

**MISIRIN (*Zea mays* L.) TUZA HASSAS VE DİRENÇLİ
VARYETELERİNDE ÖSTROJEN UYGULAMASI İLE
ALTERNATİF SOLUNUM YOLUNUN UYARILMASI
VE TUZ STRESİNE TOLERANSININ ARTIRILMASI**

Farideh KHATAEI KHOSROUSHAHI

Doktora Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Botanik Bilim Dalı

Doç. Dr. Serkan ERDAL

Yrd. Doç. Dr. Mucip GENİŞEL

2014

Her hakkı saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

MISIRIN (*Zea mays* L.) TUZA HASSAS VE DİRENÇLİ
VARYETELERİNDE ÖSTROJEN UYGULAMASI İLE
ALTERNATİF SOLUNUM YOLUNUN UYARILMASI VE TUZ
STRESİNE TOLERANSININ ARTIRILMASI

Farideh KHATAEI KHOSROUSHAHI

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
Botanik Bilim Dalı

ERZURUM
2014

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

MISIRIN (*Zea mays* L.) TUZ STRESİNE HASSAS VE DİRENÇLİ VARYETELERİNDE ÖSTROJEN UYGULAMASI İLE ALTERNATİF SOLUNUM YOLUNUN UYARILMASI VE TUZ STRESİNE TOLERANSININ ARTIRILMASI

Doç. Dr. Serkan ERDAL danışmanlığında, Farideh KHATAEI KHOSROUSHAHI tarafından hazırlanan bu çalışma 27/08/2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından BİYOLOJİ Anabilim Dalı – BOTANİK Bilim Dalı'nda DOKTORA tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Ökkeş ATICI

İmza :

Üye : Prof. Dr. Yavuz DEMİR

İmza :

Üye : Doç. Dr. İrfan TERZİ

İmza :

Üye : Doç. Dr. Serkan ERDAL

İmza :

Üye : Doç. Dr. Özkan AKSAKAL

İmza :

Üye : Doç. Dr. Mesut TAŞKIN

İmza :

Üye : Yrd. Doç. Dr. Mucip GENİŞEL

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 14 / 09 / 2014 tarih ve 36 / 1158... nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. İhsan EFEOĞLU
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Doktora Tezi

MISIRIN (*Zea mays* L.) TUZA HASSAS VE DİRENÇLİ VARYETELERİNDE ÖSTROJEN UYGULAMASI İLE ALTERNATİF SOLUNUM YOLUNUN UYARILMASI VE TUZ STRESİNE TOLERANSININ ARTIRILMASI

Farideh KHATAEI KHOSROUSHAHI

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Botanik Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Serkan ERDAL
Ortak Danışman: Yrd. Doç. Dr. Mucip GENİŞEL

Bu çalışmada tuzluluğa tolerans yetenekleri farklı olan iki çeşit mısır varyetesinde tuz stresine karşı antioksidan sistemin yanı sıra alternatif solunum yolunun yanıtları ve östrojenin bu yanıtlara etkisi araştırılmıştır. Tuz stresine dirençli (*Zea mays* cv. Simon) ve hassas (*Zea mays* cv. 71MAY69) mısır varyeteleri on bir gün boyunca hidroponik ortamda yetiştirilmiş ve daha sonra yapraklarına püskürtme yolu ile östrojen hormonu (10^{-7} M) uygulandıktan sonra üç gün boyunca tuz stresine (100 mM NaCl) maruz bırakılmıştır. Bitkilerin kök ve yapraklarında meydana gelen değişimler fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler açıdan değerlendirilmiştir. Tuz uygulaması hassas ve dirençli mısır varyetelerinin yapraklarında ki POD ve CAT aktivitelerini düşürürken süperoksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APX) ve glutatyon redüktaz (GR) aktivitelerini artırmıştır. Köklerde ise katalaz (CAT) hariç tüm enzim aktiviteleri tuz uygulaması ile belirgin bir şekilde azalmıştır. Tek başına tuz uygulamasına kıyasla tuz ile birlikte östrojen uygulamasının tüm enzim aktivitelerini önemli derecede artırdığı tespit edilmiştir. Yalnız östrojen uygulamasının da kontrol grubuna göre tüm antioksidan enzim aktivitelerini artırdığı tespit edilmiştir. Diğer yandan, tuz uygulaması iki mısır varyetesinde de süperoksit ve hidrojen peroksiti içeren reaktif oksijen türlerinin (ROT) seviyeleri ile malondialdehit (MDA) içeriğini ciddi şekilde artırırken, tuza ilave olarak uygulanan östrojen bu parametrelerdeki artışları tuz uygulamasına kıyasla dikkate değer bir biçimde indirgemıştır. Yalnız östrojen uygulaması da kontrol grubuna göre ROT seviyesini ve MDA düzeyini düşürmüştür. Öte yandan, oksijen tüketiminden elde edilen veriler tuz stresinin hem dirençli hem de hassas mısır varyetesinin yapraklarında ki hücresel solunum değerini artırdığını ortaya koymuştur. Köklerde ise tuz stresi hassas türün solunum değerini artırmış fakat dirençli türün hücresel solunum değerini düşürmüştür. Tuz uygulamasının alternatif solunum değerini hassas bitkinin kökü dışında tüm organlarda artırdığı gözlenmiştir. Tek başına tuz uygulamasına kıyasla tuz ile birlikte östrojen muamelesi her iki mısır çeşidinin hem kökünde hem de yaprağında alternatif oksidaz (AOX) aktivitesinin kayda değer bir şekilde artmasına neden olmuştur. Hatta yalnız östrojenin uygulanan bitkilerde dahi kontrol bitkilerine kıyasla daha yüksek AOX aktivitesi belirlenmiştir. Real time PCR'dan elde edilen veriler tuz stresinin AOX ifadesini kontrol eden genlerden AOX1 ve AOX2 ifadesinin artışına neden olduğunu gösterirken, tuz ile birlikte uygulanan östrojenin bu genleri daha da aktive ettiğini ortaya çıkarmıştır. Yalnız östrojen uygulanan bitkilerde de bu genlerin ifadesinin kontrol grubuna göre arttığı belirlenmiştir. Tüm bu bulgular östrojen uygulamasının her iki mısır varyetesindeki antioksidan sistemin yanı sıra AOX'un aktivitesini ve ifadesini artırarak tuz stresine karşı bitki toleransını geliştirdiğini göstermektedir.

2014, 98 sayfa

Anahtar Kelimeler: Östrojen, alternatif oksidaz, solunum, AOX1, AOX2, tuz stresi

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

IMPROVEMENT OF PLANT RESISTANCE AGAINST SALT STRESS AND ACTIVATION OF ALTERNATIVE RESPIRATION PATHWAY BY EXOGENOUS ESTROGEN APPLICATION IN SENSITIVE AND RESISTANCE MAIZE VARIETIES

Farideh KHATAEI KHOSROUSHAHI

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biyoloji

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Serkan ERDAL
Co-Supervisor: Assist. Prof. Dr. Mucip GENİŞEL

In this study, responses of alternative respiration pathway as well as antioxidant system against salt stress in two varieties of maize having different tolerance capabilities to salinity and the effect of estrogen on these responses were investigated. Salt tolerant (*Zea mays* cv. Simon) and sensitive (*Zea mays* cv. 71MAY69) maize varieties were grown in a hydroponic media for 11 days and then were exposed to salt stress (100 mM) for 3 days after being sprayed estrogen (10^{-7} M). The changes occurred in roots and leaves of plants were evaluated in terms of physiological, biochemical and molecular. While salt application decreased peroxidase (POD) and catalase (CAT) activities in the leaves of both varieties, it increased superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX) and glutathione reductase (GR) activities. However, in roots, all enzymes' activities (except CAT) was noticeably reduced by salt application. It was determined that compared to salt application alone, salt plus estrogen application increased significantly all enzymes' activities. It was also determined that estrogen application alone increased all enzymes' activities in comparison to control group. On the other hand, while salt stress elevated significantly level of reactive oxygen species (ROS) including superoxide and hydrogen peroxide, and content of malondialdehyde (MDA) in both varieties of maize, estrogen supplementation reduced markedly raises in these parameters compared to salt application alone. Estrogen application without salt also decreased ROS level and MDA content in comparison to control. At the same time, the data obtained from oxygen consumption revealed that salt stress elevated cellular respiration value in the leaves of both varieties. In roots, salt stress elevated cellular respiration value in sensitive ones; however, it was recorded a decrease in resistant ones. It was observed that salt stress raised alternative respiration level in all organs except the root of sensitive ones. Compared to salt application alone, supplementation with estrogen resulted in a remarkable raise in alternative oxidase (AOX) activities of the roots and leaves of both varieties. Even in only estrogen-applied plants, higher AOX activity was determined compared to control plants. The data obtained from Real Time PCR showed that while salt stress caused to raise in expressions of AOX1 and AOX2 genes which control AOX expression, estrogen application resulted in further activation of these genes' expression. It was determined that estrogen application alone also increased activation of these genes compared to control group. All these findings showed that estrogen application improved ability of both maize varieties to tolerate salt stress by increasing expression and activity of AOX as well as antioxidant system.

2014, 98 pages

Keywords: Alternative oxidase, Estrogen, Salt stress, Respiration, AOX1, AOX 2

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak hazırlanan bu araştırma, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Bitki Fizyolojisi Araştırma Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

Öncelikle çalışmalarımnda her türlü desteği sağlayan, her aşamamı adım adım bana öğreten ve hatalarımın üstünden geçerek sabırla bana yol gösteren ve sadece bilim değil bana gerçek hayatı öğreten kıymetli hocam Sayın Doç. Dr. Serkan ERDAL'a en içten şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarım esnasında bana her türlü yardımcı olan hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Mucip GENİŞEL'e teşekkür ederim.

Çalışmalarımı her an takip edip bana yol gösteren değerli hocam ve bölüm başkanımız Sayın Prof. Dr. Ökkeş ATICI'ya, ve kıymetli hocam Sayın Prof. Dr. Yavuz DEMİR'e ve Sayın hocam Doç. Dr. Rahmi DUMLUPINAR'a sonsuz teşekkür ederim.

Deneyslerimi kendi deneyleri gibi gören ve yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşlarım Ebru GENÇ, Aykut KARAMAN ve Murat KIZILKAYA'ya minnettarım.

Ayrıca grup arkadaşlarım Hülya TÜRK, Zeynep GÖRÇEK, Ahsen AKYÜREK ve Deniz TİRYAKİ'ye teşekkür ederim.

Sonunda dualarını uzaktada olsa üzerimden eksik etmeyen ve sabırla uzaklığa tahammül eden değerli annem Mahnaz YAZDANI'ye ve benimle arkadaş gibi olup her sıkıntımı rahatlıkla paylaştığım kıymetli babam Mir Ahmad KHATAEI'ye her türlü maddi ve manavi destek sağlayarak benim eğitimimi tamamladığı için minnettarım.

Farideh KATAEI

Eylül, 2014

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	14
2.1. Reaktif Oksijen Türleri.....	14
2.1.1. Singlet oksijen ($^1\text{O}_2$).....	14
2.1.2. Süperoksit radikali ($\text{O}_2^{\cdot-}$).....	15
2.1.3. Hidrojen peroksit (H_2O_2).....	15
2.1.4. Hidroksil radikali ($\cdot\text{OH}$).....	16
2.2. Lipid Peroksidasyonu	17
2.3. Antioksidan Enzimler.....	18
2.3.1. Süperoksit dismutaz (SOD) (EC 1. 15. 1. 1).....	18
2.3.2. Peroksidaz (POD) (EC 1.11.1.7).....	19
2.3.3. Katalaz (CAT) (EC 1. 11. 1. 6).....	20
2.3.4. Askorbat peroksidaz (APX) (EC 1. 11. 1. 11).....	21
2.3.5. Glutasyon redüktaz (GR) (EC 1. 6. 4. 2).....	21
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	23
3.1. Yararlanılan Alet ve Cihazlar.....	23
3.2. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanmaları.....	24
3.3. Yöntemler.....	27
3.3.1. Bitkilerin büyütülmesi.....	27
3.3.2. Çözünabilir protein miktarının tayini.....	27
3.3.3. Antioksidan enzim aktivitelerinin belirlenmesi	29
3.3.3.a. Katalaz (CAT) aktivitesinin belirlenmesi.....	29
3.3.3.b. Peroksidaz aktivitesinin belirlenmesi.....	30

3.3.3.c. Süperoksid dismutaz aktivitesinin belirlenmesi	31
3.3.3.d. Askorbat peroksidaz (APX) aktivitesinin tayini	31
3.3.3.e. Glutasyon redüktaz (GR) aktivitesinin tayini	32
3.3.4. Lipid peroksidasyon miktarının belirlenmesi	32
3.3.5. Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) miktarının belirlenmesi	32
3.3.6. Süperoksit (O ₂ ⁻) üretiminin belirlenmesi	33
3.3.7. Mitokondri izolasyonu	34
3.3.8. Hücresel total solunum değeri ve AOX (Alternatif oksidaz) aktivitesi	34
3.3.9. RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve Real Time PCR.....	35
3.3.10. İstatistiksel analiz	38
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	39
4.1. Kök-Gövde Uzunluğu Sonuçları	40
4.2. Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Sonuçları	43
4.2.1. SOD aktivitesi sonuçları.....	43
4.2.2. POD aktivitesi sonuçları.....	46
4.2.3. CAT aktivitesi sonuçları.....	48
4.2.4. APX aktivitesi sonuçları.....	50
4.2.5. GR aktivitesi sonuçları	53
4.3. Süperoksit (O ₂ ⁻) Üretimi Sonuçları	55
4.4. H ₂ O ₂ İçeriği Sonuçları	58
4.5. Lipid Peroksidasyon Seviyesi (MDA içeriği) Sonuçları	61
4.6. Tuz ve Östrojen Uygulamalarının Hücresel Solunum ve AOX Aktivitesi Üzerine Etkileri	64
4.7. AOX1 ve AOX2 gen İfadesi Sonuçları	68
5. SONUÇ ve TARTIŞMA.....	74
5.1. Tuz Stresi ve Eksojen Östrojen Uygulamalarının Kök-Gövde Uzunluğu ve Yaş-Kuru Ağırlıklar Üzerine Etkileri.....	75
5.2. Tuz Stresi ve Eksojen Östrojen Uygulamalarının Antioksidan Enzimler Üzerine Etkileri	76
5.3. Tuz Stresi ve Eksojen Östrojen Uygulamalarının ROT Oluşumu Üzerine Etkileri.....	79

5.4. Tuz Stresi ve Eksojen Östrojen Uygulamalarının MDA İçeriği Üzerine Etkileri	80
5.5. Tuz Stresi ve Eksojen Östrojen Uygulamalarının Hücresel Solunum ve Alternatif Solunuma Etkileri	81
5.6. Tuz Stresi ve Eksojen Östrojen Uygulamalarının AOX İfadesi Üzerine Etkileri	83
KAYNAKLAR.....	87
ÖZGEÇMİŞ.....	99

SİMGELER DİZİNİ

AOX	: Alternatif oksidaz
APX	: Askorbat peroksidaz
CAT	: Katalaz
EDTA	: Etilendiamin tetra asetik asit
GR	: Glutasyon redüktaz
MDA	: Malondialdehid
mg	: Miligram
mM	: Milimolar
NBT	: Nitroblue tetrazolium klorür
nmol	: Nano mol
POD	: Peroksidaz
PVP	: Polivinilpirrolidon
ROT	: Reaktif oksijen türleri
rpm	: Devir/dakika
SOD	: Süperoksit dismutaz
TBA	: Tiobarbutirik asit
TCA	: Trikloroasetik asit
U	: Enzim ünitesi
<i>x g</i>	: Yerçekimi ivmesinin katı
µl	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Mitokondriyal elektron taşıma zinciri	4
Şekil 1.2. Alternatif oksidazın inaktif ve aktif formları.....	8
Şekil 1.3. Östrojen çeşitleri ve yapıları.....	11
Şekil 3.1. Protein tayini için kullanılan standart grafik	28
Şekil 3.2. Katalaz aktivitesi ölçümünde kullanılan standart grafik	30
Şekil 3.3. Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) miktarını belirlemede kullanılan standart grafik ...	33
Şekil 4.1. 15 günlük Tuza hassas olan <i>Zea mays</i> cv 71 MAY 69 un genel görüntüleri .	39
Şekil 4.2. 15 günlük Tuza dirençli olan <i>Zea mays</i> cv. simon un genel görüntüleri.....	40
Şekil 4.3. Tuza hassas <i>Zea mays</i> cv. 71 MAY69 ve tuza dirençli mısır <i>Zea mays</i> cv. Simon varyetelerinde kök uzunluğunun uygulamalara göre değişim yüzdesi.....	42
Şekil 4.4. Tuza hassas <i>Zea mays</i> cv. 71 MAY69 ve tuza dirençli mısır <i>Zea mays</i> cv. Simon varyetelerinde gövde uzunluğunun uygulamalara göre değişim yüzdesi.....	43
Şekil 4.5. Tuza hassas <i>Zea mays</i> cv. 71 MAY69 ve tuza dirençli mısır <i>Zea mays</i> cv. Simon varyetelerinin köklerinde uygulamalara göre SOD aktivitesinin değişim yüzdeleri	45
Şekil 4.6. Tuza hassas <i>Zea mays</i> cv. 71 MAY69 ve tuza dirençli mısır <i>Zea mays</i> cv. Simon varyetelerinin yapraklarında uygulamalara göre SOD aktivitesinin değişim yüzdeleri	45
Şekil 4.7. Tuza hassas <i>Zea mays</i> cv. 71 MAY69 ve tuza dirençli mısır <i>Zea mays</i> cv. Simon varyetelerinin köklerinde uygulamalara göre POD aktivitesinin değişim yüzdeleri	47
Şekil 4.8. Tuza hassas <i>Zea mays</i> cv. 71 MAY69 ve tuza dirençli mısır <i>Zea mays</i> cv. Simon varyetelerinin yapraklarında uygulamalara göre POD aktivitesinin değişim yüzdeleri	48
Şekil 4.9. Tuza hassas <i>Zea mays</i> cv. 71 MAY69 ve tuza dirençli mısır <i>Zea mays</i> cv. Simon varyetelerinin yapraklarında uygulamalara göre CAT aktivitesinin değişim yüzdeleri	49

Şekil 4.10. Tuza hassas <i>Zea mays</i> cv. 71 MAY69 ve tuza dirençli mısır <i>Zea mays</i> cv. Simon varyetelerinin köklerinde uygulamalara göre APX aktivitesinin değişim yüzdeleri.....	52
Şekil 4.11. Tuza hassas <i>Zea mays</i> cv. 71 MAY69 ve tuza dirençli mısır <i>Zea mays</i> cv. Simon varyetelerinin yapraklarında uygulamalara göre APX aktivitesinin değişim yüzdeleri.....	52
Şekil 4.12. Tuza hassas <i>Zea mays</i> cv. 71 MAY69 ve tuza dirençli mısır <i>Zea mays</i> cv. Simon varyetelerinin köklerinde uygulamalara göre GR aktivitesinin değişim yüzdeleri	54
Şekil 4.13. Tuza hassas <i>Zea mays</i> cv. 71 MAY69 ve tuza dirençli mısır <i>Zea mays</i> cv. Simon varyetelerinin yapraklarında uygulamalara göre GR aktivitesinin değişim yüzdeleri	55
Şekil 4.14. Tuza hassas <i>Zea mays</i> cv. 71 MAY69 ve tuza dirençli mısır <i>Zea mays</i> cv. Simon varyetelerinin köklerinde uygulamalara göre süperoksit (O_2^-) değişim yüzdeleri	57
Şekil 4.15. Tuza hassas <i>Zea mays</i> cv. 71 MAY69 ve tuza dirençli mısır <i>Zea mays</i> cv. Simon varyetelerinin yapraklarında uygulamalara göre süperoksit (O_2^-) değişim yüzdeleri	58
Şekil 4.16. Tuza hassas <i>Zea mays</i> cv. 71 MAY69 ve tuza dirençli mısır <i>Zea mays</i> cv. Simon varyetelerinin köklerinde uygulamalara göre H_2O_2 içeriğinin değişim yüzdeleri	60
Şekil 4.17. Tuza hassas <i>Zea mays</i> cv. 71 MAY69 ve tuza dirençli mısır <i>Zea mays</i> cv. Simon varyetelerinin yapraklarında uygulamalara göre H_2O_2 içeriğinin değişim yüzdeleri.....	60
Şekil 4.18. Tuza hassas <i>Zea mays</i> cv. 71 MAY69 ve tuza dirençli mısır <i>Zea mays</i> cv. Simon varyetelerinin köklerinde uygulamalara göre MDA içeriğinin değişim yüzdeleri.....	63
Şekil 4.19. Tuza hassas <i>Zea mays</i> cv. 71 MAY69 ve tuza dirençli mısır <i>Zea mays</i> cv. Simon varyetelerinin yapraklarında uygulamalara göre MDA içeriğinin değişim yüzdeleri.....	63

Şekil 4.20. Tuza hassas <i>Zea mays</i> cv. 71 MAY69 ve tuza dirençli mısır <i>Zea mays</i> cv. Simon varyetelerinin köklerinde uygulamalara Hücrel solunum değerleri yüzdesi	66
Şekil 4.21. Tuza hassas <i>Zea mays</i> cv. 71 MAY69 ve tuza dirençli mısır <i>Zea mays</i> cv. Simon varyetelerinin yapraklarında uygulamalara göre hücrel solunum değerlerinin yüzdesi	66
Şekil 4.22. Tuza hassas <i>Zea mays</i> cv. 71 MAY69 ve tuza dirençli mısır <i>Zea mays</i> cv. Simon varyetelerinin köklerinde uygulamalara göre AOX aktivitesinin yüzdesi	67
Şekil 4.23. Tuza hassas <i>Zea mays</i> cv. 71 MAY69 ve tuza dirençli mısır <i>Zea mays</i> cv. Simon varyetelerinin yapraklarında uygulamalara AOX aktivitesinin yüzdesi	67
Şekil 4.24. Tuza hassas <i>Zea mays</i> cv. 71 MAY69 ve tuza dirençli mısır <i>Zea mays</i> cv. Simon varyetelerinin köklerinde uygulamalara göre AOX1 gen ifadesinin yüzdesi	69
Şekil 4.25. Tuza hassas <i>Zea mays</i> cv. 71 MAY69 ve tuza dirençli mısır <i>Zea mays</i> cv. Simon varyetelerinin yapraklarında uygulamalara göre AOX1 gen ifadesinin yüzdesi	70
Şekil 4.26. Tuza hassas <i>Zea mays</i> cv. 71 MAY69 ve tuza dirençli mısır <i>Zea mays</i> cv. Simon varyetelerinin köklerinde uygulamalara göre AOX2 gen ifadesinin yüzdesi	70
Şekil 4.27. Tuza hassas <i>Zea mays</i> cv. 71 MAY69 ve tuza dirençli mısır <i>Zea mays</i> cv. Simon varyetelerinin köklerinde yapraklarında göre AOX2 gen ifadesinin yüzdesi	71
Şekil 4.28. Tuza hassas mısır <i>Zea mays</i> cv. 71MAY69 ve Tuza dirençli mısır <i>Zea mays</i> cv. Simon varyetelerinde kök ve yaprağında RNA görüntüsü (1-8 hassas (kontrol yaprak, tuz ,tuz + östrojen, östrojen, kontrol kök, tuz, tuz + östrojen, östrojen) 9-16 dirençli ((kontrol yaprak, tuz, tuz + östrojen, östrojen, kontrol kök, tuz, tuz + östrojen, östrojen)	73
Şekil 4.29. Tuza hassas mısır <i>Zea mays</i> cv. 71MAY69 ve Tuza dirençli mısır <i>Zea mays</i> cv. Simon varyetelerinde kök ve yaprağında ampifikasyon görüntüsü.....	73

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Tuza hassas mısır <i>Zea mays</i> cv. 71MAY69 ve tuza dirençli mısır <i>Zea mays</i> cv. Simon varyetelerinde kök uzunluğunun ve uygulamalara göre değişim yüzdesi	41
Çizelge 4.2. Tuza hassas mısır <i>Zea mays</i> cv. 71MAY69 ve tuza dirençli mısır <i>Zea mays</i> cv. Simon varyetelerinde gövde uzunluğunun ve uygulamalara göre değişim yüzdesi.....	41
Çizelge 4.3. Tuza hassas mısır <i>Zea mays</i> cv. 71MAY69 ve tuza dirençli mısır <i>Zea mays</i> cv. Simon varyetelerinin köklerinde uygulamalara göre SOD aktivitesi ve değişim yüzdeleri	44
Çizelge 4.4. Tuza hassas mısır <i>Zea mays</i> cv. 71MAY69 ve tuza dirençli mısır <i>Zea mays</i> cv. Simon varyetelerinin yapraklarında uygulamalara göre SOD aktivitesi ve değişim yüzdeleri	44
Çizelge 4.5. Tuza hassas mısır <i>Zea mays</i> cv. 71MAY69 ve tuza dirençli mısır <i>Zea mays</i> cv. Simon varyetelerinin köklerinde uygulamalara göre POD aktivitesi ve değişim yüzdeleri	46
Çizelge 4.6. Tuza hassas mısır <i>Zea mays</i> cv. 71MAY69 ve tuza dirençli mısır <i>Zea mays</i> cv. Simon varyetelerinin yapraklarında uygulamalara göre POD aktivitesi ve değişim yüzdeleri	47
Çizelge 4.7. Tuza hassas mısır <i>Zea mays</i> cv. 71MAY69 ve tuza dirençli mısır <i>Zea mays</i> cv. Simon varyetelerinin yapraklarında uygulamalara göre CAT aktivitesi ve değişim yüzdeleri	49
Çizelge 4.8. Tuza hassas mısır <i>Zea mays</i> cv. 71MAY69 ve tuza dirençli mısır <i>Zea mays</i> cv. Simon varyetelerinin köklerinde uygulamalara göre APX aktivitesi ve değişim yüzdeleri	51
Çizelge 4.9. Tuza hassas mısır <i>Zea mays</i> cv. 71MAY69 ve tuza dirençli mısır <i>Zea mays</i> cv. Simon varyetelerinin yapraklarında uygulamalara göre APX aktivitesi ve değişim yüzdeleri	51

Çizelge 4.10. Tuza hassas mısır <i>Zea mays</i> cv. 71MAY69 ve tuza dirençli mısır <i>Zea mays</i> cv. Simon varyetelerinin köklerinde uygulamalara göre GR aktivitesi ve değişim yüzdeleri.....	53
Çizelge 4.11. Tuza hassas mısır <i>Zea mays</i> cv. 71MAY69 ve tuza dirençli mısır <i>Zea mays</i> cv. Simon varyetelerinin yapraklarında uygulamalara göre GR aktivitesi ve değişim yüzdeleri	54
Çizelge 4.12. Tuza hassas mısır <i>Zea mays</i> cv. 71MAY69 ve tuza dirençli mısır <i>Zea mays</i> cv. Simon varyetelerinin köklerinde uygulamalara göre süperoksit (O_2^-) üretimi ve değişim yüzdeleri	56
Çizelge 4.13. Tuza hassas mısır <i>Zea mays</i> cv. 71MAY69 ve tuza dirençli mısır <i>Zea mays</i> cv. Simon varyetelerinin yapraklarında uygulamalara göre süperoksit (O_2^-) üretimi ve değişim yüzdeleri	57
Çizelge 4.14. Tuza hassas mısır <i>Zea mays</i> cv. 71MAY69 ve tuza dirençli mısır <i>Zea mays</i> cv. Simon varyetelerinin köklerinde uygulamalara göre H_2O_2 içeriği ve değişim yüzdeleri.....	59
Çizelge 4.15. Tuza hassas mısır <i>Zea mays</i> cv. 71MAY69 ve tuza dirençli mısır <i>Zea mays</i> cv. Simon varyetelerinin yapraklarında uygulamalara göre H_2O_2 içeriği ve değişim yüzdeleri	59
Çizelge 4.16. Tuza hassas mısır <i>Zea mays</i> cv. 71MAY69 ve tuza dirençli mısır <i>Zea mays</i> cv. Simon varyetelerinin köklerinde uygulamalara göre MDA içeriği ve değişim yüzdeleri	62
Çizelge 4.17. Tuza hassas mısır <i>Zea mays</i> cv. 71MAY69 ve tuza dirençli mısır <i>Zea mays</i> cv. Simon varyetelerinin yapraklarında uygulamalara göre MDA içeriği ve değişim yüzdeleri	62
Çizelge 4.18. Tuza hassas mısır <i>Zea mays</i> cv. 71MAY69 ve tuza dirençli mısır <i>Zea mays</i> cv. Simon varyetelerinin kök ve yapraklarında uygulamalara göre hücre solunum değerlerinin yüzdesi	65
Çizelge 4.19. Tuza hassas mısır <i>Zea mays</i> cv. 71MAY69 ve tuza dirençli mısır <i>Zea mays</i> cv. Simon varyetelerinin kök ve yapraklarında uygulamalara göre AOX aktivitesi değerlerinin yüzdesi	65

Çizelge 4.20. Tuza hassas mısır <i>Zea mays</i> cv. 71MAY69 ve tuza dirençli mısır <i>Zea mays</i> cv. Simon varyetelerinin kök ve yaprağında AOX1 gen ifadesinin kontrol değerlerine göre değişimi.....	68
Çizelge 4.21. Tuza hassas mısır <i>Zea mays</i> cv. 71MAY69 ve tuza dirençli mısır <i>Zea mays</i> cv. Simon varyetelerinin kök ve yaprağında AOX2 gen ifadesinin kontrol değerlerine göre değişimi.....	69
Çizelge 4.22. Tuza hassas mısır <i>Zea mays</i> cv. 71MAY69 varyetesinin kök ve yaprağında RNA konsantrasyonu ve 260/280 değerleri.....	72
Çizelge 4.23. Tuza dirençli mısır <i>Zea mays</i> cv. Simon varyetesinin kök ve yaprağında RNA konsantrasyonu ve 260/280 değerleri	72

1. GİRİŞ

Metabolizmalarının esnekliğine bağılı olarak günlük ve mevsimlik değişimler karşısında büyümelerini devam ettirebilme yeteneğine sahip olan bitkiler olumsuz koşullara sürekli veya aralıklı olarak maruz kaldıkları zaman kendilerini koruyabilmek için büyüme ve gelişme olaylarını yavaşlatırlar. Doğadaki pek çok biyotik ve abiyotik koşullar bitkilerde stres adı verilen bu tür olumsuz durumlara yol açabilir. Abiyotik stres etmenleri arasında yer alan minarel stresi, kuraklıktan sonra kullanılabilir tarım alanlarını en fazla etkileyen stres faktörüdür (Blum 1986). Mineral stresinin büyük bölümünü tuz stresi oluşturur. Yeryüzünde ekilebilir tarım alanlarının yaklaşık %20'si tuz stresinden etkilenmektedir (Pitman and Läuchli 2002; Tuteja 2007). Özellikle tarım arazilerinde yanlış sulama pratiklerinin neden olduğu tuzluluk sorununun gelecek 20 yıl içerisinde %50 oranında artış göstereceği tahmin edilmektedir (Hasanuzzaman *et al.* 2013).

Dünyada adım adım verimli toprakları kuşatan tuz stresi, bitkilerin morfolojisi ve anatomisini de kapsayan tüm metabolizmayı olumsuz yönde etkileyerek özellikle kurak ve yarı kurak bölgelerde bitkisel üretimi sınırlandırır (Levitt 1980; Asraf and Foolad 2007). Bitkinin tolerans durumuna bağılı olarak büyümeyi engellemesinin yanında klorozis ve nekrotik lekelerin oluşumuna da yol açabilir. Bunların dışında tuz stresi bitkilerin verim ve kalitesinin azalmasına hatta ileri aşamalarda bitkinin ölümüne yol açabilir (Hasegawa *et al.* 1986).

Tuz stresi, bitkilerin büyümesini ve gelişmesini iyon stresine ve osmotik strese neden olarak engeller (Parida and Das 2005). Kök rizosferinde tuz miktarının artmasıyla birlikte ilk olarak osmotik stres oluşmaktadır. Bu durum kullanılabilir su miktarının azalmasına sebep olur ve "fizyolojik kuraklık" olarak adlandırılır (Tuteja 2007). Kullanılabilir su miktarının azalması, hücre genişlemesinin azalmasına ve sürgün gelişiminin yavaşlamasının neden olur. Osmotik stresin devamında ortaya çıkan iyon stresi ise ortamda artan Na^+ ve Cl^- iyonlarının K^+ , Ca^{+2} ve NO^{-3} gibi gerekli besin

elementleri ile rekabete girmesiyle bitkilerde besin eksikliği veya besin dengesizliği ile kendini gösterir (Hu and Schmidhalter 2005).

Tuz stresinden en belirgin şekilde etkilenen organel kloroplasttır (Koyro 2002). NaCl'ün kloroplastta tetiklediği en önemli değişim tilakoidlerin ve stromanın şişmesidir. Kloroplast tilakoidleri, hücre içi reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretiminde önemli role sahiptir. NaCl'nin stres oluşturduğu koşullarda kloroplastların normal değerini çok üstünde ürettiği ROT'lar oksidatif stres oluşumunu tetikler ve oluşan hidroksil radikali (OH^\cdot) ile hidrojen peroksit (H_2O_2) tilakoidlerin şişmesine ve dalgalı bir hal almasına sebep olur. Bu durum, kloroplastların metabolik fonksiyonlarında bozulmalara yol açar (Hernandez *et al.* 1995; Miyake *et al.* 2006a). Yapılan çalışmalarda tuz stresinin PSII'nin merkezinde bulunan D_1 proteinlerinin dejenerasyonuna neden olduğu belirlenmiştir (Ferroni *et al.* 2007). Ayrıca tuz stresinin kloroplastlardaki fotosistemlerin ışık toplayıcı komplekslerinde yer alan ve fotosentezin ana elemanlarından olan klorofil ve karetenoid gibi fotosentetik pigmentlerin miktarlarının azalmasına neden olduğu bilinmektedir (Parida and Das 2005).

