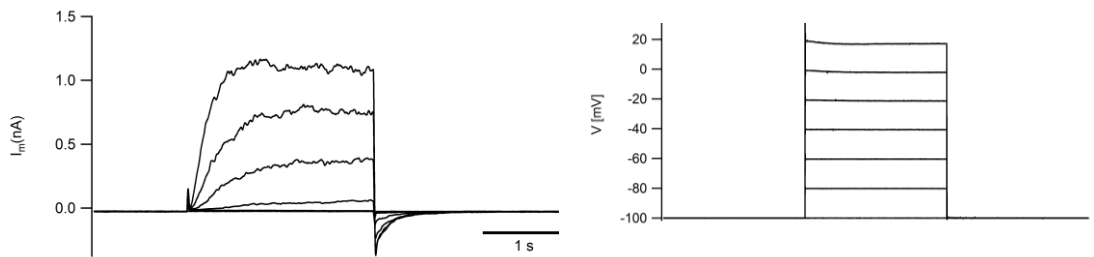


Şekil 4.19. Arpa bitkisinin mezofil hücrelerinde flg22 ve kontrol (BSA/DMSO) uygulamaları sonucunda plazma zar potansiyelindeki değişim.

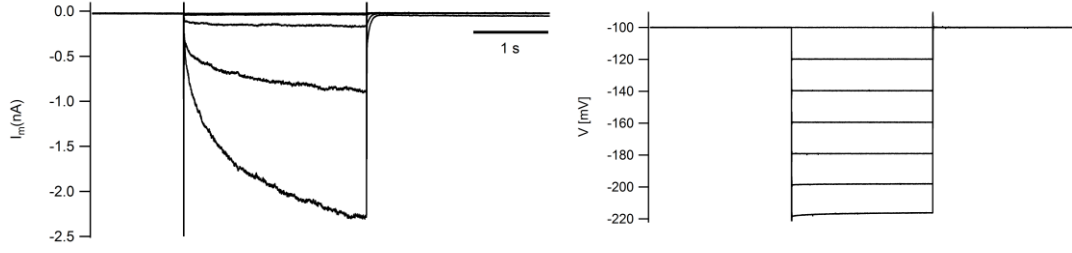
4.1.2.2. Bütünlüğü bozulmamış *Arabidopsis* stoma bekçi hücrelerinde potasyum kanal kayıtları

Aşağıdaki şekilde *Arabidopsis*'in Ler ekotipinde *Dışadoğru-Düzenlenmiş* K^+ -seçici kanalları (K^+ dışarı) ve *İçeri-Düzenlenmiş* K^+ -seçici kanalları (K^+ içeri) iki uçlu elektrodlar kullanılarak ölçüldü. Stoma bekçi hücresi -100mV da kenetlendi ve voltaj-kenetleme işleminden sonra K^+ dışarı kanallarının ölçümünü gerçekleştirmek için +40mV'a kadar akım uygulandı her bir akım 20mV luk basamaklar halinde yükseltildi (Şekil 4.20). K^+ içeri kanallarının ölçümünde yine stoma bekçi hücresi -100 mV'a kenetlendi ve kenetleme işleminden sonra basamaklar halinde -220mV'a kadar ölçüm alındı (Şekil 4.21). Her bir ölçüm basamağı 20mV olarak belirlendi.

Sonuç olarak -40 mV da bütünlüğü bozulmamış bitkilerde dışarı doğru potasyum kanallarının aktif olduğu gözlemlendi. Stomaların kapanmasına neden olan içeri doğru potasyum akışı ise - 180 mV da gerçekleşti.



Şekil 4.20. Bütünlüğü bozulmamış *Arabidopsis* Ler ekotipinde *Dışadoğru-Düzenlenmiş* K^+ -seçici kanallarının (K^+ dışarı) kinetiği ve voltaj protokolü

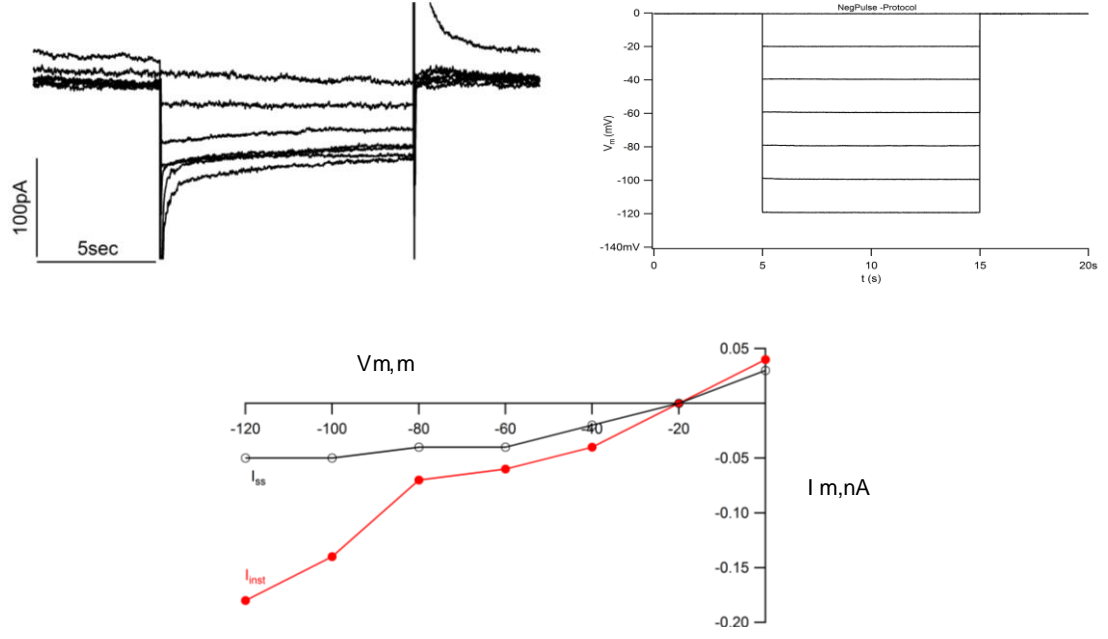


Şekil 4.21. Bütünlüğü bozulmamış *Arabidopsis* Ler ekotipinde İçedoğru-Düzenlenmiş K^+ -seçici kanallarının (K^+ içeri) kinetiği ve voltaj protokolü

4.1.2.3. Bütünlüğü bozulmamış *Arabidopsis* stoma bekçi hücrelerinde S-tip (yavaş) anyon kanal kayıtları

Bütünlüğü bozulmamış *Arabidopsis* bitkisinin yapraklarında stoma bekçi hücresinde membran potansiyeli ve iletkenliği ölçümleri çift-paralel mikroelektrot kullanılarak gerçekleştirildi. Yavaş-tip anyon kanallarının ölçümünü gerçekleştirebilmek için ölçüm elektrodu 300mM CsCl çözeltisi ile dolduruldu. CsCl çözeltisi Dışadoğru-Düzenlenmiş K^+ -seçici kanallarını (K^+ dışarı) bloke eder ve böylelikle sadece içeri doğru kanalları ve anyon kanallarının ölçümü gerçekleştirilebilir.

Yavaş-tip anyon kanallarının ölçümünü gerçekleştirebilmek için öncelikle hücre 0 mV'da kenetlendi. Bunun nedeni 0 mV'da bütün anyon kanallarının aktif olmasıdır. Daha sonra +60mV dan -120 mV'a kadar akım uygulandı. Her bir akım basamağı 20mV olarak belirlendi. Böylelikle bütünlüğü bozulmamış yavaş-tip anyon kanallarının deaktivasyon kinetiği kaydedilmiş oldu (Şekil 4.22).



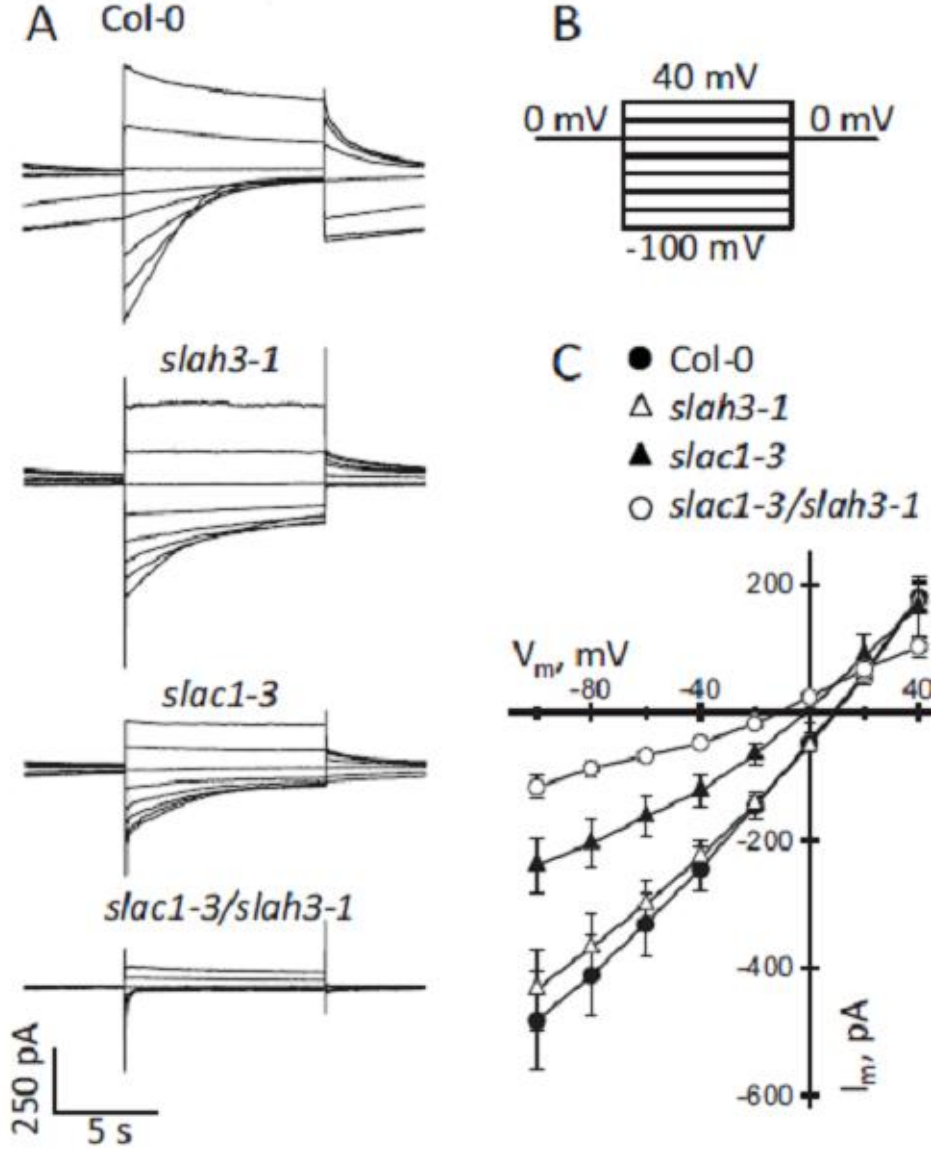
Şekil 4.22. Bütünlüğü bozulmamış *Arabidopsis* yabani tip (Col-0) stoma bekçi hücresinde yavaş-tip anyon kanallarının elektrofizyolojik kaydı, voltaj protokolü ve akım-voltaj ilişkisi

4.1.2.4. Epidermal izolasyonda *Arabidopsis* stoma bekçi hücrelerinde S-tip (yavaş) anyon kanal kayıtları

Bütünlüğü bozulmamış bitkilerdeki anyon kanal kayıtlarıyla aynı protokol kullanıldı. Epidermal izolasyon ile elde edilen bekçi hücrelerinde iki uçlu mikro-elektrot ile ölçüm gerçekleştirildi. Elektrotlarda CsCl kullanılarak K^+ dışarı doğru kanallarını bloke edilmiştir. Bekçi hücreleri 0 mV da tutuldu ve 40 mV ile -100 mV arasında voltaj uygulandı. Bu koşullar altında, yavaş tip anyon kanallarının yüksek aktivitesi ölçüldü. Kontrol (Col-0) ile karşılaştırıldığında, SLAH3 fonksiyon kaybına uğramış tekli mutantta S-tip anyon kanal iletkenliğinde önemli bir değişiklik olmazken, *slac1-3* tekli mutantında bu akım iletkenliğinin azaldığı bulunmuştur. Bununla birlikte, yinede her iki tekli mutantta halen yavaşça deaktive olan akımlar ölçülmüştür. Fakat ikili mutantta (*slac1-3Xslah3-1*) bu yanıtlar tamamen ortadan kalkmıştır. SLAC ve SLAH fonksiyon kaybına uğramış bitkilerde yavaş tip anyon kanal aktivasyonunun tamamen ortadan kalktığı bulunmuştur (Şekil 4.23).

