

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**VİTAMİN B6'NİN TUZ STRESİNE MARUZ
BIRAKILAN ARABİDOPSIS MUTANTI (pdx 1.3)
ÜZERİNDEKİ FİZYOLOJİK VE BİYOKİMYASAL
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

MERVE SARAY

Tez Danışmanı : Prof. Dr. İsmail TÜRKAN

Genel Biyoloji Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 401.01.00

Sunuş Tarihi : 31.12.2010

Bornova-İZMİR

MERVE SARAY tarafından Yüksek Lisans tezi olarak sunulan “ Vitamin B6 ‘nın tuz stresine maruz bırakılan Arabidopsis mutanti (pdx1.3) üzerindeki fizyolojik ve biyokimyasal etkilerinin araştırılması ” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 31.12.2010 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:**İmza**

Jüri Başkanı : Prof.Dr. İsmail TÜRKAN

Raportör Üye :Yrd.Doç.Dr. A. Hediye SEKMEN ESEN

Üye : Yrd.Doç.Dr. Çağlar KARAKAYA

ÖZET

Vitamin B6 'nın tuz stresine maruz bırakılan Arabidopsis mutanı (pdx1.3) üzerindeki fizyolojik ve biyokimyasal etkilerinin araştırılması

SARAY,Merve

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Bölümü
Tez Yöneticisi: Prof.Dr. İsmail TÜRKAN
Aralık 2010, 55 sayfa

Arabidopsis thaliana'nın yabani tipi Columbia ve B6 vitamini sentezleyemeyen pdx1.3 mutanında, B6 vitaminin tuz stresi altında, büyüme parametreleri, yaprak bağıl su içeriği ozmotik potansiyeli, malondialdehit miktarları ve H₂O₂ birikimi ve süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), peroksidaz (POX), askorbat peroksidaz (APX) ve glutatyon redüktaz (GR) gibi antioksidant enzimlerin total ve izozim aktiviteleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Azalan yaprak nispi su içeriği, H₂O₂ birikimi ve lipit peroksidasyon seviyeleri ve artan APX, POX, SOD ve GR aktivite seviyeleri tuz stresi altında pdx1.3 bitkilerinin Columbia bitkilerinden daha fazla etkilendiği görülmüştür. Sonuç olarak bu çalışmada, pdx1.3 bitkilerinde B6 vitamininin dışardan uygulanmasının antioksidant enzim sistemini arttırarak tuzun teşvik ettiği oksidatif hasarı azalttığı görülmüştür.

Anahtar sözcükler: B6 vitamini , tuzluluk ile indüklenen oksidatif stres ,tuz stresi, pdx1.3 , klomazon

ABSTRACT

INVESTIGATION ON THE BIOCHEMICAL AND PHYSIOLOGICAL EFFECTS OF VITAMIN B6 ON ARABIDOPSIS MUTANT (pdx 1.3) UNDER SALT STRESS

SARAY,Merve

Master of Science, Biology Department

Supervisor : Prof.Dr. İsmail TÜRKAN

December 2010, 55 pages

The effect of vitamin B6 on growth parameters, leaf relativewater content, osmoik potential, lipid peroxidation level measured as melondialdehyde (MDA) content, H₂O₂ accumulation and total and isoenzyme activities of antioxidant enzymes including superoxide dismutase (SOD), ascorbte peroxidase (APX), catalase (CAT), peroxidase (POX) and glutathione reductase (GR) in wild-type Columbia and vitamin B6 deficient mutant pdx1.3 plants of Arabidopsis thaliana under salinity. Reduced leaf RWC, H₂O₂ accumulation and lipid peroxidation level and increased APX, POX, SOD and GR activity levels showed that Col was less affected than pdx1.3 under salinity. This study demonstrates that exogenous application of vitamin B6 could alleviate salt-induced oxidative damage in B6-deficient *pdx1.3* mutant by enhancing antioxidant enzyme activities.

Keywords: vitamin B6 , salt-induced oxidative stres, pdx1.3, clomazone .

TEŞEKKÜR

Tez alıőmam boyunca bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Sayın Hocam Prof. Dr. İsmail TÜRKAN'a en içten teşekkürlerimi sunarım .

alıőmalarım boyunca desteğini, bilgi ve deneyimlerini en önemlisi zamanını benimle paylaşan, ihtiyaç duyduğum her an manevi desteğiyle yanımda olan Sevgili Hocam Yrd. Doç. Dr. A. Hediye SEKMEN ESEN 'e sonsuz teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim .

Laboratuvar çalıőmalarım da her zaman yanımda olan ve manevi desteklerini her zaman hissettiren arkadaşlarım Z. Özgecan TANYOLAÇ ve Ahmet DİNÇ'e ; destek , bilgi ve tecrübelerini paylaşmaktan hiçbir zaman kaçınmayan bana her zaman abla gibi yaklaşan Dr. Ceyda ÖZFİDAN ve Yrd. Doç. Dr. Burcu SEÇKİN 'e , manevi olarak desteğini benimle paylaşan sevgili ev arkadaşım Emine GÜRÇAM'a sonsuz teşekkürler .

Eğitim hayatım boyunca maddi manevi desteklerini esirgemeyen, her zaman yanımda olan ve hayatımı kolaylaőtıran, en önemlisi sevgilerini göstermenin en büyük erdem olduğunu düşünüp beni her daim yücelten, şanslı bir insan olduğumu bana hissettiren babam Tuncer SARAY ve annem Esin SARAY 'a sonsuz sevgilerimle teşekkürlerimi sunarım .

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vii
TEŞEKKÜR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xvii
1.GİRİŞ.....	1
1.1 TUZLULUK.....	1
1.1.2 TUZ STRESİNİN ETKİLERİ.....	2
1.1.2.1 OZMOTİK VE İYONİK STRES	3
1.1.3 TUZ STRESİNE BAĞLI OKSİDATİF STRES.....	5
1.1.3.1 KLOROPLASTLARDA ROS OLUŞUMU VE SÜPÜRÜLMESİ.....	7
1.1.3.2 PEROKSİZOMLARDA ROS OLUŞUMU VE SÜPÜRÜLMESİ.....	8
1.1.3.3 MİTOKONDRİLERDE ROS OLUŞUMU VE SÜPÜRÜLMESİ.....	8
1.1.3.4 APOPLASTTA ROS OLUŞUMU VE SÜPÜRÜLMESİ.....	9
1.1.4 BİTKİLERDE TUZ STRESİNİN ETKİLERİ	9

İÇİNDEKİLER (devam)Sayfa

1.1.5 BİTKİLERDE TUZA TOLERANS MEKANİZMALARI	10
1.1.5.1 İYONLARIN BÖLMELENDİRİLMESİ	11
1.1.5.2 OZMOLİTLERİN SENTEZİ	12
1.1.5.3 YAPRAKLARDA OLUŞAN TUZ BEZLERİ	12
1.1.6 ROS'LARIN ANTİOKSİDANT ENZİM SİSTEMİ İLE YOKEDİLMESİ .13	
1.1.6.1 SÜPEROKSİT DİSMUTAZ (SOD)	13
1.1.6.2 KATALAZ (CAT)	14
1.1.6.3 PEROKSİDAZ (POX)	15
1.1.6.4 ASKORBAT PEROKSİDAZ (APX)	15
1.1.7 ROS SÜPÜRÜLMESİNDE ENZİMATİK OLMAYAN ANTİOKSİDANTLAR.....	15
1.2 B6 VİTAMİNİ	17
2 MATERYAL VE METOD	22
2.1 BİTKİ MATERYALİ VE YETİŞTİRİLMESİ	22
2.2 BÜYÜME PARAMETRELERİ	22
2.3 YAPRAKLARDA BAĞIL SU MİKTARI	22

İÇİNDEKİLER (devam)Sayfa

2.4 YAPRAK OZMOTİK POTANSİYELİ	22
2.5 ANTİOKSİDANT ENZİM AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ.....	22
2.5.1 ENZİM EKSTRATLARININ HAZIRLANMASI	22
2.5.2 KATALAZ (CAT; EC 1.11.1.6) İZOZİM / ENZİMLERİNİN AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ	23
2.5.3 SÜPEROKSİT DİSMUTAZ (SOD; EC 1.15.1.1) İZOZİMLERİNİN ELEKTROFORETİK AYRIMI	23
2.5.4 PEROKSİDAZ (POX; EC 1.11.1.7) İZOZİM / ENZİMLERİNİN AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ	23
2.5.5 GLUTASYON REDÜKTAZ (GR; EC 1.6.4.2) TOTAL ENZİM AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ	24
2.5.6 ASKORBAT PEROKSİDAZ (APX; EC 1.11.1.11) TOTAL ENZİM / İZOZİM AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ	24
2.6 PROTEİN MİKTARININ BELİRLENMESİ	24
2.7 LİPİT PEROKSİDASYONU	25
2.8 TOTAL B6 VİTAMİNİ İÇERİĞİNİN BELİRLENMESİ	25

2.9 İSTATİSTİKSEL ANALİZLER	25
-----------------------------------	----

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3 SONUÇLAR	26
3.1 BÜYÜME PARAMETRELERİ.....	26
3.1.1 BİTKİ UZUNLUĞU, TOTAL BİTKİ YAŞ VE KURU AĞIRLIKLARI .	26
3.2 BAĞIL SU İÇERİĞİ.....	27
3.3 YAPRAK OZMOTİK POTANSİYELİ.....	28
3.4 ANTİOKSİDAN ENZİM AKTİVİTE SONUÇLARI.....	29
3.4.1 KATALAZ AKTİVİTE SONUÇLARI	30
3.4.2 PEROKSİDAZ AKTİVİTE SONUÇLARI.....	30
3.4.3 ASKORBAT PEROKSİDAZ AKTİVİTE SONUÇLARI.....	32
3.4.4 GLUTATYON REDÜKTAZ AKTİVİTE SONUÇLARI.....	33
3.5 LİPİT PEROKSİDASYONU	34
3.6 YAPRAKLARDA HİDROJEN PEROKSİT MİKTARI	36
3.7 HPLC İLE TOTAL AKTİVİTE TAYİNİ.....	37
4 TARTIŞMA	39
5 SONUÇ VE ÖNERİ	44
KAYNAKLAR.....	45

ÖZGEÇMİŞ.....56

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1. Bitkilerde tuz stresinin oluşturduğu hasarı önlenmesiyle ilişkili morfolojik , anatomik ve biyokimyasal etkileri.....	2
2. İyon homeostazisinin düzenlenmesi için tuz stresitarafından Uyarılan SOS sinyal yolu.....	4
3. ROS tarafından düzenlenen bitki prosesleri.....	5
4. Bitki hücrelerindeki ROS üretiminin ve süpürülmesinin gerçekleştiği merkezler.....	6
5. SOS sinyal yolu (S.Mahajan,2008).....	11
6. Fenton reaksiyonu.....	13
7. Bitki hücrelerinin farklı organellerinde antioksidanlar.....	14
8. de novo yolu ve salvaj yolunun şematik gösterimi.....	18
9. E. coli B6 vitamini sentez yolu.....	18
10. Klomazonun yapısı.....	20
11. Uygulama yapılan Arabidopsis thaliana ve pdx 1.3 bitkileri	21
12. COL MS- ve COL MS- NaCl / COL MS+ NaCl ve COL MS+.....	27
13. PDX MS- VE PDX MS- NaCl / PDX MS+ ve PDX MS+ NaCl.....	27

SEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
14. Tuz stresi uygulanan Arabidopsis thaliana , Columbia ve mutant pdx1.3 fidelerinin yaprak bağıl su içeriği	28
15. 100mM NaCl uygulanan Arabidopsis thaliana, yabani tip Columbia ve mutantı Pdx 1.3 fidelerinin ozmotik potansiyel değişimleri.....	29
16. Arabidopsis thaliana, yabani tip Columbia ve mutantı Pdx 1.3fidelerinin 100mM tuz stresine bağılı olarak SOD izozimlerine ayrımı.....	30
17. Arabidopsis thaliana, yabani tip Columbia ve mutantı Pdx 1.3 fidelerinin 100mM tuz stresine bağılı olarak CAT izozimlerine ayrımı.....	31
18 Arabidopsis thaliana , Columbia ve mutant Pdx1.3 fidelerinde CAT aktivitesi.....	32
19. Arabidopsis thaliana , Columbia ve mutant Pdx1.3 fidelerinde POX aktivitesi	33
20. Arabidopsis thaliana, yabani tip Columbia ve mutantı Pdx 1.3 fidelerinin 100mM tuz stresine bağılı olarak POX izozimlerine ayrımı.....	34
21 Arabidopsis thaliana , Columbia ve mutant Pdx1.3 fidelerinde APX aktivitesi	35

SEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
22. Arabidopsis thaliana , Columbia ve mutant Pdx1.3 fidelerinde GR aktivitesi.....	37
23. Arabidopsis thaliana , Columbia ve mutant Pdx1.3 fidelerinde MDA miktarı.....	39
24. 48 saat NaCl uygulanan Arabidopsis thaliana , Columbia ve mutant Pdx 1.3 gruplarının hidrojen peroksit miktarlarındaki değişimler.....	40
25. Arabidopsis thaliana , Columbia ve mutant Pdx1.3 fidelerinde toplam B6 vitamini mik-tarlarındaki değişimler	41
26. 48 saat NaCl uygulanan Arabidopsis thaliana , Columbia ve mutant Pdx1.3 fidelerinde toplam B6 vitamini miktarlarındaki değişimler.....	41

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1. Moleküler Oksijenin İndirgenme Basamakları Sonucu ROS Oluşumu.....	5
2. Tuz stresine karşı tolerans sağlama amacıyla aktive olan genler/proteinlerin Fonksiyonel grupları.....	9
3. Bitkilerde tuza tolerans mekanizmaları (Munns ve Tester,2008).....	10
4. B6 vitamini , de novo ve salvaj yollarının mutant örnekleri.....	19
5. Arabidopsis genomunun kodladığı üç PDX1 proteini ve bir PDX2 proteinin mRNA miktarları.....	20
6. Arabidopsis thaliana , yabani tip Columbia ve Mutandı pdx 1.3 ‘ ün tuz stresi altında bitki boy uzunluklarının, total bitki yaş ve kuru ağırlıkları karşılaştırılması.....	26
7. Arabidopsis thaliana, yabani tip Columbia ve mutantı pdx 1.3 fidelerinin 100mM tuz stresine bağlı olarak SOD aktiviteleri.....	30
8. Arabidopsis thaliana, yabani tip Columbia ve mutantı pdx 1.3 fidelerinin 100mM tuz stresine bağlı olarak CAT aktiviteleri.....	31
9. Arabidopsis thaliana, yabani tip Columbia ve mutantı pdx1.3 fidelerinin 100mM tuz stresine bağlı olarak POX aktiviteleri.....	34

KISALTMALAR DİZİNİ

ANOVA	Varyans Analizi
APX	Askorbat peroksidaz
CAT	Katalaz
DW	Kuru Ağırlık
EDTA	Etilendiamintetraasetikasit
FW	Yaş Ağırlık
GR	Glutasyon redüktaz
MDA	Malondialdehit
NADP	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
PAGE	Poliakrilamid Jel Elektroforezi
POX	Peroksidaz
PS	Fotosistem
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
RWC	Nispi Su İçeriği
SE	Standart Hata
SOD	Süperoksit Dismutaz

KISALTMALAR DİZİNİ(devam)

PN	Pridoksin
PL	Pridoksal
PM	Pridoksinamin
PLP	Pridoksal 5'-fosfat
DXP	Deoksiksiloz 5'fosfat

1. GİRİŞ

1.1 TUZLULUK

Tuzluluk, dünyanın her yerinde ürünlerin geniş ölçüde verimliliklerini azaltan en önemli abiyotik strestir (Tester and Davenport 2003; Ashraf and Foolad,2007). Bu nedenle tuzlu ortamlarda yaşayıp gelişebilen bitkilerinin bulunması ve geliştirilmesi son derece önemli bir konudur. Doğal koşullar altında yüksek bitkiler tuzlu ve tatlı suların akıntılarla birbirine karıştığı veya birbirinin yerini aldığı deniz kıyısına yakın yerlerde tuzla karşılaşılır. Tuzluluk dünya çapında ekilebilir alanların 80 milyon hektarında üretkenliği etkilemektedir (Türkan et al., 2004).

Tuzluluk doğal yolla oluşabildiği gibi sulama uygulamalarının yanlış yapılması sonucu insan kaynaklı da ortaya çıkabilmektedir. Ekonomik yönden önemli ürünlerin yetişmesi amacıyla yağışlar yetersiz geldiğinde sulama yoluna gidilmektedir. Ancak bu uygulama topraklarda çeşitli tuz iyonlarının birikimine neden olmaktadır. Sulama suyundaki çözülmüş madde konsantrasyonu yüksekse ve biriken tuzlar drenaj sistemiyle yıkanmazsa tuzluluk oranında artış görülebilmektedir. Özellikle doğal drenaj koşullarının kötü olduğu kurak bölgelerde buna daha çok rastlanmaktadır. Yapılan çalışmalarda dünyada sulanan alanların %20'sinin tuzluluktan etkilendiği rapor edilmiştir. (Pitman and Lauchli,2002). Tuzlu topraklarda ve sulara bulunan en önemli katyonlar sodyum(Na⁺), kalsiyum (Ca⁺⁺), magnezyum (Mg⁺⁺) ve potasyum (K⁺); en önemli anyonlar ise klorid (Cl⁻), sülfat (SO₄²⁻), bikarbonat (HCO₃⁻), karbonat (CO₃²⁻) ve nitrat (NO₃⁻)'tır . Tuzlu topraklarda en önemli problem çözülebilir tuzların varlığıdır (Sparks, 1995).