Tuz stresinden ciddi şekilde etkilenen bir diğer organel ise mitokondridir. Tuz stresine maruz kalan bitkilerin mitokondrilerinde oluşan şişme ve yapısal bozulmalar elektron taşınımı fonksiyonunda bozulmaları bereaberinde getirir (Koyro 2002). Elektron taşınım zincirinin fonksiyonun bozulması sonucu kloroplastlarda olduğu gibi mitokondrilerde de üretilen ROT'ların miktarlarında artış görülür. Bu durum mevcut oksidatif stresi tetikleyerek bitkide hasara neden olur (Blockhina and Fagerstedt 2010).

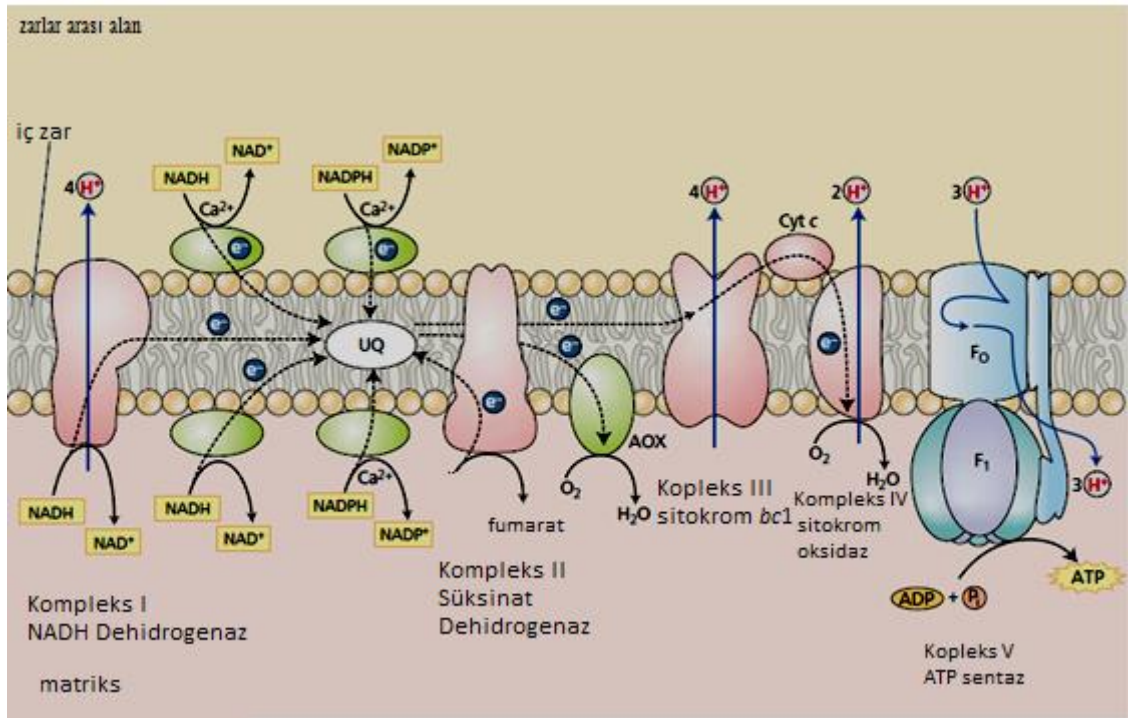
Bitkilerde tuzluluğun neden olduğu oksidatif strese karşı tolerans gösterebilmeleri onların ROT'ları bertaraf edebilme kabiliyetlerine bağlıdır. Bitki hücreleri normal metabolizma sonucu üretilen ve stres şartlarında üretimleri aşırı derecede artan ROT'ları bertaraf edebilmek için antioksidan sistem olarak adlandırılan savunma sistemine sahiptirler. ROT ların toksik düzeylere ulaşmasını engelleyen bu antioksidan sistem enzimatik ve enzimatik olmayan öğelerden oluşur (Bohnert *et al.* 1999). Bu sistemin enzimatik öğelerini süperoksit dismutaz (SOD), peroksidaz (POD), katalaz (CAT),

askorbat peroksidaz (APX), glutatyon redüktaz (GR), monodehidroksiaskorbat redüktaz (MDAR) ve dehidroksiaskorbat redüktaz (DHAR) enzimleri oluştururken, enzimatik olmayan öğelerini ise önemli redoks tepkimelerine tampon görevi yapan askorbat (ASA), glutatyon (GSH), α -tokoferoller, karotenoidler ve fenolik bileşikler oluşturur (Mittler *et al.* 2004).

Son yıllarda antioksidan sistemin dışında bitki mitokondrisinde bulunan alternatif oksidaz (AOX) enziminin de ROT oluşumunu önleme aşamasında etkili olduğu belirlenmiştir (Purvis 1997; Wagner and Moore 1997). Ayrıca birçok çalışmada AOX kapasindeki artışın çevresel streslere toleransla yakından ilişkili olduğu vurgulanmıştır (Smith *et al.* 2009; Martı' *et al.* 2011). AOX' proteinin ifadesi ile enzim aktivitesinin stressiz koşullar altında genellikle düşük olduğu belirlenmiştir. Tuz stresi (Jacoby *et al.* 2010), soğuk stresi (Vanlerberghe and McIntosh 1992a; Purvis and Shewfelt 1993), patojenik saldırı (Lennon *et al.* 1997; Simons *et al.* 1999), fosfat iyonu eksikliği (Juszczuk *et al.* 2003), yaralanma, salisilik asit düzeyinin artması, etilenin uygulaması (Meeuse 1975; Laties 1982; Moore and Siedow 1991), yaşlanma (Hiser and McIntosh 1990) ve sitokrom yolunun inhibisyonu (Vanlerberghe and McIntosh 1992a; Prasad *et al.* 1994) gibi stresli koşullarda AOX'un ifadesinde belirgin artışların meydana geldiğini belirlenmiştir. AOX ifadesinin stres şartlarında bu kadar değişim göstermesi tuz stresini de içeren çevresel streslere karşı toleransta bir cevap niteliğini taşıdığını açıkça göstermektedir. Ayrıca bitkilerde mitokondrideki AOX'un bir homologunun kloroplast tilakoidlerinde de bulunduğu ve plastokinon havuzunda bulunan elektronları kullanarak oksijeni suya indirgediği saptanmıştır (Mittler *et al.* 2004). Diğer yandan, tuz stresinin alternatif solunum değerini artırmasına karşın hücresel total solunum değerini ciddi oranlarda düşürdüğü bildirilmiştir. Bu konu ile ilgili yapılan çok sayıda çalışma tuz stresinin bitkilerin solunum değerleri üzerindeki etkisinin onların tuza karşı hassasiyetine göre değişiklik gösterdiğini ortaya koymuştur. Yapılan çalışmaların %33 tuza toleranslı bitkilerde tuzluluğun solunumu artırdığını bildirirken %42 si düşürdüğünü bildirmiştir. Tuza hassas bitkilerde yapılan çalışmaların ise %58 i tuz stresinin artırdığını bildirirken %17 si düşürdüğünü savunmuştur (Jacoby *et al.* 2011). Tuz stresinin bu kadar değişken etkilediği hücresel solunum solunum ve

alternatif solunum olayı, mitokondrilerin iç zarında yerleşmiş olan sitokrom yolu ve alternatif solunum yolu protein kompleks sistemleri tarafından düzenlenmektedir.

Elektron taşıma sistemi (ETS) olarak adlandırılan bu sistem dört tane oksidoredüktaz ve bir adet ATP sentaz kompleksinden oluşur (Dudkina *et al.* 2006) (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Mitokondriyal elektron taşıma zinciri

ETS'de yer alan ve TCA'dan gelen elektronların en büyük giriş kapısı olan Kompleks I, $\text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{NAD}^+$ 'a yükseltgeme ve ubikinonu ubikinola indirgeme fonksiyonuna sahip olan NADH-ubikinon oksidoredüktaz kompleksidir. Bu kompleksin molekül ağırlığı yaklaşık 1000 kDa'dur ve 40 alt birimden oluşur. Kompleks I'in bir ucu matriks içine uzanırken diğer bölgesi ise mitokondri iç zarına yerleşmiştir. Matriks içine uzanan bölge NADH'ı okside etmede etkindir (Abdrakhmanova *et al.* 2004; Friedrich and Böttcher 2004). NADH'tan gelen elektronlar ubikinona transfer edilirken Kompleks I'in mitokondri iç zarında ki ucundan zarlar arasına her elektron çifti başına dört proton pompalanır (Friedrich and Böttcher 2004).

Bitki mitokondrisine özgü olarak ETS'de kompleks I'in stres şartlarında aşırı yüklenmesi durumunda işlev görev iki tip NADH dehidrogenaz daha mevcuttur. Bu NADH dehidrogenazların biri matriks tarafındaki iç zarın iç yüzeyinde diğeri ise zarlar arası kısımda ki mitokondri iç zarının dış yüzeyinde bulunur. Bu NADH dehidrogenazlar kompleks I'i inhibe eden rotenona hassas olmamalarının yanı sıra ubikinona elektron transfer ederken zarlar arasına proton pompalamazlar (Moller 2002).

Mitokondri ETS'sinde yer alan en küçük protein kompleksi ise kompleks II diğeri adıyla süksinat-ubikinon oksidoredüktaz kompleksidir. Bu kompleks membran proteinlerine bağlı iki alt ünite içerir. ETS'ye FADH₂'tan gelen elektronların giriş kapısı kompleks II'dir. Kompleks II'nin ATP sentezinin temeli olan zarlar arası proton gradiyentine katkısı yoktur. Çünkü bu kompleksten zarlar arasına proton pompalanmaz (Yankovskaya *et al.* 2003).

Oksidatif fosforilasyon sisteminin merkezine yerleşmiş olan kompleks III (ubikinol-sitokrom c oksidoredüktaz) her biri 10 veya 11 farklı alt ünitelerden oluşmuş iki dimerden oluşur. Kompleks III'ün bir bölümü mitokondri iç zarına gömülüdür. Kompleks III yaklaşık 500 kDa'luk bir molekül ağırlığına sahiptir (Berry *et al.* 2000; Dudkina *et al.* 2006). Ubikinondan gelen elektronlar Kompleks IV'e transfer edilirken Kompleks III'ün mitokondri iç zarında ki ucundan zarlar arasına her elektron çifti başına dört proton pompalanır (Friedrich and Bottcher 2004).

ETS zincirinin son kısmında ise Kompleks IV (sitokrom c-O₂ oksidoredüktaz) bulunur. Bu kompleks 13 alt ünitelerden oluşur ve yaklaşık 220 kDA molekül ağırlığına sahiptir. Kompleks III'ten elektronları iç zarın yüzeyine bağlı ve hareket yetenepine sahip olan sitokrom c vasıtası ile alır ve bu elektronları son elektron alıcısı olan oksijene aktararak su molekülünün oluşmasında rol oynar. Oksijeni indirgemesinin yanı sıra kompleks IV zarlar arasına her elektron çifti başına iki proton pompalar (Lambers 1997; Parsons 1998).

Kompleks I, III ve IV'ten zarlar arasına pompalanan protonlar mitokondri iç zarları arasında bir elektrokimyasal gradient farkına neden olurken Kompleks IV olarak ta adlandırılan ATP sentaz vasıtasıyla ADP'ye fosfat bağlanması için gereken potansiyel enerji bu gradient farkından sağlanır (Boyer 1997).

ATP sentaz 15 farklı alt üniteden oluşur ve yaklaşık 500-600 kDa molekül ağırlığına sahiptir. ATP sentaz F_1 -bölgesi ve membrana tutunmayı sağlayan F_0 -bölgesinden oluşur (Stock *et al.* 2000). ATP sentazın F_0 ve F_1 bölgesi, dönebilen bir merkez sap ve baş bölgesinin dönmesini önleyen periferik bir sap ile birbirine bağlanırlar. F_0 ile F_1 alt üniteleri kataliz boyunca dönerek mitokondri iç zarının iki tarafı arasında bir protein gradienti oluşturur. Zarlar arasında oluşan bu gradient farkı ADP'ye fosfat bağlanmasının temelini oluşturur (Dudkina *et al.* 2006).

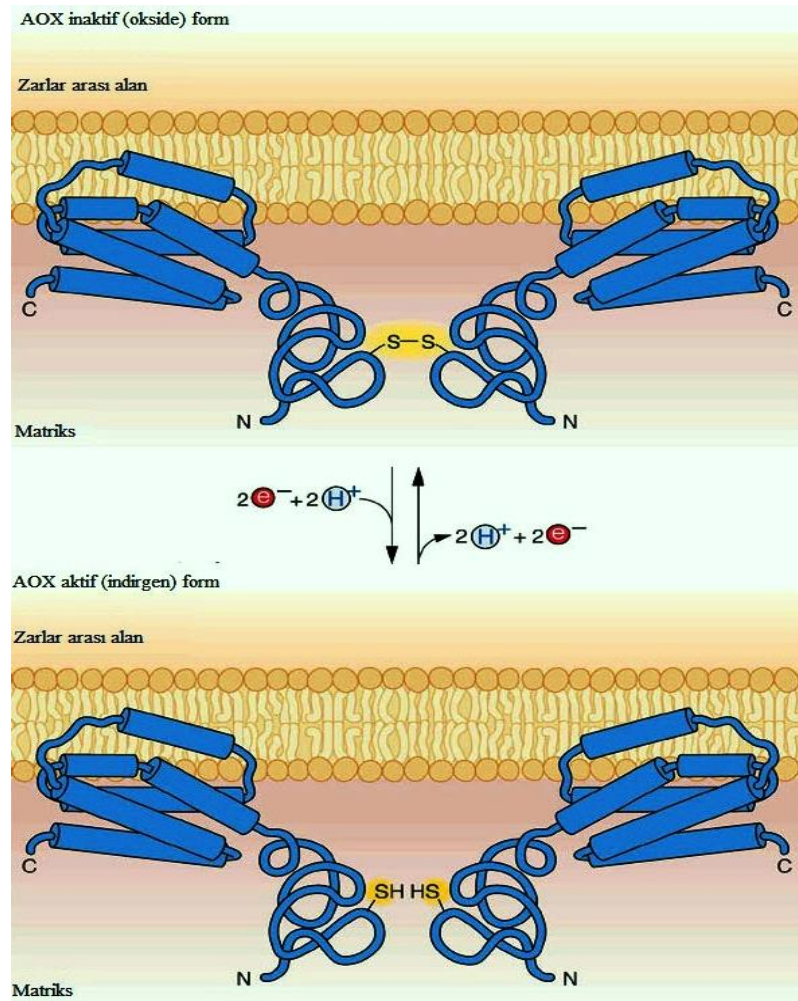
Elektron taşıma sistemindeki aksaklıklardan dolayı kompleks I ve kompleks III'te süperoksit radikali ($\cdot O_2^-$) üretilir. Bu radikalının aşırı üretilmesi yüksek miktarlarda bulunduğu toksik etki gösteren H_2O_2 'nin birikmesine neden olur (Braidot *et al.* 1999; Navrot *et al.* 2007). $\cdot O_2^-$ ve H_2O_2 'nin yüksek miktarları dolaylı yollardan canlılar için en tehlikeli radikal olan hidroksil anyonunun ($\cdot OH$) oluşumuna neden olur. Bitkilerin sahip olduğu antioksidan sistemler mitokondride oluşan bu radikalleri bertaraf etmeye çalışır (Navrot *et al.* 2007; Blokhina and Fagerstedt 2010). Ancak stresli şartlarda mitokondride sitokrom yolunda aşırı yüklendiği için ROT oluşumu artar ve bu artış bitkinin savunma kapasitesinden fazla olursa bitkiyi ölüme kadar götürebilecek oksidatif hasara neden olur. Ancak bitki mitokondrilerinde sitokrom yolundan ayrı olarak bir de alternatif solunum yolu bulunduğu için sitokrom yolunun aşırı yüklendiği durumlarda ubikinon üzerinden gelen elektronlar sitokrom yolundaki kompleks III yerine bu yolun sorumlu enzimi olan AOX üzerinden direk olarak oksijene aktarılır ve böylece hem oluşan tıkanıklılığın giderilmesi hem ETS'nin doğal işleyişine kavuşması sağlanmış olur. Ayrıca ROT oluşumunun azalmasına da önemli katkı sağlanmış olur (Izabela *et al.* 2003; Moller and Kristensen 2004).

AOX'un ROT oluşumunu sınırlandırmadaki etkisinin yanında stres şartlarından etkilenen fotosentezi optimize etmede de dolaylı yoldan etkili olduğu bilinmektedir. Ayrıca hücredeki ATP/ADP oranının, NAD(P)H/ATP oranının ve N/C dengesinin korunmasında ve TCA döngüsünün tıkanıklığının giderilmesinde de (McIntosh 1994) etkili olmak suretiyle bitkinin abiyotik stres şartlarına adaptasyonunda önemli rol oynadığı bildirilmiştir (Feng 2013). Bunların yanında AOX elektronları oksijene aktarırken su molekülünün oluşumuna da vesile olduğu için hücre içi oksijen-su konsantrasyonunun korunmasında etkilidir (Siedow and Moore 1993; Maxwell *et al.* 1999).

Bitki metabolizmasında böylesine büyük öneme sahip olan alternatif solunum yolu ilk olarak termojenik bitkilerde polinasyon için gereken ısı oluşturma fonksiyonu dikkate alınarak keşfedilmiş ve sitokrom yolunu aksine siyanide ve antimisine dirençli olduğu belirlenmiştir (Meeuse 1975). Sonraki çalışmalarda bazı protistler, mantarlar ve alglerin de alternatif solunum yoluna sahip oldukları saptanmıştır (Vanlerberghe and McIntosh 1997).

AOX'un genetik temeli hakkında bir mantar türü olan *Neurospora* adlı mantar türünden elde edilen ilk bulgular AOX'un çekirdekdeki *aod1* geni tarafından kodlandığını, bu enzimi regüle edici etmenlerin ise yine çekirdekdeki *aod2* genleri tarafından kodlandığını göstermiştir (Bertrand *et al.* 1983). Benzer şekilde bitkiler üzerinde yapılan çalışmalarda da AOX'un çekirdek genomu tarafından kodlandığı belirlenmiştir (Elthon *et al.* 1989).

Mitokondri iç zarında homo-dimer yapıda ve heliks şeklinde yerleşmiş olan AOX enzimi 30-35 kDa molekül ağırlığına sahiptir. Enziminin merkezinde hem grubu içermeyen iki demir atomu bulunur (Umbach and Siedow 1993; Siedow *et al.* 1995). Dimerlerinin birbirine kovalent bağlarla bağlanmış formu AOX'un inaktif formunu oluşturur (Vanlerberghe *et al.* 1999). AOX bu kovalent bağların indirgenmesi ile aktifleşir (Şekil 1.2) (Umbach and Siedow 1993).



Şekil 1.2. Alternatif oksidazın inaktif ve aktif formları (Anonymous 2012)

Dimerler arasındaki disülfid bağlarının indirgenip, AOX'un aktifleşmesinde tioredoksinler görevlidirler (Gelhaye *et al.* 2004). Tiyoredoksinler, hücrede redoks reaksiyonlarını düzenlemede görevli olan küçük proteinlerdir. Her yerde hazır halde bulunan bu proteinler, hem prokaryot hem de ökaryot hemen hemen bütün hücrelerde önemli işlevlere sahiptirler (Schürmann and Jacquot 2000; Bauchanan *et al.* 2002). NADPH-Trx ve tioredoksin *o* bitki mitokondrilerinde bulunduğu saptanan tioredoksin redüktazlardır (Lemaire *et al.* 2000; Laloï *et al.* 2001).

Literatürde mitokondriyal ETS'de yer alan komplekslerin faaliyetlerinin NaCl'nin yüksek konsantrasyonlarında önemli oranda inhibe olduğu böylece ETS'nin fonksiyonunun bozulduğu veya elektron kabul etme potansiyelini olumsuz etkilendiğini

gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur(Millar *et al.* 2011). Hatta tuz stresi kompleksler üzerine farklı derecelerde etkiye sahip olduğu ve bu nedenle ETS'nin bazı bölgelerinden elektron kaçağı meydana gelmesi suretiyle ciddi değerde ROT oluştuğu saptanmıştır (Marı'a *et al.* 2011). Ancak alternatif solunum yolunun ROT oluşumunu indirgeme fonksiyonu dikkate alındığında AOX'un ifadesindeki artışın tuz stresinin bu olumsuz etkisini bir dereceye kadar bertaraf edebileceği düşünülebilir. Nitekim tuza toleransı yüksek *Arabidopsis* çeşidinde AOX'un ifadesi ve aktivitesindeki yüksek değerlerin tuza tolerans üzerine olumlu etkisinin olduğu bildirilmiştir (Jacoby *et al.* 2011).

Benzer şekilde Haythem *et al.* (2012), tuza tolerans yetenekleri farklı olan *Medicago truncatula*'nın AOX1 gen ifadesi yüksek olan genotiplerinin köklerinde morfolojik bozulmaların yanısıra ROT ve MDA miktarlarının AOX1 gen ifadesi düşük olan genotipe göre daha az düzeyde olduğunu belirlemiştir. Araştırmacılar sonuç olarak AOX ifadesinin tuz stresine karşı gösterilen bitki cevabında önemli rol oynadığını ileri sürmüşlerdir.

Bu doğrultuda yapılan diğer bir çalışmada da Costa *et al.* (2007b) börölce (*Vigna unguiculata*)'nin tuza hassas çeşitlerine göre toleranslı çeşitlerinde AOX ifadesinin daha yüksek olduğunu belirlemiştir. Jacoby *et al.* (2010) ise tuza dirençli bir buğday (*Triticum aestivum*) çeşidini tuz stresine maruz bıraktığında AOX ifadesinde önemli bir yükseliş olduğunu belirlemiştir. Hatta tuz stresine maruz kalan bitki köklerinde tuz stresine yanıt olarak antioksidan sistemde yer alan enzimleri kodlayan gen ifadelerindeki artışa göre AOX1 gen ifadesinin daha fazla yükseldiği belirlenmiş ve AOX1 gen ifadesindeki artışın tuz stresine toleransın bir göstergesi olabileceği ileri sürülmüştür (Arnholdt *et al.*2006).

Smith *et al.* (2009) tafandan yapılan bir çalışmada da *Arabidopsis thaliana* bitkileri tuz stresine maruz kaldęı zaman ROT oluşumu ile kök ve gövdede Na⁺ seviyesindeki artışların yanısıra Ataox1a, Atndb2 ve Atndb4 genlerinin transkripsiyonunun da önemli artışlar gözlenmiş ve alternatif solunumun aktivasyonunun bitkinin tuz stresine karşı verdiği önemli bir yanıt olduğu belirtilmiştir. Yine aynı çalışmada transgenik olarak

Ataox1 gen ifadesi artırılmış bitkinin normal Ataox1 ifadesi olan bitkiye göre daha yüksek AOX kapasitesine ve daha düşük ROT seviyesine sahip olduğu bildirilmiştir. Hatta transgenik ve normal bitkiler karşılaştırıldığında, Ataox1 ifadesi yüksek olan bitkinin %30-40 oranında daha iyi büyüme göstermesi ve bu bitkinin gövdesinde daha düşük miktarda Na⁺ iyonu olması nedeni ile AOX kapasitesinin tuz stresine karşı kritik bir cevap olabileceği vurgulanmıştır.

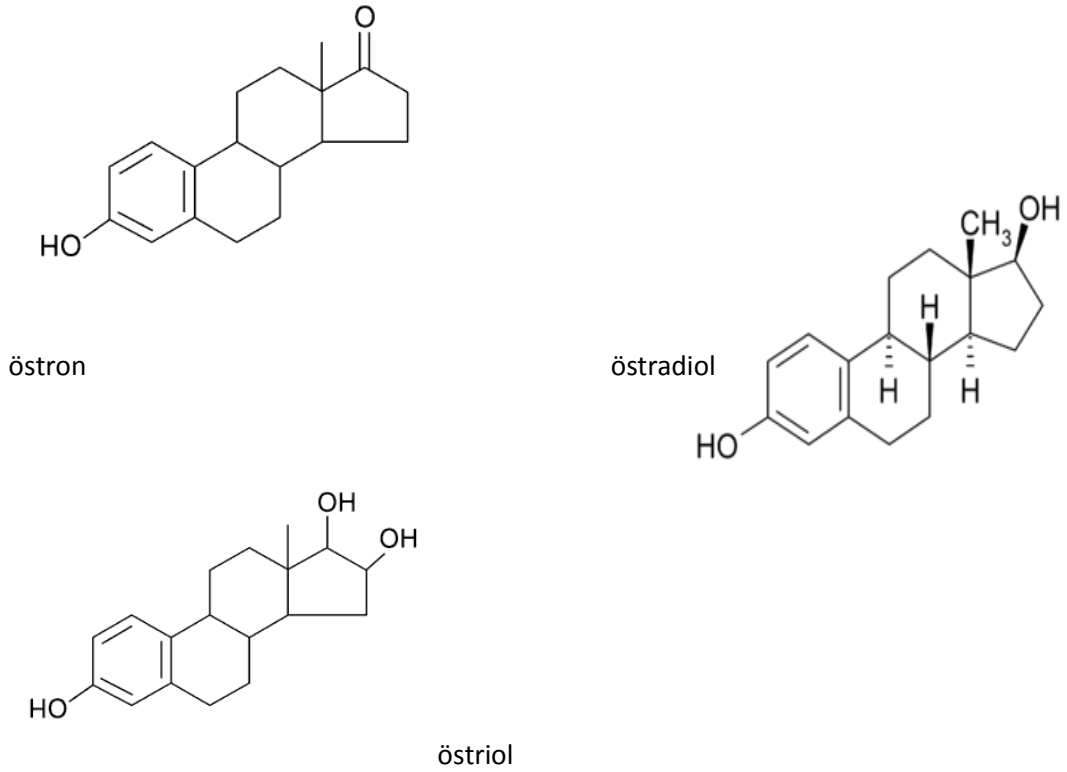
Ticari buğday çeşitlerinin mitokondrilerinde tuza toleransını etkileyen etmenleri belirlemek için izole mitokondrilerde yapılan bir proteom çalışmasında tuz stresinin Mn-SOD, sistein sentaz, nükleotid difosfat kinaz ve voltaja bağımlı anyon kanal (VDAC) proteinlerinin miktarlarının artmasının yanında AOX enzim aktivitesinin de arttığı belirlenmiş ve AOX aktivitesinin artmasının tuza toleransı artırdığı rapor edilmiştir (Jacoby *et al.* 2011).

Maria *et al.* (2011) tarafından yapılan bir çalışmada tuz stresinin tetiklediği oksidatif strese karşı AOX'un koruyucu rolü olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada tuz stresine maruz bırakılan bezelye bitkisinin mitokondrisindeki tiyoredoksin (Trx), Mn-SOD ve AOX enzimlerinin transkripsiyonları ve protein miktarları incelenmiştir. Çalışma sonucunda uygulanan tuz stresinin Trx, Mn-SOD ve AOX'un ifadesini artırdığı belirlenmiş ve bu üç mitokondri bileşeninde oksidatif strese karşı bitki savunmasında kritik rolü olduğu belirtilmiştir. Başka bir çalışmada da Citrus hücre süspansiyonuna eklenen NaCl'nin solunum değerini düşürdüğü ancak yapılan immunoblatlamada AOX protein miktarını artırdığı saptanmıştır (Ferreira *et al.* 2006).

Yukarıdaki verilen çalışmalar açıkça göstermektedir ki AOX'un ifadesinde ve/veya aktivitesindeki artışlar bitkilerin tuza tolerans yeteneği ile doğru orantılıdır. Bu nedenle bitkilerin AOX aktivitesinde sağlanabilecek artışlar onların tuza karşı daha toleranslı hale gelmelerine katkı sağlayabilir. Son yıllarda hızlı bir şekilde gelişen teknikler sayesinde transgenik bitkiler kullanılarak diğer özellikler gibi AOX ifadelerinin artırılması da mümkün hale gelmiştir. Ancak genetikte meydana getirilen değişimlere insan sağlığı açısından şüphe ile bakılmaktadır. Bu nedenle bitkilerin çevresel streslere

karşı dayanıklılığının artırılması için çeşitli kimyasalların ve özellikle doğal maddelerin eksojen olarak uygulanması yaygın olarak çalışılmaktadır. Buradan yola çıkarak mevcut çalışmada bitkilerde de doğal olarak bulunduğu bilinen ve bitki gelişimi üzerinde olumlu etkisi olduğu belirlenen (Erdal 2012) memeli cinsiyet hormonlarından biri olan östrojenin tuz stresine maruz kalan hassas ve toleranslı mısır bitkilerinde alternatif solunum yolu üzerine etkileri araştırıldı.

Memeli cinsiyet hormonlarından olan östrojenler, kadınların adet döngüsünde ve diğer memeli hayvanların dişilerinde östrus döngüsünde önemli rol oynayan 18 karbonlu steroid hormonlardır. Bu hormonlar büyüme, farklılaşma ve işlevsel yönden hedef dokularda anahtar düzenleyici olarak görev yaparlar. Östradiol, östriol ve östron olmak üzere üç alt tipi bulunmaktadır. En etkin ovaryum östrojeni olan östradioldür. Sonra sırasıyla östriol ve en az etkili olan östrondur. Bu hormonlar vücutta enzimatik reaksiyonlarla androjenlerden sentezlenirler (Erdal 2010).



Şekil 1.3. Östrojen çeşitleri ve yapıları

Memeli cinsiyet hormonları bitkilerde ilk olarak 1926 yılında Dohrn *et al.* tarafından belirlenmiştir. Daha sonra 1930'lu yıllarda Butenandt and Jacobi (1933) ve Skarzynski (1933)'de bu hormonların bitkilerde varlığını bildirmiştir. Günümüze kadar memeli cinsiyet hormonlarının bitkilerde varlığı, miktarı ve fonksiyonları hakkında yapılan çalışmaların yanı sıra, bu hormonların eksojen olarak uygulandıklarında bitki büyüme ve gelişmesi üzerine etkileri ile ilgili de birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalarda cinsiyet hormonları bitki büyüme ve gelişmesini olumlu yönde etkilerken, çevresel streslere karşı da bitkinin direnç mekanizmasını artırdığı bildirilmiştir (Erdal 2010).

Son yıllarda östrojenin tuz stresinin olumsuz etkisini hafifletmesi üzerine çalışmalar mevcuttur. Erdal (2010) tuz stresine maruz kalan mısır tohumlarına östrojen uygulaması yaparak tuza tolerans üzerine olumlu sonuçlar elde etmiştir. Bu araştırmada östrojenin antioksidan sistemin kapasitesini ve sentez reaksiyonlarını artırması ile tuz stresi semptomlarını azalttığı bildirilmiştir. Aynı araştırmacı farklı bir çalışmada tuz stresine maruz bıraktığı buğday yapraklarına eksojen olarak östrojen uygulaması yapmış ve mısırın çimlenme döneminde elde ettiği bulgulara paralel bir şekilde östrojen uygulaması ile buğdayın tuz stresine toleransının artırılabilirliğini bildirmiştir (Erdal 2012).

Yukarıdaki çalışmalardan eksojen olarak östrojen uygulaması ile bitkilere belli derecelerde direnç kazandırılabilirliği açıktır. Ancak bu çalışmalarda östrojenin bu etkisinin antioksidan sistemin kapasitesinin artmasından ve sentez reaksiyonlarının hızlanmasından kaynaklandığı bildirilmiş, oysaki tuza toleransta antioksidan enzimler gibi etkili olan alternatif solunum yolunun nasıl etkilendiği belirlenmemiştir. Diğer yandan tuz stresinin bitkiler üzerindeki etkileri; bitkinin çeşidine, uygulanan tuz çeşidi ile miktarına ve tuzluluğa maruz kalma süresine bağlı olarak değiştiği gibi tuzlu ortamlarda bitkiler genotipik farklılıklara bağlı olarak ta çok farklı cevaplar verdikleri (Dajic 2006) hatta tuzluluğa karşı verilen bu farklı büyüme cevapları sadece farklı iki bitki türü için değil aynı türün farklı çeşitleri için de geçerli olduğu bilinmektedir (Munns 2002a). Bu nedenle mevcut araştırmada tuza tolerans yetenekleri farklı olan tuz stresine hassas *Zea mays* (cv hibrid 69) ve dirençli *Zea mays* (cv simon iki farklı mısır

çeşidine eksojen olarak östrojen uygulaması yapılarak bu uygulamaların iki mısır çeşidindeki antioksidan sistemlerin yanısıra alternatif solunum yolunda nasıl değişimlere neden olduğu biyokimyasal ve moleküler düzeyde belirlenmeye çalışılmıştır. Bu yönüyle mevcut araştırma tuzluluğa toleransta alternatif solunum yolu üzerine östrojenin etkilerini ortaya koyan ilk çalışmadır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Reaktif Oksijen Türleri

Atomlarda elektronlar orbital adı verilen bölgede çift olarak bulunurlar. Moleküllerin çoğu çift elektronlu olmasına karşın az miktarda da olsa bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip olan moleküllerde vardır. Eksik elektronlu, molekül ağırlığı düşük, kısa ömürlü ve kararsız olan bu moleküller bulabilecekleri herhangi bir molekül ile etkileşime girerek bu molekülden ya bir elektron alır ya da bir elektron verirler. Başka moleküllerle kolayca elektron alış-verişine girerek onların yapısını bozan bu moleküllere serbest radikaller, oksidan moleküller ya da reaktif oksijen partikülleri' adı verilir. Reaktif oksijenler iki gruba ayrılırlar;

Radikaller: Tek elektron eksikleri nedeniyle başka moleküller ile kolayca elektron alış-verişine giren oksidanlardır. Örneğin; Süperoksit radikali, hidroksil radikali.

Nonradikaller: Elektron eksikleri olmadığı halde başka moleküllerle radikallerden daha zayıf şekilde birleşebilen oksidanlardır. Örneğin; (H₂O₂), (Genişel 2010).

