

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İNORGANİK AZOT KAYNAĞINDAKİ DEĞİŞİME CEVAPTA BİTKİLERDEKİ
HÜCRESEL REDOKS DEĞİŞİMİNİN İNCELENMESİ

ÖMER ADİL KORKMAZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
BİYOKİMYA PROGRAMI

DANIŞMAN
PROF. DR. BARBAROS NALBANTOĞLU

İSTANBUL, 2015

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İNORGANİK AZOT KAYNAĞINDAKİ DEĞİŞİME CEVAPTA BİTKİLERDEKİ
HÜCRESEL REDOKS DEĞİŞİMİNİN İNCELENMESİ**

Ömer Adil KORKMAZ tarafından hazırlanan tez çalışması _____ tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Barbaros NALBANTOĞLU
Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Barbaros NALBANTOĞLU
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Ayşegül PEKSEL
Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Turgay ÇAKMAK
İstanbul Medeniyet Üniversitesi

ÖNSÖZ

Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'ne bağlı Biyokimya Anabilim Dalındaki yüksek lisans eğitimim süresince bilgisi, deneyimi ve yardımlarıyla beni yönlendiren, zamanını ve desteğini esirgemeyen değerli hocam, tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Barbaros NALBANTOĞLU'na;

Deneysel çalışmalarda laboratuvar olanaklarını kullanabilme fırsatını sunan ve çalışmaların her aşamasında yardım eden İstanbul Medeniyet Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Turgay ÇAKMAK ve araştırma asistanı Emmanuel YOUNG'a, her aşamada yanımda olan ailemin her türlü desteğinden dolayı kendilerine sevgi ve şükranlarımı sunarım.

Ocak, 2015

Ömer Adil KORKMAZ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ.....	vi
KISALTMA LİSTESİ.....	vii
ŞEKİL LİSTESİ.....	viii
ÇİZELGE LİSTESİ	ix
ÖZET	x
ABSTRACT.....	xii
BÖLÜM 1	
GİRİŞ.....	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.2 Tezin Amacı	4
1.3 Hipotez.....	4
BÖLÜM 2	
GENEL BİLGİ	5
2.1 Arabidopsis thaliana	6
2.1.1 Model Organizma Olarak Arabidopsis.....	6
2.2 Bitkilerde Azot Alımı	7
2.2.1 Toprakta Azot	8
2.2.2 Mineral Besin Kaynağı Olarak Azot.....	10
2.3 Azot Asimilasyonu.....	11
2.3.1 Amonyum ve Nitrat Asimilasyonu	11
BÖLÜM 3	

DENEYSEL ÇALIŞMALAR	16
3.1 Kullanılan Materyaller ve Cihazlar	16
3.1.1 Kullanılan Cihazlar	16
3.1.2 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları.....	17
3.2 Kullanılan Metodlar	18
3.2.1 Bitki Tohumlarının Hazırlanması ve Ekimi	18
3.2.2 Büyüme ve Numune Alma	19
3.2.3 Toplam Protein Miktarının Belirlenmesi	21
3.2.4 Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	22
3.2.4.1 Katalaz Aktivitesinin Belirlenmesi	22
3.2.4.2 Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Belirlenmesi.....	22
3.2.4.3 Glutasyon Redüktaz Aktivitesinin Belirlenmesi.....	23
3.2.4.4 Askorbat Peroksidaz Aktivitesinin Belirlenmesi.....	24
3.2.5 GS, GDH ve GOGAT Aktivitelerinin Belirlenmesi	25
3.2.5.1 Glutamin Sentetaz Aktivitesinin Belirlenmesi.....	25
3.2.5.2 Glutamat Dehidrogenaz Aktivitesinin Belirlenmesi	25
3.2.5.3 Glutamat-2-oxoglutarat aminotransferaz Aktivitesinin Belirlenmesi	26
3.2.6 Hidrojen Peroksit Miktarının Belirlenmesi	26
3.2.7 Lipid Peroksidasyon Düzeylerinin Belirlenmesi.....	27
3.3 İstatistiksel Analiz.....	28
BÖLÜM 4	
SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	29
4.1 Toplam Protein İçeriklerinde Meydana Gelen Değişimler.....	30
4.2 Hidrojen Peroksit Konsantrasyonunda Meydana Gelen Değişimler	30
4.3 Lipid Peroksidasyonu Düzeylerinde Meydana Gelen Değişimler	31
4.4 Antikoksidan Enzim Aktivitelerinde Meydana Gelen Değişimler	32
4.4.1 Süperoksit Dismutaz Aktivitesinde Meydana Gelen Değişimler	32
4.4.2 Katalaz Enzim Aktivitesinde Meydana Gelen Değişimler	33
4.4.3 Glutasyon Redüktaz Aktivitesinde Meydana Gelen Değişimler	34
4.4.4 Askorbat Peroksidaz Aktivitesinde Meydana Gelen Değişimler	34
4.5 GS, GDH ve GOGAT Aktivitelerinde Meydana Gelen Değişimler.....	35
4.5.1 Glutamin Sentetaz Aktivitesinde Meydana Gelen Değişimler	35
4.5.2 Glutamat Dehidrogenaz Deaminasyon Aktivitesinde Meydana Gelen Değişimler	36
4.5.3 Glutamat-2-oxoglutarat Aminotransferaz Aktivitesinde Meydana Gelen Değişimler.....	36
4.6 Genel Değerlendirme ve Tartışma	37
KAYNAKLAR	43
ÖZGEÇMİŞ	49

SİMGE LİSTESİ

A	Absorbans
dk	Dakika
cm	Santimetre
ddH ₂ O	Distile su
g	Gram
L	Litre
M	Molar
µl	Mikrolitre
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
µM	Mikromolar
nm	Nanometre
rpm	Devir/dakika
°C	Santigrat derece
%	Yüzde
U	Unite
v/v	Hacim/Hacim
w/v	Ağırlık/Hacim

KISALTMA LİSTESİ

ATP	Adenozin trifosfat
AP	Askorbat peroksidaz
BHT	Bütillendirilmiş hidroksitoluen
CAT	Katalaz
DTT	Ditiyotreitol
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
GR	Glutasyon redüktaz
GS	Glutamin sentetaz
GDH	Glutamat dehidrogenaz
GOGAT	Glutamat sentetaz
GSSG	Glutasyon (yükseltgenmiş)
GSH	Glutasyon (indirgenmiş)
MDA	Malonildialdehit
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotid
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NBT	Nitroblue tetrazolium
PVP	Polivinilpirolidon
ROT	Reaktif oksijen türleri
SOD	Süperoksit dismutaz
TBA	Tiyobarbitürik asit
TCA	Trikloroasetik asit
Tris	Tris (Hidroksimetil) aminometan

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2. 1 Arabidopsis thaliana L.	6
Şekil 2. 2 Azot döngüsü	9
Şekil 2. 3 Bitkisel hücrelerde NO ₃ ⁻ alımı, indirgenmesi ve asimilasyonu.....	12
Şekil 2. 4 Bitki köklerinde inorganik azot indirgenmesi(a), asimilasyonu(b), yükseltgenmiş veya indirgenmiş ferrodoksin (c)	13
Şekil 2. 5 Farklı azot kaynakları neticesinde oluşan indirgeyici ihtiyacındaki değişime verilen cevapta mitokondrial solunum zincirinin alternatif yollarının redoks dengelemesi üzerine bir model	14
Şekil 3. 1 Protein tayini için hazırlanmış standart grafik	21
Şekil 3. 2 H ₂ O ₂ ölçümü için hazırlanan standart grafik	27
Şekil 4. 1 Arabidopsis'in protein içeriklerinde meydana gelen değişimler	30
Şekil 4. 2 H ₂ O ₂ miktarlarında meydana gelen değişim	31
Şekil 4. 3 Lipid peroksidasyonu değerlerinde meydana gelen değişimler	32
Şekil 4. 4 Süperoksit dismutaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişimler	33
Şekil 4. 5 Katalaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişimler	33
Şekil 4. 6 Glutasyon redüktaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişimler	34
Şekil 4. 7 Askorbat peroksidaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişimler	35
Şekil 4. 8 Glutamin sentetaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişimler	35
Şekil 4. 9 GDH Deaminasyon aktivitesinde meydana gelen değişimler	36
Şekil 4. 10 GOGAT aktivitesinde meydana gelen değişimler	37

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 3. 1 Somerville ve Ogren besin çözeltisi	19
Çizelge 3. 2 Bitkide büyüme ve numune alım günleri günleri	20

İNORGANİK AZOT KAYNAĞINDAKİ DEĞİŞİME CEVAPTA BİTKİLERDEKİ HÜCRESEL REDOKS DEĞİŞİMİNİN İNCELENMESİ

Ömer Adil KORKMAZ

Kimya Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Barbaros NALBANTOĞLU

Azot; bitkinin bütün yaşam evrelerinde, metabolizmadan kaynak paylaşımına birincil öneme sahip bir elementtir. Bundan dolayı azot kaynağındaki değişimin bitki üzerinde tanımlanması zordur ve henüz kesin tanımlamalar getirilememiştir. Bu çalışma; azot kaynağındaki değişimle birlikte hücrel redoks durumunda meydana gelen değişikliğe cevapta bitki hücrelerinde meydana gelen biyokimyasal değişimleri tanımlamak ve azot asimilasyon yollarının redoks dengeleme mekanizmalarındaki rollerini belirlemek amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Bu amaçla bitki araştırmalarında model organizma olarak kullanılan *Arabidopsis thaliana* tohumları azot kaynağı olarak nitrat içeren erlenler içinde 15 günlük büyüme sürecine bırakıldı. 9. gün sonunda 26 saat azot açlığına bırakıldıktan sonra azot kaynağı olarak 1mM konsantrasyonda amonyum veya nitrat ilave edildi. 9.gün sonunda, azot açlığında ve yeni azot kaynağı ilavesinden sonra takip eden 1. , 3. ve 5. gün sonunda hasat edilen bitkilerin; protein miktarları, bazı antioksidan enzim aktiviteleri, lipid peroksidasyonu, H₂O₂ düzeylerindeki değişimler, GS, GOGAT ve GDH enzim aktiviteleri ölçülmüştür.

Hem amonyum hem de nitrat protein değerlerini ve GS aktivitelerini azaltmış; SOD, GR ve AP aktivitelerini arttırmış; CAT aktivitelerinde aynı etkileri göstermiş; hem H₂O₂

değerleri hem de GOGAT aktivitelerinde farklılık göstermiştir. Amonyum ve nitrat hem MDA'lı bileşiklerin değerlerinde hem de GDH aktivitelerinde ters etki göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: *Arabidopsis thaliana*, amonyum, nitrat, asimilasyon, antioksidan enzimler



**INVESTIGATION OF CELLULAR REDOX CHANGES IN PLANTS IN RESPONSE
TO CHANGING THE INORGANIC NITROGEN SOURCE**

Ömer Adil KORKMAZ

Department of Chemistry

MSc. Thesis

Adviser: Prof. Dr. Barbaros NALBANTOĞLU

Nitrogen is a primary important element present in all the life stages and processes of plants, from metabolic pathways to the distribution of resources; therefore, identification of the changes of nitrogen utilization in plants is difficult and precise identification could not be done. The aim of this study was to identify the changes due to the nitrogen source in the various redox reactions taking place, to identify biochemical variations in plant cells, and to determine the role of nitrogen assimilation pathways on redox stabilization mechanism.

Arabidopsis thaliana seeds, a model organism for plant research, were grown in flasks containing nitrate as the nitrogen source for 15 days. On the 9th day of the incubation period, they were nitrogen starved for 26 hours, then grown in two sets of flasks containing concentrated ammonium and nitrate respectively. After starving for 26 hours and growth in the concentrated nitrogen source, the plants were harvested on 1st, 3rd, and 5th days (thus the total 15 days); amount of protein, antioxidant enzyme activities, lipid peroxidation, changes in H₂O₂ levels, GS, GOGAT, and GDH enzyme activities were investigated.

Both ammonium and nitrate decreased the amount of protein and GS activity, increased SOD, GR and AP activities; additionally, both affected CAT activity in the same way; however, H₂O₂ level and GOGAT activity were affected differently. Both the

amount of MDA compounds and GDH activity were reversely affected by ammonium and nitrate.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, ammonium, nitrate, assimilation, antioxidant enzymes



1.1 Literatür Özeti

Azot ile beslenmenin bitki büyüme ve gelişmesi, ayrıca biyokimyasal süreçler üzerinde farklı etkileri olduğu bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda, bitkilerin organik ve inorganik azot kaynaklarını kullanabildiklerini ve farklı azot kaynaklarına verilen tepkinin bitkiler arasında farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Nitrat konsantrasyonu amonyum konsantrasyonundan 3 kat fazla olan ortamda domates bitkisi en ideal büyüme gösterirken, amonyum konsantrasyonunun arttığı durumlarda büyüme sınırlanmıştır[1]. Beyaz ladinler[2] ve bazı arktik kamışlarla[3] yapılan çalışmalarda bu bitkilerin azot kaynağı olarak büyük oranda amonyumu tercih ettikleri görülmüştür. Azot kaynağı olarak sadece amonyum verilmiş olan fasulye bitkisinin kök büyümesinin, azot kaynağı olarak nitrat veya amonyum nitrat verilmiş olan bitkilere göre azaldığı bildirilmiştir[4].

Bitki büyümesi ve gelişmesinde etkili olan azot kaynakları üzerinde çevresel faktörlerin de etkili olduğu görülebilmektedir. Yüksek ışık yoğunluğunun amonyumla beslenen bitkide büyüme üzerine inhibe edici etkisi bulunmuştur[5][6][7]. Aynı şekilde toprak sıcaklığının artması bitkilerin amonyum toleransını düşürmüştür[8][9]. Mısır bitkilerinin bulunduğu ortamda potasyum iyon konsantrasyonu 0,1 mM'dan 1,6 mM'a çıkarıldığında amonyumla beslenen bitkilerin yaprak ağırlıkları, nitrat ile beslenenlere göre %49 oranında arttığı gözlenmiştir[10]. Bir başka mısır bitkisi üzerinde yapılan çalışmada, ortamın pH'sı 4'den 5,5'e çıkarıldığında; amonyumla beslenen köklerin kuru

ağırlığında artış, nitrat ile beslenenlerin kuru ağırlığında azalma olduğu bildirilmiştir[11].

Amonyumun toprakta 20-200 µM arasındaki konsantrasyonlarda bitkilerin gelişmesi üzerine olumlu etkilerinin olduğu, fakat daha yüksek konsantrasyonlarda ise toksik etki gösterdiği tespit edilmiştir[12][13]. Patates üzerinde yapılan bir çalışmada kontrollü bir şekilde sürekli düşük konsantrasyonlarda (0,2 mM) amonyum uygulandığında ürün veriminin %15-30 arasında arttığı bildirilmiştir[14]. Amonyum toksisitesine hassas bir çeşit salatalık bitkisinin yetiştirilmesinde tek azot kaynağı olarak 1 mM konsantrasyonda sürekli amonyum verilmesi, aynı konsantrasyonda sadece nitrat veya amonyumnitrat (NH₄NO₃)'a nazaran büyümeyi hızlandırdığı tespit edilmiştir[15].

Reaktif oksijen türleri (ROT); oksijenin normal metabolizmasının bir yan ürünü olarak oluşurlar ve hücre sinyalizasyonunda önemli rol oynarlar. Bitkilerin çoğunda aşırı ROT üretimi ile SOD, CAT, POD, AP ve GR gibi antioksidant enzimleri ve glutatyon, askorbik asid gibi antioksidanları içeren ROT-detoksifikasyon sistemleri oluşur. Farklı stres şartlarına maruz kalan bitkiler için antioksidatif cevabın hızlı gelişmesi çok önemlidir[16].

Amonyuma hassas ıspanak ve toleranslı bezelye üzerinde yapılan bir çalışmada; amonyum toksisitesiyle oluşan redoks değişimleri; oksidatif stresin belirleyicisi olan reaktif oksijen türleri miktarında, enzimatik antioksidan aktivitelerinde (CAT, POD, SOD) ve enzimatik olmayan antioksidan (ASC, GSH) miktarlarında önemli değişimler yapmadığı, protein karbonilasyonunu artırdığı ve bundan dolayı amonyum toksisitesinin antioksidan sistemle alakalı olmayıp, protein oksidasyonundaki değişimlerden meydana geldiği iddia edilmiştir[17]. Farklı bir çalışmada amonyum hassasiyetinin bitki türlerine göre ROT üzerinde farklılık gösterdiği, azot kaynağı olarak amonyum kullanılan tarımsal alanlarda azota hassas türlerin ilk yok olduğu gözlemlenmiştir[18][19] 20].

Bezelye üzerinde yapılan bir çalışmada; bitkiler nitrat solüsyonundan amonyum solüsyonuna bırakıldığında GS aktivitesi yavaşça azalırken, GDH aktivitesi önemli ölçüde artmıştır[21]. GS/GOGAT yolu; amonyum iyonlarının glutamin sentetaz (GS) enzimine

olan afinitelerinin yüksek olmasından dolayı amonyum asimilasyonunda öncelikli olan yoldur[22].