Toprak tuzluluğu dünyadaki tarımsal üretimi sınırlayan temel çevresel streslerden biridir (Lauchli and Grattan, 2007). Toprakta biriken tuzlar toprağın fiziksel ve kimyasal özelliklerini bozmakta ve bitki gelişimini de olumsuz yönde etkilemektedir. Toprakta bulunan tuzlar su potansiyelinde azalmaya neden olup topraktan mineral alımını sınırlamaktadırlar. Yetiştirilen bitkinin veriminde görülen azalmalar, toprak çözeltisinin konsantrasyonuna bağlı olduğu kadar, bitkinin tuza dayanıklılığı ile ilgilidir. (Ekmekçi, 2005)

Bitkiler üzerinde tuzluluğun etkileri çok karmaşık olarak ortaya çıkmaktadır. Tuzluluğun zararlı etkileri, su kıtlığı, iyon dengesizliği ve mineral besinlerle ilişkilidir (Alam, 1994; Bohnert et al, 1999). Tuzluluk bitki büyüme ve gelişimini sınırlayan en önemli çevresel etmenlerden biridir. Yüksek tuzluluğun bitkiler üzerindeki zararlı etkileri bitkinin ölümü ve/veya üretimin düşmesi şeklinde gözlenebilir. Birçok bitki türü ya hücrelerine tuzu almayarak ya da tuzu hücre içinde tolere edecek mekanizmalar geliştirmişlerdir. Tuz stresi etkisinde fotosentez, protein sentezi, enerji ve lipid metabolizması etkilenir. Esas anlamda tuz stresine ilk cevap yaprak yüzey alanının büyümesinde azalma şeklinde kendini gösterir. Hücre büyümesi için gerekli olan karbohidratlar fotosentez esnasında

sağlanır. Fotosentez oranları bitki tuz stresi (özellikle NaCl stresi) altında iken genelde düşüktür (Parida AK and Das AB. 2005)

Bitkiler tuzluluğa toleransta çok farklılık göstermektedir. Yüksek tuzlu toprakların doğal florası olan halofitler, tuzluluğa karşı glikofit olanlardan daha dirençlidirler. Glikofitler 100-200 mmol-1 NaCl'ye kadar dayanabilirken halofitler ise 300 mmol-1 NaCl'den daha yüksek konsantrasyonlardaki tuzlu alanlarda yaşayabilmektedirler (Zhu, 2007). Örneğin glikofit bir bitki olan *Arabidopsis thaliana* ile halofit bir bitki olan *Thellungiella halophila*'nın normal koşullarda ve tuzlu koşullardaki gelişim profilleri birbirinden farklıdır. Normal koşulda *Arabidopsis thaliana*'nın gelişimi devam ederken *Thellungiella halophila*'nın gelişimi yavaşlamaktadır. Tuzlu koşulda ise *Arabidopsis thaliana*'nın gelişimi neredeyse dururken, *Thellungiella halophila*'nın gelişimi artmaktadır (Zhu, 2001).

1.2 TUZ STRESİNİN ETKİLERİ

Stres bitkinin üzerinde olumsuz bir etki oluşturan dışsal bir etmen olarak tanımlanmaktadır. Tuz stresinin etkileri bitkilerde iki şekilde ortaya çıkmaktadır: homeostazinin bozulmasına bağlı olarak oluşan ozmotik stres ve iyonik toksisitedir (Zhu, 2001) (Şekil1).

Şekil 1. Bitkilerde tuz stresinin oluşturduğu hasarı önlenmesiyle ilişkili morfolojik anatomik ve biyokimyasal stratejiler

1.2.1 Ozmotik ve İyonik Stres

Bitkiler tuz stresini iyonik (Na⁺) ve ozmotik sinyaller aracılığıyla algırlarlar. Hücrede Na⁺ artışı, transmembran proteinleri ya da membran proteinleri ya da Na⁺'a duyarlı enzimler aracılığıyla algılanabilir (Zhu, 2003). Protein yapısında ve membran depolarizasyonunda Na⁺ ve Cl⁻ artışı ile uyarılan konformasyonel değişiklikler iyon toksisitesinin algılanmasını sağlar. Plazma membran proteinleri, iyon transportörleri ve/ya da Na⁺ 'a duyarlı enzimler, hücre içi ve hücre dışı alanlarda toksik Na⁺ konsantrasyon sensörleri olarak varsayılmaktadır. Tuzluluk tarafından etkilenen ozmotik stres hücrede turgor kaybına ve hacim değişimlerine yol açar. Bununla birlikte ozmotik stresin potansiyel sensörleri, membranla ilişkili esnemeyle aktive olan kanallar, hücre iskeleti (mikrotübüller ve mikrofilamentler) ve 2 bileşenli histidin kinazlar gibi transmembran protein kinazları içerir. ATHK1, *Arabidopsis*'te bulunan ozmotik stres sensörlerinden biri olarak kabul edilmektedir (Urao et al., 1999).

Tuzluluk koşullarında spesifik olmayan iyon kanalları aracılığıyla Na^+ girişi, Ca^{2+} 'yı aktive eden membran depolarizasyonuna sebep olabilir (Sanders et al., 1999) ve böylece Ca^{2+} salınımı ve tuz stres sinyalleri oluşur. Tuz stresi boyunca sitosolik Ca^{2+} salınımları, vakuol, plazma membranı ve endoplazmik retikulumda bulunan mekanosensitiv ve ligand-girişli Ca^{2+} kanallarının aktiviteleri aracılığıyla düzenlenir (Tester and Davenport 2003; Zhu, 2002,2003). Kalsiyum sinyali sodyumun dışarı aktarılmasında ve sodyum/potasyum diskriminasyonu için mekanizmayı başlatan sekonder mesajcı olarak görev alır. Bitki hücrelerinde bu kalsiyum sinyali için sensör protein SOS3'tür. SOS3, bir serin/treonin kinaz olan SOS2 ile birlikte bir komplekstir. Kalsiyum sinyalinin alınımına göre, kinaz kompleksi SOS1 gibi fosforlanmış hedef proteinleri aktive eder. SOS1, hücreden sodyumu uzaklaştırmaktan sorumlu olan bir plazma membran sodyum/proton antiportıdır (Zhu, 2002). SOS1'in sodyumu dışarı çıkarma aktivitesi SOS3 ve SOS2'ye bağlıdır (Zhu, 2007).

Tuzluluk, bitki stres hormonu olan absisik asit (ABA) biyosentezini artırır (Jia et al., 2002; Xiong and Zhu, 2003). ABA reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumuna neden olur (Smirnoff, 1993; Hernandez et al., 2001). ABA ve ROS, stres hasar kontrolünde ve proses onarımında yer aldığı gibi iyonik ve ozmotik homeostaziyi de düzenler. Tuzluluk boyunca sodyumun vakuolar bölmelendirilmesi, ozmotik düzenleme ve aynı zamanda sitosolik sodyum konsantrasyonlarının azaltılması için önemli ve masrafsız bir stratejidir. Vakuolde sodyumun bölmelendirilmesi için vakuolar Na^+/H^+ antiportırları, vakuolar H^+ -adenozin trifosfataz (H^+ -ATPaz) ve H^+ - inorganik pirofosfataz (H^+ PPaz) tarafından proton gradienti kullanılarak üretilir. Tuz stresi, tonoplast H^+ -ATPaz ve H^+ PPaz aktivitelerini uyarır (Fukuda et al., 2004). Bununla birlikte Na^+/H^+ antiportırları, H^+ -ATPaz ve H^+ -PPaz'ın birlikte koordineli düzenlemesi tuza tolerans için çok önemlidir (Şekil2).

Şekil 2. İyon homeostazisinin düzenlenmesi için tuz stresi tarafından uyarılan SOS sinyal yolu

1.3 Tuz Stresine Bağlı Oluşan Oksidatif Stres

Yüksek enerji alanına sahip oksijen, elektron çiftlerinden birini kaybederek indirgenirse moleküler oksijen (O_2) formundan, reaktif oksijen türleri formlarına dönüşür (Mittler, 2002). Süperoksit anyonu ($\text{O}_2^{\cdot-}$), singlet oksijen ($^1\text{O}_2$), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil ($\text{HO}\cdot$) gibi ROS'lar, protein, DNA ve lipitlere oksidatif hasar verme kapasitesinde olan toksik moleküllerdir (Apel and Hint, 2004). ROS'lar en az bir çift eşlenmemiş elektrona sahip atom ya da atom gruplarından oluştuğu için kararsızlardır. Bu nedenle daha çok serbest radikal oluşturmak için diğer moleküllerle çok hızlı bir şekilde reaksiyona girerler (Hideg, 1997).

Çizelge 1. Moleküler oksijenin indirgenme basamakları sonucu ROS oluşumu

Ozmotik stres ve tuzluluğun , reaktif oksijen türleri (ROS) üretiminin artmasına ve reaktif oksijen türleri ile ilişkili hasara sebep olduğu görülmüştür (Serrato et al., 2004; Borsani et al., 2005; Miao et al., 2006; Abbasi et al., 2007; Zhu et al., 2007; Giraud et al., 2008)

Şekil 3. ROS tarafından düzenlenen bitki prosesleri

Stres boyunca bitkilerde ROS üretimi fotorespirasyon ve mitokondri solunumu gibi bazı metabolik süreçlerde üretilir. Tuz stresi de farklı hücresel bölmeler içinde hücresel elektron taşınımını bozarak ROS oluşumuna neden olmaktadır (Ali and Alqurainy, 2006). Hücrenin çeşitli elemanlarına zarar vermelerinin yanında ROS'lar, strese yanıt verilmesini sağlayan ikincil mesajcılar olarak da iş görebilmektedirler (Ashraf, 2009) (Şekil3).

Optimum büyüme koşulları altında ROS, kloroplast, mitokondri ve peroksizomlar gibi organellerde düşük seviyelerde üretilirler. Bununla birlikte stres boyunca oranları gittikçe artmaktadır. Stres boyunca ROS birikimi , tamamen ROS üretimi ve ROS süpürülmesi arasındaki dengeye bağlı olarak değişir (Mittler et al., 2004) .

Şekil 4. Bitki hücrelerindeki ROS üretiminin ve süpürülmesinin gerçekleştiği merkezler.

1.3.1 Kloroplastlarda ROS Oluşumu ve Süpürülmesi

Kloroplast tillakoidlerinde fotosistem I (PSI) ve fotosistem II (PSII)'nin reaksiyon merkezleri ROS üretiminin gerçekleştiği ana bölgedir (Asada, 2006).

Su stresi koşulları altında stoma kapanmasından dolayı oluşan indirgenmiş karbondioksit kullanılabilirliği ve sürekli aşırı ışığa maruz kalma moleküler oksijeni indirger PSI de Mehler reaksiyonu tarafından süperoksit iyonlarının oluşumuna neden olur (Asada, 2006). PSI de membrana bağlı bakır/çinko süperoksit dismutaz (Cu/Zn SOD), süperoksit radikallerini hidrojen peroksit'e dönüştürür ve askorbat peroksidaz da hidrojen peroksiti suya dönüştürür. Bu yüzden buna 'su-su döngüsü' denmektedir.

APX ve GR gibi antioksidan enzimler ile askorbat ve α -tokoferoller gibi enzimatik olmayan antioksidanlar tarafından ortadan kaldırılır (Miller et al., 2009). O₂-radikalinin SOD tarafından ayrıştırılmasıyla oluşan H₂O₂ radikali ise katalaz enzimi tarafından süpürülür (Quereshi et al., 2007).

Kloroplastlardaki başlıca peroksidaz, elektron alıcısı olarak askorbat kullanan (AsA) APX'tur. Askorbat-Glutasyon döngüsün de AsA, APX enziminin katalizlenmesiyle monodehidro askorbata (MDA) dönüşürken, hidrojen peroksit suya indirgenir. MDA'nın yarılanma ömrü kısa olduğu için MDA redüktaza (MDAR) dönüşür ve enzimin katalizlenmesiyle AsA'ya dönüşür. Bu sırada elektron alıcısı olarak NAD(P)H, hidrojen vererek indirgenir (Asada, 2006). MDAR ve MDA'nın AsA'ya dönüşümü başarısız olduğunda dehidro askorbat (DHA) oluşur. Elektron alıcısı olarak indirgenmiş glutasyonu (GSH) kullanan DHA, dehidroaskorbat redüktaz (DHAR) ile AsA'ya indirgenir. Yükseltgenen GSH (GSSG), NADPH'ı indirgeyen GR ile GSH'a dönüşür (Miller, 2009).

Thioredoksin (Trx) ve peroksiredoksin (Prx) oksidatif stres süresince önemli rollere sahiptir. Trx ve Prx redüktaz, kloroplastlarda fotokimyasal olarak oluşturulan hidrojen peroksit süpürülmesinde antioksidatif rol oynamaktadır. Bu koruma mekanizmasında 'alternatif su-su döngüsü' rol alır (Detz et al., 2006). Su-su döngüsünde, suyun fotolizi ile oluşan elektronlar stres sırasında moleküler oksijeni indirger ve süperoksit radikalleri oluşur. Bunlar SOD tarafından hidrojen peroksit'e dönüştürülür, hidrojen peroksit ise APX tarafından suya dönüştürülür.

1.3.2 Peroksizomlarda ROS oluşumu ve süpürülmesi

Peroksizomların bitki hücrelerindeki en temel işlevi fotorespirasyondur. Bu süreç, ışığa bağımlı O₂ alımına ve H₂O₂ üretimiyle ilişkili CO₂ salınımına dayanır (Dat et al., 2000).

Fotorespirasyon, fotosenteze bağlı karmaşık bir süreçtir. Kloroplastlardaki karbondioksit fiksasyonunun bozulması durumunda mezofil hücrelerinde ribulaz-1,5-bifosfat karboksilaz /oksijenaz'ın oksijenaz aktivitesi artar ve gliksilat

oluşur , peroksizomlara iletilerek glioksilat oksidaz tarafından hidrojen peroksit'e dönüştürülür (Noctor et al., 2002).

Yaprak peroksizomların matriksinde ksantin oksidaz (XOD) ile oluşturulan süperoksit , SOD tarafından oksijen ve hidrojen peroksit'e dönüştürülür (Corpas et al., 2001).

Peroksizomlarda bulunan katalaz ve/veya peroksidaz fotorespirasyonun arttığı koşullarda hidrojen peroksit ve suya ve oksijene dönüşümünü sağlar (Mittler et al., 2004).

1.3.3 Mitokondride ROS oluşumu ve Süpürülmesi

Mitokondriler, ROS kaynağı olarak bilinmelerine rağmen kloroplast ve peroksizomlarda daha fazla ROS bileşikleri üretilmektedir (Foyer and Noctor, 2005; Rhoads et al., 2006). Mitokondri de mitokondriyal elektron transport zincirinde (mtETC) kompleks I ve kompleks III, ROS üretiminin ana merkezleridir (Moller, 2007) . Kompleks I ve III ' de ubisemikinon ara formu , oksijene elektron verir ve süperoksit üretilmesine sebep olur bu da hidrojen peroksit'e indirgenir (Raha and Robinson,2000 ; Rhoads et al., 2006).

Su stresi boyunca artırılmış mitokondriyal solunum, sitokrom elektron transport sisteminden oksijene elektronları transfer ederek stres boyunca potansiyel olarak ROS üretimine sebep olur (Norman et al., 2004). Mitokondriyal alternatif oksidaz (AOX) ve mangan SOD (MnSOD) , sinyal yolunu kontrol mekanizmasında anahtar enzimlerdir (Foyer and Noctor, 2005). MnSOD süperoksit radikalini H₂O₂'e çevirirken ve oksijen ROS detoksifikasyonunun başlatıcı basamağında AOX, mitokondri de düşük ROS üretimi ve ubiqlinon havuzunun merkezinde indirgenmenin devamlılığında rol oynar (Rhoads, 2006).

1.3.4 Apoplastta ROS Oluşumu ve Süpürülmesi

Apoplast, çevresel streslere yanıtta H₂O₂ üretiminin önemli merkezlerinden biridir (Hernandez et al., 2001). Plazma membranına bağlı bulunan NADPH oksidazlar veya peroksidazlar tarafından oluşturulan süperoksit radikalinin parçalanması sonucu H₂O₂ oluşur. Oluşan toksik düzeydeki süperoksit , Cu/ZnSOD ile süpürülmektedir (Sagi, 2006; Streller and Wingsle, 1994).

Apoplastik boşluklarda oluşan H₂O₂, lignifikasyon olaylarında temel rol oynar. Apoplast, kuraklık ve tuzluluk gibi çevresel koşullara tepki olarak H₂O₂'nin üretildiği önemli bir bölgedir (Hu et al., 2005).

NADPH oksidazlar haricindeki diğler apoplastik ROS oluşturan enzimler, hücre çeperi ile ilişkili oksidazlar, peroksidazlar ve poliamin oksidazdır (Mittler, 2002).

1.4 Bitkilerde Tuz Stresinin Etkileri

Tuz stresinin etkilediği ana prosesler; büyüme, fotosentez, protein sentezi, enerji ve lipit metabolizmalarıdır.