Sonuç olarak epidermal izolasyonla elde edilen bekçi hücrelerinde yapılan anyon kanal kayıtlarının bütünlüğü bozulmamış bitkilere göre daha büyük olduğu gözlemlendi. Ayrıca epidermal izolasyonda yabani tip ve ikili mutantla yapılan test

kayıtlarında ikili mutantta tamamen yavaş-tip anyon kalan aktivitesi/deaktivitesinin kaybolduğu gözlemlendi. Bekçi hücrelerinin S-tip (yavaş) anyon kanal iletkenliğine SLAC1 ve SLAH3 her ikisinde birlikte yardım ettiği bulunmuştur (Şekil 4.23).



Şekil 4.23. Epidermal izolasyon ile elde edilen stoma bekçi hücrelerinde S-tip (yavaş) anyon kanal kayıtları. A) Yabani tip, tekli ve ikili mutantlarda S-tip anyon kanal deaktivasyon kinetiği B) voltaj protokolü C) Col-0, *slac1-3*, *slah3-1* ve *slac1-3* \times *slah3-1* bekçi hücrelerinde akım-voltaj ilişkisi

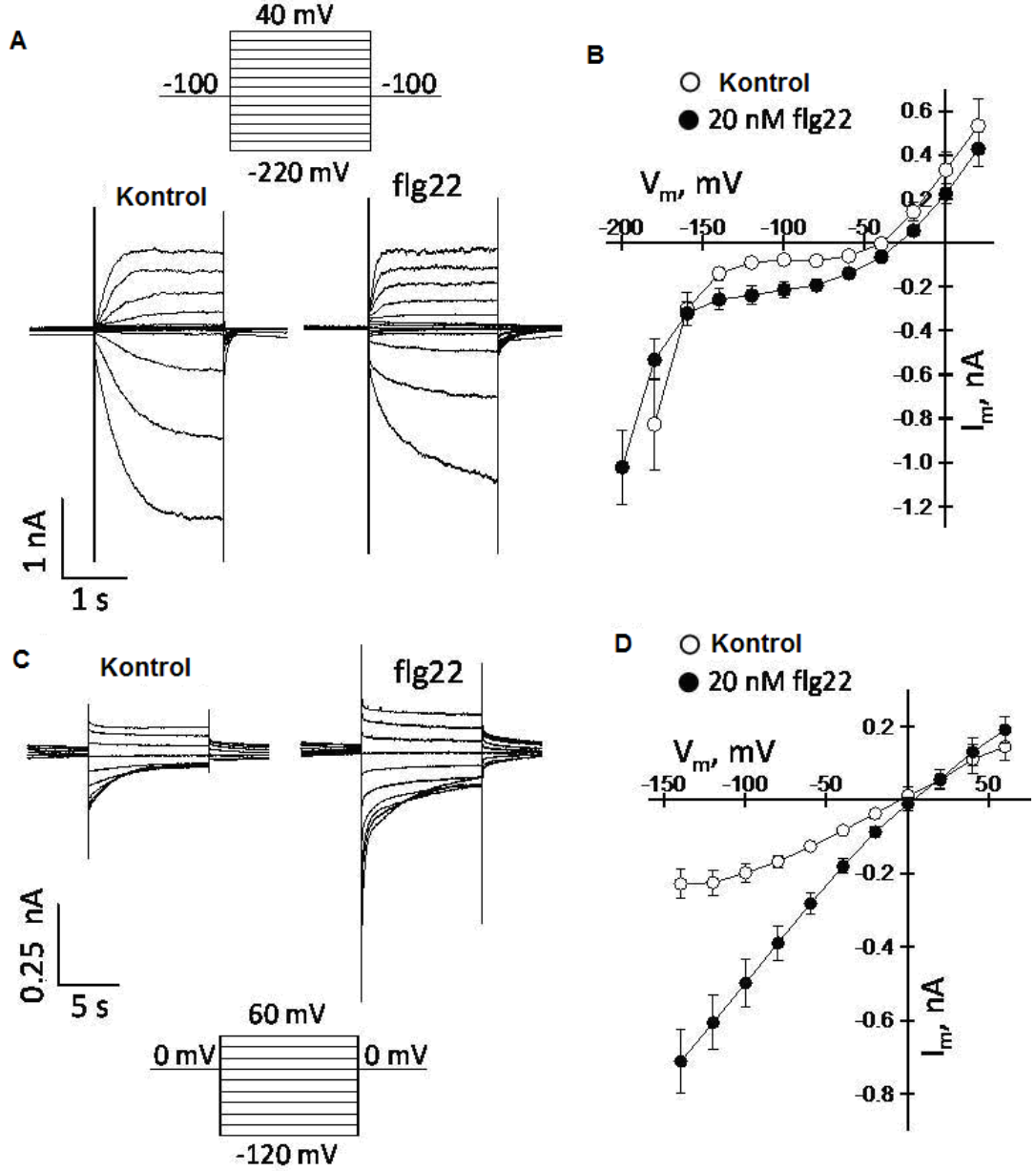
4.1.3. Nano-İnfüzyon ve Mikro-Elektrot Tekniklerinin Kombinasyonu

4.1.3.1. *Arabidopsis* stoma bekçi hücrelerinde flg22 tarafından uyarılan K⁺ iyon kanalları ve S-tip (yavaş) anyon kanal kayıtları

Flg22, K⁺ alım kanallarını inhibe ederken S-tip anyon kanallarını aktive eder

flg22'nin iyon taşınımı üzerine etkisini test etmek için bütünlüğü bozulmamış *Ler* yapraklarında stoma bekçi hücreleri iki uçlu mikro-elektrot kullanılarak ölçüldü. İlk olarak bekçi hücreleri nano-İnfüzyon tekniği ile 20 nM flg22 uygulamasına maruz bırakıldı. Daha sonra komşu stoma bekçi hücresi mikro-elektrot tekniği ile ölçüldü. Elektrotlar 300 mM KCl çözeltisi ile dolduruldu. Flg22 ile uyarıma zayıf bir şekilde K⁺ içeri doğru kanallarını inhibe etmiştir buna karşın K⁺ dışarı doğrultucu kanallar üzerine herhangi bir etkisi bulunmamıştır (Şekil4.24).

Flg22'nin nano-İnfüzyonunun -140 mV'dan -60 mV'a ulaşan potansiyellerde içeri doğru akımın artışına neden olduğu gözlemlenmiştir. Bu voltaj aralığında, K⁺ seçici kanalları (içeri veya dışarıya doğrultucu) aktif olmadığından dolayı içeri doğru akımın plazma zarı anyon kanallarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu hipotezi test etmek için anyon kanallarının aktivitesi potasyum dışarı doğrultucu kanalları inhibe eden Cs⁺ ile doldurulmuş mikro-elektrotlar ile ölçülmüştür. Bekçi hücresi plazma zarı 0 mV'da tutulmuş (kenetlenmiş) 60 mV'dan -120mV ta ulaşan voltaj uygulanmış ve bu koşullar altında S-tip anyon kanalları test edilmiştir. 20 nM flg22'nin nano-İnfüzyonunun bekçi hücrelerinde S-tip anyon kanallarının aktivasyonunu uyardığı bulunmuştur (Şekil 4.24).

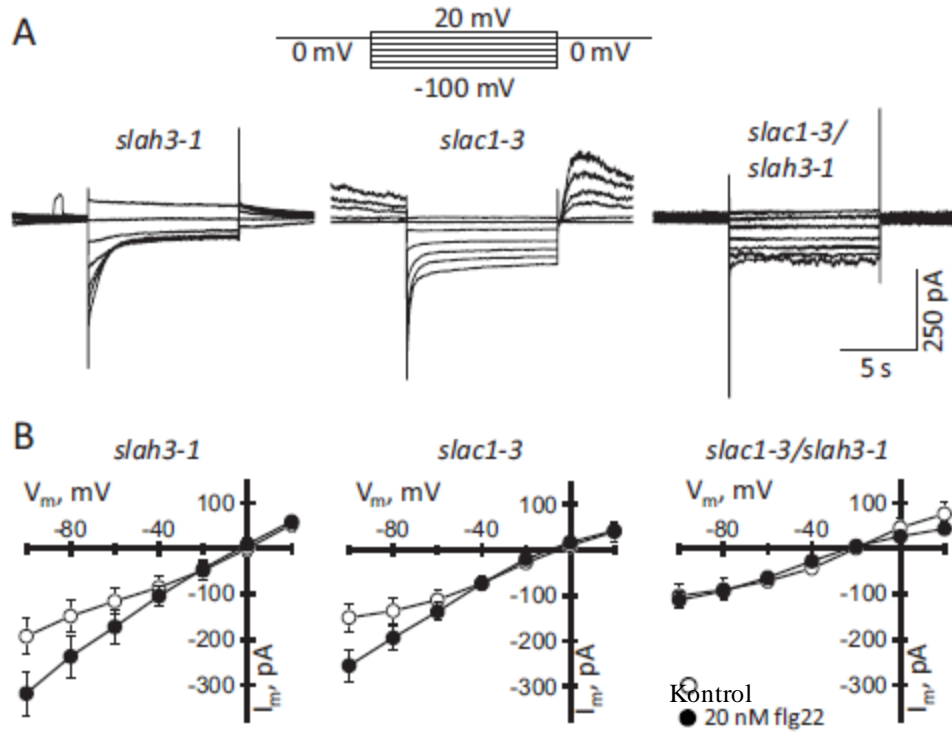


Şekil 4.24. Bütünlüğü bozulmamış bekçi hücrelerinde flg22'nin nano-infüzyonu ile uyarılan Potasyum ve S-tip anyon kanal kayıtları. Nano-infüzyon tekniği ve voltaj-kenetleme tekniğinin kombinasyonu.

4.1.3.2. *Arabidopsis* stoma bekçi hücrelerinde flg22'nin uyardığı SLAC1 ve SLAH3 S-tip anyon kanal kayıtları

Bekçi hücrelerinde iki S-tip anyon kanalının varlığından dolayı flg22'nin uyardığı anyon kanal iletkenliğinde SLAC1 ve SLAH3'ün rolü ayrı ayrı ve birlikte bütünlüğü bozulmamış *Arabidopsis* mutantlarının yapraklarında test edildi. slac1-3,

slah3-1 tekli mutantları ve slac1-3Xslah3-1 ikili mutantları 20 nM flg22 ve kontrol çözeltisi ile nano-infüzyon tekniği kullanılarak uyarıldıktan sonra elektrofizyolojik olarak ölçüldü . Epidermal izolasyon deneylerinde olduğu gibi yavaş deaktive olan S-tip anyon kanalları bütünlüğü bozulmamış bitkilerin stoma bekçi hücrelerinde de tekli mutantlarda belirlenmiştir fakat slac1-3Xslah3-1 ikili mutantında belirlenmemiştir . Flg22'nin her iki tekli mutantta S-tip anyon kanallarını aktive etme yeteneğinde olduğu bulunmuş olmasına karşın ikili mutantın (slac1-3Xslah3-1) MİMÖ-uyartısına karşın duyarsız olduğu bulunmuştur(Şekil 4.25).