Arabidopsis dahil bitkilerin büyük çoğunluğu amonyum ve nitratı kullanabilmek için özelleşmiş membran taşıyıcıların her ikisine de sahip oldukları halde azot kaynağı olarak nitrat'ı tercih etmişlerdir[23]. Arabidopsis üzerinde yapılan başka bir çalışmada yeterli büyüklüğe ulaşan bitkiler 26 saat azot açlığına bırakılmış, daha sonra büyüme ortamlarına azot kaynağı olarak 1 mM konsantrasyonda amonyum veya nitrat ilave edilmiş ve azot kaynağı ilavesinden 0, 1.5 ve 8 saat sonra hasat edilen köklerde mikrodizi analizleri, real time PCR analizleri, NADH/NADP(H) ve askorbat/glutatyon oksidasyon durumları, bazı antioksidant enzim aktiviteleri, lipid peroksidasyonu, protein karbonilasyonu ve H₂O₂ düzeylerindeki değişimler araştırılmıştır. Mikrodizi analizlerine göre azotla regüle edilen genlerin yaklaşık %60'ı amonyum ve nitrata ortak cevaplar sergilerken, önemli oranda "nitratspesifik" ve "amonyum-spesifik" gen setleri de tanımlanmıştır. Azot kaynağı olarak nitrat uygulanmış *A.thaliana* köklerinde muhtemelen mitokondriyal matriksten sitosole artan oranda indirgeyicilerin transferinden dolayı H₂O₂ üretiminde hızlı bir azalma gözlenmiştir. Farklı azot kaynaklarına cevapta NAD(H)/NADP(H) ve askorbat/glutatyon oksidasyon durumunda önemli bir değişim olmadığı belirlenmiştir. Yeni azot kaynağı ilavesinden özellikle 1.5 saat sonra amonyum uygulanmış köklerde ölçülen tüm antioksidant enzimlerde kontrole (0. saat) ve nitrata kıyasla artış belirlenmiştir. Yine amonyum sağlanmış grupta protein karbonilasyonunda hem kontrole hem de nitrat grubuna kıyasla önemli artış belirlenmiş, bunun yanında lipid peroksidasyonunda önemli bir değişim gözlenmemiştir[24],[25]. Başka bir çalışmada, amonyum ve nitrat asimilasyonunda farklılaşan indirgeyici gereksinimlerinin *Arabidopsis thaliana* mitokondriyal solunum zincirindeki aktivite değişiklikleri ile paralellik gösterdiği belirlendi. N kaynağı olarak amonyum kullanıldığında solunum zinciri aktivitelerinde ve birçok gen familyasının ifadesinde dramatik bir artış gözlemlenirken, nitrat kullanıldığında tam tersi bir etki kaydedildi [26]. Yine *Arabidopsis* ile yapılan benzer bir çalışmada mitokondriyal taşıyıcı proteinleri kodlayan genlerin çoğunun nitratla beslenmede ifade oldukları, ve buna karşın amonyumla beslenmede ifadelerinin baskılandığı, ancak solunumda rol alan çok

sayıda gen familyasının ifadesinde artışa rağmen krebs döngüsünde rol oynayan çoğu enzimin ifadesinin de yine amonyuma cevapta baskılandığı bildirildi [25].

1.2 Tezin Amacı

Bitkilerin topraktaki azot kaynağı olarak nitrat, amonyum ya da farklı bir inorganik azot bileşimini asimile ederken meydana gelen redoks dengesizliğinden etkilenmemesi için hücrel indirgeyici havuzların köklerde aktif bir şekilde ayarlanması gereklidir. Literatür bilgisindeki sonuçlar, amonyum ve nitratın farklı etkileri üzerine ilginç görüşler sağlamasına rağmen genel taslak hala belirsizdir, çünkü sonuçlar birbirinden oldukça farklı mekanizmaları işaret edebilmektedir.

Bu çalışmada; yeni yapılan bir çalışmaya [24],[25] ilave olarak, açlığa maruz bırakılmış Arabidopsis thaliana bitkisinde farklı azot formlarının alınmasıyla birlikte hücrel redoks durumunda oluşan farklılıkların bitkide meydana getirdiği 1., 3. ve 5. günlerdeki biyokimyasal değişimleri gözlemlemek ve azot asimilasyon yollarının hücrel redoks mekanizmaları üzerindeki etkilerini araştırmak amaçlanmıştır.

1.3 Hipotez

Arabidopsis thaliana bitkisinin nitrat ve amonyum iyonları ile beslenmesi sonucu meydana gelen hücrel redoks mekanizmasındaki değişiklik ve bu farklı formdaki azot bileşiklerinin asimilasyonunda görev alan enzimlerin ve moleküllerin durumlarındaki değişimleri kapsayan düzenleme modellerini tanımlamak için detaylı çalışmalar yapılacak; araştırma sonucu elde edilen veriler ile doğal ortamdaki bitkilerde redoks dengeleme mekanizmaları üzerine yapılacak çalışmalar için önemli girdiler sağlanacak, ayrıca azotlu gübrelerin daha etkili kullanımı üzerine uygun öneriler getirilecektir.

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİ

Bitki büyümesi ve gelişmesinde en temel gereksinimler su, mineraller ve ışıktır. Esansiyel mineral besinler arasında bitkiler tarafından en fazla gereksinim duyulan elementlerden biri azottur. Mineral besinlerden inorganik azot yükseltgenmiş (nitrat) ve indirgenmiş (amonyum) formda bulunan tek mineraldir. Nitratın yüksek konsantrasyonlarda depolanabilmesi ve toprağın negatif yükle yüklenmeye olan eğiliminden dolayı kök içerisinde serbest taşınımının gerçekleşebilmesi, bitki köklerinin azotu; kullanıma daha hazır olan amonyum formu yerine genellikle nitrat formunda almalarını sağlamıştır[27]. Nitratın yüksek konsantrasyonlarda depolanabilmesi ve toprak partiküllerine sıkı bağlanamaması, yağmurla beraber yer altı sularına karışabildiğinden; bazı bitkilerde nitrat konsantrasyonu olması gerekenin çok üzerinde olmakta ve bu bitkileri tüketen insanlarda nitrat zehirlenmelerine bağlı hastalıklar oluşabilmektedir. Aynı şekilde amonyum düşük konsantrasyonda bile bitkiler için toksik etkilere sebep olduğundan gübre olarak kullanımı tercih edilememektedir.

Azot bitki metabolizmasının tüm yaşam evrelerinde birincil öneme sahip bir element olduğundan, azot kaynağındaki değişimin bitki üzerindeki etkilerinin tanımlanması oldukça zordur.

2.1 Arabidopsis thaliana

Arabidopsis thaliana en bilinen model bitkidir (Şekil 2.1). Küçük boyu ve kısa üreme zamanından dolayı genetik ve bitki biyolojisi araştırmalarına uygundur. Arabidopsis genomu bilinen en küçük genomlardan biridir[28].

Alem	: Plantae
Bölüm	: Magnoliophyta
Sınıf	: Magnoliopsida
Takım	: Brassicales
Familiya	: Brassicaceae
Alt Familiya	: Brassicoideae
Cins	: Arabidopsis
Tür	: Arabidopsis thaliana L.



Şekil 2.1 Arabidopsis thaliana L.

Arabidopsis thaliana, genellikle Avrupa, Asya ve kuzeybatı Afrika'da yaşayan 20-25 cm'ye kadar uzayabilen kısa, tek yıllık çiçekli otsu bir bitkidir. Dip yaprakları genelde tırtıklı olmasına rağmen, internod yaprakları genelde düzdür. Yaklaşık 2-4mm büyüklüğünde beyaz çiçek açar. Çiçeklenme zamanı nisan'dan mayıs'a kadardır. Meyvesi 5-20 mm uzunluğundadır ve yaklaşık 20-30 tane hardalsı tohum içerir[29]. Ayrıca 10-20 cm uzunluğunda bezelye kabuğu şeklinde meyveleride vardır. Kökü yaklaşık 40 cm derinliğindedir. Bacillus megaterium gibi bakterilerle arabidopsis thaliana kökleri interaksiyonlar oluşturabilirler[30]. Yaşam döngüsünü yaklaşık 6 haftada tamamlayabilir. Tohum ekiminden takribi 3 hafta sonra çiçeklenme olur, çiçekler kendi kendine tozlaşır.

2.1.1 Model Organizma Olarak Arabidopsis

Arabidopsis, bitki ve genetik çalışmalarında yaygın olarak kullanılan model bir organizmadır. Hayvan biyolojisinde farenin oynadığı rolü bitki biyolojisinde arabidopsis

oynar. Yaklaşık 157 milyon baz çifti[31] ve 5 kromozomu ile genetik haritalama ve sekans analizleri için kullanışlı bir model organizmadır. Arabidopsis genomu sekanslanan ilk bitkidir, Arabidopsis Genome Initiative organizasyonu tarafından 2000 yılında tüm genom haritası çıkarılmıştır. Arabidopsis genomunun sürekli olarak en güncel hali The Arabidopsis Information Resource (TAIR) tarafından yenilenmekte ve www.arabidopsis.org sitesi aracılığı ile yayınlanmaktadır.

Arabidopsis ışık mikroskopi analizleri için kullanılmaya oldukça müsait bir bitkidir. Genç fideler ve kökleri diğer bitkilere göre ışığa geçirgendir. Ayrıca canlı hücre resimleme çalışmalarında; floresans ve konkofal lazer mikroskopisi yardımıyla küçük boyuta sahip arabidopsis yaygın bir şekilde kullanılmaktadır[32].

Arabidopsis'te gen transformasyonu *Agrobacterium tumefaciens* kullanılarak bitki genomuna DNA'nın transferi yaygın bir şekilde yapılan çalışmalardır. 'Floral-dip' adı verilen bir metod ile basit bir çiçek, *Agrobacterium*, ilgili DNA ve bir çeşit deterjan içeren bir çözeltiye daldırıldığında gen transformasyonu gerçekleştirilebilir[33][34].

Küçük boyutu ve hızlı yaşam döngüsüne sahip olması, kolayca mutant bireyler elde edilebilmesi ve tek bitkiden binlerce tohum alınabilmesi Arabidopsis'in model organizma olarak kullanılmasında avantajlar sağlamıştır.

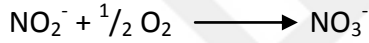
2.2 Bitkilerde Azot Alımı

Bitki dokularında oksijen, hidrojen ve karbondan sonra en bol bulunan element azottur. Ancak bitkiler kökleri tarafından havadaki azot gazının çok az miktarını (% 0,00024) alabilirler[35]. Yaklaşık olarak her yıl 90×10^{12} g atmosferik azot; şimşek, fotokimyasal reaksiyonlar veya azot fiksasyonu ile toprağa bağlanmaktadır. Şimşek tarafından reaktif hidroksil serbest radikalleri, serbest hidrojen atomları ve serbest oksijen atomlarına dönüştürülen su buharını ve oksijen moleküler azot ile tepkimeye girerek nitrik asidi (HNO_3) oluşturur. Azot fiksasyonunun yaklaşık %2'si HNO_3 üreten nitrik oksit (NO) ile ozon (O_3) gazları arasındaki fotokimyasal yollardan sağlanır, geri kalan %90'ı da, bakteri veya mavi-yeşil alglerin moleküler azotu (N_2) amonyum (NH_4^+) şeklinde bağladığı biyolojik azot fiksasyonunun sonucudur. Bazı mikroorganizmalar

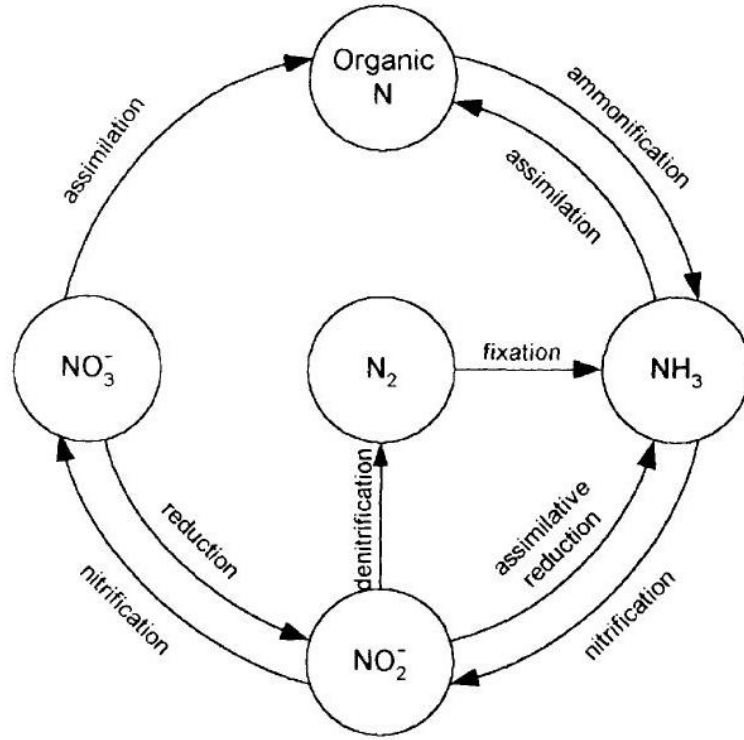
yardımıyla atmosferik azotu fikse edebilen bazı bitki gruplarının yanında çoğu bitki topraktan inorganik azot formlarını almayı tercih eder.

2.2.1 Toprakta Azot

Azot; toprakta organik ve inorganik yapıda kompleks bir karışım olarak bulunur ve şartlara göre toprak içerisinde oransal farklılıklar olabilir. Azot döngüsü; bir azot formunun diğerine dönüştürülmesi ve bitkiler tarafından absorpsiyonu gibi olayların bütünüdür (Şekil 2.2). Topraktaki azotun büyük bir kısmı toprak mikroorganizmaları tarafından mineralizasyon ile oluşturulan NH_4^+ formunda kompleks organik molekül halinde bulunur. Amonyum daha sonra nitrifikasyon sonucu nitrata (NO_3^-) okside edilir.



Nitrifikasyon; düşük toprak pH'sı, anaerobik şartlar, toprak suyunun azlığı ve 5°C'nin altındaki ve 40°C'nin üstündeki sıcaklıklarda negatif yönlü ilerler. Nitrat denitrifikasyon ile elektron akseptörü olarak O_2 yerine kullanımı ile nitrojen gazlarına (N_2 , N_2O , NO , NO_2^-) dönüşebilir. Denitrifikasyon O_2 miktarının az, NO_3^- miktarının fazla, toprak neminin yüksek, toprakta kullanılabilir karbonhidrat miktarının yüksek ve toprağın sıcak olduğu durumlarda meydana gelir[36],[37].



Şekil 2. 2 Azot döngüsü

Ortamda yeteri miktarda karbon bulunduğu takdirde mikroorganizmalar inorganik azotu kullanırlar ve bu bitkilerin kullandığı azot miktarında azalmaya neden olabilir. Azotun farklı miktar ve oranlarda bulunması, farklı şekilde döngüye uğraması ve mikroizal simbiyozis gibi olayların etkisinden dolayı mikroorganizmalar ve bitkiler arasındaki azot rekabetini oldukça karmaşık bir duruma sokmuştur[38].

Mineralizasyon, nitrifikasyon ve denitrifikasyon arasındaki denge, bitkilerin kullanabileceği azot varlığını etkiler. Toprağın havalanması, su içeriği ve sıcaklık gibi mikrobiyal aktiviteleri etkileyen faktörler mineralizasyon oranına etki eder[39]. Toprak pH'sının bazik olduğu durumlarda mineralizasyon işlemi hızlı olur, bu durumda amonyumun amonyağa buharlaşması gerçekleşebilir. Bu durum toprağın asidifikasyonu ile sonuçlanabilir[40]. Temel olarak topraktaki amonyum ve nitrat miktarları azot döngüsünün biyolojik bir sonucu olarak; mevsimlere, bölgelere, toprak sıcaklığı ve su miktarına göre değişebilir [41].

Toplam toprak azotunun yaklaşık % 0,1-50'si organik azot kaynaklı olup, bu oran bölgelere göre değişebilir[42]. Topraktaki organik azot miktarının artmasında üre tabanlı gübrelerin tarımda kullanılmasında etkilidir. Organik azot; protein, peptid

formunda (%99,5) ve geri kalanı serbest aminoasit olarak bulunur[43]. Protein ve peptidler toprak mikroorganizmalarının toprağa salgıladıkları proteazlar tarafından aminoasitlere parçalanırlar. Toprak partiküllerine sıkı bir şekilde bağlanamayan bu aminoasitler, toprakta serbest olarak bulunurlar. Tarımsal alanlarındaki aminoasit konsantrasyonu 1-100 μM arasında değişir[44]. Bitki dokularında ise bu değer 1-10 mM arasındadır ve bu değer organik azot kaynağı bakımından toprak için bitkileri değerli kılar. Toprak sıcaklığı mineralizasyonu etkileyen temel faktör olduğu için, soğuk anaerobik topraklar azot mineralizasyonunu ve aerobik nitrifikasyonunu kısıtlar ve bunun sonucunda topraktaki amino bileşiklerinin miktarını artırır[45].

2.2.2 Mineral Besin Kaynağı Olarak Azot

Mineral besinler çoğunlukla inorganik yapıda olup, bütün organizmalarda sürekli bir döngü halinde olan ve biyosfere genellikle kök sistemleri ile giren elementlerdir. Azot esansiyel mineral besinler arasında en fazla gereksinim duyulan, çoğu durumda bitkinin büyümesini ve gelişmesini etkileyen en önemli elementtir. Azot bitkinin kuru ağırlığının yaklaşık % 1,5-2'lik kısmını oluşturur. Bitki bünyesindeki karbonlu bileşiklerle beraber çeşitli organik mollekülleri oluşturarak; nükleik asitlerin, proteinlerin yapı taşı olan aminoasitlerin ve çeşitli enzimlerde koenzim olarak görev alan bazı vitaminlerin bileşimine girer ve bu sayede bitki fonksiyonlarının tüm düzeylerinde önemli bir rol oynar.

