

**EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**(YÜKSEK LİSANS TEZİ)**

**TÜTÜN BİTKİSİNDE GABA-STRES İLİŞKİSİNİN**

**BELİRLENMESİ**

**Neşe AKÇAY**

**Tez Danışmanı : Doç. Dr. Melike BOR**

**Biyoloji Anabilim Dalı**

**Bilim Dalı Kodu: 386594**

**Sunuş Tarihi : 05.11.2010**

**Bornova- İZMİR**

NEŞE AKÇAY tarafından YÜKSEK LİSANS tezi olarak sunulan “Tütün Bitkisinde Gamma-amino butirik asit (GABA) Stres İlişkisinin Belirlenmesi” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdandeğerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 05.11.2010 tarihinde yapılan tezsavunma sınavında aday oybirliği ile başarılı bulunmuştur.

**Jüri Üyeleri:**

**Jüri Başkanı : Prof. Dr. Filiz ÖZDEMİR**

**Raportör Üye : Doç. Dr. Melike BOR**

**Üye : Yrd. Doç. Dr. Okan ACAR**

**İmza**

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

**ÖZET****TÜTÜN BİTKİSİNDE GABA-STRES İLİŞKİSİNİN BELİRLENMESİ****AKÇAY, Neşe**

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Bölümü

Tez Yöneticisi: Doç. Dr. Melike BOR

Kasım 2010, 71 sayfa

Bakteriler, mantarlar, memeliler, bitkiler gibi canlılarda bulunan Gamma aminobütirik asit (GABA) hayvanlarda merkezi sinir sisteminde nörotransmitter inhibitörü olarak görev almaktadır. Glutamat dekarboksilaz (GAD), semialdehit dehidrogenaz (SSADH) ve GABA-transaminaz enzimlerinin GABA'nın metabolizmasında rol aldığı tespit edilmiştir (Kinnersley ve Turano, 2000). Farklı stres koşulları altında çeşitli bitkilerde GABA miktarlarındaki değişimler incelenmiştir ancak aynı bitki sisteminde, aynı stres koşullarında ve zamana bağlı GABA miktarındaki değişimler bilinmemektedir.

Tez projesi kapsamında, tütün (*Nicotiana glauca*) CMSII mutanı ile yabancı çeşit arasındaki GABA- stres ilişkisinin belirlenmesi hedeflenmiştir. *Nicotiana glauca* CMSII mutanı mitokondrial bir mutasyon taşımaktadır; solunum kompleksi I'in NAD7 altbirimini kodlayan *nad7* genine sahip değildir. Buna bağlı olarak, CMSII mutanı yabancı çeşit ile karşılaştırıldığında daha düşük asimilasyon oranlarına sahiptir ancak biyotik ve abiyotik stres koşullarına toleranslıdır (Dutilleul ve ark, 2003). Çimlenme sonrasında fideler yaklaşık 3 haftalık dönemde iken kuraklık stresi uygulanacaktır. Kuraklık ve tuz stresi koşullarına maruz bırakılan CMSII ve yabancı tütün fidelerinde GABA yolağının çeşitli basamakları incelendi.

**Ahahtar sözcükler:** GABA, Tütün, Kuraklık stresi, Tuz stresi.

**ABSTRACT****INVESTIGATION OF GABA-STRESS RELATION IN TOBACCO PLANT****AKÇAY, Neşe**

Master in Biology Department

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Melike BOR

November 2010, 71 pages

Gamma-amino butyric acid (GABA) has been determined in different organisms like bacteria, fungi, mammals and plants which is a neurotransmitter inhibitor of central nerve system. Glutamate decarboxylase (GAD), semialdehyde dehydrogenase (SSADH) and GABA transaminase enzymes have been determined to have important roles in GABA metabolism (Kinnersley ve Turano, 2000). To date GABA accumulation under the effect of different stresses has been determined in different plants however, it is not clear that how GABA accumulation is related to the effects of different stressors under the same plant system.

In our project, we aimed to study GABA-stress relation in *Nicotiana sylvestris* CMSII mutant and wild type plants. CMSII mutant has a mitochondrial mutation nad7 gene which encodes the subunit NAD7 of complex I in respiratory chain. CMSII mutant has lower assimilation rates but, tolerance to biotic and abiotic stresses as compared to wild type plants (Dutilleul ve ark, 2003). CMSII mutant and wild type plants were important tools for the investigation of stress tolerance, mitochondrial signal transduction and GABA interactions. Drought and salt applications started at 3 rd week of the seedling growth and components of GABA shunt were analyzed under the effect of drought and salt stresses in CMSII and wild type plants.

**Keywords:** GABA, Tobacco, Drought stress, Salt stress

## TEŞEKKÜR

Bu yüksek lisans çalışması süresince bilgisini ve deneyimlerini paylaştığı için en zor anlarda göstermiş olduğu yüksek sabrı için ve hayatımın her noktasında maddi ve manevi desteği ifade edilemeyecek kadar değerli olan sayın hocam Doç. Dr. Melike BOR'a, eğitimim ve tez çalışmam süresince maddi ve manevi desteğini esirgemediği için sayın hocam Prof Dr. Filiz ÖZDEMİR'e, laboratuvar çalışmalarım boyunca benimle her adımda birlikte olan arkadaşım Tuğba KARABUDAK'a, çalışmalarımın bir kısmında yer alan arkadaşlarım Seher YOLCU'ya, Rengin ÖZGÜR'e, Barış UZİLDAY'a ve Dilara YILDIZ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Eğitim hayatım boyunca sonsuz sabır, sevgi ve anlayış gösteren babam Nuri AKÇAY'a ve annem Nuran AKÇAY'a, manevi destekleri ile her zaman yanımda olan abim Adnan AKÇAY'a, ablalarım Ayşe Ekmekçi'ye ve Selma AKÇAY'a ve kız kardeşim Fatma AKÇAY, arkadaşlarım Ece ERDAĞ'a, Ayşegül BULUT'a, Mukadder ARSLAN'a, Sümeyye ÇEVİK'e ve Burcu BARUTOĞLU'na en içten teşekkürlerimi sunarım.

**İÇİNDEKİLER**

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
KISALTMALAR DİZİNİ.....	xvi
1.GİRİŞ.....	1
1.1 Kuraklık ve Tuz Stresi.....	2
1.2 Bitkilerde GABA Metablizması.....	5
1.2.1 Glutamat Dekarboksilaz (GAD; EC 4.1.1.15).....	6
1.2.2 GABA Transaminaz (GABA-T; EC 2.6.1.19).....	8
1.2.3 Süksinik Semialdehit Dehidrogenaz (SSADH; EC 1.2.1.16).....	9
1.2.4 Glutamat Dehidrogenaz (GDH; EC 1.4.1.2).....	11
1.3 Bitkilerde GABA'nın ve GABA Yolağı için Öngörülen Roller.....	12

1.3.1 C:N Dengesine Katılma.....	12
----------------------------------	----

## İÇİNDEKİLER (devam)

### Sayfa

1.3.2 Sitosolik pH'ın düzenlenmesi.....	13
1.3.3 Oksidatif Strese Karşı Koruma.....	13
1.3.4 Böceklere Karşı Savunma.....	13
1.3.5 Bir Osmoregülatör Olarak GABA.....	14
1.3.6 Bir Sinyal Molekülü Olarak GABA.....	14
1.4 GABA Yolu ve Azot Metabolizması.....	14
1.4.1 Azot Metabolizmasında GABA Yolunun Etkisi.....	15
1.4.2 Azot Kullanılabilirliğiyle GABA Yolunun Düzenlenmesi.....	15
1.5 Bitkilerde Bir Sinyal Molekülü Olarak GABA.....	16
1.5.1 GABA ve Polen Tübü Büyümesi.....	16
1.5.2 GABA Reseptörleri.....	17
1.6 Mitokondrial Solunum Zinciri ve ATP Sentez Kompleksi.....	18
1.7 <i>Nicotiana sylvestris</i> CMSII Mutantı.....	20
1.7.1 <i>Nicotiana sylvestris</i> CMSII Mutantında C/N Metabolizması.....	22
2. MATERYAL VE METOD.....	24

2.1 Bitki Materyali ve Yetiştirilmesi.....	24
--	----

## İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.2 Kuraklık ve Tuz Streslerinin Uygulanması .....	25
2.3 Büyüme Parametreleri.....	25
2.3.1 Klorofil Floresans Ölçümü.....	25
2.3.2 Bağlı Su Miktarı (RWC).....	26
2.3.3 Yaprak Osmotik Potansiyeli.....	26
2.3.4 Total Protein Miktarlarının Belirlenmesi.....	26
2.5 Glutamat Dehidrogenaz (GDH) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi.....	27
2.6 Glutamat Dekarboksilaz (GAD) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi.....	27
2.7 GABA Miktarının Belirlenmesi.....	28
3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	31
3.1 Büyüme Parametreleri ile İlgili Sonuçlar.....	31
3.2 Osmotik Potansiyeli.....	38
3.3 Fotosentetik Verim.....	39
3.4 Bağlı Su İçeriği.....	40
3.5 Total Protein Miktarları.....	42



3.6 Glutamat Dehidrogenaz (GDH) Enzim Aktivitesi.....43

**İÇİNDEKİLER (devam)**

	<u>Sayfa</u>
3.7 Glutmat Dehidrogenaz (GAD) Enzim Aktivitesi.....	44
3.7 GABA Miktarının Belirlenmesi.....	44
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	47
ÖZGEÇMİŞ.....	71

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
<b>1.1</b> Bitkilerin tuz stresine maruz kaldıklarında oluşan fizyolojik ve biyokimyasal değişiklikler (Seçkin, 2010).....	3
<b>1.2</b> Bitkilerde kuraklık stresinde büyümenin kısıtlanmasındaki bazı nedenler (Jaleel, et al., 2009) .....	4
<b>1.3</b> GABA yapısı: Glutamat dehidrogenaz yardımıyla GABA sentezi (Jaleel, et al; 2009) .....	5
<b>1.4</b> Trikarboksilik asit döngüsü ve GABA alternatif yolu (Akihiro et al., 2008).....	6
<b>1.5</b> GAD aktivitesi ve GABA-Stres ilişkisi. 1, GAD; 2, GABA-T ve 3, SSADH (Fait et al, 2007) .....	8

**ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)**

<b><u>Şekil</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
<b>1.6</b> GABA-T aracılığıyla mitokodrial GABA metabolizması. 2, GABA-T (Fai et al, 2007).....	9
<b>1.7</b> Bitki mitokondrilerinin iç zarındaki ATP sentezi ve elektron taşıma zincirinin düzenlenişi (Taiz & Zieger, 2002).....	19

**ÇİZELGELER DİZİNİ**

<b><u>Çizelge</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
2.1 Murashige-Skoog (MS) Ortamı.....	29
2.2 Hoagland Besin Çözeltisi .....	30
3.1 Tuz stresi uygulanan yabani tip (WT) ve CMSII mutant bitkilerinin kök uzunluğundaki değişimler (cm) .....	31
3.2 Kuraklık stresi uygulanan WT ve CMSII mutant bitkilerinin kök uzunluğundaki değişimler.....	32
3.3 Tuz stresi uygulanan WT ve CMSII mutant bitkilerinin yaprak uzunluğundaki değişimler (cm) .....	32
3.4 Kuraklık stresinin WT ve CMSII mutant bitkilerinin yaprak uzunluğundaki değişimler (cm) .....	32

**ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)**

<b><u>Çizelge</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
3.5 Tuz ve kuraklık stresi uygulanan WT bitkilerin kök yaş ve kuru ağırlığındaki değişimler (g).....	35
3.6 Tuz ve kuraklık stresi uygulanan CMSII mutanat bitkilerinin kök yaş ve kuru ağırlığındaki değişimler (g) .....	35
3.7 Tuz ve kuraklık stresi uygulanan WT bitkilerinin yaprak yaş ağırlığındaki değişimler (g) .....	36
3.8 Tuz ve kuraklık stresi uygulanan CMSII mutant bitkilerinin yaprak yaş ağırlığındaki değişimler (g) .....	36
3.9 WT ve CMSII mutant bitkilerine tuz ve kuraklık stresinin osmotik potansiyelüzerine etkisi.....	38

**ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)**

<b><u>Cizelge</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
3.10 WT ve CMSII mutant bitkilerine tuz ve kuraklık stresinin fotosentetik verim (Fv/Fm) üzerine etkisi .....	40
3.11 WT ve CMSII mutant bitkilerinin tuz ve kuraklık stresinin bağıl su içeriğine etkisi .....	41
3.12 WT ve CMSII mutant bitkilerine tuz ve kuraklık stresinin total protein içeriğine etkisi .....	42
3.13 WT ve CMSII mutant bitkilerine tuz ve kuraklık stresinin GDH enzim aktivitesine etkisi (mmol/minmg protein).....	43
3.14 WT ve CMSII mutanat bitkilerinde tuz ve kuraklık stresinin GAD enzim aktivitesi üzerine etkisi (mmol/minmgprotein).....	46

**ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)****Çizelge****Sayfa**

- 3.15 WT ve CMSII mutant bitkilerinde tuz e kuraklık stresinin GABA miktarları üzerine etkisi ( $\mu\text{mol/gyaş ağırlık}$  ).....47

**KISALTMALAR DİZİNİ**

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
CMS	Sitoplazmik erkek kısır (Cytoplasmic male sterile)
GABA	Gammaaminobütirik asit
GABA <sub>B</sub>	Tip B GABA reseptörü
GABA-T	GABA-transaminaz
GAD	Glutamat dekarboksilaz
GDH	Glutamat dehidrogenaz
GHB	Gammahidroksibütirat
GR (GluR)	Glutamat reseptörü
GOGAT	Glutamat sentaz
GS	Glutamin sentaz



**KISALTMALAR DİZİNİ (devam)**

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
iGlur	İyonotropik glutamat reseptörü
CaM	Kalmodulin
POP	Pollen pistil incompatibility (Polen pistil etkileşi)
SSA	Süksinik semialdehit
SSADH	Süksinik semialdehit dehidrogenaz
TCA	Trikarboksilik asit
WT	Wild Type (Yabani tip)

## 1. GİRİŞ

Tütün Ege Bölgesi'nde yetiştirilen ekonomik öneme sahip önemli bir tarım bitkisidir. Ege Bölgesinin iklim şartları ve küresel ısınma problemi nedeniyle tütün yetiştirilmesi sırasında çok çeşitli abiyotik streslere maruz kalmaktadır. Bu streslerin başında özellikle su kıtlığı ve kuraklık gelmektedir. Tez projemiz kapsamında tütünde (*Nicotiana glauca*) CMSII mutanlığı ile yabancı çeşit arasındaki GABA-stres ilişkisi incelenmiştir. Daha önceki yıllarda yapılan çeşitli çalışmalar bitkilerde abiyotik stres toleransı ile GABA metabolizması arasında önemli bir ilişki olduğunu göstermektedir (Bouche *et al.*, 2003; Fait *et al.*, 2005).

Gama-aminobutirik asit (GABA) protein yapısına katılmayan dört karbonlu bir amino asittir. Yapısında  $\alpha$ -karbonu yerine  $\gamma$ -karbonu bulunur, amfoterik özellik gösterir ve serbest formda bulunan bir aminoasittir. GABA, bir çok prokaryotik ve ökaryotik canlıda serbest amino asit havuzunun önemli bir bileşenidir. Stres koşullarında bitkilerde GABA yolu ile trikarboksilik asit döngüsünün iki adımı atlanır ve bu yol  $Ca^{2+}$ /kalmodulin tarafından düzenlenen sitosolik enzim glutamat dekarboksilaz (GAD) ve mitokondrial enzimler GABA-transaminaz (GABA-T) ve süksinik-semialdehit dehidrogenaz (SSADH)'dan oluşur. Asidosis, donma, anoksiya, sıcaklık, tuzluluk ve kuraklık stresine maruz kalan bitki dokularında hızla GABA biriktirilir (Snedden and Fromm 1999; Kinnorsley and Turano 2000).

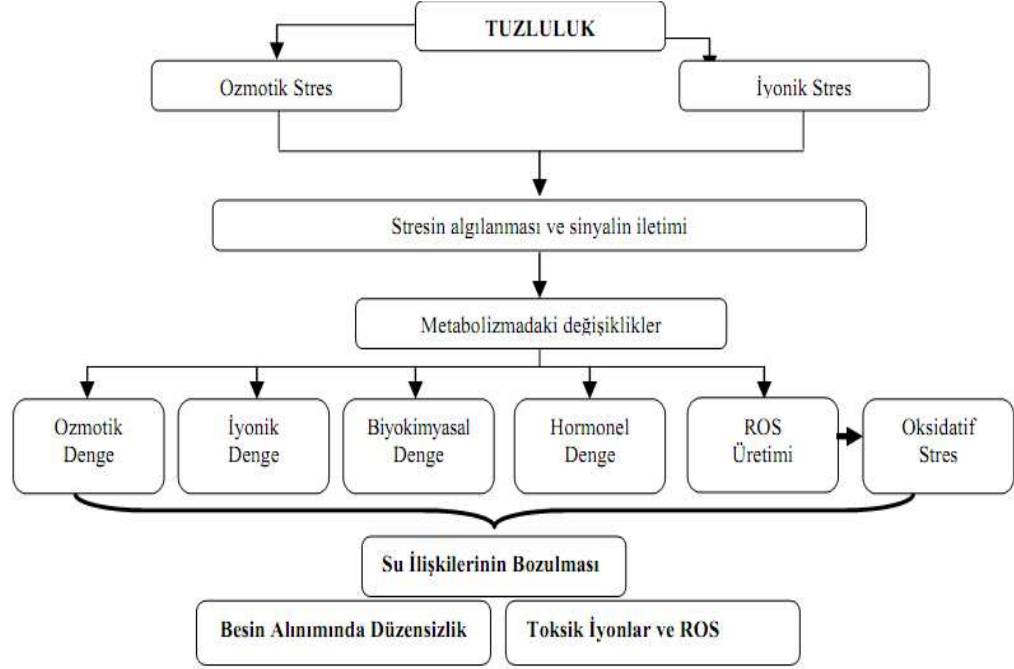
Farklı bitki türlerinde "Sitoplazmik erkek kısırlığı (CMS)" bitki mitokondrisi ile doğrudan bağlantılı bir özelliktir. CMS'yi bulandıran bitkiler canlı polen oluşturamazlar ve sonuç olarak erkek kısırlığı ortaya çıkar. CMS genotipine sahip bitkilerde mitokondri genomunun kalıtımı daima anneye bağlıdır. Hibrit tohum stoklarının üretimini kolaylaştıran kararlı kısır erkek ırklar oluşturmasından dolayı CMS, bitki ıslahında çok önemli bir özellik olarak bilinir. Bu özellik pek çok bitki türünde bulunmaktadır (Taiz ve Zeiger; 2002). *Nicotiana glauca* CMSII mutanlığının mitokondrial DNA'sı solunum kompleksi I'in (NADH-ubiquinon oksidoredüktaz) NAD7 altbirimini kodlayan 72 kb'lık *nad7* genine sahip değildir. Bu nedenle CMSII bitkilerinde rotenona duyarlı olan kompleks I aktivitesi gözlenmez (Pineau *et al.*, 2005). Ayrıca bu bitkiler indirgenmiş vejetatif ve floral organlara sahiptirler (Gutierrez *et al.*,

1997). CMS II mutanđı yaşam d6ng6s6ne alternatif NAD(P)H-dehidrogenaz yardımıyla NAD(P)H oksidasyonunun gerçekleştirilmesi ve buna bağlı olarak d6şuk solunum etkinliğiyle devam eder (Sabar et al., 2000). Ayrıca, CMSII mutanđı yaban tipiyle karşılaştırıldığında daha d6şuk fotosentez etkinliğine sahiptir ancak biyotik ve abiyotik stres koşullarına daha toleranslıdır (Sabar et al., 2000; Dutilleul et al., 2003). Tez projemizde farklı t6t6n eşitlerinde GABA-stres ilişkisinin ortaya konulması ile bu alandaki çalışmalara 6nemli bir katkı sağlandığı d6ř6n6lmektedir. Projeden elde edilen sonuçlar, aynı bitki sisteminde farklı stres koşullarında, GABA metabolizması-bitki stres ilişkisinin bilinmeyen noktaların aydınlatılması açsından 6nemli bilgiler içermektedir.

### **1.1 Kuraklık ve Tuz Stresi**

Kuraklık meteorolojik bir terimdir ve genellikle toprak nemi açısından yeterli 6l6de yağışın olmadığı bir periyodu tanımlar. Bitkilerde kuraklık stresinin etkileri topraktaki kullanılabilir suyun azaldığı ve transpirasyonla s6rekli su kaybedildiği atmosferik koşullarda ortaya çıkar (Jaleel et al., 2009). Bitkiler hayat d6ng6leri boyunca çok sık toprak ve atmosferik su kıtlığına ve y6ksek toprak tuzluluğuna da maruz kalırlar (Chaves et al., 2009). D6nya arazisinin %6'sından fazlası ve sulanan alanın %30'u tuzluluk probleminden çok fazla zarar g6rm6řt6r (Unesco Water Portal, 2007). Hızlı populasyonun artışı, tarımsal 6retimde su kaynaklarının ařırđı kullanılmasına ve buna bağlı olarak bitki b6y6mesinde, yaşam d6ng6s6nde ve 6r6n veriminde kayıplara neden olmaktadır (Chaves et al., 2002, 2003; Passioura, 2007).

Su stresine (kuraklık stresine) karşı oluşan yanıtlarla ilgili araştırmalar artan bir 6neme sahiptir, çoğu iklim değişikliği senaryosu, d6nyanın birçok b6lgesinde kuraklığın artış g6stereceğine dayanmaktadır (Petit et al., 1999). Kuraklık, y6ksek sıcaklıkla ve radyasyonla beraber bitkinin hayatta kalmasını, 6r6n verimliliğini kısıtlayan çoğu çevresel baskıyıda daha belirgin olarak ortaya çıkarır (Boyer 1982).



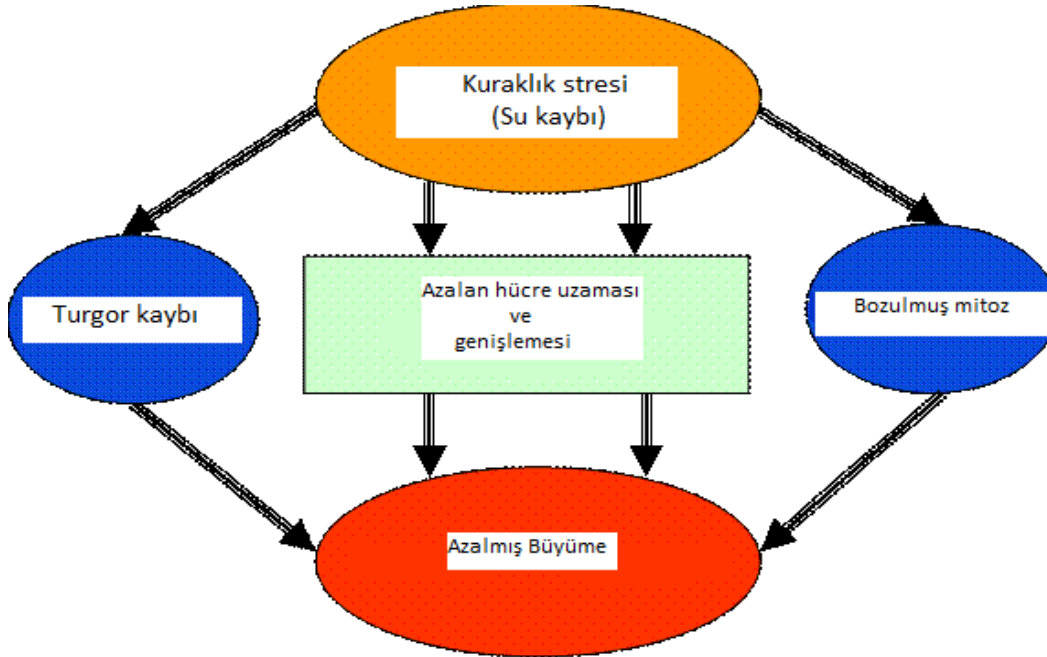
**Şekil 1.1:** Bitkilerin tuz stresine maruz kaldıklarında oluşan fizyolojik ve biyokimyasal değişiklikler (Seçkin, 2010).