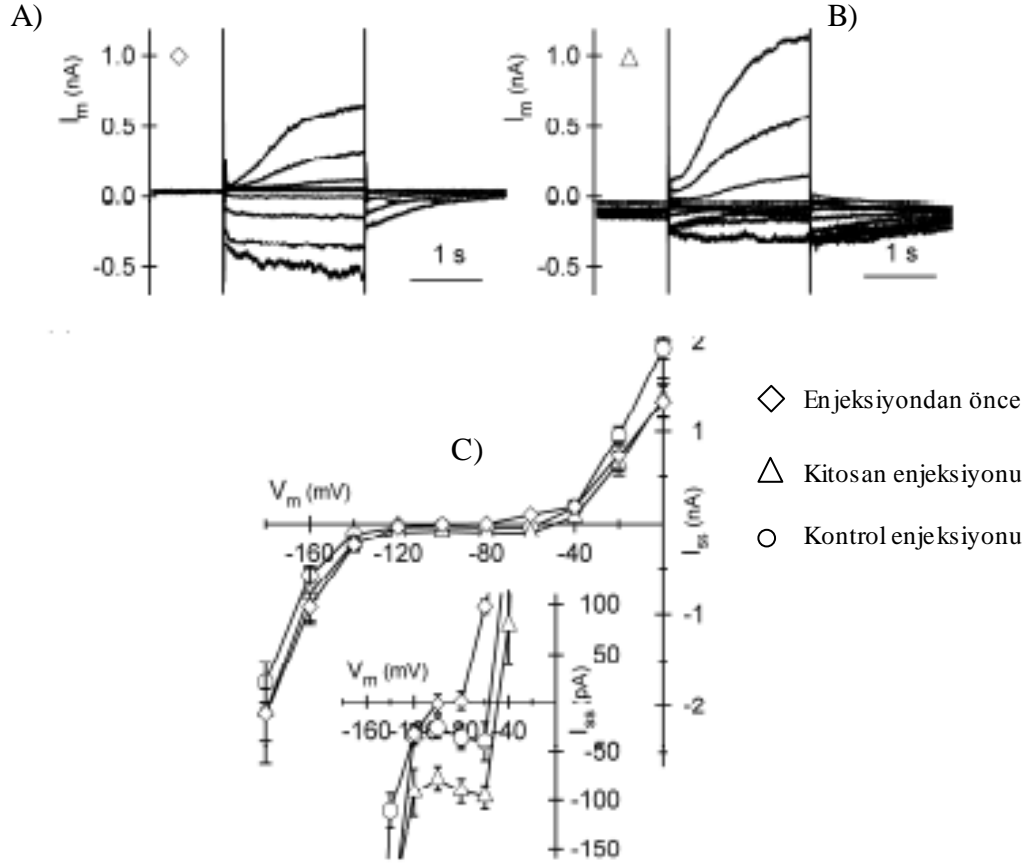


Şekil 4.25. Flg22 hem SLAC1 hemde SLAH3 aktivitesini uyarır.

4.1.3.3. Kitosanın nanoinfüzyonu ile S-tip anyon kanallarının uyarılması

Çift paralel hücre içi mikro-elektrotlar kullanılarak Arpa bitkisinin stoma bekçi hücrelerinde stoma açıklıklarındaki azalmanın mekanizması çalışıldı. Arpa bitkisinin stoma bekçi hücresi -100mV'a kenetlendi ve kenetleme işleminden sonra basamaklar halinde 20 mV dan -180 mV'a kadar ölçüm alındı. Her bir ölçüm

basamağı 20 mV olarak belirlendi. Kitosan uygulamasından sonra arpa yapraklarının stoma bekçi hücrelerinde plazma membran anyon kanallarının aktivitesinin arttığı gözlemlendi (Şekil). Kitosanın infüzyonun K^+ dışa doğrultucu kanalları ve S-tip anyon kanallarını uyardığı fakat K^+ içe doğrultucu kanalları inhibe ettiği belirlenmiştir. Kitosanın mikro-enjeksiyonu ile S-tip anyon kanallarının uyarıldığı ve bu etkinin stoma kapanmasına neden olduğu belirlendi.



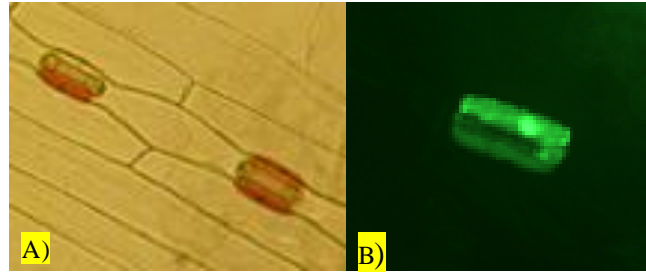
Şekil 4.26. Kitosanın nanoinfüzyonu ile S-tip anyon kanallarının uyarılması. A) enjeksiyondan önce B) kitosanın nano-infüzyonundan sonra C) akım-voltaj ilişkisi

4.1.4. Moleküler Analizler

Moleküler tekniklerden yararlanarak arpa yaprak hücrelerinde plazma zarı anyon kanallarının düzenlenmesi ve özelliklerinin belirlenmesi hedeflendi.

4.1.4.1. Bekçi hücrelerinin zenginleştirilmesi çalışmaları

Arpa bitkisinin stoma bekçi hücrelerinde anyon kanal genlerinin klonlanması amaçlanmıştır. Bu nedenle ilk olarak stoma bekçi hücrelerinin zenginleştirilmesi çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalar sırasında 100 μ M-300 μ M çaplarında farklı filtreler kullanılmış ve 2 aşamalı yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Filtre üzerindeki yeşil ve kahverengi kısımlar uzaklaştırılmış ve sadece stoma bekçi hücreleri toplanmaya çalışılmıştır. Bu ön denemeler sonucunda 300 μ M'lik filtre kullanıp 2 aşamalı yıkama yapılması sonucuna varıldı (Çizelge 4.2). Zenginleştirilen stoma bekçi hücrelerinde canlılık testleri doğal kırmızı (naturel red) ve 2',7'-Dichlorofluorescein Diacetate boyaları kullanılarak gerçekleştirildi (Şekil 4.27). Böylece zenginleştirilen stoma bekçi hücreleri mRNA izolasyonu için kullanıldı.



Şekil 4.27. Stoma bekçi hücrelerinde canlılık testi. A) doğal kırmızı boyası B) 2',7'-Dichlorofluorescein Diacetate

Çizelge 4.2. Zenginleştirilmiş bekçi hücrelerinin Axioscop2 mikroskop sonuçları

	1. Yıkama işleminde sonra 300 mikrometrelik filtreden geçirme	2. Yıkama işleminde sonra 300 mikrometrelik filtreden geçirme
Bekçi Hücreler	160 (%55)	200 (%68)
Yardımcı hücreler	37 (%12)	33 (%11)
Mezofil Hücreleri	82 (%28) (yeşil kısımlar bir pens yardımıyla uzaklaştırıldı)	58 (19) (yeşil kısımlar bir pens yardımıyla uzaklaştırıldı)
Diğer Hücreler	9 (%5) (yeşil ve kahverengi kısımlar bir pens yardımıyla uzaklaştırıldı)	6 (2) (yeşil ve kahverengi kısımlar bir pens yardımıyla uzaklaştırıldı)

4.1.4.2. Bekçi hücrelerinden mRNA izolasyonu

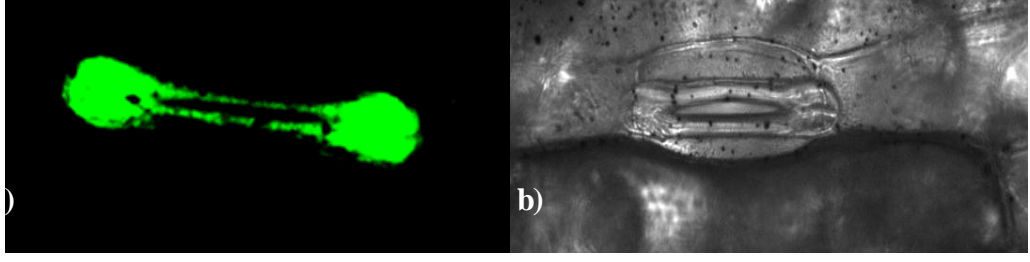
Tüm yapraktan mRNA izolasyonu yapıp anyon kanal genleri belirlenmeye çalışıldı. Ancak Bu çalışmalar sonucunda yüksek oranda kloroplast genomu bulundu. Bunun üzerine zenginleştirilmiş stoma bekçi hücrelerinden mRNA izolasyonu gerçekleştirilerek cDNA elde edildi ve *Arabidopsis*'teki anyon kanallarına homolog olan genler belirlenmeye çalışıldı. Ayrıca RACE-PCR (Rapid Amplification of cDNA Ends-PCR) deneyleri yapılarak anyon kanallarının cDNA sında N- ve C- ucu (terminal) fragmentleri incelendi. Bu çalışmalar sonucunda anyon kanal genlerinin ifadesinin çok düşük olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.28. Agaroz jel elektroforez görüntüsü. Aktin primer ile cDNA'nın kontrolü

4.1.4.3. Biyolistik yöntem ile Arpa bitkisinin stoma bekçi hücrelerine gen aktarımı

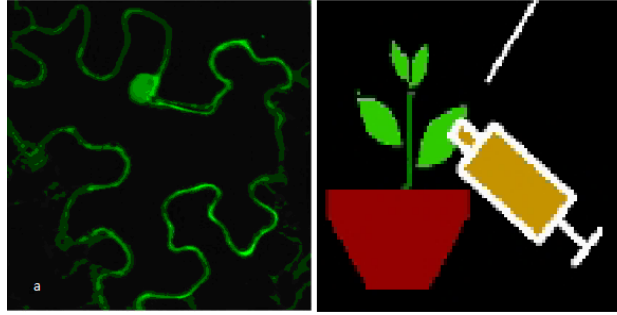
Bu deney için bütünlüğü bozulmamış arpa bitkileri kullanılmıştır. Bekçi hücrelerinde S-tip anyon kanallarının (SLAC/SLAH) aktivasyonunun belirlenmesi hedeflenmiştir. Partükül bombardman tekniğinin bütünlüğü bozulmamış bekçi hücreleri içinde genetik olarak değişmiş proteinleri ortaya çıkarabilmek için yeterli bir metod olup olmadığını test edilmesi amaçlanmıştır. Bombardmandan sonra bekçi hücrelerinin fizyolojik yanıtlar verebilme yeteneğinde olması gerekmektedir. Fizyolojik yanıtlar stomaların ışık ve karanlığa yanıt vermesi ve hareket etme yeteneğini kaybetmememesi durumudur. Bombardman sonucunda stomalar lazer tarayıcı mikroskop (LSM5 Pascal) ve Axioskop mikroskopta (Şekil 4.29) incelenmiş ve gen aktarımının başarılı olduğu gözlemlenmiştir. Yeşil floresan protein (GFP) kullanılmış ve bu genlerin ifade olduğu belirlenmiştir. Fakat stomaların gen transferinden sonra ışığa yanıt vermediği belirlenmiştir. Bu nedenle transformasyona uğramış hücrelerde elektrofizyolojik veya fizyolojik ölçümler alınamamıştır. Bu işlem açık bir şekilde bekçi hücrelerinin zarar gördüğünü ve strese maruz kaldığını göstermektedir.