Bitkilerin çoğu mineral besin kaynağı olarak nitrat (NO_3^-) ve amonyum (NH_4^+) kullanabilirler. Bitki kökleri azotu; kullanıma daha hazır olan amonyum yerine, nitrat olarak almayı tercih ederler. Bu tercihte; nitratin amonyumdan daha bol miktarda bulunması, kök hücrelerinin kofullarında yüksek miktarda (100 mM'a kadar) depolanabilmesi, toprağın negatif yük ile yüklenmeye meyilli olması sonucu köklerde serbest bir şekilde taşınımının meydana gelmesi etkilidir[27]. Zirai topraklarda nitrat konsantrasyonu 1 ile 5 mM arasında değişir[44]. Bu değer suyla yıkanan doğal sistemlerde 5-10 μM 'ye kadar düşebilir[46]. Tarımsal topraklarda amonyum konsantrasyonu ise 20 ile 200 μM arasındadır[44]. Düşük pH ve düşük sıcaklık, fenol kaynaklı allelopatik bileşiklerin birikimi ve ayrıca anaerobik toprakların nitrifikasyonu inhibe etmesi sonucunda toprakta amonyum miktarı artar. Nitrata nazaran toprak

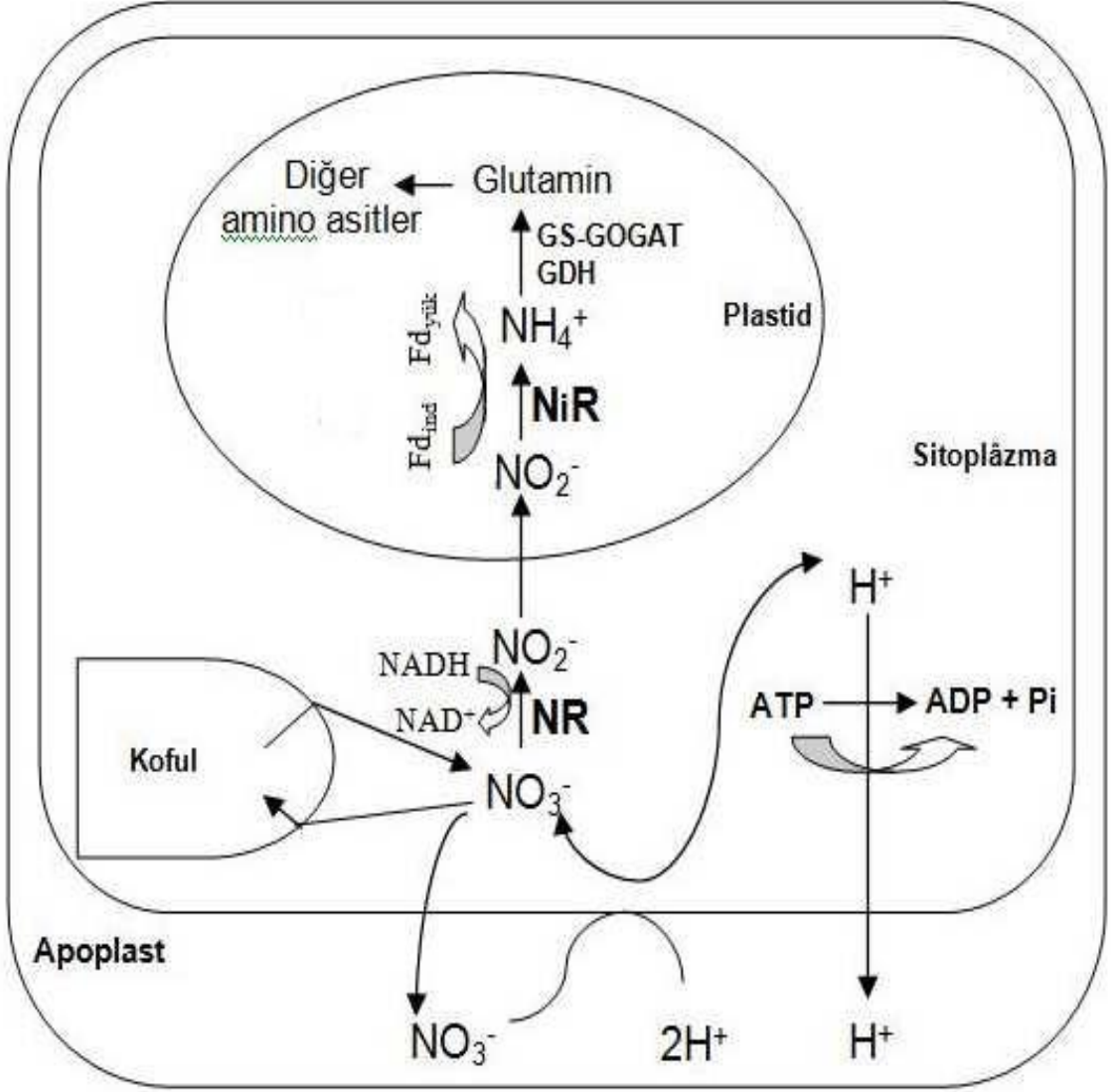
partiküllerine daha sağlam bağlanan amonyumun miktarı, zirai çalışma yapılan alanlarda genelde artar. Bunun sonucunda amonyum konsantrasyonu bazı ormanlarda 2 mM iken, bazı tarım alanlarında bu değer 20 mM'e kadar yükselir ve böylelikle amonyum birincil azot kaynağı olur[47].

2.3 Azot Asimilasyonu

Azot asimilasyonu; bitkilerin azot döngüsünde ortaya çıkan nitrat ve amonyağı kökleri vasıtasıyla alıp, azotlu organik bileşikler oluşturmasıdır. Azot gazını katı hale getiremeyen bitki, mantar ve bazı bakterilerin ihtiyaçlarına göre azotu nitrat ya da amonyum olarak asimile etmesi yeteneklerine bağlı olarak değişir. Bitkiler azotu topraktan nitrat ve amonyum formunda alırlar. Nitrifikasyonun meydana geldiği aerobik topraklarda nitrat iyonu daha hakim olan azot kaynağıdır[48][49]. Bununla beraber, amonyum bulunan otlaklar[50] ve su içindeki pirinç tarlaları[51] gibi anaerobik topraklarda nitrat her zaman daha hakim tür değildir. Bitki kökleri; pH, salgılanan organik bileşikleri ve oksijeni değiştirerek azot formlarının miktarlarını doğrudan etkileyebilirler[52].

2.3.1 Amonyum ve Nitrat Asimilasyonu

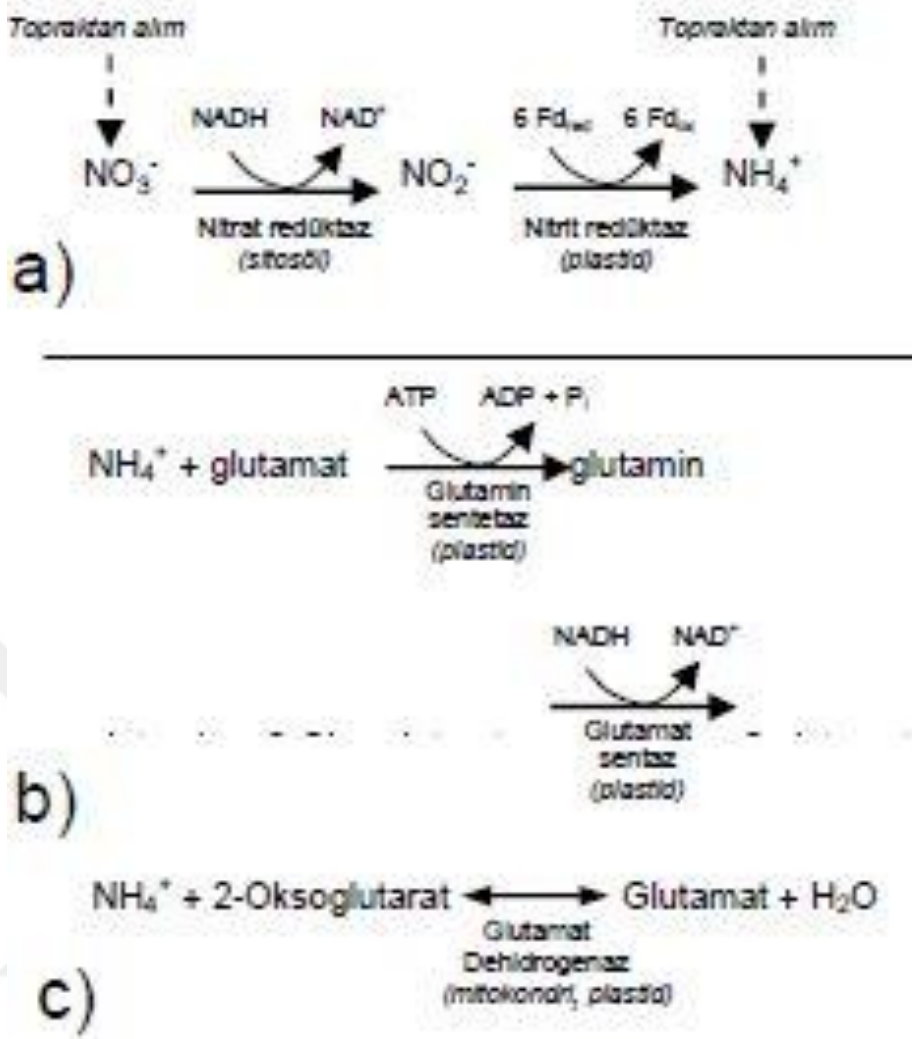
İnorganik besin kaynakları arasında azot; yükseltgenmiş nitrat ya da indirgenmiş amonyum formda bulunan tek mineraldir. Bitkilerin çoğu bu iki azot formunu kullanabilirler ve kök hücrelerinde bunlar için özelleşmiş taşıyıcılara sahiptirler[53][54]. Amonyum topraktan alındıktan sonra doğrudan asimilasyon için plastidlere taşınır. Nitrat ise asimilasyon için sitosole taşınır ve burada nitrat redüktaz tarafından nitrite indirgenir. Nitrit redüktaz plastidlerde nitriti amonyuma indirger ve glutamin sentetaz-glutamat sentaz (GS-GOGAT) ayrıca bazı durumlarda glutamat dehidrogenaz (GDH) aktivasyonu ile amonyum aminoasitlerin yapısına katılır.(Şekil 2.3).



Şekil 2. 3 Bitkisel hücrelerde NO_3^- alımı, indirgenmesi ve asimilasyonu

*NR; Nitrat redüktaz, NiR; nitrit redüktaz, $\text{Fd}_{\text{ind/yük}}$; yükseltgenmiş veya indirgenmiş ferredoksin. Nitratın asimilasyonu ile oluşan nitrit oldukça reaktif ve toksik bir iyon olduğundan, hızla sitosolden yapraklardaki kloroplastlara ve köklerdeki plastidlere gönderilir. Nitritin amonyuma indirgenmesi kök hücrelerinde gerçekleşiyorsa köklerde NAD(P)H kullanılır[24].

İndirgenmede nitrat için NAD(P)H kullanılırken, nitrit için ferredoksinler kullanılır[55],[56],[57].

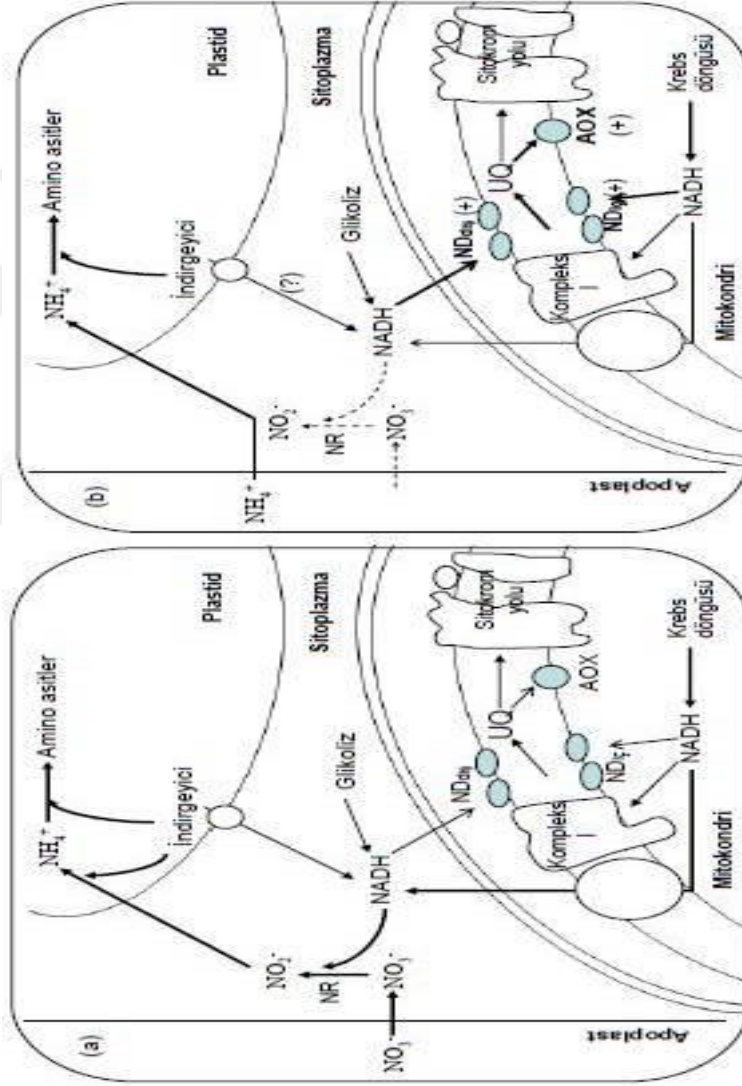


Şekil 2. 4 Bitki köklerinde inorganik azot indirgenmesi(a), asimilasyonu(b), yükseltgenmiş veya indirgenmiş ferrodoksin (c)

Hüresel indirgeyicilere olan talep asimilasyonda amonyum ve nitratta farklılık gösterebilir. Nitrat asimilasyonunda; sitosolde fazladan NADH ve plastidlerde fazladan NADPH'lara ihtiyaç duyar, bundan dolayı nitrat asimilasyonunun enerji gereksinimi amonyuma göre çok daha fazladır[58](Şekil 2.5).

Nitratin sitoplazmada nitrite, nitritinde plastidlerde amonyuma indirgenmesi; sitoplazmik NADH'lar ve plastidlerdeki indirgeyiciler için bitkilerde önemli bir indirgeyici kaynak oluşturur. Köklerde nitrati, nitrite indirgeyen indirgeyiciler (NADH, NADPH); plastidlerdeki pentoz-fosfat yolundan, glikolizden ve TCA döngüsü reaksiyonlarından sağlanır (Şekil 2.4a). Azot kaynağı olarak amonyum alımında bu indirgeyiciler kullanılmayacağından (Şekil 2.4b); hüresel ve organizma düzeyinde

redoks homeostazisinin bozulmasına sebep olabilirler. Bitkiler toprakta amonyum, nitrat ya da farklı bir inorganik azot kaynağını asimile ederken, hücresel indirgeyici kaynakları oluşabilecek herhangi bir redoks dengesizliğinden kaçınmak için köklerde dinamik olarak ayarlamalıdırlar. Arabidopsis’de azot asimilasyon reaksiyonları sitosöl ve plastidlerde oluşturduğundan dolayı redoks dengeleme mekanizmaları burada da meydana gelmeli, hücresel redoks homeostazisi; bütün bir hücresel süreç olarak değerlendirilmelidir.



Şekil 2. 5 Farklı azot kaynakları neticesinde oluşan indirgeyici ihtiyacındaki değişime verilen cevapta mitokondrial solunum zincirinin alternatif yollarının redoks dengelemesi üzerine bir model

*Nitrat (a) veya amonyum (b) asimilasyonu sonucu azot ve indirgenmiş elektronların izlediği yol oklar ile gösterilmiştir. (b)'deki kesikli oklar inaktif yolları ve ok kalınlıklarındaki değişiklikler indirgenmiş

elektronlar ve Azotun akış yolunu göstermektedir. Bir reaksiyon için gösterilen daha kalın ok reaksiyonlar arasında akış hızında muhtemel bir artış olduğunu gösterir. UQ; ubikinon [24].

Redoks homeostazisinde meydana gelen değişimleri belli bir dengede tutmak için organizmalar; hücresel enzim düzeylerini belli bir seviyede tutmak ve indirgeyici havuzlarının (NAD, NADP, FAD) diğer hücresel ihtiyaçlara göre sürekli olarak oksidasyon halinde kalması gibi bir durumla karşılaşabilirler. Hücresel indirgeyicilere olan ihtiyaç ve bunların yenilerinin üretilmesi durumları hesaba katılınca indirgeyiciler; değişen gelişimsel ve çevresel şartlara cevapta hücresel redoks homeostazisini devam ettirmek için gerekli olan dinamik ve hassas mekanizmalara bağlı olarak çok değişkenlik gösterirler. İndirgeyici gereksiniminin oluşturduğu redoks dengesizliğinden kaynaklanan aşırı ROT üretimi, oksidatif stres, hücre döngüsünün sekteye uğraması, apoptotik veya nekrotik hücre ölümleri gibi sonuçlar, redoks dengeleme mekanizmaları hücresel canlılığın sürdürülebilmesi için hayati öneme sahiptir [24].

DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1 Kullanılan Materyaller ve Cihazlar

3.1.1 Kullanılan Cihazlar

- Shimadzu ATX224 hassas terazi
- Orion Star A221 pH metre
- Optizen POP BIO spektrofotometre
- Nüve otoklav OT 90L
- Nüve etüv FN 500
- Nüve sterilkabin MN 120
- Nüve NF 800R santrifüj
- WiseStir MSH-20D manyetik karıştırıcı
- VWR ADV 5000 çalkalayıcı
- İnoksan buzdolabı
- Haier ultra düşük sıcaklık derin dondurucu (-80°C)
- İnoksan derin dondurucu (-20°C)
- Millipore safsu cihazı TANKPE030
- Hellma (10,00mm) quartz küvet

- Thermo scientific Multiskan GO çoklu okuyucu
- BIOSAN FVL-2400N combi-spin santrifüj
- BIOSAN V-32 multivorteks
- Benchmarck BSH1001-E dijital kuru blok ısıtıcı
- Su banyosu

3.1.2 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları

Çalışmada kullanılan kimyasallar; Sigma, Applichem, Merck, VWR, Alfa Aesar, TCI, abcr firmalarından temin edilmiştir. Çözeltilerin kullanıldıkları yerler ve hazırlanış biçimleri şu şekildedir.

- 1) Somerville ve Ogren besiyeri için hazırlanan makrobesein elementleri içeren stoklar; 1M KNO₃ (azotsuz besiyeri için için 1M KCl), 1M KH₂PO₄ (pH 5.60), 1M MgSO₄, 1M Ca(NO₃)₂ (azotsuz besiyeri için 1M CaCl₂), 20 mM Fe-EDTA ile mikrobesein elementlerini içeren stok; 70 mM H₃BO₃ 14 mM MnCl₂, 0,5 mM CuSO₄, 1 mM ZnSO₄, 0,2 mM NaMoO₄, 10 mM NaCl ve 0,01 mM CoCl₂
- 2) Azot açılığına bırakılan örnekler için ilave edilecek azot kaynağı olarak 1 M KNO₃ ile 1M (NH₄)₂SO₄ stok çözeltiler
- 3) SOD, CAT, GR, AP enzimleri aktiviteleri ve toplam protein miktarını belirlemek için yapılan ekstraksiyon tamponu; 50 mM KH₂PO₄ (pH 7.80), %2 PVP, 1 mM EDTA
- 4) CAT aktivitesi için reaksiyon karışımı; 19 mM H₂O₂, 50 mM KH₂PO₄ (pH 7,0)
- 5) SOD aktivitesi için reaksiyon karışımı; 50 mM KH₂PO₄ (pH 7.80), 13 mM methionin, 75 µM NBT, 0,1 mM EDTA
- 6) GR aktivitesi için reaksiyon karışımı; 0.025 M NaH₂PO₄ (pH 7.80), 0,5 mM GSSG, 0.12 mM NADPH-Na₄
- 7) AP aktivitesi için reaksiyon karışımı; 50 mM NaH₂PO₄ (pH 7,00), 0,5 mM askorbik asit, 0,3 mM H₂O₂, 0,1 mM EDTA-Na₂

- 8) GS ve GDH aktivite belirlenmesi için yapılan ekstraksiyon tamponu; (pH 8,00) 25 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM merkaptotanol, 1 mM GSH, 10 mM MgSO₄, 5 mM glutamat, %2 PVP, %0.01 Triton
- 9) GOGAT aktivite belirlenmesi için yapılan ekstraksiyon tamponu; (pH 7,20) 100 mM NaH₂PO₄, %10 (v/v) gliserol, 5 mM EDTA, % 0,1 Triton-x-100, 5 mM merkaptotanol, 1 mM PMSF
- 10) GS aktivitesi için reaksiyon karışımı; 15 µmol ATP, 20 µmol MgSO₄, 5 µmol hidroksilamin, 60 µmol L-glutamat, 33,75 µmol Tris
- 11) GS aktivite tayininde reaksiyonun durması için gerekli olan ferric chloride reagent (0,37 M FeCl₃ (anhidro), 0,2 M TCA in 0,67 N HCl)
- 12) GOGAT aktivitesi için reaksiyon karışımı; 50 mM tris-HCl (pH 7,50), 5 mM L-glutamin, 5 mM α-keto glutarik asit, 0,1 mM NADH
- 13) GDH aktivitesi için reaksiyon karışımı; 100 mM Tris-HCl (pH 9,40), 50 mM L-glutamat, 0,625 mM NAD⁺, 1 mM CaCl₂
- 14) H₂O₂ miktarının belirlenmesinde kullanmak için; 10 mM KH₂PO₄ (pH 7.00), 1 M KI, ayrıca ekstraksiyon için % 0,1 (w/v) TCA
- 15) Lipid peroksidasyonu tayininde kullanmak için; % 80 etanol, % 0,65(w/v) TBA, % 0,01(w/v) BHT, % 20(w/v) TCA

3.2 Kullanılan Metodlar

3.2.1 Bitki Tohumlarının Hazırlanması ve Ekimi

Arabidopsis tohumları %70 etanol çözeltisi ile 1dk yüzey sterilizasyonuna tabi tutulduktan sonra ddH₂O ile 1dk boyunca durulandı. Bu işlem 3 kez tekrarlandıktan sonra %5 (v/v) çamaşır suyu ile 3dk süresince yıkandı ve tekrar 3 kez ddH₂O ile 1dk durulandı. Sterilizasyon sonucunda belli miktar şişen tohumlara besin çözeltilerine bırakılmak üzere %0.01'lik agaroz çözeltisi eklendi.

Besin çözeltileri için 250 ml'lik erlenler kullanıldı. Hazırlanan Somerville ve Ogren besin çözeltisi'den erlenlere 100 ml ilave edildi (çizelge 3.1), ağız kısımları pamuk ile iyice

kapatıldı ve alüminyum folyo ile kaplandı. Otoklava bırakılarak sterilizasyon yapıldı. Yaklaşık 3 saat süren sterilizasyon işleminden sonra yaklaşık 30 dk soğumaya bırakıldı. Soğuma işleminden sonra erlenlere %0,65 agaroz içeren tohumlar çok basit hesaplama ile yaklaşık olarak 1 ml besin çözeltisine 1 tohum gelecek şekilde ilave edildi. Tohum ilave edilen erlenler ışık varlığında ve oda sıcaklığında büyümeye bırakıldı. Tüm bu işlemleri yaparken dikkat edilmesi gereken en önemli husus çalışmanın steril kabinde gerçekleşiyor olmasıdır. Steril kabin kullanılmadan önce %70 alkol çözeltisi ile iyice temizlenmeli ve çalışma süresince bek alevinin yanıyor olması gerekmektedir.

Çizelge 3. 1 Somerville ve Ogren besin çözeltisi

Son konsantrasyon	Hazırlanan stok	Stok'tan alınan
2.5 mM KNO ₃	1 M KNO ₃	4.75 ml
1.25 mM KH ₂ PO ₄ (pH= 5.60)	1 M KH ₂ PO ₄	2.38 ml
Son konsantrasyon	Hazırlanan stok	Stok'tan alınan
1 mM MgSO ₄	1 M MgSO ₄	1.9 ml
1 mM Ca(NO ₃) ₂	1 M Ca(NO ₃) ₂	1.9 ml
25 µM Fe-EDTA	20 mM Fe-EDTA (+4°C)	2.38 ml
*Mikroelement bileşikleri		1.9 ml
%2 Sükroz**		

* (70 mM H₃BO₃, 14 mM MnCl₂, 0,5 mM CuSO₄, 1 mM ZnSO₄, 0,2 mM NaMoO₄, 10 mM NaCl ve 0,01 mM CoCl₂)

**Hazırlanan besin çözeltisine %2 oranında sükroz ilave edilmiştir.

3.2.2 Büyüme ve Numune Alma

Ekim işlemi yapılan tohumlar 15 günlük büyüme süresince oda sıcaklığında ve ışık varlığında çalkalayıcı üzerinde büyütüldüler. Ekim günü dahil takip eden 9. Gün

sonunda bitkiler 26 saat azot açlığına bırakıldı. Azotsuz besin çözeltisi için Somerville ve Ogren besin çözeltisi KNO_3 yerine KCl , $Ca(NO_3)_2$ yerine $CaCl_2$ kullanılarak hazırlandı (Tekrar erlenlere ilave edilen besin çözeltisi pamuk ve folyo ile kapatılarak otoklav'da sterilizasyonu sağlandı). 26 saat azotsuz ortamda tutulan bitkiler'e süre sonunda azot kaynağı olarak son konsantrasyonları 1 mM olacak şekilde yarısına KNO_3 , yarısınada $(NH_4)_2SO_4$ ilave edildi. Azot kaynağı ilavesinden sonra erlenler tekrar çalkalayıcıya konularak bitkiler büyümeye bırakıldı. Bitkilerin yetiştiği ortamın steril olmasına dikkat edildi, belli aralıklarla alkol ile temizlik yapıldı. 15 günlük büyüme süresi boyunca bitkilerden toplam 8 adet numune alındı. İlk olarak 9. günde (kontrol grubu) 1 numune, daha sonra 10. günde (T=0) 1 numune (azot açlığından sonra azot kaynağı ilave edilmeden önce), 11. günde (T=1) 2 numune (azot açlığından sonraki ilk gün hem $(NH_4)_2SO_4$ ilaveli hemde KNO_3 ilaveli erlenlerden 1'er adet), 13. günde (T=3) 2 adet (hem KNO_3 hemde $(NH_4)_2SO_4$ bulunan erlenlerden 1'er adet), 15. günde (T=5) 2 adet (Hem KNO_3 hemde $(NH_4)_2SO_4$ olanlardan 1'er tane)(çizelge 3.2). Erlen içinden alınan bitki kâğıt mendil yardımı ile iyice kurulandıktan sonra tartıldı, alüminyum folyo'ya sarıldı ve numaralanıp derin dondurucuya atıldı (-80 °C).

Çizelge 3. 2 Bitkide büyüme ve numune alım günleri günleri

Günler	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Alınan	Ekim								N1	N2	N3		N4		N5
Numune (N)	Yapıldı														

N1 (kontrol) : ekim yapıldıktan sonra 9.gün alınan numune

N2 (T=0) : 9.gün azot açlığına bırakılan (26 saat) numune

N3 (T=1) : 10.gün azot kaynağı olarak erlenlere eklenen birinde $(NH_4)_2SO_4$, diğerinde KNO_3 bulunan iki farklı numune

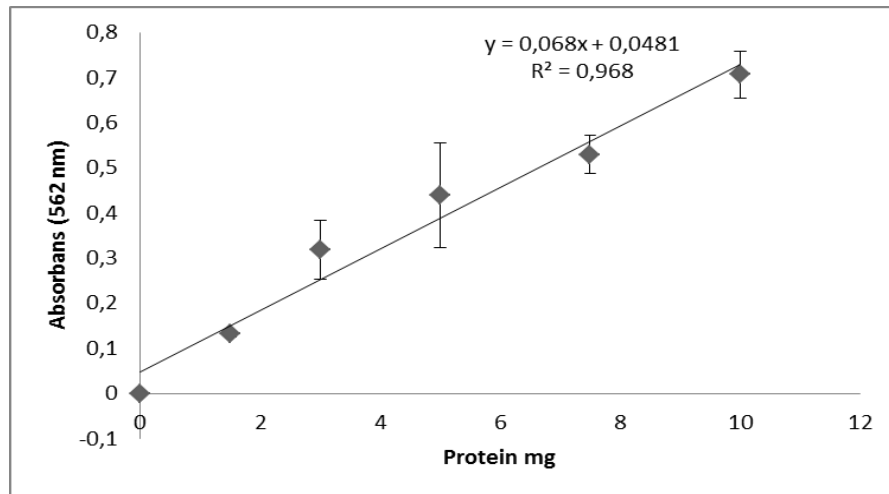
N4 (T=3) : 13.günde alınan birinde $(NH_4)_2SO_4$, diğerinde KNO_3 bulunan iki farklı numune

N5 (T=5) : 15.günde alınan birinde $(NH_4)_2SO_4$, diğesinde KNO_3 bulunan iki farklı numune

3.2.3 Toplam Protein Miktarının Belirlenmesi

Numunelerdeki protein miktarı Bikinkoninik asit (BCA) yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Bu yöntemde proteindeki peptid bağlarının $CuSO_4$ çözeltisindeki Cu^{+2} , nin Cu^{+1} 'e indirgenmesi ve daha sonra Cu^{+1} 'in BCA ile verdiği renkli kompleksin 562 nm'de spektrofotometre'de okunması esasına dayanır[59].

Protein miktarının belirlenmesi için 100 mg numune içinde 50 mM KH_2PO_4 (pH 7.80), %2 PVP, 1 mM EDTA bulunan 1 ml tampon içerisinde iyice homojenize edilmiş, daha sonra homojenat 13000g devirde 15 dk santrifüj edilmiştir. İşlem sonrasında elde edilen süpernatanttan 2 µl alınıp üzerine 1/50 oranında hazırlanmış olan BCA çözeltisinden (1 birim bakır sülfat'a 50 birim bikinkoninik asit) 200 µl ilave edilmiş ve son hacim ddH₂O ile 210 µl'ye tamamlanmıştır. Elde edilen karışım 60 °C'de 30 dk inkübe edilmiş ve inkübe sonunda 5 dk oda sıcaklığında bekletilip, 562nm'de spektrofotometrede ölçülmüştür. Elde edilen değerler hazırlanmış olan standart grafik yardımı ile (şekil 3.1); mg protein/gr doku olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3. 1 Protein tayini için hazırlanmış standart grafik

3.2.4 Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

Antioksidan CAT, SOD, GR, AP enzim aktivitelerinin belirlenmesi için derin dondurucudan alınan 500 mg doku örneği içinde 50 mM KH₂PO₄ (pH 7.80), %2 PVP, 1 mM EDTA bulunan 5 ml tampon içerisinde homojenize edilmiş, homojenat 13000g devirde 15 dk santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatant enzim ekstraktı olarak kullanılmıştır.

3.2.4.1 Katalaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Katalaz (CAT; EC 1.11.1.6) aktivitesi tayini; H₂O₂ miktarında meydana gelen azalmanın CAT aktivitesine bağlı olarak 240 nm dalga boyunda incelenmesi esasına dayanır[60]. Katalaz enzimi hidrojen peroksiti su ve oksijene ayırır.



CAT aktivitesi tayini için 3 ml'lik quartz küvet kullanılmıştır. Küvetin içine 2,92 ml hacminde, içinde 19 mM H₂O₂ bulunan 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7,00) bulunan karışım konulmuştur. Daha sonra 80 µl enzim ekstraktı ilavesi ile birlikte reaksiyon karışımındaki H₂O₂ miktarındaki azalma 240 nm dalga boyunda 3 dk boyunca izlenmiştir. CAT spesifik aktivitesi enzim ekstraktındaki protein miktarı belirlendikten sonra şu formül ile hesaplanmıştır.

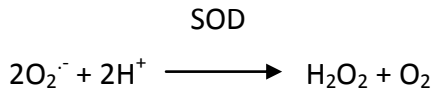
Spesifik aktivite (µmol H₂O₂/mg protein/dk) = $\frac{([\Delta A_{240 \text{ nm/dk}} \times 1000] / [43.6^* \times (\text{mg protein/ ml reaksiyon karışımı})])$

*43,6 H₂O₂'nin ekstinksiyon katsayısı

3.2.4.2 Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Süperoksit dismutaz (SOD; EC 1.15.1.1) aktivitesi; SOD enziminin, süperoksit radikallerinin riboflavin varlığında nitro blue tetrazolium (NBT) bileşiği ile fotokimyasal

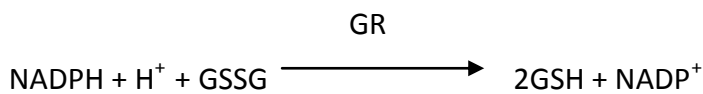
olarak mavi renkli formazana indirgenmesi reaksiyonunu inhibe etmesi esasına dayanır[61]. SOD enzimi süperoksit radikalini; su ve hidrojen peroksit'e dönüştürür.



SOD aktivitesi için 3 ml'lik küvet kullanılmıştır. Reaksiyon karışımı 50 mM Na₂HPO₄ (pH 7,80), 13 mM metiyonin, 75 µM NBT, 2 µM riboflavin ve 0,1 M EDTA'dan oluşur. Aktivite ölçümü için 3 ml spektrofotometre küvetine 2,945 ml reaksiyon karışımı, 40 µl enzim ekstraktı ilave edilmiştir. Reaksiyon son konsantrasyon 2 µM olacak şekilde riboflavin ilavesi ile tüp iyice karıştırıldıktan sonra beyaz ışık kaynağı önüne yerleştirilerek başlamıştır. Tüp, ışık kaynağının karşısında 20 dk tutulmuş ve reaksiyon ışık kaynağının kapatılmasıyla durmuştur. 20 dk içerisinde NBT'nin renk açılma yoğunluğu 560 nm'de kör numuneye karşı okunmuştur. Kör numune için, aynı işlemin enzimsiz örneği kullanılmıştır. SOD aktivitesinin 1 ünitesi, 560 nm de gözlenen NBT indirgenmesinin %50 inhibisyonuna neden olan enzim miktarı, 1 enzim ünitesi olarak alınmış ve değerler EÜ/mg protein şeklinde gösterilmiştir.