Kuraklık stresinde su durumunu kontrol eden bitki stratejileri konularından (Schulze 1986) su eksikliğine (Chaves 1991; Cornic and Massacci 1996) ve oksidatif strese (Foyer and Mullineaux 1994; Smirnoff 1998) karşı oluşan bitki yanıtının temelinde yatan fizyolojik ve biyokimyasal prosesleri kapsayan konulara kadar birçok çalışma yapılmıştır (Chavez et al., 2003). Yaprak yapısı ile fonksiyonu (Valladares and Pearcy 1997) ve kök morfolojisi ile stres toleransı (Jakson et al., 2000; Maggio et al., 2001) arasındaki ilişki belirlenmiştir, bunlar bitkinin farklı çevrelerde hayatta kalması için gerekli olan rekabetçi özelliklerin anlaşılmasında önemlidir (Chaves et al., 2003).

Kuraklık stresine tolerans hemen hemen tüm bitkilerde görülür fakat derecesi, türden türe hatta tür içinde bile değişiklik gösterir. Oluşan su kıtlığında ve tuz stresinde tarım ürünlerinin yetiştirilmesi küresel bir sorun olmuştur (Jaleel

et *al.*, 2007b-e; Nakayama et *al.*, 2007). Geleneksel ıslah çalışmaları vakit aldığı için günümüzdeki genetik markırlar kullanmaktadır (Zhu, 2002).

Kuraklık stresinde su kaybından dolayı bitki stomalarını kapatır ve gaz değişimini sınırlandırılır. Kuruma çok daha kapsamlı su kaybıdır, metabolizmanın ve hücre yapısının çok kötü bozulmasına ve sonuç olarak da enzimle katalizlenen reaksiyonların kesilmesine neden olur (Smirnoff, 1993; Jaleel et al., 2007d). Kuraklık stresi su içeriğinin ve yaprak su potansiyelinin azalmasıyla, turgor kaybıyla, stomaların kapanmasıyla ve hücrenin genişlemesindeki ve büyümesindeki azalmayla karakterize edilir (Şekil 1.1) Kuraklık stresi fotosentezin bloke edilmesi, metabolizma bozulması ve bitkinin ölümüyle sonuçlanabilir (Jaleel et al., 2008c). Kuraklık stresi hücre büyümesini hücre bölünmesinden daha fazla inhibe eder. Fotosentez, solunum, translokasyon, iyon alınımı, karbohidratlar, besin metabolizması ve büyüme promotörleri gibi çeşitli biyokimyasal ve fizyolojik proseslerin etkilenmesiyle bitki büyümesi yavaşlar (Jaleel et al., 2008a-e; Farroq et al., 2008).



**Şekil 1.2** : Bitkilerde kuraklık stresinde büyümenin kısıtlanmasındaki bazı nedenler (Jaleel et al., 2009).

## 1.2 Bitkilerde GABA Metabolizması



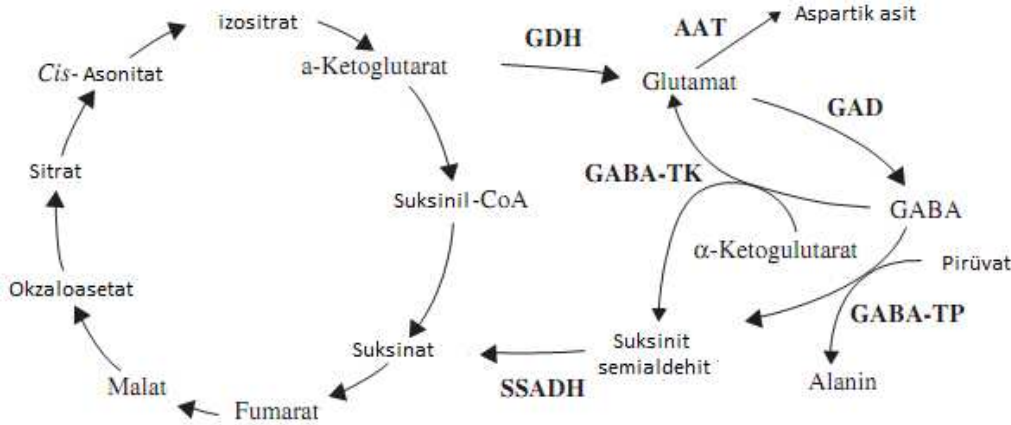
**Şekil 1.3.** GABA yapısı: Glutamat dehidrogenaz yardımıyla glutamattan GABA sentezi (Jorgensen, 2005).

Gama-aminobutirik asit protein yapısına katılmayan 4 karbonlu bir amino asittir, serbest amino asit havuzunun önemli bir bileşenidir (Shelp et al., 1999). Suda yüksek bir çözünürlüğe sahiptir: yapısal olarak esnek bir moleküldür, çözeltide birkaç konformasyonda olduğu varsayılır ve proline benzer bir halkasal yapı içerir (Christensen et al., 1994). Tipik olarak, bitki dokularında GABA seviyeleri düşüktür; 1 gram taze yaprakta 0,03 ile 2,00 µmol arasında değişir (Rhodes et al., 1986; Fougère et al., 1991) fakat ısı şoku, mekanik uyarı, hipoksiya ve fitohormonları içeren birçok farklı uyarıya karşı oluşan yanıtta birkaç kat artar (Pérez et al., 1994; Bown and Shelp; 1989, 1997; Satyanarayan and Nair, 1990). Strese yanıt metaboliti olan GABA'nın bitkilerdeki fonksiyonu hâlâ tartışılmasına rağmen (Bouché and Fromm, 2004) çevresel uyarının çoğuna karşı oluşan yanıtta hücre seviyesinde birikmesi özel ilgi uyandırmıştır (Kinnersly and Turano, 2000).

Bakterilerde, mantarlarda, bitkilerde ve omurgalılarda korunmuş olan GABA (Bouché and Fromm, 2004) ilk kez patates (*Solanum tuberosum*) yumrularında keşfedilmiştir (Dent et al., 1947), fakat nörotransmisyonunda temel bir rol oynayan GABA'nın beyinde yüksek seviyede çıkmasından dolayı ilgi hayvanlara doğru yön değiştirmiştir (Bouché and Fromm, 2004). Teorik fonksiyonları osmoregülasyon (Shelp et al., 1999) ve glutamat homeostazisinin kontrolü (Masclaux-Daubresse et al., 2002) gibi GABA metabolizmasına bağlanır. Ayrıca pH düzenlemesine katıldığı (Carroll et al., 1994; Crawford et

al., 1994) ve TCA'yı atladığı (Studart-Guinmarães et al., 2007) kanıtlanmıştır. Bunların yanında, GABA'nın nitrat alınımını ayarlama (Beuve et al., 2004), 14-3-3 genlerinin düzenlenmesinde (Lancien and Roberts, 2006) ve polen tüpünün büyümesinde ve yönlendirilmesinde (Palanivelu et al., 2003) bir sinyal molekülü olarak hareket ettiği rapor edilmiştir.

Bitkilerde ve hayvanlarda iki hücresel bölmede yer alan GABA metabolizması üç enzimli bir yolakta değerlendirilir (Renault et al., 2010) (Şekil 1.4). Sitosolik glutamat dekarboksilaz (GAD, EC 4.1.1.15) aktivitesiyle GABA temel olarak L-glutamattan sentezlenir (Renault et al., 2010). Daha sonra GABA transaminaz (GABA-T, EC 2.6.1.19) ile katabolize edilmek için mitokondriye taşınır, GABA-T GABA'yı suksinik semialdehite (SSA) dönüştürür (Van Cauwenberghe et al., 2003). Ardından, SSA mitokondrial suksinik semialdehid dehidrogenaz (SSDH, EC 1.2.1.16) ile suksinata okside edilir (Busch and Fromm, 1999). Alternatif olarak, gama hidroksibutirat (GHB) üreten gama hidroksibutirat dehidrogenazın aktivitesiyle SSA sitosolde indirgenebilir de (Breitkreuz et al., 2003).



Şekil 1.4 Trikarboksilik asit döngüsü ve GABA alternatif yolu (Akihiro et al., 2008).

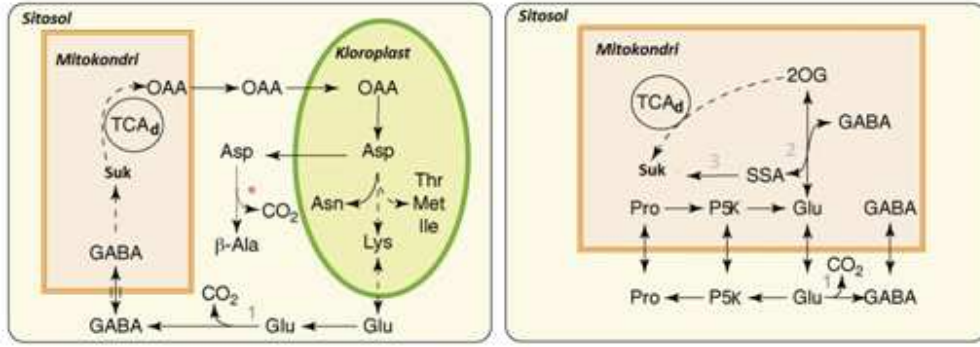
### 1.2.1 Glutamat Dekarboksilaz (GAD; EC 4.1.1.15)

Glutamat dehidrogenaz (GAD) L-glutamat için spesifik, pridoksal 5'-fosfat-bağımlıdır, sülfhidril gruplarıyla reaksiyon verdiği bilinen ajanlar

tarafından inhibe edilir, kalmodulin-bağlayan bir domaine sahiptir ve optimum pH değeri ~5,8 gibi bir pH sergiler (Barry et al., 1999). *Petunya*'da (Baum et al., 1993), domateste (Gallego et al., 1995), tütünde (Yun and Oh; 1998) ve *Arabidopsis*'de (Turano and Fang; 1998; Zik et al., 1998) GAD genleri tanımlanmıştır. Bitkilerde GAD fonksiyonu ve düzenlenmesi ile ilgili çalışmalar *Petunya* GAD geninin klonlanmasıyla ve  $Ca^{2+}$ -bağımlı kalmodulin (CaM)-bağlayan proteinik kodlanan enzimin karakterizasyonu ile uyarılmıştır (Baum et al., 1993). Daha sonra, çeşitli bitki türlerindeki ekstratlarda GAD aktivitesinin  $Ca^{2+}$  ile ayarlandığı bulunmuştur (Snedden et al., 1995; Ling et al., 1994; Arazi et al., 1995; Aurisano et al., 1995).

*Petunya* GAD'ının CaM bağlayan domainin detaylı moleküler analizi (Arazi et al., 1995) ve  $Ca^{2+}$ -CaM'la düzenlenen enzimin saflaştırılan rekombinant proteininin karakterizasyonu (Snedden et al., 1995) çeşitli stres durumlarına yanıtta GAD aktivitesinin hızlı uyarılarını açıklamak için bir çalışma modeli sağlar, bu da sitosolik  $Ca^{2+}$  konsantrasyonlarındaki değişiklikleri aydınlatır. Bu hipotezi destekleyen kanıt  $Ca^{2+}$ -CaM içeren anoksiya (Aurisano et al., 1995) ve soğuğa karşı (Cholewa et al., 1997) yanıtta GAD aktivitesinin uyarılmasının kanıtlanmasıyla sağlanmıştır (Şekil 1.5). Ayrıca  $Ca^{2+}$ -CaM ile GAD aktivitesinin düzenlenmesi hem *in vitro* (Zik et al., 1998; Turano and Fang, 1998, Snedden et al., 1996; Yevtushenko et al., 2003) hem de *in vivo*'da (Aurisano et al., 1995; Colewa et al., 1997) kanıtlanmıştır. Ayrıca, *petunya* GAD CaM-bağlayan domainine bağlanan CaM'ın üç boyutlu yapısı nükleer magnetik rezonans ile belirlenmiştir (Yap et al., 2003), CaM-bağlayan domainin iki peptidi ile CaM'ın ilginç bir bağlantısını açığa çıkarmıştır. CaM bağlı GAD ya da CaM-bağlayan domaini eksik olan GAD'ı ifade eden transgenik bitkilerde GAD protein kompleksi oluşumunun ve kararlılığının düzenlenmesinde CaM'ın bir rolü olduğu belirlenmiştir (Baum et al., 1996). Ayrıca CaM-bağlayan domain mutanti olan pirinçde (*Oryza sativa*) GAD izoformunun varlığı öne sürülmüştür (Akama et al., 2001). Sonuç olarak bazı izoformların monokotillerde mi yoksa dikotillerde mi olduğu bilinmemektedir. GAD'ı ya da CaM'ı bağlama özelliği olmayan mutant GAD'ı ektotip olarak ifade eden transgenik bitkilerin kullanımı *in vivo*'da GAD'a bağlanan CaM'ın önemi için ayrıca kanıt sağlar (Baum et al., 1996).





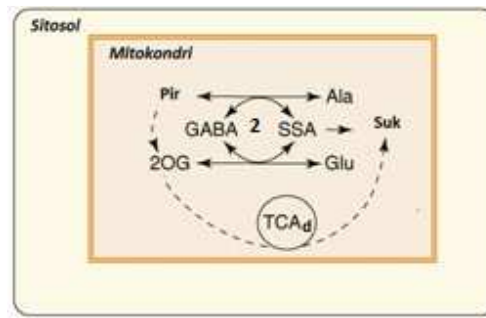
**Şekil 1. 5:** GAD aktivitesi ve GABA-Stres ilişkisi. 1, GAD; 2, GABA-T ve 3, SSADH (Fait et al., 2007).

*Arabidopsis* genom dizisinin tamamlanmasından sonra (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000), dizi karşılaştırması ile beş tane GAD geni tanımlanmıştır (Shelp et al., 1999). GAD izoformlarının en azından ikisi (GAD1 ve GAD2) organ dağılımında farklıdır: GAD1 köke spesifiktir fakat GAD2 tüm organlarda ifade olur (Zik et al., 1998; Turano and Fang; 1998). Bu bulgular farklı GAD izoformlarının dokuya bağlı bir yolda ifade olacağını ve spesifik fonksiyonlara sahip olabileceğini belirtir.

### 1.2.2 GABA Transaminaz (GABA-T; EC 2.6.1.19)

GABA transaminaz (GABA-T; EC 2.6.1.19) GABA yoluyla ilgili ikinci enzimdir, amino alıcısı olarak ya pirüvatı (GABA-TP) ya da  $\alpha$ -ketoglutaratı (GABA-TK) kullanarak GABA'nın SSA'ye iki yönlü sentezini katalizler, reaksiyonun sonunda glutamat ya da alanin sentezlenir (Şekil 1.6). Memelilerde sadece GABA-TK bulunur oysa bitki ekstratlarında her iki enzim aktivitesi de tespit edilmiştir (Shelp et al., 1999). Bitkilerde  $\alpha$ -ketoglutarata-bağımlı GABA-TK enzimi tanımlanmamıştır fakat pirüvata-bağımlı GABA-TP tütünden kısmen saflaştırılmıştır ve homolog *Arabidopsis* geni sonradan klonlanmıştır (Van Cauwenberghe et al., 2002). *in vitro*'da karakterize edilen rekombinant *Arabidopsis* GABA-TP pirüvat kullanır fakat  $\alpha$ -ketoglutarat kullanmaz bitkisel olmayan GABA-T'ler ile çok az homoloji paylaşır (Van Cauwenberghe et al., 2002). İlgili genin çalışmadığı *Arabidopsis* mutantları

yabani tip ile karşılaştırıldığında çiçeklerde 100 kat daha fazla arttırılmış GABA içeriğine sahip olduğu gözlenmiş ve GABA-TP'nin in vivo GABA yolunda fonksiyonel bir enzim olduğu doğrulanmıştır (Palanivelu et al., 2003). Bu mutanttaki yapraklarda GABA seviyelerinin artışı sınırlandırılmıştır, bu durum da GABA-TP'nin çiçeklerde özelleşmiş fonksiyonlara sahip olduğunu gösterir ve diğer GABA-T'lerin bitkinin geri kalanında GABA'yı parçalıyor olduğunu ifade eder. Bu yüzden, bitkilerde GABA transaminasyonu farklı tip GABA-T'ler yolu ile gerçekleşir, muhtemelen özelleşmiş fonksiyonlara sahip GABA-T'ler ile oluşur.



**Şekil 1. 6:** GABA-T aracılığı ile mitokondrial GABA metabolizması. 2, GABA-T. (Fait et al., 2007).

### 1.2.3 Suksinik Semialdehit Dehidrogenaz (SSADH; EC 1.2.1.16)

Bitkilerde ilk klonlanan suksinik semialdehit dehidrogenaz (SSADH) geni biyokimyasal olarak analiz edilmiştir (Coleman et al., 2001). Patates yumrularında ve *Arabidopsis* hücre kültürlerindeki mitokondrilerde lokalize olan ve saflaştırılan rekombinant *Arabidopsis* SSADH'ye karşı antikor artmıştır, soya fasulyesi hücrelerinde SSADH lokalizasyonunun araştırıldığı daha önceki çalışmaları ile de uyumludur (Breitkreuz and Shelp, 1995). Farklı organizmalarda SSADH'ın mitokondrilerdeki subselüler lokalizasyonu ortak fakat bazı istisnalar tanımlanmıştır, örneğin mayada enzim sitosoldedir (Coleman et al., 2001). *in vitro* ölçümler SSADH'ın SSA'e spesifik olduğunu ve özellikle NADH üretmek için  $NAD^+$ 'yi kullandığını açığa çıkarmıştır. Özellikle, hem ATP hem de NADH enzim aktivitesini negatif olarak düzenler. SSADH ile

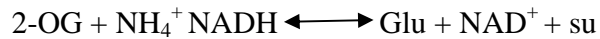
katalizlenen reaksiyonların her iki ürünü (Süksinat ve NADH) mitokondrial solunum zincirinin substratlarıdır, solunum zincirinde son ürün olarak ATP üretilir. Bu yüzden, ATP ile SSADH'ın düzenlenmesi solunum zincirine karşı GABA yoluyla sağlanan substrat oranlarının sıkı bir geri besleme kontrolünde olduğunu gösterir. Sonuç olarak, geri besleme düzenlemesi GABA'nın durgun evre seviyelerinin kontrolünde bir rol oynayabilir (Şekil 1. 5).

Çevresel strese maruz kalan *Arabidopsis* bitkisinde reaktif oksijen ürünlerinin anormal birikiminden dolayı özgün SSADH geninin bozulması bitkilerde nekrotik hücre ölümüne neden olmuştur. Örneğin, ssadh mutantları beyaz ışığa ( $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) maruz bırakıldığında nekrotik lezyonlar ile cücelik gözlenmiştir (Bouché et al., 2003). Aslında, ssadh mutantları iki tip çevresel strese duyarlıdır hem ultraviyole ışık (özellikle ultraviyole B) hem de ısı, ssadh mutantlarında  $\text{H}_2\text{O}_2$  seviyelerinde hızlı bir artışa neden olmuştur ve bu da çoğalan hücre ölümü ile yaprak nekrozislerine neden olmuştur (Bouché et al., 2003). ssadh mutanalarının fenotipi bazı metabolitlerin (örneğin solunum zincirinde NADH'ın ya da süksinatın kaybı) kaybına neden olur, olası bir toksik etki ile GABA yolundan türevlenen bir metabolitin aşırılığıyla [örneğin SSA ya da  $\gamma$ -hidroksibutirik asit (GHB)] ya da GABA yolundan türevlenen sinyal moleküllerindeki (GABA'yı da içerir) bir dengenin eksikliğiyle oluşturulabilir. Bitki mitokondrilerinde TCA döngüsünün birkaç enzimi (süksinil CoA ligaz ve  $\alpha$ -ketoglutarat) GABA yolunda atlanır (Şekil 1.5), bu enzimler oksidatif stres koşullarında parçalanır (Sweetlove et al., 2002). Beyinde yapılan bir çalışmada,  $\text{H}_2\text{O}_2$ -indüklü oksidatif stres boyunca  $\alpha$ -ketoglutarat dehidrogenazın inhibisyonu çok önemli bir biçimde NADH miktarını kısıtlar ve oksidatif strese karşı GABA yolunun bir rolü olduğu öne sürülmüştür (Coleman et al., 2001). Bitkilerde  $\text{Ca}^{+2}$  sinyali ile reaktif oksijen türleri arasındaki bir ilişki aydınlatılmıştır (Yang and Poovaiah, 2002; Pei et al., 2000; Larkindale and Knight, 2002; Coelho et al., 2002; ). GAD aracılığıyla  $\text{Ca}^{+2}$  tarafından düzenlenen GABA yolu stres koşullarında aktive edilir reaktif oksijen türlerinin artan üretimine neden olur.

### 1.2.4 Glutamat Dehidrogenaz (GDH; EC 1.4.1.2)

Omurgalılarda olduğu gibi bitkilerde de GABA, 2-okzoglutarattan sentezlenir. 2-okzoglutarat glutamat dehidrogenaz enzimi (GDH; EC 1.4.1.2) vasıtasıyla glutamata dönüştürülür. Daha sonra glutamat, glutamat dekarboksilaz (GAD) enzimi yoluyla GABA'ya dekarboksillenir (Kathiresan et al., 1997). GABA, glutamatın dekarboksillenmesi ile oluşturulur ve mitokondride süksinik semialdehit yoluyla süksinata metabolize olur (Bidwell, 1963; Cleddening et al., 1952; Dixon et al., 1961; Naylor et al., 1956). Kofaktör NAD(P)H varlığında  $\alpha$ -ketoglutaratın indirgeyici aminasyonunu gerçekleştirerek glutamat oluşumunu sağlayan (Turano et al., 1996) glutamat dehidrogenaz (GDH) enzimi kofaktör tercihinine ve hücre içi lokalizasyonuna göre çeşitli izoformlara sahiptir. NADH'a özgü GDH enziminin aktivitesi mitokondride saptanmışken NAD(P)H'a özgü enzim kloroplastlarda saptanmıştır. GDH izoformları gelişimsel ve çevresel koşullara bağlı olarak farklı bitki dokularında farklı oranlarda bulunabilir (Turano et al., 1996).

Bitki fizyologları yüksek bitkilerde GDH'nin rolünü anlamak için otuz yılı aşkın süredir uğraşmaktadır (Labboun et al., 2010). Bitkideki C ve N metabolizmasının hücresel seviyede sürekli bir dengede olması gerekmektedir (Purnell and Botella, 2007). Bu durum temelde üç metabolitin hücresel seviyede düzenlenmesini içerir: Amonyum ( $\text{NH}_4^+$ ), N organik molekülleri asimile eder; 2-okzoglutarat (2-OG),  $\text{NH}_4^+$  e karbon iskeleti olarak katılır ve Glutamin (Glu)  $\text{NH}_4^+$  ile 2-OG'nin yoğunlaşmasıyla oluşan amino asittir (Lancien and Gadal, 2000; Corizzi and Zhou, 2001).



Yüksek bitkilerde kullanılabilir  $\text{NH}_4^+$ 'ün %94'ü Glutamin sentetaz/Glutamat Sentaz (GS/GOGAT; EC 6.3.1.2/EC 1.4.7.1 ve 1.4.1.14) üzerinden asimile edilir (Lea and Miflin, 1974) ve bu konuyla ilgili olarak uzun yıllardan beri yapılan çalışmalar GDH'nin  $\text{NH}_4^+$  asimilasyonunu düzenlendiğini göstermektedir (Yamaya and Oaks, 1987; Oaks, 1995; Melo-Oliveira et al., 1996). GDH aktivitesinin özellikle stres koşullarında  $\text{NH}_4^+$  birikimini

desteklediği tahmin edilmektedir (Skopelitis, 2006). Diğer görüşler ise, standart büyüme koşullarında, GDH  $\text{NH}_4^+$ 'u şekillendirmek için Glu deaminasyonu yönünde işler (Robinson et al., 1992; Fox et al., 1995; Stewart et al., 1995, Glévarec et al., 2004). C eksikliği koşullarında GDH katabolik yönde çalışır, buna bağlı olarak hücrel C ve N oranlarını değiştirmeye yardım edebilir ve /ya da TCA döngüsünü besleyebilir (Rhodes et al., 1989; Robinson et al., 1991, 1992; Aubert et al., 2001; Loulakakis and Roubelakis-Angelakis, 2001; Mifflin and Habash, 2002; Dubois et al., 2003; Skopelitis et al., 2006).