Toprak ve sularda tuzluluğa, yüksek miktarda tuz varlığı sebep olur. En çok Na⁺ ve Cl⁻ iyonlarının varlığı tuzluluğa sebep olur. Tuz stresinin bitkiler üzerinde üç ana etkisi vardır; indirgenmiş su potansiyeli, iyon homeostazisinde dengesizlik ve düzensizlik ve toksisite. Değişen su potansiyeli ilk olarak büyümede indirgenmeye ve bitki verimliliğinin sınırlanmasına yol açar. Bundan dolayı tuz stresi ozmotik ve iyonik stresleri de içermektedir (Hagemann and Erdmann,1997; Hayashi and Murata, 1998).

Tuz stresi, bitki büyümesinin inhibisyonuna sebep olur bunun yanında bitki yapraklarının, köklerinin, gövdelerinin yaş ve kuru ağırlıklarında da ciddi bir azalmaya sebep olur (Hernandez et al., 1995). Bitkilerde, artan tuzluluk miktarına bağlı olarak birbiriyle ilişki halinde olan su potansiyeli ve ozmotik potansiyelin azalması, turgor basıncının artmasına sebep olur (Morales et al., 1998; Hernandez et al., 1999).

Tuzluluk bitkilerde fotosentetik pigment ve proteinleri negatif etkiler . Yapraklarda klorofil ve total karotenoid içerikleri azalma görülür. Yaşlı yapraklar da klorozis oluşumu gözlenmeye başlar ve tuz stresi periyodunda dökülürler (Hernandez et al., 1995). Yaprakları çözülebilir protein içeriğinde tuzluluğa yanıtta azalma gerçekteşir (Parida et al., 2002). Lipitler hücrenel membranlarda bulunan en etkili enerji depolama merkezleridir, yüksek konsantrasyonlardaki tuz stresi sırasında içerikleri azalır.

1.5 Bitkilerde Tuza tolerans Mekanizmaları

Bitkiler çevresel streslere karşı çeşitli mekanizmalar geliştirmişlerdir. Bitkiler iyonların bölmelendirilmesi, ozmolitlerin sentezi, ROS'ları süpüren antioksidan enzim sisteminin varlığı, fotosentez yolunda değişimler, membran yapısında değişimler, fitohormonların uyarılması ve tuz bezleri yoluyla iyonların atılması gibi mekanizmalar kullanmaktadırlar (Parida and Das, 2005).

Çizelge 2. Tuz stresine karşı tolerans sağlama amacıyla aktive olan genler/proteinlerin fonksiyonel grupları

- 1 Karbon metabolizması ve enerji üretimi / fotosentez
- 2 Hücre duvarının/membranının yapısal bileşenleri
- 3 Su kanal proteinleri
- 4 İyon taşınımı
- 5 Oksidatif stres savunma mekanizması
- 6 Detoksifikasyon enzimleri
- 7 Proteinazlar
- 8 Sinyalizasyonun proteinleri içermesi
- 9 Transkripsiyon faktörleri

Çizelge 3. Bitkilerde Tuza Tolerans Mekanizmaları (Munns and Tester, 2002)

1.5.1 İyonların Bölmelendirilmesi

İyon taşınımının düzenlenmesi bitkilerin tuza toleransında önemli faktörlerden biridir. Halofitler sodyum ve klor iyonlarını yaprak hücrelerinin vakuollerinde biriktirerek , sitoplazmadaki iyon konsantrasyonlarını zararsız hale getirmiş olurlar (Binzel et al., 1988). Bitki hücrelerinde iyonların dağılımı membran proteinleri ile gerçekleşmektedir, bunlar; H⁺-ATPazlar, plazma membranındaki Na⁺/H⁺ taşıyıcıları, tonoplasttaki Na⁺/H⁺ pompaları ve Na⁺'ya oranla K⁺'ya seçiciliği olan katyon kanalları (DuPont, 1992).

Tuz stresi altında sitozolik enzimlerin aktivitesi için K⁺ ve Na⁺ dengesinin korunması çok önemlidir. Sitozoldeki K⁺ iyonlarının oranının, etkili bir metabolik performans için 100-200 mM düzeyinde tutulması gerekir. K⁺ iyonlarındaki büyük değişikliklerle basa çıkabilmek için bitkiler çok sayıda K⁺ taşıyıcısını kodlayan genlere sahiptirler (Maathius et al., 1997; Very and Sentenac 2002, 2003). Sodyum, bu K⁺ taşıyıcılarının bazılarını sitozole girebilmek için kullanır. Bunun için tuz stres sinyalinin alınması, iyon taşınımının düzenlenmesini gerektirir. Bu yönde modeller geliştirilmiştir ve bitkilerde SOS (Salt Overly Sensitive) genlerine dayalı bir sinyal yolu saptanmıştır .

Şekil 5. SOS sinyal yolu (Demiral ve Türkan, 2009).

1.5.2 Ozmolitlerin sentezi

Bitki hücreleri ozmotik strese yanıt olarak çözünmüş madde potansiyellerini düşürür su potansiyellerinin düzenlenmesi için ‘uyumlu bileşikler’ olarak adlandırılan ozmolitleri sentezlerler. Denge oluşturan bu çözünmüş maddeler enzimlerin işlevlerini etkilemeyen organik bileşiklerdir. Bir aminoasit olan prolin, sorbitol ve mannitol gibi şeker alkollerini ve glisinbetain olarak adlandırılan bir quaterner amin denge oluşturan çözünmüş maddelerdendir. Genellikle organik çözünen maddeler olmasına karşın, K⁺ gibi önemli elemental iyonlardan da oluşurlar. Organik olma özellikleriyle ozmoprotektanlar, sitoplazmaya yerleşirken inorganik iyonlar kuraklık ve yüksek tuz koşullarında turgorun korunmasını ve ozmotik dengenin sağlanmasını kolaylaştırmak için vakuolde tutulurlar (Louis and Galinski, 1997; Delauney and Verma, 1993). Bu maddeler hücrede yaygın olarak birikirler. Bitkiler ozmolitleri sentezleyerek kök zonunda giderek artan tuzluluğa karşı düzenleme yaparlar.

Tuz stresine toleransın birçok gen arasında karmaşık bir ilişkiye bağlı olduğu bilinmesine rağmen ozmolit birikimindeki artış stres toleransının en azından bir yönünü artırmak için önemli mekanizmalardan biridir (Hare ve ark.,1998). Uyumlu bileşikler tuz birikiminin dengesini veya su kaybını önlerler bunlarla birlikte ozmotik etki için koruma çok düşük konsantrasyonlarda meydana gelebilir. Bu koruma serbest radikalleri süpürme (Smirnoff and Cumbes, 1989), makromolekülleri ve membran yapılarını kararlı hale getirme (Galinski, 1993) veya düşük moleküler ağırlıklı şaperonlar (Bohnert and Jensen, 1996) gibi diğer olası mekanizmaları ortaya çıkarır. Ayrıca karbon ve enerjini depolanmasında koenzimlerin düzenlenmesinde (Lewis, 1967) görev almaktadır. Örneğin; glisinbetain (GB), su kıtlığında uyumlu bileşik olarak görev yapan bir quaterner amonyum bileşiğidir ve su stresi sırasında PSII'yi koruduğu rapor edilmiştir (Murata et al., 1992). Aminoasitlerden olarak bilinen prolin ise membran kararlılığına yardımcı olan ozmolitlerdendir (Hanson and Burnet, 1994).

1.5.3 Yapraklarda Oluşan Tuz Bezleri

Halofit bitkiler dokularının tuz içeriğini kontrol etmek için özel mekanizmalar geliştirmişlerdir. Bunlar bazı organlarda tuz salgılama, yaprak tüylerinde tuz birikimi, yaşlı yaprakların dökülmesi ve tuzun diğer organlara talınması olarak sayılabilir (Waisel et al., 1986).

Tuz sediri (*Tamarix sp.*) ve Tuz çalısı (*Atriplex sp.*) gibi tuza dirençli bazı bitkiler iyonları köklerden dışarı atmazlar; bu bitkilerin yapraklarının yüzeylerinde tuz bezleri bulunur. Bu bezlere taşınan iyonlar orada kristalleştirilerek zararsız hale gelirler. Genelde halofitler sürgün hücrelerinde, glikofitlerden daha fazla iyon biriktirebilirler.

1.6. ROS'ların Antioksidan Enzim Sistemi ile Yok Edilmesi

Bitkiler, ROS'ları süpürmeleri için APX, SOD, CAT, POX, GR ve DHAR gibi enzimatik antioksidantlar geliştirmişlerdir (Vranova et al., 2002). ROS detoksifikasyonunun anahtar enzimleri SOD, CAT, POX, APX ve Halliwell-Asada döngüsünde (askorbat-glutasyon yolu) rol alan diğer enzimlerdir. Stres koşulları altında bu enzimlerin her birinin aktivitesinde artış gözlenmektedir (Zhao et al., 2008).

1.6.1 Süperoksit dismutaz (SOD)

SOD süper oksit radikalının hidrojen peroksit ve oksijene dismutasyonunu katalizleyen metal içeren bir enzimdir. SOD tarafından H₂O₂ 'ye dismutasyon, Fenton Reaksiyonu tarafından hidroksil radikalini oluşturur (Foyer et al., 1994).

Şekil 6. Fenton Reaksiyonu

SOD, metal kofaktörlerine göre üç ana gruba ayrılır: (i)Cu/ZnSOD, (ii)MnSOD, (iii)FeSOD. Cu/ZnSOD, bu enzimler kendi kofaktörleri olarak bakır ve çinkoyu kullanırlar ve bitkilerde başlıca sitosol ve kloroplastta bulunurlar. Sitoplazmik Cu/ZnSODlar bitkilerde homotetrameriktirler. MnSOD, kofaktörü olarak mangana sahiptir, mitokondri ve peroksizomlarda bulunur. FeSOD, hayvanlarda bulunmaz ve dominant olarak kloroplastlarda bulunurlar. Örneğin Arabidopsiste bu SOD tiplerinin her birinin farklı izoformları bulunmaktadır: Cu/ZnSOD izoformları –CSD1, CSD2, CSD3-, MnSOD izoformları –MSD1-, FeSOD izoformları – FSD1, FSD2, FSD3- (Kliebenstein et al., 1998). Bitkilerde süperoksit radikallerinin süpürülmesi, çeşitli SOD izoformlarının aktivitelerinin farklı düzenlenmesi tarafından meydana gelir (Wang et al., 2004). Yer aldıkları yer dışında SOD izozimleri KCN ve hidrojen peroksit karşı duyarlılıkta da farklılaşma gösterirler . MnSOD bu inhibitörlere direnç gösterirken, Cu/ZnSOD her ikisine de duyarlıdır. FeSOD ise KCN ye dirençli ve hidrojen peroksit duyarlıdır (McKersie, 2000).

Şekil 7. Bitki hücrelerinin farklı organellerinde antioksidan

1.6.2 Katalaz (CAT)

CAT, H₂O₂ süpürülmesinde görevli hem-içeren tetramerik bir enzimdir (Guan and Scandalios, 1993). Tohum çimlenmesi tuz stresi ve diğer abiyotik stres koşulları sırasında bitki katalazları fotorespirasyon fonksiyonlarında ve yağ asitlerinin β-oksidasyonu boyunca H₂O₂ sürülmesinde görevlidir (Willekens et al., 1995).

Katalaza ait üç izoform belirlenmiştir. CAT1, CAT2, CAT3 farklı görevlere sahiptir ve bitki dokularında farklı yerlerde bulunmaktadır. CAT1, peroksizomlarda, hidrojen peroksitin süpürülmesinde görevlidir. CAT2 vasküler dokularda bulunurken, CAT3 ise tohumlarda, genç fidelerde bulunmaktadır ve glioksizomlardaki hidrojen peroksiti savurma görevindedir (Dat, 2000).

Hidrojen peroksitin suya ve oksijene parçalanmasını katalizlerler. Kataliz aktivitesi tuz stresi, sıcaklık ve soğuk stresi ile azalabilir çünkü çevresel streslerle uyarılan ikincil oksidatif strese karşı bitkinin cevabı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Kloroplastlarda katalazın yokluğu Calvin Döngüsündeki tiol bağlı enzimlere zarar verebilir. Ayrıca katalazın hidrojen peroksite karşı ilgisi diğer enzimlere göre daha düşüktür.

1.6.3. Peroksidaz (POX)

Peroksidazlar, hayva, bitki ve mikroorganizmalarda bulunan hidrojen peroksit ile çeşitli indirgeyicilerin arasında indirgenme ve yükseltgenme reaksiyonlarını katalizleyen enzim sınıfıdır.

Peroksidazların üç sınıfı bulunmaktadır. Askorbat peroksidaz ve sınıf3 bitki peroksidazları (guasiol tip peroksidazlar; GPX) antioksidan sistemle ilgili olan önemli bitki peroksidazlarıdır.

1.6.4 Askorbat peroksidaz (APX)

APX, bitki hücrelerinin çoğunlukla sitosolunda ve kloroplastlarında bulunan H₂O₂ 'yi savuşturmakla sorumlu anahtar enzimlerdir. Askorbatın H₂O₂ tarafından oksidasyonunu katalizler ve monodehidroaskorbat radikalini (MDA) oluştururlar. Hücrede kloroplast stromasındaki çözünebilir (sAPX), tillakoide bağlı (tAPX), sitosolik (cAPX) ve glioksizom membranına (gmAPX) bağlı olmak üzere 4 farklı APX tespit edilmiştir (Campa, 1991).

Askorbat-glutasyon döngüsü enzimleri bitkilerde oksidatif stresle başa çıkabilmek için önem taşımaktadırlar. APX, askorbik asiti (Asc) elektron verici olarak kullanarak H₂O₂ 'yi indirger (Bowler ve ark.,1992) .

Bitkilerde yüksek antioksidan enzim düzeyleri ile hem azalan hem de artan ROS'ların oluşturduğu oksidatif hasara karşı tolerans gösteren bir çok kanıt mevcuttur (Parida ve Das, 2005).

Birçok araştırmacı SOD , CAT , APX ve GR enzimlerinin tuz stresi ile değişimini rapor etmiştir (Hernandez, 2000; Mittova,2002; Azevedo, 2006)

1.7 ROS Süpürülmesinde Enzimatik Olmayan Antioksidantlar

Enzimatik antioksidantlara ek olarak bitkiler, stresin neden olduğu oksidatif stresin etkilerini yok etmede önemli rol oynayan enzimatik olmayan moleküllere de sahiptir. Enzimatik olmayan bu antioksidantlar; askorbik asit, α -tokoferoller, karotenoidler, flavonoidler, glutatyondur (Noctor ve Foyer,1998; Schafer ve ark., 2002).

α -tokoferoller, bütün bitkilerde sentezlenen lipofilik antioksidantlardır. Lipidlerin poliansatüre gruplarıyla etkileşim halindedir. Membranları stabilize eder ve oksidatif stres ürünleriyle, çözümlü lipidleri ve birçok ROS'u süpürür. (Wang ve Quinn, 2000). α -tokoferol seviyeleri birçok abiyotik strese yanıtta fotosentetik bitki dokularında artar. (Munne – Bosch ve Algere, 2003).

α -tokoferol antioksidant olarak ve stabilizer olarak biyolojik membranlarda özgün bir rol oynar. α -tokoferol (özellikle fotosentetik membranlarda) hücrelerin biyolojik membranlarıyla ilişkili bir lipid çözümlü antioksidanttır (Lawlor, 2002;

Kanwischer ve ark., 2005) Protoplastlarda ve kloroplastlarda sentezlenir ve hücrelerin membranlarında lokalize olur. (Smirnoff, 1995)

Askorbik asit, doğada bol bulunan potansiyel bir oksidant olduğu bilinmektedir (Smirnoff, 2000) Hücre genişlemesinin düzenlenmesinde görevlidir(Crivalli, 2003). GSH gibi askorbatta suda çözünebilir ve birçok hücre tipinde ve organellerde ve apoplastta bulunur.

Normal fizyolojik koşullar altında yaprak ve kloroplastlarda daha çok indirgenmiş formda mevcuttur (Smirnoff, 2000). Askorbik asit doğrudan süperoksiti, hidroksil radikallerini ve tekli oksijeni baskılar ayrıca hidrojen peroksiti askorbat peroksidaz reaksiyonu yoluyla suya indirger (Foyer ve ark., 1997).

Glutasyon, sitosol, kloroplast, endoplazmik retikulum, vakuol ve mitokondri gibi hücrenin birçok bölmesinde bulunan sisteğin içeren bir tripeptit olarak bitkilerdeki çok önemli metabolitlerden biridir (Jimenez ve ark., 1997). Glutasyonun indirgenmiş formu potansiyel olarak tekli oksijeni, hidrojen peroksidi ve hidroksil radikali gibi diğer radikalleri de süpürür (Noctor ve Foyer,1998). Bunun yanında GSH askorbat glutasyon döngüsüyle diğer bir potansiyel suda çözülebilir antioksidant olan askorbat asidin yeniden oluşumuyla antioksidatif savunma sisteminde önemli bir rol oynar (Foyer et al., 1997). Stres şiddeti arttığında glutasyon konsantrasyonları genellikle azalır ve redoks durumu daha çok okside olur dolayısıyla sistem zararsız olur (Parida, 2000).