3.2.4.3 Glutasyon Redüktaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Glutasyon redüktaz (GR; EC 1.6.4.2), okside glutasyonu (GSSG) nikotinamid dinükleotid fosfatı kullanarak redükte glutatyon'a (GSH) indirgeyen bir flavoenzimdir. Enzim etkinliğinin azalması, hücrelerin oksidatif hasardan korunmasını azaltır. Reaksiyon şu şekilde gösterilebilir;



Glutasyon redüktaz enzim aktivitesi NADPH'ın NADP⁺ ya oksidasyonunda meydana gelen absorpsiyon azalmasının 340 nm'de ölçülmesi esasına dayanır[62].

GR aktivitesi için 1 ml'lik küvet kullanılmıştır. Küvetin içine 0,91 ml hacminde içinde 0,025M NaH₂PO₄ (pH 7,80), 0,5 mM GSSG, 0,12 mM NADPH-Na₄ bulunan reaksiyon karışımı ve bunun üzerine 0,09 ml enzim ekstraktı ilave edilmiştir. 3 dk boyunca NADPH'ın oksidasyonundan kaynaklanan absorpsiyondaki azalma gözlemlenmiştir. 1

enzim ünitesi olarak 1 dakikada mg protein başına 1 µM NADPH'ın oksidasyonu kabul edilmiştir. Numunelerdeki GR aktivitesi;

Spesifik aktivite ($\mu\text{mol yükseltgenmiş NADPH/mg protein}^*/\text{dk}$) = $([\Delta A_{340 \text{ nm}}/6,22^{**}]/\text{mg protein})$

formülünden hesaplanmıştır.

* 0,1 ml enzim ekstraktında bulunan protein miktarı

** 6,22 NADPH'ın ekstinksiyon katsayısı

3.2.4.4 Askorbat Peroksidaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Askorbat peroksidaz (AP; EC 1.11.1.11) aktivitesi; H_2O_2 ile bağımlı askorbik asit oksidasyonundan kaynaklanan absorbandsdaki azalmanın 290 nm dalga boyunda okunması esasına dayanır[63]. Reaksiyon;



Şeklinde gösterilebilir. Reaksiyon karışımı 50 mM Na_2HPO_4 (pH 7.00), 0,5 mM askorbik asit, 0,3 mM H_2O_2 ve 0,1 mM EDTA- Na_2 'den oluşmaktadır. AP aktivitesinin belirlenmesinde 1 ml'lik quartz küvet kullanılmıştır. Küvetin içine 940 µl reaksiyon karışımı, 40 µl enzim ekstraktı ilave edilmiştir. 20 µl H_2O_2 ilavesi ile reaksiyon başlatılmıştır. 290 nm dalga boyunda 3 dk boyunca absorband değişimi gözlemlenmiştir.

Spesifik aktivite ($\mu\text{mol yükseltgenen askorbat/mg protein}^*/\text{dk}$) = $([\Delta A_{290 \text{ nm}} / 2,8^{**}]/\text{mg protein})$

formülünden hesaplanmıştır.

* reaksiyon karışımına ilave edilen enzim ekstraktı içerisinde bulunan protein miktarı

** 2,8 askorbik asitin ekstinksiyon katsayısı

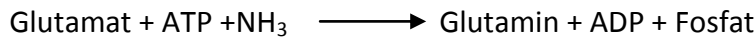
3.2.5 GS, GDH ve GOGAT Aktivitelerinin Belirlenmesi

Glutamin sentetaz (GS) ve Glutamat dehidrogenaz (GDH) enzimleri aktiviteleri ölçümleri için 500 mg doku örneği içinde; 25 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM merkaptotanol, 1 mM GSH, 10 mM MgSO₄, 5 mM glutamat, %2 PVP ve % 0,01 Triton bulunan 5 ml ekstraksiyon tamponu (pH 8,00) içerisinde iyice homojenize edilmiş ve homojenat 12000g devirde 25 dk santrifüjlendikten sonra elde edilen süpernatant enzim ekstraktı olarak kullanılmıştır.

Glutamat oxoglutarat aminotransferaz (GOGAT) aktivitesi için içerisinde iyice homojenize edilmiş ve homojenat 12000g devirde 25 dk santrifüjlendikten sonra elde edilen süpernatant enzim ekstraktı olarak kullanılmıştır.

3.2.5.1 Glutamin Sentetaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Glutamin sentetaz (GS; EC 6.3.1.2) aktivitesi için reaksiyon karışımı; 15 µmol ATP, 20 µmol MgSO₄, 5 µmol hidroksilamin, 60 µmol L-glutamat ve 37,75 µmol Tris (pH 7,60) içermektedir. 0,25 ml enzim ekstraktı alınıp, üzerine 0,75 ml reaksiyon karışımı ilave edilmiş, 30 °C 'de 30 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 0,75 ml ferric chloride ilavesi ile reaksiyon sonlandırılmıştır. Karışım 500g devirde 10 dk santrifüj edildikten sonra 500 nm dalga boyunda ölçülmüştür[64]. Kör numuna olarak enzim ekstraktı yerine, ekstraksiyon tamponu kullanılmış, aynı işlemlerden geçirilmiştir. GS reaksiyonu şu şekilde ilerler;



3.2.5.2 Glutamat Dehidrogenaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Glutamat dehidrogenaz (GDH; EC 1.4.1.2) aktivitesi; deaminasyon reaksiyonunun spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır. Deaminasyon reaksiyon karışımı; 100 mM Tris-HCl (pH 9,40), 50 mM L-glutamat, 0,625 mM NAD⁺, 1 mM CaCl₂'dan oluşmaktadır. 950 µl reaksiyon karışımı alınıp üzerine 50 µl enzim ekstraktı ilave edilmesiyle reaksiyon başlamıştır. 340 nm dalga boyunda 3, 15 ve 30 dk değerleri ölçülmüştür[62].

GDH reaksiyonu şu şekilde ilerler;



3.2.5.3 Glutamat-2-oxoglutarat aminotransferaz Aktivitesinin Belirlenmesi

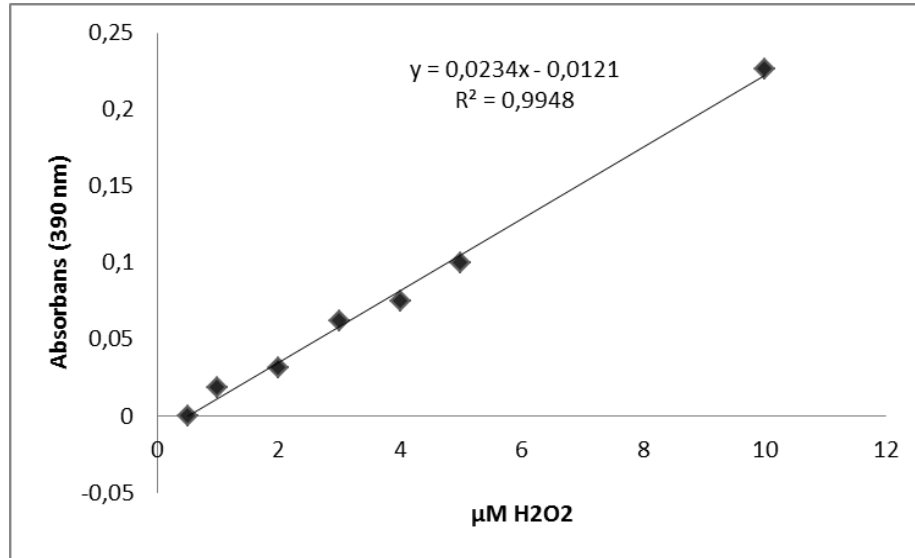
Glutamat-2-oxoglutarat aminotransferaz (GOGAT; EC 1.4.7.1) aktivitesi için reaksiyon karışımı; 50 mM tris-HCl (pH 7,50), 5 mM L-glutamin, 5 mM α -ketoglutarat, 0,1 mM NADH içerir. 950 μ l reaksiyon karışımı alınıp üzerine 50 μ l enzim ekstraktı ilave edilip, 30 $^{\circ}$ C' deki su banyosunda inkübe edilmiştir. Karışım 0, 15 ve 30 dk sonunda 340 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçülmüştür. Kör olarak enzim ekstraktı yerine ekstraksiyon tamponu kullanılmıştır[65].

GOGAT reaksiyonu şu şekilde ilerler;



3.2.6 Hidrojen Peroksit Miktarının Belirlenmesi

Dokulardaki H_2O_2 miktarı tayini için 100 mg örnek 1 ml % 0,1 (w/v) TCA ile iyice homojenize edildikten sonra 13000g devirde 15 dk santrifüj edilmiştir. 0,5 ml süpernatanta eşit hacimde 10 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7,00) ve 1 ml 1M KI ilave edilmiştir. Karışımın absorbansı 390 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Standart grafik kullanılarak (şekil 3.2)örneklerdeki H_2O_2 miktarları hesaplanmıştır[66].



Şekil 3. 2 H₂O₂ ölçümü için hazırlanan standart grafik

3.2.7 Lipid Peroksidasyon Düzeylerinin Belirlenmesi

Bitki dokusundaki lipid peroksidasyonu tayini için 100 mg örnek 1 ml % 80 etanol içerisinde iyice homojenize edildikten sonra 3000g devirde 10 dk santrifüj edilmiştir. Daha sonra süpernatant eşit iki hacime bölünüp; birine eşit hacimlerde % 0,65 TBA ve % 0,01 BHT içeren % 20 TCA çözeltisi, diğerine de yine eşit hacimde % 0,01 BHT içeren % 20 TCA çözeltisi ilave edilmiştir. Karışımlar 95 °C 'de 20 dk inkübe edilmiştir. Süre sonunda örnekler 5 dk buz banyosunda soğumaya bırakılmış, reaksiyonun durması sağlanmıştır. Örnekler tekrar 3000g devirde 10 dk santrifüj edildikten sonra süpernatantlar alınıp 532 nm dalga boyunda okunmuş ve 440 nm (antosiyenin için) ve 600 nm (şekerler için) dalga boyundaki spesifik olmayan absorpsiyon için absorpsiyon değerleri belirlenmiştir[67].

Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan malondialdehit (MDA) bileşikleri miktarları aşağıdaki formül yardımı ile 1 gr dokuda bulunan MDA (nmol MDA/ gr doku) şeklinde hesaplanmıştır;

$$[(A^{532}+TBA) - (A^{600}+TBA) - (A^{532}-TBA - A^{600}-TBA)] \longrightarrow A$$

$$[(A^{440}+TBA - A^{600}+TBA) 0,0571 \longrightarrow B$$

$$\text{MDA bileşikleri (nmol / ml süpernatant)} = (A - B/ 157000) 10^6$$

3.3 İstatistiksel Analiz

Nihai sonuçlar t-test yöntemi ile istatistiksel olarak analiz edilmiş, 0,05 hata seviyesinde önemli bulunan değerler istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur.



SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada, azot kaynağı olarak sadece nitrat içeren besin çözeltilisinde büyütülen *Arabidopsis thaliana* bitkisi, belli bir büyüme evresi sonunda azot açlığına bırakılmış ve bu ortama yeni azot kaynağı olarak nitrat veya amonyum ilave edilerek nitrat ve amonyum'a cevapta bitkinin tamamında meydana gelen bazı biyokimyasal değişimler incelenmiştir. Sonuçlar, her bir parametre için en az iki tekrar ve her bir tekrar için üç tekerrür yapıldıktan sonra elde edilen altı değer in ortalaması olarak verilmiştir. Grafiklerde kullanılan gruptaki isimlendirmeler ve bunların anlamları aşağıdaki gibi verilmiştir. Grafiklerdeki bütün gruplar kontrol ile karşılaştırılarak istatistiksel olarak yorumlanmıştır.

C: kontrol grubu 9.gün

To: azot açlığına bırakılan grup 10.gün

A1: amonyum ilave edilmiş grup 11.gün (yeni azot ilavesi sonrası 1. gün)

A3: amonyum ilave edilmiş grup 13.gün (yeni azot ilavesi sonrası 3. gün)

A5: amonyum ilave edilmiş grup 15.gün (yeni azot ilavesi sonrası 5. gün)

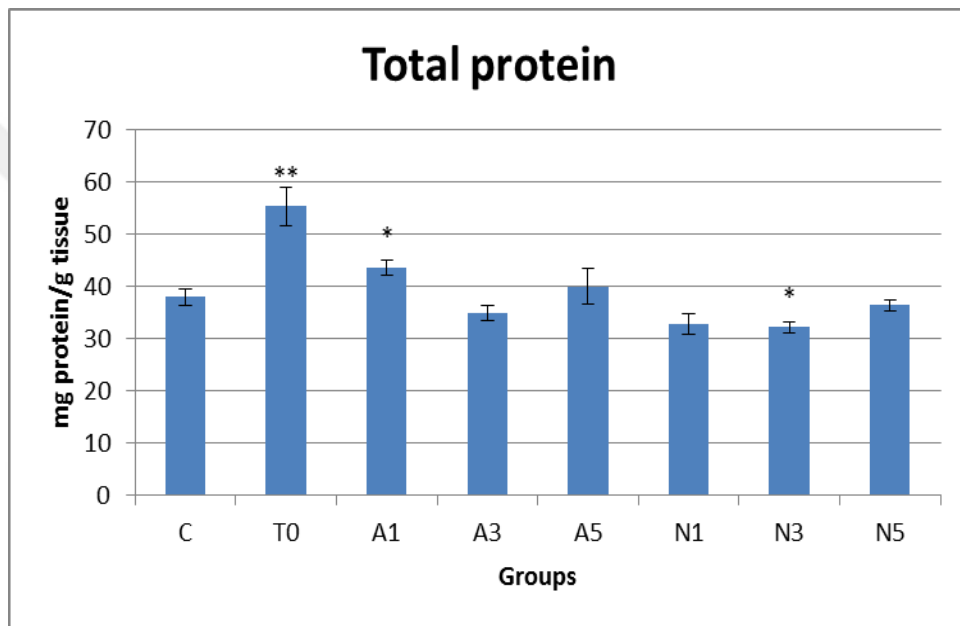
N1: nitrat ilave edilmiş grup 11.gün (yeni azot ilavesi sonrası 1. gün)

N3: nitrat ilave edilmiş grup 13.gün (yeni azot ilavesi sonrası 3. gün)

N5: nitrat ilave edilmiş grup 15.gün (yeni azot ilavesi sonrası 5. gün)

4.1 Toplam Protein İçeriklerinde Meydana Gelen Değişimler

Arabidopsis’de meydana gelen toplam protein miktarındaki değişimleri belirlemek için BCA yöntemi kullanılarak bitkinin farklı günlerdeki protein miktarları ölçülmüştür. Ölçüm sonuçlarına göre; azot açlığına bırakıldığında ve azot kaynağı olarak amonyum ilavesinin ilk gününde protein konsantrasyonunun arttığını, azot kaynağı olarak nitrat ilavesinin üçüncü gününde protein konsantrasyonunun azaldığı, diğer günlerde bir değişimin olmadığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.1).