Şekil 4.29. Arpa bitkisinin stoma bekçi hücrelerine biyolistik yöntem ile gen transferi. a) Stoma bekçi hücrelerinin LSM5 görüntüsü b) Axioskop mikroskop görüntüsü

4.1.4.4. Agrobacterium Aracılığıyla Transient Transformasyon

Tütün (*Nicotiana bentamiana*) ve arpa (*Hordeum vulgare ingrid.*) bitkisine *Agrobacterium* infiltrasyonu ile gen transferi çalışmaları denendi.



Şekil 4.30. *Agrobacterium* aracılığıyla gen transferi

Tüm yaprakta yapılan çalışmalarda yüksek oranda kloroplast genomuna rastlanması ve bekçi hücrelerinde yapılan çalışmalarda anyon kanal genlerinin ifadesinin çok düşük olması nedeniyle gen transferi çalışmaları gerçekleştirildi. Biyolistik yöntemde karşılaşılan sorunlardan dolayı *Agrobacterium* aracılığıyla gen transferi çalışmaları denendi fakat beklenen sonuç gözlenemedi.

4.2. TARTIŞMA

4.2.1. Nano-İnfüzyon Ölçümleri

4.2.1.1. Fungal elisitör kitosan tarafından uyarılan stoma kapanması

Pek çok mantar hücre duvarının bileşiminde bulunan ve bitki türlerinin çeşitli hücreleri tarafından tanınan kitin veya kitosan (β -1,4 glükozamin bağlantılı polimer) fragmentleri MİMÖler olarak temsil edilirler [Ryan 1987, Maffi vd., 1988, Lee vd., 1999]. Bu tez çalışmasında, arpa bitkisinin stoma hareketliliği üzerine MİMÖlerin etkisi nano-infüzyon tekniği ile test edilmiştir. Kitosan veya ilgili kitin fragmentleri belki de pirinç bitkisindeki OsCERK (kitin elisitör reseptör kinaz) reseptörleri ve protein kompleks homologları CEBİP (Chitin Elicitor Binding Protein) tarafından tanınabilirler [Shimizu vd.,2010]. Çalışmamızda günün erken saatlerinde, kitosanın hızlı stoma kapanmasını tetiklediği bulunmuştur. Yapılan çalışmada, infüzyonun kendisinin stoma açıklığı üzerine herhangi bir etkisi olmamıştır. Bu hızlı stoma kapanmasının S-tip anyon kanallarının aktivitesinin artışı ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Günün ilerleyen saatlerinde bitkilerin biyolojik ritminden dolayı yapılan enjeksiyonda stoma hassasiyetinin (duyarlılığının) arttığı düşünülmektedir.

Son zamanlarda yapılan çalışmalar, mikroorganizmalar veya MİMÖlerin stoma kapanmasını tetikleyebildiği yönünde kanıtlar sunmaktadır [Lee vd., 1999, Melotto vd., 2006, Liu vd., 2009]. Mikroorganizmaların yaprağın içine açık stomaları kullanarak girebileceği ve MİMÖlerin tanınmasıyla stomaların kapanabileceği önerilmektedir [Melotto vd., 2008]. Bulgularımız, stoma kapanmasını fungal elisitör kitosanın tetiklediğini göstermiştir ve bu sonuçlar literatür bilgilerini desteklemektedir.

4.2.1.2. Bütünlüğü bozulmamış *Arabidopsis* bitkilerinde flg22 ve ABA tarafından uyarılan stoma hareketliliği

Mikrop ile ilişkili moleküler örüntülere stoma bekçi hücrelerinin erken yanıtlarını ABA sinyali ile karşılaştırmalı olarak incelemek; sinyal zincirini daha iyi anlayabilmek için model bitki olan *Arabidopsis*'in farklı ekotiplerinde (*Col-0*, *Ler*, *Ws*) ve mutantlarında (*ost1-2*, *ckps*, *rbohD/F*, *Slac1/SLAH3*, *abi1-1*) çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar ile MİMÖler ve ABA'e bekçi hücrelerinin cevabında hangi sinyal bileşenlerinin paylaşıldığının ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.

MİMÖler ve ABA'e bekçi hücrelerinin yanıtları benzerlikler gösterir; her ikisi de S-tip anyon kanallarını uyarmakta ve hızlı stoma kapanmasına neden olmaktadır (Roelfsema vd.,2004, Pei vd., 1997). *Arabidopsis*'in yabani tipleriyle (*Col-0* ve *Ler*) yaptığımız çalışmalarda daha önceki çalışmaları destekler nitelikte stoma bekçi hücrelerinin hem flg22 hemde ABA uygulamasına benzer yanıtlar verdiği gözlemlendi. Flg22 uygulanan bitkilerde stoma kapanmasının ABA uygulanan gruplara göre daha yavaş olduğu ve geç başladığı belirlenmiştir. Bunun nedeni MİMÖ ve ABA sinyalinin reseptör düzeyinde farklı olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. MİMÖ reseptörleri hücre dışı bağlanma bölgesine sahip olmakla birlikte [Boller ve Felix, 2009], ABA sitosolik reseptörlere bağlanır [Park vd., 2009, Ma vd., 2009]. Bu farklılıklara rağmen, reseptörlerden sonraki sinyal zincirinde benzer bileşenleri paylaştığı görülmektedir.

Felix vd. [1999] ve Jeworutzki vd. [2010] yaptıkları çalışmalarda FLS2 reseptörü için flg22'nin en az 10 nM'lık konsantrasyonun çalışmalar için yeterli olduğunu göstermişlerdir. Bu nedenle çalışmamızda flg22'nin konsantrasyonunu 20 nM olarak belirlendi ve böylece FLS2 reseptörü tamamen uyarılmış oldu. Referans olarak, stomalar ayrıca stres hormonu ABA ile uyarılmıştır, ABA'nın tamamen hücrelerde aktif olduğu konsantrasyon 10 µM olarak uygulanmıştır [Roelfsema vd., 2006, Roelfsema ve Prins 1995]. Hem ABA hemde flg22 uygulaması yabani tiplerde farklı geçikme sürelerinde stoma kapanmasına neden olmuştur. Bu süre ABA uygulaması için 7 dk, flg22 uygulaması için ise 17 dk olarak bulunmuştur.

Flg22-uyarılı stoma kapanması FLS2 reseptörüne bağlıdır, bu da BAK1 ve SERKs homoloğu ile [Chinchilla vd., 2009] ilişkidir. Bekçi hücrelerinde, flagellin reseptör kompleksinin hedefi OST1 olarak görünmektedir [Roelfsema vd., 2012]. Çalışmamızda, *ost1-2* mutant bitkisinin yaprakları içine açık stoma aracılığıyla ABA, flg22 ve kontrol uygulamalarının stoma kapanmasına neden olmadığı bulunmuştur. Bu da bize Flg22 veya ABA tarafından uyarılan stoma kapanması için protein kinaz OST1'in gerekli olduğunu göstermektedir.

Arabidopsis'in *WS-0* ekotipinde doğal olarak FLS2 reseptörü fonksiyonel değildir [Gomez-Gomez vd., 1999]. Bu özelliğinden dolayı bu ekotip nano-infüzyon yöntemiyle test edildi. Flg22'nin nano-infüzyonundan sonra stomaların kapanmadığı, fakat ABA duyarlılığının devam ettiği gözlemlenmiştir. *At-WsFLS2myc* mutantında [Zipfel vd., 2004] ise hem flg22 hem de ABA duyarlılığının olduğu belirlenmiştir. Elde ettiğimiz bu veriler flg22-uyarılı stoma kapanması için FLS2 reseptörünün mutlak gerekli olduğunu, fakat ABA yanıtı için gerekli olmadığını göstermiştir. Bu sonuçlar daha önceki çalışmaları destekler niteliktedir.

ABA sinyal yolağında, OST1 ABI1'i içeren 2C Protein Fosfatazın bir sınıfı tarafından inhibe edilir [Cutler vd.,2010]. *abil-1* mutantında, ABI1 OST1'i inhibe ettiği [Gosti vd., 1909, Vlad vd.,2009] ve ABA'in uyardığı SLAC1 [Geiger vd.,2009, Lee vd., 2009] ve SLAH3 [Geiger vd., 2011] aktivasyonun uyarılmasını engellediği bilinmektedir. Çalışmamızda beklenildiği üzere, *abil-1*'in stoması ABA ile uyarıldıktan sonra kapanmamıştır. Bununla birlikte, ABA-duyarsızlığına rağmen, *abil-1*'in stomasının flg22'ye karşı duyarlı olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlar, bekçi hücrelerinde flg22 ve ABA sinyal yolağının OST1 düzeyinde bulunduğunu önermektedir.

Kalsiyum bağımlı protein kinazlar (CPKs = cpk3,6,21,23) bekçi hücre ABA sinyalini de içermektedir [Geiger vd.,2011. Scherzer vd., 2012]. Kalsiyum bağımlı protein kinazlar (CPK4, 5, 6 ve 11) NADPH oksidaz ile Reaktif Oksijen Türlerinin (ROT) üretimini uyararak flg22 için gereklidir [Boudsocq vd., 2010, Dubiella vd., 2013]. Bu alandaki güncel bilgilere dayanarak, CPKs, ROT-üretimi ve flg22-uyarılı anyon kanallarının aktivasyonunun birbirleriyle ilişkili olduğu beklenmektedir. Bununla birlikte, yaptığımız çalışmalarda, flg22'nin halen cpk3,5,6,11 ve cpk4,5,6,11 dördümlü mutantlarında stoma kapanmasına neden olduğu bulunmuştur. Bu

sonuçlar 34 üyeli gen ailesinin diğer CPK üyelerinin flg22 ile uyarılan S-tip anyon kanallarının aktivasyonunda rol alabileceğini önermektedir [Boudsocq ve Sheen,2013].

Çalışmamızda ayrıca yaprakların ROT üretimini, bekçi hücrelerinin flg22 ve ABA yanıtlarını kapsayan NADPH oksidazlar, *AtRBOH-D* ve *F* fonksiyon kaybına uğramış ikili mutantında test edildi [Park vd., 2009, Macho vd., 2013]. Tıpkı *cpk* dördü mutanlarındaki gibi, RBOH-D/F fonksiyon kaybı flg22-uyarılı stoma kapanmasını engellemedi. Flg22 ve ABA *Arabidopsis* NADPH oksidaz ikili mutanta (*rbohD/F*= respiratory burst oxidase homolog D/F) stoma kapanmasını uyarmıştır.

Bekçi hücrelerinde iki S-tip anyon kanalının varlığından dolayı çalışmamızda flg22 ve ABA uygulamalarının SLAC1 ve SLAH3 üzerine etkileri test edildi. *slac1-3* ve *slah3-1* tekli mutantlarının yaprakları içine 20 nM flg22'nin nano-infüzyonu stoma kapanmasına neden olmuştur, fakat stomalar tamamen kapanmamıştır. Çalışmamızda, SLAC1 ve SLAH3 kanallarının her ikisinin de kaybı sonucunda, flg22 uyarısına karşı stomaların tamamen duyarsız olduğu gözlemlenmiştir. ABA uygulaması da flg22 uygulamasına benzer sonuçlar vermiştir. *slac1-3* tekli mutantının ABA uygulamasına *slah3-1* tekli mutantına göre daha az duyarlı olduğu gözlemlenmiştir. Fakat hem SLAC1 hemde SLAH3 fonksiyon kaybına uğramış mutantların stomalarının ABA'ye yanıt vermediği belirlenmiştir. Roelfsema vd'nin [2012] *Arabidopsis* bitkisinde yaptıkları çalışmalarda S-tip anyon kanalları SLAC1 ve SLAH3'ün stoma kapanmasında anahtar rol oynayabileceği önerilmiştir. Bu tez çalışmasından elde edilen bulgular literatür bilgilerini desteklemektedir.