2.1.1. Singlet oksijen (¹O₂)

Oksijenin yüksek enerjili formudur. Singlet oksijen, eşleşmiş iki elektron aynı orbitalde veya farklı orbitallerde zıt spinler halinde bulduklarında oluşur. Eşleşmemiş elektronu bulunmadığı için radikal özelliği yoktur, ancak oksidan özelliği oldukça yüksektir. Singlet oksijen çok çeşitli yollarla kimyasal veya fotokimyasal olarak üretilebilir. Bitkilerde singlet oksijenin üretildiği en iyi bilinen yol fotokimyasal olup, fazla miktarda ışık enerjisi absorblayan klorofilden oksijene enerji aktarılmasıyla ilgilidir. Yani asıl kaynağı fotosentez reaksiyonlarında elektron transport sistemindeki klorofil pigmentleridir (Foyer *et al.* 1997; Güler 2008). Singlet oksijen diğer moleküllerle etkileştiğinde ya içerdiği enerjisi transfer eder, ya da kovalent tepkimelere

girer. Özellikle karbon-karbon çift bağları singlet oksijenin tepkimeye girdiği bağlardır. $^1\text{O}_2$ birçok organik molekülle reaksiyona girdiğinden yüksek oranda yıkıcıdır ve canlı organizmada hasara neden olan başlıca oksijen türlerinden biridir (Cadenas 1989; Durmuş 2003). Doymamış yağ asitleri ile de doğrudan tepkimeye girerek peroksit radikalini oluşturur ve $\cdot\text{OH}$ kadar etkin bir şekilde lipid peroksidasyonu başlatabilir. Hücre zarlarının glikolipid, fosfolipid, sterol ve gliserid yapısındaki doymamış yağ asitleriyle reaksiyona girerek peroksitler, aldehitler, hidroksi yağ asitleri ve pentan gibi çeşitli lipid peroksidasyon ürünlerini oluştururlar (Gechev *et al.* 2002; Minibaeva and Gordon 2003; Mutlu 2009; Erdal 2010).

2.1.2. Süperoksit radikali ($\text{O}_2\cdot^-$)

Kimyasal formülü $\text{O}_2\cdot^-$ olan ve oksijenin bir elektron alarak indirgenmesiyle hızlı bir şekilde oluşan bir anyondur. Süperoksit radikali enzimatik ya da enzimatik olmayan reaksiyonlarla meydana gelebilir. Bu radikal oldukça reaktiftir ve lipidlerin yanı sıra diğer biyokimyasal bileşenlerin de oksidasyonuna sebep olur. Bu radikalın lipidperoksidasyonu, membran hasarı, hücrel toksisite ve DNA'daki tek zincir kırıklarına sebep olduğu belirtilmiştir (Fridovich 1995; Mutlu 2009). Süperoksit radikali hidrojen peroksitle reaksiyona girerek çok daha toksik bir molekül olan hidroksil radikalini üretebilir. Haber-Weiss reaksiyonu olarak bilinen bu reaksiyon demir ve bakırgibi metallerin katalizörlüğünde oldukça hızlı gerçekleşir. Süperoksit radikali, yüksek katalitik etkiye sahip süperoksitdismutaz (SOD) enziminin etkisiyle dismutasyona girerek konsantrasyonu azaltılır (Halliwell 1984; Güler 2008; Mutlu 2009; Erdal 2010).

2.1.3. Hidrojen peroksit (H_2O_2)

Oksijenin enzimatik olarak iki elektron ile indirgenmesiyle ya da süperoksitlerin enzimatik veya enzimatik olmayan dismutasyon tepkimeleri sonucu oluşurlar. Süperoksitin enzimatik olmayan yıkımı nötral ve hafifçe asidik pH'da kendiliğinden, enzimatik yıkımı ise süperoksit dismutaz enzimi tarafından gerçekleştirilir. Süperoksitin

oluştugu yerlerde (peroksizomlar, elektron taşıma zinciri, plazma membranı, ekstraselülmatriks) önemli miktarda H_2O_2 'de üretilir (Slesak *et al.* 2007). Zayıf bir asit olmasına karşın güçlü oksidasyon özelliğine sahiptir. Yapısında paylaşılmamış elektron içermediğinden radikal özellik taşımaz. Radikal olmadığı halde H_2O_2 'nin oksitleyici bir tür olarak bilinmesinin nedeni demir ve bakır gibi metal iyonlarının varlığında serbest oksijen radikalleri içinde en yüksek derecede toksisiteye sahip olan hidroksil radikalının öncülü olarak davranmasıdır. H_2O_2 özellikle proteinlerdeki hem grubunda bulunan demir ile tepkimeye girerek yüksek oksidasyon düzeyindeki reaktif demir formlarını oluşturur. Bu formdaki demir çok güçlü oksitleyici özelliklere sahip olup, hücre zarlarında lipidperoksidasyonu gibi radikal tepkimeleri başlatabilir. Oksitleyici özelliği nedeniyle biyolojik sistemlerde oluşan H_2O_2 'nin ortamdaki uzaklaştırılması gerekir (Halliwell 1984; Güler 2008). Bu görevi katalaz ve peroksidaz gibi antioksidan enzimler H_2O ve O_2 gibi ürünlere dönüştürerek yerine getirir. Oksidatif streslere tolerans sağlamada bitkilerin bu enzimlerin hücresel seviyelerini düzenlemesi oldukça önemlidir (Gechev *et al.* 2002; Minibaeva and Gordon 2003; Mutlu 2009; Erdal 2010).

2.1.4. Hidroksil radikali ($\cdot OH$)

Oksijen radikalleri içerisinde en reaktif ve bilinen en potansiyel oksidanttır. Nötral formları hidroksit iyonları olan bu radikaller kısa ömürlü ve yüksek derecede reaktiftirler. Bir hidrojen atomuyla kovalent bağlı bir oksijen atomundan oluşur. Yarılanma ömürleri çok kısa olan hidroksil radikalleri, iyonlaştırıcı radyasyonun (X ışınları) etkisiyle su moleküllerinin homolitik kırılması sonucunda oluştuğu gibi hidrojen peroksit molekülünün metaller ile reaksiyonu sonucunda eksik indirgenmesi ile de oluşabilir (Stahl and Sies 2002; Mutlu 2009). Biyolojik sistemlerin tanıdığı en reaktif tür olan $\cdot OH$, su dahil rastladığı her molekülle tepkimeye girebilir. Bütün bu tepkimeler $\cdot OH$ 'in paylaşılmamış elektron içeren dış orbitaline elektron alma ilgisinden kaynaklanır (Halliwell 1984). Hidroksil radikalının sebep olduğu en önemli hasar, lipidperoksidasyonu olarak bilinen serbest radikal zincir reaksiyonudur. $\cdot OH$ 'in başlıca hedefi yağ asitleri olup zar lipidlerinin peroksidasyonu ile zarın yapısını bozar ve

geçirgenliğini artırıp hücre ölümüne sebep olabilir (Nishiyama *et al.*1998; Güler 2008; Erdal 2010).

2.2. Lipid Peroksidasyonu

Reaktif oksijen türleri (ROT) lipid, protein, karbohidrat ve nükleik asitler gibi hücrelerin temel bileşenleri üzerinde etkili olurlar. Özellikle çift bağların bulunduğu doymamış yağ asitlerini içeren lipidler, ROT ile kolayca reaksiyona girmektedirler. Membran yapısı ve fonksiyonu üzerinde ROT'ların etkilerinin en çok araştırılanlarından birisi lipid peroksidasyonudur. Membranlardaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyon vererek peroksidasyon ürünlerini oluştururlar. Çoklu doymamış (poliansatüre) yağ asitlerinin oksidatif yıkımı, lipid peroksidasyonu (LPO) olarak bilinir ve oldukça zararlıdır. Çünkü kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler. LPO ile oluşan membran hasarı geri dönüşümsüzdür (Akkus 1995). Biyolojik sistemlerde LPO'yu başlatan serbest radikallerin, süperoksit anyonu ile özellikle hidroksil radikali olduğu kabul edilmektedir. Serbest radikal etkisi ile yağ asidi zincirinden hidrojen atomunun uzaklaşması, bu yağ asidinin radikal özelliği kazanmasına neden olmaktadır. Molekül içi konjuge edilen bağlarının farklı pozisyonlara gelmesi ile değişikliğe uğrayabilen kararsız lipid radikalının moleküler oksijenle tepkimesi sonucu lipid peroksit radikali meydana gelir (Spiteller 2001; Kuru 2007; Erdal 2010). Oluşan lipid radikali dayanıksız bir bileşiktir. Lipid hidroperoksitlerinin yıkımı ile oluşan ve biyolojik olarak reaktif olan aldehitler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler ya da başlangıçtaki etki alanlarından diffüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar. Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda, malondialdehid (MDA) meydana gelir (Yılmaz ve Ozan 2003). MDA yağ asidi oksidasyonunun spesifik yada kantitatif bir indikatörü değildir, fakat lipid peroksidasyonunun derecesi ile iyi bir korelasyon gösterir. Bu sebeple organizma da oluşan LPO düzeyini ölçmek için MDA seviyelerinin ölçümü sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. MDA, tiobarbitürik asit ile pembe renkli bir kompleks oluşturmakta ve oluşan bu çözeltinin absorbans değerlerinden LPO'nun derecesi saptanmaktadır (Yılmaz ve Ozan 2003; Kuru 2007; Erdal 2010).

2.3. Antioksidan Enzimler

ROT miktarını kontrol etmek ve stres koşullarında hücreleri ROT etkisinden korumak için hücreler ROT'u temizleyen bazı enzimler ihtiva ederler. Antioksidan enzimler olarak adlandırılan bu enzimler reaktif oksijen türlerini kademeli bir şekilde daha az toksik olan bileşiklere parçalayarak temizlerler.

2.3.1. Süperoksid dismutaz (SOD) (EC 1. 15. 1. 1)

İlk defa Mann and Keilis (1938) tarafından izole edilen bu enzim McCord and Fridovich (1969) tarafından katalitik fonksiyonu tesbit edilinceye kadar indofenoloksidaz, tetrazoliumoksidaz, eritrocuprein gibi isimlerle anılmıştır. SOD, süperoksid radikalinin ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyen metal içeren bir enzimdir (Sairam and Srivastava 2000; Eyidogan *et al.* 2003; Minibaeva and Gordon 2003).



SOD, süperoksidin parçalanmasını sağlayarak metallerin katalizlediği Haber-Weiss reaksiyonuyla hidroksil radikali oluşma riskini azaltır. ROT'a karşı antioksidan savunma sisteminin ilk hattı olan ve bütün aerobik organizmalarda ve aktifleşmiş oksijen üreten bütün hücre alt yapılarında bulunan bu enzimin aktivitesinin çeşitli streslere cevap olarak arttığı ve bu artışların strese karşı dirençle bağlantılı olduğu belirlenmiştir (Bowler *et al.* 1991; Van Camp *et al.* 1994; Foyer *et al.* 1997; Apel and Hirt 2004). SOD'un üç farklı izoenzimi; bakır/çinko (Cu/ZnSOD), mangan (MnSOD) ve demir (FeSOD) izoenzimleri olup KCN ve H_2O_2 'ye duyarlılıklarına bağlı olarak belirlenirler ve hücre alt yapılarındaki dağılımları farklıdır. MnSOD her iki inhibitöre dirençli olup prokaryotik organizmalar ve ökaryotik hücrelerin mitokondrisinde, Cu/ZnSOD her iki inhibitöre duyarlı olup yüksek bitkilerin hem sitoplazma hem de kloroplastlarında (Scandalios 1993; Güler 2008), FeSOD ise, H_2O_2 'ye duyarlı, KCN'ye dirençli olup, bazı bitki türlerinin kloroplastlarında ve prokaryotik organizmalarda

bulunabilirler (Bowler *et al.* 1992; Güler 2008). Ancak bu enzimin tek başına strese karşı yeterli olamayacağı da bildirilmiştir (Pitcher *et al.* 1991; Erdal 2010).

2.3.2. Peroksidaz (POD) (EC 1.11.1.7)

Peroksidazlar, SOD ve CAT ile koordineli olarak ROT'ların temizlenmesinde önemli rol oynayan, çoklu moleküler formlara ve geniş bir hücre altı dağılımına sahip, hem grubu ihtiva eden oksidaz grubu enzimlerdir. POD'lar H₂O₂'yi kullanarak fenoller ve hidrokinonlar gibi çok sayıda aromatik bileşenlerin dehidrojenasyonunu katalizlerler (Bergmeyer and Grabl 1983). Bitki peroksidazları, protein kısmına bağlanan ve enzimin kararlılığında etkisi olan oligosakkarit zincirlerinin varlığı ile karakterize edilen glikoproteinlerdir (Hu and Van Huystee 1989). Peroksidazların pek çok fizyolojik olayla ilişkisi olduğu ve metabolizmada aktif bir rol oynadığı belirlenmiştir (Durmuş 2003). Stres altındaki bitkilerde peroksidaz aktivitesinin arttığı bilinmektedir (Asada 1992a). POD, elverişsiz çevresel faktörler altında üretilen zararlı oksijen radikallerinin seviyesini düzenler ve bitki hücresinin en önemli koruyucu enzimlerinden birisidir (Bakardjieva and Christov 1996). Molekül ağırlıkları 35-100 kDa arasında değişmektedir. POD'lar hidrojen vericisi olarak birçok organik ve inorganik substratı (AH₂) kullanarak H₂O₂'yi temizlerler. POD enziminin katalilediği reaksiyon aşağıda şematize edildiği gibidir.

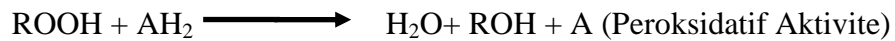


POD'lar oksin katabolizması, hücre duvarı proteinlerinin bağlanması ve pektinlerin çapraz bağlanması gibi bir çok metabolik süreçte de etkili olurlar. Sonuç olarak peroksidazlar hidrojen peroksidi kontrol altında tutarak hücre duvarının yapısına katılmasını sağlarlar. Mekanizmaları henüz tam olarak aydınlatılamamış olmasına rağmen, çeşitli stres faktörlerinden yüksek seviyede etkilenen POD aktivitesi, bu enzimin stres enzimi olarak anılmasına sebep olmuştur (Whetten *et al.* 1998; Amaya *et al.* 1999; Rout *et al.* 2000; Jaleel *et al.* 2007; Mutlu 2009; Erdal 2010).

2.3.3. Katalaz (CAT) (EC 1. 11. 1. 6)

Tabiatta çok yaygın dağılım gösteren bu enzimler, aerobik mikroorganizmaların hepsinde, omurgalılarda, omurgasızlarda, bitkilerde ve mantarlarda bulunmaktadır (Bergmeyer and Grabl 1983). CAT, aktif bölgesinde Fe^{+3} atomuyla birlikte hem grubu ihtiva eden, yüksek molekül ağırlığına sahip antioksidan bir enzimdir. Her birinde yaklaşık 500 aminoasit içeren 4 polipeptit zincirinden oluşan bir tetramerdir. En yüksek hızla reaksiyon veren enzimlerden biridir. Bir molekül katalaz bir saniyede milyonlarca hidrojen peroksit molekülünü su ve oksijene dönüştürür.

CAT'ın bitki dokularında H_2O_2 'nin uzaklaştırılmasında önemli rol oynadığı belirtilmiştir (Patykowski and Urbanek 2003). CAT'ın temel fonksiyonu, moleküler O_2 mevcudiyetinde metabolizmanın bazı kademelerinde sentezlenen, radikal karakterli H_2O_2 'nin ve ROOH gibi bir peroksitin radikalliğini gidererek özellikle membranlarda oluşabilecek geri dönüşümsüz hasarları engellemektir. Zira H_2O_2 , singlet oksijen (1O_2) ve hidroksil radikallerinin ($\cdot OH$) potansiyel kaynağıdır (Scandalios 1993; Chaudiere and Ferrari 1999). CAT, solunum zincirinde oksijenin eksik indirgenmesinden oluşan H_2O_2 'yi O_2 'ye indirger (Chaudiere and Ferrari 1999).



CAT kararlı bir enzim değildir. Yüksek ışık yoğunluğu ve strese maruz kalan bitki hücrelerinde oluşan H_2O_2 'nin yüksek konsantrasyonlarıyla inhibe edilebilir (Streb *et al.*1993). H_2O_2 'ye olan zayıf afinitesi ve sadece peroksizomlarda bulunması (çok az miktarda mitokondri matriksinde bulunurlar) CAT'ın etkinliğini azaltmaktadır (Asada 1992a; Scandalios 1993). CAT'ın koruyucu işlevi askorbik asit, glutatyon, E ve K vitaminleri tarafından güçlendirilir. Çünkü bu bileşikler kolayca elektron alabilir ve serbest radikalın ortadan kaldırılmasıyla yakalayıcı fonksiyon üstlenebilirler (Keha and Küfrevioğlu 2000; Taşgın 2004; Erdal 2010).

2.3.4. Askorbat peroksidaz (APX) (EC 1. 11. 1. 11)

İki molekül askorbat kullanarak hidrojen peroksiti suya dönüştüren antioksidan enzim askorbat peroksidazlar (APX)'dir (Noctor and Foyer 1998). Bu reaksiyon sonucunda askorbat iki molekül monodehidroaskorbata (MDHA) dönüşür. MDHA monodehidroaskorbat redüktaz tarafından tekrar askorbata dönüştürülür (Kumar *et al.* 2011). APX bitki hücrelerinde tilakoid ve mikrozomal mebranlara bağlı formlara da, sitoplazmada ve stromada çözülmüş formlarda ve apoplast da olmak üzere en az beş izoformu vardır (Yamaguchi 1995; Noctor and Foyer 1998). APX'in izoformları elektron verici olarak askorbat için spesifik olup, askorbatın yokluğunda aşırı derecede kararsızdırlar (Miyake and Asada 1996). Sitoplazmada bulunan askorbat peroksidazlar, kloroplastakine benzer ancak askorbat yokluğunda daha fazla kararlı olup askorbattan başka elektron vericilerini de kullanabilir (Ranieri *et al.* 1996; Vanacker *et al.* 1998; Güler 2008). Askorbat peroksidazlar yaygın şekilde çalışılan guaiakol peroksidazlara benzemesine rağmen H⁺ vericisi olarak askorbata olan yüksek afinitelerinden dolayı aralarında farklılıklar vardır (Nakano and Asada 1987; Güler 2008).

2.3.5. Glutatyon redüktaz (GR) (EC 1. 6. 4. 2)

NADPH'ı elektron verici olarak kullanan oksitlenmiş glutatyonun (GSSG), glutatyona (GSH) indirgenmesini katalizleyen enzim glutatyon redüktaz (GR, EC 1.6.4.2) enzimidir (Ranieri *et al.* 2005; Yannarelli *et al.* 2007).



GSH'nin antioksidan özelliğinden dolayı, glutatyon redüktaz hücrenin antioksidan kapasitesinin devamlılığı için önemlidir (Meister 1983; Creissen *et al.* 1994; Güler 2008). GR askorbat glutatyon döngüsünde GSH/GSSG oranını yüksek tutarak hücreleri oksidatif hasara karşı korumada görevli anahtar enzimlerden biridir (Foyer and Noctor 2005). GR diğer enzimlerle birlikte H₂O₂'nin radikal özelliğinin ortadan kaldırılmasında görev alır. Oksitlenmiş askorbik asiti (dehidroaskorbat) tekrardan askorbik asite

indirgeyen dehidroaskorbat redüktaz (DHAR) enzimi sustrat olarak GSH'ı kullanmakta ve reaksiyon sonucu GSSG oluşmaktadır. Oluşan GSSG, GR enzimiyle tekrardan GSH'a indirgenir ve böylece dehidroaskorbat redüktaz enziminin substratı yeniden oluşur. Ayrıca GR enzimi GSSG'yi GSH'a indirgerken, NADPH'ı kullanmakta ve böylece CO₂ fiksasyonu sınırlandığı durumlarda, NADPH/NADP⁺ oranının dengelenmesine yardımcı olmaktadır. Bu nedenle GSSG'nin GSH'a indirgenmesi, oksidan temizlenmesinde önemli bir basamaktır ve oksidatif strese karşı savunmada GR'nin önemini ortaya çıkarmaktadır (Aono *et al.* 1995; Creissen *et al.* 1996; Güler 2008).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Yararlanılan Alet ve Cihazlar

Buzdolabı	: Arçelik
Derin dondurucu (-30°C)	: Arçelik
Derin dondurucu (-80°C)	: Harris, İngiltere
Hassas terazi	: Shimadzu AY220
Homojenizatör	: Wiggen Hauser D- 500
İklim dolabı	: Sanyo, Japonya ve Jenotech, Kore
Karıştırıcı	: Fisons Whirlimixer
Manyetik karıştırıcı	: Chiltern HS31
Masa santrifüjü	: Hettich EBA 21
Oksijen tüketim cihazı	: Vernier Labpro
Otomatik pipetler	: Ependhof, Axigen
pH metre	: WTW unilab pH metre
Soğuk su banyosu	: Huber Polystat CC1
Soğutmalı santrifüj	: Hettich Micro 22 R
Spektrofotometre	: Shimadzu UVmini-1240
Real-Time PCR	: Qiagen

3.2. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanmaları

Çalışmada kullanılan çözeltilerin kullanıldığı yerler ve hazırlanış şekilleri aşağıda belirtilmiştir. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler Sigma ve Fluka şirketlerinden temin edilmiştir.

1. Arnon ve Hogland besi çözeltisi: 1.02 g KNO₃, 0.492 g Ca(NO₃)₂.4H₂O, 0.23 g NH₄H₂PO₄, 0.49 g MgSO₄.7H₂O, 2.86 g H₃BO₃, 1.81 g MnCl₂.4H₂O, 0.08 mg CuSO₄.5H₂O, 0.22 mg ZnSO₄.7H₂O, 0.6 mg FeSO₄, 0.6 mg tartarik asit saf su içerisinde çözülerek hacmi 1 litreye tamamlanmıştır.
2. 100 mM NaCl çözeltisi: 116.88 g NaCl tartılıp 20 L saf suda çözüldü.
3. 10⁻⁷ M Östrojen çözeltisi: 10⁻⁴ M östrojen çözeltisinden 1 ml alınıp üzeri saf su ile 1 litreye tamamlanmıştır.
4. 10 mM KCN stok çözeltisi: 0.1625 g KCN tartılıp 250 ml saf suda çözülmüştür. Daha düşük konsantrasyonlar hazırlanırken stok çözeltiden seyreltilerek kullanılmıştır.
5. 4 mM SHAM (salisilhidroksamik asit) stok çözeltisi: 0.15314 g SHAM tartılıp 500 µl metanolde çözüldükten sonra 250 ml saf suya tamamlanıp tamamen çözülmeye bırakılmıştır. 4 mM SHAM çözeltisini seyreltme yoluyla daha düşük konsantrasyonları hazırlanmıştır.
6. 0.05 M KH₂PO₄ (pH: 6.5) (Protein tayini için): 1.7 g KH₂PO₄ 200 ml saf suda çözülmüş, 1 N NaOH kullanılarak pH 6.5'e ayarlandıktan sonra hacim saf su ile 250 ml'ye tamamlanmıştır.
7. 0.1M KH₂PO₄ (pH: 7.0), %1 PVP, 1mM EDTA (antioksidan enzimlerin homojenizasyon tamponu): 3.4 g KH₂PO₄ 200 ml saf suda çözülmüş, 1 N NaOH kullanılarak pH 7.0'ye ayarlandıktan sonra hacim saf su ile 250 ml'ye tamamlanmış ve üzerine 2.5 g PVP ve 0.073 g EDTA ilave edilmiştir.
8. 103.5 mM KH₂PO₄, pH: 7.5 (Katalaz aktivitesi ölçümünde kullanılan tampon): 1.41 g KH₂PO₄, 70 ml saf suda çözülmüş, 1 N NaOH ile pH: 7.5'e ayarlanmış ve hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.
9. 40 mM H₂O₂ çözeltisi (Katalaz aktivitesi ölçümünde kullanılan substrat çözeltisi): 346 µl %35'lik H₂O₂ alınıp hacmi saf su ile 100ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

- 10.** 5 mM H₂O₂ çözeltisi (Katalaz aktivitesi ölçümünde standart grafik hazırlamak için kullanılan): 43 µl %35'lük H₂O₂ alınıp hacmi saf su ile 100ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
- 11.** 0.1 M Na₂HPO₄, pH: 5.5 (Peroksidazın aktivitesi ölçümünde kullanılan tampon çözeltisi): 3.55 g Na₂HPO₄ alınarak 200 ml saf suda çözülmüş ve pH: 5.5'e ayarlandıktan sonra hacim saf su ile 250 ml'ye tamamlanmıştır.
- 12.** Peroksidaz aktivitesi ölçümünde kullanılan substrat çözeltisi (5mM guaikol + 5mM H₂O₂): 54 µl quaiKol ve 15 µl H₂O₂'dan (d=1.13 g/mol) 5 mM olacak şekilde 100 ml 0.1 M fosfat tamponu (pH: 5.5) içinde çözümlenerek hazırlanmıştır.
- 13.** 50 mM KH₂PO₄ (pH: 7.8) (SOD için tampon çözeltisi): 1.7 g KH₂PO₄ 200 ml saf suda çözülmüş, pH: 7.8'e ayarlandıktan sonra ve hacim saf su ile 250 ml'ye tamamlanmıştır.
- 14.** 13 mM metionin çözeltisi (SOD reaksiyon karışımı için): 0.586 g metionin alınır, 27. maddede hazırlanmış olan 250 ml 50mM KH₂PO₄ tamponu içerisine ilave edilerek çözülür.
- 15.** 63 µM NBT-Nitroblue Tetrazolium Klorür (SOD reaksiyon karışımı için): 0.0128 g NBT alınır, 27. maddede hazırlanmış olan 250 ml 50mM KH₂PO₄ tamponu içerisine ilave edilerek çözülür.
- 16.** 0.1 mM EDTA-Etilen Diamin Tetra Asetik asit (SOD reaksiyon karışımı için): 0.073 g EDTA alınır, 27. maddede hazırlanmış olan 250ml 50mM KH₂PO₄ tamponu içerisine ilave edilerek çözülür.
- 17.** 13 µM riboflavin (SOD aktivitesi için 2. çözeltisi): 0.019 g riboflavin, 500 ml saf suda çözülmüş, 3 ml'lik reaksiyon karışımının 13 µM riboflavin içermesi için 390 µL riboflavin alınmıştır.
- 18.** %5 lik TCA - trikloroasetik asit (Lipid peroksidasyon için homojenizasyon çözeltisi) : 100 ml saf su içerisine 5 g TCA ilave edilerek çözülür.
- 19.** %0.5 lik TBA-tiobarbutirik asit (Lipid peroksidasyon için reaksiyon çözeltisi): 100 ml saf su içine 20 gram TBA çözülür ve daha sonra içerisine %0.5 TBA ilave edilerek iyice çözünmesi sağlanır.
- 20.** RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve Real Time PCR için kullanılan çözeltiler: RLC tamponu, etanol (%96-100), RW1 buffer, RPE buffer, RNeas, RNaz-Free su,

etidiyumbromid, ampul su, 20X MOPS, formamid, bromfenolblue, 1X MOPS tamponu, 20X MOPS tamponu

21. 0.4 M mannitol, 50 mM MOPS, 2mM EGTA, 4 mM L-sistein, %0.6 PVP, 20 mM β -merkapttoetanol, %0.5 BSA (Mitokokondri izolasyonu için homojenat tamponu): 3.64 g mannitol, 0.5225 g MOPS 40 ml saf suda çözülp pH: 7.2'ye ayarlandıktan sonra 0.0388 g EGTA, 0.0242 g L-sistein, 0.3 g PVP, 0.25 g BSA ve 70 μ l β -merkapttoetanol, aynı çözeltilde çözüldükten sonra son hacim 50 ml'ye ayarlanır.

22. 0.3 M mannitol, 20 mM MOPS, 1 mM EGTA, %0.1 BSA (Mitokondri yıkama tamponu): 2.73 g mannitol, 0.209 g MOPS 40 ml saf suda çözülp pH: 7.2'ye ayarlandıktan sonra 0.0194 g EGTA ve 0.05 g BSA aynı çözeltilde çözülpür. Son Hacim 50 ml olacak şekilde saf su ile tamamla

3.3. Yöntemler

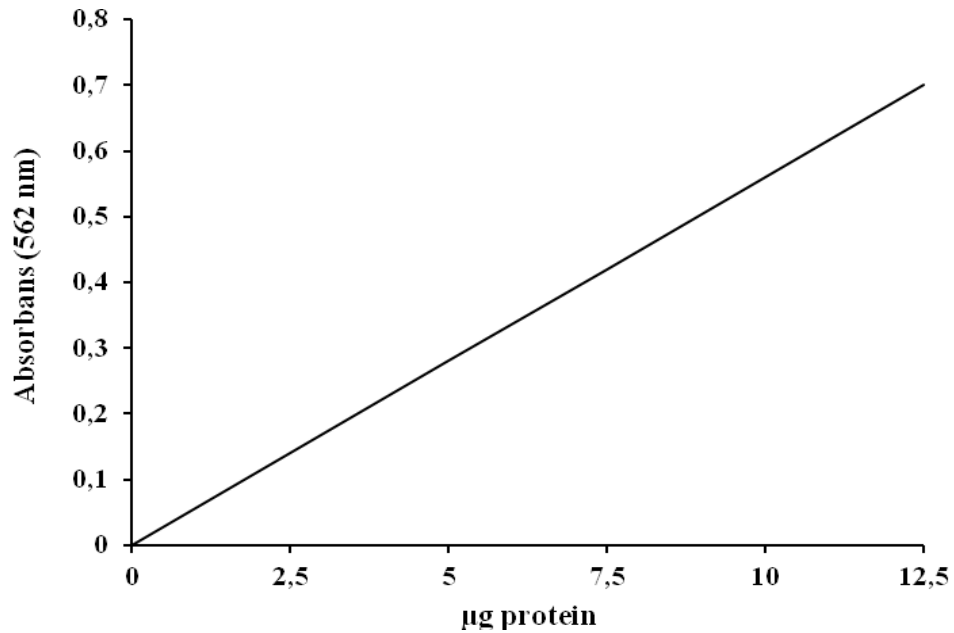
3.3.1. Bitkilerin büyütülmesi

Yapılan çalışmada tuza tolerans yetenekleri bakımından dirençli *Zea mays* cv.Simon ve hassas *Zea mays* cv. 71MAY69 mısır bitkileri kullanılmıştır. Tuz stresine dirençli olan simon varyetesinin tohumları İran Batı Azerbaycan Salmas Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden, tuza hassas olan 71MAY69'un tohumları ise Türkiye May Tohum Firması'ndan temin edilmiştir. Tohumlar ekilmeden önce %96'lık etil alkol ile kısa süreli hızlıca yıkanmış ve %5'lik sodyum hipoklorit içerisinde 5 dk yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuştur. Daha sonra 3 kez saf su ile yıkanarak, oda şartlarında saf su içerisinde yaklaşık 5 saat şişmeye bırakılmıştır. Sonra bitkiler hidroponik ortamda her saksıya 6 tane tohum koyularak kontrol şartlar altında (25/20°C sıcaklık ve 14/10 saat ışık-karanlık periyodunda 20.000 lüks, %70 nem) iklim odasında büyümüştür. 11 gün boyunca 8% lik Hoagland içeren saf su içerisinde büyütülen bitkilere on birinci gün ikinci yapraklarını açtıktan sonra 10^{-7} M östrojen hormonu eksojen olarak yapraklarına püskürtülmüştür. Bitkilerin hormonu absorbe etmesi için 3 saat bekledikten sonra bitkilerin bir grubu 100 mM tuza maruz bırakılmışlardır. Tuza uygulanmasında 72 saat sonra bitki grupları hasat edilerek fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler parametrelerindeki değişimler belirlenmeye çalışılmıştır.

3.3.2. Çözünabilir protein miktarının tayini

Mısır bitkisinin yapraklarından alınan 0,5 g'lık taze örnekler kullanılarak Smith PK. *et al.* (1985) metoduna göre protein tayini yapıldı. Sonuçlar "mg protein/g taze doku cinsinden hesap edildi. Bitkilerin, küçük parçalara ayrılmış yapraklarından 0,5 g alınarak 10 misli hacimdeki 0,1 M fosfat tamponunda (pH: 6,75) havanda ezilerek homojenizasyon yapıldı. Homojenat dört katlı tülbentten süzülde ve süzüntü santrifüj tüplerine alınıp, 15.000 rpm'de 15 dk. boyunca santrifüj edildi. Protein tayini için tüplerin üst kısmındaki sıvı faz (süpernatant) kullanıldı. Protein miktarı spektrofotometrik yolla tayin edildi. Metot için gerekli standart grafik şu şekilde

hazırlandı; 1 ml'sinde 1 mg protein içeren standart sığır albümin çözeltisinden 0, 2,5, 5, 7,5, 10 ve 12 µg protein içeren hacimler plate'de ki kuyucuklara aktarılıp, saf su ile bütün tüplerin hacimleri 12 µl 'ye tamamlandı. Bu tüplere 0,2'şer ml de BCA (bicionchonic asit+ FeCl₃) reaktifi ilave edilip karıştırıldı. Kör numune olarak 0,2 ml BCA reaktifi kullandı. Plate 65°C'de 15 dk. bekletildi. Yapılan spektrofotometrik ölçümler sonucunda, 562 nm'deki absorbans değerlerine karşılık gelen protein değerlerinden yararlanarak standart grafik elde edildi. Standart grafik hazırlama çalışmasında olduğu gibi, bitki organlarından elde edilen özütlerden 5 µl alınıp, 0,2 ml BCA reaktifiyle karıştırıldı, 65°C'de 15 dk. bekletildi ve 562 nm'de absorbansları ölçülerek, standart grafikten yararlanılıp, 5 µl özütteki protein miktarları belirlendi. Daha sonra, gerekli hesaplamalar yapılarak protein miktarları µg protein/g doku olarak tayin edildi.