1.2 B6 VİTAMİNİ

B6 vitamini birçok metabolik enzim ve aminoasit metabolizmasında kofaktör olarak özel bir rol oynayan pridoksamin, pridoksal ve fosforlanmış bileşiklerine verilen genel bir addır ve bunun yanında tüm organizmalar için gereklidir (Schneider et al, 2000; Chen ve Xiong, 2005). Vitamin B6 dekarboksilasyon, deaminasyon ve transsülfürasyon gibi metabolik olaylarda da bulunan enzimler için kofaktör olarak görev alır (Drewke and Leistner, 2001; Denslow et al., 2005). Ayrıca vitamin B6, bazı antibiyotik prekürsörlerinin üretimini ve aminosiklopropan-1-karboksilat (ACC) sentezini gerçekleştiren karbonhidrat ve lipid metabolizmasında da rol alır (Drewke ve Leistner, 2001) .

Vitamin B6, bir hidroksil grubu taşıyan pridoksin, bir aldehit olan pridoksal ve bir amino grubu taşıyan pridoksaminden oluşur ve bu üçü fosforlanırsa birçok önemli enzimatik olayda kofaktör olarak kullanılan ve biyolojik olarak en aktif form olan pridoksal 5'-fosfat (PLP) meydana gelmektedir. PLP-bağımlı enzimler, 140'dan fazla birbirinden farklı enzimatik reaksiyonu katalizler. Örneğin; PLP-bağımlı enzimler yağ asit metabolizmasını katalizler, PLP-bağımlı glikojen fosforilaz depo glikojenin yıkılarak glukoz salınımını sağlar.

De novo vitamin B6 biyosentezinin bilinen iki yolu vardır: deoksiksiloz-5'fosfat(DXP)- bağımlı ve DXP-bağımsız. DXP-bağımlı de novo vitamin B6 biyosentezi öbakterilerde ; DXP-bağımsız yol ise bazı bakterilerde , archaea ve ökaryada bulunmaktadır (Schmidt ve ark.,1996) . DXP-bağımlı de novo B6 vitamini biyosentezi, gram negatif bakteri olan E. Coli de çalışılmıştır. E.coli de

B6 vitamin PdxJ ve PdxA'nın çalışmasıyla üretilir. Bu iki B6 vitamini sentaz proteinleri PLP oluşturmak için 4-fosfohidroksi-L-treonin (4HPT) ve DXP 'yi kullanmaktadır (Zhao ve Winkler,1996).

De novo B6 vitamini biyosentez yolu ise DXP-bağımsız yoldur. İki protein içerir: PDX1 ve PDX2. Bu iki sentaz proteini PLP 'yi riboz 5'-fosfat ya da ribuloz 5'fosfattan direk sentezler (Zhu et al., 2005 ; Xiang et al., 2005) . PDX1 , en son zincir kapanmasını, PDX2 ise glutaminden glutamat oluşumunda glutaminaz olarak iş görür.

PNP veya PLP sentezine ek olarak, salvaj yolu aracılığıyla vitamerler birbirine dönüşebilmektedir. Bu dönüşümler, kinazlar ve oksidazlar yardımıyla tamamlanır (Hill et al., 1996 ; Yang et al., 1996-1998) . Salvaj yoluyla ilgili çalışmalar PN, PL ve PM'nin ilgili 5'-fosfatlarına fosfarlandığı 2 farklı kinaza sahip olan E. coli de yapılmıştır. Bu iki farklı kinaz substrat seçililiklerine göre PdxY substrat olarak PL üzerind ; PdxJ ise substrat olark fosfarlanmış üç farklı vitamer kullanır.

Şekil 8. De novo yolu ve salvaj yolunun şematik gösterimi .

Bir çok ökaryot bir basit kinaz ve bir dimer açığa çıkararak farklı organizmalardan kristal yapıda olan bir kinaz içerir (Cao et al., 2006; Safo et al., 2004). İki monomerin her biri, aktiviteleri için ATP ve metal iyonlarını kullanan aktif bir bölge içerir (Musayev,2007).

E.coli' de bulunan PdxJ ve PdxK kinazlarının aksine , PdxH'nin , fosforlanmış formlar olan PNP ve PMP'yi PLP'ye direk okside ettiği görülmüştür (Zhao et al., 1995-1996).

Şekil 9. E.coli B6 vitamini sentez

Maya da bulunan pridoksin fosfat oksidaz, PDX3, tanımlanmıştır ve bu gene ait mutantlar da oksidatif stres duyarlılığı artmaktadır (Loubbardi, 1995). İlginç olarak, Arabidopsis'te yakın zamanlarda tanımlanan bir oksidaz olan, AtPPOX, bu mayaya direnç sağlamaktadır (Sang et al., 2007) .

Aktif B6 vitamini kofaktörlerinin havuzunda PLP/PMP/PNP 'nin defosforilasyonu en önemli kontrol noktası olduğundan dolayı çok kritik bir basamaktır. PLP/PMP/PNP 'nin spesifik olmayan defosforilasyonunun, alkalın fosfataz ve asit fosfotazlar tarafından gerçekleştiği rapor edilmiştir (Fonda et al., 1991; Bull et al.,2002).

B6 vitamini bitki hücrelerini oksidatif stresten korumak için çok önemli bir rol oynar. Çünkü B6 vitamini antioksidant etki göstermektedir (Ehrenshaft et al., 1998 ; Bilski and Daub, 2002) .

Salvaj ve de novo yollarını kodlayan genlerin mutasyonlarıyla oluşan birbirinden farklı birçok fenotipte B6 vitamini sentezinde, tuz ve ROS'a duyarlılık görülmüştür.

Çizelge 4. B6 vitamini de novo ve salvage yollarının mutant örnekleri

Birbirinden farklı birçok çalışma sonucu B6 vitamininin oksidatif strese ve diğer abiyotik streslere toleransta çok önemli rol oynadığı ortaya koyulmuştur. Örneğin Arabidopsis thaliana PDX1.3'ün, ROS içeren bir kimyasal olan Rose Bengal uygulamasına aşırı duyarlılık gösterdiği görülmüştür (Chen et al., 2005). Ayrıca Arabidopsis pdx 1.3 mutantları tuz ve UV-B uygulamalarına da aşırı duyarlılık göstermektedir.

Hücre de ve stresörler de abiyotik strese karşı toleransta, B6 vitamini biyosentezini içeren generin ifadelerinde ciddi bir artış olduğu bulunmuştur.

B6 vitamini inhibitörü bir antibiyotik olan klomazondur. Klomazon DXP bağımlı yolu baskılar ve PLP üretimini engeller. Klomazon, dimethazon ya da FMC 57020 olarak da bilinir.

Şekil 10. Klomazonun yapısı

Bitkilerde bilinen B6 vitamini biyosentezi ve PDX protein aktivitesi esas olarak Brassicaceae üyesi olan *Arabidopsis thaliana*'dan ortaya çıkarılmıştır (Tambasco-Studart et al., 2005; Wagner et al., 2006; Denslow ve Daub, 2007). *Arabidopsis* genomu üç AtPDX1 proteini kodlar; AtPDX1.1, 1.2 ve 1.3 fakat sadece bir tane AtPDX2 proteini kodlar.

Çizelge 5. *Arabidopsis* genomunun kodladığı üç PDX1 proteini ve bir PDX2 proteininin mRNA miktarları

Bu çalışma da kullanılan AtPDX1.3, geciken çiçeklenme, azalan klorofil içeriği ve kısa kök uzunluğu göstermektedir (Tambasco-Studart et al., 2005; Wagner et al., 2006).

Şekil 11. Uygulama yapılan *Arabidopsis thaliana* ve pdx 1.3 bitkileri

Arabidopsis thaliana, Brassicaceae ailesine ait 30 santimetre boya kadar büyüeyebilen, dikotil, tek yıllık otsu bir bitkidir. *Arabidopsis thaliana*, en çok bilinen model bitkidir. Küçük boyu ve kısa üreme zamanından dolayı genetik araştırmalara uygundur ve birçok fenotipik ve biyokimyasal mutanları haritalanmıştır. *Arabidopsis* genom dizilimi bulunan ilk bitkidir. *Arabidopsis*'in genom dizilimi, TAIR veri tabanı tarafından sağlanmıştır. *Arabidopsis* kendileşir ve iki generasyon sonra seleksiyon yapılır. Tek bitki 5.000-10.000 tohum oluşturur. Genom dizisi bilinmektedir. Genom 125 Mb ve 25498 gen içermektedir.

Çalışmamızda *Arabidopsis* yabani tip Columbia ve pdx1.3 bitkileri kullanılmıştır. Bitkiler iki farklı Murashige and Skoog (MS) ortamı hazırlanarak yetiştirildi (Murashige and Skoog, 1962). İlk ortama B6 vitamini eklenmezken, diğer ortama 100µM pridoksin eklendi. Bitkiler 16/8 ışık periyodu, 22°C oda sıcaklığında iklim odasında yetiştirildi. Col kontrol grubuna 13. Günlerinde kloromazon uygulaması (10-4M) yapıldı. Bitkilere 15. günlerinde 100mM NaCl stresi uygulandı ve 48 saatlik uygulamadan sonra hasat edilerek analizleri yapıldı.

Bu çalışma da, *Arabidopsis* mutanları pdx1.3'e ve yabani tipe tuz stresi altında dıştan B6 vitamini uygulanarak H₂O₂ miktarları, SOD, GR, APX, POX ve CAT gibi antioksidan enzim aktiviteleri ve izozimleri belirlenmiştir. Ayrıca bu parametreler büyüme, yaprak su potansiyeli, bağıl su içeriği ve lipid peroksidasyonu gibi diğer fizyolojik ve biyokimyasal parametrelerle ilişkilendirilmiştir.

Tuz stresi altındaki *Arabidopsis* mutanının (pdx1.3) antioksidan savunma sisteminde oluşan yanıtlarla ilgili literatürde sınırlı sayıda araştırma mevcuttur. Literatürdeki bu eksiklik göz önüne alındığında, yabani tip *Arabidopsis*'in tuza tolerans mekanizmasının aydınlatılması, tuzluluk problemiyle karşı karşıya kalan bölgelerdeki sınırlı bitkisel üretimin artırılabilmesi için gerekli en temel ve orijinal bilgileri sağlayacaktır.

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Bitki Materyali ve Yetiştirilmesi

2.2. Büyüme Parametreleri

Arabidopsis thaliana yabani tip ve B6 vitamini eksik mutant (pdx1.3) bitkileri 15. günlerinden yapılan 48 saatlik tuz uygulamasının sonunda hasat edilmiştir. Bu sırada her gruptan rasgele beşer tekrarlı alınan bitkilerin gövde uzunlukları ve yaş ağırlıkları (YA) ölçülmüştür. Daha sonra örnekler 70°C 'de 72 saat etüvde bekletilerek kuru ağırlıkları (KA) belirlenmiştir.

2.3 Yapraklarda Bağlı Su Miktarı (RWC)

48 saat süren tuz stresi uygulamasının sonunda tüm bitki gruplarından yaklaşık olarak eşit boylardaki yapraklardan örnekler alınarak yaş ağırlıkları ölçülmüştür. Daha sonra yapraklar 6 saat boyunca düşük ışık altında 50 ml deiyonize su bulunan petrielerde bekletilerek turgorlu hale geçmeleri sağlanmıştır. Bu süre sonunda turgorlu yapraklar kurutularak tartılmış ve turgor ağırlıkları belirlenmiştir. Tartılan yaprak örnekleri 48 saat süreyle 65-70°C'de etüv de kurutulduktan sonra kuru ağırlıkları ölçülmüştür. Her bir gruba ait yaprak örneklerinin RWC değerleri Smart ve Bingham , (1974)'in aşağıda verilen formülüne göre hesaplanmıştır.

$$RWC(\%) = [(Yaş Ağırlık - Kuru Ağırlık) / (Turgorlu Ağırlık - Kuru Ağırlık)] \times 100$$

2.4 Yaprak Ozmotik Potansiyeli

Yaprak ozmotik potansiyeli, Wescor 5500 marka ozmotik potansiyel sistem cihazı ile mmol kg⁻¹ olarak ölçülmüştür. Ölçümler her bir gruptan beşer tekrarlı olarak kaydedilmiştir. Sonuçlar Santa Cruz ve arkadaşlarına (2002) göre 2.408×10^{-3} katsayısıyla çarpılarak MPa'ya çevrilmiştir.

2.5 Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

2.5.1 Enzim Ekstratlarının Hazırlanması

Antioksidan enzim ekstraksiyonu için -80°C'lik derin dondurucuda bekletilen 1 gr yaprak örnekleri, SOD, CAT, GR ve POX için soğutulmuş havanda 50mM Tris-HCL (pH 7.8), 0,1 mM EDTA, %0.2 TritonX100, 1 mM PMSF, 2 mM DTT içeren homojenizasyon tamponuyla homojenize edilmiştir. APX için homojenizasyon tamponuna 2mM ascorbat ilave edilmiştir. Homojenatlar 14000g'de +4°C'de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatant, enzim aktivitelerinin belirlenmesinde kullanılmıştır. Tüm spektrofotometrik ölçümler Shimadzu UV-1600 ile yapılmıştır (Shimadzu, JAPAN).

2.5.2 Katalaz (CAT; EC 1.11.1.6) İzozim/Enzimlerinin

Aktivitelerinin Belirlenmesi

CAT izozimleri Woodbury et al. (1971) tarafından tanımlanan metoda göre belirlenmiştir. 10µg protein içeren örnekler %7.5 luk denatüre olmayan poliakrilamid jelde (PAGE) sabit akım altında (60 mA) yürütüldükten sonra, jeller %0,003 H₂O₂'de 5 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra jeller %1 FeCl ve %1 K₃Fe(CN)₆ içeren solüsyonda 10 dk boyanmaya alınmıştır. Yeşil renk görünmeye başlar başlamaz jeller deiyonize su ile yıkanmıştır.

Total katalaz (CAT) enziminin aktivitesi, Bergmeyer (1970)'in tanımladığı yöntemle göre belirlenmiştir. Bu enzimin aktivitesi dakikada tüketilen µmol H₂O₂ miktarı olarak ifade edilmiştir. Reaksiyon boyunca absorbansta oluşan düşüş 180 sn boyunca 240nm'de izlenmiştir.

2.5.3 Süperoksit dismutaz (SOD; EC 1.15.1) Enim/İzozimlerinin Elektroforetik Ayrımı

Eşit miktarda protein içeren (100mg/well) yaprak ekstratları Laemli (1970)'ye göre Native-Page ile ayrılmıştır. SOD aktivitesi, Beauchamp ve Fridovich

(1971)'e göre, riboflavin ve nitrobluetetrazolium(NBT) boyaması ile belirlenmiştir. Jeller 45 dk boya çözeltisinde bekletildikten sonra, SOD izozim bantlarının densiyometrik analizi Bio-1D yazılım programında görüntüleme cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Bir birim SOD aktivitesi, 560nm'de spektrofotometrede ölçülen elektron alıcısı olan NBT'nin fotokimyasal redüksiyonunun %50 inhibisyonuna neden olan enzim miktarı, spesifik enzim aktivitesi ise U/mg protein olarak belirlenmiştir. Unit, 25°C'de 1 dakika 1µmol substratı ürüne dönüştüren enzim (SOD) miktarını göstermektedir.

Elektroforetik SOD izozimlerinin ayrımı Beauchamp and Fridovich (1971)'e göre riboflavin ve nitroblue tetrazolium boyamasıyla yapılmıştır. Esit miktarda protein (20µg) içeren örnekler, denatüre olmayan (SDS içermeyen) poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE)'ne tabi tutulmuştur (Laemmli, 1970). SOD örnekleri 4°C'de sabit akım altında (120 mA), % 5 toplayıcı jel (stacking gel) ve % 12 ayırıcı jelde (seperating gel) yürütülmüştür.

2.5.4 Peroksidaz (POX; EC 1.11.1.7) İzozim/Enzimlerinin

Aktivitelerinin Belirlenmesi

Elektroforetik POX izozimlerinin ayrımı SeEVERS ve arkadaşlarına (1971) göre yapılmıştır. 30 µg protein içeren örnekler %10'luk denatüre olmayan poliakrilamid jelde (PAGE) 60mA sabit akım altında yürütülmüştür. Elektroforezden sonra oluşan bantları görebilmek için jeller karanlıkta 30 dk boyunca, DAB ve hidrojen peroksit içeren 200mM Na-asetat tamponunda (pH5.0) inkübe edilmiştir. Daha sonra jeller %7'lik asetik asit solüsyonunda saklanmıştır.

Total peroksidaz enzim aktivitesi, Herzog ve Fahimi (1973)'nin tanımladığı yöntemle göre yapılmıştır. Köre karşı 465nm'de hidrojen peroksit varlığında okside olan DAB (3'-3'-diaminobenzidin tetrahidroklorit) oluşumunun miktarına bağlı olarak üç dakika boyunca absorbans değişimleri okunmuştur. Reaksiyon hidrojen peroksitin katılmasıyla başlamış ve absorbans artışı izlenmiştir. Spesifik enzim aktivitesi dakikada tüketilen µmol/ml hidrojen peroksit olarak ifade edilmiştir.

2.5.5 Glutasyon Redüktaz (GR; EC 1.6.4.2) Total Enzim

Aktivitesinin Belirlenmesi

Glutasyon redüktaz (GR) aktivitesi, 340nm'deki absorbans azalmasından yola çıkılarak hesaplanmıştır (Foyer ve Halliwell,1976) . NADPH varlığında, okside glutasyon miktarındaki azalma, kuvartz küvette köre karşı 180 sn boyunca izlenmiştir. Hesaplamalar glutasyon redüktaz enziminin ekstinksiyon katsayısı kullanılarak yapılmıştır. Spesifik enzim aktivitesi, dakikada indirgenen 1 mmol/ml GSSG miktarı olarak ifade edilmiştir.