4.2.2. Mikro-Elektrot ve Nano-İnfüzyon Ölçümleri

Bütünlüğü bozulmamış *Arabidopsis* yapraklarının bekçi hücrelerinde, bakteriyel MİMÖ flg22 iki S-tip anyon (SLAC1 ve SLAH3) kanalını aktive eder. Bu her iki kanalın kaybı stomaları MİMÖ'ye duyarsız kılar. Bu veriler S-tip anyon kanallarının fonksiyonunun patojen-nedenli stoma kapanması için kilit olduğunu göstermektedir. Koers vd [2011] , Roelfsema vd'nin [2012] çalışmaları bunu desteklemektedir [Koers vd.,2011, Roelfsema vd.,2012]. Bekçi hücrelerinde S-tip anyon kanalları, stoplazmadan hücre duvarına anyonların salınımına neden olur ve bu da plazma zarını depolarize eder [Roelfsema ve Hedrich, 2005]. Depolarizasyondan dolayı, ayrıca bekçi hücrelerinde K⁺ iyonları K⁺ dışa doğrultucu kanallar boyunca dışarı çıkar ve böylece bekçi hücreleri osmolit kaybeder, büzülür ve sonunda stoma açıklığı kapanır.

OST1, SLAC1 anyon kanalını doğrudan aktifleştirebilir [Geiger vd., 2009, Lee vd., 2009], fakat SLAH3 anyon kanalını hedeflemez [Geiger vd., 2011]. Bu nedenle SLAH3 kanalı alternatif bir sinyal mekanizmasıyla uyarılmak zorundadır. Grup1 ve grup 2'deki birçok kalsiyum bağımlı protein kinazların (CPKs) hem SLAH3 hem de SLAC1 anyon kanallarını aktifleştirdiği gösterilmiştir [Boudsocq ve Sheen, 2013]. Çalışmamızda, bu protein kinaz ailesinin üyelerinin OST1 bağımlı yol ile flg22 tarafından uyarıldığı gösterilmiştir.

Arpa bitkisinin bekçi hücrelerinde, fungal MİMÖ kitosanın plazma zarı S-tip anyon kanallarını aktive ettiği çalışmamızda gösterilmiştir. *Arabidopsis* bitkisinde de, SLAC1 ve SLAH3 S-tip anyon kanalları stoma kapanmasında anahtar rol üstlenmektedir. Roelfsema ve ark. [2012] stres hormonu ABA tarafından uyarılan stoma kapanmasında bu iyon kanallarının anahtar rol oynadığını öne sürmüşlerdir. Bu tez çalışması da bunu destekler niteliktedir.

MİMÖ'ler ve sinyal yolları tarafından hedeflenen iyon kanallarının ortaya çıkarılması patojen savunmasının erken safhalarında yeni bakış açıları sağlayabilir. Bekçi hücrelerinin MİMÖ yanıtları bakterilerin sadece stomalar aracılığıyla girişine olanak sağlamaz, aynı zamanda iyon taşınımının patojen-bağımlı düzenlenmesi için planlayıcı olarak hizmet edebilir. Jeworutzki vd. [2010] mezofil ve kök hücrelerinde yaptıkları çalışmalarda, flg22'nin bekçi hücrelerindeki yanıtla benzer bir şekilde

depolarizasyona neden olduğunu bildirmişlerdir. Bu tez çalışmasında da arpa bitkisinin mezofil hücrelerinde flg22 uygulamasının benzer bir şekilde zar depolarizasyonuna neden olduğubelirlendi. Bununla birlikte, OST1 mezofil hücreleri ve kök tüyü hücrelerinde ifade olmaz ve OST1'in anahtar fonksiyonu SnRK2.2/2D ve SnRK2.3/2I protein kinaz homologları gibi diğer proteinler tarafından yapılmaktadır [Fujii ve Zhu, 2009, Fujita vd., 2009]. Erken patojen savunma yanıtlarının özellikleri ve hücre tipi spesifik farklılıklarının anlaşılması patojen direncinin sağlanmasında yeni stratejiler bulunmasına yardımcı olabilir. Uzun vadede, bu araştırma hattı patojenik mikroplara karşı direnç geliştiren bitkilerin üretimini destekleyebilir. Bulgularımız, stoma kapanmasını sadece fungal elisitörlerin değil aynı zamanda bakteriyel elisitörlerin de tetiklediğini göstermiştir.

4.2.3.Moleküler Analizler

Moleküler tekniklerden yararlanarak arpa yaprak hücrelerinde plazma zarı anyon kanallarının düzenlenmesi ve özelliklerinin belirlenmesi hedeflendi. Bu amaçla, tüm yapraktan mRNA izolasyonu gerçekleştirilerek cDNA elde edildi ve *Arabidopsis*'teki anyon kanallarına homolog olan genler belirlenmeye çalışıldı. Bu çalışmalar sonucunda yüksek oranda kloroplast genomu bulundu. Bunun üzerine stoma bekçi hücrelerinin zenginleştirilmesi çalışmaları gerçekleştirildi ve bu bağlamda başarılı olundu. Fakat elde edilen sonuçlarda anyon kanal genlerinin ifadesinin çok düşük olduğu belirlendi.

Bunun üzerine, Arpa bitkisinde gen aktarım çalışmaları yapıldı. Biyolistik yöntem ve *Agrobacterium* aracılığıyla gen transfer teknikleri denendi. Moleküler çalışmalar sonucunda RNA izolasyonları ve gen aktarımı başarılı oldu. Fakat gen aktarımı sonucunda hücreler mikroskop altında incelendiğinde aşırı strese maruz kaldıklarından dolayı herhangi bir fizyolojik yanıt gözlemlenemedi.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasından elde edilen bulgulara göre;

- ✓ Bitkiler yaşamları süresince birçok biyotik ve abiyotik stres koşullarına maruz kalırlar.
- ✓ Enfeksiyon esnasında, bitkiler Mikrob İlişkili Moleküler Örüntülerin tanınması için doğal bağışıklık yanıtları geliştirirler.
- ✓ Bu yanıtlardan birisi yaprak yüzeyinde bulunan stoma açıklıklarının mikropların girişini engellemek üzere kapanmasıdır.
- ✓ Bu yanıtların moleküler mekanizması ve ABA sinyali ile ilişkisi non-invazif nano-infüzyon tekniği ve mikroelektrotlar kullanılarak çalışılmıştır. Stoma hareketliliği zamana bağlı olarak çalışıldı ve ImageJ programı kullanılarak stoma açıklıkları ölçüldü.
- ✓ Bu tez çalışmasında özellikle ülkemiz ve dünyamız için ekonomik ve tarımsal önemi olan Arpa bitkisi ve bitki biyolojisinde model bitki olarak kullanılan *Arabidopsis* bitkileri seçilmiştir. Böylelikle çalışmadan elde edilen verilerin hem temel bilimlere hem de tarıma katkı sağlayacağı düşünülmektedir.
- ✓ Arpa bitkisinin bekçi hücrelerinde, fungal MİMÖ kitosanının stoma kapanmasına neden olduğu bulunmuştur.
- ✓ Çalışmamızda, fungal elisitör kitosanının plazma zarı S-tip anyon kanallarını aktive ettiği gösterilmiştir.
- ✓ Mikrop ile ilişkili moleküler kalıplara stoma bekçi hücrelerinin erken yanıtlarını ve sinyal zincirini daha iyi anlayabilmek için model bitki olan *Arabidopsis*'in farklı ekotiplerinde (*Col-0*, *Ler*) ve mutantlarında (*ost1-2*, *ckps*, *rbohD/F*, *slac1/slah3*, *abil-1*) çalışmalar gerçekleştirildi. Böylece stoma bekçi hücrelerinin yanıtları altında yatan moleküler mekanizmaların ortaya konması amaçlanmıştır.
- ✓ Çalışmamızda, *Arabidopsis* bitkisinde S-tip anyon kanalları SLAC1 ve SLAH3'ün stoma kapanması için anahtar bir rol oynadığı önerilmektedir. Her iki kanalın aktivasyonu stres hormonu ABA tarafından uyarılan stoma kapanması için gereklidir.

- ✓ Protein kinaz OST1 bekçi hücre ABA sinyalinde merkezi bir rol oynamaktadır
- ✓ Bulgularımıza göre, OST1 hem ABA-nedenli stoma kapanması hem de 20 nM flg22 uygulamasında bekçi hücrelerinin hızlı yanıtı için mutlak gereklidir. flg22 uygulanan bitkilerde stoma kapanmasının ABA uygulanan gruplara göre daha yavaş olduğu ve daha geç başladığı gözlemlendi.
- ✓ Çalışmamızda, flg22'nin S-tip anyon kanallarını aktifleştirdiği ve K⁺ içeri doğru kanallarını inhibe ettiği belirlenmiştir.
- ✓ Flg22, S-tip anyon kanalları SLAC1 ve SLAH3'ü uyarmaktadır.
- ✓ Sinyal mutantları ile yapılan sonuçlara dayanarak, ABA ve flg22'nin bekçi hücre sinyal zincirlerinde reseptör ile ilgili olarak farklı olduğunu, fakat OST1 protein kinaz düzeyinde birleştiği gösterildi.

Sonuç olarak; gerek ABA ve gerekse farklı elisitör (kitosan, flg22) uygulamalarının bitkilerin biyotik ve abiyotik stres koşullarında stomaların açılıp kapanma mekanizmasını kontrol ettiği ve strese toleranslı türlerde stres koşullarında ortaya çıkacak zararların ortadan kaldırılmasında önemli bir etkiye sahip olduğu düşünülmektedir. Biyotik ve abiyotik stres koşullarında stomaların ve anyon kanallarının rolü oldukça önemlidir. Bu roller farklı mutantlar kullanılarak gösterilmiştir. Stres tolerans mekanizmalarının ayrıntılı olarak ortaya konulması ve sinyal yollarının belirlenmesi bitki biyoteknolojisi çalışmalarına ışık tutacaktır.

Erken patojen savunma yanıtlarının özelliklerinin ve hücreye özgü spesifik farklılıklarının anlaşılması patojen direncinin sağlanmasında yeni stratejiler bulunmasına yardımcı olabilir. Ayrıca, bu çalışmanın verileri mikroplara karşı direnç geliştiren bitkilerin üretimini destekleyebilir.