Şekil 3.1. Protein tayini için kullanılan standart grafik

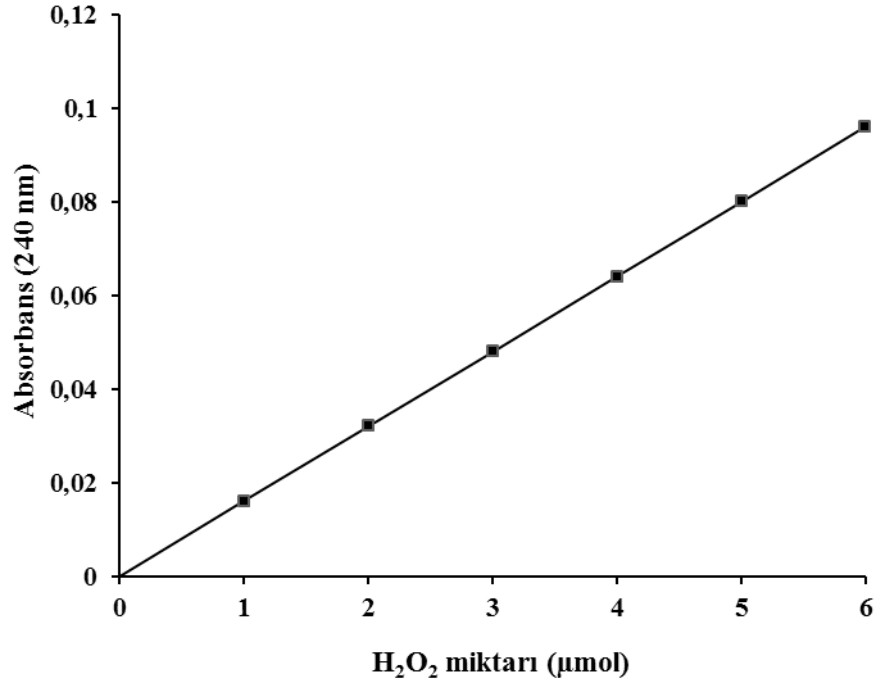
3.3.3. Antioksidan enzim aktivitelerinin belirlenmesi

0.5'er gram kök ve yaprak örnekleri 5 ml 0.1 M fosfat tamponunda homojenize edilerek 15000 rpm'de 15 dk santrifüj edildi. Süpernatant kısmı alınarak enzim kaynağı olarak kullanıldı.

3.3.3.a. Katalaz (CAT) aktivitesinin belirlenmesi

Katalazın (CAT) aktivite tayini için Gong *et al.* (2001) uyguladığı metot kullanıldı. Bu metot, katalazın ortamdaki H₂O₂'nin oksijen ve suya dönüşümünü sağlarken meydana gelen absorbans değişiminin 240 nm'de izlenmesi esasına dayanır.

Önce reaksiyonda azalan H₂O₂ miktarını belirlemek için standart grafik hazırlanır. Standart grafik hazırlamak için, 5 mM H₂O₂ çözeltisinden 3 ml'lik spektrofotometre tüplerine sırasıyla; 0.15, 0.3, 0.45, 0.6, 0.75, 0.9, 1.05, 1.2, 1.35 ve 1.5 ml konulur, tüplerin hacimleri saf su ile 1.5 ml'ye tamamlanır ve her tüpe 1.47 ml 103.5 mM KH₂PO₄ ve 30 µl su ilave edilir. Spektrofotometrede 240 nm'de absorbans köre karşı okunur ve absorbans değerlerine karşılık gelen µM H₂O₂ değerleri kullanarak standart grafik elde edilir. Aktivite ölçümü için 3 ml'lik spektrofotometre küvetine, 103 mM KH₂PO₄ tamponundan 1.475 ml ve 40 mM'lık H₂O₂ substrat çözeltisinden 1.5 ml konulduktan sonra, 25 µl enzim ekstraktı ilave edilir. Spektrofotometrede 240 nm'de 3 dakika boyunca 1 dakika aralıklarla köre karşı absorbansı okunur ve absorbansın doğrusal olarak azaldığı aralıktan dakika başına absorbans azalması hesaplanır. Bu ortalama absorbans değerleri, standart grafik yardımıyla µmol cinsinden H₂O₂ miktarına dönüştürülür. 25°C'de, 1 dakika içinde, absorbansı 1 µmol azaltan enzim miktarı 1 enzim ünitesi olarak kabul edilir ve sonuçlar g yaprak başına düşen enzim ünitesi (U.mg⁻¹ protein) olarak sunuldu.



Şekil 3.2. Katalaz aktivitesi ölçümünde kullanılan standart grafik

3.3.3.b. Peroksidaz aktivitesinin belirlenmesi

Peroksidaz (POD) aktivite tayini, guaikol ve H₂O₂'nin substrat olduğu reaksiyonun ürünü olan renkli bileşiğin meydana getirdiği absorbans artışının 470 nm'de izlenmesi esasına dayanmaktadır.

Aktivite ölçümü için spektrofotometre küvetine; 100 ml 0.1 M, NaH₂PO₄ (pH: 5.5) ve 5 mM guaikol ve 5mM H₂O₂ içeren substrat çözeltisinden 3 ml konulduktan sonra, üzerine 10 µl enzim ekstraktı ilave edilir. 470 nm'de 5 dakika boyunca absorbans artışı 1 dakika aralıklarla kaydedilir ve absorbansın doğrusal olarak arttığı kısımdaki absorbans artışı 1 dakikaya oranlanır. 25°C'de 1 dakikada, absorbansı 0.01 artıran enzim miktarı 1 enzim ünitesi olarak kabul edilir ve sonuçlar g yaprak başına düşen enzim ünitesi (U.mg⁻¹ protein) olarak sunuldu (Yee *et al.* 2002; Erdal 2010).

3.3.3.c. Süperoksid dismutaz aktivitesinin belirlenmesi

Süperoksid dismutaz (SOD) aktivitesi, nitro blue tetrazoliumun (NBT) süperoksit radikalleri ile mavi renkli formazona fotokimyasal indirgenmesi reaksiyonunun SOD enzimi tarafından engellenmesinin spektrofotometrik olarak belirleme esasına dayanır (Mutlu 2009).

Reaksiyon karışımı (3 ml); 50 mM KH_2PO_4 (pH: 7.8), 13 mM metiyonin, 63 μM NBT, 13 μM riboflavin ve 0.1 mM EDTA içermektedir. Aktivite ölçümü için 3 ml spektrofotometre küvetine yukarıdaki riboflavin içermeyen reaksiyon karışımından 2,58 ml alınmış ve üzerine 30 μL enzim ekstraktı pipetlenmiştir. Reaksiyon, tüp üzerine 13 μM 'lık riboflavin çözeltisinden 390 μL pipetlenip karıştırıldıktan hemen sonra, beyaz bir ışık kaynağı önüne yerleştirmek suretiyle başlatılmıştır. Tüp, ışık kaynağının karşısında 15 dk. tutulmuş ve reaksiyon ışık kaynağının kapatılmasıyla durdurulmuştur. 15 dk. içerisinde NBT'nin renk açılma yoğunluğu 560 nm'de köre karşı okunmuştur. Kör; aynı işlemin enzimsiz örneğinden oluşmaktadır. SOD aktivitesinin 1 ünitesi, 560 nm'de gözlenen NBT indirgenmesinin %50 inhibisyonuna neden olan enzim miktarı, 1 enzim ünitesi olarak kabul edilmiş ve değerler $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ protein olarak sunulmuştur (Agarwal and Pandey 2004; Yordanova *et al.* 2004).

3.3.3.d. Askorbat peroksidaz (APX) aktivitesinin tayini

Askorbat peroksidaz aktivitesi, 290 nm'de absorbansdaki azalışa bağlı olarak belirlenir (Nakano ve Asada; 1981). Enzim aktivitesi, 50 mM Potasyum fosfat tamponu (pH 7,0), 250 μM askorbik asid (ASC), 5 mM H_2O_2 ve 20 μl enzim ekstraktı içeren 1 ml'lik reaksiyon karışımının ölçülmesiyle belirlenir. Askorbat peroksidaz aktivitesi, 290 nm'de ASC için $2,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ epsilon katsayısının kullanılmasıyla hesaplanır. Sonuçlar $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ protein olarak ifade edildi.

3.3.3.e. Glutasyon redüktaz (GR) aktivitesinin tayini

Glutasyon redüktaz aktivitesi spektrofotometrik olarak Foyer ve Halliwell (1976)'e göre belirlendi. Substrat olarak 0,25 mM NADPH ve 1 mM oksitlenmiş glutasyon (GSSG) kullanılır. Yükseltgenmiş glutasyonun enzim tarafından indirgenmesi için indirgeyici faktör olarak NADPH kullanıldı. Aktivite tayini için, 200 µl 0,5 mM EDTA içerisinde hazırlanmış 50 mM Tris-HCl (pH 7,8), 250 µl GSSG ve 500 µl NADPH ihtiva eden karışıma 50 µl enzim ekstraktı ilave edildi. NADPH'in oksidasyonu 340 nm'de 5 dakika boyunca azalmanın ölçülmesiyle belirlendi. GR aktivitesi U.mg⁻¹ protein olarak ifade edilir.

3.3.4. Lipid peroksidasyon miktarının belirlenmesi

Lipid peroksidasyonu için 0.5 g yaprak alınarak 10 ml %0.1'lik TCA (trikloro asetik asit) içinde homojenize edildikten sonra homojenat 15.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Tüpün süpernatant kısmından 1 ml alınarak üzerine 250 µl %0.5'lik TBA çözeltisi ilave edilmiştir. Reaksiyon karışımı kaynar suda 30 dakika inkübe edilmiş ve reaksiyon tüplerin buz banyosuna alınmasıyla durdurulmuştur. Örnekler 10000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısmı alınmış ve 532 nm absorban değer ve 600 nm deki non-spesifik absorpsiyon için absorban değeri okunmuştur.

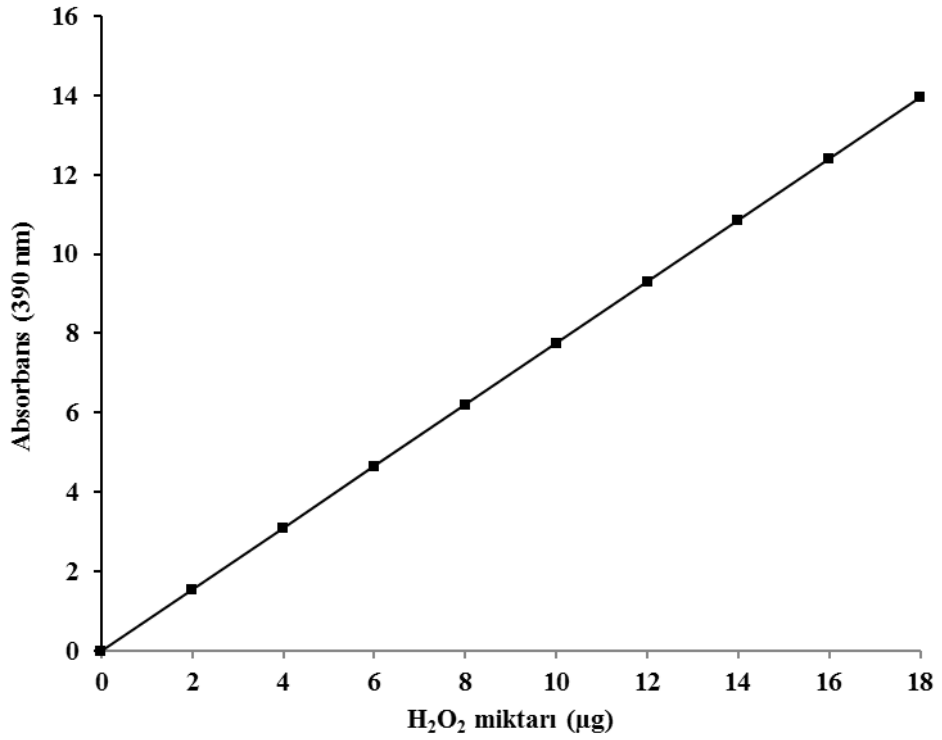
Lipid peroksidasyonun hesaplanması için; 532 nm'de ölçülen absorban değerinden 600 nm'de belirlenen değeri çıkarılmış ve 1 ml çözeltideki MDA (nmol/µl): [(A532-A600)/155000] X 10⁶ formülüyle hesaplanmıştır. Sonuçlar MDA (nmol.g⁻¹ doku) şeklinde verilmiştir (Heath and Packer 1968; Jaleel *et al.* 2007; Erdal 2010).

3.3.5. Hidrojen peroksit (H₂O₂) miktarının belirlenmesi

0.5 gram bitki dokusu alınarak 5 ml soğuk %0,1 TCA homojenize edildikten sonra homojenat 12 000 x g'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra elde edilen süpernatantın 0.5 ml'sine 0.5 ml 10 mM KH₂PO₄ (pH: 7.0) tamponundan ve 1ml KI

eklendi. Absorban değerleri 390 nm'de ölçölüp kaydedilmiştir. Sonuçlar standart grafikte oranlanarak g doku başına düşen H_2O_2 miktarı ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ doku) olarak hesaplanmıştır (Velikova *et al.* 2000).

Standart grafiğin hazırlamak için, H_2O_2 çözeltisinden eppendorf tüplerine sırasıyla; 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 ve 18 mikrogram H_2O_2 olacak şekilde hesaplanarak konuldu. Tüpün hacmi 1 ml olacak şekilde 10 mM KH_2PO_4 (pH: 7.0) tamponu ile tamamlandı. Daha sonra her tüpe 1ml KI ilave edilmiştir. Absorbans değerleri 390 nm'de köre karşı okunmuştur. Absorbans değerlerine karşılık gelen mikrogram H_2O_2 değerleri kullanarak standart grafik elde edilmiştir.



Şekil 3.3. Hidrojen peroksit (H_2O_2) miktarını belirlemede kullanılan standart grafik

3.3.6. Süperoksit ($O_2^{\cdot-}$) üretiminin belirlenmesi

Süperoksit içeriği Elstner and Heupel (1976) tarafından tanımlanan metoda göre ölçölüdü. Bitki yapraklarından 0,4 g alınarak 2 ml 50 mM potasyum fosfat tamponunda (pH: 7,8)

homojenize edildi. Homojenat 10 dakika 10000 g'de santifüj edildikten sonra süpernatanttan 0,5 ml alınarak üzerine 0,5 ml 50 mM potasyum fosfat (pH: 7,8) tamponundan eklendi. Daha sonra karışıma 0,1 ml 10 mM hidroksilamin hidroklorid eklenerek karıştırıldı. Karışım 1 saat 25°C'de inkibe edildikten sonra üzerine 1 ml 17 mM sülfonamid ve 1 ml 7 mM α -naftilamin eklenerek oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildi. Daha sonra 530 nm'de spesifik absorpsiyon değerleri belirlendi. Süperoksit anyonu içeriğini hesaplamak için sodyum nitrit kullanılarak standart grafik hazırlandı. Sonuçlar $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ doku olarak belirlendi.

3.3.7. Mitokondri izolasyonu

Bitki yaprakları sıvı azotta homojenize edildi. Daha sonra ağırlığının 4 katı kadar hacimde 0,4 M mannitol, 50 mM MOPS (pH 7,2), 2mM etilen glikol tetra asetik asid (EGTA), 4 mM L-sistein, %0,6 polivilprolidin (PVP), 20 mM β - merkaptoetanol ve %0,5 bovine serum albumin (BSA) içeren ekstraksiyon tamponunda 4°C'de homojenize edildi. Karışım 5 dakika 400 g 'de santifüj edildi. Süpernatant kısmı alınıp 15 dakika 2000 g'de santifüj edildi. Santifüj işleminden sonra süpernatant alınıp 30 dakika 10000 g'de tekrar santifüj edildi. Oluşan pelet alınıp 0,3 M mannitol, 20 mM MOPS (pH 7,2), 1mM EGTA ve %0,1 BSA içeren tamponda homojenize edildi. Elde edilen karışım 2000 g'de 10 dakika santifüj edildi. Süpernatant alınıp 15 dakika 15000 g'de santifüj edildi. Elde edilen saf mitokondri peleti az miktarda yıkama tamponunda homojenize edilip oksijen tüketimi ve Western blot analizleri için -80°C'de muhafaza edildi (Plummer 1980; Chien 2011).

3.3.8. Hücresel total solunum değeri ve AOX (Alternatif oksidaz) aktivitesi

Yıkama tamponunda çözülmüş izole mitokondrilerin oksijen tüketimi, ortama ikişer dakika aralıklarla eklenen 2 mM KCN ve 4 mM SHAM'ın neden olduğu oksijen tüketimi değerlerindeki değişimler kaydedilerek belirlendi. Sitokrom yolu inhibitörü 2 mM KCN eklenene kadar olan değer hücresel solunum değerini 2 mM KCN ile

alternatif oksidaz inhibitörü 4 mM SHAM arasındaki oksijen tüketim değeri ise AOX aktivitesi olarak belirlendi (Borecky and Vercesi 2005).

3.3.9. RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve Real Time PCR

Quantitectreversetranscription kiti kullanılarak üretici firmanın önerisine göre RNA izolasyonu şu sıra ile yapılmıştır.

1. 100 mg doku sıvı azot içerisinde ezilmiş ve 2 ml'lik ependorf tüplerine aktarılmıştır.
2. Ependorf tüplerinin üzerine 450 µl RLC tamponu ilave edilmiş ve vortekslenmiştir.
3. Elde edilen lizat leylak renkli QIAshredder tüpüne transfer edilmiş ve 2 dk santrifüj edilmiştir.
4. RNeasy hız kolonuna ½ hacimde soğuk etanol (%96-100) eklenmiş ve bu karışımdan 650 µl alınarak 2 ml'lik toplama tüpü içindeki pembe renkli RNeasy hız kolonuna aktarılıp 18000 rpm'de 45 sn santrifüj edilip süpernatant kısmı atılmıştır.
5. Süpernatant kısmı atılan hız kolonuna 700µl RW1 buffer eklenip yine 18000 rpm'de 45sn santrifüj edildi ve süpernatant kısmı atılmıştır.
6. Hız kolonuna 500µl RPE buffer eklenerek 45 sn 18000 rpm'desantirifüj edilip süpernatant kısmı atılmıştır.
7. Tekrar 500µl RPE eklenip 2 dk 18000 rpm'desantirifüj edilmiştir.
8. RNeasy hız kolonu kitinde bulunan 1.5 ml'lik toplama tüpüne yerleştirilmiş ve üzerine 30-40µlRNaz-Free su eklenip 1dk 18000 rpm'desantirifüj edilerek RNA izole edilmiştir.

Real time PCR'a başlamadan önce elde edilen RNA'ların saflığını kontrol etmek için RNA'lar agaroz jelde yürütülerek analizleri yapılmıştır. Bu işlemde şu sıra takip edilmiştir.

1. 07 gr agaroz 70 ml 20X MOPS tamponu ile karıştırılmış ve agaroz tamamen çözülünceye kadar kaynatılmıştır. Solüsyon 60°C'nin altına düşünce 12.8

uletidyumbromid ilave edilmiş ve jel kasete dökülüp kuruyuncaya kadar (yaklaşık 45 dk) beklenerek yüklemeye hazır hale getirilmiştir.

2. Analiz için örnekten 1µl bir tüpe alınmış ve üzerine 3.5µl ampul su, 0.5µl 20X MOPS, 5µlformamid eklenmiş ve boyama içinde 0.5µlbromfenolblue eklenip 65°C'de 15dk inkübe edilmiştir.

3. Jele yüklenmeden önce kaset sistemine 1X MOPS tamponu eklenmiş ve eşit hacim ve miktardaki örnekler Axygen pipetleri yardımıyla yüklenmiştir. Jel yürütme işlemi 90 V, 90 mA'de gerçekleştirilmiştir.

4. Son olarak jelde elde edilen bantlar gözlemlenerek RNA'nın saflığı kontrol edilmiştir.

Elde edilmiş olan RNA'nın saflığı belirlendikten sonra cDNA sentezine geçilmiştir. Sentez için ticari olarak temin edilmiş olan "Quantitectreversetranscription kit" kullanılmış ve üreticinin önerdiği protokol takip edilmiştir.

1. cDNA sentezi için hazırlanmış olan reaksiyon karışımı (2µl QDNA wipeoutbuffer 7x, 1 µg olacak şekilde hazırlanmış RNA ve son hacim 14 µl olacak şekilde RNAasefree su) 42°C'de 2 dk inkübe edilmiş ve buz banyosuna alınmıştır.

2. Yine buz banyosu üzerinde reaksiyon karışımına 1 µl RT primer mix, 4µlQuantiscriptRTbuffer 5x, 1 µlQuantiscriptreversetranscritase ilave edilmiş ve son karışım 42°C'de 30 dk inkübasyona bırakılmıştır.

3. Son olarak 95°C'de 3 dk inkübasyona bırakılmış ve buz banyosu üzerine alınarak reaksiyon durdurulmak suretiyle cDNA sentezi tamamlanmıştır.

cDNA 500 ng olacak şekilde hazırlanmış ve real time PCR işlemine geçilmiştir. Bu işlen şu sıra takip edilerek yapılmıştır.

1. PCR reaksiyonu için örnekler (her örnek için 12.5 µl master mix, her örnek için 1 µl primer, her örnek için 5 µl cDNA ve her örnek için 6.5 µl Rnase free su) hazırlanmış ve iyice karıştırıldıktan sonra önceden soğutulmuş olan PCR metal bloğu içerisine yerleştirilmiştir.

2. Örnekler hazırlandıktan sonra 500 ng cDNA stok olarak kullanılarak bu stok 1/1, 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000 oranlarında seyretilerek hazırlanmıştır.
3. PCR cihazında döngüler;
 - 1döngü 15 dk 95°C
 - 40döngü 15 sn 94°C, 60 sn 60°C

Şeklinde ayarlanmıştır. Bu işlem için Rotor Gene-Q kullanılarak analiz edilmiştir. Verilerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi Livak ve Schmittgen 2001'e ait $2^{\Delta CT}$ yöntemine göre 18 S housekeeping geni referans alındı ve tek yönlü varyans analizine (ANOVA) göre yapılmıştır.

Araştırmada kullanılan ve *Zea mays* için hazırlanan primerler aşağıda gösterilmiştir.

Zea mays alternative oxidase (AOX1) mRNA primer details

Sense primer	position	Tm	GC%	3'dG	Dimer
AGGTGCTTTTCTGGCGTTT	1.277	55.9	47.4	-4.6	0
Anti-sense primer	position	Tm	GC%	3'dG	Dimer
CGATATTAGCGAGCCCAATTC	1.356	55.3	47.6	-2.8	

Zea mays alternative oxidase AOX 1 precursor (aox1) mRNA aox1 precursor(AOX2)

Sense primer	position	Tm	GC%	3'dG	Dimer
GTCTTCTTCAACGCCTACTTC	847	55	47.6	-3.6	0
Anti-sense primer	position	Tm	GC%	3'dG	Dimer
GAGGTATTCGGTATATGAGTGGAT	954	56.2	41.7	-3.9	

Zea mays rrn18 18s ribosomal RNA, *Zea mays* subsp. *maize* mitochondrion, complete genome

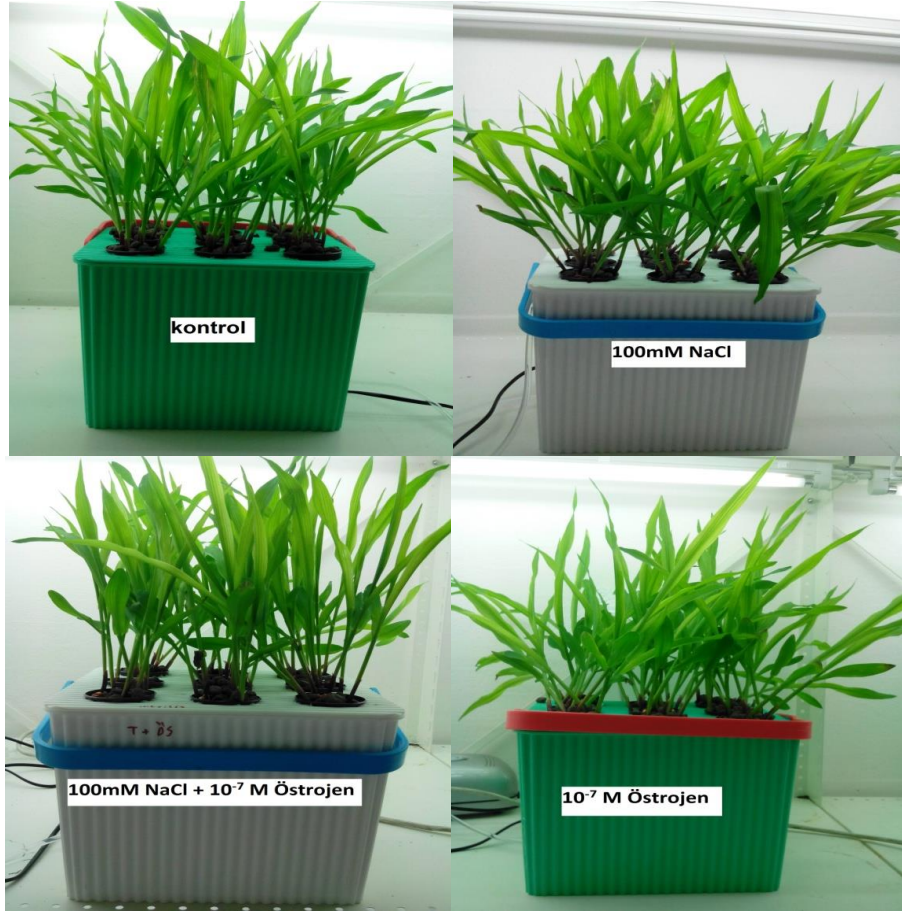
Sense primer	position	Tm	GC%	3'dG	Dimer
AAAGTGGCGGAATGCTCTC	952	55.9	52.6	-3.2	0
Anti-sense primer	position	Tm	GC%	3'dG	Dimer
TCTACGGATTTACCCCTACA	1.036	56.1	47.6	-3.3	

3.3.10. İstatistiksel analiz

Tez içerisinde sunulan sonuçlar, her bir uygulamadan üç örnek (3 paralel) ve her bir örnekten 2 tekrür yapıldıktan sonra elde edilen 6 değer in ortalamasıdır. Sonuçların karşılaştırılması, SPSS 20 paket programı kullanılarak tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile yapılmış $p < 0.05$ önem seviyesinde Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma Testi kullanılarak belirlenmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Araştırmamızda kullanılan östrojen hormonunun en uygun konsantrasyonunun literatür verilerinden ve yapılan ön çalışmalardan elde edilen verilere göre 10^{-7} M olduğu tespit edilmiştir. NaCl konsantrasyonu ise ön çalışmalarda farklı konsantrasyonlar uygulayarak bitkilerin çimlenme üzerine etkileri araştırıldı ve her iki varyetede letal konsantrasyon belirlendi ve böylece tuza tolerans farklılıkları netleştirildi ve her iki varyete de 100 mM NaCl uygulanmasıyla çalışmalarımızı büyüme aşamasında devam edildi. Çalışmaya 10^{-7} M konsantrasyondaki östrojen hormonu ve 100 mM NaCl uygulamaları ile devam edilerek tuza hassas *Zea mays* cv. 71MAY69 ve dirençli *Zea mays* cv. Simon gruplarındaki fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler parametrelerindeki değişimler tespit edilmiştir.



Şekil 4.1. 15 günlük Tuza hassas olan *Zea mays* cv 71 MAY 69 un genel görüntüleri



Şekil 4.2. 15 günlük Tuza dirençli olan *Zea mays* cv. simon un genel görüntüleri

4.1. Kök-Gövde Uzunluğu Sonuçları

Tuz stresine hassas *Zea mays* cv. 71MAY69 genotipinin kontrol grubunda kök ve gövde uzunluğu sırası ile 30.56 ve 34.45 cm olarak ölçülmüştür. Tuz uygulaması bu varyetenin kök uzunluğunu %17.4 oranında azaltmış ve 25.24 cm değerine geriletmiştir ($P < 0.05$). Gövde uzunluğu ise tuz uygulaması ile %18.3 oranında azalarak 28.15 cm değerlerine gerilemiştir. Tuz uygulamasına göre, tuza ilave olarak östrojen uygulaması yapılan grupta ise kök ve gövde uzunluğunda artış tespit edilmiştir. Kökteki artış %11 oranında olmuş ve kök uzunluğu 28.01 cm değerine yükselmiştir. Gövde ki artış ise %7.1 oranında olmuş ve gövde uzunluğu 30.15 cm değerine yükselmiştir. Kontrol grubuna

kıyasla yalnız östrojen uygulaması da kök uzunluğunu %3.5 artırarak 31.64 cm değerine, gövde uzunluğunu ise %2.6 artırarak 35.33 cm değerine ulaşmasına neden olmuştur (Çizelge 4.1) ($P < 0.05$).

Çizelge 4.1. Tuza hassas mısır *Zea mays* cv. 71MAY69 ve tuza dirençli mısır *Zea mays* cv. Simon varyetelerinde kök uzunluğunun ve uygulamalara göre değişim yüzdesi

Uygulamalar	Tuza hassas varyete <i>Zea mays</i> cv. 71MAY69		Tuza dirençli varyete <i>Zea mays</i> cv. Simon	
	Kök uzunluğu (cm)	Değişim (%)	Kök uzunluğu (cm)	Değişim (%)
Kontrol	30.56b	100	28.17b	100
Tuz	25.24d	82.59	25.24d	89.59
Tuz + 10^{-7} M Östrojen	28.01c	91.65	26.66c	94.63
10^{-7} M Östrojen	31.64a	103.53	28.99a	102.91

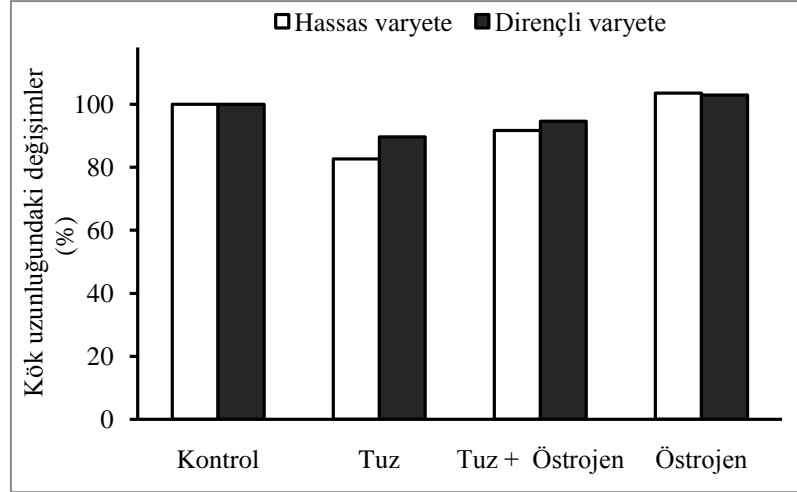
* Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır

Çizelge 4.2. Tuza hassas mısır *Zea mays* cv. 71MAY69 ve tuza dirençli mısır *Zea mays* cv. Simon varyetelerinde gövde uzunluğunun ve uygulamalara göre değişim yüzdesi

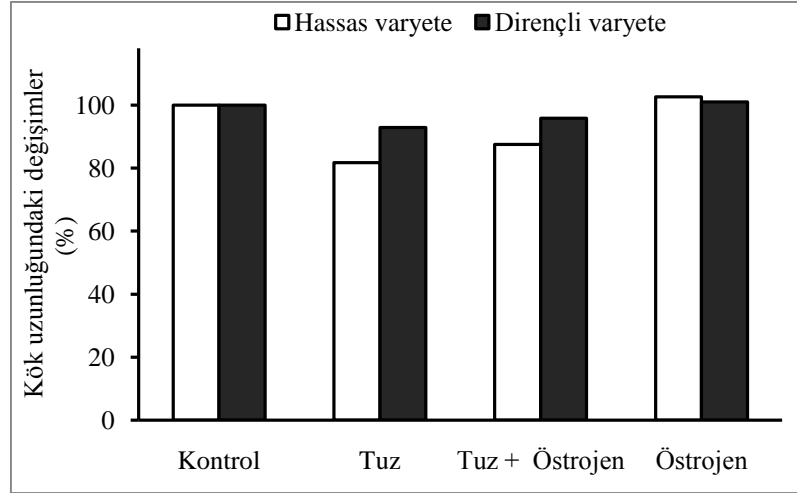
Uygulamalar	Tuza hassas varyete <i>Zea mays</i> cv. 71MAY69		Tuza dirençli varyete <i>Zea mays</i> cv. Simon	
	Gövde uzunluğu (cm)	Değişim (%)	Gövde uzunluğu (cm)	Değişim (%)
Kontrol	34.45b	100	31.20a	100
Tuz	28.15d	81.71	28.99c	92.91
Tuz + 10^{-7} M Östrojen	30.15c	87.51	29.88b	95.76
10^{-7} M Östrojen	35.33a	102.55	31.50a	100.96

* Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır.

Tuza dirençli genotip mısır varyetesinin kök-gövde uzunluğunda hassas varyetedeği gibi tuz uygulaması ile azalmıştır. Kontrol grubunda kök-gövde uzunluğu 28.17-31.2 cm olarak ölçülürken tuz uygulaması bu değerleri %10.4 ve %7.1 oranlarında azaltarak 25.24 ve 28.99 değerlerine geriletmiştir. Tuz uygulamasına kıyasla tuz+östrojen uygulamasında ise kök-gövde uzunlukları artış göstermiştir. Tuz uygulamasına kıyasla bu artışlar kökte %5.6 oranında gövde de ise %3.1 oranında olmuştur. Yalnız östrojen uygulaması ise kontrol grubuna göre kök-gövde uzunluğunu %2.9 ve %1 oranlarında artırarak sırası ile 28.99 ve 31.5 cm değerlerine ulaşmasına neden olmuştur (Çizelge 4.2).