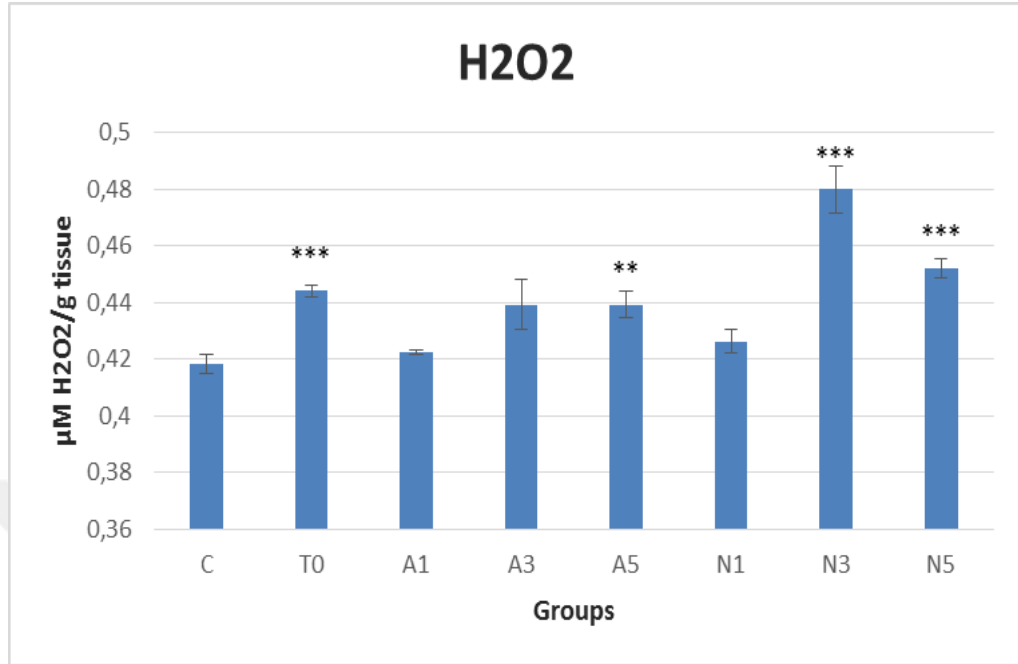


Şekil 4. 1 Arabidopsis’in protein içeriklerinde meydana gelen değişimler

4.2 Hidrojen Peroksit Konsantrasyonunda Meydana Gelen Değişimler

Organizmaların uzun süre strese maruz kalmaları, reaktif oksijen türlerinin (ROT) artmasına neden olur. Eğer ROT’lar etkin bir biçimde temizlenmezse, bu oksidatif stres organizmanın ölümüne neden olabilir. Farklı günlerde hidrojen peroksit miktarları ölçülen Arabidopsisin istatistiksel sonuçlarına göre; azot açlığına bırakıldığında hidrojen peroksit miktarı belirgin bir şekilde artmıştır. Azot kaynağı olarak amonyum kullanıldığında birinci ve üçüncü gün konsantrasyon kontrol grubu değerlerinde bulunmuş, beşinci gün ise artmıştır. Azot kaynağı olarak nitrat alındığında birinci gün

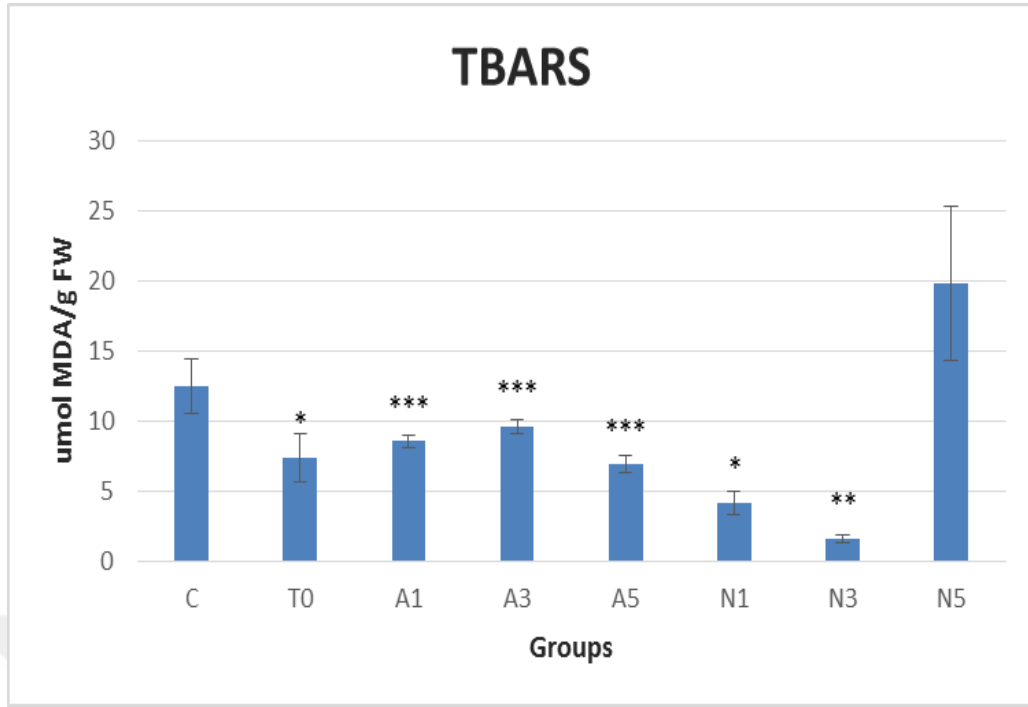
hidrojen peroksit konsantrasyonu kontrol grubu değerinde bulunmuş, üçüncü ve beşinci gün ise bu konsantrasyon önemli derece artmıştır (şekil 4. 2).



şekil 4. 2 H₂O₂ miktarlarında meydana gelen değişim

4.3 Lipid Peroksidasyonu Düzeylerinde Meydana Gelen Değişimler

Uzun süre oksidatif strese maruz kalan organizmalarda reaktif oksijen türlerinin etkili bir şekilde temizlenememesi sonucu oluşan hasarların başında lipidlerin oksitlenerek malonildialdehit'li (MDA) bileşiklerin oluşması gelir. Farklı zamanlarda lipid peroksidasyonu düzeyleri ölçülen bitkinin istatistiksel sonuçlarına göre; azot açlığına bırakıldığında MDA'lı bileşiklerin miktarlarında bir azalma meydana gelmiştir. Azot kaynağı olarak amonyum kullanıldığında bu durum değişmemiştir. Azot kaynağı olarak nitrat kullanıldığında birinci ve üçüncü günlerde de bu azalma devam etmiştir. Beşinci gün ise kontrol grubuna kıyasla ihmal edilebilecek seviyede bir artış gözlemlenmiştir (şekil 4.3). (Elde edilen beşinci gün değerlerine tam güvenememekteyiz).



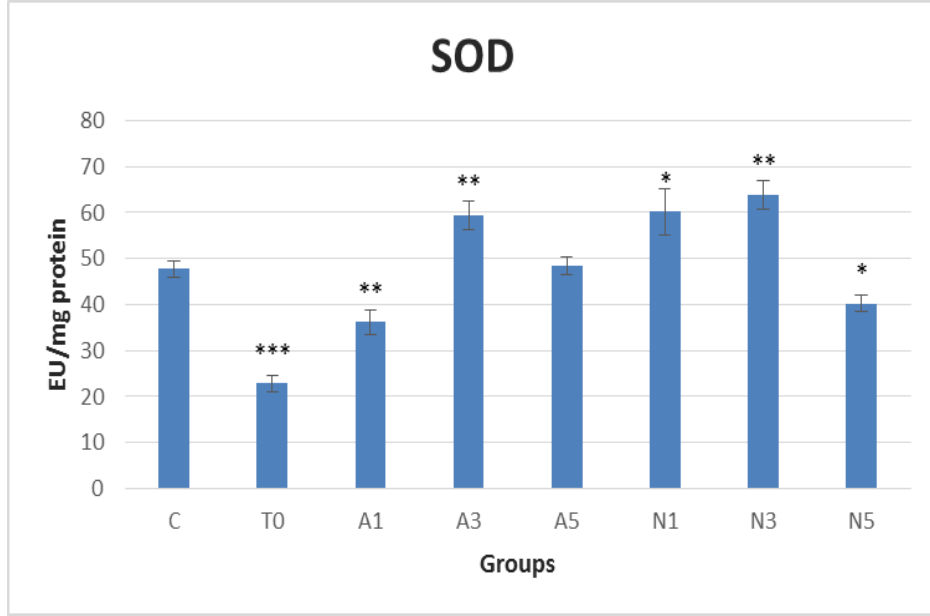
Şekil 4. 3 Lipid peroksidasyonu değerlerinde meydana gelen değişimler

4.4 Antikoksidan Enzim Aktivitelerinde Meydana Gelen Değişimler

Bu enzimlerden süperoksit dismutaz; iki süperoksit molekülünü hidrojen peroksit ve suya dönüştürür. Hidrojen peroksit ise genellikle CAT enzimi tarafından suya çevrilir. Bitkinin büyüme koşullarında ve sürecinde meydana gelen değişimlere cevapta oluşan oksidatif stresin düzeyinin belirlenmesinde; hidrojen peroksit miktarındaki ve antioksidan enzim aktivitelerindeki değişim önemlidir.

4.4.1 Süperoksit Dismutaz Aktivitesinde Meydana Gelen Değişimler

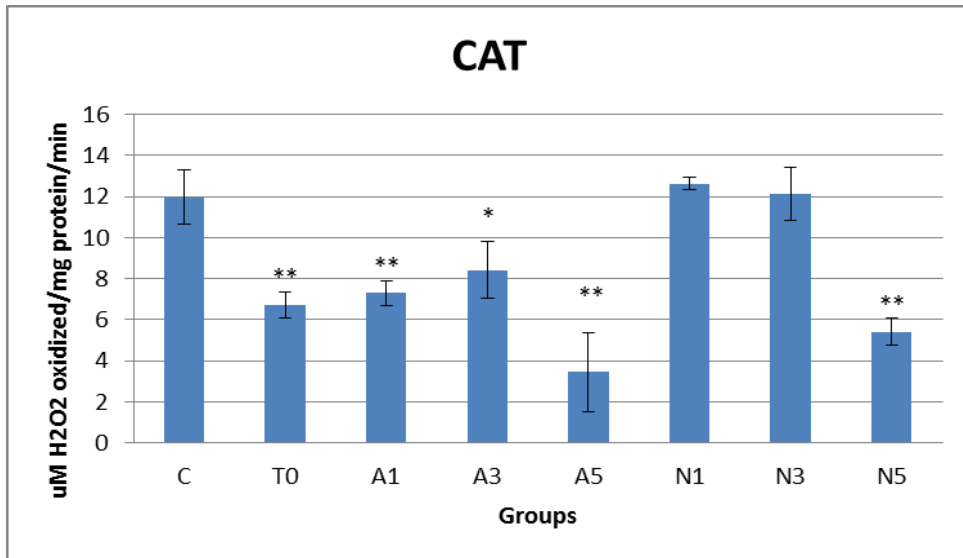
Süperoksit dismutaz enzimi aktivitesi; bitki azot açlığına bırakıldığında azalmış, bu azalma azot kaynağı olarak amonyum ilavesinin birinci gününe kadar devam etmiştir. Amonyum ilavesinin üçüncü günü aktivite artmasına rağmen, beşinci günü bu artış yerini kontrol değerine bırakmıştır. Azot kaynağı olarak nitrat ilavesinin birinci ve üçüncü günü SOD aktivitesi artmış, fakat beşinci günü azalmıştır (Şekil 4.4).



Şekil 4. 4 Süperoksit dismutaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişimler

4.4.2 Katalaz Enzim Aktivitesinde Meydana Gelen Değişimler

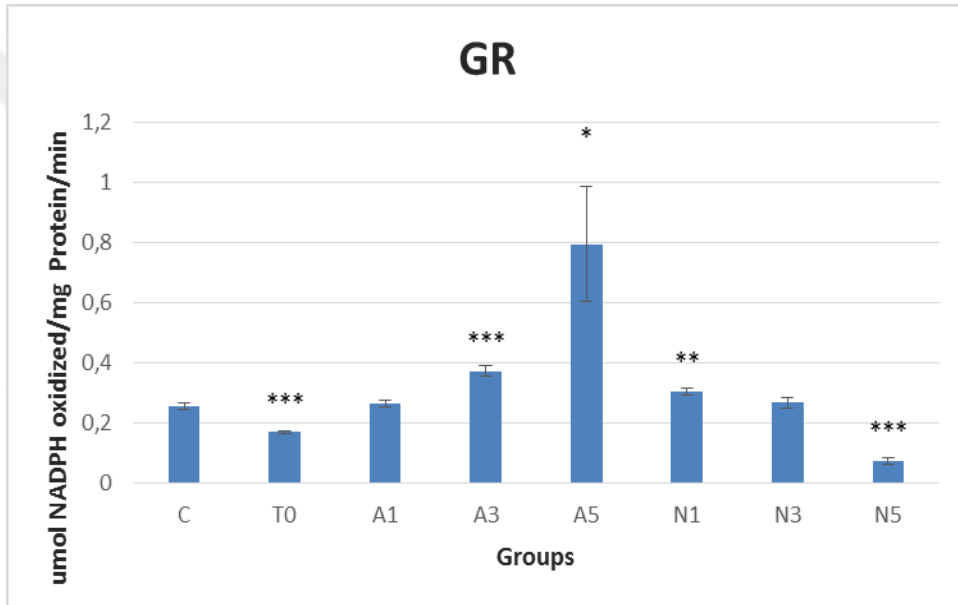
Katalaz enzim aktivitesi; bitkiler azot açlığına bırakıldığında ve azot kaynağı olarak amonyum ilave edildiğinde birinci, üçüncü ve beşinci günlerde azalmıştır. Azot kaynağı olarak nitrat ilavesinin birinci ve üçüncü gününde CAT aktivitesinde değişme gözlenmez iken, nitrat ilavesinin beşinci gününde CAT aktivitesi önemli düzeyde düşük bulunmuştur (Şekil 4.5).



Şekil 4. 5 Katalaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişimler

4.4.3 Glutasyon Redüktaz Aktivitesinde Meydana Gelen Değişimler

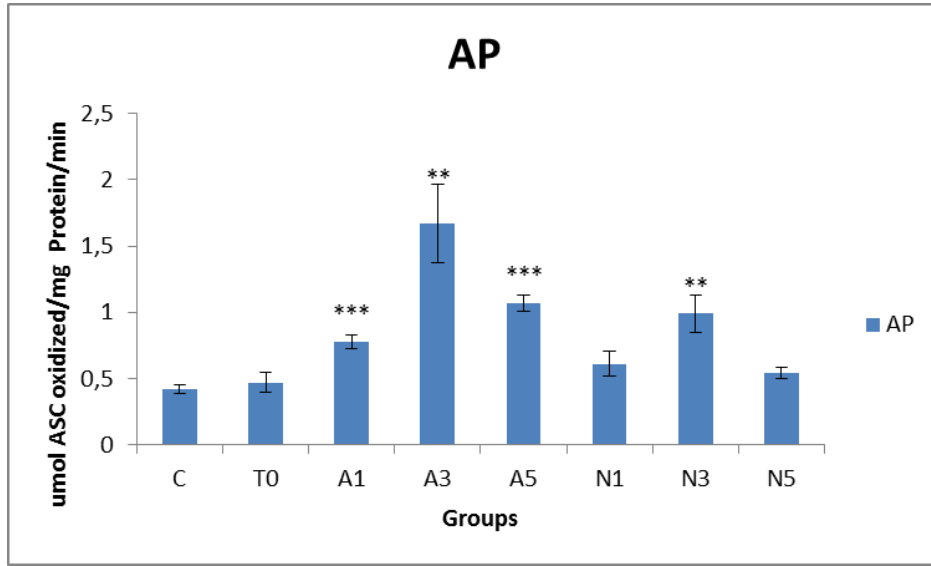
Glutasyon redüktaz enzim aktivitesi; bitki azot açlığına bırakıldığında önemli miktarda azalmıştır. Azot kaynağı olarak amonyum kullanıldığında; birinci gün bir değişiklik gözlemlenmezken, üçüncü ve beşinci gününde aktivite artmış, beşinci gündeki aktivite yüksek bulunmuştur. Azot kaynağı olarak nitrat kullanıldığında; birinci gün az bir artış olmuş, üçüncü günde bu artış kontrol değerlerine bırakmış, beşinci günde ise hem önemli bir azalma görülmüş hemde kontrol grubuna kıyasla GR aktivitesi düşük bulunmuştur (Şekil 4.6).



Şekil 4. 6 Glutasyon redüktaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişimler

4.4.4 Askorbat Peroksidaz Aktivitesinde Meydana Gelen Değişimler

Askorbat peroksidaz enzim aktivitesi; bitki azot açlığına bırakıldığında değişmemiştir. Azot kaynağı olarak amonyum ilave edildiğinde birinci gün aktivite kontrol grubu değerine göre önemli ölçüde artmış, bu artış üçüncü ve beşinci günlerde de devam etmiştir. Azot kaynağı olarak nitrat kullanıldığında AP aktivitesi birinci gün kontrol grubu seviyesinde olmasına rağmen üçüncü gün önemli oranda artmıştır. Fakat bu artış beşinci gün tekrar kontrol grubu seviyesine düşmüştür (Şekil 4.7).