KAYNAKLAR

- Anderson J.A., Huprikar SS, Kochian LV, Lucas WJ, Gaber RF., “Functional expression of probable *Arabidopsis thaliana* potassium channel in *Saccharomyces cerevisiae*”, Proceedings of the National Academy of Science of USA, 89: 3736-3740, (1992).
- Assmann SM., “Open stomata opens the door to ABA signaling in *Arabidopsis* guard cells”, Trends Plant Sci., 8: 151–153, (2003).
- Bartnicki-Garcia S., “Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi”, Annual Review of Microbiology, 22: 87–108, (1968).
- Blatt MR., “Electrical characteristics of stomatal guard cells: the ionic basis of the membrane potential and consequence of potassium chloride leakage from microelectrodes”, Planta, 170, 272-287, (1988).
- Blume, B., Nurnberger, T., Nass, N. and Scheel, D., “Receptor-mediated increase in cytoplasmic free calcium required for activation of pathogen defense in parsley”, Plant Cell, 12, 1425-1440, (2000).
- Boller, T. and Felix, G., “A renaissance of elicitors: Perception of microbe associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors”, Annual Review of Plant Biology, 60, 379-406, (2009).
- Boudsocq M and Sheen J., “CDPKs in immune and stress signaling”, Trends Plant Sci., 18(1): 30-40, (2013).
- Boudsocq, M., Willmann, M.R., McCormack, M., Lee, H., Shan, L.B., He, P., Bush, J., Cheng, S.H. and Sheen, J., “Differential innate immune signalling via Ca²⁺ sensor protein kinases”, Nature, 464(7288), 418-422, (2010).
- Brandt, B., Brodsky, D.E., Xue, S., Ne “Reconstitution of abscisic acid activation of SLAC1 anion channel by CPK6 and OST1 kinases and branched ABI1 PP2C phosphatase action”, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 109, 10593-10598, (2012).
- Chen, Y.H., et al. “Homologue structure of the SLAC1 anion channel for closing stomata in leaves”, Nature, 467: 1074–1157, (2010).
- Chinchilla D, Shan L, He P, de Vries S, and Kemmerling B., “One for all: the receptor-associated kinase BAK1”, Trends Plant Sci., 14(10): 535-541, (2009).
- Chinchilla, D., Zipfel, C., Robatzek, S., Kemmerling, B., Nürnberger, T., Jones, J. D. G., Felix, G. and Boller, T., “A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence”, Nature, 448: 497–500, (2007).

- Cole, K.S., “Dynamic electrical characteristics of the squid axon membrane”, *Arch.Sci.Physiol.*, 3: 253-258, (1949).
- Cutler SR, Rodriguez PL, Finkelstein RR, and Abrams SR Abscisic Acid: Emergence of a Core Signaling Network. *Annual Review of Plant Biology*, Vol 61, *Annual Review of Plant Biology*, eds Merchant S, Briggs WR, & Ort D (Annual Reviews, Palo Alto), 61: 651-679, (2010).
- Cutler SR, Rodriguez PL, Finkelstein RR, Abrams SR., “Abscisic acid: emergence of a core signaling network”, *Annu. Rev. Plant. Biol.*, 61: 651–679, (2010).
- Diatloff, E., Roberts, M., Sanders, D. and Roberts, S. K. “Characterization of anion channels in the plasma membrane of *Arabidopsis* epidermal root cells and the identification of a citrate-permeable channel induced by phosphate starvation”, *Plant Physiol.*, 136: 4136–4149, (2004).
- Dietrich, P. and Hedrich, R., “Anions permeate and gate GCAC1, guard cells”, *EMBO J.*, 12: 897–901, (1998).
- Dubiella U, Seybold H, Durian G, Komander E, Lassig R, Witte C-P, Schulze WX, and Romeis T., “Calcium-dependent protein kinase/NADPH oxidase activation circuit is required for rapid defense signal propagation”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 110(21): 8744-8749, (2013).
- Felix, G., Duran, J. D., Volko, S. and Boller, T., “Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin”, *Plant J.*, 18, 265-276, (1999).
- Felle, H.H., Herrmann, A., Hanstein, S., Hüchelhoven, R., Kogel, K., “Apoplastic pH Signaling in Barley Leaves Attacked by the Powdery Mildew Fungus *Blumeria graminis* f. *sp. hordei*” *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17 (1):118-123, (2004).
- Frachisse, J.M., Thomine, S., Colcombet, J., Guern, J. and -Brygoo H. B., “Sulfate is both a substrate and an activator of the voltage-dependent anion channel of *Arabidopsis* hypocotyl cells”, *Plant Physiol.*, 121: 253–261, (1999).
- Fujii H and Zhu JK., “*Arabidopsis* mutant deficient in 3 abscisic acid-activated protein kinases reveals critical roles in growth, reproduction, and stress”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 106(20): 8380-8385, (2009).
- Fujii H, Chinnusamy V, Rodrigues A, Rubio S, Antoni R, Park SY, Cutler SR, Sheen J, Rodriguez PL, Zhu JK., “In vitro reconstitution of an abscisic acid signalling pathway”, *Nature*, 462: 660–664, (2009).
- Fujita Y, Nakashima K, Yoshida T, Katagiri T, Kidokoro S, Kanamori N, Umezawa T, Fujita M, Maruyama K, Ishiyama K, Kobayashi M, Nakasone S, Yamada K, Ito T, Shinozaki K, and Yamaguchi-Shinozaki K., “Three SnRK2 Protein

- Kinases are the Main Positive Regulators of Abscisic Acid Signaling in Response to Water Stress in *Arabidopsis*", *Plant Cell Physiol.*, 50(12): 2123-2132, (2009).
- Geiger, D., Maierhofer, T., Al-Rasheid, K.A.S., Scherzer, S., Mumm, P., Liese, A., Ache, P., Wellmann, C., Marten, I., Grill, E., Romeis, T. and Hedrich, R., "Stomatal closure by fast abscisic acid signaling is mediated by the guard cell anion channel SLAH3 and the receptor RCAR1", *Science Signaling*, 4(173), p. ra32, (2011).
- Geiger, D., Scherzer, S., Mumm, P., Marten, I., Ache, P., Matschi, S., Liese, A., Wellmann, C., Al-Rasheid, K.A.S., Grill, E., Romeis, T. and Hedrich, R., "Guard cell anion channel SLAC1 is regulated by CDPK protein kinases with distinct Ca²⁺ affinities", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 107, 8023-8028, (2010).
- Geiger, D., Scherzer, S., Mumm, P., Stange, A., Marten, I., Bauer, H., Ache, P., Matschi, S., Liese, A., Al-Rasheid, K.A.S., Romeis, T. and Hedrich, R., "Activity of guard cell anion channel SLAC1 is controlled by drought-stress signaling kinase-phosphatase pair", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 106, 21425-21430, (2009).
- Goldman, D.E., "Potential, impedance and rectification in membranes", *J. Gen. Physiol.*, 27: 37-60, (1943).
- Gomez-Gomez, L. and Boller, T., "FLS2: An "LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*", *Mol. Cell.*, 5, 1003-1011, (2000).
- Gomez-Gomez, L., Felix G, Boller, T., "A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*", *Plant J.* 18 (3):277-284, (1999).
- Gosti F, Beaudoin N, Serizet C, Webb AAR, Vartanian N, and Giraudat J., "ABI1 protein phosphatase 2C is a negative regulator of abscisic acid signaling", *Plant Cell*, 11(10): 1897-1909, (1999).
- Grobler, J., Bauer, F., Subden, R. E., and van Vuuren, H. J. J., "The *mae1* gene of *Schizosaccharomyces pombe* encodes a permease for malate and other C-4 dicarboxylic acids" *Yeast*, 11: 1485–1491, (1995).
- Gustavo e. Gudesblat, Pablo S. Torres and Adrian A. vojnov, "Stomata and pathogens Warfare at the Gates", *Plant Signaling & Behavior*, 4(12): 1114-1116, (2009).
- Guzel Deger A., Scherzer S., Nuhkat M., Kollist H., Brosche M., Unyayar S., Boudsocq M., Hedrich R. and Roelfsema MRG., "Guard cell SLAC1-type anion channels control flagellin-induced stomatal closure", (2013) (İnceleme).

- Hanstein, S.M. and Felle, H.H., "Nanoinfusion: an integrating tool to study elicitor perception and signal transduction in intact leaves". *New Phytol.*, 161, 595-606, (2004).
- Hedrich R, Busch H, Raschke K., "Calcium ion and nucleotide dependent regulation of voltage dependent anion channels in the plasma membrane of guard cells", *EMBO Journal*, 9: 3889–3892, (1990).
- Hedrich R., "Ion channels in plants". *Physiol Rev.* 92(4):1777-811, (2012).
- Hedrich R, Moran O, Conti F, Busch H, Becker D, Gambale F, Dreyer I, Kuch A, Neuwinger K, Palme K., "Inward rectifier potassium channels in plants differ from their animal counterparts in response to voltage and channel modulators", *Eur. Biophys J.*, 24: 107–115, (1995).
- Hedrich, R, Marten, I., Lohse, G., Dietrich, P., Winter, H., Lohaus, G., and Heldt, H.-W., "Malate-sensitive anion channels enable guard cells to sense changes in the ambient CO₂ concentration", *Plant Journal*, 6: 741–748, (1994).
- Hedrich, R. and Marten, I., "Malate-induced feedback regulation of plasma membrane anion channels could provide a CO₂ sensor to guard cells", *EMBO J.*, 12: 897-901, (1993).
- Hetherington AM, Woodward FI. "The role of stomata in sensing and driving environmental change", *Nature*. Aug 21;424(6951):901-8, (2003).
- Hille B., "Ionic Channels of Excitable Membranes 2nd ed", Sinauer Associated, Inc., Sunderland, Massachusetts, 607 s., (1940).
- Hodgkin, A.L., Huxley, A.F., Katz, B., "Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of *Loligo*", *J.Physiol. Lond.*, 116: 424-448, (1952).
- Inoue H., Nojima H., "Okayama, "High efficiency transformation of *E.coli* with plasmids". *Gene*, 96: 23-28, (1990).
- Jeworutzki, E., Roelfsema, M.R.G., Anschutz, U., Krol, E., Elzenga, J.T.M., Felix, G., Boller, T., Hedrich, R. and Becker, D., "Early signaling through the *Arabidopsis* pattern recognition receptors FLS2 and EFR involves Ca²⁺-associated opening of plasma membrane anion channels", *Plant J.*, 62, 367-378, (2010).
- Jiang Y, Lee A, Chen J, Ruta V, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R., "X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel", *Nature*, 423: 33–41, (2003).
- Jones, J.D.G. and Dangl, J.L., "The plant immune system", *Nature*, 444: 323–329, (2006).

- Joshi-Saha A, Valon C, Leung J., “Abscisic acid signal off the STARTing block”, *Mol. Plant*, 4: 562–580, (2011).
- Kang J, Hwang JU, Lee M, Kim YY, Assmann SM, Martinoia E, Lee Y., “PDR-type ABC transporter mediates cellular uptake of the phytohormone abscisic acid”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107: 2355–2360, (2010).
- Kinoshita T, Doi M, Suetsugu N, Kagawa T, Wada M, Shimazaki K., “Phot1 and phot2 mediate blue light regulation of stomatal opening”, *Nature*, 414:656–660, (2001).
- Koers, S., “Die Rolle der S-Typ Anionenkanäle in der Reaktion von Gerstenschließzellen auf *Blumeria graminis* f. sp. hordei”, Doktora tezi, 112 s., Würzburg, (2013).
- Koers, S., Güzel-Deger, A., Marten, I. and Roelfsema, M.R.G., “Barley mildew and its elicitor chitosan promote closed stomata by stimulating guard-cell S-type anion channels”, *Plant J.*, 68, 670-680, (2011).
- Kolb H.A., Marten, I., Hedrich, R., “Hodgkin-Huxley analysis of a GCAC1 anion channel in the plasma membrane of guard cells”, *J. Membr. Biol.*, 146: 273–282, (1995).
- Koncz, C. and Schell, J., *Mol. Gen. Genet.* 204: 383-396, (1986).
- Koncz, C. and Schell, J., “The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector”, *Mol. Gen. Genet.*, 204(3): 383-396, (1986).
- Koornneef M, Dellaert LW, van der Veen JH., “EMS- and radiation-induced mutation frequencies at individual loci in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.”, *Mutat. Res.*, 93: 109–123, (1982).
- Koornneef M, Reuling G, Karssen CM., “The isolation and characterization of abscisic acid insensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*”, *Physiol. Plant*, 61: 377–383, (1984).
- Krol E, Mentzel T, Chinchilla D, Boller T, Felix G, Kemmerling B, Postel S, Arents M, Jeworutzki E, Al-Rasheid KA, Becker D, Hedrich R. Perception of the *Arabidopsis* danger signal peptide 1 involves the pattern recognition receptor AtPEPR1 and its close homologue AtPEPR2”, *J Biol Chem.*, 285: 13471–13479, (2010).
- Kuchitsu, K., Yazaki, Y., Sakano, K. and Shibuya, N., “Transient cytoplasmic pH change and ion fluxes through the plasma membrane in suspension-cultured rice cells triggered by N-acetylchitooligosaccharide elicitor”, *Plant Cell Physiol.*, 38: 1012-1018, (1997).