2.5.6 Askorbat Peroksidaz (APX; EC1.11.1.11) Total Enzim

Aktivitesinin Belirlenmesi

Askorbat peroksidaz aktivitesinin tayini Nakano ve Asada (1981)'ya göre belirlenmiştir. Askorbat okside oldukça, spektrofotometreden 290nm'deki absorbansta oluşan azalma kaydedilmiş ve hesaplamalar askorbatın oksidasyonu, enzim ekstratının katılmasıyla başlatılmış ve absorbanstaki azalma 180 sn boyunca izlenmiştir. Bir birim APX aktivitesi dakikada okside olan 1mmol/ml askorbat olarak ifade edilmiştir.

2.6 Protein Miktarının Belirlenmesi

Protein içeriği Bradford (1976) 'a göre, bovin serum albumin standart olarak kullanılarak belirlenmiştir.

2.7. Lipit Peroksidasyonu

Yapraklarda meydana gelen lipit peroksidasyon derecesinin belirlenmesi için , lipit peroksidasyonunun son ürünü olan malondialdehit (MDA) seviyesi ölçülmüştür. MDA miktarı Madhava Rao ve Sresty (2000)'e göre belirlenmiştir. Bunun için 0,5 g yaprak örneği, TCA (trikloroasetik asit) ile homojenize edilmiştir. Santrifüjden sonra süpernatant TBA (thiobarbitürük asit) ve TCA içeren reaksiyon karışımı pipetlenmiş ve tüm deney tüpleri 95°C'de 30dk ısıtılmıştır. Karışım 10000g x 15 dk santrifüjlenmiştir. Oluşan süpernatantın 532 ve 600 nm'deki absorbans değerleri okundu. MDA konsantrasyonu ekstinksiyon katsayısı ($\epsilon = 155\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) kullanılarak hesaplanmıştır.

2.8 B6 Vitamini Miktarının Belirlenmesi

Total B6 vitamini tayini HPLC yöntemiyle Marmara Araştırma Merkezi'nde yapılmıştır.

2.9 İstatistiksel Analizler

Her bir deneme en az 3 kez tekrar edilmiştir ve her bulgu , büyüme parametreleri dışında (n=10) 2tekrardan oluşmaktadır (n=6). Elde edilen veriler Tek-Yönlü Varyans Analizi (One-Way ANOVA) ile analiz edilmiş ve ortalamalar arasındaki farklılıklar Lowest Standart Deviations (LSD) testi ile karşılaştırılmıştır. Yaprak su potansiyeli gibi tekrarlanmalı ölçümlerde ise veriler İki-Yönlü Varyans Analizi (Two-way ANOVA) ile analiz edilmiştir. $P < 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. İstatistiksel analizler SPSS programı (standart versiyon 10.0) ile gerçekleştirilmiştir. Bütün şekillerdeki hata çubukları ortalama \pm standart hatayı (S.H.) göstermektedir ve çizelgelerdeki değerler ortalama \pm S.H. şeklinde verilmiştir.

3.BULGULAR

3.1 Büyüme Parametreler

3.1.1 Bitki Uzunluğu, Total Bitki Yaş ve Kuru Ağırlıkları

Arabidopsis thaliana, yabani tip Columbia ve mutandı Pdx1.3 bitkilerinin tuz stresi uygulamalarına bağlı olarak nispi büyüme oranı yaş ve kuru ağırlıklarında meydana gelen değişimler Çizelge 6'da verilmistir.

Çizelge 6. *Arabidopsis thaliana*, yabani tip Columbia ve Mutandı Pdx 1.3 ' ün tuz stresi altında bitki boy uzunluklarının, total bitki yaş ve kuru ağırlıkları karşılaştırılması . Çizelgede gösterilen hata çubukları ortalama \pm standart hatayı (S.E.) göstermektedir.(n=6)

	YAŞ AĞIRLIK	KURU AĞIRLIK	UZUNLUK
COL MS-	0,056525 \pm 0,01	0,0057525 \pm 0,001	6,6 \pm 1,2
COLMS- N	0,076995 \pm 0,013	0,00878125 \pm 0,0012	5,625 \pm 0,71
COL MS+	0,02746625 \pm 0,011	0,00245625 \pm 0,001	6,863 \pm 1,4
COL MS+ N	0,0891275 \pm 0,002	0,01049375 \pm 0,0034	6,338 \pm 1,24
COL CL	0,0129 \pm 0,003	0,0013 \pm 0,0005	2,95 \pm 0,89
COL CL N	0,02686625 \pm 0,01	0,00312 \pm 0,0056	3,34 \pm 0,98
PDX MS-	0,007093 \pm 0,002	0,00128 \pm 0,00017	1,2 \pm 0,76
PDX MS- N	0,01637 \pm 0,0032	0,00164 \pm 0,0008	1 \pm 0,23
PDX MS+	0,01921 \pm 0,01	0,00242 \pm 0,0001	5,35 \pm 1,79

PDX MS+ N 0,02712±0,015 0,004684±0,0006 4±1,3

Tuz stresine maruz bırakıldığında Col 'un nispi büyüme oranı , yaş ve kuru ağırlıklarındaki azalma , pdx 1.3 'ten %80 oranında daha az olduğu görülmektedir. Ortama B6 vitamini ilave edildiğinde Col ve pdx 1.3 arasındaki farkın %10 olduğu görülmektedir. B6 vitamini sentezini inhibe eden bir inhibitör olan klomazon uygulanan Col bitkilerinin büyüme parametrelerinde ise tuz stresi sonucu %48 oranında bir azalma mevcuttur.

Şekil 12. Kontrol ve 100 mM NaCl stresi altındaki Columbia (Col) bitkileri (A), .Kontrol ve 100 mM NaCl stresi altındaki B6 vitamini uygulanmış Columbia (Col) bitkileri

Şekil 13 . Kontrol ve 100 mM NaCl stresi altındaki pdx1.3 bitkileri (A), Kontrol ve 100 mM NaCl stresi altındaki B6 vitamini uygulanmış pdx1.3 bitkileri

Şekil 14. Columbia ve pdx1.3 bitkilerinin karşılaştırılması

3.2 Bağıl Su İçeriği (RWC)

Bitki bağıl su içeriğinde B6 uygulamasına ve tuz uygulamasına bağıl olarak oluşan değişimler aşağıdaki Şekil 14'de gösterilmektedir.

Yaprak bağıl su içeriğinde uygulamalara bağıl olarak Arabidopsis thaliana, yabancı tip Columbia ve mutandı Pdx1.3 fidelerinde meydana gelen değişimler şekil de gösterilmiştir.

Şekil 14 . Tuz stresi uygulanan Arabidopsis thaliana , Columbia ve pdx 1.3 mutant fidelerinin yaprak bağıl su içeriği . Sütunlar üzerindeki aynı harfler aynı ekotip içinde istatistiksel bakımdan farklı olmayan değerleri göstermektedir. ($P < 0,05$) .Sütunlardaki hata çubukları ortalama \pm standart hatayı (S.E.) göstermektedir. (n=6)

Tuz stresi pdx 1.3 mutandında %40,18 iken Columbia'da ise %26,32 azalmaya neden olmuştur. B6 vitamini uygulaması sonucu Pdx 1.3'de %22,22, Columbia'da %19,61 oranında azalma gözlenmiştir. Klomazon uygulaması yapılan Columbia'da ise tuz stresi sonucunda bağıl su içeriğinde %35,14 oranında azalma gerçekleşmiştir.

3.3 Yaprak Ozmotik Potansiyel

Arabidopsis thaliana yabancı tip Columbia ve mutant Pdx 1.3 fidelerinin , uygulanan 100mM tuz stresine bağıl olarak yaprak ozmotik potansiyelindeki değişmeler aşağıdaki şekil 15'de verilmektedir.

Tuz stresi pdx 1.3 mutantının ozmotik potansiyelinde %31,75, Columbia'da ise %10,51 oranında azalmaya neden olmuştur. B6 vitamini uygulaması sonucu Pdx1.3'de %38, Columbia'da %20 oranında azalma gözlenmiştir. Klomazon uygulaması yapılan Columbia'da ise tuz stresi sonucunda ozmotik potansiyelinde %16,79 oranında azalma gerçekleşmiştir.

Şekil 15. 100mM NaCl uygulanan Arabidopsis thaliana, yabani tip Columbia ve mutanıtı Pdx 1.3 fidelerinin ozmotik potansiyel değışimleri (1,COL C; 2,COL NaCl; 3,COL+B6; 4,COL B6+ NaCl; 5,COL CL; 6,COL CL NaCl; 7,PDX C; 8,PDX NaCl; 9,PDX+B6; 10,PDX B6+ NaCl) Sütunlar üzerindeki aynı harfler aynı ekotip içinde istatistiksel bakımdan farklı olmayan değeri göstermektedir. (P<0,05) .Sütunlardaki hata çubukları ortalama \pm standart hatayı (S.E.) göstermektedir.(n=6)

3.4Antioksidant Enzim Aktivite Sonuçları

3.4.1 Süperoksit dismutaz (SOD) İzoenzim Aktivite Sonuçları

SOD enzimine ait elektroforetik ayırmada 6 farklı SOD izozimi tespit edilmiştir. Bu izozimlerden 3 tanesi KCN ve H₂O₂ 'den etkilenmemelerinden dolayı Mn-SOD olarak belirlenmiş ve bu izoenzimler jel de gösterdikleri hareket pozisyonlarına göre sırasıyla Mn-SOD1 , Mn-SOD2 , Mn-SOD3 şeklinde tanımlanmıştır. Diğer bandlardan biri ise H₂O₂'e gösterdikleri duyarlılık ve KCN'ye gösterdikleri dayanıklılık nedeniyle Fe-SOD1 şeklinde tanımlanmıştır. Diğer 3 bant ise Cu/Zn-SOD olarak belirlenmiştir ve Cu/Zn-SOD1, Cu/Zn-SOD2 ve Cu/Zn-SOD3 olarak tanımlanmıştır. Tanımlanan her bir SOD izozimine ait densiyometrik analiz Çizelge 7'de verilmiştir.

B6 uygulanan Col ve pdx1.3 bitkilerine stres uygulanması sonucu temel SOD aktivitelerinin %7 oranında arttığı tespit edilmiştir. Col ve Pdx1.3 control gruplarının temel SOD aktiviteleri birbirine benzerdir her iki grupta da Mn-SOD2, total SOD aktivitesinin %55'ini oluşturduğu görülmektedir. B6 uygulaması yapılan gruplarda Mn-SOD1 izoenzimi görülmemektedir. Tuz stresi altında B6 vitamini inhibitörü, klomazon, uygulanan Col gruplarında toplam SOD aktivitesinin en yüksek olduğu görülmüştür ve ilk kez bu grupta Cu/Zn-SOD3 izoenzimi tanımlanmıştır.

Çizelge 7. Arabidopsis thaliana, yabani tip Columbia ve mutanıtı Pdx 1.3 fidelerinin 100mM tuz stresine bağılı olarak SOD aktiviteleri. Bölmeler üzerindeki aynı harfler aynı ekotip içinde istatistiksel bakımdan farklı olmayan değeri göstermektedir. (P<0,05) .

	Mn-SOD1	Mn-SOD2	Fe-SOD1	Cu/Zn-SOD1	Cu/Zn-SOD2
	Cu/Zn-SOD3	Σ Aktivite(u)			
COL C0,	3876u \pm 0,12a	0,731u \pm 0,02a	0,2486u \pm 0,02a		
	1,367				
COL NaCl	0,6139u \pm 0,01b	0,9719u \pm 0,02d		0,4168u \pm 0,02d	
	0,2227u \pm 0,02a	2,2254			
+B6	0,8798u \pm 0,02c	0,2485u \pm 0,02a			1,1283
B6+NaCl		1,1097u \pm 0,04d	0,4646u \pm 0,04e		
	1,5743				
CL	0,8405u \pm 0,01b	0,4665u \pm 0,02e			1,3069
CL NaCl	0,8154u \pm 0,02d	1,0802u \pm 0,02d		0,4067u \pm 0,01d	
	0,7088u \pm 0,02a	0,3452u \pm 0,01b	0,1443u \pm 0,02	3,5006	

PDX C 1,3413	0,8355u±0,02b	0,3167u±0,02c	0,189u±0,02b
PDX NaCl 2,4082	0,7887u±0,01c	1,3173u±0,02e	0,3022u±0,01c
+B6	0,8686u±0,02c	0,1989u±0,02b	1,0674
B6+NaCl 1,2756	0,9373u±0,04d	0,3383u±0,04c	

Şekil 16 . Arabidopsis thaliana, yabancı tip Columbia ve mutanı Pdx 1.3 fidelerinin

100mM tuz stresine bağlı olarak SOD izozimlerine ayrımı .

3.4.2 Katalaz (CAT) Enzim/İzoenzim Aktivite Sonuçları

Arabidopsis thaliana yabancı tip Columbia ve mutant Pdx 1.3 fidelerinin, uygulanan 100mM tuz stresine bağlı olarak katalaz aktivitesindeki değişimler aşağıdaki şekil 16' da verilmektedir.

Col'un temel CAT aktivite seviyesinin pdx1.3 mutantlarından daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Tuz stresi, pdx1.3'ün CAT aktivitesinde %22.2, Col'da ise %45.45 oranında bir artışa neden olmuştur. B6 uygulaması her iki ekotipinde temel CAT aktivite seviyesini arttırmıştır. B6 uygulaması (B6+NaCl) tuz stresine maruz kalmış pdx1.3 ve Columbia'nın CAT aktivitelerini farklı şekillerde etkilemiştir.

B6 uygulamasıyla stres altındaki Col'un CAT aktivitesi %5.88 artarken pdx 1.3'ün aktivitesi değişmemiştir. B6 sentezini inhibe etmek için dışarıdan klomazon uygulanan Col bitkilerinin CAT aktivitesi hem kontrol hem de stresli gruplarda artmıştır.

Çizelge 8. Arabidopsis thaliana, yabancı tip Columbia ve mutanı Pdx 1.3 fidelerinin 100mM tuz stresine bağlı olarak CAT aktiviteleri. Bölmeler

üzerindeki aynı harfler aynı ekotip içinde istatistiksel bakımdan farklı olmayan değerleri göstermektedir. ($P < 0,05$).

CAT1	CAT2	CAT3	CAT4	CAT5	Σ aktivite(u)
COL C	0,4777u±0,005a		0,964u±0,01a		1,4414
COL NaCl	0,524u±0,01c		1,0294u±0,01b		1,5534
+B6	0,5125u±0,006c		1,006u±0,01b		1,5187
B6+NaCl	0,5523u±0,008d		1,29u±0,01d		1,8425
CL	0,4933u±0,006b		1,1590u±0,01c		1,6522
CL NaCl	0,6262u±0,02e		1,1978u±0,85c		0,2381u±0,004a
	0,0392u±0,004a		2,1014		
PDX C	0,4478u±0,006b		1,0951u±0,012b		0,133u±0,005a
	1,6759				
PDX NaCl	0,481u±0,006b		1,351u±0,05e		1,8312
+B6	0,481u±0,006b		1,3623u±0,012e		1,8432
B6+NaCl	0,3144u±0,011		1,1785u±0,02c		
	1,4929				

Şekil 17. Arabidopsis thaliana, yabani tip Columbia ve mutanı Pdx 1.3 fidelerinin 100mM tuz stresine bağlı olarak CAT izozimlerine ayrımı .

Şekil 18. Arabidopsis thaliana, Columbia ve mutant pdx1.3 fidelerinde CAT aktivitesi. Sütunlar üzerindeki aynı harfler aynı ekotip içinde istatistiksel

bakımdan farklı olmayan değerleri göstermektedir. ($P<0,05$) .Sütunlardaki hata çubukları ortalama \pm standart hatayı (S.E.) göstermektedir.($n=6$)

Elektroforetik ayırmada 5 farklı CAT izozimi tespit edilmiştir ve bu enzimler jeldeki mobilite farklarına göre CAT1, CAT2, CAT3, CAT4 ve CAT5 olarak tanımlanmıştır (Şekil.17) . Columbia ve pdx1.3'ün bütün gruplarında CAT1 ve CAT2 bandı görülmektedir. Yalnızca klomazon ve tuz stresi uygulanan Col grubunda CAT3 ve CAT4 bantları, pdx1.3 kontrol grubunda ise CAT5 bandı görülmektedir. Toplam CAT izozim aktivitesi en fazla Klomazon ve tuz stresi uygulanan Col grubunda görülmüştür. Col ve pdx1.3'ün tüm gruplarında CAT2 izozimi, CAT1'den daha yüksektir. Tuz stresi altında B6 vitamini inhibitörü, klomazon, uygulanan Col gruplarında CAT2 izozimi toplam aktivitenin %57'sini oluşturduğu görülmüştür.

3.4.3 Peroksidaz (POX) Enzim/İzoenzim Aktivite Sonuçları

Arabidopsis thaliana, yabani tip (Columbia) ve mutant pdx 1.3 gruplarındaki peroksidaz (POX) aktivitesinin sonuçları şekil 17'de gösterilmektedir.