Şekil 4.3. Tuza hassas *Zea mays* cv. 71 MAY69 ve tuza dirençli mısır *Zea mays* cv. Simon varyetelerinde kök uzunluğunun uygulamalara göre değişim yüzdesi



Şekil 4.4. Tuza hassas *Zea mays* cv. 71 MAY69 ve tuza dirençli mısır *Zea mays* cv. Simon varyetelerinde gövde uzunluğunun uygulamalara göre değişim yüzdesi

4.2. Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Sonuçları

4.2.1. SOD aktivitesi sonuçları

Tuz stresine hassas mısır varyetesinin kontrol grubunun yaprağında SOD aktivitesi 8.81 U.mg^{-1} protein değerinde ölçülürken tuz uygulaması SOD aktivitesini %6 artırarak 9.34 U.mg^{-1} protein değerine ulaşmasına neden olmuştur. Kökte ise kontrol grubunda 7.57 U.mg^{-1} protein değerinde olan SOD aktivitesi tuz uygulaması ile %28.5 düşerek 5.41 U.mg^{-1} protein değerine gerilemiştir. Tuz uygulamasına kıyasla tuz+östrojen uygulaması hem kökte hem de gövdede SOD aktivitesinin artmasına neden olmuştur. Bu artışlar kökte %34.2 oranında, yaprakta ise %5.8 oranında olmuştur. Kontrol grubuna göre yalnız östrojen uygulaması SOD aktivitesini kökte %4.9 ($P < 0.05$) oranında yaprakta %1.6 ($P > 0.05$) oranında artırarak kök ve yaprakta sırası ile 7.94 ve 8.95 U.mg^{-1} protein değerlerine ulaştırmıştır (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. Tuza hassas mısır *Zea mays* cv. 71MAY69 ve tuza dirençli mısır *Zea mays* cv. Simon varyetelerinin köklerinde uygulamalara göre SOD aktivitesi ve değişim yüzdeleri

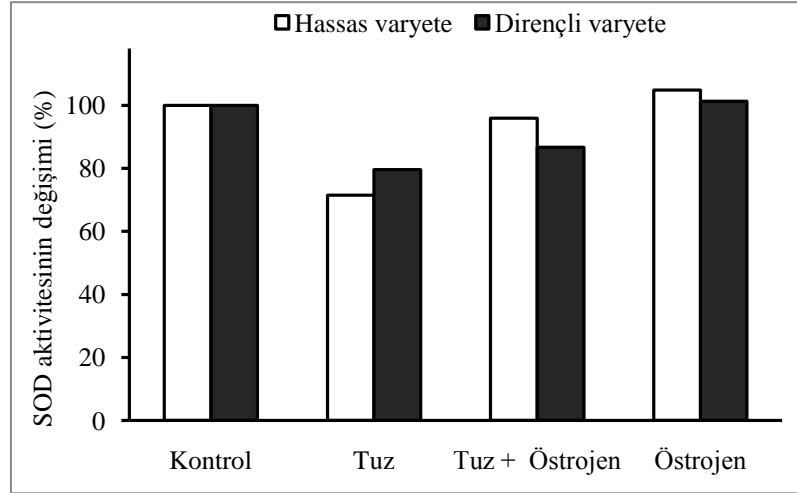
Uygulamalar	Tuza hassas varyete <i>Zea mays</i> cv. 71MAY69		Tuza dirençli varyete <i>Zea mays</i> cv. Simon	
	Aktivite (U.mg ⁻¹ protein)	Değişim (%)	Aktivite (U.mg ⁻¹ protein)	Değişim (%)
Kontrol	7.57b	100	8.24a	100
Tuz	5.41d	71.46	6.56c	79.61
Tuz + 10 ⁻⁷ M Östrojen	7.26c	95.9	7.14b	86.65
10 ⁻⁷ M Östrojen	7.94a	104.88	8.35a	101.33

* Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır

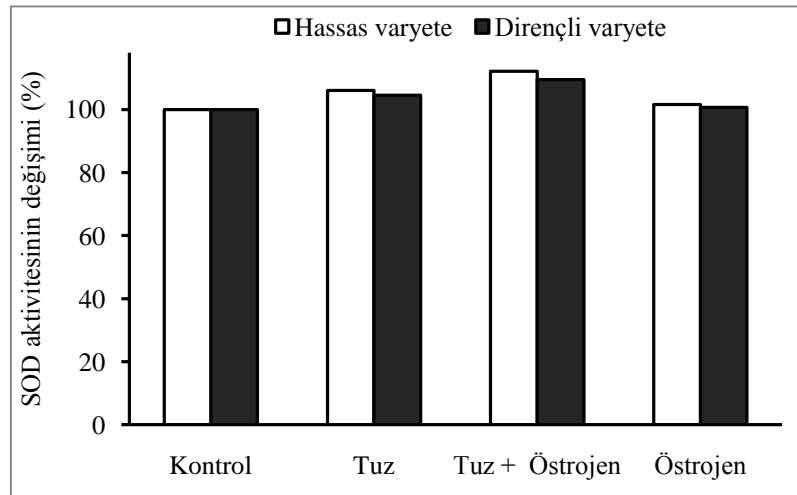
Çizelge 4.4. Tuza hassas mısır *Zea mays* cv. 71MAY69 ve tuza dirençli mısır *Zea mays* cv. Simon varyetelerinin yapraklarında uygulamalara göre SOD aktivitesi ve değişim yüzdeleri

uygulamalar	Tuza dirençli varyete <i>Zea mays</i> cv. Simon		Tuza dirençli varyete <i>Zea mays</i> cv. Simon	
	Aktivite	Değişim (%)	Aktivite	Değişim (%)
Kontrol	8.81c	100	9.34c	100
Tuz	9.34b	106	9.76b	104.4
Tuz + 10 ⁻⁷ M Östrojen	9.88a	112.1	10.23a	109.5
10 ⁻⁷ M Östrojen	8.95c	101.5	9.4c	100.6

* Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır



Şekil 4.5. Tuza hassas *Zea mays* cv. 71 MAY69 ve tuza dirençli mısır *Zea mays* cv. Simon varyetelerinin köklerinde uygulamalara göre SOD aktivitesinin değişim yüzdeleri



Şekil 4.6. Tuza hassas *Zea mays* cv. 71 MAY69 ve tuza dirençli mısır *Zea mays* cv. Simon varyetelerinin yapraklarında uygulamalara göre SOD aktivitesinin değişim yüzdeleri

Tuza dirençli mısır genotipi *Zea mays* cv. Simon'un kontrol grubunun yaprağında 9.34 U.mg^{-1} protein değerinde ölçülen SOD aktivitesi tuz uygulaması ile %4.5 oranında artarak 9.76 U.mg^{-1} protein değerine ulaşmıştır. Kökte ise tuz uygulaması SOD aktivitesini kontrol grubundaki 8.24 U.mg^{-1} protein değerinden %20.4 oranında azaltarak 6.56 U.mg^{-1} protein değerine geriletmiştir. Tuz uygulamasına göre tuz+östrojen uygulaması yapraktaki SOD aktivitesini %4.8 artırarak 10.23 U.mg^{-1} protein değerine kökteki SOD aktivitesini ise %8.8 oranında artırarak 7.14 U.mg^{-1}

protein değerine ulaştırmıştır ($P < 0.05$). Yalnız östrojen uygulaması ise kontrol grubunun kök ve yaprağında ki SOD aktivitelerini sırası ile %1.3 ve 0.6 oranlarında artırarak 8.35 ve 9.4 U.mg^{-1} protein seviyelerine ulaştırdığı belirlenmiştir (Çizelge 4.4)

4.2.2. POD aktivitesi sonuçları

Tuzluluğa hassas *Zea mays* cv. 71MAY69 mısır varyetisinin kontrol grubu bitkilerine göre tuz uygulamasının hem yaprak hem de kökte ki POD aktivitesinde önemli derecede düşüşe neden olduğu saptanmıştır. Kontrol grubu bitkilerin kök ve yaprağında POD enzim aktiviteleri sırası ile 2449 ve 662 U.mg^{-1} protein olarak ölçülmüşken tuz uygulamasında bu değerler kökte %2.2 yaprakta %20.3 azalarak sırası ile kök ve yaprakta 2395 ve 376 U.mg^{-1} proteine gerilemiştir ($P < 0.05$). Tuz uygulamasına göre tuz+östrojen uygulaması yapılan bitkilerin kök ve yapraklarındaki POD aktiviteleri kökte %13.2 ve yaprakta %29 artış göstererek 2710 ve 650 U.mg^{-1} protein değerlerine yükselmiştir. Yalnız östrojen uygulamasında kontrol grubuna göre POD aktivitesini artırmıştır. Bu artışlar kökte %1.9 oranında olmuş ve enzim aktivitesi 2495 U.mg^{-1} protein değerinde iken yaprakta %0.5 oranında artışla 665 U.mg^{-1} protein değerine yükselmiştir (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. Tuza hassas mısır *Zea mays* cv. 71MAY69 ve tuza dirençli mısır *Zea mays* cv. Simon varyetelerinin köklerinde uygulamalara göre POD aktivitesi ve değişim yüzdeleri

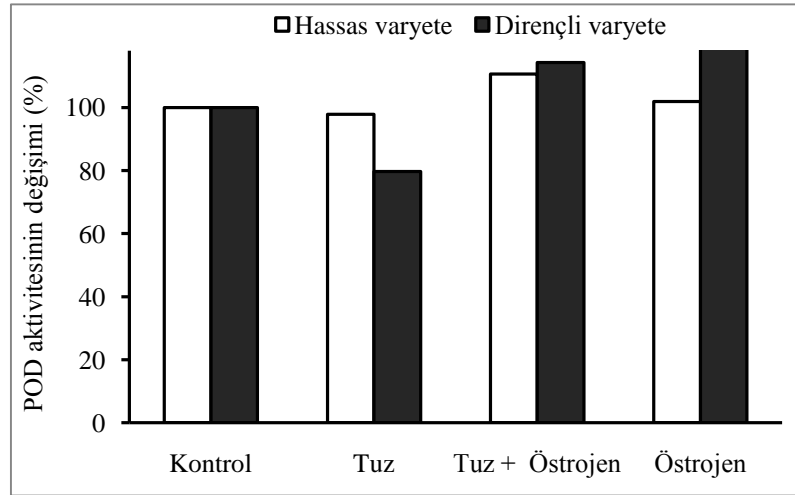
Uygulamalar	Tuza dirençli varyete <i>Zea mays</i> cv. Simon		Tuza dirençli varyete <i>Zea mays</i> cv. Simon	
	Aktivite (U.mg^{-1} protein)	Değişim (%)	Aktivite (U.mg^{-1} protein)	Değişim (%)
Kontrol	2449c	100	4863c	100
Tuz	2395d	97.79	3876d	79.7
Tuz + 10^{-7} M Östrojen	2710a	110.65	5559b	114.31
10^{-7} M Östrojen	2495b	101.87	5811a	119.49

* Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır

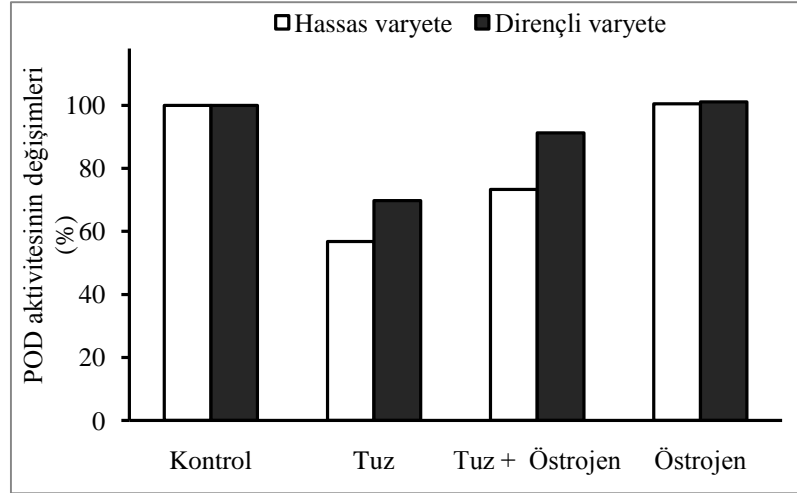
Çizelge 4.6. Tuza hassas mısır *Zea mays* cv. 71MAY69 ve tuza dirençli mısır *Zea mays* cv. Simon varyetelerinin yapraklarında uygulamalara göre POD aktivitesi ve değişim yüzdeleri

Uygulamalar	Tuza dirençli varyete <i>Zea mays</i> cv. Simon		Tuza dirençli varyete <i>Zea mays</i> cv. Simon	
	Aktivite (U.mg ⁻¹ protein)	Değişim (%)	Aktivite (U.mg ⁻¹ protein)	Değişim (%)
Kontrol	662a	100	387a	100
Tuz	376c	56.79	270c	69.76
Tuz + 10 ⁻⁷ M Östrojen	485b	73.26	353b	91.21
10 ⁻⁷ M Östrojen	665a	100.45	391a	101.03

* Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır



Şekil 4.7. Tuza hassas *Zea mays* cv. 71 MAY69 ve tuza dirençli mısır *Zea mays* cv. Simon varyetelerinin köklerinde uygulamalara göre POD aktivitesinin değişim yüzdeleri



Şekil 4.8. Tuza hassas *Zea mays* cv. 71 MAY69 ve tuza dirençli mısır *Zea mays* cv. Simon varyetelerinin yapraklarında uygulamalara göre POD aktivitesinin değişim yüzdeleri

Tuzluluğa dirençli *Zea mays* cv. Simon mısır varyetesinin kök ve yaprağında da hassas varyete ile benzer sonuçlar elde edildi. Ancak dirençli varyetede ki artışların daha fazla olduğu tespit edildi. Kontrol grubu bitkilerin kök ve yaprağındaki POD aktiviteleri 4863 ve 387 U.mg⁻¹ protein değerlerinde iken tuz stresi bu değerleri %20.3 ve 30.2 değerlerinde düşürerek, 3876 ve 270 U.mg⁻¹ protein değerlerine geriletmiştir (P<0.05). Tuz uygulamasına göre tuz ile birlikte uygulanan östrojen hem kök hemde yaprakta POD aktivitesini artırmıştır. Bu artışlar kökte %43.4 ve yaprakta % 30.7 oranlarında olurken enzim aktiviteleri kökte 5559, yaprakta 353 U.mg⁻¹ protein değerlerinde olduğu belirlenmiştir. Yalnız östrojen uygulamasında kontrol grubuna göre POD aktivitesini kökte %19.5 artırarak 5811 U.mg⁻¹ protein değerine yaprakta ise %1 oranında artırarak 391 U.mg⁻¹ protein değerine ulaştırmıştır (Çizelge 4.6).

4.2.3. CAT aktivitesi sonuçları

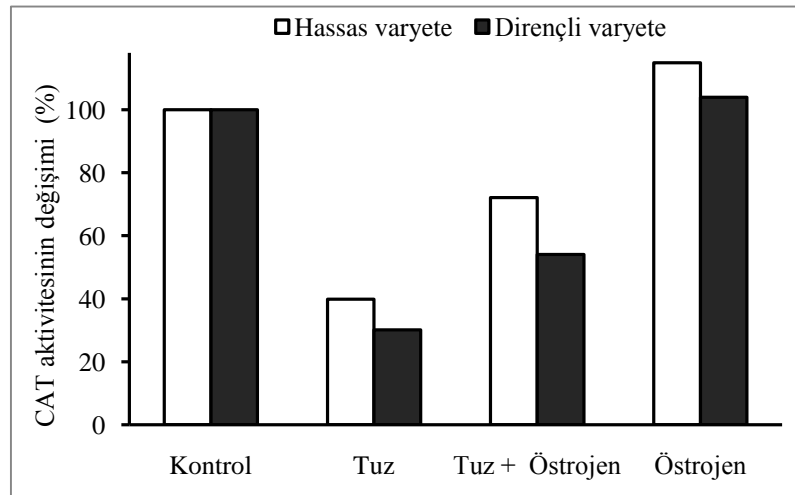
Zea mays cv. 71MAY69 varyetesinin yaprağında 4.77 U.mg⁻¹ protein değerinde ölçülen CAT aktivitesi tuz uygulaması ile %60.2 düşerek 1.9 U.mg⁻¹ protein değerine geriletmiştir (P<0.05). Köklerde ise CAT aktivitesinde herhangi birdeğişim tesbit edilememiştir. Tuz grubuna göre tuz+östrojen uygulaması CAT aktivitesini yaprakta %81.1 artırmış ve 3.44 U.mg⁻¹ protein değerine ulaştırmıştır. Yalnız östrojen

uygulaması ise kontrol grubunda tespit edilen CAT aktivitesini % 14.9 oranında artırmış ve bu uygulamadaki CAT aktivitesi 5.48 U.mg^{-1} protein olarak ölçülmüştür (Çizelge 4.7) ($P < 0.05$).

Çizelge 4.7. Tuza hassas mısır *Zea mays* cv. 71MAY69 ve tuza dirençli mısır *Zea mays* cv. Simon varyetelerinin yapraklarında uygulamalara göre CAT aktivitesi ve değişim yüzdeleri

Uygulamalar	Tuza dirençli varyete <i>Zea mays</i> cv. Simon		Tuza hassas varyete <i>Zea mays</i> cv. Simon	
	Aktivite (U.mg^{-1} protein)	Değişim (%)	Aktivite (U.mg^{-1} protein)	Değişim (%)
Kontrol	4.77b	100	4.59b	100
Tuz	1.90d	39.83	1.38d	30.06
Tuz + 10^{-7} M Östrojen	3.44c	72.11	2.48c	54.03
10^{-7} M Östrojen	5.48a	114.88	4.77a	103.92

* Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır



Şekil 4.9. Tuza hassas *Zea mays* cv. 71 MAY69 ve tuza dirençli mısır *Zea mays* cv. Simon varyetelerinin yapraklarında uygulamalara göre CAT aktivitesinin değişim yüzdeleri

Zea mays cv. Simon genotipinde de kökte herhangi bir CAT aktivitesi tespit edilememiştir. Diğer taraftan kontrol bitkisinin yaprağında CAT aktivitesi 4.59 U.mg^{-1} protein değerinde iken tuz uygulaması bu değeri %69.9 düşürerek 1.38 U.mg^{-1} protein değerine geriletmiştir. Tuz uygulamasına göre tuz+östrojen uygulaması ise CAT aktivitesini %79.7 oranında artırmış ve 2.48 U.mg^{-1} protein değerine ulaştırmıştır. Östrojen uygulamasıda kontrol grubuna göre CAT aktivitesini %3.9 oranında artırarak 4.77 U.mg^{-1} protein değerine yükselttiği belirlenmiştir (Çizelge 4.8) ($P<0.05$).

4.2.4. APX aktivitesi sonuçları

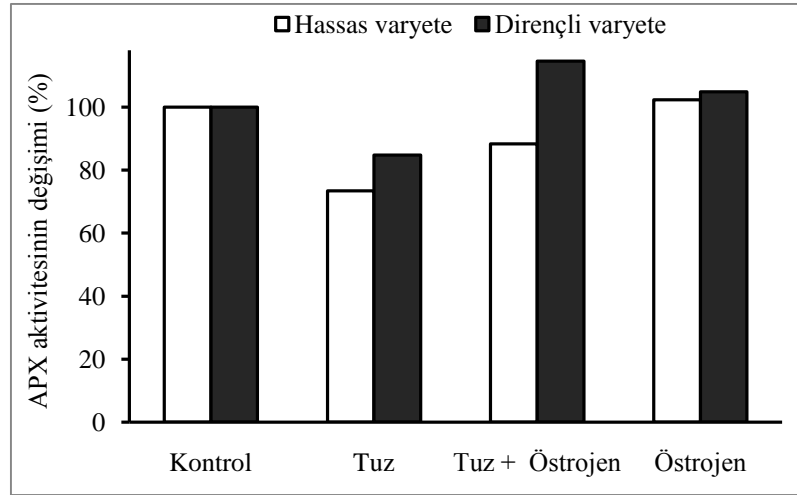
Tuza hassas mısır bitkisinde tuz uygulaması APX aktivitesini kökte %26.6 düzeyinde düşürürken yaprakta %10.7 artırmıştır. Kontrol bitkisinin kök ve yaprağındaki enzim aktivite değerleri sırası ile 1.28 ve 1.78 U.mg^{-1} protein olarak ölçülürken tuz uygulamasıyla kökte 0.94 , yaprakta 1.97 U.mg^{-1} protein olarak ölçülmüştür. Tuz uygulamasına kıyasla tuz+östrojen uygulaması APX enzim aktivitesini tuz uygulamasına göre kök ve yaprakta sırası ile %20.2 ve %7.6 oranında artırarak 1.13 ve 2.12 U.mg^{-1} protein değerlerine ulaştırmışlardır ($P<0.05$). Kontrol grubuna göre, yalnız östrojen uygulaması da enzim aktivitesini artırdığı tespit edilmiştir. APX aktivitesinde östrojen uygulaması kontrole göre kök ve yaprakta sırası ile %2.3 ve %5.1 artışa neden olurken bu uygulama sonucunda enzim aktivitesi değerleri kökte 1.31 , yaprakta 1.87 U.mg^{-1} protein olarak saptanmıştır (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.8. Tuza hassas mısır *Zea mays* cv. 71MAY69 ve tuza dirençli mısır *Zea mays* cv. Simon varyetelerinin köklerinde uygulamalara göre APX aktivitesi ve değişim yüzdeleri

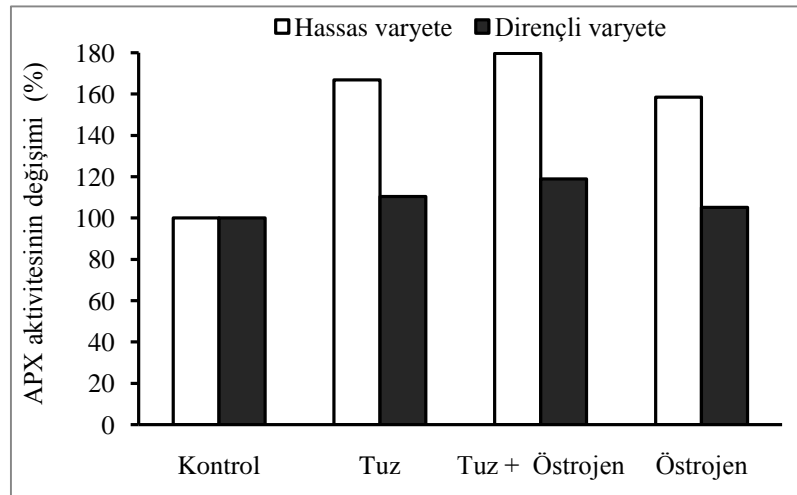
Uygulamalar	Tuza dirençli varyete <i>Zea mays</i> cv. Simon		Tuza dirençli varyete <i>Zea mays</i> cv. Simon	
	Aktivite (U.mg ⁻¹ protein)	Değişim (%)	Aktivite (U.mg ⁻¹ protein)	Değişim (%)
Kontrol	1.28a	100	1.44c	100
Tuz	0.94c	73.43	1.22d	84.72
Tuz + 10 ⁻⁷ M Östrojen	1.13b	88.28	1.65a	114.58
10 ⁻⁷ M Östrojen	1.31a	102.34	1.51b	104.86

Çizelge 4.9. Tuza hassas mısır *Zea mays* cv. 71MAY69 ve tuza dirençli mısır *Zea mays* cv. Simon varyetelerinin yapraklarında uygulamalara göre APX aktivitesi ve değişim yüzdeleri

Uygulamalar	Tuza dirençli varyete <i>Zea mays</i> cv. Simon		Tuza dirençli varyete <i>Zea mays</i> cv. Simon	
	Aktivite (U.mg ⁻¹ protein)	Değişim (%)	Aktivite (U.mg ⁻¹ protein)	Değişim (%)
Kontrol	1.18d	100	2.11d	100
Tuz	1.97b	166.94	2.33b	110.42
Tuz + 10 ⁻⁷ M Östrojen	2.12a	179.66	2.51a	118.95
10 ⁻⁷ M Östrojen	1.87c	158.47	2.22c	105.21



Şekil 4.10. Tuza hassas *Zea mays* cv. 71 MAY69 ve tuza dirençli mısır *Zea mays* cv. Simon varyetelerinin köklerinde uygulamalara göre APX aktivitesinin değişim yüzdeleri



Şekil 4.11. Tuza hassas *Zea mays* cv. 71 MAY69 ve tuza dirençli mısır *Zea mays* cv. Simon varyetelerinin yapraklarında uygulamalara göre APX aktivitesinin değişim yüzdeleri

Tuzluluğa dirençli mısır varyetesinde de hassas varyetedeki APX aktivitesi değişimlerine benzer eğilimde sonuçlar elde edilmiştir. Kontrol grubunun kök ve yaprağında 1.44 ve 2.11 U.mg^{-1} protein olarak ölçülen enzim aktiviteleri tuz uygulaması ile kökte %15.3 düşüşle 1.22 U.mg^{-1} protein değerine gerilerken yaprakta %10.4 oranında artışla 2.33 U.mg^{-1} protein değerlerine ulaşmıştır. APX aktivitesini tuz+östrojen uygulaması ise tuz uygulamasına göre kök ve yaprakta sırasıyla %35.2 ve %7.7 artırmış ve bu uygulamadaki aktivite değerleri kökte 1.65 , yaprakta 2.51 U.mg^{-1}

¹ protein olarak ölçülmüştür ($P < 0.05$). Östrojen uygulaması ise APX aktivitesini kontrol grubuna göre kökte %4.9 oranında artırmış ve 1.51 U.mg^{-1} protein değerine ulaştırmıştır. Bu uygulama APX aktivitesinde kontrol grubuna göre yaprakta %5.2 artışa neden olarak 2.22 U.mg^{-1} protein seviyesinde ölçülmüştür (Çizelge 4.10).

4.2.5. GR aktivitesi sonuçları

Tuza hassas mısır bitkisinde tuz uygulaması GR aktivitesini kökte %12.6 düzeyinde düşürürken yaprakta %11.2 artırmıştır. Kontrol bitkisinin kök ve yaprağındaki enzim aktivite değerleri sırası ile 2.06 ve 1.78 U.mg^{-1} protein olarak ölçülürken tuz uygulamasıyla kökte 1.8 , yaprakta 1.98 U.mg^{-1} protein olarak ölçülmüştür. Tuz+östrojen uygulaması GR enzim aktivitesini tuz uygulamasına göre kök ve yaprakta sırası ile %31.7 ve %11.6 oranında artırarak 2.37 ve 2.21 U.mg^{-1} protein değerlerine ulaştırmışlardır ($P < 0.05$). Yalnız östrojen uygulaması da kontrol grubuna göre GR aktivitesini kökte %3.9 artırarak 2.14 U.mg^{-1} protein değerine yaprakta ise %4.5 oranında artırarak 1.86 U.mg^{-1} protein değerine ulaştırmıştır (Çizelge 4.11).

Çizelge 4.10. Tuza hassas mısır *Zea mays* cv. 71MAY69 ve tuza dirençli mısır *Zea mays* cv. Simon varyetelerinin köklerinde uygulamalara göre GR aktivitesi ve değişim yüzdeleri

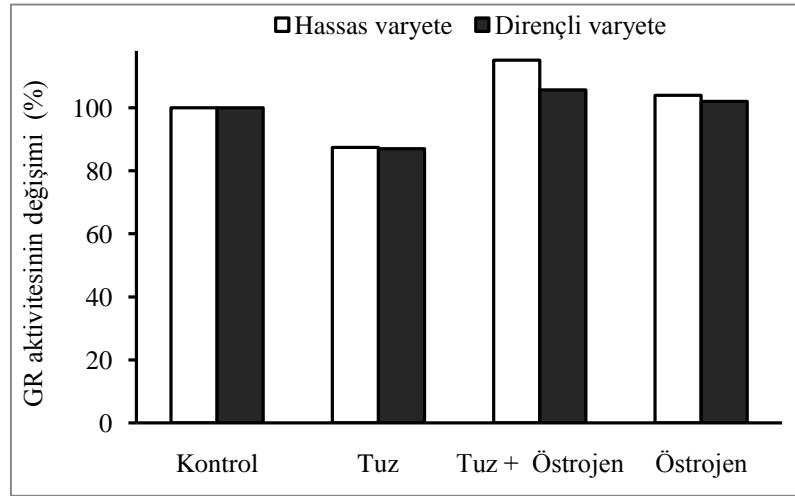
Uygulamalar	Tuza dirençli varyete <i>Zea mays</i> cv. Simon		Tuza dirençli varyete <i>Zea mays</i> cv. Simon	
	Aktivite (U.mg^{-1} protein)	Değişim (%)	Aktivite (U.mg^{-1} protein)	Değişim (%)
Kontrol	2.06c	100	2.46b	100
Tuz	1.80d	87.37	2.14c	86.99
Tuz + 10^{-7} M Östrojen	2.37a	115.04	2.60a	105.69
10^{-7} M Östrojen	2.14b	103.88	2.51b	102.03

* Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır

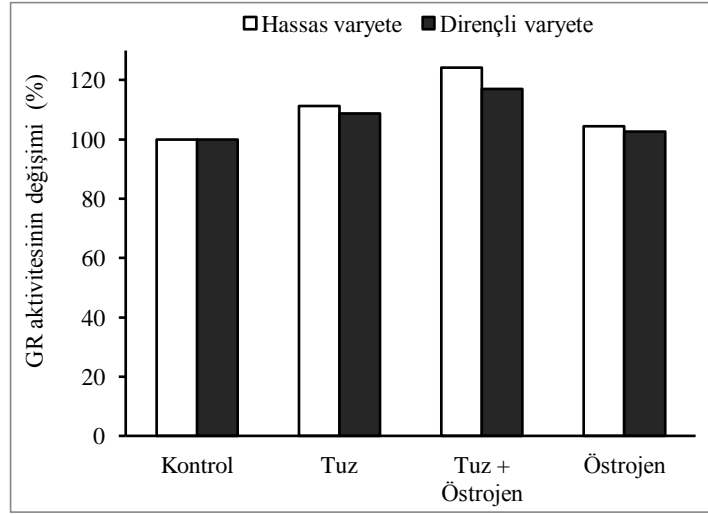
Çizelge 4.11. Tuza hassas mısır *Zea mays* cv. 71MAY69 ve tuza dirençli mısır *Zea mays* cv. Simon varyetelerinin yapraklarında uygulamalara göre GR aktivitesi ve değişim yüzdeleri

Uygulamalar	Tuza dirençli varyete <i>Zea mays</i> cv. Simon		Tuza dirençli varyete <i>Zea mays</i> cv. Simon	
	Aktivite (U.mg ⁻¹ protein)	Değişim (%)	Aktivite (U.mg ⁻¹ protein)	Değişim (%)
Kontrol	1.78d	100	1.94c	100
Tuz	1.98b	111.23	2.11b	108.76
Tuz + 10 ⁻⁷ M Östrojen	2.21a	124.15	2.27a	117.01
10 ⁻⁷ M Östrojen	1.86c	104.49	1.99c	102.57

* Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır



Şekil 4.12. Tuza hassas *Zea mays* cv. 71 MAY69 ve tuza dirençli mısır *Zea mays* cv. Simon varyetelerinin köklerinde uygulamalara göre GR aktivitesinin değişim yüzdeleri



Şekil 4.13. Tuza hassas *Zea mays* cv. 71 MAY69 ve tuza dirençli mısır *Zea mays* cv. Simon varyetelerinin yapraklarında uygulamalara göre GR aktivitesinin değişim yüzdeleri

Tuza dirençli mısır genotipi *Zea mays* cv. Simon'un kontrol grubunun yaprağında 1.94 U.mg^{-1} protein değerinde ölçülen GR aktivitesi tuz uygulaması ile %8.8 oranında artarak 2.11 U.mg^{-1} protein değerine ulaşmıştır. Kökte ise GR aktivitesini tuz uygulaması kontrol grubundaki 2.46 U.mg^{-1} protein değerinden %13 oranında azaltarak 2.14 U.mg^{-1} protein değerine geriletmişir. Tuz uygulamasına göre tuz+östrojen uygulaması yapraktaki GR aktivitesini %7.6 artırarak 2.27 U.mg^{-1} protein değerine kökteki GR aktivitesini ise %21.5 oranında artırarak 2.6 U.mg^{-1} protein değerine ulaştırmıştır ($P < 0.05$). Yalnız östrojen uygulaması ise kontrol grubunun kök ve yaprağında ki GR aktivitelerini sırası ile %2 ve 2.6 oranlarında artırarak 2.51 ve 1.99 U.mg^{-1} protein seviyelerine ulaştırdığı belirlenmiştir (Çizelge 4.12) ($P > 0.05$).

4.3. Süperoksit (O_2^-) Üretimi Sonuçları

Hassas mısır genotipi *Zea mays* cv. 71MAY69 çeşidinin hem kök hem de yaprağında süperoksit anyonu üretimi tuz uygulaması ile önemli derecede yükseldiği belirlendi ($P < 0.05$). Kontrol grubunun kökünde $4.8 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{g}^{-1}$ doku ve yaprağında $3.9 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{g}^{-1}$ doku olarak ölçülen süperoksit anyonu miktarı tuz uygulaması ile

kökte %40.6, yaprakta %41 oranlarında artışla kök ve yaprakta sırası ile 6.75 ve 5.5 $\text{nmol.min}^{-1}.\text{g}^{-1}$ doku olarak ölçüldü. Tuza ilave olarak östrojen uygulaması ile tuz uygulamasına göre süperoksit içeriği hem kök hem de yaprakta azalmıştır. Bu azalış kök %13.3 yaprakta ise %14.5 oranlarında olmuştur. Bu uygulama sonucu süperoksit anyonu üretimi kök ve yaprakta sırası ile 5.85 ve 4.7 $\text{nmol.min}^{-1}.\text{g}^{-1}$ doku olarak belirlenmiştir ($P<0.05$). Kontrol bitkilerine kıyasla yalnız östrojen uygulaması da süperoksit içeriğini düşürmüştür. Bu düşüş kontrol grubuna göre kök dokusunda %4.2 oranında olurken yaprakta bu oranın %2.6 değerinde olduğu saptanmıştır. Bu uygulama ile süperoksit miktarı kök ve yaprakta 4.6 ve 3.8 $\text{nmol.min}^{-1}.\text{g}^{-1}$ doku değerlerinde olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.13) ($P<0.05$).