- Kuromori T, Miyaji T, Yabuuchi H, Shimizu H, Sugimoto E, Kamiya A, Moriyama Y, Shinozaki, "ABC transporter AtABCG25 is involved in abscisic acid transport and responses", *Proc Natl Acad Sci. USA*, 107:2361–2366, (2010).
- Langer, K., Levchenko, V., Fromm, J., Geiger, D., Steinmeyer, R., Lautner, S., Ache, P., Hedrich, R., "The poplar K⁺ channel KPT1 is associated with K⁺ uptake during stomatal opening and bud development", *Plant Journal*, 37 (6), 828-838, (2004).
- Lecourieux, D., Lamotte, O., Bourque, S., Wendehenne, D., Mazars, C., Ranjeva, R. and Pugin, A., "Proteinaceous and oligosaccharidic elicitors induce different calcium signatures in the nucleus of tobacco cells" *Cell Calcium*, 38: 527-538, (2005).
- Lee, S., Choi, H., Suh, S Doo, I.S. Oh, K.Y., Choi, E.J., Taylor, A.T.S., Low, PiS. and Lee, Y. "Oligogalacturonic acid and chitosan reduce stomatal aperture by inducing the evolution of reactive oxygen species from guard cells of tomato and *Commelina communis*" *Plant Physiol.* 121: 147-152, (1999).
- Lee, S.C., Lan, W.Z., Buchanan, B.B. and Luan, S.A., "Protein kinase-phosphatase pair interacts with an ion channel to regulate ABA signaling in plant guard cells", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 106, 21419-21424, (2009).
- Linder, B. and Raschke, K., "A slow anion channel in guard cells, activating at large hyperpolarization, may be principal for stomatal closing", *FEBS Lett.*, 313(1): 27–30, (1992).
- Liu, J., Elmore, J.M., Fuglsang, A.T., Palmgren, M.G., Staskawicz, B.J. and Coaker, G., "RIN4 functions with Plasma Membrane H⁺-ATPases to Regulate Stomatal Apertures during Pathogen Attack", *PLoS. Biol.*, 7, (2009).
- Ma, Y., Szostkiewicz, I., Korte, A., Moes, D., Yang, Y., Christmann, A., Grill, E., "Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors", *Science*, 324: 1064-1068, (2009).
- Macho, AP, Boutrot, F., Rathjen, JP, and Zipfel, C., "ASPARTATE OXIDASE Plays an Important Role in *Arabidopsis* Stomatal Immunity", *Plant Physiology* 159(4): 1845-1856, (2012).
- MacRobbie, EAC, "Ionic relations of guard cells", In E Zeiger, GD Farquhar, IR Cowan, eds, *Stomatal Function*. Stanford University Press, Stanford, CA, 125-162, (1987).
- Maffi, D., Bassi, M., Brambilla, A. and Conti, C.G., "Possible role of chitosan in the interaction between barley and *Erysiphe graminis* after tetraconazole treatment", *Mycol. Res.*, 102: 599-606, (1988).

- Maniatis T., Sambrook J., Fritsch E.F., “Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, (1989).
- Melotto M, Underwood W, Koczan J, Nomura K, He SY., “Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion”, *Cell*, 126: 969–980, (2006).
- Melotto, M., Underwood, W. and He, S.Y., “Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases”, *Annu. Rev. Phytopathol.*, 46, 101-122, (2008).
- Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K. and He, S.Y. “Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion”. *Cell*, 126, 969-980, (2006).
- Merlot S, Leonhardt N, Fenzi F, Valon C, Costa M, Piette L, Vavasseur A, Genty B, Boivin K, Muller A, Giaudat M, Leung J., “Constitutive activation of a plasma membrane H⁺-ATPase prevents abscisic acid-mediated stomatal closure”, *EMBO J.*, 26: 3216–3226, (2007).
- Meyer, S., Mumm, P., Imes, D., Endler, A., Weder, B., Al-Rasheid, K. A. S., Geiger, D., Marten, I., Martinoia, E., “AtALMT12 represents an R-type anion channel required for stomatal movement in *Arabidopsis* guard cells”, *Plant J.*, 63: 1054–1062, (2010).
- Montillet, J., Leonhardt, N., Mondy, S., Tranchimand, S., Rumeau, D., Boudsocq, M., Garcia, A.N., Douki, T., Bigeard, J., Laurière, C., Chevalier, A., Castresana, C. and Hirt, H., “An Abscisic Acid-Independent Oxylin Pathway Controls Stomatal Closure and Immune Defense in *Arabidopsis*”, *PLoS. Biol.*, 11, (2013).
- Mori IC, Murata Y, Yang YZ, Munemasa S, Wang YF, Andreoli S, Tiriack H, Alonso JM, Harper JF, Ecker JR, Kwak JM, and Schroeder JI., “CDPKs CPK6 and CPK3 function in ABA regulation of guard cell S-type anion- and Ca²⁺-permeable channels and stomatal closure”, *PLoS. Biol.* 4(10): 1749-1762, (2006).
- Motoda, H., Sasaki, T., Kano, Y., Ryan, P. R., Delhaize, E., Matsumoto, H. and Yamamoto, Y., “The membrane topology of ALMT1, an aluminum-activated malate transport protein in wheat (*Triticum aestivum*)”, *Plant Signal Behav.*, 2: 467–472, (2007).
- Mustilli AC, Merlot S, Vavasseur A, Fenzi F, Giraudat J., “*Arabidopsis* OST1 protein kinase mediates the regulation of stomatal aperture by abscisic acid and acts upstream of reactive oxygen species production”, *Plant Cell*, 14: 3089–3099, (2002).
- Negi, J., Matsuda, O., Nagasawa, T., Oba, Y., Takahashi, H., Kawai-Yamada, M., Uchimiya, H., Hashimoto, M., Iba, K., “CO₂ regulator SLAC1 and its

- homologues are essential for anion homeostasis in plant cells”, *Nature*, 452: 483–486, (2008).
- Nernst, W., “Zur Kinetik der in Lösung befindlichen Körper: .Theorie der Diffusion”, *Z. Phys. Chem.*, 612-637, (1888).
- Orke EC, Dehne HW, Schonbeck F, Weber A., “Crop production and crop protection: Estimated losses in major food and cash crop”, Amsterdam: Elsevier, (1994).
- Park SY, Fung P, Nishimura N, Jensen DR, Fujii H, Zhao Y, Lumba S, Santiago J, Rodrigues A, Chow TFF, Alfred SE, Bonetta D, Finkelstein R, Provart NJ, Desveaux D, Rodriguez PL, McCourt P, Zhu JK, Schroeder JI, Volkman BF, and Cutler SR., “Abscisic Acid Inhibits Type 2C Protein Phosphatases via the PYR/PYL Family of START Proteins”, *Science*, 324(5930): 1068-1071, (2009).
- Pei, Z.M., Kuchitsu, K., Ward, J.M., Schwarz, M., Schroeder, J.I., “Differential abscisic acid regulation of guard cell slow anion channels in *Arabidopsis* wild-type and *abi1* and *abi2* mutants”, *Plant Cell*, 9: 409-423, (1997).
- Pelissier, B., Thibaud, J.B., Grignon, C. and Esquerretugaye, M.T. “Cell-surfaces in plant-microorganism interactions. “Elicitor preparations from 2 fungal pathogens depolarize plant membranes”, *Plant Sci.*, 46: 103-109, (1986).
- Raschke K, Hedrich R, Reckmann U., Schroeder J.I., “Exploring biophysical and biochemical-components of the osmotic motor that drives stomatal movement”, *Bot. Acta*, 101, 283-294, (1988).
- Raschke K., “Action of abscisic acid on guard cells”, In: *Stomatal Function* edited by Zeiger E., Farquhar G. D., Cowan I. R.. Palo Alto, CA: Stanford Univ. Press, (1987), p. 253–279. Vol. 71: 59-82 (2009).
- Roelfsema MRG and Prins HBA., “Effect of abscisic acid on stomatal opening in isolated epidermal strips of *abi* mutants of *Arabidopsis thaliana*”, *Physiol. Plant*, 95(3): 373-378, (1995).
- Roelfsema MRG, Hedrich R., “In the light of stomatal opening: new insights into 'the Watergate'”. *New Phytol.* 167: 665-691, (2005)
- Roelfsema MRG, Konrad KR, Marten H, Psaras GK, Hartung W, and Hedrich R., “Guard cells in albino leaf patches do not respond to photosynthetically active radiation, but are sensitive to blue light, CO₂ and abscisic acid”, *Plant Cell and Environment*, 29(8): 1595-1605, (2006).
- Roelfsema MRG, Steinmeyer R, Staal M, Hedrich R., “Single guard cell recordings in intact plants: light-induced hyperpolarization of the plasma membrane”, *Plant J.*, 26, 1-13, (2001).

- Roelfsema, MRG, Hedrich, R. and Geiger, D., “Anion channels: master switches of stress responses”, *Trends Plant Sci.*, 17, 221-229, (2012).
- Roelfsema M. Rob G. and Hedrich Rainer, “Studying guard cells in the intact plant: modulation of stomatal movement by apoplastic factors”, *New Phytologist*, Research review, 153: 425–431, (2002).
- Ryan, C.A., “Oligosaccharide signaling in plants”, *Annu. Rew. Cell. Biol.*, 3: 295-317, (1987).
- Sasaki, T., Mori, I. C., Furuichi, T., Munemasa, S., Toyooka, K., Matsuoka, K., Murata, Y. and Yamamoto Y., “Closing plant stomata requires a homolog of an aluminum activated malate transporter”, *Plant Cell Physiol*, 51: 354–365, (2010).
- Scherzer S, Maierhofer T, Al-Rasheid KAS, Geiger D, and Hedrich R., “Multiple Calcium-Dependent Kinases Modulate ABA-Activated Guard Cell Anion Channels”, *Mol. Plant.*, 5(6): 1409-1412, (2012).
- Schroeder J.I. and Hagiwara S., “Cytosolic calcium regulates ion channels in the plasma membrane of *Vicia faba* guard cells”, *Nature*, 338: 427–430, (1989).
- Schroeder J.I. and Keller B.U., “Two types of anion channel currents in guard cells with distinct voltage regulation”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89: 5025–5029, (1992).
- Schulze-Lefert, P. and Panstruga, R., “A molecular evolutionary concept connecting nonhost resistance, pathogen host range, and pathogen speciation”, *Trends Plant Sci.*, 16: 117–125, (2011).
- Schulze-Lefert, P. and Robatzek, S., “Plant pathogens trick guard cells into opening the gates”, *Cell*, 126, 831-834, (2006).
- Sentenac, H., Bonneaud, N., Minet, M., Lacroute, F., Salmon, JM., Gaymard F., Grignon C., “Cloning and expression in yeast of a plant potassium ion transport system”, *Science*, 256 (5057): 663-5 (1992).
- Sharp, RE and LeNoble, ME., “ABA, ethylene and the control of shoot and root growth under water stres”, *J Exp Bot.*, 53: 33–37, (2002).
- Shimizu, T, Nakano, T, Takamizawa, D, Desaki, Y, Ishii-Minami, N, Nishizawa, Y, Minami, E, Okada, K, Yamane, H, Kaku, H, Shibuya, N., “Two LysM receptor molecules, CEBiP and OsCERK1, cooperatively regulate chitin elicitor signaling in rice”, *Plant J.*, 64: 204-214, (2010).
- Spanswick, RM., “Electrogenic ion pumps”, *Annu. Rev.Plant Physiol.*, 32: 267-289, (1981).