McKenzie and Lees (1981) tohum ve kökten ekstrakte edilen GDH enziminin mitokondride yer aldığını bulmuşlardır. GDH2 izoformu ise kloroplastta yer alır. Turano et al. (1996) çimlenen soya fasulyesi tohumlarında yaptıkları çalışmada üç farklı GDH izoformu (GDH1, GDH2, GDH3) tespit etmişlerdir. GDH izoformlarının organlara özgü dağılımının tespit edildiği çalışmada GDH1 ve GDH2 kotiledonlardan, GDH3 ise hipokotillerden ve köklerden elde edilen protein ekstraktlarında bulunmuştur (Turano et al., 1996). GDH izoformları farklı genler tarafından kodlanır. Örneğin Arabidopsis (Cammaerts and Jacobs, 1983) ve mısırdaki (Pryor, 1979; Goodman et al., 1980; Sakakibara et al., 1995) yapılan moleküler ve genetik çalışmalarda GDH izoformlarının iki farklı polipeptitten oluştuğu ve iki farklı lokus tarafından kodlandığı belirlenmiştir.

### **1.3 Bitkilerde GABA İçin Öngörülen Roller**

#### **1.3.1 C:N Dengesine Katılma**

$\gamma$ -aminobutirik asit (GABA) seviyeleri bazı bitki dokularında yüksektir. Örneğin, kiraz domates çeşitinde GABA seviyeleri serbest amino asit havuzunun %50'sine kadar ulaşabilmektedir (Rolin et al., 2000) ve GABA konsantrasyonları farklı streslere yanıtta dikkat çekici bir biçimde artabilmektedir (Shelp et al., 1999; Snedden and Fromm; 1999). Ayrıca, *Arabidopsis* azot kaynağı olarak yalnızca GABA içeren bir ortamda etkili bir şekilde büyüyebilir (Breitkreuz et al., 1999). GABA genel olarak azot metabolizması ile ilişkilidir ve olasılıkla azotun depolanmasıyla ve/ya da

taşınımıyla da ilişkilidir. GABA yolu glutamattan karbonları asimile etmek için ve C:N akışının düzenlenmesi için (burdan da TCA döngüsüne girer) bir yoldur.

### 1.3.2 Sitosolik pH'ın Düzenlenmesi

Bakterilerde asit direncinde GABA yolunun bir rolü vardır (Castanie-Cornet et al., 1999; Ma et al., 2002). *Escherichia coli* aşırı strese maruz kaldığında GAD indüklenir, aslında böylece glutamat dekarboksilasyonunun katalizlenmesiyle protonları uzaklaştırır (Şekil 1.5). Üretilen GABA hücrelerden dışarı taşınır (Iyer et al., 2002). Bitkilerde, GAD asidik pH'da aktive olur (Snedden et al., 1995, 1996) ve sitosolik asidifikasyona yanıtta GABA birikir (Shelp et al., 1999), böylece bitkilerde GAD aktivitesi sitosolik pH'ı düzenlemede rol alır.

### 1.3.3 Oksidatif Strese Karşı Koruma

*Arabidopsis*'de, SSAD'da hasarlı mutantlar çevresel strese karşı daha hassastır çünkü H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'yi süpüremez (Bouché et al., 2003). GABA yolunun son adımı solunum zincirine hem suksinat hem de NADH sağlar. TCA döngüsündeki bazı enzimleri inhibe eden oksidatif stress koşullarında reaktif oksijen ara ürünlerinin birikmesini GABA degradasyonunun sınırlayabileceği hipotezi ortaya atılmıştır. GABA yolu enzimlerinde knock out olan mutantların H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'ye daha duyarlı olduğu görünür (Coleman et al., 2001).

### 1.3.4 Böceklere Karşı Savunma

Omurgalılarda ve omurgasızlarda GABA nörotransmitter olduğu için böcek beslenmesini engellemek için bitki tarafından GABA üretilebildiği tahmin ediliyor. GABA seviyeleri mekanik uyarıyla ya da zararlarla (Ramputh and Bown; 1996) ve hatta yapraktaki böcek ısırılmalarıyla bile yükselir (Bown et al., 2002).

### **1.3.5 Bir Osmoregülatör Olarak GABA**

Hem *Arabidopsis*'deki [yani AtProT2 (Breitkreuz et al., 1999)] hem de domatesteki [yani LeProT1(Schwacke et al., 1999)] prolin taşıyıcıları GABA'yı taşır, su stresi ya da tuz stresi boyunca AtProT2 güçlü bir şekilde indüklenir (Rentsch et al., 1996). Prolin-GABA taşıyıcı proteinleri uyumlu bileşikleri de taşıyabilir, bu taşınım farklı streslere karşı savunmada rol oynar (Bouché and Fromm, 2004).

### **1.3.6 Bir Sinyal Molekülü Olarak GABA**

Memelilerde, sinyal iletim yolundaki rolü net bir şekilde tanımlanan GABA, en önemli nörotransmitlerdendir. Benzer bir şekilde, GABA'nın bitkilerde de sinyal yolu ile ilişkili bir molekül olduğu düşünülmektedir (Kinnersley and Turano, 2000; Bouché et al., 2003). Bitkilerde GABA reseptörlerinin varlığı ile ilgili bulgular vardır ancak kesin olarak kanıtlanmamıştır. Bununla birlikte bitki glutamat reseptörleri ayarlayıcı ligand olarak GABA'yı kullandığı bilinmektedir (Bouché and Fromm, 2004).

## **1.4 GABA Yolu ve Azot Metabolizması**

Bitkiler besin çevrelerini hisseder ve sensörlerin, reseptörlerin, taşıyıcıların, sinyal iletim bileşenlerinin ve gen ifadesi regülatörlerinin karmaşık bir sitemini kullanarak alınımlarını ve metabolizmalarını modifiye ederek tepki verir, bu tepki toplam olarak büyüme oranlarında ve gelişmesinde değişikliklere neden olur (Snead, 2000). Daha spesifik olarak, C:N dengesini düzenleyen kompleks mekanizmaların oluşturduğu sinyali şeker seviyelerinin düzenlenmesini, azot alınımını ve indirgenen azotun içsel içeriğini (örneğin amonyum ve amino asitler) kapsar. GABA yolunun C:N dengesiyle ve azot metabolizmasıyla ilişkili metabolik yolların bir kısmını oluşturduğu görülmektedir (Bouché and Fromm; 2004).

### 1.4.1 Azot Metabolizmasında GABA Yolunun Etkisi

Genellikle inorganik azot glutamin sentetaz/glutamat sentaz (GS/GOGAT) yolağı yardımıyla glutamat üretmekle asimile edilir, GABA da çoğu amino asitin sentezindeki başlangıç noktasıdır (Şekil 1.5). GAD seviyeleri modifiye edildiğinde glutamat seviyeleri çok ciddi şekilde etkilenebilir. Örneğin, sürekli aktif GAD'ın aşırı ifadesini yapan transgenik bitkiler önemli biçimde azalan glutamat seviyesine sahiptir (Baum et al., 1996). Hâlâ, yabancı bitkilerde glutamat seviyelerinin kontrolünde GAD'ın önemi netleşmemiştir. Bu sorun kısmen tütünde araştırılmıştır, birkaç metabolit seviyeleri iki gün gece gündüz döngüsü boyunca takip edilmiştir ve en yukarıda ki genç yapraklar (yani havuz) ve en yaşlı yapraklar (yani kaynak) arasında karşılaştırma yapılmıştır (Masclaux-Daubresse et al., 2002). Diurnal ritimler farklı amino asitler için her iki yaprak tipinde belirlenmiştir (Stitt et al., 2002). İlginç bir şekilde, diurnal değişikliklerde yalnızca GABA ve glutamat metabolitleri kaynak ve havuz arasında 6 saatte yön değiştirmiştir. Bu bulgu, GABA sentezinin glutamat içeriğine sıkı bir şekilde bağlı olduğunu düşündürür ve Masclaux-Daubresse ve ark. (2002) GABA'nın glutamat üretimini tamponlamada dominant bir role sahip olduğu hipotezini ortaya atmışlardır. Bu da geçici azot depo metabolitleri olarak GABA'nın rolü hakkındaki önceki gözlemleri doğrulayabilir (Shelp et al., 1999; Snedden and Fromm, 1999). Bu düşüncenin sonrasında, GAD aktivitesinin glutamat seviyesinde düzenlediğini ortaya atar (Shelp et al., 1999).

C:N dengesini kontrol etmek için, bitkiler azalan azot durumunu algılayabilir ve yeterince nitrat alınımı ve indirgenmesini düzenleyebilir (Forde, 2002). Hâlâ, bitkilerin proste sensör olarak kullandıkları metabolit(ler)in tanımlanması net değildir. Glutaminin oynadığı rol hâlâ tartışma konusudur ve muhtemelen amino asitleri ve şekerleri içeren diğer metabolitler ile ilişkilidir (Stitt et al., 2002). GABA bu metabolitlerden biri olabilir.

### 1.4.2 Azot Kullanılabilirliğiyle GABA Yolunun Düzenlenmesi

İndirgenmemiş azot ( $KNO_3$ ) kaynağından indirgenmiş azot formlarına ( $NH_4Cl$ ,  $NH_4NO_3$ , glutamat ya da glutamin) geçen değişken bitkilerle yapılan



dört günlük denemeler *GAD2* transkript seviyelerinde ve proteinlerinde ve *Arabidopsis* yaprak ektratlarında toplam GAD spesifik aktivitesindeki bir artışla sonuçlanmıştır (Turano and Fang, 1998); *GAD1* belirlenmemiştir çünkü köke spesifiktir (Zik et al., 1998; Turano and Fang; 1998 ). 20 dakikalık kısa bir süre boyunca amonyumdan 250  $\mu\text{M}$  nitrate kayan bitki transkriptomlarının mikroarray analizi köklerde ya da gövdede diğer herhangi bir GABA yolu genlerinde ve GAD genlerinin transkriptomunda herhangi bir değişiklik göstermemiştir (Wang et al., 2003). Bu yüzden, GABA ve nitrat ya da amonyum alınımı ve asimilasyonu arasındaki bağlantılar hâlâ net değildir ve transkripsiyondan enzim aktivitesinin metabolik kontrolüne kadar farklı seviyelerde GABA yolu düzenlenir bu bağlamda ayrıca araştırmalar gereklidir.

## 1.5 Bitkilerde Bir Sinyal Molekülü Olarak GABA

### 1.5.1 GABA ve Polen Tüpü Büyümesi

*Arabidopsis*'de, polen-pistil-etkileşimi2 (*pop2*) mutanti pistillerde polen tübünün öncülüğü ve büyümesi etkilenmiş mutantlardır (Wilhelmi and Preuss; 1996). Bu proste GABA'nın belirli bir öneminin olduğu bulunmuştur çünkü GABA katabolizmasına katılan pürivate-bağımlı GABA-T'yi (GABA-TB) kodlayan *pop2*'de mutasyonlu gendir (Palanivelu et al., 2003). Yaban tipinde, polen tübünün dışı dokulara hareket ettiği yol boyunca GABA konsantrasyonu artar, böylece pistilde GABA gradiyenti yaratılmış olur. *pop2* bitkilerinde gradient bozuktur çünkü çiçeklerinde GABA biriktirirler. İlginç olan, polen tübünün hem öncülüğü hem de büyümesi *pop2* ve yaban tipi bitkiler çaprazlandığında onarılabilir. Böylece, pistil ya da polen tübünün kendisi aktif bir POP2 enzimini (GABA-TP) ve GABA'yı degrades edebilirse polen tübü tam olarak ovule hedeflenir. Polen tübü gelişiminde GABA miktarlarının uygun seviyedeki gerekliliğinin net olmasına rağmen ilgili mekanizmalar hala belirsizdir ve ilgili mekanizmalar GABA reseptörleriyle (yani sinyal rolü) ya da GABA homeostazisinin modifikasyonu (yani metabolik dengesizlik ya da toksisite) araya girebilir.

### 1.5.2 GABA Reseptörleri

Memeli merkez sinir sisteminde, GABA başlıca nörotransmitterdir, pre- ve postsinaptik membranlarda lokalize olan reseptörlere bağlanarak inhibitör sinaptik akımlara aracılık eder. Yapılan çalışmalar (Kinnersley and Turano, 2000; Turano and Fang, 1998) bitkilerde GABA reseptörlerinin mümkün varlığı tartışılmıştır, GABA reseptörleri bir sinyal molekülü olarak GABA'nın çalışmasına aracılık edebilir. Kısacası, hayvanda bulunan GABA reseptörlerine yüksek derecede homolog olan GABA reseptörleri *Arabidopsis* genomunda mevcut değildir. Buna rağmen, memeli iyonotropik glutamate reseptörleri (iGluRs) ile diz ve yapısal bakımdan homoloji paylaşan [*Arabidopsis* glutamat reseptörleri için dizayn edilen AtGLRS (Wilhelmi and Preuss, 1996)] bir protein ailesi ile GABA'nın etkileşim kurduğu hakkında şüpheli olduğu sebepler vardır. Glutamate (Kang and Turano, 2003; Davenport, 2002) ya da glisin (Dubos, 2003) ile uyarıldığında AtGLR'ler  $Ca^{2+}$  aracılığıyla bitki hücrelerine girebilir. Buna rağmen, glutamate/glisin-bağlayan domain ek olarak, AtGLR'ler modulator olarak ligand molekülleri (GABA<sub>B</sub> reseptörlerini içeren birkaç reseptör domainleri ile yapısal homoloji paylaşan moleküllerdir.) bağladığı bilinen bir domaine sahiptir (Galvez et al., 1999; Turano et al., 2001). Bu yüzden, ana ligandlarına (glutamate ya da glisin) ek olarak GABA'nın bu domaini bağlayabildiği ve AtGLR'leri module ettiği spekülasyonlarını arttırmıştır. Ayrıca, bitkilerde GABA-yanıt reseptörlerinin mümkün rolünü önerilmesine karşı olarak hayvan GABA reseptörlerinin bilinen gonistleri ve agonistleri su mercimeği (*Lemna minor*) büyümesindeki etkilerini karşılaştırabilir (Kinnersley and Lin, 2000). Bu reseptörlerin kesin olarak doğasının ve fonksiyonunun belirlenmesi gerekmektedir.

Bir çalışmada, Kang ve Turano (Kang and Turano, 2003) bitkilerin fenotipini kanıtlamıştır, farz edilen glutamat reseptörlerinden birinin fonksiyonu antisens teknoloji ile bastırılmıştır. Bu transgenik hatlarda, C:N dengesinin kontrolüyle ilişkili birkaç anahtar enzim tam anlamıyla düzenlenmez. Bu yüzden GABA ya glutamat reseptörlerinin (sinyal rolü) yardımıyla ya da glutamat kullanılabilirliğinin kontrolüyle (metabolik rol) C:N dengesinin kontrolüyle ilişkilendirilebilir.

## 1.6 Mitokondrial Solunum Zinciri ve ATP Sentaz Kompleksi

Mitokondrial iç membranda yer alan beş tane multi-alt birimli enzimlerden oluşan enzim yolunda oksidatif fosforilasyon ile mitokondri ATP üretir. Bu yol elektron taşınım zincirinde alt bölümlere ayrılır, kompleks I (NADH:ubikinon oksiredüktaz), kompleks II (süksinat:ubikinon oksiredüktaz), kompleks III (ubikinol:sitokrom c oksiredüktaz), kompleks IV (sitokrom c:O<sub>2</sub> oksiredüktaz) ve kompleks V (ATP sentaz) (Hatefi, 1985). Bu kompleks sisteminin yapısı ve fonksiyonu heterotrofik ökaryotlarla yakın ilişkili olduğu düşünülmektedir (Dudkina et al., 2006).

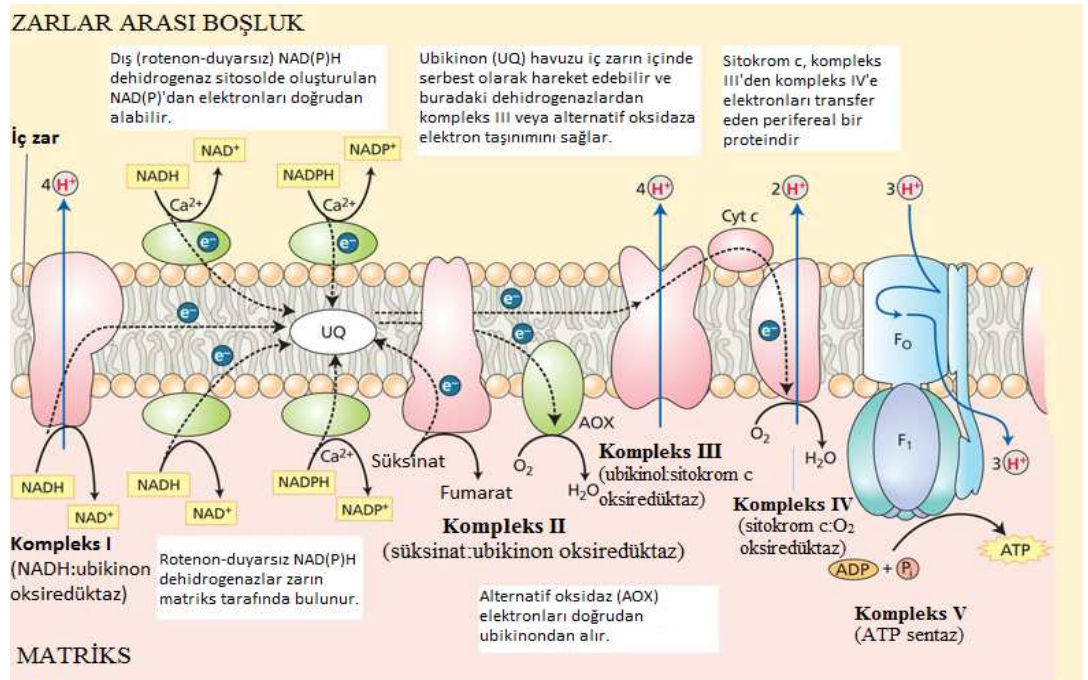
Kompleks I solunum zincirine elektronların temel giriş noktasıdır (Friedrich and Böttcher, 2004). Moleküler ağırlığı ~1 MDa'dır ve L-benzeri yapıyı oluşturan iki uzun domainden oluşmuştur. Bir domain mitokondrial iç membranda lokalize olur ve proton translokasyonu ile ilişkilidir; diğer domain membrandan mitokondrial matrikse çıkıntı yapar ve NADH'in oksidasyonundan sorumludur. Kompleks I'i oluşturan yaklaşık olarak 40 farklı alt birimin olduğu bilinmektedir (Carroll et al., 2003; Abdrakhmanova et al., 2004).

Kompleks II solunum zincirine elektronların ikinci giriş noktasıdır (Yankovskaya et al., 2003; Horsefield et al., 2004). Sistemin en küçük kompleksidir ve matris türevli çözünebilir iki domainden oluşur, iki hidrofobik membran proteinlerine bağlanır.

Kompleks III sistemin merkez bileşimini oluşturur (Berry et al., 2000; Hunte et al., 2000). 2x10 ya da 11 farklı alt birimden oluşan ~500 kDa ağırlığında fonksiyonel bir dimerdir. Kompleksin dörtte biri iç mitokondrial membranda gömülmüştür ve en büyük parçası da mitokondrial matrikse gömülmüştür.

Kompleks IV solunum zincirinin terminal kompleksini oluşturur (Tsukihara et al., 1996; Michel et al., 1998), 12-13 tane ~220 kDa'lık bir monomeri oluşturur. Membrandaki bir monomer ya da bir dimer olarak bulunabilir.

Kompleks V mitokondrial matriks içinde  $F_1$  başlığı olarak adlandırılan iki parçalı bir yapıdır,  $F_1$  başlığı iç mitokondrial membranda bulunan hidrofobik  $F_0$ -parçasına saplanmıştır (Stock et al., 2000). İki kısımdan oluşan kompleks V merkez bir sapla bağlantılıdır, tüm başlığın rotasyonunu sağlamak için kataliz boyunca periferel sap vasıtasıyla döner. Kompleks V'in iki alt bileşenindeki alt birimlerin rotasyonu iç mitokondrial membranda proton gradiyenti tarafından oluşur ve ADP'nin fosforilasyonundaki temeli oluşturur. Kompleks V kısmen holo-enzimdeki multiple-kopyalarda bulunan ~15 farklı alt birimleri kapsar. Kompleks V'in toplam moleküler ağırlığı 550 ile 600 kDa arasındadır.



**Şekil 1.7:** Bitki mitokondrilerinin iç zarındaki ATP sentezi ve elektron taşıma zincirinin düzenlenişi (Taiz & Zeiger, 2002).

Elektronlar elektron taşıma zincirine kompleks I (NADH:ubikinin oksidredüktaz) üzerinden geçerek NADH'dan ya da süksinattan kompleks II'ye (Süksinat:ubikinin oksidredüktaz) geçer. Ubikinin yardımıyla kompleks III'e (ubikinin:sitokrom c oksidredüktaz) ve daha sonra sitokrom c yardımıyla kompleks IV'e (sitokrom c-O<sub>2</sub> oksidredüktaz) geçer (Şekil 1.7). Mitokondrial matriksden membranlar arası boşluğa protonların çekilmesi için Kompleks I, III ve IV elektron taşımasını gerçekleştirir. kompleks V'in oluşturduğu İç

memrandaki proton elektrokimyasal gradient oluşumu tarafından ATP sentezinde ADP ve Pi yoğunlaşması için gerekli potansiyel enerjiyi sağlar (Boyer 1997, Hatefi 1985).

### 1.7 *Nicotiana sylvestris* CMSII Mutantı

*Saccharomyces cerevisiae* gibi evrimsel olarak daha alttaki bazı mantarlar dışındaki çoğu ökaryotlarda, komplek1 mitokondrial solunum zincirinde elektron girişinde daha kompleks bir elemandır, matriksten türevlenen NAD(P)H'dan ubiquinona elektron transferini flavin mononukleotid ve bir grup demir sülfür kümesi yardımıyla katalizler (Weiss et al., 1991; Walker, 1992). Bu reaksiyon matrinden intermembran alana proton püskürtmesiyle başlar, ATP sentezi için gerekli olan elektrokimyasal gradiyenti oluşturur. Diğer organizmalar gibi bitkilerde, kompleks 1 en az 35 polipeptidin multimerik bir enzimdir (Leterme and Boutry, 1993). Bakterilerde bulunan "minimal kompleks 1" 14 alt birimden oluşur (Friedrich, 1998), bu alt birimlerin tümü ökaryotik mitokondrial kompleks 1: hayvanlarda (Chomyn et al., 1985, 1986), bitkilerde (Rasmusson et al., 1998) ve mantarlarda (Videira, 1998) korunmuştur. Memelilerde, yedi alt birim (NAD1, NAD2, NAD3, NAD4, NAD5, NAD6 ve NAD4L) mitokondri tarafından kodlanır (Walker, 1992), geri kalanı da nükleer genom tarafından kodlanır, sitosole taşınır ve oradan da organelere taşınır. *Neurospora*'da, Kompleks 1 iki alt kompleksten oluşur: (i) periferik bölüm, matrikse dönüktür, nükleer genom tarafından kodlanan 13 alt birimden oluşur, 30, 38 ve 49 kD'luk polipeptitler içerir; (ii) membranlar arası hidrofobik bölüm, mitokondri tarafından kodlanan tüm NAD alt birimleri kapsar ve geriye kalan nükleer kodlu alt birimleri de kapsar. Yüksek bitkilerde 30- ve 49-kD'luk altbirimler, sırasıyla NAD7 ve NAD9 diye adlandırılırlar, mitokondria genomu tarafından kodlanırlar (Gäbler et al., 1994; Lamattina et al., 1993).