Çizelge 4.12. Tuza hassas mısır *Zea mays* cv. 71MAY69 ve tuza dirençli mısır *Zea mays* cv. Simon varyetelerinin köklerinde uygulamalara göre süperoksit (O_2^-) üretimi ve değişim yüzdeleri

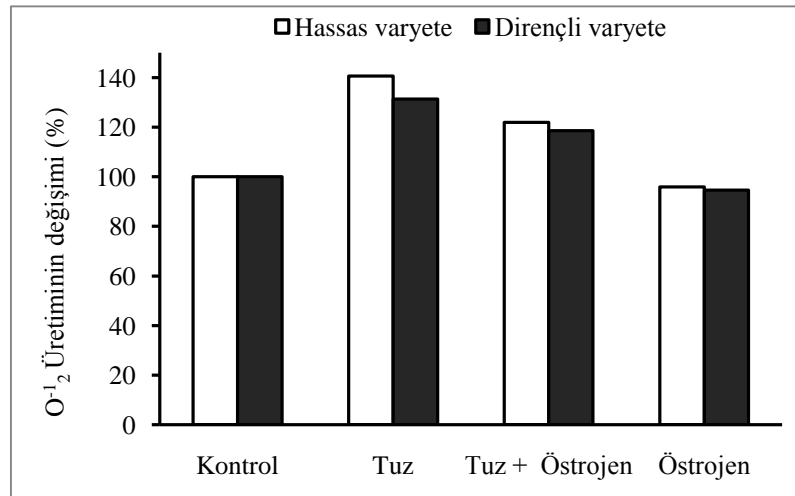
Uygulamalar	Tuza dirençli varyete <i>Zea mays</i> cv. Simon		Tuza dirençli varyete <i>Zea mays</i> cv. Simon	
	O_2^- içeriği ($\text{nmol.min}^{-1}.\text{g}^{-1}$ doku)	Değişim (%)	O_2^- içeriği ($\text{nmol.min}^{-1}.\text{g}^{-1}$ doku)	Değişim (%)
Kontrol	4.80c	100	4.21c	100
Tuz	6.75a	140.62	5.53a	131.35
Tuz + 10^{-7} M Östrojen	5.85b	121.87	4.99b	118.52
10^{-7} M Östrojen	4.60d	95.83	3.98d	94.53

* Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır

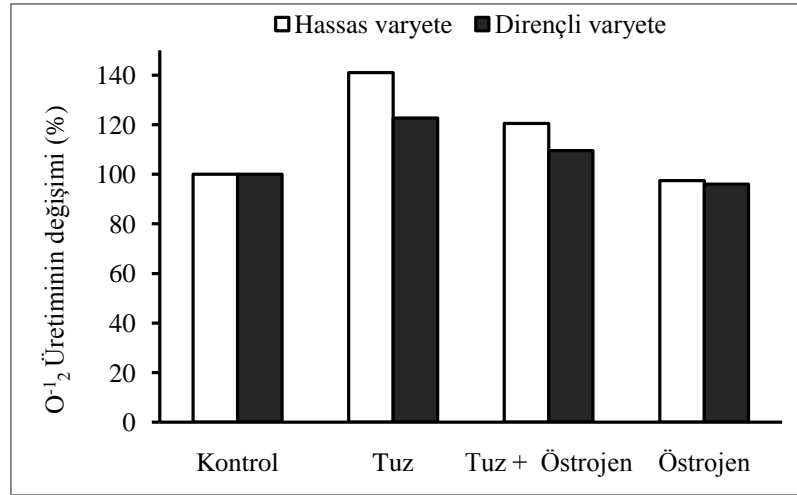
Çizelge 4.13. Tuza hassas mısır *Zea mays* cv. 71MAY69 ve tuza dirençli mısır *Zea mays* cv. Simon varyetelerinin yapraklarında uygulamalara göre süperoksit (O_2^-) üretimi ve değişim yüzdeleri

Uygulamalar	Tuza dirençli varyete <i>Zea mays</i> cv. Simon		Tuza dirençli varyete <i>Zea mays</i> cv. Simon	
	O_2^- içeriği (nmol.min ⁻¹ .g ⁻¹ doku)	Değişim (%)	O_2^- içeriği (nmol.min ⁻¹ .g ⁻¹ doku)	Değişim (%)
Kontrol	3.90c	100	3.75c	100
Tuz	5.50a	141.02	4.60a	122.66
Tuz + 10 ⁻⁷ M Östrojen	4.70b	120.51	4.11b	109.6
10 ⁻⁷ M Östrojen	3.80d	97.43	3.60d	96

* Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır



Şekil 4.14. Tuza hassas *Zea mays* cv. 71 MAY69 ve tuza dirençli mısır *Zea mays* cv. Simon varyetelerinin köklerinde uygulamalara göre süperoksit (O_2^-) değişim yüzdeleri



Şekil 4.15. Tuza hassas *Zea mays* cv. 71 MAY69 ve tuza dirençli mısır *Zea mays* cv. Simon varyetelerinin yapraklarında uygulamalara göre süperoksit (O_2^-) değişim yüzdeleri

Dirençli mısır genotipi *Zea mays* cv. 71MAY69 çeşidindeki süperoksit anyonu üretimi değişimlerinde hassas genotiple benzer seyir izlemiştir. Ancak bu genotipteki değişim oranları hassas genotipe göre daha düşük olmuştur. Süperoksit içeriğinde bu varyetede kontrol grubunun kök ve yaprağında 4.21 ve 3.75 $nmol.min^{-1}.g^{-1}$ doku değerlerinde ölçülürken tuz uygulaması bu değerleri kök ve yaprakta sırası ile %31.4 ve %22.7 artırarak 5.53 ve 4.6 $nmol.min^{-1}.g^{-1}$ doku değerlerine ulaştırmıştır. Tuz uygulamasına göre tuz+östrojen uygulaması ise süperoksit içeriğinde kökte %9.8 yaprakta %10.7 düşüşe neden olmuş ve bu uygulama sonucunda süperoksit miktarları kökte 4.99 yaprakta 4.11 $nmol.min^{-1}.g^{-1}$ doku değerlerinde ölçülmüştür ($P<0.05$). Yalnız başına uygulanan östrojende kontrol grubuna göre kıyaslandığında süperoksit içeriğini kök ve yaprakta %5.5 ve %4 oranlarında düşürerek kökte 3.98 yaprakta 3.60 $nmol.min^{-1}.g^{-1}$ doku değerlerine geriletmiştir (Çizelge 4.14) ($P<0.05$).

4.4. H_2O_2 İçeriği Sonuçları

Tuz stresine hassas *Zea mays* cv. 71MAY69 varyetesinin kontrol grubunun kök ve yaprağında sırası ile 0.853 ve 0.280 $\mu mol.g^{-1}$ doku değerinde ölçülen H_2O_2 içeriğini tuz uygulaması ile %37.5 ve %11.8 oranlarında artarak 1.173 ve 0.313 $\mu mol.g^{-1}$ doku değerlerine ulaştığı saptandı (Çizelge 4.15). Tuz uygulamasına göre tuz+östrojen

uygulamasının H₂O₂ içeriğini önemli oranlarda azalttığı belirlendi. Tuz uygulamasına göre bu uygulamayla kök ve yaprakta kaydedilen değerler sırasıyla %9.2 ve %4.7 oranlarında daha düşük olarak 1.065 ve 0.298 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ doku değerlerinde olduğu belirlendi ($P < 0.05$). Yalnız östrojen uygulamasıyla da kontrol grubuna göre önemli değerlerde düşüşler kaydedildi. Bu uygulama sonucunda H₂O₂ içeriği kontrole göre kökte %4.9, yaprakta %13.4 azaldığı belirlenmiştir ($P < 0.05$).

Çizelge 4.14. Tuza hassas mısır *Zea mays* cv. 71MAY69 ve tuza dirençli mısır *Zea mays* cv. Simon varyetelerinin köklerinde uygulamalara göre H₂O₂ içeriği ve değişim yüzdeleri

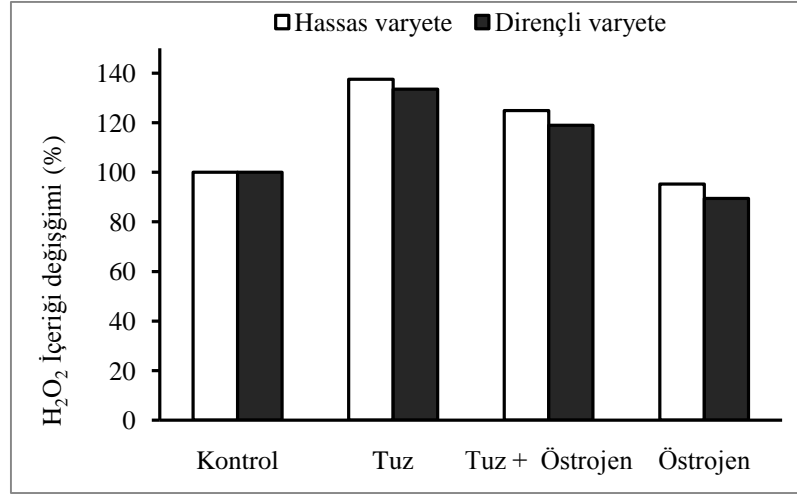
Uygulamalar	Tuza dirençli varyete <i>Zea mays</i> cv. Simon		Tuza dirençli varyete <i>Zea mays</i> cv. Simon	
	H ₂ O ₂ İçeriği ($\mu\text{mol.g}^{-1}$ doku)	Değişim (%)	H ₂ O ₂ İçeriği ($\mu\text{mol.g}^{-1}$ doku)	Değişim (%)
Kontrol	0.853c	100	0.433c	100
Tuz	1.173a	137.5	0.578a	133.4
Tuz + 10 ⁻⁷ M Östrojen	1.065b	124.8	0.515b	118.9
10 ⁻⁷ M Östrojen	0.812d	95.1	0.387d	89.3

* Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır

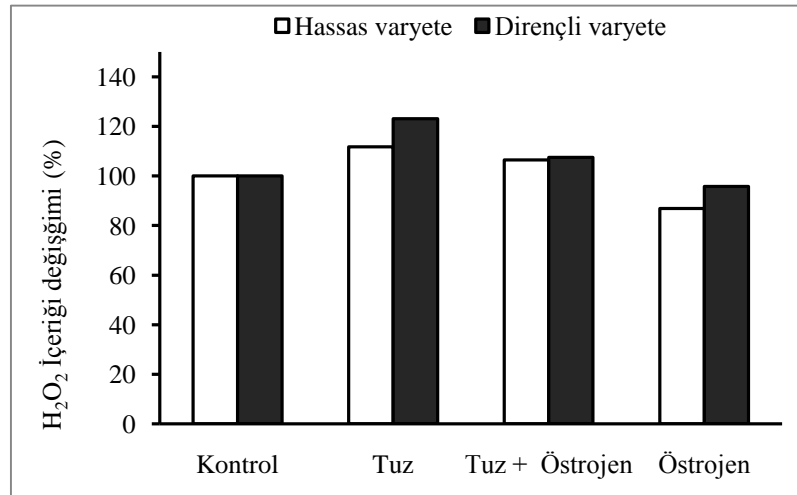
Çizelge 4.15. Tuza hassas mısır *Zea mays* cv. 71MAY69 ve tuza dirençli mısır *Zea mays* cv. Simon varyetelerinin yapraklarında uygulamalara göre H₂O₂ içeriği ve değişim yüzdeleri

Uygulamalar	Tuza dirençli varyete <i>Zea mays</i> cv. Simon		Tuza dirençli varyete <i>Zea mays</i> cv. Simon	
	H ₂ O ₂ İçeriği ($\mu\text{mol.g}^{-1}$ doku)	Değişim (%)	H ₂ O ₂ İçeriği ($\mu\text{mol.g}^{-1}$ doku)	Değişim (%)
Kontrol	0.853c	100	1.063c	100
Tuz	1.173a	111.78	1.308a	123.0
Tuz + 10 ⁻⁷ M Östrojen	1.065b	106.42	1.143b	107.5
10 ⁻⁷ M Östrojen	0.812d	86.79	1.018d	95.76

* Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır.



Şekil 4.16. Tuza hassas *Zea mays* cv. 71 MAY69 ve tuza dirençli mısır *Zea mays* cv. Simon varyetelerinin köklerinde uygulamalara göre H₂O₂ içeriğinin değişim yüzdeleri



Şekil 4.17. Tuza hassas *Zea mays* cv. 71 MAY69 ve tuza dirençli mısır *Zea mays* cv. Simon varyetelerinin yapraklarında uygulamalara göre H₂O₂ içeriğinin değişim yüzdeleri

Tuz stresine dirençli *Zea mays* cv. 71MAY69 varyetesinde de tuz uygulaması H_2O_2 içeriğini artırmıştır. Kontrol bitkisinin kök ve yaprağında ki H_2O_2 içeriği sırası ile 0.433 ve 1.063 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ doku değerlerinde ölçülmesine rağmen tuz uygulaması bu değerleri %33.5 ve %23 oranlarında artırmış, 0.578 ve 1.308 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ doku değerlerine ulaştırmıştır (Çizelge 4.16). Tuz uygulamasına göre tuz+östrojen uygulaması H_2O_2 içeriğinde kök ve yaprakta da sırasıyla %10.9 ve %12.6 oranlarında düşüşe neden olmuştur. Bu uygulamada H_2O_2 içeriği kök ve yaprakta 0.515 ve 1.143 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ doku değerlerinde ölçülmüştür. Yalnız östrojen uygulaması sonucunda ise H_2O_2 içeriği kontrol grubuna göre kök ve yaprakta da sırasıyla %10.6 ve %4.3 oranlarında bir azalışa neden olmuş ve bu uygulama H_2O_2 içeriğinin 0.387 ve 1.018 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ doku değerlerine gerilemesine neden olmuştur ($P<0.05$).

4.5. Lipid Peroksidasyon Seviyesi (MDA içeriği) Sonuçları

Tuz uygulamasının tuza hassas *Zea mays* cv. 71MAY69 varyetesinin bitkisinin kök ve yaprağındaki MDA içeriğinin kontrol bitkisine oranla önemli derecede artırdığı belirlendi. Kontrol bitkisinde MDA içeriği kök ve yaprakta sırası ile 2.048 ve 1.885 nmol.g^{-1} doku olarak belirlenirken tuz uygulaması bu değerleri yine sırası ile %18.8 ve %25.9 artırarak 2.434 ve 2.373 nmol.g^{-1} doku seviyelerine çıkardı ($P<0.05$). Tuz uygulamasına kıyasla, tuz+östrojen uygulaması MDA içeriğinde önemli azalmalara neden olduğu saptanmıştır. Tuz uygulamasına göre MDA içeriğini tuz+östrojen uygulaması kökte %4.6 azaltarak 2.322, yaprakta ise %16.3 azaltarak 1.986 nmol.g^{-1} doku düzeylerine düşürdüğü belirlenmiştir ($P<0.05$). Yalnız östrojen uygulaması ise tuz uygulamasına kıyasla MDA içeriğini kökte %0.9 ($P>0.05$) azaltarak 2.029 nmol.g^{-1} doku yaprakta ise %4.8 azaltarak 1.794 seviyelerine geriletmiştir (Çizelge 4.17).

Çizelge 4.16. Tuza hassas mısır *Zea mays* cv. 71MAY69 ve tuza dirençli mısır *Zea mays* cv. Simon varyetelerinin köklerinde uygulamalara göre MDA içeriği ve değişim yüzdeleri

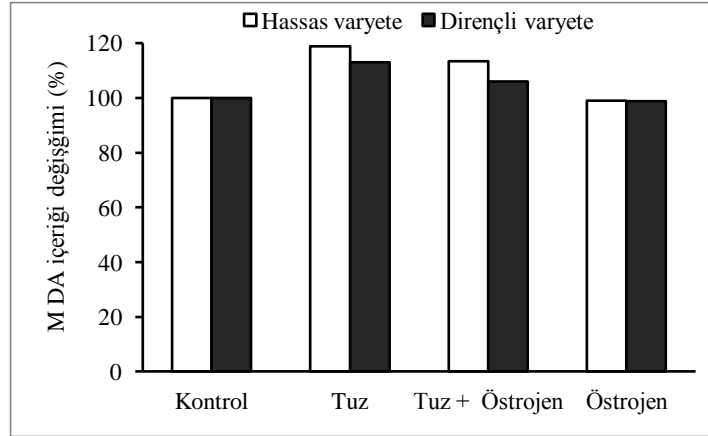
Uygulamalar	Tuza hassas varyete <i>Zea mays</i> cv. 71MAY 69		Tuza dirençli varyete <i>Zea mays</i> cv. Simon	
	MDA İçeriği (nmol.g ⁻¹ doku)	Değişim (%)	MDA İçeriği (nmol.g ⁻¹ doku)	Değişim (%)
Kontrol	2.048c	100	1.372c	100
Tuz	2.434a	118.84	1.550a	112.97
Tuz + 10 ⁻⁷ M Östrojen	2.322b	113.37	1.456b	106.12
10 ⁻⁷ M Östrojen	2.029c	99.07	1.357c	98.9

* Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır

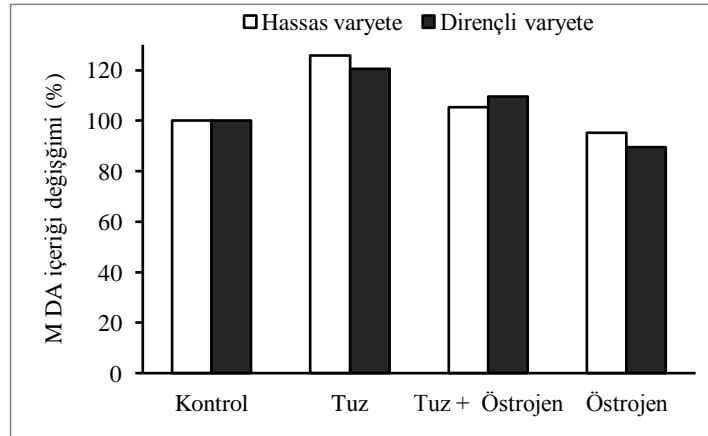
Çizelge 4.17. Tuza hassas mısır *Zea mays* cv. 71MAY69 ve tuza dirençli mısır *Zea mays* cv. Simon varyetelerinin yapraklarında uygulamalara göre MDA içeriği ve değişim yüzdeleri

Uygulamalar	Tuza hassas varyete <i>Zea mays</i> cv. 71MAY 69		Tuza dirençli varyete <i>Zea mays</i> cv. Simon	
	MDA İçeriği (nmol.g ⁻¹ doku)	Değişim (%)	MDA İçeriği (nmol.g ⁻¹ doku)	Değişim (%)
Kontrol	1.885c	100	2.333c	100
Tuz	2.373a	125.8	2.811a	120.4
Tuz + 10 ⁻⁷ M Östrojen	1.986b	105.3	2.555b	109.5
10 ⁻⁷ M Östrojen	1.794d	95.1	2.089d	89.5

* Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır



Şekil 4.18. Tuza hassas *Zea mays* cv. 71 MAY69 ve tuza dirençli mısır *Zea mays* cv. Simon varyetelerinin köklerinde uygulamalara göre MDA içeriğinin değişim yüzdeleri



Şekil 4.19. Tuza hassas *Zea mays* cv. 71 MAY69 ve tuza dirençli mısır *Zea mays* cv. Simon varyetelerinin yapraklarında uygulamalara göre MDA içeriğinin değişim yüzdeleri

Tuz uygulamasının tuz stresine dirençli *Zea mays* cv. 71MAY69 varyetesinin kök ve yaprağında kontrol grubuna göre MDA içeriğinde önemli artışlara neden olduğu belirlendi. MDA içeriği kontrol bitkisinin kök ve yaprağında sırası ile 1.372 ve 2.333 nmol.g^{-1} doku değerlerinde ölçüldü. Tuz uygulaması ise MDA içeriğini kontrol grubuna göre kök ve yaprakta %13 ve %20.5 oranlarında artırarak 1.550 ve 2.811 nmol.g^{-1} doku değerlerine yükselttiği saptandı. Tuz ile birlikte östrojen uygulamasının ise tuz uygulamasına göre MDA içeriğini önemli derecede düşürdüğü tespit edildi. Tuz

uygulamasına göre tuz+östrojen MDA içeriğini kökte %6.1 azaltırken yaprakta ise %9.1 azalttığı belirlendi. Tuz+östrojen uygulamasında kök ve yaprakta MDA içerikleri 1.456 ve 2.555 nmol.g⁻¹ doku olarak ölçülmüştür. Yanlı östrojen uygulamasında ise kontrol grubuna göre MDA düzeyi daha düşük değerde ölçülmüştür. Kontrol grubuna göre östrojen uygulaması kökteki MDA içeriğini %1.1 ($P>0.05$) azaltıp 1.357 nmol.g⁻¹ doku yapraktaki MDA değerini ise %10.5 azaltarak 2.089 değerlerine geriletmiştir (Çizelge 4.18).

4.6. Tuz ve Östrojen Uygulamalarının Hücresel Solunum ve AOX Aktivitesi Üzerine Etkileri

Mitokondride ki sitokrom yolu ile birlikte alternatif solunum yolunda tüketilen oksijen düzeyi hücresel solunum olarak kabul edilir. Hücresel solunum değeri ve AOX aktivitesi kök ve yaprak dokusundan izole edilmiş mitokondriler üzerinde sitokrom yolu inhibitörleri ve AOX inhibitörlerinin kullanılması ile oksijen tüketimindeki değişimlerin gözlenmesi yöntemiyle ölçülmüştür.

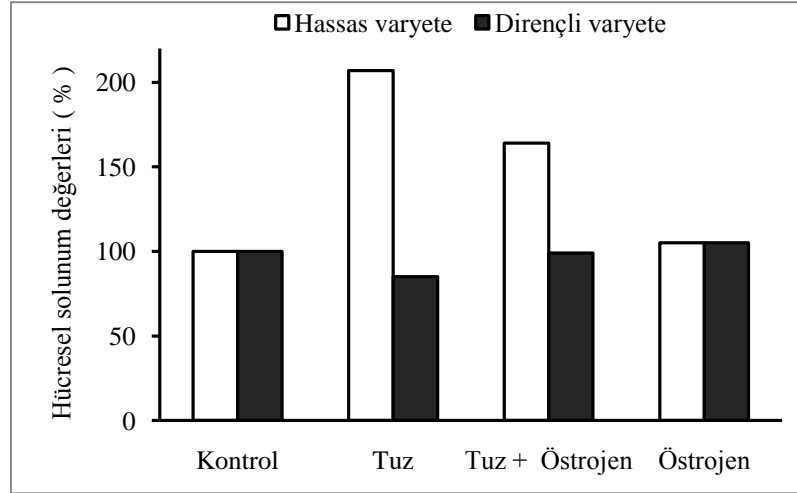
Tuz uygulamasının tuza hassas *Zea mays* cv. 71MAY69 varyetesinin kök ve yaprağında ki hücresel solunum değeri ve AOX aktivitesi %100 olarak kabul edilmiştir. Kontrol bitkilerine göre tuz uygulaması hücresel solunum değerini hem kökte hem de yaprakta ciddi anlamda artırmıştır. AOX aktivitesini ise kökte önemli oranda etkilemezken yaprakta belirgin artış sağlamıştır. Tuz+östrojen uygulaması ise tuz uygulamasına göre kök ve yapraktaki hücresel solunum değerini tuz uygulamasından elde edilen değerlerden %20.8 ve %12.5 azaltırken AOX aktivitesini önemli değerde artırmıştır ($P<0.05$). Yalnız östrojen uygulaması ise kontrol grubuna göre kök ve gövdede hem hücresel solunum değerlerini hem de AOX aktivitesini artırdığı belirlenmiştir (Çizelge 4.19).

Çizelge 4.18. Tuza hassas mısır *Zea mays* cv. 71MAY69 ve tuza dirençli mısır *Zea mays* cv. Simon varyetelerinin kök ve yapraklarında uygulamalara göre hücrel solunum değerlerinin yüzdesi

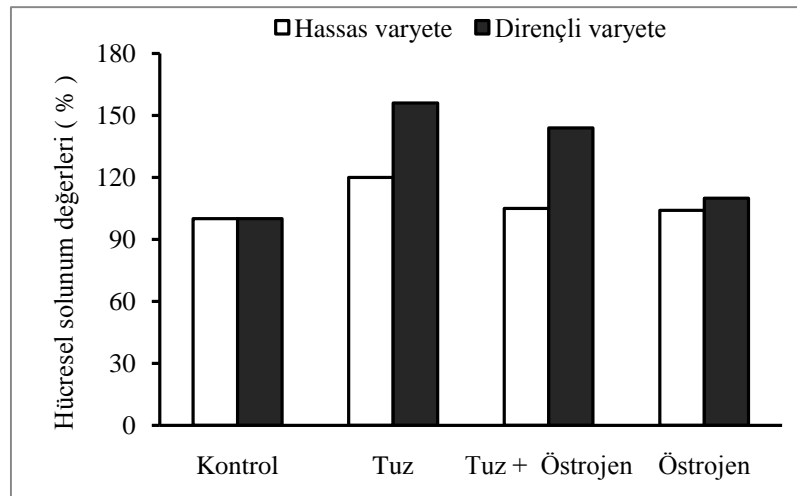
Uygulamalar	Tuza hassas varyete <i>Zea mays</i> cv. 71MAY 69 Hücrel solunum değeri (%)		Tuza dirençli varyete <i>Zea mays</i> cv. Simon Hücrel solunum değeri (%)	
	Kök	Yaprak	Kök	Yaprak
Kontrol	100	100	100	100
Tuz	207	120	85	156
Tuz + 10^{-7} M Östrojen	164	105	99	144
10^{-7} M Östrojen	105	104	105	110

Çizelge 4.19. Tuza hassas mısır *Zea mays* cv. 71MAY69 ve tuza dirençli mısır *Zea mays* cv. Simon varyetelerinin kök ve yapraklarında uygulamalara göre AOX aktivitesi değerlerinin yüzdesi

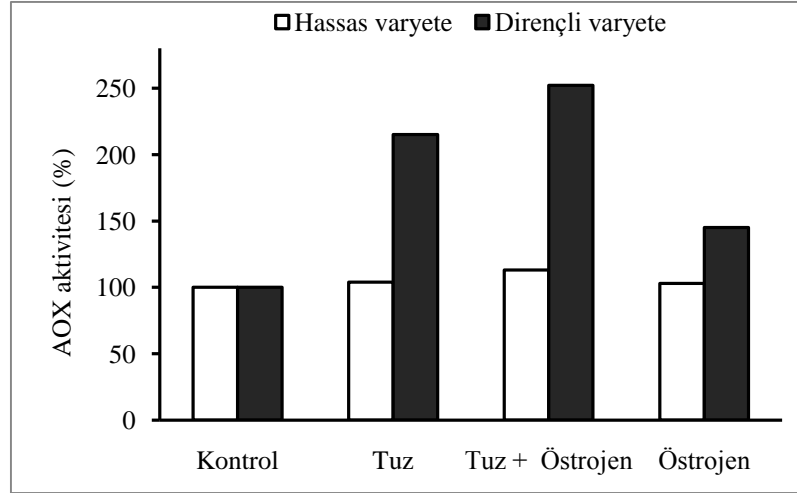
Uygulamalar	Tuza hassas varyete <i>Zea mays</i> cv. 71MAY 69 AOX aktivite değeri (%)		Tuza dirençli varyete <i>Zea mays</i> cv. Simon AOX aktivite değeri (%)	
	Kök	Yaprak	Kök	Yaprak
Kontrol	100	100	100	100
Tuz	104	125	215	235
Tuz + 10^{-7} M Östrojen	113	185	252	265
10^{-7} M Östrojen	103	115	145	130



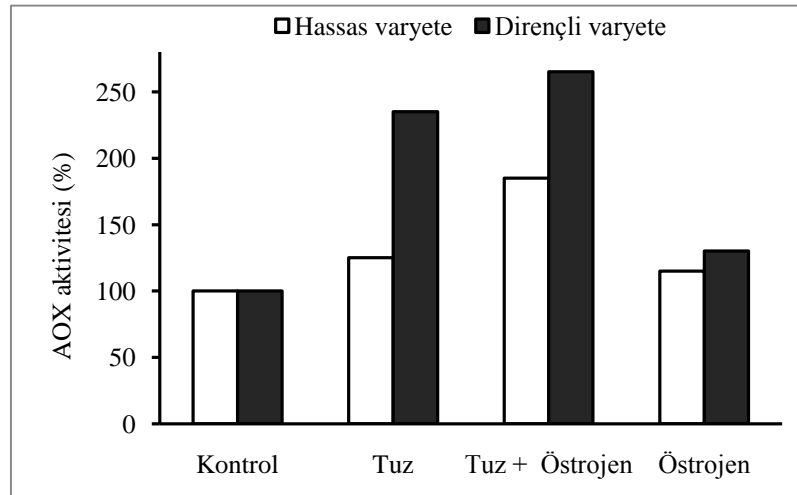
Şekil 4.20. Tuza hassas *Zea mays* cv. 71 MAY69 ve tuza dirençli mısır *Zea mays* cv. Simon varyetelerinin köklerinde uygulamalara Hücresel solunum değerleri yüzdesi



Şekil 4.21. Tuza hassas *Zea mays* cv. 71 MAY69 ve tuza dirençli mısır *Zea mays* cv. Simon varyetelerinin yapraklarında uygulamalara göre hücresel solunum değerlerinin yüzdesi



Şekil 4.22. Tuza hassas *Zea mays* cv. 71 MAY69 ve tuza dirençli mısır *Zea mays* cv. Simon varyetelerinin köklerinde uygulamalara göre AOX aktivitesinin yüzdesi



Şekil 4.23. Tuza hassas *Zea mays* cv. 71 MAY69 ve tuza dirençli mısır *Zea mays* cv. Simon varyetelerinin yapraklarında uygulamalara AOX aktivitesinin yüzdesi

Kontrol grubuna göre tuz uygulamasının tuz stresine dirençli *Zea mays* cv. 71MAY69 varyetesinin kökündeki hücre solunum değerini azalttığı yaprakta ise artırdığı belirlenmiştir. Bu uygulama ile AOX aktivitesi ise hem kök hem de yaprakta önemli oranlarda artırmıştır. Bu bitkinin kontrol grubuna göre tuz uygulaması hücre solunum değerini yaklaşık iki buçuk katına çıkarmıştır. Tuz+östrojen uygulaması ile tuz uygulamasına göre kökte hücre solunum artırırken yaprakta düşüş olduğu

belirlenmiştir. AOX aktivitesi ise tuz grubuna göre tuz+östrojen grubunda hem kökte hemde gövde önemli oranlarda artmıştır. Yalnız östrojen uygulaması ise kontrol grubuna göre kök ve gövde deki hem hücrel solunum değerini hemde AOX aktivitesini artırdığı belirlenmiştir (Çizelge 4.19).

4.7. AOX1 ve AOX2 gen İfadesi Sonuçları

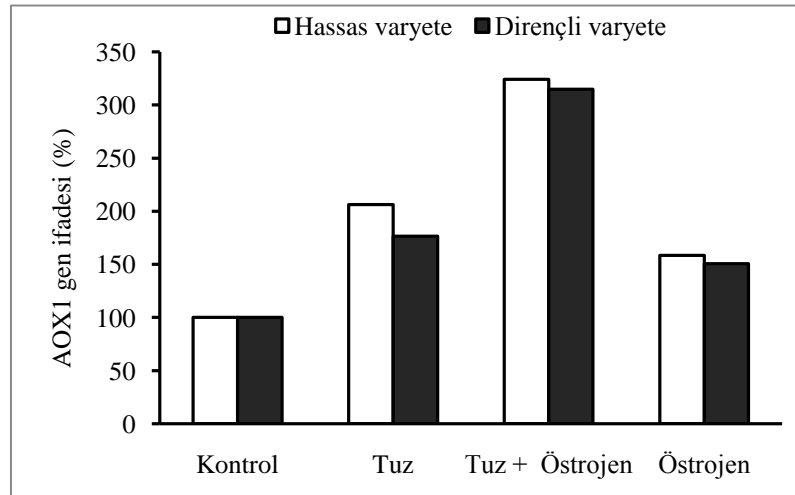
AOX enzimini kodlayan AOX1 ve AOX2 genlerinin ifadesine Real-Time PCR ile bakılarak kontrol grubuna göre değişimleri yüzde olarak belirlenmiştir. Kontrol grubundaki AOX1 ve AOX2 gen ifadeleri %100 olarak kabul edilmiştir. Tuzluluğa hassas *Zea mays* cv. 71MAY69 mısır varyetisinin kontrol grubunun köklerindeki AOX1 ifadesine göre AOX1 ifadesinde tuz, tuz+östrojen, östrojen uygulamaları sırasıyla %106, 224.3, 58.4 oranlarında artışa neden olmuştur. Tuz grubuna göre tuz+östrojen uygulaması ise %57.1 oranında artışa neden olduğu saptanmıştır. Aynı bitkinin kontrol grubunun yaprağındaki AOX1 gen ifadesine göre ise tuz grubu %114 tuz+östrojen grubu %276.2 ve östrojen grubu ise %43.3 oranlarında artışa neden olmuştur. Tuz grubu ile tuz+östrojen grubu kıyaslandığında tuz+östrojen grubunun yaprağındaki AOX1 ifadesinin %75.8 oranında daha yüksek olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.20) ($P < 0.05$).