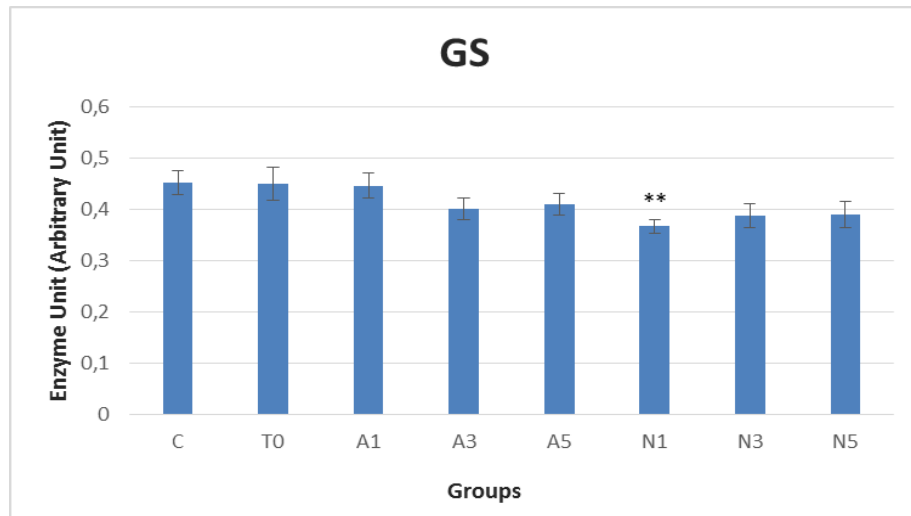


Şekil 4. 7 Askorbat peroksidaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişimler

4.5 GS, GDH ve GOGAT Aktivitelerinde Meydana Gelen Değişimler

4.5.1 Glutamin Sentetaz Aktivitesinde Meydana Gelen Değişimler

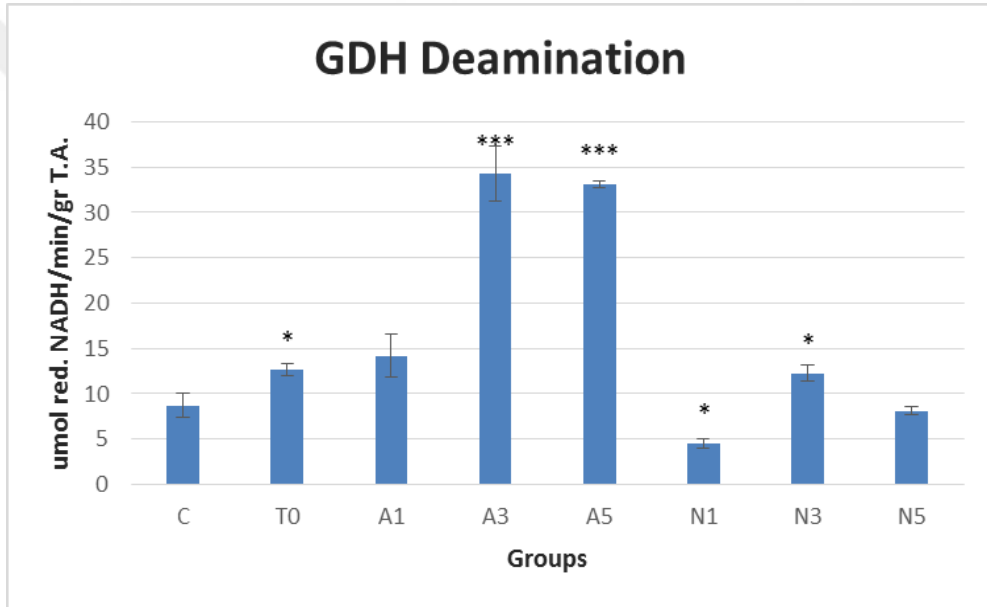
Glutamin sentetaz aktivitesi incelendiğinde; bitki azot açlığına bırakıldığında bir değişim olmamıştır. Azot kaynağı olarak amonyum ilave edildiğinde; birinci, ikinci ve üçüncü günde yine aktivite kontrol grubu değerlerinde devam etmiştir. Azot kaynağı olarak nitrat ilave edildiğinde; birinci günde bir azalma meydana gelmiştir, fakat ikinci ve üçüncü günlerde aktivite kontrol grubu değerlerine çıkmıştır (Şekil 4.8).



Şekil 4. 8 Glutamin sentetaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişimler

4.5.2 Glutamat Dehidrogenaz Deaminasyon Aktivitesinde Meydana Gelen Değişimler

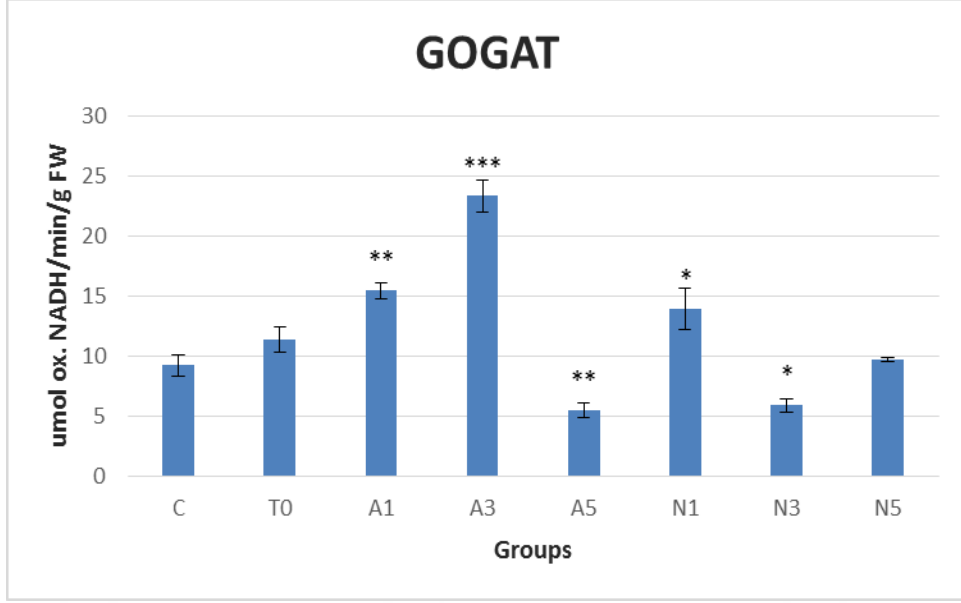
GDH enzim aktivitesi sonuçlarına göre; bitki azot açlığına bırakıldığında aktivitede bir artış gözlemlenmiştir. Azot kaynağı olarak amonyum ilave edildiğinde birinci gün aktivite kontrol seviyesinde kalmış, üçüncü ve beşinci günler önemli ölçüde artmıştır. Azot kaynağı olarak nitrat kullanıldığında ise; birinci gün aktivite azalmış, üçüncü gün ise artmıştır. Beşinci gün ise kontrol grubu seviyelerinde gözlemlenmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9 GDH Deaminasyon aktivitesinde meydana gelen değişimler

4.5.3 Glutamat-2-oxoglutarat Aminotransferaz Aktivitesinde Meydana Gelen Değişimler

GOGAT enzim aktivitesi sonuçlarına göre; azot açlığına bırakılan bitkide bir değişim olmamıştır. Azot kaynağı olarak amonyum verildiğinde birinci ve üçüncü günlerde aktivite önemli derecede artmış, beşinci günde ise önemli derecede azalmıştır. Azot kaynağı olarak nitrat verildiğinde birinci gün artış, üçüncü gün ise azalış olmuştur. Beşinci gün ise kontrol grubu değerine dönmüştür (Şekil 4.10).



Şekil 4. 10 GOGAT aktivitesinde meydana gelen değişimler

4.6 Genel Değerlendirme ve Tartışma

Toplam protein değerlerine bakıldığında (Şekil 4.1), bitki azot açlığına maruz bırakıldığı zaman kontrole göre artan protein değeri amonyum verildiğinde üçüncü ve beşinci günlerde, nitrat verildiğinde ise birinci ve beşinci günlerde kontrol değerine yakınlaşmıştır. Hem amonyumun hem de nitratın beşinci günde ortak etki gösterdiği görülmektedir. Bitki azot açlığına maruz bırakıldığında azot kaynağı olarak hem amonyum hem de nitrat verildiği zaman, elde edilen toplam protein değerleri T0 ile karşılaştırıldığında bütün günlerde azalma gözlenmiştir. Hem amonyumun hem de nitratın bütün günlerde ortak etki gösterdiği görülmektedir.

Altı saat azot açlığına bırakılan Arabidopsis köklerinde H_2O_2 düzeylerinin arttığı daha önceki başka bir çalışmada gösterilmiştir[68]. Yaptığımız çalışmada, hidrojen peroksit değerlerine bakıldığında (Şekil 4.2), bitki azot açlığına maruz bırakıldığı zaman kontrole göre artan H_2O_2 değeri amonyum verildiğinde birinci ve üçüncü günlerde, nitrat verildiğinde ise birinci günde kontrol değerine yaklaşmıştır. Hem amonyumun hem de nitratın birinci günde ortak etki gösterdiği görülmektedir. Bitki azot açlığına maruz

birakıldığında azot kaynağı olarak amonyum verildiği zaman elde edilen değerler T0 ile karşılaştırıldığında H_2O_2 değeri birinci günde azalırken nitrat verildiğinde ise birinci günde azalma ve üçüncü günde artış gözlenmiştir. Aynı bitkinin köklerinde yapılan 24 saat süren bir çalışmada[25], azot kaynağı olarak nitrat verildiğinde H_2O_2 düzeylerinde 24. saate kadar önemli düşüşler gözlenirken amonyum verildiğinde ilk saatlerde H_2O_2 düzeyi yüksek iken 1.5 saatten sonra azalmaya başlamıştır. Bizim çalışmamızdan elde edilen bir günlük sonuçlar bu çalışma ile paralellik göstermektedir.

Lipid peroksidasyonu değerlerine bakıldığında (Şekil 4.3), bitki azot açlığına maruz bırakıldığı zaman kontrole göre azalan MDA değeri amonyum ve nitrat verildiğinde (N5 hariç) kontrol değerine yaklaşmamıştır. Hem amonyumun hem de nitratın bütün günlerde ortak etki gösterdiği görülmektedir. Bitki azot açlığına maruz bırakıldığında azot kaynağı olarak amonyum verildiği zaman elde edilen değerler T0 ile karşılaştırıldığında, birinci ve üçüncü günlerde artış gözlenirken nitrat verildiğinde (N5 hariç) birinci ve üçüncü günlerde düşüş gözlenmiştir. Bu sonuçlardan amonyum ve nitratın ters etki gösterdiği görülmektedir. Aynı bitkinin köklerinde yapılan 24 saat süren bir çalışmada[24], azot kaynağı olarak hem nitrat hem de amonyum verildiğinde MDA düzeylerinde 24. saate kadar önemli bir değişim gözlenmemiştir.

Süperoksit dismutaz aktivitesi değerlerine bakıldığında (Şekil 4.4), bitki azot açlığına maruz bırakıldığı zaman kontrole göre azalan SOD aktivite değeri sadece amonyum verildiğinde beşinci günde kontrol değerine yaklaşmıştır. Bitki azot açlığına maruz bırakıldığında azot kaynağı olarak hem amonyum hem de nitrat verildiği zaman elde edilen değerler T0 ile karşılaştırıldığında, hem amonyumun hem de nitratın SOD değerlerini arttırdığı görülmektedir. Aynı bitkinin köklerinde yapılan 24 saat süren bir çalışmada[25] azot kaynağı olarak nitrat verildiğinde SOD düzeylerinde 24. saate kadar değişim gözlenmezken amonyum verildiğinde ilk saatlerde SOD düzeyi yüksek iken 1.5 saatten sonra azalmaya başlamıştır.

Katalaz aktivitesi değerlerine bakıldığında (Şekil 4.5), bitki azot açlığına maruz bırakıldığı zaman kontrole göre azalan CAT aktivite değeri sadece nitrat verildiğinde

birinci ve üçüncü günlerde kontrol değerine yaklaşmıştır. Bitki azot açlığına maruz bırakıldığında azot kaynağı olarak amonyum verildiği zaman elde edilen değerler T0 ile karşılaştırıldığında, üçüncü günde artış ve beşinci günde azalma gözlenirken nitrat verildiğinde ise birinci ve üçüncü günde artış ve beşinci günde düşüş gözlenmiştir. Aynı bitkinin köklerinde yapılan 24 saat süren bir çalışmada[25], azot kaynağı olarak hem nitrat hem de amonyum verildiğinde CAT düzeylerinde 24. saate kadar önemli bir değişim gözlenmemiştir.

Glutasyon redüktaz aktivitesi değerlerine bakıldığında (Şekil 4.6), bitki azot açlığına maruz bırakıldığı zaman kontrole göre azalan GR aktivite değeri amonyum verildiğinde birinci günde, nitrat verildiğinde ise üçüncü günde kontrol değerine yaklaşmıştır. Hem amonyumun hem de nitratın farklı günlerde ortak etki gösterdiği görülmektedir. Bitki azot açlığına maruz bırakıldığında azot kaynağı olarak amonyum verildiği zaman elde edilen değerler T0 ile karşılaştırıldığında, birinci, üçüncü ve beşinci günlerde artış gözlenirken nitrat verildiğinde ise birinci ve üçüncü günlerde artış ve beşinci günde azalma gözlenmiştir. Aynı bitkinin köklerinde yapılan 24 saat süren bir çalışmada (2010 Peterson), azot kaynağı olarak nitrat verildiğinde GR enzim aktivitesi düzeylerinde 24. saate kadar düşüşler gözlenirken amonyum verildiğinde ilk saatlerde GR enzim aktivitesi düzeyi yüksek iken 1.5 saatten sonra azalmaya başlamıştır. Amonyuma cevapta GR enzim aktivitelerindeki artışlar[69] ve [70] tarafından da rapor edilmiştir. Bu durum askorbat/glutasyon havuzunun amonyuma cevapta ROT detoksifikasyonunda aktif rol oynadığını gösterir.

Askorbat peroksidaz aktivitesi değerlerine bakıldığında (Şekil 4.7), bitki azot açlığına maruz bırakıldığı zaman kontrole göre değişmeyen AP aktivite değeri sadece nitrat verildiğinde birinci ve beşinci günlerde kontrol değerinde kalmıştır. Bitki azot açlığına maruz bırakıldığında azot kaynağı olarak amonyum verildiği zaman elde edilen değerler T0 ile karşılaştırıldığında, tüm günlerde; nitrat verildiğinde de birinci ve üçüncü günlerde artış gözlenmiştir. Aynı bitkinin köklerinde yapılan 24 saat süren bir çalışmada [24], azot kaynağı olarak nitrat verildiğinde AP enzim aktivitesi düzeylerinde 24. saate kadar düşüşler gözlenirken amonyum verildiğinde tüm saatlerde AP enzim aktivitesi düzeyleri artmıştır. Amonyuma cevapta AP enzim aktivitelerindeki artışlar[69] ve [70]

tarafından da rapor edilmiştir. Bu durum askorbat/glutasyon havuzunun amonyuma cevapta ROT detoksifikasyonunda aktif rol oynadığını gösterir.

Glutamin sentetaz aktivitesi değerlerine bakıldığında (Şekil 4.8), bitki azot açlığına maruz bırakıldığı zaman kontrole göre değişmeyen GS aktivite değeri hem amonyum hem de nitrat (N1 hariç) verildiğinde kontrol değerinde kalmıştır. Bitki azot açlığına maruz bırakıldığında azot kaynağı olarak amonyum verildiği zaman elde edilen değerler T0 ile karşılaştırıldığında, üçüncü ve beşinci günlerde; nitrat verildiğinde de tüm günlerde hafif bir azalma gözlenmiştir.

Glutamat dehidrogenaz deaminasyon aktivitesi değerlerine bakıldığında (Şekil 4.9), bitki azot açlığına maruz bırakıldığı zaman kontrole göre artan GDH deaminasyon aktivite değeri amonyum verildiğinde birinci günde, nitrat verildiğinde ise beşinci günde kontrol değerine yaklaşmıştır. Hem amonyumun hem de nitratin farklı günlerde ortak etki gösterdiği görülmektedir. Bitki azot açlığına maruz bırakıldığında azot kaynağı olarak amonyum verildiği zaman elde edilen değerler T0 ile karşılaştırıldığında, üçüncü ve beşinci günlerde artış; nitrat verildiğinde ise birinci ve beşinci günlerde düşüş gözlenmiştir.

Glutamat-2-oxoglutarat aminotransferaz aktivitesi değerlerine bakıldığında (Şekil 4.10), bitki azot açlığına maruz bırakıldığı zaman kontrole göre değişmeyen GOGAT aktivite değeri sadece nitrat verildiğinde beşinci günde kontrol değerine yaklaşmıştır. Bitki azot açlığına maruz bırakıldığında azot kaynağı olarak amonyum verildiği zaman elde edilen değerler T0 ile karşılaştırıldığında, birinci ve üçüncü günlerde artış ve beşinci günde azalma gözlenirken nitrat verildiğinde birinci gün artış ve üçüncü gün azalma gözlenmiştir.

Bitki azot açlığına maruz bırakıldığında azot kaynağı olarak hem amonyum hem de nitrat verildiği zaman bu çalışmada elde edilen sonuçlar aşağıdaki gibi özetlenebilir:

- Hem amonyum hem de nitrat protein değerlerini azaltmıştır.
- Hem amonyum hem de nitrat H₂O₂ değerlerini birinci günde azaltmış, sadece nitrat üçüncü günde arttırmıştır.

- Amonyum ve nitrat MDA'lı bileşiklerin değerlerinde ters etki göstermiştir.
- Hem amonyum hem de nitrat SOD aktivitelerini arttırmıştır.
- Hem amonyum hem de nitrat CAT aktivitelerinde genelde aynı etkileri göstermiştir.
- Hem amonyum hem de nitrat GR aktivitelerini genelde arttırmıştır.
- Hem amonyum hem de nitrat AP aktivitelerini genelde arttırmıştır.
- Hem amonyum hem de nitrat GS aktivitelerini genelde azaltmıştır.
- Amonyum ve nitrat GDH aktivitelerinde genelde ters etki göstermiştir.
- Hem amonyum hem de nitrat GOGAT aktivitelerini birinci günde arttırmış, diğer günlerde farklılık göstermiştir.