Şekil 19. Arabidopsis thaliana, Columbia ve mutant pdx1.3 fidelerinde POX aktivitesi. Sütunlar üzerindeki aynı harfler aynı ekotip içinde istatistiksel bakımdan farklı olmayan değerleri göstermektedir. ($P<0,05$) .Sütunlardaki hata çubukları ortalama \pm standart hatayı (S.E.) göstermektedir.($n=6$)

Col'un temel POX aktivite seviyesinin pdx1.3 mutantlarından daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Tuz stresi, pdx 1.3'ün POX aktivitesinde 4.8%, Col'da ise %21.15 oranında bir artışa neden olmuştur. B6 uygulaması her iki ekotipinde hem temel POX hem de stres bağlı aktivite seviyesini arttırmıştır. B6 uygulaması (B6+NaCl) tuz stresine maruz kalmış pdx1.3 ve Columbia'nın POX aktivitelerini

farklı şekillerde etkilemiştir. B6 uygulamasıyla stres altındaki Col'un POX aktivitesi % 7,11 azalırken pdx1.3'ün aktivitesi % 27,59 oranında artmıştır. B6 sentezini inhibe etmek için dışarıdan Clomazon uygulanan Col bitkilerinin POX aktivitesi hem kontrol hem de stresli grupta belirgin oranda azalmıştır. B6 sentezini inhibe etmek için dışarıdan Clomazon uygulanan Col bitkilerinin POX aktivitesi, kontrol grubuna göre stresli grupta %21,18 oranında azalmıştır

Çizelge 9. Arabidopsis thaliana, yabani tip Columbia ve mutanti pdx 1.3 fidelerinin 100mM tuz stresine bağlı olarak POX aktiviteleri. Bölmeler üzerindeki aynı harfler aynı ekotip içinde istatistiksel bakımdan farklı olmayan değerleri göstermektedir. (P<0,05) .

	POX1	POX2	POX3	∑ aktivite(u)
COL C	0,4676u±0,01a		0,3831u±0,01a	0,850630004
COL NaCl	0,5211u±0,01e			0,521057042
COL+	0,4941u±0,01d		0,4798u±0,01d	0,3488u±0,02a
	1,32268326			
COL+NaCl	0,5424u±0,01e		0,4345u±0,01d	0,3465u±0,2a
	1,323381541			
COL CL	0,3721u±0,09b		0,5202u±0,01e	0,892309602
COL CL N	0,5051u±0,01d		0,5434u±0,01f	0,1591u±0,01c
	1,207567811			
PDX C	0,4242u±0,01c		0,3326u±0,01c	0,756765564
PDX NaCl	0,3847u±0,01b		0,231u±0,02b	0,0859u±0,02b
	0,701221215			
PDX+	0,4304u±0,01c		0,3839u±0,02a	0,814381478
PDX+NaCl	0,4069u±0,01b		0,5729u±0,02g	0,979873999

Şekil 20 . Arabidopsis thaliana, yabani tip Columbia ve mutanti Pdx 1.3 fidelerinin

100mM tuz stresine bağlı olarak POX izozimlerine ayrımı

Elektroforetik ayırım sonucu 3 farklı POX izozimi tespit edilmiştir ve bu izozimler jeldeki mobilite farklarına göre POX1, POX2 ve POX3 olarak belirlenmiştir. 100mM tuz stresine maruz bırakılan Col grubu haricindeki tüm gruplarda POX1 ve POX2 bantları görülmüştür. Tuz stresi uygulanan Col bitkilerinde sadece POX1 bantı görülmektedir. POX3 ise B6 vitamini uygulanan Col ve Col+NaCl gruplarında, klomazon ve tuz uygulanan Col grubunda ve pdx1.3 kontrol grubunda görülmektedir.

Toplam POX izozim aktivitesi en fazla B6 vitamini uygulanan Col gruplarında görülmüştür. B6 vitamini uygulanan Col bitkilerinde en yüksek aktivite POX1 izoziminde görülmüştür, tuz stresine maruz bırakıldığında POX1 aktivitesi %37,36'dan %71,78'e yükseldiği görülmüştür.

3.4.4 Askorbat Peroksidaz (APX) Total Aktivite Sonuçları

Arabidopsis thaliana, yabani tip (Columbia) ve mutant Pdx1.3 gruplarındaki askorbat peroksidaz (APX) aktivitesinin sonuçları şekil 18'de gösterilmektedir.

Col'un temel APX aktivite seviyesinin pdx 1.3 mutantlarından daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Tuz stresi, pdx 1.3'ün APX aktivitesinde 16.6% oranında azalmaya, Col'da ise %7.85 oranında bir artışa neden olmuştur. B6 uygulaması her iki ekotipinde hem temel APOX hem de stres bağlı aktivite seviyesini arttırmıştır. B6 uygulaması (B6+NaCl) tuz stresine maruz kalmış pdx 1.3 ve Columbia'nın APOX aktivitelerini benzer şekillerde etkilemiştir. B6 uygulamasıyla stres altındaki pdx1.3 APX aktivitesi 56.46% artarken Col'un aktivitesi %19 artmıştır. B6 sentezini inhibe etmek için dışarıdan Clomazon uygulanan Col bitkilerinin APX aktivitesi hem kontrol hem de stresli gruplarda belirgin oranda artmıştır, kontrol grubuna göre stresli grupta % 5,91 oranında artış görülmüştür.

Şekil 21. *Arabidopsis thaliana*, Columbia ve mutant Pdx1.3 fidelerinde APX aktivitesi. Sütunlar üzerindeki aynı harfler aynı ekotip içinde istatistiksel bakımdan farklı olmayan değerleri göstermektedir. ($P < 0,05$) .Sütunlardaki hata çubukları ortalama \pm standart hatayı (S.E.) göstermektedir. (n=6)

3.4.5 Glutatyon redüktaz (GR) Total Aktivite Sonuçları

Arabidopsis thaliana yabani tip (Columbia) ve mutant Pdx 1.3 gruplarındaki glutatyon redüktaz (GR) aktivitesinin sonuçları şekil 19'da gösterilmektedir.

Col'un temel GR aktivite seviyesinin pdx 1.3 mutantlarından fazla olduğu tespit edilmiştir. Tuz stresi, pdx 1.3'ün GR aktivitesinde %9,63 oranında azalma, Col'da ise %11,22 oranında bir artışa neden olmuştur.

Şekil 22. Arabidopsis thaliana, Columbia ve mutant Pdx1.3 fidelerinde GR aktivitesi. Sütunlar üzerindeki aynı harfler aynı ekotip içinde istatistiksel bakımdan farklı olmayan değerleri göstermektedir. ($P < 0,05$) .Sütunlardaki hata çubukları ortalama \pm standart hatayı (S.E.) göstermektedir.(n=6)

B6 uygulaması her iki ekotipinde temel GR aktivite seviyesini artırmıştır. B6 uygulaması (B6+NaCl) tuz stresine maruz kalmış pdx1.3 ve Columbia'nın GR aktivitelerini aynı şekilde etkilemiştir.

B6 uygulamasıyla stres altındaki Col'un GR aktivitesi % 14,04, pdx1.3'ün aktivitesi %1,95 oranında artmıştır. B6 sentezini inhibe etmek için dışarıdan Clomazon uygulanan Col bitkilerinin GR aktivitesi kontrol grubuna göre stresli grupta % 88,45 oranında artmıştır.

Tuz stresinin etkisiyle belirgin oranda azalan Asada-Halliwell yolunun iki enzimi askorbat peroksidaz ve glutasyon redüktaz enzimleri dışarıdan B6 vitaminin uygulanmasıyla stresin zararlı etkilerinden korunmuşlardır.

3.5 Lipid peroksidasyonu

Arabidopsis thaliana yabani tip Columbia (Col) ve B6- eksik mutantının (pdx1.3) lipid membranlarının peroksidasyonunda uygulama koşullarına bağlı olarak meydana gelen değişimler şekil 20'de gösterilmiştir.

pdx1.3 mutantlarının temel MDA seviyesinin Col'dan daha düşük olduğu görülmüştür. Tuz stresi, pdx1.3'ün lipid peroksidasyonunda %27'lik, Col'da ise sadece %12'lik bir artışa neden olmuştur.

B6 uygulaması her iki ekotipinde temel MDA seviyesini azaltmıştır. pdx 1.3 ve Columbia'nın B6+NaCl gruplarında lipid peroksidasyonu sadece NaCl uygulanmış gruplara göre daha az olduğu tespit edilmiştir. B6+NaCl gruplarının lipid peroksidasyon seviyeleri kontrol gruplarına göre Col'da %13 azalırken pdx 1.3'te %3.7 artmıştır.

B6 uygulaması stres altında lipid peroksidasyonunu azaltmıştır. B6 sentezini inhibe etmek için dışarıdan Clomazon uygulanan Col bitkilerinin MDA seviyesi, B6 miktarındaki azalmaya bağlı olarak, kontrol şartlarında %8,3 artarken stresli grupta %2,5 oranında artmıştır.

Şekil 23. Arabidopsis thaliana, Columbia ve mutant Pdx1.3 fidelerinde MDA miktarı . Sütunlar üzerindeki aynı harfler aynı ekotip içinde istatistiksel bakımdan farklı olmayan değerleri göstermektedir. ($P<0,05$) .Sütunlardaki hata çubukları ortalama \pm standart hatayı (S.E.) göstermektedir.(n=6)

3.6 Yapraklarda Hidrojen Peroksit (H₂O₂) Miktarı

Arabidopsis thaliana yabancı tip Columbia (Col) ve B6- eksik mutantının (pdx 1.3) H₂O₂ miktarında uygulama koşullarına bağlı olarak meydana gelen değişimler Şekil 21’de gösterilmiştir.

pdx 1.3 mutantlarının temel H₂O₂ miktarının Col’dan daha 21.4% daha düşük olduğu görülmüştür.

Tuz stresi, pdx1.3’ün H₂O₂ miktarında 2.18 kat artışa, Col’da ise 1.5 kat artışa neden olmuştur.

B6 uygulaması her iki ekotipinde temel H₂O₂ miktarında belirgin bir değişikliğe neden olmamıştır. pdx1.3 ve Columbia’nın B6+NaCl gruplarında H₂O₂ miktarı sadece NaCl uygulanmış gruplara göre azalmıştır. B6+NaCl gruplarının H₂O₂ miktarları kontrol gruplarına göre Col’da %26.6, pdx1.3’te ise %14.29 azalmıştır.

B6 uygulaması stres altında H₂O₂ miktarını azaltmıştır. B6 sentezini inhibe etmek için dışarıdan Clomazon uygulanan Col bitkilerinin H₂O₂ miktarı, B6 miktarındaki azalmaya bağlı olarak, kontrol şartlarında %23.36 artarken stresli grupta 16.27% oranında artmıştır.

Şekil 24. 48 saat NaCl uygulanan Arabidopsis thaliana, Columbia ve mutant Pdx 1.3 gruplarının hidrojen peroksit miktarlarındaki değişimler. Sütunlar üzerindeki aynı harfler aynı ekotip içinde istatistiksel bakımdan farklı olmayan değerleri

göstermektedir. ($P<0,05$) Sütunlardaki hata çubukları \pm standart hata (S.E) 'yı göstermektedir ($n=$).

3.7 HPLC İle Total B6 Vitamini Tayini

Uygulama koşullarına bağlı olarak *Arabidopsis thaliana* yabani tip Columbia (Col) ve B6- eksik mutantının (pdx 1.3) B6 vitamini miktarındaki meydana gelen değişimler Şekil 22 ve 23'de gösterilmiştir.

pdx1.3 mutantlarının temel B6 vitamini miktarının Col'dan %48,91 oranında daha düşük olduğu görülmüştür.

Tuz stresi, pdx 1.3'ün B6 vitamini içerisinde %33,33 azalırken, Col'da ise %34,79 artışa neden olmuştur. pdx1.3 ve Columbia'nın B6+NaCl gruplarında B6 vitamini miktarının NaCl uygulanmış gruba göre arttığı görülmüştür.

B6 sentezini inhibe etmek için dışarıdan klomazon uygulanan Col bitkilerinin B6 vitamini miktarı, kontrol şartlarında %65,94 azalırken stresli grupta % 73,24 oranında azalmıştır.

Şekil 25 . *Arabidopsis thaliana*, Columbia ve mutant Pdx1.3 fidelerinde toplam B6 vitamini miktarlarındaki değişimler. Sütunlar üzerindeki aynı harfler aynı ekotip içinde istatistiksel bakımdan farklı olmayan değerleri göstermektedir. ($P<0,05$) Sütunlardaki hata çubukları \pm standart hata (S.E) 'yı göstermektedir ($n=6$) .

Şekil 26 48 saat NaCl uygulanan *Arabidopsis thaliana*, Columbia ve mutant Pdx1.3 fidelerinde toplam B6 vitamini miktarlarındaki değişimler . Sütunlar üzerindeki aynı harfler aynı ekotip içinde istatistiksel bakımdan farklı olmayan değerleri göstermektedir. ($P < 0,05$) Sütunlardaki hata çubukları \pm standart hata (S.E) 'yı göstermektedir (n=6)

5. TARTIŞMA

Tüm organizmalar için gerekli olduğu bilinen B6 vitamininin (Schneider et al, 2000; Chen and Xiong, 2005) üç farklı formu bulunmaktadır: pridoksin, pridoksal, pridoksamin. Vitamin B6'nın dekarboksilasyon, deaminasyon ve transsülfürasyon gibi metabolik olaylarda bulunan enzimler için kofaktör olarak görev aldığı bilinmektedir (Drewke and Leistner, 2001 ; Denslow et al., 2005). Bununla birlikte B6 vitamininin, aminoasit, karbonhidrat ve lipid metabolizmasında rol aldığı da bilinmektedir (Drewke and Leistner, 2001).

Literatürde, bitkilerde B6 vitamininin oluşumu için deoksi-D-ksiloz-5-fosfat (DXP) ve 4-fosfo-hidroksi-L-treoninin prekürsör olduğu bilinmektedir (Esteves et al, 2001; Guavera-Garcia et al, 2005). Canlılarda, B6 homeostazisinin devamlılığı, hücre içerisinde bu vitaminin kofaktör ya da antioksidant olarak fonksiyonlarını denge içerisinde sürdürmesine bağlıdır.

B6 vitamin homeostazisinin nasıl gerçekleştiği bitkilerde henüz tam olarak kesinlik kazanmamış olsa da de novo (DXP-bağımlı ve DXP-bağımsız) ya da/ve salvaj yolları biyosenteziyle ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Shi and Zhu, 2002; Tambasco-Studart et al, 2005). Vitamin B6 biyosentezinin salvaj yolu birçok organizmada açığa kavuşturulmasına rağmen daha çok kullanılan de novo biyosentez yolu ile ilgili araştırmalar son zamanlarda yapılmaya başlanmıştır (Bunns et al, 2005; Tambasco-Studart et al, 2005).

Arabidopsis thaliana'da sitoplazmik üç PDX1 gen homoloğu (PDX1.1, PDX1.2, PDX1.3) ve bir PDX2 geni bulunmaktadır. PDX1.1 ve PDX1.3. *Arabidopsis thaliana*'nın rozet yapraklarında yüksek oranda ifade olurken, PDX1.2 düşük seviyede ifade olmaktadır. Homozigot olan pdx1.1, pdx1.3 ya da pdx2 fidelerinde de novo biyosentez yolu çalışmadığında salvaj yolunun yeterli olmadığı görülmüştür. Bu, de novo yolunun bitki canlılığı için önemli olduğunu ve B6 vitamininin homeostazisinin devamlılığında baskın bir rol oynadığını göstermektedir.

B6 biyosentez yollarından biri olan DXP-bağlı yolun baskılandığı pdx1.3 fidelerinde PDX1 proteininin üretilmemesi çiçeklenme de gecikmeye, klorofil içeriğinde azalmaya ve kök büyümesinde inhibisyona neden olmaktadır (Tambasco-Studart et al, 2005; Wagner et al, 2006). PDX1 mutantının fenotipi olan engellenmiş kök büyümesi, yaprak sararması ve strese duyarlılık yaşlı bitkilerde daha çok göze çarpmaktadır. Ancak olgun pdx1.3 mutantları yabancı tip bitkilere benzer şekilde tohum üretmektedir ve embriyo gelişimi, tohum dormansisi ya da çimlenmesinde hiçbir kusur bulunmamaktadır (Sivasubramaniam et al, 1995).

Benzer olarak bu çalışmada da pdx1.3 mutantlarının çimlenme yüzdesi yabancı tiptekinden farklılık göstermemiştir. Diğer yandan Şekil 23'te görüldüğü gibi kısa kök ve gövde boyunda azalma ve yapraklarda renk solması gözlenmiştir. Bu

çalışmada B6 inhibitörü olan klomazonun yabancı tiplere uygulanması sonucunda benzer fenotipik özelliklerin gözlenmesi bu sonuçları desteklemektedir.

B6 vitamininin farklı bitkiler üzerinde anti-stres özelliğinin bulunduğu görülmüştür (Titiz et al, 2006). Örneğin B6 vitaminin yüksek ışık, kuraklık, soğuk stresi, ozon, UV-B ve tuz stresi altında bu vitaminin sentezinden sorumlu genlerin transkrip seviyelerinin arttığı rapor edilmiştir (Denslow et al, 2007). Tüm bu bulgulara rağmen bitkilerde B6 vitamininin bitkilerin stres toleransını nasıl arttırdığına dair fizyolojik mekanizmalar hala tam olarak aydınlatılamamıştır.

Normal koşullar altında reaktif oksijen türlerinin üretimi düşük düzeyde tutulmasına rağmen, kuraklık ve su kıtlığı, tuz stresi, üşüme, yüksek sıcaklık şoku, ağır metaller, UV radyasyon, ozon, mekanik stres, besin eksikliği, patojen saldırı ve yüksek ışık stresi gibi pek çok stres faktörü, hücredeki dengeyi bozarak, ROS'ların artmasına neden olur (Mittler, 2002).