Aerobik organizmaların enerji gereksinimlerinin neredeyse toplamı mitokondrial solunumla ölçüldüğünde, Kompleks 1 eksiklikleri tüm aerobik hücreler için letal olmalıdır. Bununla beraber, bitkisel ve fungal mitokondri alternatif solunum yollarının iki setini içerir, iç mitokondrial membranda lokalize olan proton-pompaleyen kompleksleri bypass eder (Rasmusson et al.,

1998) ve memeli mitokondrisinde herhangi bir eşleneği yoktur. Bu yollar: (a) En az dört ilave NAD(P) H:ubikinon oksiredüktaz (alternatif dehidrogenaz) Kompleks 1'i bypass eder. Bunların iki tanesi membranlar arası boşluğa bakar, sırasıyla sitosolik NADH'ı ya da NADPH'ı okside eder; diğer ikisi ise matrikse bakar, sırasıyla matriks türevli NADH ya da NADPH'ı okside eder. Bunların tümünün "Kompleks 1'e spesifik inhibitör" olan rotenona duyarsız olduğu göz önünde bulundurulmalıdır (Douce et al., 1973; Roberts et al., 1995; Melo et al., 1996; Møller, 1997) ve (b) unikinon havuzunun downstreami, alternatif oksidaz (AOX) Kompleks III'ü ve Kompleks IV'ü bypass eder ve siyanide duyarsızdır (Moore and Siedow, 1991; Siedow and Umbrach, 1995). AOX 35-kD monomerlik bir homodimerdir ve disülfid bağlarıyla kovalent bağlanır. İkincisi indirgendiğinde AOX aktifleşir ve ayrıca pirüvat tarafından uyarılır (Millar et al., 1993, Umbach et al., 1994). AOX gelişimsel olarak ve çevresel faktörler tarafından etkilenir ve gen ekspresyonu seviyesinde ya da enzim aktivitesiyle düzenlenebilir (Umbach and Siedow, 1993; Vanlerberghe and McIntosh, 1997).

Bu alternatif yolların rolü henüz net olarak aydınlatılamamıştır ve soluma katkısı kompleks 1 aktivitesine bağlı olabilir. Solunum mutanatlarnın kullanılması fizyolojik önemlerinin ve regülasyonunun anlaşılmasına yardım edebilir.

Farklı bitki türlerinde CMS, sitoplazmik erkek kısırlığı olarak bilinen ve bitki mitokondrisine doğrudan bağlantılı olan bir özelliktir. CMS'yi bulduran bitkiler canlı polen oluşturmazlar ve sonuç olarak erkek kısırlığı ortaya çıkar. CMS genotipi mitokondri genomunun kalıtımı daima anneye bağlıdır. Hibrit tohum stoklarının üretimini kolaylaştıran kararlı kısır erkek ırklar oluşturmamasından dolayı CMS, bitki ıslahında çok önemli bir özellik olarak bilinir. Bu özellik pek çok türde bulunmaktadır (Taiz ve Zeiger; 2002). *Nicotiana glauca* CMSII mutanının mitokondrial DNA'sı solunum kompleksi I (NADH-ubiquinon oksiredüktaz)'ın NAD7 altbirimini kodlayan 72 kb'lık *nad7* genine sahip değildir. CMSII bitkileri rotenona duyarlı kompleks I aktivitesinden mahrumdur (Pineau *et al.*, 2005) ve indirgenmiş vejetatif ve floral organlara sahiptirler (Gutierrez *et al.*, 1997). CMS II mutanının canlı kalmasına bağlı olarak mitokondrideki NAD(P)H oksidasyonu alternatif NAD(P)H-

dehidrogenaz yardımıyla daha düşük solunum etkinliğiyle devam eder (Sabar *et al.*, 2000). Buna bağlı olarak, CMSII mutanlığı yaban tipiyle karşılaştırıldığında daha düşük asimilasyon oranlarına sahiptir ancak biyotik ve abiyotik stres koşullarına toleranslıdır (Sabar *et al.*, 2000; Dutilleul *et al.*, 2003).

### 1.7.1 *Nicotiana sylvestris* CMSII Mutantında C/N Metabolizması

Yapraklardaki karbon ve azot metabolizması koordinasyonu gen ifadesi ve enzim aktivitesi seviyesinde karmaşık bir etkileşimi içerir (Stitt *et al.*, 2002; Foyer *et al.*, 2003). Metabolitlerin ve enerjinin kullanımında bütünleyicilik ve rekabet içinde gerçekleşir, C ve N asimilasyonunun birbiriyle sıkı bağlantısı kloroplast, sitosol ve mitokondri arasında sıkı bir iletişimi gerektirir (Noctor and Foyer, 1998). CMSII ve WT'de yaprak metabolit profillerinin karşılaştırılması kompleks 1'in işlev bozukluğunun yaprak C/N etkileşimini güçlü bir şekilde etkilediğine işaret eder (yazarın yayınlanmamış sonucu). Bu nedenle, karanlıktaki solunum oranları mutantta artmasa bile TCA döngüsüyle ilişkili metabolitlerin nispi miktarları modifiye edilir. Şaşırtıcı bir şekilde, glutamin sentaz/glutamat sentaz (GS/GOGAT) yolağında karbon iskeleti olan 2-okzoglutarat (2-OG) (Lea and Mifflin, 2003) mutantta azalmıştır. Buna zıt olarak, malat ve sitrat CMSII'de genel olarak artmıştır, böylece sitrat/2-OG oranı WT'ye göre oranla 10-20 kat artmıştır. Bu değişiklikler, artan amonyum ve Gln/Glu ile birlikte gerçekleşir, bu durum düşük C/N oranına sahip amino asitlerde (Asn, Arg) keskin bir artışta gözlenir. Sitrat/2-OG'de ve Gln/Glu'daki artışlar mutantın aydınlatılan yapraklarındaki Gly/Ser'deki değişikliklerin amonyum asimilasyonu için gerekli olan mitokondri-kloroplast etkileşimlerini GDC aktivitesini etkilediğinden çok daha güçlü etkilediğini ileri sürer. Sürekli olarak artan sitrat/2-OG oranları sitratın 2-OG'ye mitokondrial dönüşümü üzerindeki bir kısıtlamaya işaret eder, bu ya asonitaz ya izositrat dehidrogenaz ya da her iki ile gerçekleşir. İzositrat dehidrogenaz NAD-bağımlıdır. CMSII'deki artan sitrat/2-OG'nin en basit açıklaması matriks NAD havuzunun artan indirgenmesine karşı bir yanıtı. Bu yüzden TCA döngüsü ara ürünleri nispi havuz boyutlarının CMSII'deki ayarlanması GS-GOGAT yolağında bir karışıklığa neden olur, Gln/Glu ve amonyumdaki bir artışla gösterildiği gibidir. Bu etkilerin amonyum kaynağıyla ilgili olarak 2-OG kaynağı düşük olduğunda

gerçekleştirdiği tahmin edilmektedir (Novitskaya *et al.*, 2002). Bu gözlemler izositrat dehidrogenazın (mitokondrial ya da sitosolik) 2-OG'nin TCA'daki üretiminde çok önemli etkisi hakkında ilginç belirsizlik verir (Hodges *et al.*, 2003). Teorik tartışmalar sitosolik NADP-bağımlı form için baskın bir rolü desteklemede (Chen and Gadal, 1990) ve bununla beraber CMSII'de bu proteinin miktarı WT'lerdekine benzemektedir, oysa mitokondrial NAD-bağımlı formun indüklenmesi 2-OG etkilerindeki eksikliğe işaret eder, dolaylı ya da direk olarak, buradaki sinyal bu enzimi spesifik olarak up-regüle eder. Fosfenol pirüvat karboksilazın up-regülasyonuna eşlik eden ayrıca kanıt anaplerosisin homeostatik aktivasyonunun 2-OG eksikliklerine ve GS-GOGAT yolağının karmaşıklığına yanıtta mutantta oluşur, bu da mitokondrial kompleks1 aktivitesinin yokluğundan kaynaklanır.

Kompleks1 eksikliği GS-GOGAT yolağının C/N etkileşimlerinin downstreaminde değişikliklere neden olur. Minör amino asitlerin sentez koordinasyonu fungilerde N metabolizmasının anahtar özeliğidir. Bu olgu, amino asit sentezinin genel kontrolü olarak bilinir, bitkilerde geniş olarak açıklanmamıştır (Foyer *et al.*, 2003). Birkaç minör aminoasit içeriği *N. sylvestris*'de koordineli olduğu gösterilmiştir. WT'de oldukça yüksek C/N oranına sahip amino asitler (Arg, Lys) ile baskılamak için minör amino asit havuzlarına neden olur. Bu yüzden azalan 2-OG'yi, artan Gln/Glu'yu ve artan amonyumu içermesinden dolayı GS-GOGAT yolağının karmaşıklığı minör aminoasitlerin sentezindeki downstreamini besler. Bu, minör amino asitlerin koordinasyonunda zayıflamaya neden olur, karbonca zengin amino asitlerin harcanmasında azotça zengin amino asitleri destekler (Noctor *et al.*, 2003).



## 2. MATERYAL VE METOD

### 2.1 Bitki Materyali ve Yetiştirilmesi

Çalışmalarda *Nicotiana sylvestris* bitkisinin yabani tipi ve mitokondrial genomunda delesyon olan CMSII mutanıtı kullanılmıştır. Tohumlarının 10 dakika %10'luk hipoklorit çözeltisinde tutularak yüzey sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Daha sonra tohumlar steril deiyonize su (dI-H<sub>2</sub>O) ile 5'er kez yıkanmıştır. Tohumların sterilizasyon işlemi Nüve MN 120 marka steril kabinde gerçekleştirilmiştir

Tohumlar Murashige-Skoog (MS) ortamında çimlendirilmiştir. MS ortamındaki besin maddeleri ve miktarları çizelge 2.1'de gösterilmiştir. Besin ortamının pH'ı NaOH kullanılarak 5,8 olarak ayarlandıktan sonra sukroz ve agar ilave edildi. Besin ortamı 121<sup>0</sup>C'de 1,4 atm basınç koşullarında Nüve marka otoklavda sterilize edildi. Ortam otoklavlanma işleminden sonra oda sıcaklığına ulaşana kadar bekletildi. Besin ortamı otoklavlanmış kültür kaplarınının (Magenta, Sigma) her birine yaklaşık 25'er ml gelecek şekilde paylaştırılmıştır. Ortam, magentalarda donduktan sonra streil kabinde sterilize edilmiş tohumlar her bir magentaya 9-10'ar tohum olacak şekilde ekilmiştir.

Tohumlar, 16 saat ışık/ 8 saat karanlıkta 25/23<sup>0</sup>C'de nem oranı % 70 olan 350  $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$  ışık yoğunluğunda çimlendirilmiştir. Çimlenme yaklaşık ekimden sonraki 7. gün ile 10. Günler arasında gözlenmiştir. Çimlenmeden 1 ay sonra bitkiler içinde perlit bulunan viollere aktarılmışlardır. Perlit, saksılara konulmadan önce saf su ile yıkanmıştır. Perlite aktarılan bitkiler 1/2 oranında seyreltilmiş Hoagland ile sulanmıştır (Hoagland and Arnon, 1950). Hoagland çözeltisindeki besin maddeleri ve miktarları çizelge 2.2'de gösterilmektedir. Perlitte büyümeye devam eden bitkiler kontrol koşullarda (16 saat ışık/ 8 saat karanlık, 25/23<sup>0</sup>C sıcaklık, nem oranı % 70, 350  $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$  ışık yoğunluğu) büyütülmeye devam edilmiştir. Bitkiler perlit ortamına aktarıldıktan 20 gün sonra saf su ile yıkanmış perlit bulunan daha büyük boy saksılara aktarılmıştır. Bu saksılar da aynı kontrol şartlarında büyütülmüştür ve 1/2 oranında seyreltilmiş Hoagland çözeltisiyle sulanmaya devam edilmiştir.

## 2.2 Kuraklık ve Tuz Streslerinin Uygulanması

Çalışmamızda birbirinden bağımsız deneme serilerine iki farklı abiyotik stres uygulanmıştır. Stres uygulaması her iki stres içinde 21 gün sürmüştür. Daha sonraki her stres grubu 10 gün süre ile iyileştirme uygulamasına geçilmiştir. Çimlenmeden 60 gün sonra bitkilere kuraklık ve tuz stresleri uygulanmıştır. Tuz stresi için ½ oranında seyreltilmiş Hoagland çözeltisine 100 mM konsantrasyonunda NaCl ilave edilmiş ve uygulama grubundaki bitkiler sulanmıştır. Kuraklık stresi için ½ oranında seyreltilmiş Hoagland çözeltisine %20 oranında polietilenglikol (PEG 6000) ilave edilmiştir. Kontrol grupları ise ½ oranında seyreltilmiş Hoagland çözeltisi ile sulanmaya devam edilmiştir. Stres sonrası iyileştirme sürecine alınan bitkiler 10 gün süre ile ½ oranında seyreltilmiş Hoagland çözeltisi ile sulanmıştır. Örnekleme, 21 günlük stres uygulaması ve 10 günlük iyileştirilme süresinde toplamda 13 kez yapılmıştır. Bu örneklemeler; 0.Saat (s), 2.s, 4.s, 8.s, 12.s, 24.s, 48.s, 72.s, 7.Gün (G), 14.G, 21.G, 3. Gün iyileştirme (İ) ve 10.İ. Örnekleme için 5. yapraklar kullanılmıştır. Örnekler hasat edildikten hemen sonra sıvı azotta dondurularak analiz edilinceye kadar -80°C'de saklanmıştır.

## 2.3 Büyüme Parametreleri

*Nicotiana sylvestris* bitkisinin yabani tip ve CMSII mutanı, bağımsız olarak gerçekleştirilen tuz ve kuraklık stresi uygulamasının 0.S, 7.G, 14.G, 21.G ve stres uygulamaları bittikten hemen sonra 3.İ ve 10.İ gününde büyüme parametrelerinin değerlendirilmesi için örnek alınmıştır. Bunun için her bir gruptan 3'er bitki alınarak gövdelerin yaş ağırlıkları tartılmış ve uzunlukları ölçülmüştür. Örnekler 70 °C'de 72 saat bekletildikten sonra kuru ağırlıkları belirlenmiştir.

### 2.3.1 Klorofil Floresans Ölçümü

Klorofil flüoresans ölçümleri, uygulamanın 0.s, 2.s, 4.s, 8.s, 12.s, 24.s, 48.s, 72.s, 7.G, 14.G, 21.G ve iyileşmenin 3. ve 10. günlerinde yapılmıştır. Bu ölçümde her bir uygulamaya ait 3 farklı bitkinin yaprakları kullanılmıştır.

Floresans ölçümlerinden önce, yaprak üst yüzeyindeki 1cm<sup>2</sup>'lik alan 20 dakika boyunca yaprak klipsleri kullanılarak karanlığa alıştırılmıştır. Bir bitki verim analizi Plant efficient analyser cihazı (Hansatech marka) kullanılarak yaprakların 20 doygun ışık demetine maruz bırakılmasıyla, değişken olmayan bazal klorofil flüoresansı (*F<sub>o</sub>*), maksimum flüoresans uyarılması (*F<sub>m</sub>*), değişken flüoresans (*F<sub>v</sub>*) ve *F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>* oranları belirlenmiştir.

### 2.3.2 Bağlı Su Miktarı (RWC)

Yapraklardaki bağlı su miktarını belirlemek için, uygulamanın 0.s, 2.s, 4.s, 8.s, 12.s, 24.s, 48.s, 72.s, 7.G, 14.G, 21.G'de her bir gruptaki 3 farklı bitkinin hemen hasat sonrası yapraklarının yaş ağırlıkları (YA) tespit edilmiştir, ardından bu yaprakların turgorlu hale gelmesi için 5 saat deiyonize suda bekletilmiştir. Yaprakların, fazla suyu alındıktan sonra turgorlu ağırlıkları (TA) tespit edilmiştir. Bu işlemin ardından, yapraklar 72 saat boyunca 70<sup>0</sup>C'lik etüvde kuruması sağlanmıştır. Yaprakların kuru ağırlıkları (KA) tespit edildikten sonra RWC değerleri Smart ve Bingham (1972)'in aşağıda verilen formülüne göre hesaplanmıştır.

$$RWC\% = [(YA-KA)/(TA-KA)] \times 100$$

### 2.3.3 Yaprak Osmotik Potansiyeli

Uygulamanın 0.s, 2.s, 4.s, 8.s, 12.s, 24.s, 48.s, 72.s, 7.G, 14.G, 21.G yaprak ozmotik potansiyeli Wescor 5500 marka ozmotik potansiyel sistem cihazı ile belirlenmiştir. Osmotik potansiyel birimi olarak mmolkg<sup>-1</sup>'dir.

### 2.4 Total Protein Miktarlarının Belirlenmesi

Total protein miktarını belirlemek için -80 <sup>0</sup>C'de saklanan yapraklar, soğutulmuş havanda sıvı azot yardımıyla, %2 (w/v) polivinilpolipirrolidon (PVPP) ve 1 mM EDTA içeren 0,05 M sodyum fosfat tamponuyla (pH 7.8) homojenize edilmiştir. Homojenat +4 <sup>0</sup>C'de 14.000 rpm'de 30 dk santrifüj edilmiş ve oluşan süpernatant enzim aktivitesinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

Ekstraksiyon prosedürünün tümü +4 °C'de gerçekleştirilmiştir. Total protein miktarı Bradford (1976)'a göre bovine serum albumine (BSA) standartları kullanılarak belirlenmiştir. Örneklerin protein miktarları, 50 µl örnek ve 950 µl Bradford boyası içeren 1 ml'lik polistren küvetlerde ölçülmüştür. Kör ise, 50 µl 50 mM Na-P tamponu (pH 7.0) ve 950 µl Bradford boyası ile hazırlanmıştır. Örnekler Shimadzu UV-1600 (Shimadzu, Japan) ile 595 nm dalga boyunda ölçülmüştür.

## **2.5 Glutamat Dehidrogenaz (GDH) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi**

Örneklerdeki glutamat dehidrogenaz (GDH) enzim aktivitesi ölçümü için önce Akihiro et al. (2008)'a göre ekstraksiyon gerçekleştirildi. Glutamat dehidrogenaz (GDH) enzim aktivitesini belirlemek için 1 g örnek 5 mM EDTA, 0,1 mM tris-HCl, 10 mM ditioneitol (DTT), 1 mM piridoksal-5-fosfat hidrat ve 1/100 PVPP içeren 3,5 ml homojenizasyon tamponuyla (pH 7.8) homojenize edildi. Homojenatlar +4°C 10.000 g'de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatantlar, tuzlarından arındırılması için PD-10 Desalting kolonlarından geçirildi. Daha sonra Amicon Ultra marka konsantratörler kullanılarak süpernatantlar konsantre edildi. Enzim aktivitesini belirlemek için 50 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 13 mM α-ketoglutarat, 0,25 mM NADPH ve 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 100 mM Tris-HCl tamponu (pH 8) içinde ayrı ayrı çözüldü. Reaksiyon karışımı için her bir çözeltilerden ve örneklerden 200 µl alınarak okuma yapılmıştır. Okumalar kuvarz küvetlerde 340 nm dalga boyunda 1 dakika boyunca köre karşı yapılmıştır.

## **2.6. Glutamat Dekarboksilaz (GAD) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi**

Glutamat dekarboksilaz enzim aktivitesi ölçümü için Bartyzel et al. (2003)'ün yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde göre dekarboksilasyon, 0,4 ml hacimde 3 mM L-glutamat, 20 µM pridoksal fosfat (PLP), 50 mM K-fosfat tamponu (pH 5,8) ve 100 µl örnek içeren reaksiyon karışımında gerçekleştirildi. Örnek, önce 10 dakika 30°C'de glutamat içermeyen reaksiyon karışımı ile inkübe edildi. Reaksiyon, glutamat eklenmesiyle başlatıldı ve 0,5M HCl'den 0,1

ml eklenerek 60 dakika sonra durduruldu. Karışımlar 10 dakika 12.5000 g'de santrifüjlendi. Santrifüj sonrasında örnekler ninhidrin reaktifi ile türevlendirilerek, reaksiyon sonucu oluşan GABA miktarları belirlendi. Ninhidrin çözeltisi 0,35 % (w/v) etanolde çözülerek hazırlandı. Örnekler 1:5 oranında ninhidrin çözeltisi eklendi ve 10 dakika 80°C'de inkübasyon yapıldı. Oda sıcaklığına getirilen örneklerin, 570 nm'de spektrofotometrede absorbans değerleri belirlendi. Aynı koşullarda absorbans değerleri bilinen GABA standartları ile karşılaştırılarak örneklerdeki GABA miktarı saptandı. GAD aktivitesi enzim birimi olarak dakikada oluşan mmol GABA şeklinde hesaplandı.

## **2.7 GABA Miktarının Belirlenmesi**

Örneklerdeki GABA miktarı HPLC (Shimadzu-VP101, Japan) cihazı ile belirlenmiştir. GABA ekstraksiyonu Baum ve ark.'na (1996) göre, HPLC analizi ise Khuhwar ve Rajper ve ark.'na (2003) göre yapıldı. Bitki örnekleri (0,5 g) sıvı azotta masere edildi ve üzerine 1 mL su: kloroform: metanol (3:5:12 v/ v/ v) solüsyonu eklendikten sonra örnekler 2 dakika süre ile 10000 rpm 4 °C'de santrifüj edildi. Süpernatant üzerine 100 µL ddH<sub>2</sub>O, 150 µL Borax tamponu (pH= 8) ve 250 µL 2-hydroxynaphthaldehyde (HN) (0,3 % w/v ) eklendi. Karışım 20 dakika süre ile 80 °C'lik su banyosunda bekletildikten sonra hacmi metanol ile 1mL'ye tamamlandı ve örnek filtresinden geçirildikten sonra HPLC kolonuna uygulandı. HPLC koşulları; enjeksiyon hacmi 20 µL, Kolon Supelco LC18 (250 X 4.6 mm, 5 µ), akış hızı 0.5 mL min<sup>-1</sup>, Mobil faz metanol: su (62:38 v/v) ve dedeksiyon 330 nm UV şeklinde uygulandı. Örneklerdeki GABA miktarı aynı koşullarda yürütülen standartlarla karşılaştırılarak belirlendi.

Çizelge 1.1: Murashige - Skoog (MS) Ortamı

<b><u>Makro besleviciler</u></b>	<b><u>g/lt</u></b>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1.650
KNO <sub>3</sub>	1.900
CaCl <sub>2</sub>	0.440
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,37
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,17
KI	0,83
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,028
EDTA.Na <sub>2</sub>	0,37
Sakaroz	30
Agar	70
<b><u>Mikro Elementler</u></b>	<b><u>mg/lt</u></b>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	620
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	860
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	1675
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	25
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	2,5
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	2,5
<b><u>Vitamin Stok Solüsyonu</u></b>	<b><u>100 ml için</u></b>
Glisin	10000mg
nikotinic asit	50 mg
pidoksin hcl	50 mg
tiamin hcl	200 mg
miyo-inositol	10 mg

**Çizelge 1.2:** Hogland Besin Çözeltisi

$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	115 mg
$\text{KNO}_3$	606 mg
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	656 mg
$\text{MgSO}_4$	492 mg
$\text{H}_3\text{BO}_3$	0,572 mg
$\text{MnCl}_2$	0,363 mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,044 mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,016 mg
$\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,004 mg
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	6,22 mg

### 3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

#### 3.1 Büyüme Parametreleri İle İlgili Sonuçlar

*Nicotiana sylvestris* yaban tipi ve CMSII mutant tütün bitkilerinde kuraklık ve tuz streslerinin büyüme parametreleri üzerindeki etkileri, stres uygulamasının 7., 14. ve 21. günlerinde ve stres sonrası iyileştirme uygulamasının 3. ve 10. günlerinde kaydedilmiştir.