Farklı inorganik azot formlarının analizinde durumu karmaşık hale getiren potansiyel bir faktör de Arabidopsis'de amonyum asimilasyonu ve nitrat indirgenmesi ve asimilasyonunun aynı organda gerçekleşmeme potansiyelidir. Toprakтан alınan amonyumun, kökten gövdeye taşınımı ile ilgili bazı raporlar bulunsa da[71] genellikle direkt olarak köklerde asimile edildiği kabul edilir[72]. Nitrat indirgenmesi ve asimilasyonu ise bitki türüne ve çevresel şartlara bağlı olarak oldukça değişkenlik gösterir. Arabidopsis'de pek çok çevresel şartlar altında nitrat indirgenmesi ve asimilasyonu için esas alanlar yapraklar olsa da bazı çalışmalarda önemli düzeyde nitrat indirgenmesi ve asimilasyonunun köklerde gerçekleştiğini gösteren bulgular elde edilmiştir. Sonuçta, farklı şekilde ifade olan genler arasında üç genel düzenleyici sınıf tanımlanmıştır: Amonyum-spesifik düzenleme, nitrat-spesifik düzenleme, ve genel inorganik azot düzenleme genleri. Amonyum ve nitrat metabolizmasının bir noktadan sonra örtüşmesinden dolayı nitrat bir kez amonyuma indirgenince, temelde nitrat-spesifik gen setini düzenleyici anahtar sinyali muhtemelen başlı başına nitrat (veya nitrit) iyonu olduğu ifade edilmektedir [25],[26]. Bununla beraber, Arabidopsis'de kök, gövde ve yaprak'tan verilen amonyumun alınımı ile ilgili genetik çalışmalar sonucunda, spesifik dokuların davranışlarındaki farklılıklar hala belirli değildir. Farklı dokulardaki amonyumun dağılımı ve bunların doku spesifik ekspresyon durumu önem

arzetmektedir. Hatta bunların açıklanabilmesi için diğere iyonların da stress durumu göz önüne alınmalıdır[73]. Bu yüzden, bu çalışmada elde edilen verilerle ileri sürülen tezimizin hipotezi detaylı araştırmaya ihtiyaç duymaktadır.



KAYNAKLAR

- [1] Bloom, A.J., Jackson, L.E. and Smart, D.R., (1993). "Root growth as a function of ammonium and nitrate in the root zone", *Plant Cell Environment*, 16: 199-206.
- [2] Kronzucker H.J., Siddiqi, M.Y. and Glass, A.D.M., (1997). "Conifer root discrimination against soil nitrate and the ecology of forest succession", *Nature*, 385: 59-61.
- [3] Chapin, F.S., Moilanen, L. and Kielland, K.,(1993). "Preferential use of organic nitrogen for growth by a non-mycorrhizal arctic sedge", *Nature*, 361: 150-153.
- [4] Guo, S., Brueck, H., and Sattelmacher B., (2002). 'Effects of supplied nitrogen form on growth and water uptake of French bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants". *Plant and Soil*, 239: 267-275.
- [5] Magalhaes, J.R. and Wilcox, G.E., (1983), "Tomato growth and mineral composition as influenced by nitrogen form and light intensity". *Journal of Plant Nutrition*, 6: 847-862
- [6] Magalhaes, J.R. and Wilcox, G.E., (1984), "Ammonium toxicity development in tomato plants relative to nitrogen form and light intensity", *Journal of Plant Nutrition*, 7: 1477-1496
- [7] Zhu, Z., Gerendas, J., Bendixen, R., Schinner, K., Tabrizi, H., Sattelmacher, B., Hansen, U.P., (2000), "Different tolerance to light stress in NO_3^- and NH_4^+ -grown *Phaseolus vulgaris* L." , *Plant Biology*, 2:558-570.
- [8] Ganmore-Neumann, R. and Kafkafi, U., (1980), "Root temperature and percentage $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ effect on tomato plant development. I. Morphology and growth", *Agronomy Journal*, 72: 758-761.
- [9] Ganmore-Neumann, R. and Kafkafi, U., (1983), "The effect of root temperature and $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ ratio on strawberry plants. I. Growth, flowering, and root development", *Agronomy Journal*, 75: 941-947.
- [10] Gerendás, J., Ratcliffe, R.G., and Sattelmacher, B., (1995). "The influence of nitrogen and potassium supply on the ammonium content of maize (*Zea mays* L.) leaves including a comparison of measurements made in vivo and in vitro". *Plants and Soil*, 173: 11-20.

- [11] Schortemeyer, M., Feil, B., and Stamp, P., (1993). "Root morphology and nitrogen uptake of maize simultaneously supplied with ammonium and nitrate in a split-root system". *Annals of Botany*, 72: 107–115.
- [12] Miller, A.J., Cramer, M.D., (2004). "Root nitrogen acquisition and assimilation". *Plant and Soil*, 274: 1–36.
- [13] Loque, D. and von Wieren, N., (2004). "Regulatory levels for the transport of ammonium in plant roots". *Journal of Experimental Botany*, 55: 1293–1305.
- [14] Schumacher, H.J., Sommer, K., (2001). "Cultivation of potatoes by the CULTAN cropping System". Poster presented at international congress of International Plant Nutrition Colloquium (IPNC), Hannover, Germany.
- [15] Roosta, H.R., Schjoerring, J.K., (2007). "Effects of ammonium toxicity on nitrogen metabolism and elemental profile of cucumber (*Cucumis sativus* L., cv. Styx) plants". *Journal of Plant Nutrition*, 30: 1933–1951.
- [16] Sharma, S.S., Dietz, K.J., (2008). "The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance". *Trends in Plant Science*, 14: 43–50.
- [17] Maria Dolores Dominguez-Valdivia, Pedro Maria Aparicio-Tejo, Carmen Lamsfus, Cristina Cruz, Maria Amelia Martins-Louçao and Jose Fernando Moran. (2008). "Nitrogen nutrition and antioxidant metabolism in ammonium-tolerant and – sensitive plants". *Physiologia Plantarum*, 132: 359–369.
- [18] Cao, T., Ni, L.Y., Xie, P., (2004). "Acute biochemical responses of a submersed macrophyte, *Potamogeton crispus* L., to high ammonium in an aquarium experiment". *Journal of Freshwater Ecology*, 19: 279–284.
- [19] Nimptsch, J., Pflugmacher, S., (2007). "Ammonia triggers the promotion of oxidative stress in the aquatic macrophyte *Myriophyllum spicatum*". *Chemosphere*, 66: 708–714.
- [20] Wang, C., Zhang, S.H., Wang, P.F., Hou, J., Li, W., Zhang, W.J., (2008). "Metabolic adaptations to ammonia-induced oxidative stress in leaves of the submerged macrophyte *Vallisneria spiralis* (Lour.)". *Aquatic Toxicology*, 87: 88–98.
- [21] Frechilla, S., Lasa, B., Aleu, M., Juanarena, N., Lamsfus, C., Aparicio-Tejo, P.M., (2002). "Short-term ammonium supply stimulates glutamate dehydrogenase activity and alternative pathway respiration in roots of pea plants". *Journal of Plant Physiology*, 159: 811–818.
- [22] Mifflin, B.J., Lea, P.J., (1980). "Ammonium assimilation". In: Mifflin B.J. (ed) *The biochemistry of plants*. Academic, New York, pp 169–202.
- [23] Crawford, N.M. and Forde, B.G., (2002). "Molecular and Developmental Biology of Inorganic Nitrogen Nutrition", *The Arabidopsis Book*, American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, pp. 1–25.

- [24] Çakmak, T., (2010). Bitki Solunum Zinciri: Farklı Azot Kaynaklarına Cevapta Hücrel Redoks Homeostazisi ve Alternatif Oksidazın Redoks Yanıtları, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- [25] Patterson, K., Cakmak, T., Cooper, A., Lager, I., Rasmusson, AG., Escobar MA. (2010). "Distinct signalling pathways and transcriptome response signatures differentiate ammonium-and nitrate-supplied plants". *Plant, cell & environment*, 33.(9): 1486-1501.
- [26] Escobar, MA., Geisler, DA., Rasmusson, AG. (2006). "Reorganization of the alternative pathways of the Arabidopsis respiratory chain by nitrogen supply: opposing effects of ammonium and nitrate". *The Plant Journal*, 45.(5): 775-788.
- [27] Reisenauer, H.M., (1978). "Absorption and utilization of ammonium nitrogen by plants". In *Nitrogen in the environment*, Vol II. Eds. Nielsen, D.R. and Vol II. Eds. Nielsen, D.R. and McDonald, JG., pp. 157-170. Academic Press, London New York.
- [28] Leutwiler, LS., Hough-Evans, BR., Meyerowitz, EM., (1984). "The DNA of *Arabidopsis thaliana*". *Molecular and General Genetics MGG*, 194(1-2): 15-23.
- [29] Blamey, M., Grey-Wilson, C., (1989). *The Illustrated Flora of Britain and Northern Europe*, First Edition Hodder and Stroughton Sevenoaks, Kent UK.
- [30] Lopez-Bucio J, Campos-Cuevas JC, Hernández-Calderón E.,(2007). "Bacillus megaterium rhizobacteria promote growth and alter root-system architecture through an auxin- and ethylene-independent signaling mechanism in *Arabidopsis thaliana*". *Mol. Plant Microbe Interact.* 20 (2): 207–217.
- [31] Bennett, M. D., Leitch, I. J., Price, H. J., & Johnston, J. S., (2003). "Comparisons with *Caenorhabditis* (100 Mb) and *Drosophila* (175 Mb) Using Flow Cytometry Show Genome Size in *Arabidopsis* to be 157 Mb and thus 25% Larger than the Arabidopsis Genome Initiative Estimate of 125 Mb". *Annals of Botany* 91 (5): 547-557.
- [32] Moreno, N., Bougourd, S., Haseloff, J., Feijo, JA., (2006). Imaging plant cells. In: *Handbook of biological confocal Microscop*, Third edition, Springer US, Newyork.
- [33] Clough, S.J., Bent, A.F., (1998). "Floral dip: a simplified method for Agrobacterium mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*". *Plant J* 16 (6): 735–743.
- [34] Zhang, X., Henriques, R., Lin, S.S., Niu, Q.W., Chua, N.H., (2006). "Agrobacterium mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method". *Nat Protoc* 1 (2): 641–6
- [35] Rosswall, T., (1983). "C, N, P, and S Cycles: Major Reservoirs and Fluxes – The Nitrogen Cycle"; In "The Major Biogeochemical Cycles and Their Interactions". Eds. Bolin, B., Cook, R.B., Scientific Committee on Problems of the Environment (SCOPE).

- [36] Luo, J., Tillman, RW., Ball, PR., (2000). "Nitrogen loss through denitrification in a soil under pasture in New Zealand". *Soil Biology and Biochemistry*, 32: 497–509.
- [37] Strong, DT., Fillery, I.R.P., (2002). "Denitrification response to nitrate concentrations in sandy soils". *Soil Biology and Biochemistry*, 34: 945–954.
- [38] Hodge, A., (2001). "Arbuscular mycorrhizal fungi influence decomposition of, but not plant nutrient capture from, glycine patches in soil". *New Phytologist*, 151: 725–734.
- [39] Lewis, O.A.M., (1986). *Plants and nitrogen*, First edition, Edward Arnold Publishers Ltd., London.
- [40] Dejoux, J.F., Recous, S., Meynard, J.M., Trinsoutrot, I. and Leterme, P., (2000). "The fate of nitrogen from winter-frozen rapeseed leaves: mineralisation, fluxes to the environment and uptake by rapeseed crop in spring". *Plant Soil*, 218: 257–272.
- [41] Bloom, A.J., (1988). "Ammonium and nitrate as nitrogen sources for plant growth". *Atlas of Science: Animal Plant Science*, 1: 55–59.
- [42] Barber, S.A., (1984). *Soil nutrient bioavailability. A mechanistic approach*, First Edition, John Wiley and Sons, New York, NY.
- [43] Jones, D.L., Owen, A.G. and Farrar, J.F., (2002). "Simple method to enable the high resolution determination of total free amino acids in soil solutions and soil extracts". *Soil Biology and Biochemistry*, 34: 1893–1902.
- [44] Owen, A.G. and Jones, D.L., (2001). "Competition for amino acids between wheat roots and rhizosphere microorganisms and the role of amino acids in plant N acquisition". *Soil Biology and Biochemistry*, 33: 651–657.
- [45] Atkin, O.K., (1996). "Reassessing the nitrogen relations of Arctic plants. A mini-review". *Plant Cell and Environment*, 19: 695–704.
- [46] Hagedorn, F., Bucher, J.B. and Schleppei, P., (2001). "Contrasting Dynamics of dissolved inorganic and organic nitrogen in soil and surface waters of forested catchments with Gleysols". *Geoderma*, 100: 173–192.
- [47] Britto, D.T., Kronzucker, H.J., (2002). "NH₄⁺ toxicity in higher plants". *Journal of Plant Physiology*, 159: 567–584.
- [48] Guohua, X., Fan, X., Millwe, AJ., (2012). "Plant nitrogen assimilation and use efficiency". *Annual review of plant biology*, 63: 153-182
- [49] Nadelhoffer, KJ., Aber, JD., Melillo, JM., (1984). "Seasonal patterns of ammonium and nitrate uptake in nine temperate forest ecosystems". *Plant and Soil*, 80.(3): 321-335.
- [50] Jackson, LE., Schimel, JP., Firestone, MK., (1989) "Short-term partitioning of ammonium and nitrate between plants and microbes in an annual grassland". *Soil Biology and Biochemistry*, 21.(3): 409-415.

- [51] Ishii, S., Ikeda, S., Minamisawa, K.; Senoo, K. (2011). "Nitrogen cycling in rice paddy environments: Past achievements and future challenges". *Microbes and environments* 26 (4): 282–292.
- [52] LI, YL., Fan, XR., SHEN, QR., (2008). "The relationship between rhizosphere nitrification and nitrogen-use efficiency in rice plants". *Plant, cell & environment* 31.(1): 73-85.
- [53] Falkengren-Grerup, U., (1995). "Interspecies differences in the preference of ammonium and nitrate in vascular plants". *Oecologia*, 102: 305-311.
- [54] Herrera-Estrella, L., (1999). "Transgenic plants for tropical regions: Some considerations about their development and their their transfer to the small farmer". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96: 5978- 5981.
- [55] Crawford, N.M., (1995). "Nitrate: Nutrient and signal for plant growth". *Plant Cell*, 7: 859-868.
- [56] Heldt, H.W., (1997). *Plant Biochemistry and Molecular Biology*. Oxford University Press, Oxford.
- [57] Stitt, M., Krapp, A., (1999). "The molecular physiological basis for the interaction between elevated carbon dioxide and nutrients". *Plant Cell Environment*, 22: 583–622.
- [58] Salsac, L., Chaillou, S., Morot-Gaudry, J.F., Lesaint, C. and Jolivet, E., (1987). "Nitrate and Ammonium Nutrition in Plants". *Plant Physiology and Biochemistry*, 25: 805-8.
- [59] Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C., (1985). "Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytic Biochemistry*". 150: 76-85.
- [60] Beers, R.F., Sizer, I.W., (1952). "A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase". *Journal of Biological Chemistry*, 195: 133-140.
- [61] Dhindsa, R.S., Plumb-Dhindsa, P. ve Thorpe, T.A., (1981). "Leaf senescence: Correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dimutase and catalase". *Journal of Experimental Botany*, 32: 93-101.
- [62] Foyer CH, Halliwell B (1976). "The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplast: a proposed role in ascorbic acid metabolism". *Planta* 133: 21–25.
- [63] Nakano, Y., Asada, K., (1981). "Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts". *Plant Cell Physiology*, 22: 867–880.

- [64] Robinson, SA., Slade, AP, Fox GG,Phillips R.,Ratcliffe,GR, Stewart GR.(1991). "The role of glutamate dehydrogenase in plant nitrogen metabolism". *Plant Physiology*, 95.(2): 509-516.
- [65] Wallsgrave, RM., Lea, PJ., Mifflin, BJ.,(1982). "The development of NAD (P) H-dependent and ferredoxin-dependent glutamate synthase in greening barley and pea leaves". *Planta*, 154.(5): 473-476.
- [66] Velikova V, Yordanov I, Edreva A. (2000). "Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines". *Plant Sci*; 151: 59–66.
- [67] Hodges D, DeLong J, Forney C, Prange R. (1999). "Improving the thiobarbituric acid reactive- substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds". *Planta*; 207: 604–11.
- [68] Shin, R., Berg, R.H., Schachtman, D.P., (2005). "Reactive oxygen species and root hairs in Arabidopsis root response to nitrogen, phosphorus and potassium deficiency". *Plant Cell Physiology*, 46: 1350-1357.
- [69] Guo, S., Zhou, Y., Shen, Q., Zhang, F., (2006). "Effect of ammonium and Nitrate Nutrition on Some Physiological Processes in Higher Plants – Growth, Photosynthesis, Photorespiration, and Water Relations". *Plant Biology*, 9: 21-29.
- [70] Dominguez-Valdivia, M.D., Aparicio-Tejo, P.M., Lamsfus, C., Cruz, C., Martins-Louçao, M.A., Moran, J.F., (2008). "Nitrogen nutrition and antioxidant metabolism in ammonium-tolerant and - sensitive plants". *Physiologia Plantarum*, 132: 359–369.
- [71] Schjoerring, J. K., Husted, S., Mäck, G., & Mattsson, M. (2002). "The regulation of ammonium translocation in plants". *Journal of Experimental Botany*, 53(370), 883-890.
- [72] Bloom, A.J., (1997). "Interactions between inorganic nitrogen nutrition and root Development". *Zeitschrift Pflanzenernahrung Bodenkunde*, 160: 253-259.
- [73] Li, B., Li, G., Kronzucker HJ., Baluska, F., Shi, W. (2013). " Ammonium stress in Arabidopsis: signaling, genetic loci, and physiological targets". *Trends in plant science*, 19.(2): 107-114.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Ömer Adil KORKMAZ
Doğum Tarihi ve Yeri : 03-11-1986 / Kartal
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : omeradilk@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lisans	Kimya	İstanbul Üniversitesi	2012
Lise	Fen/Matematik	Rauf Denктаş Lisesi	2004