- Szyroki, A., Ivashikina, N., Dietrich, P., Roelfsema, M. R., Ache, P., Reintanz, B., Deeken, R., Godde, M., Felle, H., Steinmeyer, R., Palme, K., Hedrich, R., "KAT1 is not essential for stomatal opening", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98: 2917–2921, (2001).
- Taiz, L., Zeiger, E., "Plant Physiology", Fifth ed., Sinauer Assoc., s.692, (2010).
- Türkan, İ., (Çeviri Editörü), "Bitki Fizyolojisi", Palme Yayıncılık, Ankara, 690 s., (2008). [Taiz, L., Zeiger, E., "Plant Physiology 3th ed." Sinauer Associates, Inc. Publishers.]
- Vahisalu, T., Kollist, H., Wang, Y.-F., Nishimura, N., Chan, W.-Y., Valerio, G., Lamminmäki, A., Brosché, M., Moldau, H., Desikan, R., Schroeder, J. I. and Kangasjärvi, J., "SLAC1 is required for plant guard cell S-type anion channel function in stomatal signalling", *Nature*, 452: 487-491, (2008).
- Vahisalu, T., Puzorjova, I., Brosche, M., Valk, E., Lepiku, M., Moldau, H., Pechter, P., Wang, Y.S., Lindgren, O., Salojärvi, J., Loog, M., Kangasjärvi, J. and Kollist, H., "Ozone-triggered rapid stomatal response involves the production of reactive oxygen species, and is controlled by SLAC1 and OST1", *Plant J.*, 62, 442-453, (2010).
- Vlad F, Rubio S, Rodrigues A, Sirichandra C, Belin C, Robert N, Leung J, Rodriguez PL, Lauriere C, and Merlot S., "Protein Phosphatases 2C Regulate the Activation of the Snfl-Related Kinase OST1 by Abscisic Acid in *Arabidopsis*", *Plant Cell*, 21(10): 3170-3184, (2009).
- Wang YB, Holroyd G, Hetherington AM, Ng CKY., "Seeing "cool" and "hot"-infrared thermography as a tool for non-invasive, high-throughput screening of *Arabidopsis* guard cell signalling mutants", *J Exp Bot.*, 55:1187–1193, (2004).
- Ward, M.J., Maser, P., Schroder J.I., "Plant Ion Channels: Gene Families, Physiology, and Functional Genomics Analyses", *Annu. Rev. Physiol.*, 71: 59-82, (2009).
- Weiqing Zeng, Maeli Melotto and Sheng Yang He, "Plant stomata: a checkpoint of host immunity and pathogen virulence", *Current Opinion in Biotechnology*, 21: 599–603, (2010)
- Wilkinson S and Davies WJ., "Drought, ozone, ABA and ethylene: new insights from cell to plant to community", *Plant Cell Environ.*, 33: 510–525, (2010).
- Wilmer, C, Fricker M. "Stomata" Ed 2. Vol. 135. London: Chapman and Hall; (1996).
- Xie XD, Wang YB, Williamson L, Holroyd GH, Tagliavia C, Murchie E, Theobald J, Knight MR, Davies WJ, Leyser HMO, Hetherington AM.,

“The identification of genes involved in the stomatal response to reduced atmospheric relative humidity”, *Curr. Biol.*, 16: 882–887, (2006).

Xiong L, Schumaker KS, Zhu JK., “Cell signaling during cold, drought, and salt stres”. *Plant Cell.* ;14 Suppl:S165-83, (2002).

Yoshida, R., Hobo, T., Ichimura, K., Mizoguchi, T., Takahashi, F., Aronso, J., Ecker, J.R. and Shinozaki, K., “ABA-activated SnRK2 protein kinase is required for dehydration stress signaling in *Arabidopsis*”, *Plant Cell Physiol.*, 43: 1473–1483, (2002).

Young D. H., Kohle H., and Kauss H. “Effect of Chitosan on Membrane Permeability of Suspension-Cultured *Glycine max* and *Phaseolus vulgaris* Cells”, 70: 1449-1454, (1982).

Zeng, W., Melotto, M. and He, S. Y., “Plant stomata: a checkpoint of host immunity and pathogen virulence”, *Current Opinion in Biotechnology*, 21, 599–603, (2010).

Zipfel C, Robatzek S, Navarro L, Oakeley EJ, Jones JDG, Felix G, and Boller T “Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception”, *Nature*, 428(6984): 764-767, (2004).

ÖZGEÇMİŞ ve ESERLER LİSTESİ

Adı Soyadı: AYŞİN GÜZEL DEĞER

Doğum Tarihi: 14/07/1979

Öğrenim Durumu:

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lise	Fen Bilimleri	Mersin Hacı Sabancı Lisesi	1993-1996
Lisans	Biyoloji	Niğde Üniversitesi	1998-2000
		Mersin Üniversitesi	2000-2002
Yüksek Lisans	Biyoloji	Mersin Üniversitesi	2003-2006

(Varsa) Görevler:

Görev Unvanı	Görev Yeri	Yıl
Araştırma görevlisi	Mersin Üniversitesi Biyoloji Ana Bilim Dalı	2004-2007
Araştırma görevlisi	Mersin Üniversitesi Biyoloji Ana Bilim Dalı	2008-2013
VHKİ	Mersin Üniversitesi, ADEK	2013-

ESERLER (Makaleler ve Bildiriler)

1. **Aysin Guzel Deger**, Sönke Scherzer, Maris Nuhkat, Hannes Kollist, Mikael Brosche, Serpil Unyayar, Marie Boudsocq, Rainer Hedrich and M. Rob G. Roelfsema "Guard cell SLAC1-type anion channels control flagellin-induced stomatal closure", (2013) (İncelemede).
2. Çevik, S., Yıldızlı, A., Yandım, G., Göksu H., Gultekin M.S., **Güzel Değer, A.**, Çelik, A., Şimşek Kuş, N. , Ünyayar, S. , "Synthetic Cyclitol Derivatives Alleviate the Effect of Drought Stress in Cultivated and Wild-Type Chickpea Species" (2013) (İncelemede).
3. Sandra Koers, **Aysin Guzel-Deger**, Irene Marten1, M. Rob G. Roelfsema, "Barley mildew and its elicitor chitosan promote closed stomata by stimulating guard-cell S-type anion channels", The Plant Journal, (2011).

4. Birgül Mazmancı, Mehmet Ali Mazmancı, Ali Unyayar, Serpil Unyayar, Fazilet Ozlem Cekic, **Aysin Guzel Değer**, Serap Yalin, Ulku Comelekoglu, Protective Effect of *Funalia trogii* crude extract on Deltamethrin-Induced Oxidative Stress in Rats, *Food Chemistry*, 125, 1037-1040, (2011).
5. Serpil UNYAYAR*, **Aysin Guzel Değer**, Ayla CELİK, Fazilet Ozlem CEKİC, Sertan CEVİK, Cadmium-induced antioxidant status and sister-chromatid exchanges in *Vicia faba* L., *Turk J Biol*, 34 (2010).
6. Ayla Çelik ,Serpil Ünyayar, Fazilet Özlem Çekiç, **Aysin Güzel**. “Micronucleus Frequency and Lipid Peroxidation in *Allium sativum* Root Tip Cells Treated with Gibberellic acid and Cadmium”, *Cell Biol. Toxicol*, 24:159–164,(2008).
7. Ünyayar, S., Çelik, A., Çekiç, F.Ö.,**Gözel, A.**, “Cadmium-induced genotoxicity and lipid peroxidation in *Allium sativum* and *Vicia faba*”, *Mutagenesis* vol:21 No:1pp. 77-81,(2006).
8. . **Aysin GÖZEL**, Serpil ÜNYAYAR, “Role of abscisic acid and Ca²⁺ on superoxide dismutase isoenzymes and lipid peroxidation in tomato under drought stress”, II. International Environmental Protection Symposium, Dumlupınar Üniversitesi, **Kütahya, 2005**.
9. **Aysin Güzel** ,F. Özlem Çekiç, Ayla Çelik, Serpil Ünyayar, Gibberellik asit ve kadmiyumun *Allium sativum* kök ucu hücrelerinde mikronukleus frekansı ve lipid peroksidasyonu üzerine etkisi, 18. Ulusal Biyoloji Kongresi, **Aydın, 2006**.
10. Serpil Ünyayar, Ayla Çelik, **Aysin Güzel Değer**, Sertan Çevik, F.Özlem Çekiç, “*Vicia Faba* Bitkisinde Kadmiyum Uygulamasına Bağlı Olarak H₂O₂, Lipid Peroksidasyonu ve Kardeş Kromatid Değişimi Arasındaki İlişki”, 19. Ulusal Biyoloji Kongresi, **Trabzon, 2008**.
11. **Aysin Güzel Değer**, Sertan Çevik, Cemalettin Alp, M. Serdar Gültekin, Nermin Şimşek Kuş, Savaş Zengin, Harika Topal, Serpil Ünyayar, “Sentetik Olarak Sentezlenen Siklitollerin Kuraklık Stresi Altındaki Cicer arietinum'un Büyümesi Üzerine Etkisi", Poster Sunum, 20. Ulusal Biyoloji Kongresi, S.352, Haziran, **Denizli, 2010**.

12. Serpil Ünyayar, Gurbet Yandım, Sertan Çevik, Aytunç Yıldızlı, M.Serdar Gültekin, Gizem Kızıgut, Ayla Çelik, Nermin Ş. Kuş, **Ayşin G.Değer**, “Kuraklık Stresi Altındaki Nohut (*Cicer arietinum* ve *C. reticulatum*, Fabaceae) Bitkilerinin Malondialdehit (MDA) İçeriği Üzerine Bazı Sentetik Siklitollerin Etkisi”, 21. Ulusal Biyoloji Kongresi, 3-7 Eylül 2012, İzmir, Türkiye, **2012**
13. **Ayşin GÖZEL**, Serpil ÜNYAYAR, “Effects of abscisic acid and Ca²⁺ on pigments and ascorbate contents in tomato seedlings under drought stress”, XV Congress FESPB The Federation of European Societies in Plant Biology, Lyon, **France**, 2006
14. Sandra Koers*, **Ayşin Güzel Deger**, Irene Marten, M. Rob G. Roelfsema, “Impact of powder mildew and derived molecular patterns on stomata of barley”, Botanikertagung, Conference Book,S22-TALK-5, 18-23 September -Berlin-Germany, 2011
15. Unyayar S, Çevik, S.,Yandım G, Gültekin, M.S.,Çelik A., Kuş, N.Ş.,Yıldızlı A., **Değer, A.G.**, “Can synthetic cyclitols be induced on the growth and biologically active?”, Plant Biology Congress Freiburg 2012, Germany, 2012
16. **Aysin Güzel Değer**, Sandra Koers, M.Rob G. Roelfsema, “Early responses of plant cells to microbe-associated molecular patterns (MAMPs)”, Joint Symposium GRK1342 Würzburg and iGRAD-Plant Düsseldorf 10th -12th September at Heinrich Heine University, Duesseldorf, 2012, Germany, 2012
17. Sandra Koers*, **Ayşin Güzel Deger**, Irene Marten, M. Rob G. Roelfsema, “Impact of powder mildew and derived molecular patterns on stomata of barley”, Botanikertagung, Conference Book,S22-TALK-5, 18-23 September **2011**-Berlin-Germany (Sözlü sunum).