Kök uzunluğuna ait veriler incelendiğinde; yaban tipi bitkilerde 21. günde kök uzunluğu kontrol gruplarında %93'lük bir artış gösterirken, tuz stresi uygulanan gruplarda kök uzunluğunu %13 oranında azalmıştır. CMSII bitkilerinde 21. günde, kök uzunluğu kontrol gruplarında %39 oranında, tuz uygulanan gruplarda ise %8 oranında artış göstermiştir (Çizelge 3.1). İyileştirme uygulamasına ait kök uzunluğu verileri incelendiğinde, kontrol ve tuz uygulamaları arasında belirgin ve anlamlı bir fark görülmemektedir. Ancak tuz uygulaması yapılan yaban tipi bitkilerde iyileştirme uygulamasının 10. Gününde kök uzunluğunda %44'lük bir artış gözlenirken, CMSII bitkilerinde kök uzunluğunda % 30'luk azalma kaydedilmiştir. Bitkilerin tuz stresine maruz kalmaları sonucunda gözlenen en belirgin yanıtlardan biri kök büyümesindeki azalmadır. Birçok çalışma da bizim sonuçlarımız destekler biçimde kök uzunluğunda azalma tespit edilmiştir.

**Çizelge 3.1:** Tuz stresi uygulanan (yabani tip) WT ve CMSII mutant bitkilerinin kök uzunluğundaki değişimler (cm).

	WT Kontrol	WT Tuz	CMSII Kontrol	CMSII Tuz
<b>0.G</b>	13,33±1,53		10,83±0,76	
<b>7.G</b>	16,83±3,25	14±2,78	13±1,323	13,63±0,93
<b>14.G</b>	18±1,73	11±1	16,33±5,86	12±1
<b>21.G</b>	25,67±4,51	12,3±4,19	15±5,57	14,67±2,52
<b>3. İ</b>	17±1	10,33±1,16	15,33±2,09	12±2
<b>10.İ</b>	15,67±2,31	17,67±3,22	31±16,02	10,33±1,76



PEG ile gerçekleştirilen kuraklık stresi uygulaması sonucunda yaban tipi ve CMSII bitkilerinde kök uzunluğunda belirgin değişimler saptanmıştır. 21. günde kontrol gruplarında kök uzunluğu %78 oranında artarken, kuraklık uygulanan bitkilerde kök uzunluğu %9 oranında artış göstermiştir. CMSII bitkilerinde 21. Günde gözlenen kök uzunluğu artış miktarı kontrol gruplarında %90 seviyelerinde iken kuraklık uygulanan gruplarda bu oran %62 olarak saptanmıştır (Çizelge 3.2). İyileştirme periyodu 10. gün sonunda kök uzunluğu yaban tipi ve CMSII kontrol gruplarında artış göstermiştir. Kuraklık uygulaması sonrasında iyileştirmeye tabii tutulan yaban tipi bitkilerde 10. günde kök uzunluğundaki artış %21 iken, CMSII lerde kök uzunluğu %18 oranında azalmıştır.

**Çizelge 3.2:** Kuraklık stresi uygulanan WT ve CMSII mutant bitkilerinde kök uzunluğundaki değişimler (cm)

	WT Kontrol	WT Kuraklık	CMSII Kontrol	CMSII Kuraklık
0.G	10±1,15		8,33±1,04	
7.G	12,33±2	11,66±1,52	11,67±0,76	8,25±0,288
14.G	14±1,89	12,67±1,26	13,17±0,58	12±1,32
21.G	17,83±3,51	12,67±2,08	15,83±0,29	13,34±0,76
3. İ	14,67±2	12,33±3,05	17,34±3,05	11,5±0,5
10.İ	18±2	15,33±1,15	18,75±1,06	11±1

Tuz ve kuraklık stresi uygulanan *Nicotiana sylvestris* yabani tip ve CMSII mutanti bitkilerinin 5. yaprak uzunluklarındaki değişim incelendiğinde genel olarak bitkilerin abiyotik stresten olumsuz etkilendiği görülmektedir. Ancak bu etki küçük yapraklarda daha belirgin ortaya çıkarken, yaban tipi ve CMSII bitkileri karşılaştırıldığında büyüme gerilemesi yaban tipi bitkilerde daha belirgindir. 21. günde kontrol gruplarının yapraklarında uzunluk artışı yaban tiplerinde %42 CMSII'lerde ise %9 oranındadır. Tuz stresi uygulanan gruplarda yaban tipi bitkilerde %3'lük bir azalma gözlenirken, CMSII'lerde %11'lik bir artış elde edilmiştir (Çizelge 3.3). İyileştirme periyodu verileri incelendiğinde her iki bitkide kontrol gruplarında uzunluk artışı devam ederken, tuz uygulanan

gruplarda, iyileştirme uygulamasının 10. gününde yaban tipi bitkilerde %25'lik artış, CMSII lerde ise %26'lık azalma gözlenmiştir.

Kuraklık stresine maruz bırakılan yaban tipi ve CMSII bitkilerinin yaprak uzunluğundaki değişimler Çizelge 3.4'de verilmiştir.

**Çizelge 3.3:** Tuz stresi uygulanan WT ve CMSII mutant bitkilerinin yaprak uzunluğundaki değişimler (cm).

	WT Kontrol	WT Tuz	CMSII Kontrol	CMSII Tuz
0.G	18,67±1,15		16,93±0,812	
7.G	19,23±0,75	16,73±0,59	16,4±0,36	15,8±0,93
14.G	22,83±2,25	16,83±2,47	17,17±0,29	16,67±1,26
21.G	26,5±2,78	16,17±1,26	18,5±1,80	17,5±0,87
3. İ	22,83±1,61	14,33±1,89	17±2,18	13,17±3,33
10.İ	27,17±2,31	20,17±0,289	22,03±2,48	13±0

**Çizelge 3.4:** Kuraklık stresi uygulanan WT ve CMSII mutant bitkilerinin yaprak uzunluğundaki değişimler (cm).

	WT Kontrol	WT Kuraklık	CMSII Kontrol	CMSII Kuraklık
0.G	2±1		4,83±1,54	
7.G	9,13±0,78	7±0,5	5,67±0,76	4,1±0,66
14.G	10,83±1,04	9,83±0,76	10,33±0,29	6,1±0,46
21.G	14,27±0,42	11,17±0,76	11,83±0,58	4,33±0,29
3. İ	14,83±0,76	9,84±1,15	18,5±2	5,9±0,17
10.İ	16,17±1,04	12±1,73	19,67±0,28	7,33±0,29

Her iki bitkide de kuraklık stresi altında yaprak büyümesi devam etmiş ancak büyüme oranı kontrol gruplarındaki kadar yüksek olmamıştır. 21 gün yaprak uzunluğu değerleri incelendiğinde kontrol gruplarında yabancı bitkilerde yaklaşık 7 kat, CMSII bitkilerinde ise 2 kat artış gözlemlendi. Kuraklık stresi altında yaprak uzunluğu yabancı bitkilerde %60, CMSII bitkilerinde ise %6 oranında artış gösterdi. İyileştirme sürecinde yaprak büyümesi kontrol gruplarında yabancı tipi ve CMSII'de sırasıyla %13 ve %66 oranında artış gösterirken, PEG uygulanan gruplarda belirgin bir iyileşme gözlemlenmiştir. Yaprak uzunluğu artışı iyileştirme uygulamasının 10. gününde yabancı tipinde %7, CMSII bitkilerinde %69 olarak gözlemlenmiştir.

Tuz ve kuraklık stresi etkisi altında yabancı tipi ve CMSII tütün bitkilerinin büyümesi kök ve yaprak kuru ve yaş ağırlıklarındaki değişimlerin spatlanması yolu ile de incelenmiştir. Kök yaş ve kuru ağırlığına ait veriler çizelgeler 3.5 ve 3.6'da; yaprak yaş ve kuru ağırlığına ait veriler çizelgeler 3.7 ve 3.8 de verilmiştir.

Yabancı tipi bitkilerde 21. günde kök yaş ağırlığı yaklaşık 9 kat artarken, tuz stresi uygulanan yabancı tipi bitkilerde kök yaş ağırlıkları %13 oranında azalmıştır. Kök kuru ağırlıklarındaki değişim incelendiğinde, 21. günde kontrol gruplarında yaklaşık 4 kat artış gösterirken, tuz stresine maruz kalan bitkilerde kök kuru ağırlığı %42 oranında azalmıştır. Kuraklık stresi uygulanan yabancı tipi bitkilerinde kök yaş ağırlığı %84 oranında; kök kuru ağırlığı da %81 oranında artış göstermiştir. Kök yaş ve kuru ağırlıkları karşılaştırıldığında tuz stresinin kök büyümesinin engellenmesinde daha etkili olduğu görülmüştür. Yabancı tipi bitkilerde iki abiyotik stresin kök büyümesi üzerindeki etkisi karşılaştırıldığında tuz stresinin kök büyümesinin engellenmesi açısından daha etkili olduğu gözlemlenmiştir. Kök yaş ve kuru ağırlık değerleri daha önce verilen kök uzunluğu ile ilgili değerlerle uyumludur.

CMSII mutant bitkilerinde 21. günde kontrol gruplarında kök yaş ağırlığı belirgin bir artış göstermemiştir ancak tuz uygulanan ve kuraklık uygulanan gruplarda kök yaş ağırlığı artış göstermiştir. Bu artış oranları tuz stresi uygulanan gruplarda %86, kuraklık stresi uygulanan gruplarda %157 oranında

saptanmıştır. Kök kuru ağırlık değerleri karşılaştırıldığında, 21. Günde hem kontrol, hem tuz hem de kuraklık uygulanan gruplarda artış gözlenmiştir. Kontrol gruplarında kök kuru ağırlığındaki artış %36; tuz stresi gruplarında %117 ve kuraklık stresinde ise %400 olarak gözlenmiştir. Yaban tipi bitkilerinden farklı olarak her iki stres uygulaması da CMSII mutantlarında kök ağırlığını artırıcı etki yapmıştır, özellikler tuz stresi açısından belirgin bir farklılık bulunmaktadır.

**Çizelge 3.5:** Tuz ve kuraklık stresi uygulanan WT bitkilerinin kök yaş ve kuru ağırlığındaki değişimler (g).

	WT Kontrol YA	WT Tuz YA	WT Kuraklık YA	WT Kontrol KA	WT Tuz KA	WT Kuraklık KA
<b>0.G</b>	0,40±0,05			0,16±0,045		
<b>7.G</b>	0,25±0,1	3,17±1,88	0,96±0,6	0,26±0,052	0,24±0,15	0,16±0,05
<b>14.G</b>	0,83±0,4	2,14±0,57	1,38±0,5	0,36±0,14	0,17±0,045	0,18±0,08
<b>21.G</b>	3,53±1,2	2,75±1,45	1,77±0,5	0,59±0,36	0,14±0,04	0,29±0,14
<b>3.G İ</b>	3,10±1,8	2,69±1,04	1,87±1,1	0,30±0,11	0,2±0,104	0,29±0,17
<b>10.G İ</b>	5,48±2,34	2,61±0,34	1,73±0,1	0,33±0,072	0,16±0,038	0,21±0,1

**Çizelge 3.6:** Tuz ve kuraklık stresi uygulanan CMSII mutant bitkilerinin kök yaş ve kuru ağırlığındaki değişimler (g).

	CMSII Kontrol YA	CMSII Tuz YA	CMSII Kuraklık YA	CMSII Kontrol KA	CMSII Tuz KA	CMSII Kuraklık KA
<b>0.G</b>	1,77±0,55			0,11±0,02		
<b>7.G</b>	1,58±0,35	1,81±0,14	0,35±1,1	0,14±0,02	0,18±0	0,03±0,01
<b>14.G</b>	1,62±0,17	1,67±0,16	0,63±0,1	0,15±0,05	0,18±0,015	0,10±0,02
<b>21.G</b>	1,75±0,10	3,36±0,15	0,90±0,4	0,18±0,021	0,39±0,02	0,15±0,06
<b>3.G İ</b>	1,60±0,59	2,04±1,28	0,82±0,5	0,12±0,04	0,20±0,13	0,19±0,1
<b>10.G İ</b>	4,59±0,64	1,26±0,28	0,81±0,2	0,33±0,031	0,13±0,06	0,13±0,02

İyileştirme uygulamasının yapıldığı her iki bitki grubunda da 10. günde kontrol gruplarında kök yaş ve kuru ağırlıklarında, büyümeye bağlı olarak artış kaydedilmiştir. 10. günde iyileştirme uygulamasının olumlu etkisi açısından CMSII ve yaban tipi bitkilerde her iki stres grubunda da kök yaş ve kuru ağırlıklarında belirgin bir farklılık gözlenmemiştir.

**Çizelge 3.7.** Tuz ve kuraklık stresi uygulanan WT bitkilerinin yaprak yaş ve kuru ağırlığındaki değişimler (g).

	WT Kontrol YA	WT Tuz YA	WT Kuraklık YA	WT Kontrol KA	WT Tuz KA	WT Kuraklık KA
<b>0.G</b>	3,34±0,36			0,17±0,025		
<b>7.G</b>	3,36±0,37	2,60±0,40	0,54±0,05	0,23±0,04	0,16±0,04	0,043±0,006
<b>14.G</b>	4,33±0,63	2,47±0,89	0,7±0,04	0,23±0,036	0,15±0,06	0,065±0,014
<b>21.G</b>	4,43±1,46	2,10±0,62	0,38±0,06	0,32±0,075	0,14±0,05	0,055±0,008
<b>3.G İ</b>	3,87±0,84	1,82±0,54	0,68±0,122	0,27±0,065	0,13±0,04	0,077±0,018
<b>10.G İ</b>	4,78±0,26	3,37±0,17	0,42±0,12	0,21±0,16	0,17±0,023	0,047±0,002

**Çizelge 3.8.** Tuz ve kuraklık stresi uygulanan CMSII mutant bitkilerinin yaprak yaş ve kuru ağırlığındaki değişimler (g).

	CMSII Kontrol YA	CMSII Tuz YA	CMSII Kuraklık YA	CMSII Kontrol KA	CMSII Tuz KA	CMSII Kuraklık KA
<b>0.G</b>	2,15±0,23			0,14±0,01		
<b>7.G</b>	1,82±0,29	1,95±0,39	0,12±0,01	0,10±0,025	0,14±0,023	0,011±0,002
<b>14.G</b>	2,07±0,07	1,71±0,30	0,21±0,02	0,12±0,01	0,13±0,021	0,019±0,002
<b>21.G</b>	2,64±0,82	2,13±0,43	0,12±0,006	0,15±0,05	0,19±0,05	0,021±0,001
<b>3.G İ</b>	2,18±0,60	1,55±0,19	0,23±0,01	0,13±0,04	0,11±0,05	0,03±0,005
<b>10.G İ</b>	4,10±0,57	1,08±0	0,35±0,01	0,25±0,03	0,09±0	0,04±0,002

*Nicotiana sylvestris* yaban tipi ve CMSII mutantı kontrol ve stres uygulama gruplarının yaprak yaş ve kuru ağırlıklarına ait değerler çizelgeler 3.7 ve 3.8'de verilmiştir. Yaban tipi bitkilerde kontrol gruplarında 21. günde yaprak

yaş ve kuru ağırlıkları beklendiği şekilde artış göstermiştir. Bu artış yaş ağırlıkta %33, kuru ağırlıkta %88 oranında belirlenmiştir. Stres uygulanan gruplarda ise 21. günde genel olarak yaprak yaş ve kuru ağırlıklarında azalma görülmüştür. Tuz stresi uygulanan yaban tipi bitkilerinde yaprak yaş ağırlığı %19, kuru ağırlığı %12,5 oranında azalmıştır. Kuraklık uygulamasında ise yaprak yaş ağırlığı %30 oranında azalırken, kuru ağırlık %28 oranında artmıştır. İyileştirme uygulamasının yaprak kuru ve yaş ağırlıkları üzerinde belirgin etkisi tespit edilmiştir. İyileştirme uygulamasının 10. gün değerlerine göre tuz uygulanan gruplarda yaş ağırlık %60, kuru ağırlık %21 oranında artış göstermiştir. Kuraklıkta iyileşmenin olumlu etkisi sadece %11 oranında artış görülen yaş ağırlık gruplarında görülmüştür (Çizelge 3.7).

CMSII bitkilerinde yaprak yaş ve kuru ağırlıklarındaki değişim çizelge 3.8'de verilmiştir. Genel olarak her iki stres uygulamasında da yaprak yaş ve kuru ağırlıkları artış göstermiştir. Kontrol gruplarının 21. gün yaprak yaş ağırlıkları %23, yaprak kuru ağırlıkları % 7 oranında artış göstermiştir. Tuz stresi uygulanan CMSII bitkilerinde yaprak yaş ağırlığı %9; yaprak kuru ağırlığı %36 oranında artmıştır. Kuraklık stresi uygulanan CMSII bitkilerinde ise yaprak yaş ağırlığında belirgin bir değişim görülmezken, yaprak kuru ağırlığı %91 oranında artış göstermiştir. Her iki stres sonrasında yapılan iyileştirme uygulamasının 10. gün sonuçları karşılaştırıldığında tuz stresi uygulanan gruplarda yaprak yaş ve kuru ağırlıklarında belirgin bir etki görülmemiştir. Ancak kuraklık stresine maruz kalan gruplarda hem yaprak yaş ağırlığında hem de kuru ağırlığında belirgin farklılık elde edilmiştir. Bu gruplarda iyileştirme uygulaması sonrasında yaş ağırlık %192, kuru ağırlık %95 oranında artmıştır (Çizelge 8).

Tuz ve kuraklık stresinin bitki büyümesi üzerindeki olumsuz etkilerine ait literatürde pek çok örnek bulunmaktadır. Bor ve ark. tuz stresi uygulanan susam bitkisinde kök uzunluğunda %15, gövde uzunluğunda %12 oranında azalma saptamışlardır. Aynı çalışmada PEG ile oluşturulan kuraklık stresinde de büyüme olumsuz etkilenmiştir. Kontrol grupları ile karşılaştırıldığında, kuraklık sonucu kök uzunluğu %34, gövde uzunluğu %33'lük oranlarında azalmıştır.

Türkan ve ark. (2005) *Phaseolus acutifolius* ve *Phaseolus vulgaris* ile yaptıkları çalışmada kuraklık stresinin her iki bitki türünde farklı büyüme yanıtları oluşturduğunu gözlemiştir. Deneme süresince kök ve gövde kuru ağırlığı *Phaseolus acutifolius*'ta artarken, *Phaseolus vulgaris*'te azalmıştır.

### 3.2 Ozmotik Potansiyel

*Nicotiana sylvestris* yabancı tipi ve CMSII mutanı kontrol ve stres uygulama gruplarının yaprak osmotik potansiyel değerleri çizelge 3.9'da verilmiştir. Denemeler sırasında yabancı tipi bitkilerin tuz stresi uygulanan gruplarında osmotik potansiyel ölçümü yapılamamıştır, bu nedenle bu bitkilere ait değerler çizelge 3.9 da yer almamaktadır. Tuz ve kuraklık stresinin mutant bitkilerde 12 ve 24 saatlik dönemlerinde yaprak osmotik potansiyelini düşürdüğü ancak uzun sürede yaprak osmotik potansiyelini artırdığı görülmüştür.

**Çizelge 3.9:** WT ve CMSII mutant bitkilerine tuz ve kuraklık stresinin osmotik potansiyel (mmol/kg) üzerine etkisi.

	WT Kontrol	WT Kuraklık	CMSII Kontrol	CMSII Tuz	CMSII Kuraklık
2.h	303,4±30,26	206±55,22	432,3±9,63	443,42±14,4	329,5±3,08
4.h	303,8±16,64	289,1±5,95	420±12,81	408,5±20,52	327,2±5,31
8.h	311,67±15	287,2±12,1	377±11,48	363,92±19	307,8±3,42
12.h	291,78±7,2	285,2±8,17	402±17,37	388±6,66	326,8±6,69
24.h	295±20,62	315,37±15	412,7±12,9	415,25±9,42	275,5±62,76
48.h	271,6±3,78	262,7±8,8	411±11,15	427,2±9,19	353,6±32,67
72.h	298,2±4,757	280,8±9,03	419,5±13,3	441,6±28,14	559±12,10
7.G	312,625±34	355,6±25	411±11,61	476,4167±50	637±12,73
14.G	343±40,88	606±48,6	305±13,66	440,2±53,86	532±7,572
21.G	340,2±18,28	854,6±9,5	455±21,42	674,5±39,59	419,4±9,81
3.İ	377,7±25,46	855±77	424±20,64	637±13,42	532±7,57
10.İ	353±13,7	730,8±22	287±38,5	419±50,62	419±9,8

İlk 12 saatte CMSII bitkilerinde ozmotik potansiyel değeri tuz uygulanan gruplarda %12, kuraklık uygulanan gruplarda ise %1 oranında; ikinci 12 saatte ise tuz uygulanan gruplarda %6 kuraklık uygulanan gruplarda ise %16 oranında azaltmıştır. Yaban tipi bitkilerde ise kuraklık stresi uygulanan gruplarda ise ilk 12 saatte % ozmotik potansiyel %38, 24 saatte ise %53 oranında arttırmıştır. 21. gün değerleri incelendiğinde, yaban tipi bitkilerden kuraklık stresine maruz bırakılanlarda ozmotik potansiyel yaklaşık 4 kat artış göstermiştir. CMSII bitkilerinde 21. günde tuz stresi uygulanan gruplarda yaprak ozmotik potansiyeli yaklaşık 1,5 kat, kuraklık uygulananlarda ise 1,2 kat artış göstermiştir. Stres sonrası iyileştirme süreci değerleri incelendiğinde 10. günde özellikle CMSII bitkilerinde her iki stres grubunda da ozmotik potansiyel değerlerinin kontrol grupları ile aynı seviyelere indiği gözlenmiştir (çizelge 3.9). Yaban tipi kuraklık uygulanan bitkilerde de iyileşme 10.gün ozmotik potansiyel değerlerinde bir azalma söz konusudur ancak azalma oranı CMSII bitkilerinde ki kadar belirgin farklılık göstermemektedir.

### 3.3 Fotosentetik Verim

Tuz ve kuraklık stresinin yabani tip ve CMSII mutant bitkilerinin fotosentetik verimliliğine olan etkisi incelenmiştir (çizelge 3.10). Her iki bitkide de stres uygulanan grupların Fv/Fm değerlerinde düşüş gözlenmiştir ancak bu düşüş çok belirgin seviyelerde değildir. 21. Gün değerleri ele alındığında CMSII bitkilerinde bu değerlerde ki değişimin yaban tipine göre daha az olduğu görülmüştür. İyileşme sürecinde Fv/Fm değerlerindeki düşüş tuz stresine maruz kalan mutant grubunda ve kuraklık uygulanan yabani tip ve mutant gruplarındaki düşüş azalmıştır. Yabani tip bitkilerin tuz stresi uygulama grubunda Fv/Fm değeri artmıştır.



**Çizelge 3.10:** WT ve CMSII mutant bitkilerine tuz ve kuraklık stresinin fotosentetik verim ( $F_v/F_m$ ) üzerine etkisi.