Çizelge 4.20. Tuza hassas mısır *Zea mays* cv. 71MAY69 ve tuza dirençli mısır *Zea mays* cv. Simon varyetelerinin kök ve yaprağında AOX1 gen ifadesinin kontrol değerlerine göre değişimi

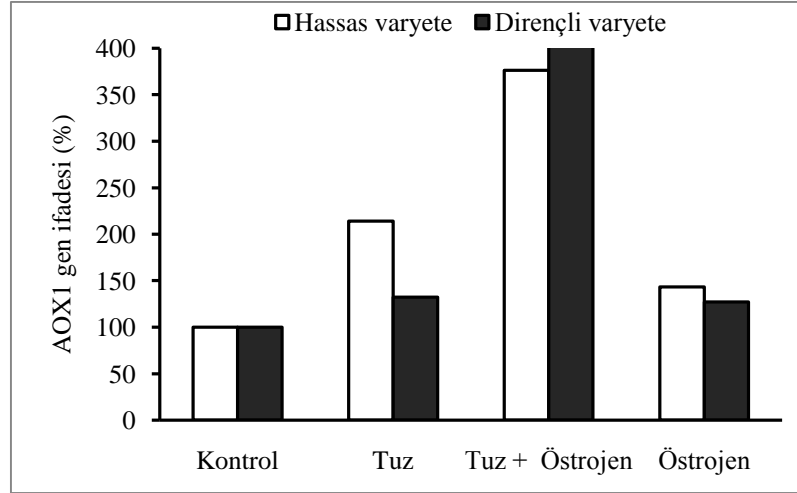
Uygulamalar	Tuza hassas varyete <i>Zea mays</i> cv. 71MAY 69 AOX1 gen ifadesi (%)		Tuza dirençli varyete <i>Zea mays</i> cv. Simon AOX1 gen ifadesi (%)	
	Kök	Yaprak	Kök	Yaprak
Kontrol	100	100	100	100
Tuz	206.3	214.0	176.5	132.2
Tuz + 10^{-7} M Östrojen	324.3	376.2	314.8	413.8
10^{-7} M Östrojen	158.4	143.3	150.6	127.0

Çizelge 4.21. Tuza hassas mısır *Zea mays* cv. 71MAY69 ve tuza dirençli mısır *Zea mays* cv. Simon varyetelerinin kök ve yaprağında AOX2 gen ifadesinin kontrol değerlerine göre değişimi

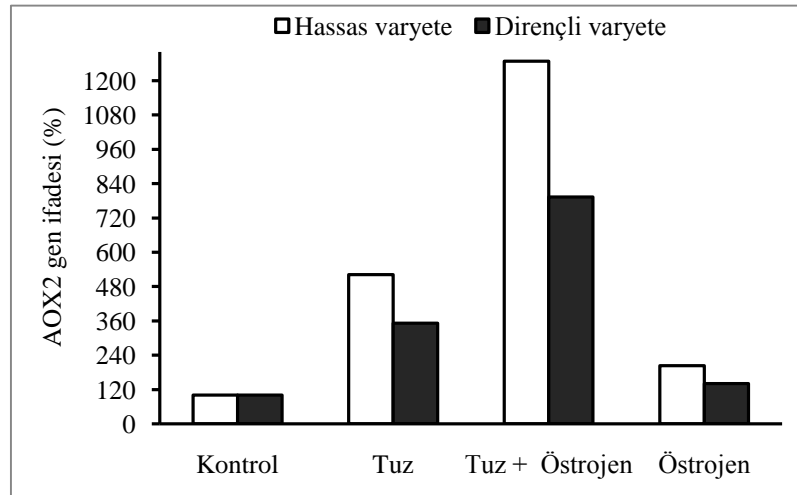
Uygulamalar	Tuza hassas varyete <i>Zea mays</i> cv. 71MAY 69 AOX2 gen ifadesi (%)		Tuza dirençli varyete <i>Zea mays</i> cv. Simon AOX2 gen ifadesi (%)	
	Kök	Yaprak	Kök	Yaprak
Kontrol	100d	100d	100d	100d
Tuz	521.9b	859.3b	351.9b	618.7b
Tuz + 10^{-7} M Östrojen	1267.7a	1110.6a	792.9a	864.7a
10^{-7} M Östrojen	202.9c	180.4c	140.6c	231c



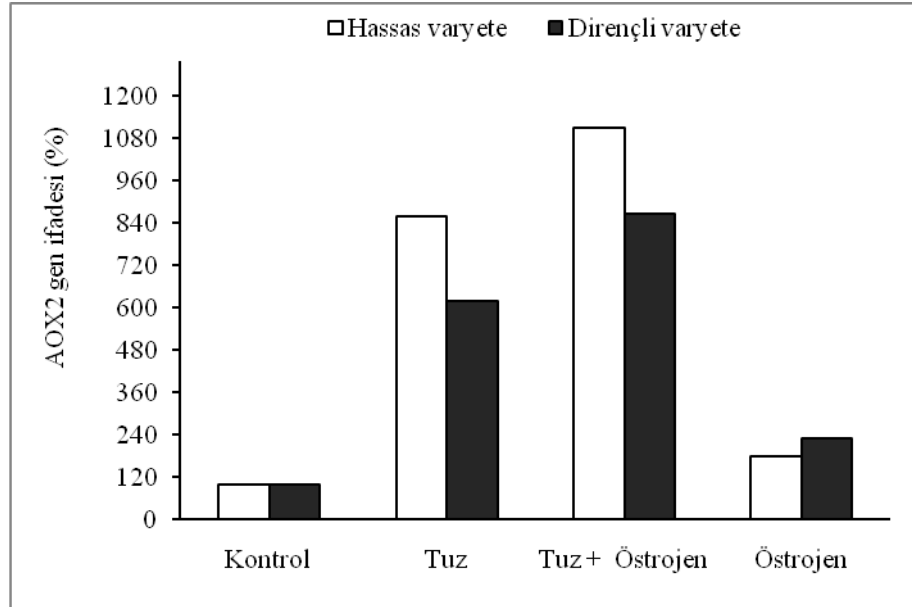
Şekil 4.24. Tuza hassas *Zea mays* cv. 71 MAY69 ve tuza dirençli mısır *Zea mays* cv. Simon varyetelerinin köklerinde uygulamalara göre AOX1 gen ifadesinin yüzdesi



Şekil 4.25. Tuza hassas *Zea mays* cv. 71 MAY69 ve tuza dirençli mısır *Zea mays* cv. Simon varyetelerinin yapraklarında uygulamalara göre AOX1 gen ifadesinin yüzdesi



Şekil 4.26. Tuza hassas *Zea mays* cv. 71 MAY69 ve tuza dirençli mısır *Zea mays* cv. Simon varyetelerinin köklerinde uygulamalara göre AOX2 gen ifadesinin yüzdesi



Şekil 4.27. Tuza hassas *Zea mays* cv. 71 MAY69 ve tuza dirençli mısır *Zea mays* cv. Simon varyetelerinin köklerinde yapraklarında göre AOX2 gen ifadesinin yüzdesi

Tuza hassas varyetede de AOX2 gen ifadesinin kontrol grubundaki değerine göre tuz, tuz+östrojen ve östrojen uygulaması ile kökte %421.9, 1167.7 ve 102.9 oranlarında yaprakta ise %759.3, 1010.6 ve 80.4 oranlarında artış olduğu saptanmıştır. Tuz grubundaki AOX2 ifade değerine göre tuz+östrojen uygulaması ise kökte %142.9 yaprakta ise %29.2 oranlarında artışa neden olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.21) ($P<0.05$).

Tuza dirençli olan mısır varyetesi *Zea mays* cv. Simon'un kontrol grubundaki AOX1 gen ifade değerlerine göre kökte tuz, tuz+östrojen ve östrojen uygulamaları sırası ile %76.5, 214.8 ve 50.6 oranlarında artışa neden olduğu saptanmıştır. Yapraktaki AOX1 gen ifadesi ise kontrol grubundaki değere göre tuz uygulaması ile %32.2 tuz+östrojen uygulaması %313.8 ve yalnız östrojen uygulaması ise %27 artışa neden olmuştur. Tuz uygulamasına göre AOX1 gen ifade değeri tuz+östrojen uygulaması ile kökte %78.3 yaprakta %213 oranlarında artış göstermiştir (Çizelge 4.22) ($P<0.05$).

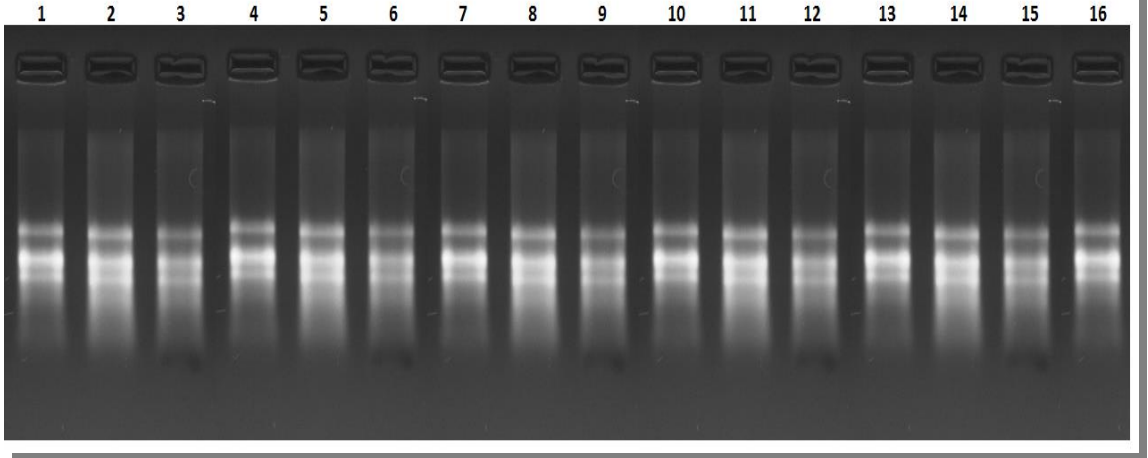
Tuzluluğa dirençli *Zea mays* cv. Simon mısır varyetesinin kök ve yaprağındaki AOX2 gen ifade değerleri de tüm uygulamalarla hem kök hemde yaprakta ciddi değerlerde arttığı saptanmıştır. Kontrol grubunun kökündeki AOX2 gen ifadesine göre tuz uygulaması %251.9 tuz+östrojen uygulaması %692.9 ve yalnız östrojen uygulaması ise %40.6 oranlarında artışa neden olmuştur. Tuz, tuz+östrojen ve yalnız östrojen uygulamaları *Zea mays* cv. Simon varyetesinin kontrol grubunun yaprağındaki gen ifadesi değerine göre AOX2 gen ifadesi değerinde sırasıyla %518.7, 764.7 ve 131 oranlarında artışa yol açtıkları saptanmıştır. Tuz grubunun kök ve gövdesindeki AOX2 gen ifadesine göre tuz +östrojen uygulamasındaki AOX2 gen ifadesi kökte %125.3 yaprakta ise %39.8 oranlarında artış göstermiştir (Çizelge 4.23) ($P<0.05$).

Çizelge 4.22. Tuza hassas mısır *Zea mays* cv. 71MAY69 varyetesinin kök ve yaprağında RNA konsantrasyonu ve 260/280 değerleri

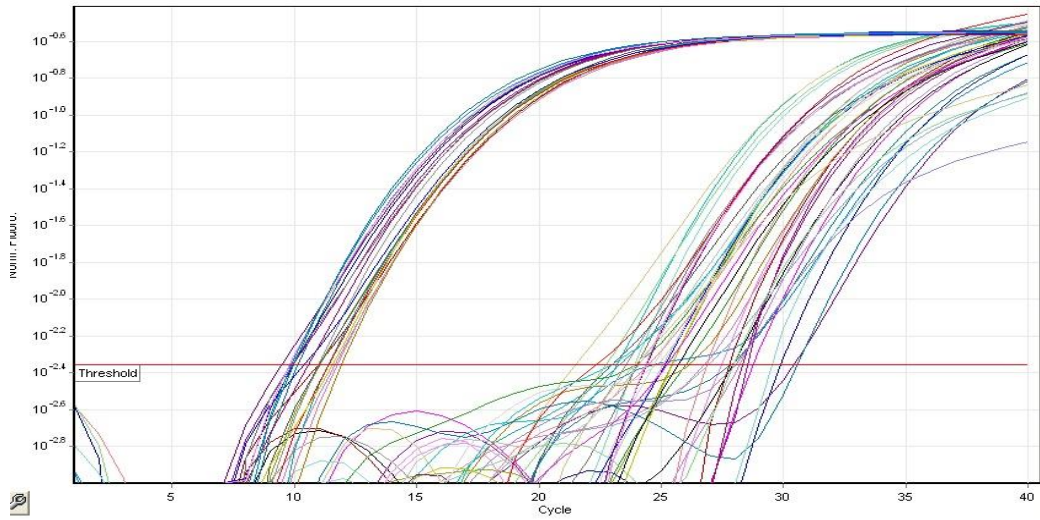
Uygulamalar	RNA konsantrasyon		260/280	
	kök	yaprak	kök	yaprak
kontrol	252.154	1537.192	2.06835	2.03775
Tuz	97.385	384.077	1.9259	2.0973
Tuz+östrojen	79.115	292.615	1.9637	2.069
östrojen	100.690	477.038	2.11185	2.02195

Çizelge 4.23. Tuza dirençli mısır *Zea mays* cv. Simon varyetesinin kök ve yaprağında RNA konsantrasyonu ve 260/280 değerleri

Uygulamalar	RNA konsantrasyon		260/280	
	kök	yaprak	kök	yaprak
kontrol	448.692	1267.654	2.0635	2.07985
Tuz	691.038	1417.885	1.96103	2.08665
Tuz+östrojen	375.000	1326.885	2.0377	2.0345
östrojen	340.393	1382.504	2.1062	2.08085



Şekil 4.28. Tuza hassas mısır *Zea mays* cv. 71MAY69 ve Tuza dirençli mısır *Zea mays* cv. Simon varyetelerinde kök ve yaprağında RNA görüntüsü (1-8 hassas (kontrol yaprak, tuz ,tuz + östrojen, östrojen, kontrol kök, tuz, tuz + östrojen, östrojen) 9-16 dirençli ((kontrol yaprak, tuz, tuz + östrojen, östrojen, kontrol kök, tuz, tuz + östrojen, östrojen)



Şekil 4.29. Tuza hassas mısır *Zea mays* cv. 71MAY69 ve Tuza dirençli mısır *Zea mays* cv. Simon varyetelerinde kök ve yaprağında ampifikasyon görüntüsü

5. SONUÇ ve TARTIŞMA

Türkiye’de tahıllar içinde buğday ve arpadan sonra en geniş ekim alanına sahip bitki mısırdır. Mısır tanelerinin 100 g da 83 kalori, 3.2 gr protein, 18.8 gr karbohidrat, 0 kolesterol, 0.1 g yağ, 0.7 g lif, 89 mg fosfor, 3 g kalsiyum, 0.6 mg demir, 165 mg potasyum, 400 mg A vitamini, 0.11 mg B1 vitamini, 0.1 mg B2 vitamini, 1.3 mg B3 vitamini ve 7 mg C vitamini içermesi mısırın insanlar için hem protein hem de vitamin hem de inorganik element kaynağı olarak ne kadar önemli olduğunu göstermektedir. Mısırın insanlar için besin değerinin yanı sıra hayvan yemi olarak ta kullanılması onun ekonomik ve tarımsal önemini artırmaktadır (Şahin 2001).

Ekonomik öneme sahip birçok bitki gibi mısırdaki tuzluluktan olumsuz etkilenmektedir. Toprakta bulunan tuz konsantrasyonu bitkinin tolerans sınırını aşınca topraktaki su potansiyeli ve bitki hücrelerinin osmotik potansiyeli düşer. Tuz stresinin devam etmesi durumunda stomalar kapanır ve fotosentez gibi metabolik süreçler bu durumdan ciddi derecede zarar görürler. Tüm bu olumsuz etkiler bitki büyüme ve gelişmesini olumsuz yönde etkilemenin yanı sıra bitkiyi ölüme kadar götürebilecek oksidatif hasarlara neden olurlar (Ashraf 1994). Mevcut çalışmada foliar östrojen uygulamasıyla bitki mitokondrisinde doğal olarak mevcut olan alternatif solunum yolunu aktive etmek suretiyle tuz stresinin bitkide neden olduğu hasarların en önemli nedeni olan ROT oluşumunu azaltmak ve böylece tuz stresine karşı bitki direncini artırmak hedeflenmiştir. Bu amaçla tuza tolerans yetenekleri farklı olan dirençli *Zea mays* cv.Simon ve hassas *Zea mays* cv. 71MAY69 iki mısır varyetesi kullanılmıştır. Literatürde östrojenin tuza direnç üzerine etkili olduğunu belirten çalışmalar vardır (Erdal 2012). Ancak bu çalışmalarda östrojenin antioksidan sistemi ve biyosentez reaksiyonlarını aktive ederek bu etkiyi sağladığı bildirilmiş fakat alternatif solunum yolu üzerine etkisine değinilmemiştir. Bu çalışmada ise eksojen östrojen uygulamasının tuz stresine maruz kalan mısır bitkilerindeki antioksidan sistemin yanında alternatif solunum yolu üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu çalışma östrojenin etki mekanizmasını detaylı olarak açıklaması bakımından literatüre önemli katkı sağlayacaktır.

Tuz stresi altındaki mısır varyetelerinde eksojen östrojen uygulamasının etkileri kök-gövde uzunlukları ve ağırlıkları, antioksidan enzim aktiviteleri, ROT seviyesi, membran hasarı, solunum değerleri ve AOX aktivitesi gibi fizyolojik ve biyokimyasal düzeyde belirlenmenin yanı sıra AOX ifadesini kontrol eden genlerin ifadesi gibi moleküler düzeyde de belirlenmeye çalışılmıştır.

5.1. Tuz Stresi ve Eksojen Östrojen Uygulamalarının Kök-Gövde Uzunluğu ve Yaş-Kuru Ağırlıklar Üzerine Etkileri

Literatürde tuz stresinin kök-gövde uzunluğu düşürdüğüne dair birçok çalışma mevcuttur. Öz ve Karasu (2007) 12 çeşit pamuk üzerinde yaptığı çalışmada tuz stresinin tüm pamuk çeşitlerinin kök-gövde uzunluklarını düşürdüğünü belirlemiştir. Başka bir çalışmada ise Koca *et al.* (2007) susamın tuz stresine maruz kalma süresine bağlı olarak özellikle uzun dönemde kök ve gövde uzunluklarının ciddi anlamda düştüğünü bildirmiştir. Mevcut çalışmada da tuz stresinin her iki mısır varietesinde de kök ve gövde uzunluklarını önemli oranda indirgediği belirlenmiştir. Ancak dirençli genotipinin kök-gövde uzunluğundaki düşüşün hassas genotiptekinden daha az olduğu belirlenmiştir. Özellikle kök uzunluğundaki düşüşlerin tuz stresine karşı yüzey azaltma şeklinde bir savunma mekanizması olmasının yanı sıra hem kök hem de gövde uzunluğundaki düşüşler tuz stresinin etkisi ile büyüme ve gelişmenin temelini oluşturan sentez reaksiyonlarının ciddi anlamda olumsuz etkilenmesinden kaynaklandığı söylenebilir. Dirençli varyetede söz konusu parametrelerde daha az düşüşün gözlenmesi ise bu bitkinin gerek daha güçlü bir antioksidan sisteme gerekse daha yüksek bir alternatif solunumun aktivitesine sahip olması nedeniyle tuz stresinin metabolizma üzerine olumsuz etkilerinden hassas varyeteye oranla daha az etkilendiği ve bu nedenle savunma stratejisi ve sentez reaksiyonları bakımından farklı cevaplar verdiği şeklinde yorumlanabilir. Tuz ile birlikte östrojen uygulaması ise tek başına tuza kıyasla kök ve gövde uzunluklarında belirgin artışa neden olmuştur. Bu bulguyla uyumlu olarak Erdal (2012) çimlenen mısır tohumlarının kök ve koleptil uzunluklarında meydana gelen tuz stresi kaynaklı düşüşün östrojen uygulaması ile azaldığını bildirmiştir. Ancak bu çalışmada östrojen bu etkisini antioksidan sistemi uyarmak suretiyle gerçekleştirdiği

vurgulanmıştır. Oysaki mevcut çalışmada ise tuz ve östrojen uygulamalarının birlikte ve ayrı ayrı olarak kök ve gövdede antioksidan sistem üzerine farklı etkiler gösterdikleri belirlenmiştir. Bu farklılığa rağmen hem kök hem de gövde uzunlukları üzerine östrojenin benzer etkiyi göstermiş olması, onun bu etkisinin sadece antioksidan sistemi uyarmak suretiyle olmadığını açıkça ortaya koymaktadır. Diğer yandan hem kök hem de gövde de alternatif solunum yolunun tuz ve östrojen uygulamaları ile arttığının belirlenmesi, östrojenin antioksidan sisteme destek olarak alternatif solunum yolunu aktive etmek suretiyle büyüme ve gelişmenin devamlılığını sağladığını göstermektedir. Tek başına östrojen uygulanan bitkilerde de kontrol grubuna göre alternatif solunum yolunun daha yüksek olarak belirlenmesi yukarıdaki varsayımı kuvvetli bir şekilde desteklemektedir.

5.2. Tuz Stresi ve Eksojen Östrojen Uygulamalarının Antioksidan Enzimler Üzerine Etkileri

Bitkilerin sahip olduğu antioksidan sistemler ROT'ların zararlı etkilerine karşı bitkinin en önemli savunma mekanizması olarak kabul edilirler. Bu sistemde SOD, POD, CAT, APX ve GR gibi antioksidan enzimler ile glutasyon ve askorbik asit gibi antioksidan maddeler yer alırlar. Stres şartları altında antioksidan enzimlerin aktivitesi ile antioksidan maddelerin biyosentezi artarak bitkilerin oksidatif strese karşı koymasında aktif rol oynarlar (Chen and Li 2002; Erdal 2010; Javadian 2010). Diğer yandan olumsuz çevre koşullarına maruz kalan bitkilerde ROT üretiminde ciddi artışlar meydana geldiği için birçok metabolik süreçte önemli aksamalar meydana gelir. ROT seviyesinde meydana gelen artış enzimatik ve non-enzimatik antioksidan sistemi aktifleştirir. Aktifleşen antioksidan sistem bitkinin stres şartlarına karşı direncinin artmasına ve bitkinin bu şartlara adaptasyonuna yardımcı olur. Bu sistemde yer alan enzimlerden SOD enzimi bitki savunma hattının ilk basamağını oluşturur. Bu enzim $\cdot O_2^-$ 'i oksijen ve H_2O_2 'ye dönüştür. Oluşan H_2O_2 ise $\cdot OH$ 'ın öncülü olduğundan diğer antioksidan enzimler (CAT, POD ve APX) tarafından oksijen ve suya dönüştürülerek etkisiz hale getirilir (Bergmeyer and Grabl 1983; Scandalios 1990; Asada 1992b). H_2O_2 'nin radikal özelliğinin ortadan kaldırılmasında görev alan diğer bir sistem

ise askorbat-glutasyon döngüsüdür. Bu sistemde APX'e ek olarak GR enzimi ile non-enzimatik antioksidanlar olan askorbat ve glutasyon da yer alır (Hossain *et al.* 1984; Polle *et al.* 1990; Bowler *et al.* 1992; Saruyama and Tanida 1995).

Mevcut çalışmada tuz stresi altında her iki mısır varyetesinin yapraklarında SOD aktivitesi artarken, köklerde belirgin düşüşler gözlenmiştir. Birçok araştırmacı bu bulgu ile uyumlu olarak aynı tür içinde tuza dirençli ve hassas varyetelerin her ikisinin yaprağında ki SOD aktivitesinin tuz uygulaması ile artığını bildirmişlerdir (Gosset *et al.* 1996; Dion'ıσιο-Sese and Tobita 1998; Hernandez *et al.* 2000). Benzer şekilde tuz stresinin hem dirençli hem de hassas varyetelerde köklerdeki SOD aktivitesini düşürdüğü bildirilmiştir (Shalata *et al.* 2001). Ayrıca tuz stresi altında yapraklarda ki SOD aktivitesinin dirençli varyetede daha fazla artması ile köklerdeki düşüş oranının dirençli varyetede daha az olması tuza tolerans özelliğinde O_2^- 'i süpürme yeteneğinin önemini açıkça ortaya koymaktadır. Sadece tuz stresine maruz kalan bitkilere kıyasla tuz+östrojen uygulanan her iki varyetinin hem kök hem de yapraklarında daha yüksek SOD aktivitesinin gözlenmesi östrojenin antioksidan savunma sistemi üzerine uyarıcı etkisini açıkça ortaya koymaktadır. O_2^- diğer ROT'ların öncülü olduğu için sadece tuz uygulaması yapılan bitkilerde ölçülen yüksek ROT seviyelerine kıyasla tuz+östrojen uygulanan bitkilerde düşük ROT içeriğinin belirlenmesi de bu durumu doğrulamaktadır. Sadece östrojen uygulaması yapılan her iki varyetenin hem yaprak hem de köklerindeki SOD aktivitesinin kontrol grubuna kıyasla daha yüksek oluşu, östrojenin antioksidan sistem üzerindeki etkisini pekiştirmektedir.

SOD enziminin aktivitesi sonucu kendisi oluşan H_2O_2 'yi bertaraf etmede görevli enzimlerden POD aktivitesi her iki varyetenin kök ve yaprağında düşüş göstermiştir. CAT aktivitesi ise yapraklarda düşüş göstermiş ancak bu enzimin kökte kaydadeğer bir aktivite değişimi belirlenmemiştir. H_2O_2 'nin detoksifikasyonunda görevli olan APX aktivitesi ise her iki varyetinin yaprağında artış gösterirken kökünde düşme eğilimi göstermiştir. Bu bulgularla uyum içinde olan bir çalışmada, tuz stresine farklı tolerans yeteneğine sahip iki mısır varyetesinin tuz stresine maruz kalma sürecine göre değişiklik göstermekle beraber beş günlük dönemde yapraklarda POD aktivitesi

düşerken APX aktivitesinin arttığı belirlenmiştir(Neto *et al.* 2006). CAT aktivitesinin ise dirençli varyetede önemli bir değişim göstermediği ancak hassas varyetede düştüğü bildirilmiştir. Köklerde ise tüm enzim aktivitelerinin önemli oranda düştüğü rapor edilmiştir. Bu çalışmada enzim aktivitesindeki artışların dirençli varyetede daha fazla, düşüşlerin ise daha az olduğu bildirilmiş ve dirençli varyetenin tuza tolerans yeteneğinin hassas varyeteye göre sahip olduğu güçlü antioksidan sisteme bağlı olduğu vurgulanmıştır (Neto *et al.* 2006). Bizim çalışmamızda da benzer şekilde dirençli varyetenin daha güçlü bir antioksidan sisteme sahip olduğu belirlenmiştir. Tuzla birlikte östrojen uygulanan bitkilerde ise her iki varyetenin yaprağında CAT, POD ve APX aktivitesini artırdığı belirlenmiştir. Köklerde ise POD ve APX aktiviteleri artarken CAT aktivitesinde önemli bir değişim kaydedilmemiştir. Bu durum köklerde H₂O₂'nin bertaraf edilmesinde POD ve APX enziminin daha aktif işlev gördüğü şeklinde yorumlanabilir. Östrojenin bu enzim aktivitelerinin artışı üzerindeki etkisi kontrol grubuna göre sadece östrojen uygulamasında da görülmüştür. Benzer şekilde askorbat-glutasyon çemberinin diğer önemli enzimi olan GR'nin aktivitesinde de APX'e paralel değişimler gözlenmiştir.

Kısacası östrojen uygulaması sonucunda her iki varyetede de hem kök hemde gövdede antioksidan enzimlerin aktivitelerinde kaydedilen belirgin artışlar, bu hormonun antioksidan enzim sistemlerini kaydadeğer bir biçimde aktive ederek tuz stresi kaynaklı oksidatif hasarın yatıştırılmasında önemli rol oynadığını göstermektedir. Ancak iki varyeteninde kök ve gövdelerinde antioksidan aktivitelerdeki belirgin farklılığa rağmen östrojenin bu organlardaki ROT içerikleri ve membran hasarı üzerine benzer etkilere neden olması oksidatif hasarı farklı bir mekanizma üzerinden indirgediğini göstermektedir. Bu bağlamda östrojenin AOX aktivitesi ve ifadesi üzerine pozitif etkisi onun ROT'ların bertaraf edilmesi ve dolayısıyla oksidatif hasarın yatıştırılmasında alternatif solunum yolunun aktivasyonunu kullandığını açıkça ortaya koymaktadır.

5.3. Tuz Stresi ve Eksojen Östrojen Uygulamalarının ROT Oluşumu Üzerine Etkileri

Tuz stresinin hem $\cdot\text{O}_2^-$ hem de H_2O_2 seviyelerini ciddi değerlerde yükselttiğini bildiren birçok çalışma vardır. Erdal (2012) mısır bitkisinin tuz stresine maruz kalması sonucu O_2^- içeriğinin ciddi derecede arttığını tespit etmiştir. Yine aynı araştırmacı farklı bitkiler üzerine yaptığı çalışmalarda da tuz stresinin O_2^- ve H_2O_2 miktarlarını ciddi derecede artırdığını belirlemiştir (Erdal 2012b; Erdal *et al.* 2012). Benzer şekilde mevcut çalışmada tuz stresi uygulaması her iki mısır varyetesinin hem kök hem de gövdesinde O_2^- ve H_2O_2 miktarlarını ciddi değerlerde yükseltmiştir. Bu durumun tuz stresinin mitokondri ve kloroplastlarda yürüyen metabolik süreçleri olumsuz etkilemesi sonucu elektron kaçaklarından kaynaklanması kuvvetle muhtemeldir. Tuz ile birlikte östrojen uygulamasının her iki mısır varyetesinin kök ve gövdesindeki ROT miktarlarını tuz uygulamasına göre önemli değerlerde düşürdüğü belirlenmiştir. Bu konuda daha önce yapılan çalışmalarda östrojen uygulaması ile tuz stresinin neden olduğu aşırı ROT miktarının azaltılabileceği bildirilmiştir (Erdal 2012 a,b). Ancak bu çalışmalarda ROT içeriğindeki düşüşün yüksek antioksidan aktiviteden kaynaklandığı vurgulanmış fakat mitokondride ROT oluşumunu engelleme sürecinde alternatif solunum yolunun katkısına değinilmemiştir. Oysaki Moller and Kristensen (2004) AOX'un ROT oluşumunu önleyen ilk basamak olarak işlev gördüğünü belirtmiştir. Başka bir çalışma da ise AOX'un hücre içi oksijen-su konsantrasyonunun korunmasında etken olduğu böylece ROT oluşumunu azalttığı bildirilmiştir (Maxwell *et al.* 1999). AOX bu işlevini mitokondri ETS'indeki yeri ve görevi ile başarmaktadır. Şöyle ki mitokondride oluşan ROT'ların kaynağı kompleks I ve kompleks III'tür. Alternatif solunum yolunun sorumlu enzimi olan AOX'un ise bu komplekslerin arasında olması ve ubikinondan gelen elektronları doğrudan oksijene aktarması, kompleks III'ten kaynaklanabilecek olası kaçakları ortadan kaldıracak ve böylece ROT oluşumunu azaltabilecektir (Popov *et al.* 1997; Navrot *et al.* 2007). Bu çalışmada her iki mısır varyetesinde ki AOX aktivitesinin tuz uygulamasındaki değerlere göre tuz ile birlikte östrojen uygulaması ile önemli oranda arttığı belirlenmiştir. Bu durum östrojenin sadece antioksidan sistemi değil aynı zamanda AOX aktivitesini artırarak ROT oluşumunun önlenmesine katkıda

bulunduğu açıkça ortaya koymaktadır. Yalnız östrojen uygulaması bile kontrol bitkilerindeki AOX aktivitesini belirgin bir şekilde artırmış olması bu varsayımı daha da kuvvetlendirmektedir. Östrojen bu etkisini sinyal görevi görerek AOX ifadesini artırmak ve/veya AOX enzimi üzerine allosterik etki yaparak AOX aktivitesini artırmak şeklinde ortaya koymuştur. Nitekim AOX aktivite sonuçlarının yanı sıra Real-Time PCR sonuçları da östrojenin AOX'u kodlayan gen ailelerini uyardığını göstermektedir.

5.4. Tuz Stresi ve Eksojen Östrojen Uygulamalarının MDA İçeriği Üzerine Etkileri

Hücre zarlarındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyon vererek peroksidasyon ürünlerini oluştururlar. Lipit peroksidasyonu (LPO) çoklu doymamış (poliansatüre) yağ asitlerinin oksidatif yıkımı olarak nitelendirilir. Oluşumundan sonra zincir reaksiyonu şeklinde ilerleyen LPO'nun membranlarda meydana getirdiği hasar dönüşümsüzdür (Akkus 1995). Zararlardaki bu dönüşümsüz hasarı ölçmek için LPO'nu son ürünü malondialdehit (MDA) miktarı iyi bir belirleyici olarak kabul görmektedir (Balestrasse *et al.* 2010).

Literatürde tuz stresinin bitkilerdeki MDA miktarını artırdığına dair birçok çalışma mevcuttur (Ediga *et al.* 2013; Hatamnia *et al.* 2013; Khan *et al.* 2014). Mevcut çalışmada da tuz uygulaması her iki varyetenin kök ve gövdelerinde MDA miktarını ciddi oranlarda artırmıştır. Bu durum tuz stresi kaynaklı ROT artışından kaynaklanmaktadır (Botella *et al.* 2005; Hong *et al.* 2009). Oysaki tuz ile birlikte uygulanan östrojen, tuz stresinin neden olduğu yüksek MDA değerlerini önemli oranda düşürdü. Sadece östrojen uygulamasının bile kontrol bitkilerine kıyasla MDA miktarında düşüşe neden oldu. Daha önceki araştırmalarda da östrojenin bu etkisi belirlenmiş ve bu etkiyi antioksidan sistemdeki gelişime bağlı olarak gerçekleştirdiği vurgulanmıştır (Erdal 2012a, b). Bizim çalışmamızın bulgularına göre de östrojenin antioksidan sistem üzerinde etkili olarak MDA miktarını düşürdüğünü söylemek mümkündür. Ancak çalışmamızın AOX aktivitesi ve AOX gen ifadesi bulguları dikkate alındığında, östrojenin alternatif solunumu aktifleştirmek suretiyle ROT oluşumunu doğrudan engelleyerek MDA'nın düşüşüne önemli katkı sağladığı açıktır. Dirençli mısır

Zea mays cv. Simon varyetesinin hassas *Zea mays* cv. 71MAY69 varyeteye kıyasla daha yüksek AOX aktivitesine sahip olması bu varyetenin tuz stresine karşı direnç yeteneğinde AOX enziminin katkısı olduğunu vurgulamaktadır. Bu varsayımı destekler biçimde literatürde aynı türün çeşitleri arasında AOX ifadesi yüksek olan varyetelerin tuza daha toleranslı olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur (Costa *et al.* 2007; Haythem *et al.* 2012).