Hücresinin herhangi bir organelinde ROS'ların üretimi ve antioksidan savunma sistemi arasındaki dengenin bozulması hücrenin zarar görmesiyle sonuçlanan oksidatif strese neden olmaktadır (Mittler, 2002; Scandalios, 2002).

Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda bitki türlerinin veya bir bitki türüne ait kültürlerin tuz toleransı/duyarlılığının, bu bitkilerin antioksidan yanıtlarıyla yakından ilişkili olduğu ortaya konulmuştur. SOD, CAT, APX, POX ve GR gibi antioksidan enzimlerinin aktivitelerinin ve bazı metabolitlerin tuz stresi koşullarında arttığı (Hernandez et al, 1993,1995,2000) ve toleranslı türlerde, duyarlılara göre daha yüksek aktivitenin görüldüğü bildirilmiştir (Bor ve ark., 2003; Demiral ve Türkan, 2005; Sekmen ve ark., 2007; Seçkin ve ark., 2010). Yukarıda da bahsedildiği gibi B6 vitamini, bitki büyüme gelişiminin çeşitli evrelerinde ve strese verilen yanıtlarda rol almaktadır.

Tuzluluk bitki büyüme ve gelişimini sınırlayan en önemli çevresel etmenlerden biridir. Tuz stresi, bitki büyümesinin inhibisyonuna sebep olur ve bunun yanında bitki yapraklarında, köklerinde, gövde yaş ve kuru ağırlıklarında da ciddi bir azalmaya sebep olduğu bilinmektedir (Hernandez et al, 1995).

Çalışmamızda tuz stresine maruz kalan pdx1.3 bitkilerinde nispi büyüme oranı %20 azalırken Col bitkilerinde bu oranın sadece %14 oranında olduğu görülmüştür. Bu sonuçlara göre tuz stresi altında Columbia fidelerinin, nispi büyüme oranındaki değişimin pdx 1.3 fidelerine göre daha az olduğu görülmüştür.

Ozmotik potansiyeldeki azalmanın, apoplastik eriyiklerin birikiminden çok hücre hacminin azalmasından kaynaklandığı belirtilmektedir (Nepomuceno et al, 1998). Strese bağlı olarak gelişen ozmotik düzenlemenin, ozmotik potansiyelin düşmesine neden olduğu düşünülmektedir (Hussain ve ark., 2009).

Tuz ve kuraklık stresine gösterilen tepkilerden birisi de yaprak bağıl su içeriğinde (RWC) ve su potansiyelinde görülen azalmadır. Çalışmamızda tuz stresi altında pdx 1.3'ün ozmotik potansiyelinin, Col'a göre %13 daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. B6 uygulaması yapıldığında ise pdx1.3'de %2,14 oranında, Col'da ise %2,44 oranında artış olduğu görülmüştür (Şekil15). Tuz stresi altında nispi su içeriğindeki değişimlerin daha yüksek oranlarda meydana geldiği görülmüştür. Tuz uygulaması yapılan Col bitkilerinde azalma %26,32 oranında iken pdx1.3 bitkilerinde bu oran %40,18'e çıkmaktadır. B6 vitamini uygulaması sonucu

pdx1.3'de %22,22, Columbia'da %19,61 oranında azalma gözlenmiştir. B6 vitamini eklenmesi Col ve pdx1.3 bitkilerinin nispi su içeriklerinin artmasını sağlamıştır. Klomazon uygulaması yapılan Columbia'da ise tuz stresi sonucunda bağıl su içeriğinde %35,14 oranında azalma gerçekleşmiştir (Şekil14).

Kuraklık, donma ve tuzluluk gibi abiyotik streslerin, bitki hücrelerinin faydalanacağı su miktarını düşürmeleri gibi ortak bir yönü vardır. Mevcut su miktarındaki bu azalma, su potansiyelindeki azalma olarak tabir edilir. Bitkiler su potansiyelindeki düşmeye ve buna neden olan streslere karşı, su alınımını ve kaybını değiştirerek direnç gösterirler. Düşük su potansiyelinden kaçınmak için bitkiler, çeşitli bileşikler biriktirir, düşük su potansiyelinin neden olduğu dehidrasyondan korunmak için hücre çeperinin yapısını değiştirir ve azalan su içeriğine karşı koyabilmek için zarar görmesini önleyen veya zararı tamir eden bazı proteinler sentezlerler (Verslues ve ark., 2006).

Mikrobiyolojik yöntemler kullanılarak Tambasco-Studart et al., (2005) Arabidopsis cla-1 mutantında B6 vitamini miktarını ölçmüşlerdir. CLA-1, DXS enzimini kodlamaktadır (Estevez et al, 2000; Mandel et al, 1996). Buna göre, cla-1 mutant bitkilerinin vitamin miktarının, yabani tip bitkilerle karşılaştırıldıklarında azaldığı görülmüştür. B6 vitamin biyosentezinin bu proteinin yokluğunda devam edebildiği netlik kazanmıştır.

Ek olarak, dışarıdan B6 vitamini verilmeden çimlenen cla-1 tohumlarının yüzdesinin, yabani tiple hemen hemen aynı olduğu görülmektedir (Tambasco-Studart et al, 2005). Arabidopsis'te, DXP sentaz enzimini kodlayan CLA-1 ile yakın ilişkili 2 gen daha var olduğu öne sürülmektedir fakat bunların henüz işlevsel analizleri yapılmamıştır. Bitkilere, DXP sentaz enzimini baskılayan bir ajan olan klomazon (Zeidler et al., 2000) muamelesi yapıldığında B6 vitamini içeriğinde ciddi bir düşüş saptanmıştır (Şekil11).

Çalışmamızda, daha önce yapılan çalışmalara benzer olarak Columbia kontrol grubuna klomazon uygulaması yapılması sonucu B6 vitamin miktarında azalma görülmüştür. Bu sonuç, Tambasco-Studart et al. (2005)'un sonuçlarıyla uyumludur. Ve bu düşüş bitkilerde B6 vitamininin biyosentezinin iki farklı yolla yapılmasıyla ilişkili olabileceğini göstermektedir.

Bitkilerde B6 vitamininin birçok metabolik olayda çoklu rol oynuyor olabileceği hipotezi gittikçe kesinlik kazanmaktadır. B6 vitamininin kofaktör olma özelliğinden dolayı normal hücresel fonksiyonlar için gerekli olduğu ispatlanmıştır. B6 vitamininin kofaktör formları olan PLP ve PMF birçok metabolik reaksiyon için gereklidir. Bununla birlikte bitkilerde B6 vitamininin antioksidant olma özelliği gösterdiği bilinmektedir (Ehrenschaft et al,1999).

Örneğin; Arabidopsis'te pridoksin vitamini ilave edildiğinde singlet oksijenin indüklediği hücre ölümünü azaltmakta olduğu (Danon et al, 2005) ve bir başka çalışmada Nicotiana tabacum da B6 vitamini ROS'a bağlı patojen savunma yanıtlarını geciktirmekte olduğu belirlenmiştir (Denslow et al, 2005).

Bununla birlikte artmış ROS süpürme kapasitesinin stres toleransının artmasıyla ilişkili olduğu öne sürülmüştür (Xiong and Zhu,2002; Yamamoto et al, 2005).

Bitkinin strese karşı toleransı, stres esnasında oluşan ROS'ların zararlı etkilerini uzaklaştırabilme kapasitesiyle belirlenmektedir (Ghassemian et al, 2008).

SOD , CAT , APX , POX ve GR gibi antioksidan enzimlerin aktiviteleri ile bazı metabolitlerin tuz stresi koşullarında arttığı (Hernandez et al., 1993,1995) ve duyarlılara göre dirençli türlerde daha yüksek aktivite görüldüğü tespit edilmiştir (Demiral ve ark. ,2004-2005; Neto et al., 2006; Sairam et al.,2005). Çalışmamızda APX, GR ve POX aktivitelerinin arttığı saptanmıştır.

Oksidatif stres altında ROS'ların, başlıca mitokondri ve kloroplastta elektron taşıma sisteminde hasara neden olduğu bilinmektedir (Hamilton and Heckathorn, 2001).

Süperoksit dismutaz (SOD), hücreyi oksidatif zarardan koruyan en temel enzimlerden birisidir (Alsher et al, 2002). Ökaryotik hücrelere üç temel izoformu bulunur, bunlar mitokondride ve peroksizomlarda yer alan Mn-SOD, kloroplast, sitoplazma ve hücre dışı boşlukta bulunan Cu/Zn-SOD ve plastidlerde bulunan Fe-SOD izozimleridir. Bugüne kadar Arabidopsis'te 3 tanesi metal kofaktör olarak demir-bağımlı, 3 tanesi bakır içeren ve 1 adet mangan-bağımlı SOD olmak üzere toplam 7 SOD tanımlanmıştır (Kliebenstein et al., 1998) fakat Arabidopsis'te bulunan SOD'ların asıl sayısı ve yapısı hala tam olarak aydınlatılmamıştır. Tuz stresine maruz bırakılan bitkilerde Mn- ve Cu/Zn-SOD aktivitelerinin arttığı ve hatta H₂O₂ seviyelerinin yükseldiği görülmüştür (Hernandez et al, 1995).

Çalışmamızda 100 mM tuz stresine maruz bırakılan Columbia'nın tüm izozimlerin aktiviteleri kontrole göre belirgin oranda artmıştır. Tuz stresine bağlı olarak Col'un diğer gruplarında gözlenmeyen Cu/Zn-SOD2 izozimi belirlenmiştir Benzer olarak tuz stresine maruz kalan pdx 1.3 mutantlarının da SOD aktivitesi tüm izozim aktivitelerinde meydana gelen artışa bağlı olarak artmıştır. Ancak Col+NaCl grubundan farklı olarak mutantın grubunda yeni bir izozim (Mn-SOD1) belirlenmiştir. Diğer yandan Col da tuz stresiyle ilk defa gözlenen Cu/Zn-SOD izozimi tuz stresi altında pdx 1.3 mutantlarında tamamen kaybolmuştur. Tuz stresi altındaki iki kültürün en belirgin farklılıklarından bir diğeri Col'un stres altında özellikle Fe-SOD aktivitesini iki katına çıkarması pdx 1.3. mutantların ise Mn-SOD izoenzimlerinin aktivitelerini arttırmasıdır.

Tuz stresi altında Col'da özellikle Mn-SOD'un pdx 1.3. te ise özellikle Fe-SOD'un artışı sırasıyla mitokondri ve kloroplastlarda oluşturulan süperoksit radikal oluşumuyla ilgili olabileceği düşünülmektedir. Diğer yandan dışarıdan uygulan B6 vitamini heriki kültürde SOD aktivitesini kontrol grubuna göre arttırmış ancak bu artışın oranının B6 uygulanmayan gruplardan çok daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Bu durumda B6 vitaminin SOD aktivitesini stres altında kontrol grubu seviyesine yaklaştırdığı söylenebilmektedir. B6 vitamin uygulaması pdx 1.3. mutantlarında Fe-SOD miktarını belirgin oranda arttırırken Col'da hem Mn-SOD hem de Fe-SOD aktivitelerini arttırmıştır. Bu durum, B6 vitaminin pdx 1.3 mutantlarının özellikle kloroplastlarındaki süperoksit radikallerinin süpürülmesinde Col da ise hem mitokondri hem de kloroplastlardaki radikal süpürülmesinde etkili olabileceğini işaret etmektedir.

Başlıca peroksizomlarda bulunan CAT enzimi , stres süresince oluşan H₂O₂ 'nin süpürülmesinde görev yapar (Willekens et al., 1997). Aktif oksijen türlerine karşı oluşturulmuş ikinci savunma hattıdır. Bitkiler gen familyalarının üyeleri tarafından kodlanan birden fazla CAT izozimine sahiptirler. 32 aminoasit içeren

gen bankasından elde edilen katalaz sekansları ile yapılan filogenetik çalışmalar (Willekens et al, 1994), bitkilerde 3 temel CAT sınıfı olduğunu göstermiştir. Örneğin, tütün ve mısır 3 CAT izozimi içermektedir. Arabidopsiste şimdiye kadar yapılan çalışmalarda katalazın alt birimlerini kolayan 3 gen ve en az 6 adet katalaz izozimi tanımlanmıştır (Zhong and McClung, 1996).

CAT aktivitesi tuz stresi, sıcaklık ve soğuk stresi ile azalabilir çünkü çevresel streslerle uyarılan ikincil oksidatif strese karşı bitkinin cevabı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Kloroplastlarda CAT'ın yokluğu Kalvin Döngüsündeki tiol bağlı enzimlere zarar verebilir. Ayrıca CAT'ın hidrojen peroksida karşı ilgisi diğer enzimlere göre daha düşüktür.

Çalışmamızda CAT aktivitesinin temel seviyesinin Columbia fidelerinde, pdx 1.3 fidelerinden daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Tuz stresiyle birlikte pdx 1.3'ün CAT aktivitesi %22.2, Col'un ise %45.45 artmıştır. B6 uygulaması, total CAT aktivitesinde Col'da %43,47 oranında artışa neden olmuştur. Ancak Col'nın aksine, dışarıdan uygulanan B6 vitamininin stres altındaki pdx 1.3. mutantlarının CAT aktivitesi üzerine belirgin bir etkisi gözlenmemiştir.

Elektroforetik ayırında 5 farklı CAT izozimi tespit edilmiştir (Şekil.17) . pdx1.3 kontrol grubunda diğer gruplardan farklı yeni bir CAT izozimi (CAT5) tanımlanmıştır. Col ve pdx1.3'ün tüm gruplarında CAT2 izoziminin, CAT1'den daha yüksek aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur.

Peroksidaz, bitki kloroplastlarında H₂O₂'yi savuşturan bir diğer enzimdir (Asada ve Takashi,1987) . Bunun yanısıra hücre çeperinin yapımında rol oynamaktadır. Ayrıca bitki savunma mekanizmalarında oksidatif strese karşı oluşturulan yanıtta görev aldığı bilinmektedir (Felton, 1995) .

Yapılan çalışmalarda bitkilerde POX aktivitesindeki artışın tuz stresinin neden olduğu oksidatif hasara karşı koruma sağladığı gözlemlenmiştir. Vitamin B6 uygulaması Col'daki POX enziminin temel aktivite düzeyini arttırdığını ve tuz stresi altında (B6+NaCl) daha fazla oranda ifade olmasına neden olduğu görülmüştür. Bu durum heriki ekotipin B6+NaCl grubunda, NaCl grubundan daha düşük seviyede H₂O₂ birikimine neden olmuş olabileceğini göstermektedir..

Elektroforetik ayırında 3 farklı POX izozimi tespit edilmiştir (Şekil). Col'da, POX izozim aktivitelerinin temel seviyesi, kontrol ve tuzlu ortam koşullarında pdx1.3'ten yüksek olduğu tespit edilmiştir. Stres altında Col'da özellikle POX1 izoziminin aktivitesi belirgin oranda artarken pdx 1.3 mutantında iki farklı izozim aktivitesinde artış gözlenmiştir (POX2 ve POX3). Vitamin B6 uygulamasıyla Col'da hem normal hem de stresli koşullar altında iki farklı izozim tanımlanmıştır (POX2 ve POX3). Strese maruz kalan Col'nın toplam POX aktivitesinde meydana gelen artış bu izozimlerin aktivitesindeki artışla uyumludur. B6 uygulanmış pdx1.3. mutantlarında ise stres altında POX 3 izozimine rastlanmamakla birlikte POX 1 izozimlerinin aktivitesinin kontrol grubuna göre belirgin oranda arttığı tespit edilmiştir.

APX enzimi, bitki hücrelerinin sitosolünde ve kloroplastlarda H₂O₂'nin yok edilmesini sağlayarak bitkinin oksidatif strese karşı savunmasında temel rolü oynamaktadır (Asada,1992) . Tuzluluk ve kuraklık gibi farklı biyotik streslerin APX aktivitesi üzerindeki etkisinin incelendiği birçok çalışmada APX aktivitesinde artış rapor edilmiştir (Mitler ve Zilinska,1993; Hernandez ve

ark,1995). Benzer olarak tütün kloroplastlarında APX ekspresyonundaki artışın bitkinin tuzluluğa toleransını artırdığı rapor edilmiştir (Badavi ve ark.,2004).

Çalışmamızda Col ve pdx 1.3 fidelerinde temel APX aktivite seviyelerinin çok farklı olmadığı görülmüştür. Tuz stresi uygulaması sonucu pdx 1.3'te APX aktivite seviyesinde %15 oranında azalma, Col'da ise %7 oranında artış tespit edilmiştir. B6 uygulaması her iki ekotipinde hem temel hem de stres bağlı APX aktivite seviyesini arttırmıştır.

Askorbat-glutasyon döngüsünün son enzimi olan GR, okside edilmiş glutasyonun NADPH'a bağlı indirgenmesini katalizler. GR, birçok bitkiyi oksidatif stresten koruyan önemli bir enzimdir (Foyer,1991) . Tuz stresi altında artan GR aktivitesindeki artışın tuzluluğa dirençli çeltik çeşidinde duyarlıdan daha fazla olduğu rapor edilmiştir (Demiral ve Türkan,2005).