	WT Kontrol	WT Tuz	WT Kuraklık	CMSII Kontrol	CMSII Tuz	CMSII Kuraklık
2.h	0,859±0,002	0,856±0,001	0,84±0	0,852±0	0,832±0,017	0,846±0,01
4.h	0,859±0,002	0,857±0,005	0,835±0,01	0,848±0,008	0,856±0,005	0,851±0,04
8.h	0,818±0,009	0,851±0,002	0,811±0,01	0,851±0,004	0,857±0,001	0,833±0,01
12.h	0,832±0,002	0,835±0,002	0,828±0	0,852±0,005	0,850±0,006	0,845±0,04
24.h	0,854±0,001	0,850±0,006	0,835±0,03	0,852±0,002	0,854±0,001	0,852±0,01
48.h	0,847±0,004	0,849±0,002	0,834±0,009	0,86±0,0035	0,856±0,01	0,842±0,01
72.h	0,853±0,005	0,855±0,002	0,852±0,001	0,855±0,005	0,846±0,01	0,813±0,03
7.G	0,853±0,003	0,853±0,002	0,848±0,006	0,852±0,007	0,853±0,004	0,856±0,02
14.G	0,848±0,006	0,848±0,003	0,846±0,002	0,847±0,004	0,852±0,002	0,848 ±0,02
21.G	0,845±0,002	0,839±0,003	0,842±0,004	0,854±0,003	0,85±0,0006	0,847 ±0,03
3.İ	0,847±0,004	0,84±0,00154	0,844±0,003	0,848±0,001	0,845±0,002	0,849 ±0,03
10.İ	0,853±0,003	0,847±0,003	0,841±0,009	0,844±0,001	0,848±0,004	0,831±0,01

### 3.4 Bağlı Su İçeriği

Yabani tip ve CMSII mutant bitkilerine uygulanan abiyotik stresin bağlı su içeriğine etkisi Çizelge 3.11’de gösterilmiştir. Buna göre, tuz stresi uygulanan mutant ve yabani tip bitkilerin bağlı su içeriklerinde düşüş gözlenmiştir. Ama kuraklık stresi uygulanan yabani tip bitkilerde 12. saatten itibaren, mutant bitkilerde ise 24. saatten itibaren bağlı su içeriğinde düşüş gözlenmiştir. İyileşme sürecinde stres uygulanan grupların bağlı su içeriği değerleri kontrol gruplarının değerlerine çok yaklaşmıştır.

Kuraklıkla ilgili bir başka çalışmada Özkur ve ark. (2009) *Capparis ovata* bitkisinde 14 günlük PEG uygulamasının gövde yaş ve kuru ağırlığını, bağlı su

içeriğini ve fotosentetik verim parametresi olan Fv/Fm değerini düşürdüğünü belirtmiştir. Kiraz çeşidi Gisela 5 ile yapılan bir çalışmada 50, 100 ve 150 mM NaCl konsantrasyonlarının büyüme azalttığı ancak bağıl su içeriği açısından belirgin bir değişim oluşturmadığı kaydedilmiştir (Ertürk ve ark. 2007). Acar ve ark (2001) tarafından kuraklığa duyarlı ve dayanıklı arpa çeşitleri ile yapılan bir çalışmada dayanıklı çeşit TOKAK 157/37'nin büyüme parametreleri ve bağıl su içeriği açısından hassas çeşit ERGİNEL 90'a göre daha iyi bir performans gösterdiğini ortaya konulmuştur. Kuraklık stresine maruz bırakılan fasulye bitkilerinde bağıl su içeriği incelendiğinde denemenin 14. gününde *Phaseolus acutifolius*'ta her hangibir değişim gözlenmezken, *Phaseolus vulgaris*'te bağıl su içeriğinde belirgin bir azalma tespit edilmiştir (Türkan ve ark. ,2005).

**Çizelge 3.11:** WT ve CMSII mutant bitkilerine tuz ve kuraklık stresinin bağıl su içeriği etkisi.

	WT Kontrol	WT Tuz	WT Kuraklık	CMSII Kontrol	CMSII Tuz	CMSII Kuraklık
0.h	88,14±0,77			96,38±8,61		
2.h	90,44±1,47	92,28±1,12	78,07±3,63	89,02±1,59	91,89±2,12	79,7±13,41
4.h	92,21±0,06	96,02±7,68	88,06±1,02	89,17±5,59	100,10±13,03	88,83±3,34
8.h	89,48±1,25	89,21±1,22	87,09±4,18	88,93±1,06	87,53±0,96	69,69±2,69
12.h	93,1±0,21	91,73±1,47	84,35±8,78	91,5±1,73	93,68±0,4	88,77±3,73
24.h	91,07±1,47	88,25±3,23	78,24±3,82	84,63±4,7	89,05±0,14	92,41±2,58
48.h	91,22±0,72	90,99±2,43	64,81±2,67	88,81±0,43	88,19±1,87	87,95±4,70
72.h	91,75±0,77	91,83±1,15	63,75±8,20	86,92±2,55	89,47±0,74	85,90±2,64
7.G	81,67±8,86	87,15±1,06	69,64±9,31	89,31±1,34	85,01±3,01	89,15±4,43
14.G	71,66±24,24	90,07±3,22	62,84±10,84	88,16±1,75	84,04±2,12	82,21±3,14
21.G	90,86±1,38	85,36±2,49	53,76±9,02	91,35±3,31	70,04±13,27	78,60±8,61
3.İ	90,96±0,54	83,14±0,52	77,39±4,4	92,67±0,27	85,21±2,00	76,55±7,29
10.İ	90,82±3,77	87,46±4,27	86,83±35,12	89,96±1,69	83,2±5,69	87,49±15,98

### 3.5 Total Protein Miktarları

Tuz ve kuraklık stresi uygulanan yabancı tip ve mutant bitkilerinin yapraklarının total protein miktarları belirlenmiştir (çizelge 3.12). Tuz stresi uygulanan yabancı tip bitkilerde total protein miktarı yaklaşık 4 kat artarken, mutant bitkilerde bu artış yaklaşık 2 kat kadardır. Kuraklık stresi uygulamasında ise yabancı tip bitkilerdeki total protein miktarı yaklaşık 2 kat artarken, mutant bitkilerde bu artış 0,5 kadardır. Protein miktarlarındaki bu değişim yeni proteinlerin sentezlenmesi veya proteinlerin bağlı formdan serbest forma hidrolizi sonucunda ortaya çıkmış olabilir. Enzim aktivite değerleri ile ilişkilendirildiğinde protein değerlerindeki değişimin anlamlı olacağı düşünülmektedir. CMSII ve yabancı tipi bitkilerinde 10 gün boyunca gerçekleştirilen iyileşme denemesinin 3. gününde genel olarak total protein miktarlarında azalma gözlenmiştir. İyileşmenin 10. günündeki total protein miktarları kontrol grubu değerlerine yaklaşmıştır (Çizelge 3.12).

**Çizelge 3.12:** WT ve CMSII mutant bitkilerine tuz ve kuraklık stresinin total protein içeriğine etkisi.

	WT Kontrol	WT Tuz	WT Kuraklık	WT Kontrol	WT Tuz	WT Kuraklık
<b>0. h</b>	0,23±0,02			0,94±0,16		
<b>2.h</b>	0,56±0,26	0,24±0,01	0,37±0,02	1,47±1,28		
<b>4.h</b>	0,39±0,08	1,70±0,14	0,19±0,01	1,40±0,26	0,8±0,22	0,8±0,22
<b>8.h</b>	0,26±0,05	1,24±0,04	0,35±0,04	1,22±0,09	0,71±0,06	0,71±0,06
<b>12.h</b>	0,19±0,06	0,89±0,03	0,2±0,02	1,10±0,37	0,97±0,16	0,97±0,16
<b>24.h</b>	0,38±0,08	0,67±0,13	0,48±0,02	1,02±0,2	0,79±0,13	0,79±0,13
<b>48.h</b>	0,26±0,03	1,25±0,17	0,26±0,04	1,23±0,1	0,72±0,1	0,72±0,1
<b>72.h</b>	0,58±0,05	1,22±0,16	0,19±0,05	1,34±0,11	1,31±0,18	1,31±0,81
<b>7.G</b>	0,47±0,05	0,63±0,07	0,14±0,05	1,23±0,19	1,16±0,11	1,16±0,11
<b>14.G</b>	0,35±0,03	1,07±0,23	0,16±0,02	0,45±0,07	0,74±0,18	0,74±0,18
<b>21.G</b>	0,44±0,05	0,85±0,1	0,95±0,05	0,27±0,12	1,64±0,12	1,64±0,12
<b>3.İ</b>	0,41±0,04	1,19±0,15	0,21±0,13	0,33±0,03	1,06±0,06	1,06±0,06
<b>10.İ</b>	0,64±0,93	0,99±0,23	0,58±0,07	0,16±0,08	1,29±0,19	1,29±0,19

### 3.6 Glutamat Dehidrogenaz (GDH) Enzim Aktivitesi

*Nicotiana sylvestris* yaban tipi ve CMSII mutant bitkilerinde GABA yolunun önemli bileşenlerinden biri olan glutamat dehidrogenaz enziminin aktivitesindeki değişimler kontrol, tuz ve kuraklık stresi uygulanan gruplarda belirlenmiştir (çizelge 3.13). Yaban tipi ve CMSII mutantı kontrol grupları günlük GDH aktivite seviyesi karşılaştırıldığında oldukça farklılık göstermektedir. Yaban tipinde başlangıçtaki yüksek GDH aktivite seviyesinin ilk 8 saatte yaklaşık %96 lık bir azalma gösterdiği ancak 12. saatte ise tekrar arttığı gözlenmiştir. CMSII kontrol gruplarında 1 günlük periyotta GDH aktivite değişimleri açısından belirgin bir farklılık kaydedilmemiştir, yaban tipi kontrol GDH aktivite değerleri ile karşılaştırıldığında iki bitki arasında belirgin bir farklılık vardır. CMSII lerde elde edilen en yüksek GDH aktivite değeri bile yaban tipi bitkilerdeki GDH aktivite değerlerinin çok gerisinde kalmaktadır. Örneğin, 21. gün CMSII aktivite değeri 0,030 mmol min mg protein<sup>-1</sup> iken yaban tipi bitkilerinde bu değer 0,103 mmol min mg protein<sup>-1</sup> olarak kaydedilmiştir.

**Çizelge 3.13:** WT ve CMSII mutant bitkilerine tuz ve kuraklık stresinin GDH enzim aktivitesine etkisi (mmol min mg protein<sup>-1</sup>).

	WT Kontrol	WT Tuz	WT Kuraklık	CMSII Kontrol	CMSII Tuz	CMSII Kuraklık
0.s	0,092			0,007		
2.s	0,012	0,02	0,046	0,003		
4.s	0,019	0,01	0,037	0,007	0,005	0,013
8.s	0,004	0,01	0,271	0,008	0,002	0,086
12.s	0,069	0,01	0,428	0,004	0,025	0,026
24.s	0,017	0,06	0,135	0,007	0,004	0,05
48.s	0,201	0,01	0,076	0,004	0,01	0,02
72.s	0,022	0,02	0,144	0,004	0,016	0,005
7.G	0,051	0,02	0,326	0,014	0,006	0,015
14.G	0,049	0,04	0,521	0,005	0,107	0,037
21.G	0,103	0,01	0,124	0,03	0,011	0,016
3.İ	0,026	0,01	0,16	0,01	0,011	0,046
10.İ	0,126	0,01	0,241	0,056	0,019	0,051

Stres uygulanan gruplar incelendiğinde genel olarak her iki bitkide de tuz stresi sonucu gözlenen aktivite artışlarının kuraklık stresi sonucu gözlenen artışlardan daha düşük olduğu görülmektedir (çizelge 3.13). Tuz stresi uygulanan CMSII bitkilerinde ilk 12 saatte GDH aktivitesinde yaklaşık 5 kat artış gözlenirken, yaban tipi bitkilerde 24 saate GDH aktivitesi yaklaşık 4 kat artış göstermiştir. Tuz stresinin 21. gün değerleri incelendiğinde her iki bitkide de GDH aktivitesinde kontrol seviyelerine doğru hızlı bir düşüş gözlenmiştir. GDH aktivitesi açısından kuraklık stresine verilen yanıtlar her iki bitkide de daha dikkat çekicidir. Yaban tipi bitkilerde ilk 12 saatlik dönemde GDH aktivitesi kontrol seviyelerinin yaklaşık 6 katına çıkmıştır, sonraki 24 ve 48 saatlik değerlerde hızlı bir düşüş kaydedilmiştir. Kuraklık stresinin 21. gününde GDH aktivite seviyeleri kontrol GDH aktivite seviyelerinden yaklaşık 3 katlık bir artış göstermiştir. CMSII bitkilerinde ise kuraklık uygulamasının ilk 8 saatinde GDH aktivitesi kontrol değerlerinin yaklaşık 10 katına çıkmıştır ve 72. saate kadar kontrol GDH aktivite değerlerinin üzerinde değerler elde edilmiştir (çizelge 3.13). CMSII bitkilerinin kuraklık uygulanan gruplarında 21. gün GDH aktivite değerleri incelendiğinde, aktivite stres uygulamasının diğer saat ve günlere göre düşüktür ancak kontrol gruplarından yüksek seviyededir. İyileştirme periyodunun kontrol ve stres grupları GDH aktivite değerleri açısından kendi içinde karşılaştırıldığında 10. günde tuz stresi uygulanan her iki bitki grubunda da aktivitenin düştüğü gözlenmiştir. Yaban tipi bitkilerde aktivitedeki düşüş daha belirgin (yaklaşık 1/25 oranında azalma), CMSII bitkilerindeki düşüş yaklaşık 1/3 oranındadır. Kuraklık stresi sonrası iyileştirme yapılan bitkilerde yaban tipinde yaklaşık 2 katlık bir aktivite artışı gözlenirken CMSII bitkilerinde GDH aktivitesi, kontrol 10. gün iyileştirme değerleri ile aynı seviyede gözlenmiştir.

### **3.7 Glutamat Dekarboksilaz (GAD) Enzim Aktivitesi**

GABA biyosentez yolunun önemli enzimi glutamat dekarboksilaz (GAD) aktivitesindeki değişimler yaban tipi ve CMSII bitkilerinde kontrol, tuz ve kuraklık stresi uygulanan gruplarda belirlenmiştir (çizelge 3.14). Kontrol gruplarına ait enzim aktivite değerlerinin belirlenmesi ve karşılaştırılması, yaban tipi ve CMSI mutanı arasında temel enzim aktivitelerinin saptanabilmesi

açısından önem taşımaktadır. Günlük ritim boyunca yaban tipi bitkilerde GAD enzim aktivitesi 8 saatlik dönemde yaklaşık %80 seviyesinde bir artış gösterirken, 24. saatte aktivite artışı %47 düzeyindedir. Denemenin diğer örnekleme günlerinde GAD aktivitesinde ilk 24 saatten daha düşük düzeylerde aktivite gözlenmiştir. CMSII kontrol gruplarında GAD aktivitesi ilk 12 saatlik dönemde %21'lik bir artış göstermiş bu seviye ikinci 12 saatlik dönemde de korunmuştur. 14. günde GAD aktivitesi 1. güne göre yaklaşık %75 oranında, 21. Günde ise %132 oranında artış göstermiştir.

Tuz ve kuraklık stresi uygulanan gruplarda GAD aktivitesi değerlerindeki değişim incelendiğinde her iki bitkinin de strese farklı yanıtlar verdiği belirgin olarak gözlenmiştir. Yaban tipi bitkilerde her iki streste de GAD aktivitesindeki artış 4. saatten itibaren görülmüştür. Artış oranı tuz stresi gruplarında %9, kuraklık stresinde ise %80 olarak belirlenmiştir. Yaban tipi bitkilerde tuz stresinde en yüksek aktivite ( $0,340 \text{ mmol min mg protein}^{-1}$ ) 72. saatte görülürken, kuraklık stresine maruz kalan bitkilerde en yüksek GAD enzim aktivitesi ( $0,397 \text{ mmol min mg protein}^{-1}$ ) 12. saatte gözlenmiştir. CMSII bitkilerinin stres uygulanan gruplarında GAD enzim aktivitesi tuz stresi gruplarında 8. saatte, kuraklık uygulananlarda ise 4. saatten itibaren artış göstermiştir. Kontrol değerleri ile karşılaştırıldığında bu değerler tuz stresi gruplarında yaklaşık %86'lık, kuraklık stresi gruplarında ise %36'lık bir aktivite artışı göstermektedir. Kuraklık uygulanan gruplarda aktivite artışı 24 saatte kadar devam ederken, tuz stresi uygulanan gruplarda aktivite hızla düşmüş ve tüm stres uygulaması süresince yaklaşık olarak kontrol değerlerinde kalmıştır. GAD aktivitesinin en yüksek değeri tuz stresi gruplarında 8. saatte  $0,078 \text{ mmol min mg protein}^{-1}$ , kuraklık stresi gruplarında ise  $0,098 \text{ mmol min mgprotein}^{-1}$  olarak tespit edilmiştir.

Her iki bitkide de 21. gün değerlerini incelediğimizde, yaban tipi bitkilerde tuz stresi uygulanan bitkilerde aktivitenin %62 oranında arttığı, kuraklık uygulananlarda ise %7 oranında azaldığı gözlenmiştir. CMSII bitkilerinde ise stresin 21. gününde GAD aktivitesi değerleri kontrol değerlerinin altında kalmıştır. Tuz stresi uygulananlarda aktivite % 45, kuraklık uygulanan gruplarda %38 oranında azalmıştır.

Stres sonrası uygulanan iyileştirme dönemi sonuçları incelendiğinde 10. günde CMSII bitkilerindeki GAD aktivite değişiminde daha anlamlı farklılıklar gözlenmiştir (çizelge 3.14). 21. gün değerleri ile karşılaştırıldığında tuz stresi uygulanan gruplarda yaklaşık 4 kat artış, kuraklık uygulananlarda ise yaklaşık 3 kat artış gözlenmiştir. Yaban tipi bitkilerde tuz stresi sonrası iyileştirme uygulanan grupta, 21. gün GAD aktivite değerlerine göre yaklaşık 2 kat artış gözlenmiştir. Kuraklık grubunda GAD aktivitesindeki düşüş iyileştirme uygulaması süresince de düzenli bir şekilde devam etmiştir.

Bouche ve ark (2004) tarafından *Arabidopsis thaliana*'da yapılan GAD enziminin aktivitesi ve GAD geninin beliriminin incelendiği çalışmada GABA biyosentezi ile GAD enzimin aktivitesi ve ilgili genin ifadesi açısından belirgin bir ilişki görülmüştür. Domates bitkisinde yapılan bir çalışmada meyve olgunlaşması döneminde GAD genlerinin ifadesi ve GAD enzim aktivitesindeki artışın GABA'nın aşırı birikimine neden olduğu saptanmıştır (Akihiro ve ark. 2008). Bu sonuçlar bizim çalışmamızdaki GAD enzim aktivitesindeki değişimler ve GABA miktarındaki artış ile uyum içerisindedir.

**Çizelge 3.14:** WT ve CMSII mutant bitkilerinde tuz ve kuraklık stresinin GAD enzim aktivitesine üzerine etkisi (mmol min mg protein<sup>-1</sup>).

	WT Kontrol	WT Tuz	WT Kuraklık	CMSII Kontrol	CMSII Tuz	CMS Kuraklık
4.s	0,104	0,123	0,186	0,047	0,046	0,064
8.s	0,188	0,135	0,207	0,042	0,078	0,098
12.s	0,165	0,148	0,397	0,056	0,04	0,074
24.s	0,153	0,167	0,363	0,057	0,043	0,058
48.s	0,113	0,29	0,234	0,036	0,04	0,063
72.s	0,105	0,34	0,176	0,03	0,029	0,033
7.G	0,096	0,26	0,157	0,046	0,035	0,029
14.G	0,104	0,12	0,133	0,1	0,042	0,047
21.G	0,117	0,19	0,109	0,132	0,073	0,0821
3.İ	0,154	0,27	0,081	0,192	0,123	0,136
10.İ	0,168	0,42	0,063	0,312	0,29	0,25

### 3.8 GABA Miktarları

*Nicotiana sylvestris* yaban tipi ve mutant bitkilerinin GABA miktarlarındaki değişimler kontrol, tuz ve kuraklık stresi uygulanan gruplarda saptanmıştır (çizelge 3.15). Her iki abiyotik stresle ilgili yanıtlarda GABA miktarlarındaki değişimlerin belirlenmesi ve bu değişimlerin diğer parametrelerle ilişkilendirilmesi tez projemiz açısından büyük önem taşımaktadır. Ayrıca yaban tipi ve CMSII kontrol gruplarının GABA miktarlarında zamana bağlı olarak meydana gelen değişimde saptanarak karşılaştırma yapılması mümkün olmuştur. Yaban tipi kontrol gruplarında günlük ritm boyunca artış gösteren GABA miktarları günlük değişimler dikkate alındığında büyümeyle ilişkili olarak düzenli artış belirlenmiştir. Bu gruplardaki GABA miktarında 21. günde, 1. gün değerlerine göre 3 katlık bir artış gözlenmiştir. CMSII bitkilerinin kontrol gruplarında da GABA miktarlarında düzenli bir artış görülmüştür ancak artış miktarı yaban tipi kontrol gruplarına göre daha düşük seviyededir. Örneğin 1. Gün GABA miktarı 14,773  $\mu\text{mol g YA}^{-1}$  iken, 21. günde GABA miktarı yaklaşık 2 kat artarak 29,986  $\mu\text{mol g YA}^{-1}$  düzeyine ulaşmıştır.

**Çizelge 3.15:** WT ve CMSII mutant bitkilerinde tuz ve kuraklık stresinin GABA miktarları üzerine etkisi ( $\mu\text{mol g yaş ağırlık}^{-1}$ ).

	WT Kontrol	WT Tuz	WT Kuraklık	CMSII Kontrol	CMSII Tuz	CMSII Kuraklık
2.s	15,478	16,107	25,063	9,067	11,38	14,615
4.s	23,227	21,48	15,063	10,548	15,402	16,952
8.s	47,353	77,975	10,135	10,674	15,833	18,946
12.s	46,264	92,977	11,546	13,855	21,956	24,459
24.s	38,755	84,217	21,565	14,773	4,548	9,408
48.s	32,947	68,187	51,918	16,588	25,424	43,211
72.s	25,584	49,887	101,289	19,453	25,283	55,356
7.G	44,358	54,958	102,756	21,615	44,701	65,433
14.G	46,959	77,826	78,731	23,62	57,974	47,784
21.G	53,361	79,122	53,105	29,986	60,643	45,382
3.İ	59,128	74,677	51,04	41,07	54,476	37,843
10.İ	60,268	64,385	50,982	46,811	30,092	31,748



Tuz ve kuraklık stresi uygulamaları sonucunda GABA miktarı değişimleri hem bitkiye hem de uygulanan strese ve süresine bağlı olarak belirgin değişim göstermiştir (çizelge 3.15). Yaban tipi bitkilerinde tuz stresi etkisiyle GABA miktarındaki artış en yüksek düzeye 12. saatte ulaşmıştır, kontrol grubu değerlerine göre GABA miktarında yaklaşık 2 katlık bir artış görülmüştür. Bu en yüksek GABA değeri denemenin diğer günlerinde düzenli olarak azalma göstermiştir. 21. günde stresin 12. Saatindeki GABA değerine göre yaklaşık % 15 oranında bir azalma görülürken, bu değer 21. günün kontrol grubu GABA değerlerine göre %48'lik bir artışa denk gelmektedir. Kuraklık stresi GABA değerleri incelendiğinde ilk 12 saatte kontrol düzeylerinin altında gözlenen GABA miktarının 24. saatten itibaren artmaya başladığı ve en yüksek GABA miktarı 72. saatte  $101,289 \mu\text{mol g YA}^{-1}$  olarak belirlenmiştir. Bu değer kontrol GABA değerinden yaklaşık olarak 4 kat daha fazladır. Kuraklık stresi uygulanan bitkilerde 21. gün GABA miktarı kontrol grupları ile aynı seviyelere düşmüştür ( $53,105 \mu\text{mol g YA}^{-1}$ ). CMSII bitkilerinin stres sonrası GABA miktarları incelendiğinde hem tuz stresi uygulanan bitkilerde hem de kuraklık stresi uygulanan gruplarda GABA miktarının stresin 12. saatinden itibaren artış gösterdiği gözlenmiştir. Bu artış tuz stresi uygulanan gruplarda %58 oranında, kuraklık stresi uygulananlarda ise %77 oranında saptanmıştır. Tuz stresi uygulanan gruplarda en yüksek GABA miktarı 21. günde  $60,643 \mu\text{mol g YA}^{-1}$  iken, kuraklık uygulanan CMSII lerde en yüksek GABA miktarı 7. günde,  $65,433 \mu\text{mol g YA}^{-1}$  olarak belirlenmiştir. CMSII bitkilerindeki bir diğer ilgi çekici sonuçta her iki stres grubunda gözlenen ilk 12 saatteki GABA miktarındaki hızlı artışı, ikinci 12 saatteki hızlı düşüşün takip etmesidir. Bu düşüş kontrol düzeylerinin bile altına inmiştir. 24. saatte tuz stresinde 12. saatteki GABA değerinin yaklaşık 1/5'ine, kuraklık stresinde ise yaklaşık 1/3'üne düşmüştür. Bu değerler 24. saatteki kontrol değerleri ile karşılaştırıldığında da belirgin bir düşüş söz konusudur. Abiyotik stres koşulları altında bitkilerin verdiği savunma yanıtları açısından GABA miktarındaki bu ani azalmanın anlamlı olduğu düşünülmektedir. GABA için önerilen çeşitli rollerden özellikle yedek azot kaynağı olması veya sinyal iletim yolağı ile ilgili rolü açısından önemli bir bulgu olabileceği ön görülmektedir.

Stres sonrası iyileştirme uygulaması GABA değerleri incelendiğinde, hem yaban tipi hem de CMSII mutant bitkilerinde her iki streste de benzer değişimler görülmüştür. İyileşme döneminin 3. ve 10. Gün değerlerinin stres uygulamasının 21. gün değerlerinden daha düşük olduğu ve bu değerlerin giderek kontrol grubu değerlerine yaklaştığı belirlenmiştir (çizelge 3.15). İyileştirme uygulamasının 10.gün GABA miktarları incelendiğinde yaban tipi bitkilerde tuz stresi grubunda yaklaşık %20'lik, kuraklık stresi grubunda ise yaklaşık %4'lük bir azalma gözlenmiştir. CMSII bitkilerinde tuz ve kuraklık stresi uygulanan gruplarda GABA miktarındaki azalma oranları sırasıyla %50 ve %30 olarak elde edilmiştir.

Çevresel stresler sonucunda bitkilerde GABA birikiminin gerçekleştiği birçok farklı çalışma tarafından gösterilmiştir. Tez çalışmamıza benzer şekilde kuraklık koşullarında buğdayda (Bartyzel ve ark. 2003), fasulyede (Raggi 1994), soya fasulyesinde (Simon-Sarkadi ve ark., 2006), susam bitkisinde (Bor ve ark. ,2009) ve *Arabidopsis thaliana*'da (Allan ve ark. 2008) stres sonrasında GABA düzeylerinde belirgin artış kaydedilmiştir. Önemli abiyotik streslerden biri olan tuz stresi koşullarında da birçok bitki de GABA birikimi gözlenmiştir. Tuz stresi koşullarında domates kök ve yapraklarında (Bolarin ve ark., 1995), susam yapraklarında (Bor ve ark., 2009), *Arabidopsis thaliana* yapraklarında (Allan ve ark. 2008) stres uygulamasının erken aşamalarından itibaren GABA miktarı kontrol düzeylerinin üzerine çıkmıştır.

## KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abdrakhmanova A., Zickermann, V., Bostina, M., Radermacher, M., Schagger H., Kerscher, S. and Brandt, U.,** 2004, Subunit composition of mitochondrial complex I from the yeast *Yarrowia lipolytica*, *Biochim Biophys Acta*, 1658, 148–156 pp.
- Andriamampandry, C., Taleb, O., Viry, S., Muller, M., Humbert, J.P., Gobaille, S., Aunis, D. and Maitre, M. ,** 2003, Cloning and characterization of a rat brain receptor that binds the endogenous neuromodulator gamma-hydroxybutyrate (GHB), *FASEB J.* 17, 1691-1693 pp.
- Akama, K., Akihiro, T., Kitagawa, M. and Takaiwa, F.,** 2001, Rice (*Oryza sativa*) contains a novel isoform of glutamate decarboxylase that lacks an authentic calmodulin-binding domain at the C-terminus, *Biochim Biophys Acta*, 1522, 143–150 pp.
- Akihiro, T., Koike, S., Tani, R., Tominaga, T., Watanabe, S., Iijima, Y., Aoki, K., Shibata, D., Ashihara, H., Matsukura, C., Akama, K., Fujimura, T. and Ezura, H.,** 2008, Biochemical mechanism on GABA accumulation during fruit development in tomato, *Plant Cell Physiol.* 49, 1378–1389 pp.
- Allan, W.L., Simpson, J.P., Clark, S.M. and Shelp B.J.,** 2008,  $\gamma$ -Hydroxybutyrate accumulation in plants is a general response to abiotic stress: putative regulation by redox balance and glyoxylate reductase isoforms. *Journal of Experimental Botany*, 59, 2555–2564 pp.
- Arazi, T., Baum, G., Snedden, W.A., Shelp, B.J. and Fromm, H.,** 1995, Molecular and biochemical analysis of calmodulin interactions with the calmodulin-binding domain of plant glutamate decarboxylase, *Plant Physiol* 108, 551-561 pp.
- Aubert, S.R., Bligny, R., Douce, R., Gout, E., Ratcliffe, R.G. and Roberts, J.K.M.,** 2001, Contribution of glutamate dehydrogenase to mitochondrial glutamate metabolism studied by C-13 and P-31 nuclear magnetic resonance, *J. Exp. Bot.* 52, 37–45 pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Aurisano, N., Bertani, A. and Regianni, R.,** 1995a, Anaerobic accumulation of 4-aminobutyrate in rice seedlings: causes and significance, *Phytochemistry* 38, 1147-1150 pp.
- Barry, J.S., Alan, W.B. and Michael, D.M.,** 1999, Metabolism and function of gamma-aminobutyric acid, *Trends Plant Sci.* 4, 446-452 pp.
- Bartyzel, I., Pelczar, K. and Paszkowski, A.,** 2003, Functioning of the gamma-aminobutyrate pathway in wheat seedlings affected by osmotic stress, *Biol Plant*, 47(2), 221–225 pp.
- Baum, G., Chen, Y., Arazi, T., Takatsuji, H. and Fromm, H.,** 1993, A plant glutamate decarboxylase containing a calmodulin binding domain, *J Biol Chem* 268, 19610-19617 pp.
- Baum, G., Lev-Yadun, S., Fridmann, Y., Arazi, T., Katsnelson, H., Zik, M., and Fromm, H.,** 1996, Calmodulin binding to glutamate decarboxylase is required for regulation of glutamate and GABA metabolism and normal development in plants, *EMBO J.*, 15 (12), 2988-2996 pp.
- Baum, G., Lev-Yadun, S., Fridmann, Y., Arazi, T., Katsnelson, H., Zik, M. and Fromm, H.,** 1996, Calmodulin binding to glutamate decarboxylase is required for regulation of glutamate and GABA metabolism and normal development in plants, *EMBO J.*, 15 (12), 2988-2996 pp.
- Berry, E.A., Guergova-Kuras, M., Huang, L. and Crofts, A.R.,** 2000, Structure and function of cytochrome *bc* complexes, *Annu. Rev. Biochem.*, 69, 1005–1075 pp.
- Beuve, N., Rispail, N., Laine, P., Cliquet, J.B., Ourry, A. and Le Deunff, E.,** 2004, Putative role of gamma-aminobutyric acid (GABA) as a long-distance signaling up regulation of nitrate up take in *Brassica napus* L., *Plant, Cell & Environment*, 27 (8), 1035-1046 pp.
- Bidwell, R. G. S.,** 1963, Pathways leading to the formation of amino acids and amides in leaves, *Can. J. Bot.* 41, 1623-1638 pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Bolarin, M.C., Santa-Cruz, A., Cayuela, E., Perez-Alfocea, F.,**1995, Short term solute changes in leaves and roots of cultivated and wild tomato seedlings under salinity. *J Plant Physiol*, 147, 463–468 pp.
- Bor M., Seckin B., Ozgur R., Yilmaz O., Ozdemir F. And Turkan I.,** 2009, Comparative Effects of Drought, Salt, Heavy Metal and Heat Stresses on Gamma-aminobutyric acid (GABA) Levels of Sesame (*Sesamum indicum* L.), *Acta Physiologiae Plantarum*, 31 (3), 655-659 pp.
- Bouche´, N., Fait, A., Bouchez, D., Moller, S.G. and Fromm, H.,** 2003, Mitochondrial succinic-semialdehyde dehydrogenase of the g-aminobutyrate shunt is required to restrict levels of reactive oxygen intermediates in plants, *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.*, 100, 6843–6848 pp.
- Bouche´, N., Lacombe, B. And Fromm, H.,** 2003, GABA signalling: a conserved and ubiquitous mechanism, *Trends Cell Biol.*, 13, 607–610 pp.
- Bouché, N. and Fromm, H.,** 2004 GABA in plants: just a metabolite? *Trends in Plant Science*, 9(3),110-115 pp.
- Bown, A.W. and Shelp, B.J.,** 1989, The metabolism and physiological roles of 4-aminobutyric acid, *Life Sci Adv*, 8, 21-25 pp.
- Bown, A.W., and Shelp, B.J.,** 1997, The Metabolism and Functions of  $\gamma$  Aminobutyric Acid, *Plant Physiol.*, 115, 1-5 pp.
- Bown, A.W., Hall, D.E. and MacGregor, K.B.,** 2002, Insect footsteps on leaves stimulate the accumulation of 4-aminobutyrate and can be visualized through increased chlorophyll fluorescence and superoxide production, *Plant Physiol.*, 129, 1430–1434 pp.
- Boyer, J.S.,** 1982, Plant productivity ad environment potential for increasing crop plant productivity, genotypic selection, *Science*, 218, 443-448 pp.
- Boyer, P.D.,** 1997, The ATP synthase – A splendid molecular machine, *Annu. Rev. Biochem.*, 66, 717-749 pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Bradford, M.M.**, 1976, A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of the protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254 pp.
- Breitkreuz, K.E., Allan, W.L., Van Cauwenberghe, O.R., Jakobs, C., Talibi, D., Andre, B. and Shelp, B.J.**, 2003, A novel gamma-hydroxybutyrate dehydrogenase: identification and expression of an *Arabidopsis* cDNA and potential role under oxygen deficiency, *J. Biol. Chem.*, 278, 41552–41556 pp.
- Breitkreuz, K.E. and Shelp, B.J.**, 1995, Subcellular compartmentation of the 4-aminobutyrate shunt in protoplasts from developing soybean cotyledons, *Plant Physiol.*, 108, 99–103 pp.
- Breitkreuz, K.E., Shelp, B.J., Fischer, W.N., Schwacke, R. and Rentsch, D.**, 1999, Identification and characterization of GABA, proline and quaternary ammonium compound transporters from *Arabidopsis thaliana*, *FEBS Lett.*, 450, 280–284 pp.
- Busch, K.B. and Fromm, H.**, 1999, Plant succinic semialdehyde dehydrogenase. Cloning, purification, localization in mitochondria, and regulation by adenine nucleotides, *Plant Physiol.*, 121, 589–597 pp.
- Carroll, J., Fearnley, I.M., Skehel, J.M, Shannon, R.J., Hirst, J. and Walker, J.E.**, (2003), Analysis of the subunit composition of Complex I from bovine heart mitochondria, *Mol. Cell. Proteomics*, 2, 117–126 pp.
- Castanie-Cornet, M.P., Penfound, T.A., Smith, D., Elliott, J.F. and Foster, J.W.** 1999, Control of acid resistance in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, 181, 3525–3535 pp.
- Chambliss, K.L., Chambliss, K.L., Hinson, D.D., Trettel, F., Malaspina, P., Novelletto, A., Jakobs, C. and Gibson, K.M.**, 1998, Two exon-skipping mutations as the molecular basis of succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency (4-hydroxybutyric aciduria), *Am. J. Hum. Genet.*, 63, 399–408 pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Chaves M.M.**, 1991, Effects of water deficits on carbon assimilation, *Journal of Experimental Botany* 42,1-16 pp.
- Chaves, M.M., Flexas J. and Pinheiro, C.**, 2009, Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell, *Annals of Botany*, 103, 551-560 pp.
- Chaves, M.M., Maroco, J.P. and Pereira, J.S.**, 2003, Understanding plant responses to drought – from genes to the whole plant, *Functional Plant Biology*, 30, 239–264 pp.
- Chaves, M.M., Pereira, J.S., Maroco, J., Rodrigues, M.L., Ricardo, C.P.P. and Osório, M.L.**, 2002, How plants cope with water stress in the field: photosynthesis and growth, *Annals of Botany*, 89, 907–916 pp.
- Chen, R.D. and Gadal, P.**, 1990, Do the mitochondria provide the 2-oxoglutarate needed for glutamate synthesis in higher plant chloroplasts? *Plant Physiology and Biochemistry*, 28, 141-145 pp.
- Cholewa, E., Chloewinski, A. J., Shelp, B. J., Snedden, W. A. and Bown, A. W.**, 1997, Cold shock-stimulated g-aminobutyrate synthesis is mediated by an increase in cytosolic Ca<sup>2+</sup> not by an increase cytosolic H<sup>+</sup>, *Can. J. Bot.*, 75, 375–382 pp.
- Chomyn, A., Cleeter, M.W.J., Ragan, C.I., Rilley, M., Doolittle, R.F. and Attardi, G.**, 1986, URF6, last unidentified frame of human mtDNA codes for an NADH dehydrogenase subunit, *Science*, 234, 614–618 pp.
- Chomyn, A., Mariottini, P., Cleeter, M.W.J., Ragan, C.I., Matsuno-Yagi, A., Hatefi, Y., Doolittle, R.F. and Attardi, G.**, 1985, Six unidentified reading frames of human mitochondrial DNA encode components of the respiratory chain NADH dehydrogenase, *Nature* 314, 592–597 pp.
- Clendenning, K. A., Waygood, E.R. and Weinberger, P.**, 1952, The carboxylases of leaves and their role in photosynthesis, *Can. J. Bot.*, 30, 395-409 pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Coleman, S.T., Fang, T.K., Rovinsky, S.A., Turano, F.J. and Moye-Rowley, W.S.**, 2001, Expression of a glutamate decarboxylase homologue is required for normal oxidative stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.*, 276, 244–250 pp.
- Cornic, G. and Massacci, A.**, 1996, Leaf photosynthesis under drought stress. In “Photosynthesis and the environment”, *Kluwer Academic Publishers: New York*, 347-366 pp.
- Coruzzi, G.M. and Zhou, L.**, 2001, Carbon and nitrogen sensing and signalling in plants: emerging “matrix effects”, *Curr Opin Plant Bio.*, 4, 247–253 pp.
- Crawford, L.A., Bown, A.W., Breitzkreuz, K.E. and Guinel, F.C.**, 1994, The Synthesis of  $\gamma$ -Aminobutyric Acid in Response to Treatments Reducing Cytosolic pH, *PlantPhysiolog*, 104(3), 865-871 pp.
- Davenport, R.**, 2002, Glutamate receptors in plants, *Ann. Bot.*, 90, 549–557 pp.
- Dent, C.E., Stepka, W. and Steward, F.C.**, 1947, Detection of the free amino acids of plant cells by partition chromatography, *Nature*, 160, 682–683 pp.
- Dixon, R. O. D. and Fowden, L.**, 1961,  $\gamma$ -Aminobutyric acid metabolism in plants. 2. Metabolism in higher plants, *Ann. Bot.*, 25, 513-530 pp.
- Dubois, F., Tercé-Laforgue, T., Gonzalez-Moro, M.B., Estavillo, J.M., Sangwan, R., Gallais, A. and Hirel, B.**, 2003, Glutamate dehydrogenase in plants: is there a new story for an old enzyme? *Plant Physiol Biochem*, 41, 565–576 pp.
- Dudkina, N.V., Heinemeyer, J., Sunderhaus, S., Boekema, E.J. and Braun, H.P.**, 2006, Respiratory chain supercomplexes in the plant mitochondrial membrane, *TRENDS in Plant Science*, 11, 5 pp.
- Dubos, C., Huggins, D., Grant, G., Knight, M. and Campbell, M.**, 2003, A role for glycine in the gating of plant NMDA-like receptors, *Plant J.*, 35, 800–810 pp.



**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- . Douce, R., Manella, C.A. and Jr Bonner, W.D., 1973, The external NADH dehydrogenases of intact plant mitochondria, *Biochim Biophys Acta*, 292, 105–116 pp.
- Dutilleul, C., Driscoll, S., Cornic, G., De Paepe, R., Foyer, C.H. and Noctor, G., 2003a**, Tobacco leaves require functional mitochondrial complex I for optimal photosynthetic performance in photorespiratory conditions and during transients, *Plant Physiology*, 131, 264–275 pp.
- Erturk, U., Sivritepe, N., Yerlikaya, C., Bor, M., Ozdemir, F., Turkan, I., 2007**, Responses of the cherry rootstock to salinity *in vitro*, *Biologia Plantarum*, 51(3), 597-600 pp.
- Fait, A., Yellin, A. and Fromm, H., 2005**, GABA shunt deficiencies and accumulation of reactive oxygen intermediates: insight from *Arabidopsis* mutants, *FEBS Lett*, 579, 415–420 pp.
- Farooq, M., Basra, S.M.A., Wahid, A., Cheema, Z.A., M.A., Cheema and Khaliq, A., 2008**, Physiological role of exogenously applied glycinebetaine in improving drought tolerance of fine grain aromatic rice (*Oryza sativa* L.), *J. Agron. Crop Sci.*, 194, 325–333 pp.
- Forde, B.G., 2002**, Local and long-range signaling pathways regulating plant responses to nitrate, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 53, 203–224 pp.
- Fougere, F., Rudulier, D.L. and Streeter, J.G., 1991**, Effects of salt stress on amino acid, organic acid, and carbohydrate composition of roots, bacteroids, and cytosol of alfalfa (*Medicago sativa* L.), *Plant Physiol*, 96, 1228–1236 pp.
- Foyer, B.G. and Mullineaux, P.M., 1994**, Causes of photooxidative stress and amelioration of defence systems in plants, *CRC Press: Boca Raton*.
- Foyer, C.H., Parry, M. and Noctor, G., 2003**, Markers and signals associated with nitrogen assimilation in higher plants, *Journal of Experimental Botany*, 54, 585-593 pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Friedrich, T.**, 1998, The NADH: ubiquinone oxidoreductase (Complex I) from *Escherichia coli*, *Biochim Biophys Acta*, 1364, 134–146 pp.
- Friedrich, T. and Böttcher, B.**, 2004, The gross structure of the respiratory Complex I: a Lego system, *Biochim. Biophys. Acta*, 1608, 1–9 pp.
- Fox, G.G., Ratcliffe, R.G., Robinson, S.A. and Stewart, G.R.**, 1995, Evidence for deamination by glutamate dehydrogenase in higher plants: commentary, *Can. J. Bot.*, 73, 1112-1115 pp.
- Gäbler, L., Herz, U., Liddell, A., Leaver, C.J., Schröder, W., Brennicke, A. and Grohmann, L.**, 1994, The 42.5 kDa subunit of the NADH: ubiquinone oxidase (Complex I) in higher plants is encoded by the mitochondrial *nad7* gene, *Mol Gen Genet*, 244, 33–40 pp.
- Gallego, P.P., Whotton, L., Picton, S., Grierson, D. and Gray, J.E.**, 1995, A role for glutamate decarboxylase during tomato ripening: the characterisation of a cDNA encoding a putative glutamate decarboxylase with a calmodulin-binding site, *Plant Mol. Biol.*, 27, 1143-1151 pp.
- Galvez, T., Parmentier, M.L., Joly, C., Malitschek, B., Kaupmann, K., Kuhn, R., Bittiger, H, Froestl, W, Bettler, B. And Philippe Pin, J.P.**, 1999, Mutagenesis and modeling of the GABAB receptor extracellular domain support a Venus flytrap mechanism for ligand binding, *J. Biol. Chem.*, 274, 13362–13369 pp.
- Gibson, K.M., Hoffmann, G.F., Hodson, A.K., Bottiglieri, T. and Jakobs, C.**, 1998, 4-Hydroxybutyric acid and the clinical phenotype of succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency, an inborn error of GABA metabolism, *Neuropediatrics*, 29, 14–22 pp.
- Glévarec, G., Bouton, S., Jaspard, E., Riou, M.T., Cliquet, J.B., Suzuki, A. and Limani, A.**, 2004, Respective roles of the glutamine synthetase/glutamate synthase cycle and glutamate dehydrogenase in ammonium and amino acid metabolism during germination and post-germinative growth of the model legume *Medicago truncatula*, *Planta*, 219, 286-297 pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Goodman, M.M., Stuber, C.A., Newton, K. and Weissinger, H.H., 1980,** Linkage relationships of 19 loci in maize, *Genetics*, 96, 697-710 pp.
- Gutierrez, S., Sabar, M., Lelandais, C., Chetrit, P., Dioloz, P., Degand, H., Boutry, M., Vedel, F., de Kouchkovsky, Y. and De Paepe, R., 1997,** Lack of mitochondrial and nuclear-encoded subunits of complex I and alterations of the respiratory chain in *Nicotiana sylvestris* mitochondrial deletion mutants, *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 94, 3436–3441 pp.
- Hatefi, Y., 1985,** The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system, *Annu. Rev. Biochem.*, 54, 1015-1069 pp.
- Hoagland, D. R. and Arnon, D. I., 1950,** The water culture method for growing plants without soil, *California Agricultural Experiment Station Circular*, 347, 1–32 pp.
- Hodges, M., Flesch, V., Gaálvez, S. and Bismuth, E., 2003,** Higher plant dual approach through modelling and metabolite analysis, *Plant, Cell and Environment*, 25, 821-836 pp.
- Horsefield, R., Iwata, S. and Byrne, B., 2004,** Complex II from a structural perspective, *Curr. Protein Pept. Sci.*, 5, 107–118 pp.
- Hunte C, Koepke J, Lange C, Rossmannith T, Michel H. 2000,** Structure at 2.3Å<sup>o</sup> resolution of the cytochrome bc<sub>1</sub> complex. from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* co-crystallized with an antibody fragment. *Structure*, 8, 669–684 pp.
- Intergovernmental panel on Climate Change, 2007.**
- Iyer, R. et al., 2002,** A biological role for prokaryotic ClC chloride channels. *Nature*, 419, 715–718 pp.
- Jackson, R.B., Sperry, J.S. and Dawson, T.E., 2000,** Root water uptake and transport: using physiological processes in global predictions. *Trends in Plant Science*, 5, 482-488 pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Jaleel, C.A., Gopi, R., Sankar, B., Gomathinayagam, M. and Panneerselvam, R., 2008a.** Differential responses in water use efficiency in two varieties of *Catharanthus roseus* under drought stress. *Comp. Rend. Biol.*, 331, 42–47 pp.
- Jaleel, C.A., Manivannan, P., Kishorekumar, A., Sankar, B., Gopi, R., Somasundaram, R. and Panneerselvam, R., 2007c.** Alterations in osmoregulation, antioxidant enzymes and indole alkaloid levels in *Catharanthus roseus* exposed to water deficit. *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, 59, 150–157 pp.
- Jaleel, C.A., Manivannan, P., Lakshmanan, G.M.A., Gomathinayagam, M. and Panneerselvam, R., 2008c.** Alterations in morphological parameters and photosynthetic pigment responses of *Catharanthus roseus* under soil water deficits. *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, 61, 298–303 pp.
- Jaleel, C.A., Manivannan, P., Sankar, B., Kishorekumar, A., Gopi, R., Somasundaram, R., and Panneerselvam, R., 2007b.** Water deficit stress mitigation by calcium chloride in *Catharanthus roseus*; effects on oxidative stress, proline metabolism and indole alkaloid accumulation. *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, 60, 110–116 pp.
- Jaleel, C.A., Manivannan, P., Sankar, B., Kishorekumar, A., Gopi, R., Somasundaram, R. and Panneerselvam, R., 2007d.** Induction of drought stress tolerance by ketoconazole in *Catharanthus roseus* is mediated by enhanced antioxidant potentials and secondary metabolite accumulation. *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, 60, 201–206 pp.
- Jaleel, C.A., Manivannan, P., Wahid, A., Farooq, M., Al-Juburi, H.J., Somasundaram, R. and Panneerselvam, R., 2009,** Drought stress in plants: A review on morphological characteristic and Pigments composition. *Int. J. Agric. & Bio.*, 11, 100-105 pp.
- Jaleel, C.A., Sankar, B., Murali, P.V., Gomathinayagam, M., Lakshmanan, G.M.A. and Panneerselvam, R., 2008e,** Water deficit stress effects on