Benzer şekilde çalışmamızda da Col'un temel GR aktivite seviyesinin pdx 1.3 mutantından daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Tuz stresiyle Col'un GR aktivitesi artmasına rağmen pdx1.3'ün azalmıştır. Ancak stres altında B6 uygulamasına bağlı olarak pdx1.3'te artış gösteren GR aktivitesi, NADP+/NADPH oranını arttırmış ve böylece fotosentetik elektron transport zincirinden gelen elektronları yakalayacak yeterli miktarda NADP+ sağlanmış olabilir (Jung, 2004). Böylece Haber-Weiss reaksiyonuyla oluşacak reaktif hidroksil radikalının oluşumu engellenir. Bu sonuçlar neden tuz stresinin B6 uygulanmış pdx1.3'ün lipid membranlarının peroksidasyona uğramazken B6 uygulanmayanların peroksidasyonundaki %41,30'luk artışı açıklamaktadır. Vitamin B6 uygulamasıyla pdx 1.3. mutantlarının POX, APX ve GR aktivitelerinin tuz stresi altında artmasıyla daha az oranda H₂O₂ biriktirdiği ve böylece lipid membranların peroksidasyonunun azalarak tuz stresi altında oluşan oksidatif hasardan bitkilerin korunduğu görülmektedir. Bu durumda pdx1.3'te tuz stresinin neden olduğu oksidatif hasarın özellikle askorbat-glutasyon döngüsü tarafından savuşturulduğu görülmektedir.

Çalışmamızda B6 eksikliği nedeniyle antioksidan savunma sisteminin verdiği bu farklı yanıtların bir B6 inhibitörü olan Klamozon uygulaması yapıldığında Col fidelerinde nasıl bir değişime neden olduğu araştırılmıştır. Böylece B6 eksik pdx1.3 ile yapılan denemeyi tamamlayıcı veriler elde edilmiştir. Col yabancı kültürlerin klamozonlu MS ortamında yetiştirilmesiyle tuz stresi altında 3 farklı Cu/Zn SOD izoenziminin belirlenmesine karşılık total SOD aktivitesi azalmış, CAT2 izoziminin aktivitesinin teşvikiyle ise total CAT aktivitesi (CAT2) artmıştır. APX aktivitesi stresle korunurken GR aktivitesi artmıştır. Ancak tüm bu enzimlerin artışına rağmen H₂O₂ miktarındaki artış, lipid peroksidasyon oranındaki artıştan da görüleceği gibi engellenememiştir.

Sonuç olarak, gerek B6 eksik mutanti pdx 1.3 gerekse inhibitör uygulamasıyla B6 vitamin miktarı azaltılmış Col, genel anlamda tuz stresine direnç gösterememişlerdir. Bunun aksine; tuz stresi altında B6 uygulanmış pdx1.3 mutantının, yaprak nispi su içeriğinin artması, POX, APX ve GR aktivitelerinin artması, H₂O₂ miktarının ve lipid peroksidasyon seviyesinin azalması vitamin B6'nın antioksidan savunma sistemi üzerindeki belirleyici etkisini ortaya koymaktadır.

Elde edilen bu bulguların, B6 vitaminin fizyolojik ve biyokimyasal etki mekanizmalarının aydınlatılması bakımından tarımsal teknolojilerin kullanıldığı

bitki biyolojisi, ıslah ve genetik mühendisliği alanlarında yapılacak çalışmalar için yol gösterici bir kaynak olacağı kanısındayız.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Ali, A.A. and Alqurainy, F., 2006, Activities of Antioxidants in Plants Under Environmental Stress. In: Motohashi N, editor. The Luteinprevention and Treatment for Diseases, India: Transworld Research Network, 187–256 p.
- Apel, K., and Hirt, H., 2004, ROS : Metabolism, Oxidative Stress and Signal Transduction, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55, 373-399 pp.
- Asada, K., 2006, Production and Scavenging of Reactive Oxygen Species in Chloroplasts and their functions, *Plant Physiology*, 141:391-396 pp.
- Asada, K., 1999, The Water-Water Cycle in Chloroplasts: Scavenging of Active Oxygens and Dissipation of Excess photons, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 50, 601-639 pp.
- Asada, K., 1994, Production And Action of Active Oxygen Species in Photosynthetic Tissues. In: Foyer and Mullineaux, Causes of Oxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants pp. 78-99 CRC Press, Boca Raton, FL.
- Ashraf, M., and Foolad, M. R., 2007, Roles of glycine Betaine and Proline in Improving Plant Abiotic Stress Resistance, *Environ. Exp. Bot.*, 59:206-216 pp.
- Ashraf, M., 2009, Biotechnological Approach of Improving Plant Salt Tolerance Using Antioxidants as Markers, *Biotechnology Advances* 27:84-93.
- Bradford, M.N., 1976, A Rapid and Sensitive Method for The Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing The Principle of Protein-Dye Binding , *Anal Biochem*, 72: 248-254.

Bowler, C., Van Camp, W., Van Montagu, M., and Inze, D., 1994 Superoxide Dismutases in Plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 13:199-218 pp.

Chinnusamy V, Jagendorf, A, Zhu, J-K, 2005, Understanding and Improving Salt Tolerance in Plants. *Crop. Sci.* 45: 437-448.

Corpas, F.J., Barroso, J. B., and Del Rio, L. A., 2001, Peroximoses as a Source of Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide Signal Molecules in Plant Cells., *Trends Plant Sci.*, 6:145-150 pp.

Cuin, T.A., Miller, A.J., Laurie, S.A., Leigh R.A., 2003, Potassium Activities in Cell Compartments of Salt-Grown Barley Leaves, *J Exp Bot*, 54:657-661.

Davies, W. J. And Zhang, J., 1991, Root Signals and The Regulation of The Growth and Development of Plants in Drying Soil, *Ann. Rev. Of Plant Physiol. And Plant Mol. Biol.*, 42:55-76 pp.

Demiral, T. and Türkan, I., 2004, Does Exogenous Glycinebetaine Affect Antioxidative System of Rice Seedlings Under NaCl Treatment, *J Plant Physiol*, 161(10): 1089-1100.

Demiral, T. and Türkan, I., 2005, Comparative Lipid Peroxidation, Antioxidant Defence Systems and Proline Content in Roots of Two Rice Cultivars Differing in Salt Tolerance, *Environ Exp Bot*, 53(3): 247-257.

El Nagggar, S. F. et al. Metabolism of Clomazone Herbicide in soybean *J. Agric. Food Chem.* 40, 880 – 883 (1992)

Farooq, M., Wahid, A., Basra, S. M. A. And Shahzad, I. , 2009

Improving Water Relations and Gas Exchange with Brassinosteroids in rice under drought stress, *J Agron. Crop Sci.*, 195:262-269 pp.

Ferhatoglu, Y. & Barrett M. Studies of Clomazone Mode of Action Pesticide *Biochem. Physiol.* 85, 7-14 (2005)

Foyer, C. H. and Mullineaux, (eds.) ,1994, Causes of Oxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants, CRC Press, Boca Raton, FL.

- Foyer, C.H. and Halliwell, B., 1976, The Presence of Glutathione and Glutathione Reductase in Chloroplasts: a Proposed Role in Ascorbic Acid Metabolism, *Planta*, 133: 21-25.
- Foyer, C.H. and Noctor, G., 2000, Oxygen Processing in Photosynthesis: Regulation and Signaling, *New Phytologist*, 146: 359-388.
- Foyer, C.H. and Noctor, G., 2003, Redox Sensing and Signaling Associated With Reactive Oxygen in Chloroplasts, Peroxisomes and Mitochondria, *Physiol Plant*, 119:355-364.
- Frugoli, J.A., Zhong, H.H., Nuccio, M.L., McCourt, P., McPeck, M.A., Thomas, T.L. and McClung, C.R., 1996, Catalase is Encoded by Multigene Family in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, *Plant Physiology*, 112(1): 327-336.
- Gomez, M., Hernandez, J.A., Jimenez, A., del-Rio, L.A. and Sevilla, F., 1999, Differential Response of Antioxidative System of Chloroplasts and Mitochondria to Long-Term NaCl Stress of Pea Plants, *Free Radic Res*, 31:11-18.
- Hernandez, J.A., Almansa, M.S., 2002, Short-Term Effects of Salt Stress on Antioxidant Systems and Leaf Water Relations of Pea Leaves, *Physiol Plant*, 115: 251-257.
- Hernández, J.A., Jiménez, A., Mullineaux, P. and Sevilla, F., 2000. Tolerance of Pea (*Pisum sativum* L.) to Long-Term Salt Stress Is Associated With Induction of Antioxidant Defences, *Plant Cell Environ*, 23: 853-862.
- Herzog, V., and Fahimi, H., 1973, Determination of the activity of peroxidase, *Anal. Biochem.*, 55:557-562 pp.
- Hu, X., Wang, W., Li, C., Zhang, J., Lin, F., Zhang, A., and Jiang, M., 2008, Cross-Talks Between Ca²⁺ / CaM and H₂O₂ in Abscisic Acid-Induced Antioxidant Defense in Leaves of Maize Plants Exposed to Water Stress, *Plant Growth Regul*, 55:183-198 pp.

Hu, X, Zhang, J., Lin, F., Zhang, A., and Jiang, M., 2006, Abscisic Acid is a Key Inducer of Hydrogen Peroxide Production in Leaves of Maize Plants Exposed to Water Stress, *Plant and Cell Physiology*, 1-26 pp.

Jaleel, C. A., Riadh, K., Gop., R., Manivannan, P., Ine's, J., Al-Juburi, H.J., Chang-Xing, Z., Hong-Bo, S., and Panneerselvam, R., 2009, Antioxidant Defence Responses: Physiological Plasticity in Higher Plants Under Abiotic Constraints, *Acta Physiol Plant*, 31:427-436 pp.

Jiang, M. Y., 1999, Generation of Hydroxyl Radicals and Its Relation to Cellular Oxidative Damage in Plants Subjected to Water Stress, *Acta Botanica Sinica*, 41(3):229-234 pp.

Jiang, M., and Zhang, J., 2003, Cross-Talk Between Calcium and Reactive Oxygen Species Originated from NADPH oxidase in Abscisic Acid-Induced antioxidant Defence in Leaves of Maize Seedlings, *Plant Cell Environ.*, 26:929-939 pp.

Jiang, M., and Zhang, J., 2001, Effect of Abscisic Acid on Active Oxygen Species, Antioxidative Defence System and Oxidative Damage in Leaves of Maize Seedlings, *Plant Cell Physiol.*, 42(11):1265-1273 pp.

Jiang, M., and Zhang, J., 2002, Water Stress-Induced Abscisic Acid Accumulation Triggers The Increased Generation of Reactive Oxygen Species and Up-Regulates the Activities of Antioxidant Enzymes in Maize Leaves, *J. Of Exp. Bot.*, 53:2401-2410 pp.

Jiang, Y., and Huang, B., 2001, Drought and Heat Stress Injury to Two Cool-Season Turfgrasses in Relation to Antioxidant Metabolisms and Lipid Peroxidation, *Crop Sci.* 41:436-442 pp.

Jimenez, A., Hernandez, J.a., del Rio, L.A., and Sevilla, F., 1997, Evidence for The Presence of The Ascorbate-Glutathione Cycle in Mitochondria and Peroxisomes of Pea Leaves, *Plant Physiol.*, 114, 275-284 pp.

Jitesh, M.n., Prashanth, S.R., Sivaprakash, K.R., and Parida, A.k., 2006, Antioxidative Response Mechanisms in Halophytes: Their Role in Stress Defence. *J Genet* 85:237-254 pp.

Jimenez, A., Hernandez, J.A., Del Rio, L.A., Sevilla, F., 1997, Evidence for The Presence of The ascorbate Glutathione Cycle in Mitochondria and Peroxisomes of Pea Leaves, *Plant Physiol*, 114:275-84.

- Lauchli, A., 2002, Introduction to Salinity: Environment-Plantsmolecules, ed. A. Lauchli, U Lüttge, pp. Ix-x. Dordrecht, Netherlands: Kluwer.
- Miller, G., Suzuki, N., Ciftci – Yılmaz, S., and Mittler, R., 2009 Reactive Species Homeostasis and Signalling During Drought and Salinity Stresses, *Plant, Cell and Environment*, (in press).
- Mittler, R., 2002 Oxidative Stress, Antioxidants and Stress Tolerance, *Trends in Plant Science*, 7:405-410 pp.
- Mittler, R., Vande Rauwera, S., Gollery, m., and Van Breusegem, F., 2004 Reactive Oxygen Gene Network of Plants, *Trends Plant Sci.*, 9:490-498 pp.
- Moller, I. M., Jensen, P. E., and Hansson, A., 2007, Oxidative Modifications to Cellular Components in Plants , *Annu. Rev. Plant Biol.*, 58:459-481 pp.
- Noctor, G. and Foyer, C., 1998, Ascorbate and Gutathione: Keeping Active Oxygen Under Control, *Annual Review of Plant Physiology and PlantMolecular Biology*, 49: 249-279.
- Parida, A.K., Das, A.B., Mohanty, P., 2004, Investigations on the Antioxidative Defense Responses to NaCl Stress in a Mangrove, *Bruguiera Parviflora*: Differential, Regulations of Isoforms of Some Antioxidant Enzymes, *Plant Growth Regul*, 42: 213-226.
- Parida, A. K., Dasa, A. B., Sanadac, Y., and Mohanty, P., 2004, Effects of Salinity on Biochemical Components of the Mangrove, *Aegiceras Corniculatum*. *Aquat. Bot.* 80:77-87 pp.
- Scandalios, J.G., 2002, Oxidative Stress Responses – What Have Genome-Scale Studies Taught Us, *Genome Biology*, 3(7): 1019.1-1019.
- Shi, H, Zhu, J-K, 2002a, SOS4, a Pyridoxal Kinase Gene, is Required For Root Hair Development in Arabidopsis, *Plant Physiol*, 129: 585-593.
- Shi, H, Zhu, J-K, 2002b, Regulation of Expression of the Vacuolar Na⁺/H⁺ Antiporter Gene ATNHX1 by Salt Stress and ABA.

Smirnoff, N., 1993, The Role of Active Oxygen in The Response of Plants to Water Deficit and Desiccation, *New Phytol*, 125: 27-58.

Smirnoff, N., 2000, Ascorbic Acid: Metabolism and Functions of a Multifaceted Molecule, *Curr Opin Plant Bio*, 3:229–35

Smirnoff, N., Cumbes, Q.J., 1989, Hydroxyl Radical Scavenging Activity of Compatible Solutes, *Phytochem*, 28: 1057-1060.

Smirnoff, N., 2005, Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants. Blackwell Publishing Book.

Takahashi, M. and Asada, K., 1988, Superoxide Production in Aprotic Interior of Chloroplast Thylakoids, *Arch. Biochem. Biophys.*, 267:714-722. Blo C.

Taiz, L., and Zaiger, E., 2002, *Plant Physiology*, 3rd edn., Sinauer Associates, Inc., Sunderland, 539 p.

Türkan I., Demiral T., 2008, Salinity Tolerance Mechanisms of Higher Plants. *Abiotic Stress and Plant Responses*, Khan N.A., Singh S.(ed.)I.K. International Publishing House Pvt. Ltd.

Wang, S., Assmann, S.M., Fedoroff, N.V., 2008, Characterization of The Arabidopsis Heterotrimeric G Protein. *J Biol Chem*;283:13913–22.

Wang, z., Huang, B., Bonos, S. A., and Meyer, W.A., 2004, Abscisic Acid Accumulation in Relation to Drought Tolerance in Kentucky Bluegrass. *Hort Sci.*, 39:1133-1137 pp.

Wang, Z. L., Huang, B. R., and Xu, Q. Z., 2003, Effects of Abscisic Acid on Drought Responses of Kentucky Bluegrass, *J. Am Soc. Hort. Sci.*, 128:36-41 pp.

Zeidler, J., Schwender, J., Mueller, C. & Lichtenthaler, H. K. The Non-Mevalonate isoprenoid Biosynthesis of Plants as a Test System for Drugs Against Malaria and Pathogenic Bacteria. *Biochem. Soc. Trans.* 28, 796-798 (2000)

Zhang, J and Kirkham, MB., 1995, Water Relations of Waterstressed, Split

Root C4 (*Sorghum bicolor*; Poaceae) and C3 (*Helianthus annuus*; Asteraceae) Plants, *Am J Bot* 82:1220–9.

Zhang, J.Z., Creelman, R.A, Zhu J-K, 2004, From Laboratory to Field. Using Information from *Arabidopsis*, to Engineer Salt, Cold, Rought Tolerance in Crops, *Plant Physiol*, 135: 615-621.

Zhu, J-K, 2003, Regulation of Ion Homeostasis Under Salt Stress, *Curr Opin Plant Biol* 6:441-445.

Zhu, j. K., 2002, Salt and Drought Stress Signalk Transduction in Plants, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 53:247-273 pp.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı-Soyadı: Merve SARAY

Dogum tarihi ve yeri: 17/01/1986 , Aydın

EĞİTİM

Lise : Aydın Lisesi Y.D.A 1999 - 2004

Lisans : Biyoloji Bölümü 2004-2008 Ege Üniversitesi

YAPILAN ÇALIŞMALAR

Lisans Bitirme Tezi , Fosfatidik Asit ve Stres Toleransı

2004, Ege Üniversitesi

Poster sunumu , Salt Tolerance at Germination and Vegetative

Growth of a Turkish Endangered *Gypsophila aucheri*

(Caryophyllaceae), ICAST 2010, Ege Üniversitesi