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- reactive oxygen metabolism in *Catharanthus roseus*; impacts on ajmalicine accumulation. *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, 62, 105–111 pp.
- Jorgensen, E.M.**, 2005, GABA, The *C. elegans* Research Community, *WormBook*, doi/10.1895/wormbook.1.14.1, [www.wormbook.org](http://www.wormbook.org).
- Kathiresan, A., Tung, P., Chinnappa, C.C., and Reid, D. M.**, 1997,  $\gamma$ -Aminobutyric acid stimulates ethylene biosynthesis in Sunflower. *Plant Physiol.*, 11, 5, 129-135 pp.
- Kinnersley, A.M. and Turano, F.J.**, 2000, Gamma aminobutyric acid (GABA) and plant responses to stress. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 19, 479–509 pp.
- Kang, J. and Turano, F.J.**, 2003, The putative glutamate receptor 1.1 (AtGLR1.1) functions as a regulator of carbon and nitrogen metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.*, 100, 6872–6877 pp.
- Khuhawar, M.Y. and Rajper, A.D.**, 2003, Liquid chromatographic determination of gamma-aminobutyric acid in cerebrospinal fluid using 2-hydroxynaphthaldehyde as derivatizing reagent. *J. Chrom.*, 788, 413-418 pp.
- Labboun, S., Tercé-Laforgue, T., Roscher, A., Bedu, M., Francesco, M.R., Velanis, C.N., Restivo, M., Skopelitis, D.S., Moschou, P.N., Roubelakis, K.A., Suzuki, A., Hirel, B.**, 2010, Resolving the role of plant glutamate dehydrogenase: I. *in vivo* real time nuclear magnetic resonance spectroscopy experiments. *Plant and Cell Physiology Advance*, 50, 10, 1761-1773 pp.
- Lamattina, L., Gonzalez, D., Gualberto, J. and Grienenberger, J.M.**, 1993, Higher plant mitochondria encode a homologue of the nuclear-encoded 30-kDa subunit of bovine mitochondrial Complex I. *Eur J Biochem*, 217, 831–838 pp.
- Lancien, M. and Gadal, P.**, 2000, Enzyme redundancy and the importance of 2-oxoglutarate in higher plant ammonium assimilation. *Plant Physiol*, 123, 817–824 pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Lancien, M. and Roberts, M.R.**, 2006, Regulation of *Arabidopsis thaliana* 14-3-3 gene expression by g-aminobutyric acid. *Plant, Cell & Environment*, 29(7), 1430-1436 pp.
- Larkindale, J. and Knight, M.R.**, 2002, Protection against heat stress induced oxidative damage in *Arabidopsis* involves calcium, abscisic acid, ethylene, and salicylic acid. *Plant Physiol.*, 128, 682–695 pp.
- Lea, P.J. and Miflin, B.J.**, 1974, An alternative route for nitrogen assimilation in higher plants. *Nature, London*, 251, 614-616 pp.
- Lea, P.J. and Miflin, B.J.**, 2003, Glutamate synthase and the synthesis of glutamate in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 41, 555-564 pp.
- Leegood, R.C., Lea, P.J., Adcock, M.D. and Häusler, R.E.**, 1995, The regulation and control of photorespiration. *J. Exp. Bot.*, 46, 1397-1414 pp.
- Leterme, S. and Boutry, M.**, 1993, Purification and preliminary characterization of mitochondrial Complex I (NADH: ubiquinone reductase) from broad bean (*Vicia faba* L.). *Plant Physiol.*, 102, 435–443 pp.
- Ling, V., Snedden, W.A., Shelp, B.J. and Assmann, S.M.**, 1994, Analysis of a soluble calmodulin binding protein from fava bean roots: identification of glutamate decarboxylase as a calmodulin-activated enzyme. *Plant Cell*, 6, 1135–1143 pp.
- Loulakakis, K.A. and Roubelakis-Angelakis, K.A.**, 2001, Ammonium assimilating genes in *Vitis vinifera* L. In KA Roubelakis-Angelakis, ed, *Molecular Biology and Biotechnology of the Grapevine*. Kluwer, Amsterdam, 59-108 pp.
- Maggio, A., Hasegawa, R.W., Bressan, R.A., Consiglio, M.F., and Joly, R.J.**, 200, Unravelling the functional relationship between root anatomy and stress tolerance. *Functional Plant Biology*, 28, 999-1004.
- Masclaux-Daubresse, C., Valadier, M.H., Carrayol, E., Reisdorf-Cren, M. and Hirel, B.**, 2002, Diurnal changes in the expression of glutamate

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- dehydrogenase and nitrate reductase are involved in the C/N balance of tobacco source leaves. *Plant Cell Environ.*, 25, 1451–1462 pp.
- Maitre, M.**, 1997, The gamma-hydroxybutyrate signalling system in brain: organization and functional implications. *Prog. Neurobiol.*, 51, 337–361 pp.
- McKenzie, E.A. and Lees, E.M.**, 1981, Glutamate dehydrogenase activity in developing soybean seed: isolation and characterization of three forms of the enzyme. *Arch Biochem Biophys.*, 212, 290-297 pp.
- Melo, A.M.P., Roberts, T.H. and Møller, I.M.**, 1996, Evidence of the presence of two rotenone-insensitive NAD(P) H dehydrogenases on the inner surface of the inner membrane of potato tuber mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 1276, 133–139 pp.
- Melo-Oliveira, R., Cinha-Oliveira, I. and Coruzzi, G.M.**, 1996, Arabidopsis mutant analysis and gene regulation define a non-redundant role for glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation. *Proc. Natl Acad. Sci., USA*, 96, 4718-4723 pp.
- Michel, H., Behr, J., Harrenga, A. and Kannt, A.**, 1998, Cytochrome c oxidase: structure and spectroscopy. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 27, 329–356 pp.
- Mifflin, B.J. and Habash, D.Z.**, 2002, The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops. *J Exp Bot*, 53, 979–987 pp.
- Millar, A.H., Wiskich, J.T., Whelan, J. and Day, D.**, 1993, Organic acid activation of the alternative oxidase of plant mitochondria. *FEBS Lett.*, 329, 259–262 pp.
- Møller, I.M.**, 1997, The oxidation of cytosolic NAD(P) H by external NAD(P) H dehydrogenases in respiratory chain of plant mitochondria. *Physiol Plant*, 100, 85–90 pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Moore, A.L. and Siedow, J.N.**, 1991, The regulation and nature of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 1059, 121–140 pp.
- Murashige, T., and Skoog, F.**, 1962, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497 pp.
- Munns, R. and Tester, M.**, 2008, Mechanism of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59, 651-81 pp.
- Nakayama, N., Saneoka, H., Moghaieb, R.E.A., Premachandra, G.S. and Fujita, K.**, 2007, <sup>13</sup>C-labelled Photosynthate and N Accumulation in two Soybean (*Glycine max* L. Merrill) Cultivars to Drought Stress. *Int. J. Agri. Biol.*, 9, 5, 669-674 pp.
- Naylor, A. W., and Tolbert N.E.**, 1956, Glutamic acid metabolism in green and etiolated barley leaves, *Physiol. Plant.* 9, 220-229 pp.
- Noctor, G., Dutilleul, C., De Paepe, R. and Foyer, C.H.**, 2003, Use of mitochondrial electron transport mutants to evaluate the effects of redox state on photosynthesis, stress tolerance and the integration of carbon/nitrogen metabolism. *Journal of Experimental Botany*, 55 (394), 49-57 pp.
- Noctor, G. and Foyer, C.H.**, 1998, A re-evaluation of the ATP:NADPH budget during C<sub>3</sub> photosynthesis. A potential role for nitrate assimilation and its associated respiratory activity? *Journal of Experimental Botany*, 49, 1895-1908 pp.
- Novitskaya, L., Trevanion, S., Driscoll, S., Foyer, C.H. and Noctor, G.**, 2002, How does photorespiration modulate leaf amino acids? A dual approach through modelling and metabolite analysis. *Plant, Cell and Environment*, 25, 821-836.



**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Oaks, A.**, 1995, Evidence for deamination by glutamate dehydrogenase in higher plants: reply. *Can. J. Bot.*, 73, 1116-1117 pp.
- Palanivelu, R., Brass, L., Edlund, A.F. and Preuss, D.**, 2003, Pollen Tube Growth and Guidance Is Regulated by *POP2*, an *Arabidopsis* Gene that Controls GABA Levels. *Cell*, 114(1), 47-59 pp.
- Passioura, J.B.**, 2002, Environmental plant biology and crop improvement. *Functional Plant Biology*, 29, 537-546 pp.
- Passioura, J.B.**, 2007, The drought environment: physical, biological and agricultural perspectives. *Journal of Experimental Botany* 58: 113–117.
- Pei, Z.M., Murata, Y., Benning, G., Thomine, S., Klusener, B., Allen, G.J., Grill, E., and Schroeder, J.I.**, 2000, Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signaling in guard cells. *Nature*, 406, 731–734 pp.
- Pineau, B., Mathieu, C., Gerard-Hirne, C., De Paepe, R. and Chetrit, P.**, 2005, Targeting the NAD7 subunit to mitochondria restores a functional complex I and a wild type phenotype in the *Nicotiana sylvestris* CMS II mutant lacking nad7. *J. Biol. Chem.*, 15, 25994–256001 pp.
- Pryor, A.J.**, 1979, Mapping of glutamate dehydrogenase (Gdh) on chromosome 1,20.1 recombination units distal to Adhl Maize, *Genetics Cooperative News Letter*, 53, 25-26 pp.
- Purnell, M.P. and Botella, J.R.**, 2007, Tobacco isoenzyme 1 NAD(H)-Dependent Glutamate Dehydrogenase catabolizes glutamate *in vivo*. *Plant Physiology*, 143, 530-539 pp.
- Raggi, V.**, 1994, Changes in free amino acids and osmotic adjustment in leaves of water stressed bean. *Physiol Plant*, 91,427–434 pp.
- Ramputh, A.I. and Bown, A.W.**, 1996, Rapid  $\gamma$ -aminobutyric acid synthesis and the inhibition of the growth and development of obliquebanded leaf-roller larvae. *Plant Physiol.*, 111, 1349–1352 pp.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Rasmusson, A.G., Heiser, V., Zabaleta, E., Brennicke, A. and Grohmann, L.,** 1998, Physiological, biochemical and molecular aspects of mitochondrial Complex I in plants. *Biochim Biophys Acta*, 1364, 1401–111 pp.
- Renault, H., Roussel, V., El Amrani, A., Arzel, M., Renault, D., Alain Bouchereau, Carole Deleu,** 2010, The *Arabidopsis* pop2-1 mutant reveals the involvement of GABA transaminase in salt stress tolerance. *BMC Plant Biology*, 2010, 1-16 pp.
- Rentsch, D., Hirner, B., Schmelzer, E. and Frommer, W.B.,** 1996, Salt stress-induced proline transporters and salt stress-repressed broad specificity amino acid permeases identified by suppression of a yeast amino acid permease-targeting mutant. *Plant Cell*, 8, 1437–1446 pp.
- Rhodes, D., Brunk, O.G., Magalhaes, J.R.** 1989, Assimilation of ammonium by glutamate dehydrogenase? In TE Poulten, JT Romeo, EE Conn, eds, *Recent Advances in Phytochemistry*. Plenum Press, New York, 91–226 pp.
- Rhodes, D., Handa, S. and Bressan, R.A.,** 1986, Metabolic changes associated with adaptation of plant cells to water stress. *Plant Physiol.* 82, 890-903 pp.
- Richard, H., Tucker, D.L., Conway, T. and Foster, J.W.,** 2002, Collaborative regulation of *Escherichia coli* glutamate-dependent acid resistance by two AraC-like regulators, GadX and GadW (YhiW). *J. Bacteriol.*, 184, 7001–7012 pp.
- Robinson, S.A., Slade, A.P., Fox, G.G., Phillips, R., Ratcliffe, R.G. and Stewart, G.R.,** 1991, The role of glutamate dehydrogenase in plant nitrogen metabolism. *Plant Physiol*, 95, 509–516 pp.
- Robinson, S.A., Stewart, G.R. and Phillips, R.,** 1992, Regulation of glutamate dehydrogenase activity in relation to carbon limitation and protein catabolism in carrot cell suspension cultures. *Plant Physiol.*, 98, 1190-1195 pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Roberts, T.H., Fredlund, K.M. and Møller, I.M.,** 1995, Direct evidence for the presence of two external NAD(P) H dehydrogenases coupled to the electron transport chain in plant mitochondria. *FEBS Lett*, 373, 307–309 pp.
- Sabar, M., De Paepe, R. and De Kouchkovsky Y.,** 2000, Complex I impairment, respiratory compensations, and photosynthetic decrease in nuclear and mitochondrial male sterile mutants of *Nicotiana sylvestris*. *Plant Physiology*, 124, 1239–1249 pp.
- Sakakibara, H., Fujii, K. and Sugiyama, T.,** 1995, Isolation and characterization of a cDNA that encodes maize glutamate dehydrogenase, *Plant Cell Physiol*, 36, 789-797 pp.
- Satyanarayan. V. and Nair, P.M.,** 1990, Metabolism, enzymology and possible roles of 4-aminobutyrate in higher plants. *Phytochemistry*, 29, 367-375 pp.
- Schulze, E.D.,** 1986a, Whole-plant responses to drought. *Australian Journal of Plant Physiology*, 13, 127-141 pp.
- Shelp, B.J., Bown, A.W., and McLean, M.D.,** 1999, Metabolism and functions of gammaaminobutyric acid. *Trends Plant Sci.*, 4, 446–452 pp.
- Siedow, J.N. and Umbach, A.L.,** 1995, Plant mitochondrial electron transfer and molecular biology. *Plant Cell*, 7, 821–831 pp.
- Simon-Sarkadi, L., Kocsy, G., Varhegyi, A., Galiba, G. and De Ronde, J.A.,** 2006, Stress induced changes in the free amino acid composition in transgenic soybean plants having increase proline content. *Biol Plant*, 50(4), 93–796 pp.
- Skopelitis, D.S., Paranychiankis, N.V., Kouvarakis, A., Spyros, A., Stephanou, E.G. and Roubelakis-Angelakis, K.A.,** 2007, The isoenzym 7 of tobacco NAD(H)-dependent glutamate dehydrogenase exhibits high deaminating and low aminating activity. *Plant Physiol.*, 145, 1726-1734 pp.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Skopelitis, D.S., Paranychianakis, N.V., Paschalidis, K.A., Pliakonis, E.D., Delis, I.D., Yakoumakis, D.I., Kouvarakis, A., Papadakis, A.K., Stephanou, E.G. and Roubelakis-Angelakis, K.A.,** 2006, Abiotic stress generates ROS that signal expression of anionic glutamate dehydrogenases to form glutamate for proline synthesis in tobacco and grapevine. *Plant Cell*, 18, 2767–2781 pp.
- Smart, R. E. and Birgham, G. E.,** 1974, Rapid estimates of relative water content, *Plant Physiol.*, 53, 258-260 pp.
- Smirnoff, N.,** 1998, Plant resistance to environmental stress. *Current Opinion in Biotechnology*, 9, 214-219 pp.
- Snead, O.C.,** 2000, Evidence for a G protein-coupled gamma-hydroxybutyric acid receptor, *J. Neurochem.*, 75, 1986–1996 pp.
- Snedden, W.A., Arazi, T., Fromm, H. and Shelp, B.J.,** 1995, Calcium/calmodulin activation of soybean glutamate decarboxylase, *Plant Physiol.*, 108, 543-549 pp.
- Snedden, W.A. and Fromm, H.,** 1999, Regulation of the  $\gamma$ -aminobutyrate-synthesizing enzyme, glutamate decarboxylase, by calcium/calmodulin: a mechanism for rapid activation in response to stress. In: Lerner HR (ed) Plant responses to environmental stresses: from phytohormones to genome reorganization, *Dekker, New York*, 549–574 pp.
- Stewart, G.R., Shatilov, V.R., Turnbull, M.H., Robinson, S.A. and Goodall, R.,** 1995, Evidence that glutamate dehydrogenase plays a role in oxidative deamination of glutamate in seedlings of *Zea mays*, *Austr. J. Plant Physiol.*, 22, 805-809 pp.
- Stitt, M., Müller, C., Matt, P., Gibon, Y., Carillo, P., Morcuende, R., Scheible, W.R. and Krapp, A.,** 2002, Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism, *J. Exp. Bot.* 53, 959–970 pp.
- Stock, D., Leslie, A.G. and Walker, J.E.,** 2000, Rotary mechanism of ATP synthase. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 10, 672–679 pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Studart-Guimarães, C., Fait, A., Nunes-Nesi, A., Carrari, F., Usadel, B. and Fernie, A.R.**, 2007, Reduced expression of succinyl-coenzyme A ligase can be compensated for by up-regulation of the gamma-aminobutyrate shunt in illuminated tomato leaves, *Plant Physiology*, 145(3), 626-639 pp.
- Sweetlove, L.J., Heazlewood, J.L., Herald, V., Holtzapffel, R., Day, D.A., Leaver, C.J. and Millar, A.H.**, 2002, The impact of oxidative stress on *Arabidopsis* mitochondria, *Plant J.*, 32, 891–904 pp.
- The Arabidopsis Genome Initiative**, 2000, Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*, *Nature*, 408, 796–815 pp.
- Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., and Yoshikawa, S.**, 1996, The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å, *Science* 272, 1136–1144 pp.
- Turano, F.J., Dashner, R., Upadhyaya, A., and Caldwell, C.R.**, 1996, Purification of Mitochondrial Glutamate Dehydrogenase from Dark-Grown Soybean Seedlings, *Plant Physiol.* 112, 1357-1364 pp.
- Turano, F.J. and Fang, T.K.**, 1998, Characterization of two glutamate decarboxylase cDNA clones from *Arabidopsis*, *Plant Physiol.*, 117, 1411–1421 pp.
- Turano, F.J., Panta, G.R., Allard, M.W. and Van Berkum, P.**, 2001, The putative glutamate receptors from plants are related to two superfamilies of animal neurotransmitter receptors via distinct evolutionary mechanisms, *Mol. Biol. Evol.* 18, 1417–1420 pp.
- Turkan, I., Bor, M., Ozdemir, F., Koca, H.**, 2005, Differential response of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought-tolerant *P. acutifolius* Gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress. *Plant Sci.*, 168, 223–231 pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Umbach, A.L., Wiskich, J.T. and Siedow, J.N.**, 1994, Regulation of alternative oxidase kinetics by pyruvate and intermolecular disulphide bond redox status in soybean seedling mitochondria, *FEBS Lett.*, 348, 181–184 pp.
- Umbach, A.L. and Siedow, J.N.**, 1993, Covalent and non-covalent dimers of cyanide-resistant alternative oxidase protein in higher plant mitochondria and their relationship to enzyme activity, *Plant Physiol.*, 103, 845–854 pp.
- Unesco Water Portal**, 2007.
- Valladares, F. and Pearcy, R.W.**, 1997, Interactions between water stress, sun-shade acclimation, heat tolerance and photoinhibition in the sclerophyll *Heteromeles arbutifolia*, *Plant, Cell and Environment*, 20, 25-36 pp.
- Van Cauwenberghe, O.R., Michael, A., McLean, M.D., Clark, S.M. and Shelp, B.J.**, 2002, Plant pyruvate-dependent gamma-aminobutyrate transaminase: identification of an *Arabidopsis* cDNA and its expression in *Escherichia coli*, *Can. J. Bot.*, 80, 933–941 pp.
- Vanlerberghe, G.C. and McIntosh, L.**, 1997, Alternative oxidase: from gene to function, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 48, 703–734 pp.
- Videira, A.**, 1998, Complex I from the fungus *Neurospora crassa*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1364, 89–100 pp.
- Walker, J.E.**, 1992, The NADH:ubiquinone oxidoreductase (Complex I) of respiratory chain, *Q. Rev. Biophys.*, 25, 253–324 pp.
- Wang, R., Okamoto, M., Xing, X. and Crawford, N.M.**, 2003, Microarray analysis of the nitrate response in *Arabidopsis* roots and shoots reveals over 1,000 rapidly responding genes and new linkages to glucose, trehalose-6-phosphate, iron, and sulfate metabolism, *Plant Physiol.*, 132, 556–567 pp.
- Weiss, H., Friedrich, T., Hofhaus, G. and Preis, D.**, 1991, The respiratory chain NADH dehydrogenase (Complex I) of mitochondria, *Eur. J. Biochem.*, 197, 563–576 pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Wilhelmi, L.K. and Preuss, D.**, 1996, Self-sterility in *Arabidopsis* due to defective pollen tube guidance, *Science*, 274, 1535–1537 pp.
- Yamaya, T., Oaks, A., Rhodes, D. and Matsumoto, H.**, 1987, Synthesis of [<sup>15</sup>N]glutamate from [<sup>15</sup>N]H<sub>4</sub> and [<sup>15</sup>N]glycine by mitochondria isolated from pea and corn shoots, *Plant Physiol.*, 81, 754-757 pp.
- Yang, T. and Poovaiah, B.W.**, 2002, Hydrogen peroxide homeostasis: activation of plant catalase by calcium/calmodulin, *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.*, 99, 4097–4102 pp.
- Yankovskaya, V., Horsefield, R., Tornroth, S., Luna-Chavez, C., Miyoshi, H., Leger, C., Byrne, B., Cecchini, G. and Iwata, S.**, 2003, Architecture of Succinate Dehydrogenase and Reactive Oxygen Species Generation, *Science*, 299, 700-704 pp.
- Yap, K.L., Yuan, T., Mal, T.K., Vogel, H.J. and Ikura, M.**, 2003, Structural basis for simultaneous binding of two carboxy-terminal peptides of plant glutamate decarboxylase to calmodulin, *J. Mol. Biol.*, 328, 193–204 pp.
- Yevtushenko, D.P., McLean, M.D., Peiris, S., Van Cauwenberghe, O.R. and Shelp, B.J.**, 2003, Calcium/calmodulin activation of two divergent glutamate decarboxylases from tobacco, *J. Exp. Bot.*, 54, 2001–2002 pp.
- Yun, S.J. and Oh, S.H.**, 1998, Cloning and characterization of a tobacco cDNA encoding calcium/calmodulin-dependent glutamate decarboxylase, *Mol. Cell*, 11, 125–129 pp.
- Zhu, J.K.**, 2002, Salt stress signal transduction in plants, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 53, 247-273 pp.
- Zik, M., Arazi, T., Snedden, W.A. and Fromm, H.**, 1998, Two isoforms of glutamate decarboxylase in *Arabidopsis* are regulated by calcium/calmodulin and differ in organ distribution, *Plant Mol. Biol.*, 37, 967–975 pp.

## **ÖZGEÇMİŞ**

25.06.1980 yılında İzmir’de doğan Neşe AKÇAY 2008 yılında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nden mezun olmuştur. 2008-2010 yılları arasında Ege üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Genel Biyoloji ABD dalında yüksek lisans eğitimini tamamlamıştır. Şu an TÜBİTAK-TEYDEB 1501 projesinde (Ülkemizde yetiştirilmekte olan fındık, ceviz, badem ve yerfıstığı populasyonlarının markırlar yardımıyla genetik karakterizasyonunun yapılması ve ıslahının yönlendirilmesi) yürütücüsü olarak yer almaktadır.