5.5. Tuz Stresi ve Eksojen Östrojen Uygulamalarının Hücresel Solunum ve Alternatif Solunuma Etkileri

Tuz stresinin bitkilerde solunum üzerine etkileri ile ilgili yapılan çalışmalardan elde edilen bulgular son derece farklılık göstermektedir. Yapılan çalışmaların %37'si bitkilerde tuzluluğun solunumu artırdığını bildirirken, %34'ü solunumu düşürdüğünü, %29'u ise herhangi bir değişime neden olmadığını rapor etmiştir. Tuz stresine karşı hassas ve dirençli bitkilerde de bu oranlar oldukça farklılık göstermektedir. Tuz stresine karşı dirençli bitkiler üzerine yapılan çalışmaların %33'ü tuzluluğun solunumu artırdığını, %42'si ise solunumu düşürdüğünü bildirirken; hassas bitkiler üzerine yapılan çalışmaların %58 tuzluluğun solunumu artırdığını, %17'si ise azalttığını bildirmiştir. Tuzluluğa hassas bitkilerde tuz stresi altındaki yüksek solunum oranları tolerans stratejisine bağlı olarak büyüme hızı için yararlı ya da zararlı olabilir (Jacoby *et al.* 2011). Şöyle ki yüksek solunum oranı daha fazla ATP üretilmesine neden olur ve bu durum yeni dokuların gelişmesi için ve Na⁺ iyonunu dışlama ya da osmotik ayarlama için gerekli olan enerjinin sağlanması açısından olumlu olarak nitelendirilebilir (Yeo 1983). Ancak yüksek solunum oranının bitki için C durumu açısından maliyeti de yüksek olabilir. Çünkü doku sentezi için ayrılan karbonun önemli bir kısmı solunumda harcanarak büyüme oranları sınırlanabilir (Poorter *et al.* 1990). Bitkilerin mitokondrial ETS'sinde yer alan AOX enzimi sayesinde bitkilerin solunum sistemi diğer canlılara göre daha esnekler. Çünkü yüksek solunum oranında doğal olarak artacak olan elektron kaçıkları ROT miktarının artmasına neden olacaktır. Oysa bitkiler alternatif solunum yolunu kullanarak mitokondrial ETS sisteminde ubikinondan gelen elektronları oksijene aktarır ve böylece ETS'nin aşırı indirgenmesini azaltabilir. Sonuçta ROT oluşumunda

önemli bir azalma meydana gelir. Transgenik olarak AOX geni aşırı ifade edilmiş *Arbidopsis*'in tuz stresine daha dirençli olması da bu durumu desteklemektedir (Smith *et al.* 2009; Jacoby *et al.* 2011).

Mevcut çalışmada tuz stresine maruz kalan mısır varyetelerinden dirençli olanın köklerinde solunum hızını düşerken yaprakta artırmıştır. Hassas varyetede ise tuzluluk hem kök hem de yaprakta solunumu önemli oranda artırmıştır. Bu durum solunumun bitkinin dokusuna ve tuzluluğa hassasiyet derecesine göre farklı şekillerde etkilendiğini ortaya koymaktadır. Dirençli varyetenin köklerinde solunum hızının düşmesine karşın, hem kök hem de yaprağında AOX aktivitesinin ciddi derecede arttığı belirlenmiştir. Tuz ile birlikte uygulanan östrojen ise AOX aktivitesinin tüm uygulamalara göre en yüksek değere ulaşmasını sağlamıştır. Hatta sadece östrojen uygulamasındaki AOX değerinin bile kontrol bitkilerine göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu bulgular açıkça göstermektedir ki; tuz stresi altında total solunum artsada azalsada alternatif solunum yolu aktifleşmiştir. Östrojen uygulaması ise hem total solunumu hemde alternatif solunumu önemli derecede artırmış ve böylece olası elektron kaçaklarını önlemek suretiyle ROT oluşumunu ve neticesinde olası oksidatif hasarı dikkate değer bir biçimde indirmişdir. Östrojen uygulanan bitkilerde tek başına tuza maruz kalan bitkilere kıyasla dahah düşük ROT içeriğinin ve daha düşük membran hasarının belirlenmesi bu varsayımı kuvvetle desteklemiştir. Literatürde H₂O₂'nin AOX ifadesini artırdığını gösteren çalışmalar mevcuttur (Feng *et al.* 2008). İyi bilinmektedir ki, H₂O₂ yüksek konsantrasyonlarda toksik etkiye neden olurken düşük konsantrasyonlarda sinyal görevi görmektedir. Östrojen uygulanan bitkilerde, östrojenin kendisi doğrudan alternatif solunumu yolunun aktivasyonunda sinyal rolü oynamış olabileceği gibi dolaylı olarak antioksidan aktiviteyi ve alternatif solunum yolunu uyararak ROT içeriğini azaltmak suretiyle H₂O₂'nin sinyal rolü oynamasını sağlamış olabilir. Son yıllarda düşük ROT'ların strese tolerans mekanizmalarını uyarmada sinyal görevi gördüğü büyük oranda kabul görmektedir (Geleason *et al.* 2011; He *et al.* 2012).

Diğer yandan, tuza hassas varyetede oksijen tüketiminden elde edilen sonuçlar AOX aktivitesinin dirençli varyeteye göre daha az arttığını hatta köklerde istatistiksel olarak

önemli bir değişimin meydana gelmediğini göstermiştir. Bu durum bitkinin tuz stresine karşı zayıf toleransı ile ilişkilendirilebilir. Nitekim köklerdeki hasarın ve ROT içeriklerinin yapraklara oranla daha fazla olması bu bulguyu doğrulamaktadır. Sadece tuza maruz kalan bitkilere kıyasla tuz+östrojen uygulaması hem kök hem de yaprakta AOX aktivitesini önemli derecede artırmıştır. Ancak AOX aktivitesinde ki bu artış değerlerinin dirençli varyetede değerlerden daha az oranda olduğu belirlenmiştir. Diğer taraftan yalnız östrojen uygulanan bitkilerdeki AOX aktivitesinin kontrol bitkisinde ki değerden daha yüksek olması östrojenin AOX aktivitesi üzerine etkisini belirginleştirmiştir. Dirençli varyeteden elde edilen bulgulara benzer olarak, hassas varyete de östrojen uygulaması ile AOX aktivitesinde belirlenen artışla ters orantılı olarak ROT içeriği ve LPO seviyesinde önemli düşüşler belirlenmesi, östrojenin bitkilerin tuza toleransı artırmada alternatif solunum yolunu uyardığını açıkça ortaya koymuştur.

5.6. Tuz Stresi ve Eksojen Östrojen Uygulamalarının AOX İfadesi Üzerine Etkileri

Yüksek bitkilerde AOX genlerinin hücre çekirdeğindeki küçük bir gen ailesi tarafından kodlandığı kabul görmektedir (Considine *et al.* 2002) Farklı bitki türlerinde AOX'u ifade eden genlerin moleküler tanımlama çalışmaları sayesinde en az iki farklı gen grubu tarafından AOX'un ifade edildiği ve bu gen gruplarının AOX1 ve AOX2 tipi genler olduğu ortaya koyulmuştur. AOX1 tipi gen grubu hem monokotil hem de dikotil bitki türlerinde mevcut iken AOX2 dikotillerin tamamında ve monokotillerin bazılarında belirlenebilmiştir (Hanqing *et al.* 2013). AOX gen ailesinin birçok üyesi, özellikle model bitkilerde ve bazı zirai öneme sahip olan bitkilerde karakterize edilmiştir. Örneğin soya bitkisinde 3 tane AOX geni saptanmış ve bu genler AOX1, AOX2a ve AOX2b olarak adlandırılmıştır (Djajanegara *et al.* 2002) Diğer tarafta pirinçte AOX 1a, AOX 1b ve AOX 1c genleri, mısır bitkisinde AOX 1a AOX 1b ve AOX 1c genleri, tütün bitkisinde AOX 1 ve AOX 2 genleri, buğdayda AOX 1a ve AOX 1c, *Arabidopsis thaliana* bitkisinde ise AOX1a, AOX1b, AOX1c, AOX1d, and AOX2 genlerinin bulunduğu belirlenmiştir (Vanlerberghe *et al.* 1992; Karpova *et al.* 2002; Saika *et al.* 2002; Takumi *et al.* 2002; Borecky *et al.* 2006)

Bazı çalışmalarda, spesifik problemler kullanılarak farklı abiyotik stres şartlarında AOX gen ailesi elemanlarının farklı ifadeler gösterdiği belirlenmiştir. Örneğin *Arabidopsis* yapraklarında AOX1a geni soğuk stresinde indüklenmişken, AOX1b, AOX1c ve AOX2 genleri soğuğa duyarlı olmadığı belirlenmiştir. Hatta AOX1d geninin ifadesi soğuk stresinde azalmıştır (Borecky *et al.* 2006). Pirinç fidelerinin yapraklarında ve köklerinde AOX1a ve AOX 1b genleri soğuk, kuraklık ve tuz stresi gibi bazı abiyotik stres şartları altında uyarılırken, AOX1c geninin bu stres koşullarına hiçbir yanıt göstermediği belirlenmiştir (Ohtsu *et al.* 2002; Li *et al.* 2013) Bu gözlemler abiyotik stres şartları altında AOX ifadesinde görevli olan gen grupları arasındaki nitelik ve nicelik olarak farklı ifade kalıpları olduğunu göstermektedir. Ayrıca tuz stresinin AOX'u kodlayan genleri antioksidan sistemleri kodlayan genlere göre daha yüksek oranda uyardığı bilinmektedir. Bu durum AOX ifadesinin tuz stresine toleransta kritik önem derecesine sahip olduğunu göstermektedir (Arnholdt *et al.* 2006).

Mevcut çalışmada iki mısır varyetesinin kök ve yapraklarındaki AOX1 ve AOX2 genlerinin ifade düzeyleri belirlenmiştir. Tuz uygulaması hassas genotipte her iki gen ifadesinde de artışa neden olmuştur. Tuz ile birlikte östrojen uygulamasının ise bu gen ifadelerini daha da artırdığı belirlenmiştir. Benzer şekilde tuzluluğa dirençli genotipte de tuz uygulaması ile AOX1 ve AOX2 gen ifadeleri önemli değerlerde artmış, östrojen uygulaması ile bu artış daha yüksek değerlere ulaşmıştır. Hem AOX1 hemde AOX2 genlerinin ifade değerleri dirençli bitkilerin kök ve yapraklarında daha yüksek olmasına karşın, artış oranlarının hassas bitkilerde daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu durum hassas bitkilerin strese karşı koyabilmek için alternatif solunum yolunu dirençli olanlara kıyasla oransal olarak daha fazla aktive etmeye çalıştıklarını göstermektedir. Ancak tuz uygulaması ile hassas varyetenin yapraklarında AOX'u kodlayan genlerin ifade değerlerinin yanısıra AOX aktivitesi de artmasına karşın, köklerde ifade artışına rağmen AOX aktivitesinde önemli bir değişim gözlenmemiştir. Bu durum, hassas bitkilerin köklerinde alternatif solunum yolunu kodlayan genlerini aktive ettikleri halde, stres şartları altında meydana gelen oksidatif stresin doğal bir sonucu olarak protein sentezini de içeren çeşitli biyosentez reaksiyonlarının bozulması nedeniyle AOX'un yapısını oluşturan protein sentezinin gerçekleşmemiş olduğu ve/veya doğrudan enzimin

aktivitesinin inhibe edildiği şekilde yorumlanabilir. Dirençli varyetede ise tuz uygulaması hem kök hem de yapraklarda AOX1 ve AOX2 gen ifadelerinin artışı ile birlikte AOX aktivitesinin de artması aynı bitki türünün farklı varyetelerinde bile alternatif solunum yolunun farklı aktivite gösterdiğini gözler önüne sermektedir. Ayrıca bu bulgu ortaya koymaktadır ki; dirençli varyetede diğer savunma mekanizmaları da hassas olan varyeteye göre daha düşük olduğundan oksidatif stres ve onun neticesinde ortaya çıkacak olan metabolik bozukluklar indirgenmiş ve böylece ifade olan genlerin ürüne dönüşmesi daha kolay meydana gelmiştir. Tuza ilave olarak östrojen uygulanan bitkilerde ise hem daha yüksek gen ifadesi hem de daha yüksek enzim aktivitesinin gözlenmesi, bu hormonun alternatif solunum yolunun yanı sıra diğer savunma mekanizmalarını da önemli derecede aktive etmesi nedeniyle aktive edilen genlerin ürüne dönüşmesinin yanında farklı mekanizmaların aktive edilmesiyle bitkiye daha güçlü bir direnç kazandırılmıştır. Nitekim tek başına veya tuz ile birlikte olsun östrojen uygulanan bitkilerde gerek antioksidan sistemdeki artış, gerek ROT seviyesindeki azalma, gerekse membran hasarındaki düşüş bu varsayımı kuvvetle desteklemektedir.

Sonuçlar

- 1) Mevcut çalışmadan elde edilen bilgiler açıkça göstermektedir ki, eksojen östrojen uygulaması her iki varyetenin de tuza karşı olan direncini artırmıştır.
- 2) Eksojen östrojen uygulaması ile her iki varyetenin antioksidan sistemleri önemli derecede uyarılmıştır.
- 3) Eksojen östrojen uygulaması ile her iki varyetenin AOX ifadeleri ve AOX aktivitelerinde önemli artışlar meydana gelmiştir.
- 4) Aynı türün farklı varyetelerinin tuza tolerans yeteneğine AOX'un katkısının dikkate değer şekilde yüksek olduğu görülmüştür.
- 5) Östrojen uygulanan bitkilerde hem antioksidan sistemdeki artışlar hemde alternatif solunum yolunun aktivasyonu ile ters orantılı olarak ROT miktarlarında önemli düşüşler meydana gelmiştir..
- 6) ROT içeriğindeki azalışa paralel olarak tuz stresi kaynaklı membran hasarı da östrojen uygulaması ile önemli oranda indirgenmiştir.

Sonuç olarak mevcut araştırmada tuz stresine maruz kalan bitkilere eksojen östrojen uygulaması ile hem antioksidan sistemlerin uyarılabileceği hem de antioksidan sistem dışında abiyotik streslere karşı koymada önemli yeri olan alternatif solunum yolunun da aktive edilebileceği açıkça ortaya koyulmuş, böylece önemli çevresel streslerden biri olan tuz stresinin bitkilerde neden olduğu ciddi hasarların bir dereceye kadar önüne geçilebilmiştir. Ancak ileriki çalışmalarda östrojenin antioksidan sistem ve alternatif solunum yolu üzerine göstermiş olduğu uyarıcı etkinin mekanizmasının aydınlatılmasına ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

- Abdrakhmanova, A., Zickermann, V., Bostina, M., Radermacher, M., Schagger, H., Kerscher, S., Brandt, U., 2004. Subunit composition of mitochondrial Complex I from the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biochim. Biophys. Acta*, (1658), 148-156.
- Agarwal, S. and Pandey, V., 2004. Antioxidant enzyme responses to NaCl stress in *Cassia angustifolia*. *Biologia Plantarum*, (484), 555-560.
- Akkus, I., 1995. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkiler, Mimoza Yayınları, Konya.
- Amaya, I., Botella, M.A., Calle, M., Medina, M.I., Heredia, A., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., Quesada, M.A., Valpuesta, V., 1999. Improved germination under osmotic stress or tobacco plants overexpressing a cell wall peroxidase. *FEBS Lett.*, (457), 80-84.
- Anonymous, 2012. [http://vpopov.professorjournal.ru/26\(15.12.2012\)](http://vpopov.professorjournal.ru/26(15.12.2012)).
- Aono, M., Saji, H., Fujiyama, S., Sugita, M., 1995. Decrease in activity of glutathione reductase enhances paraquat sensitivity in transgenic *Nicotiana tabacum*, *Plant Physiol.*, (107), 645-648.
- Apel, K. and Hirt, H., 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.*, (55), 373–399.
- Arnholdt, S. B., Costa, J.H., Fernandes de Melo, D., 2006 AOX- a functional marker for efficient cell reprogramming under stress?. *Trends in Plant Science.*,(11) ., 6.
- Asada, K., 1992a. Ascorbate peroxidase-a hydrogen peroxidescavenging enzyme in plants. *Physiol Plant*, (85), 235-241.
- Asada, K., 1992b. Production and scavenging of active oxygen in chloroplasts, in: J.G. Scandalios (Ed.), *Current Communications, In Cell and Molecular Biology, Molecular Biology of Free Radical Scavenging Systems*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp,173-192.
- Asada, K., 1997. The role of ascorbate peroxidase and monodehydroascorbate reductase in H₂O₂ scavenging in plants. See Ref., (185), 715-36.
- Bakardjieva, N. and Christov, K., 1996. Effect of calcium and zinc ions on the sensitivity of peroxidase from moses (*Mnium* sp.) and ferns (*Polydium vulgare*) to high temperature. *Can. J. Bot.*, (74), 1665-1670.
- Bauchanan, B.B., Schurmann, P., Wolosiuk, R.A., Jacquot, J.P., 2002. The ferredoxin/thioredoxin system: from discovery to molecular structures and beyond. *Photosynth. Res.*, 73, 215-222.
- Bergmeyer, J. and Grabl, M., 1983. *Methods of Enzymatik Analysis* (Third Edition). Germany. 190-302.
- Berry, E.A., Guergova-Kuras, M., Huang, L.S., Crofts, A.R., 2000. Structure and function of cytochrome bc complexes. *Annu. Rev. Biochem.*, (69), 1005-1075.
- Bertrand, H., Argan, C.A., Szakacs, N.A., 1983. Genetic control of the biogenesis of cyanide insensitive respiration in *Neurospora crassa*. In Schweyen, R.J., Wolf, K., Kaudewitz, F.eds, *Mitochondria* 1983. Walter de Gruyter, Berlin, pp, 495-507.
- Beuchamp, C. and Fridovich, I., 1971. Isozymes of superoxide dismutase from wheat germ, *Biochim. Biophys. Acta*, (317), 50-64.

- Blokhina, O. and Fagerstedt, K.V., 2010. Reactive oxygen species and nitric oxide in plant mitochondria: origin and redundant regulatory systems. *Physiologia Plantarum*, (138), 447-462.
- Blokhina, O., Fagerstedt, K., 2010. Reactive oxygen species and nitric oxide in plant mitochondria: origin and redundant regulatory systems. *Physiol Plant*, 138(4) , 447-62.
- Borecky, J., Nogueira, FT., De Oliveira, KA. , Maia G, Vercesi AE and Arruda P. 2006 The plant energy-dissipating mitochondrial systems: depicting the genomic structure and the expression profiles of the gene families of uncoupling protein and alternative oxidase in monocots and dicots. *J Exp Bot*, (57), 849–864.
- Borecky, J. and Vercesi, A.E., 2005. Plant uncoupling mitochondrial protein and alternative oxidase: energy metabolism and stress. *Bioscience Reports*, (24), 269–283.
- Bowler, C., Slooten, I., Tsang, W.T., Vancamp, W., Vanmontagu, M., Inze, D., 1991. Oxidative stress in plants. *Nato Advanced Science Institutes Series, Series a, Life Sciences*, (212), 695-705.
- Boyer, P.D., 1997. The ATP Synthase-A Splendid molecular machine. *Annual Review of Biochemistry*, (66), 717-749.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for t quantition of microgram quantities of protein utilising the princible of protein-dye binding analiticl. *Biochem.*, (72), 248-254.
- Braidot, E., Petrusa, E., Vianello, A., Macr, F., 1999. Hydrogen peroxide generation by higher plant mitochondria oxidizing complex I or complex II substrates. *FEBS Letters*, 451(3), 347-350.
- Buchanan, B. B., Schürmann, P., Wolosiuk, R. A., Jacquot, J. P., 2002. The ferredoxin/thioredoxin system: from discovery to molecular structures and beyond. *Photosynth. Res.*, (73), 215-222.
- Buettner, G. R., Jurkiewicz, B. A., 1996. Chemistry and biochemistry of ascorbic acid. In *Handbook of Antioxidants*, ed. E Cadenas, L Packer, 91–115. New York: Dekker.
- Burns, J. J., 1957. Missing step in man, monkey and guinea pig required for the biosynthesis of L-ascorbic acid. *Nature*, 180-553.
- C. Marti, M., Florez-Sarasa, I., Camejo, D., Ribas-Carbo, M., J. La' zaro, J., Sevilla, F., Jime' nez, A., 2011 Response of mitochondrial thioredoxin PsTrxo1, antioxidant enzymes, and respiration to salinity in pea (*Pisum sativum* L.) leaves. *Journal of Experimental Botany*, (62) ,3863–3874.
- Cadenas, E., 1989. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu. Rev. Biochem.*, (58), 79.
- Chaudiere, J. and Ferrari-Iliou, R., 1999. Intracellular antioxidants from chemical to biochemical mechanism. *Food Chem. Toxicol.*, (37), 949-962.
- Chien, L., Wu, Y., Chen, H., 2011. Mitochondrial energy metabolism in young bamboo rhizomes from *Bambusa oldhamii* and *Phyllostachys edulis* during shooting stage. *Plant Physiology and Biochemistry*, (49), 449-457.
- Considine, M. J., C.Holtzapffel, R., A. Day, D., Whelan, J., Millar, H., 2002. Molecular distinction between Alternative Oxidase from monocots and dicots. *Plant Physiol*, (129).

- Considine, M.J., Holtzapffel, R.C., Day, D.A., Whelan, J., and Millar A.H., 2002. Molecular distinction between alternative oxidase from monocots and dicots. *Plant Physiol*, (129)949–953.
- Creissen, G., Broadbent, P., Stevens, R., Wellburn, A.R., Mullineaux, P. M., 1996. Manipulation of glutathione metabolism in transgenic plants, *J. Biochem.*, 24, 465-472.
- Creissen, G., Edwards, E. A., Mullineaux, P. M., 1994. Glutathione reductase and Ascorbate peroxidase, in: causes of photooxidative stress and amelioration of defence systems in plants, Foyer, C.H., Ed., Mullineaux, P.M., CRC Press. Boca Raton, 343-364.
- Dias de Azevedo Neto, A., Tarquinio Prisco, J., Enéas-Filho, J., Eduardo Braga de Abreu, C., Gomes-Filho, E., 2006. Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes. *Environmental and Experimental Botany*, (56), 87–94.
- Dionisio-Sese, M., Tobita, S., 1998. Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress. *Plant Science*,(135), 1–9.
- Djajanegara, I., Finnegan, P., Mathieu, C., McCabe, T., Whelan, J., and Day D.A. 2002 Regulation of alternative oxidase gene expression in soybean. *Plant Mol Biol*, (50) , 735–742.
- Dron, M., Clouse, S. D., Dixon, R. A., Lawton, M. A., Lamb, C. J., 1988. Glutathione and fungal elicitor regulation of a plant defense promoter in electroporated protoplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, (85), 6738-42.
- Dudkina, N. V., Heinemeyer, J., Sunderhaus, S., Boekema, E.J., Braun, H., 2006. Respiratory chain supercomplexes in the plant mitochondrial membrane. *Trends in Plant Science*, 11(5), 232-240.
- Durmuş, N., 2003. Büyümeyi düzenleyici maddelerin oksidatif stres üzerine etkileri. Doktora tezi, karadeniz teknik universitesi, fen bilimleri enstitüsü., Trabzon.
- Elthon, T. E., Nickels, R. L., McIntosh, L., 1989. Monoclonal antibodies to the alternative oxidase of higher plant mitochondria. *Plant Physiol.*, (89), 1311-1317.
- Erdal, S., 2010. Memeli cinsiyet hormonlarının arpa ve nohut bitkilerinin büyüme ve gelişmeleri üzerine etkileri. Doktora tezi. Atatürk universitesi, fen bilimleri enstitüsü, Erzurum.
- Erdal, S., 2012. Androsterone-induced molecular and physiological changes in maize seedlings in response to chilling stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, (57),1-7.
- Esim, N., Atici, O., Mutlu, S., 2012. Effects of exogenous nitric oxide in wheat seedlings under chilling stress. *Toxicol Ind Health*. DOI: 10.1177/0748233712457444.
- Eyidogan, F. D., Öktem H. A., Yücel, M., 2003. Superoxide dismutase activity in salt stressed wheat seedlings. *Acta Physiologica Plantarum*, (25), 263-269.
- Fadzilla, N., P. Finch, R., H. Burdon, R., 1997. Salinity, oxidative stress and antioxidant responses in shoot cultures of rice. *Journal of Experimental Botany*, 48 (307), 325-331.
- Feng, H., Guan, D., Sun, K., Wang, Y., Zhang, T., Wang, R., 2013. Expression and signal regulation of the alternative oxidase genes under abiotic stresses. *Biochim. Biophys. Acta*, (45), 985–994.

- Ferreira, A. I., Arrabaça, J. D., Vaz-Pinto, V., Lima-Costa, M. E., 2008. Induction of alternative oxidase chain under salt stress conditions. *Biologia plantarum*, 52 (1), 66-71.
- Ferroni, A., Baldisserotto, C., Pantaleoni, L., Billi, P., Fasulo, M., Pancaldi, S., 2007. High salinity alters chloroplast morpho-physiology in a freshwater kirchneriella species (selenastraceae) from ethiopian lake. *American journal of botany* 94(12), 1972–1983.
- Finnegan, P. M., Soole, K. L., Umbach, A. L., 2004. Alternative mitochondrial electron transport proteins in plants. In: Day, D. A., Millar, A. H., Whelan, J.(eds), *Plant Mitochondria: From Genome to Function*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 163–230.
- Forti, G., Elli, G., 1995. The function of ascorbic acid in photosynthetic phosphorylation. *Plant Physiol*, (109), 1207-11.
- Foyer, C. H., 1993. Ascorbic acid, in: Alscher, R. G., Hess, J. L. (Eds.), *Antioxidants in higher plants*, CRC Press, Boca Raton, FL, 31–58.
- Foyer, C. H., Descouvieres, P. ve Kunert, K. J., 1994. Protection against oxygen radicals: an important mechanism studied in transgenic plants, *Plant Cell Environ.*, (17), 507-523.
- Foyer, C. H., 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., Harbinson, J.. 1994. Oxygen metabolism and the regulation of photosynthetic electron transport. In *Causes of Photooxidative Stresses and Amelioration of Defense Systems in Plants*, ed. Foyer, C.H., Mullineaux, P., pp. 1-42. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Foyer, C. H., Lopez-Delgado, H., Dat, J. F., Scott, I. M. 1997. Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiol Plant.*, (100), 241-254.
- Foyer, C. H., Souriau, N., Perret, S., Lelandais, M., Kunert, K.J., 1995. Overexpression of glutathione reductase but not glutathione synthetase leads to increases in antioxidant capacity and resistance to photoinhibition in poplar trees. *Plant Physiol.*(109), 1047-57.
- Foyer, C., Noctor, G., 2005. Oxidant and antioxidant signaling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell Environ.*, 28, 1056-1071.
- Fridovich, I., 1995. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.*, (64), 97-112.
- Friedrich, T. and Bottcher, B., 2004. The gross structure of the respiratory Complex I: a Lego system. *Biochim. Biophys. Acta*, (1608), 1-9.
- Gaber, M. A., 2010 Antioxidative defense under salt stress. *Plant Signal Behav*, 5(4) , 369–374. Lauchli, A.,Grattan, S.R., 2007. Plant growth and development under Salinity stress. *Advances in molecular breeding toward drought.*, 1–32.
- Gechev, T., Gadjev, I., Breusegem, F.V., Inze, D., Dukiandjiev, S., Taneve, V., Minkov, I., 2002. Hydrogen peroxide protect tobacco from oxidative stress by inducing a set of antioxidant enzymes. *CMLS*, (59), 708-714.
- Gelhay, E., Rouhier, N., Ge´rard J., Jolivet Y., Gualberto, J., Navrot N., Ohlsson, P., Wingsle, G., Hirasawa M., Knaff, D.B., Wang, H., Dizengremel, P., Meyer, Y.,

- Jacquot, J., 2004a. A specific form of thioredoxin H occurs in plant mitochondria and regulates the alternative oxidase. *Plant Biology.*, 101 (40), 14545-14550.
- Genisel, M., Turk, H., Erdal, S., 2013. Exogenous progesterone application protects chickpea seedlings against chilling-induced oxidative stress. *Acta Physiol Plant.*, DOI 10.1007/s11738-012-1070-3.
- Genişel, M., 2010. Kemik tozu solüsyonu, CaCl₂ ve IAA uygulamalarının tuz stresi altındaki Fasulye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisinin fizyolojik parametreleri üzerine etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü., Erzurum.
- Gong, Y., Toivonen, P.M.A., Lau, O.L., Wiersma, P.A., 2001. Antioxidant system level in 'Braeburn' apple in related to its browning disorder. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, (42), 259-264.
- Griffith, O. W., 1980. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Analyt. Biochem.*, (106), 207-212.
- Grill, E., Löffler, S., Winnacker, E.L., Zenk, M.H., 1989. Phytochelatins, the heavy metal binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific γ -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatase). *Proc. Natl. Acad. Sci.*, (86), 6838-42.
- Güler, N. S., 2008. *Ctenanthe setosa*'da yaprak kıvrılması sırasında apoplastik ve simplastik alanlarda antioksidan sistemde meydana gelen değişimler. Doktora tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Halliwell, B., 1984. Toxic effects of oxygen on plant tissues, in: chloroplast metabolism, the structure and function of chloroplasts in green leaf cells. Oxford Press, Oxford, 180-206.
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Fujita, M., Ahmad Chandna, P., Chandna, R., V. Prasad, M. N., Ozturk, M., 2013. Enhancing plant productivity under salt stress: relevance of poly-omics. *Salt Stress in Plants*, 113-156.
- Heath, R. L. and Packer, L., 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplast I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, (25), 189-198.
- Hernandez, J. A., Olmos, E., Corpas, F. J., Sevilla, F., Rio, L. AD., 1995. Salt-induced oxidative stress in chloroplasts of pea plants. *Plant Sci*, (105), 151-167. <http://www.izotar.com/teknik7.htm>. (07.04.2010).
- Herschbach, C., Rennenberg, H., 1994. Influence of glutathione (GSH) on net uptake of sulphate and sulphate transport in tobacco plants. *J. Exp. Bot.*, (45), 1069-76.
- Hiser, C. and McIntosh, L., 1990. Alternative Oxidase of Potato is an integral membrane protein synthesized *de Novo* during aging of tuber slices. *Plant Physiology*, 93(1), 312-318.
- Hodges, D. M., Andrews, C. J., Johnson, D. A., Hamilton, R. I., 1996. Antioxidant compound responses to chilling stress in differentially sensitive inbred maize lines. *Physiol. Plant.*, 98, 685-692.
- Hodgson, R. A. J. and Raison, J.K., 1991. Superoxide production by thylakoids during chilling and its implication in the susceptibility of plants to chilling-induced photoinhibition. *Planta*, (183), 222-228.
- Horemans, N., 1997. Ascorbate-mediated functions at the plasma membrane of higher plants. PhD thesis. Univ. Antwerpen, Belg.

- Hu, C. and Van Huystee, R.B., 1989. Immunochemical relatedness of two peanut peroxidase isozymes from peanut cell culture. *Biochem. Cell Biol.*, (37), 371-376.
- Hung, S. H., Yu, C. W., L, C. H., 2005. Hydrogen peroxide functions as a stress signal in plants. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 46, 1-10.
- Izabela, M. J. and Anna, M.R., 2003. Alternative oxidase in higher plants. *Acta Biochimica Polonica*, 50(4), 1257-1271.
- Jacoby, R. P., Taylor, N. L., Millar, H., 2011. The role of mitochondrial respiration in salinity tolerance. *Trends in Plant Science*, (16) ,11.
- Jaleel, C. A., Sankar, B., Sridharan, R., Panneerselvam, R., 2007. Soil salinity alters growth, chlorophyll content, and secondary metabolite accumulation in *Catharanthus roseus*. *Turk. J. Biol.*, (32), 79–83.
- Jones, M. G., Bickar, D., Wilson, M. T., Brunori, M., Colosimo, A., Sarti, P., 1984. A re-examination of the reactions of cyanide with cytochrome c oxidase. *Biochem J.*, 220(1), 57-66.
- Juszczuk, I. M. and Anna M., 2003. Alternative oxidase in higher plants. *Acta Biochimica Polonica*, 50(4), 1257-1271.
- Kano, H. and Kumazawa, H., 1972. Studies on CN--insensitive respiration in plant roots III. Induction of CN--insensitive respiration with low concentrations of respiratory inhibitors. *Plant and Cell Physiology*, 13(2), 237-244.
- Karpova, O. V., Kuzmin, E. V., Elthon, T. E., and Newton K. J. 2002. Differential expression of alternative oxidase genes in maize mitochondrial mutants. *Plant Cell*, (14) , 3271–3284.
- Keha, E. E. ve Küfrevioğlu, Ö.İ., 2000. *Biyokimya. Safak Yayınları*, Erzurum, 107-115.
- KJ, Livak., T. D, Schmittgen., (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ method. *Methods* 25(4): 402-408.
- Kumar, R. R., Goswami, S., Kumar, N., Pandey, S. K., Pandey, V. C., Sharma, S. K., Pathak, H., Rai, R. D., 2011. Expression of novel ascorbate peroxidase isoenzymes of wheat (*Triticum aestivum* L.) in response to heat stress. *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry*, 3(11), 188-194.
- Kunert, K. J., Foyer, C., 1993. Thiol/ disulfide exchange in plants. in sulfur nutrition and sulfur assimilation in higher plants, ed. De Kok, L.J., Stulen, I., Rennenberg, H., Brunold, C., Rauser, W.E., pp. 139–51. The Hague: SPB Acad.
- Kuru, H. İ., 2007. Arseniğin insan ve bazı canlılarda oksidatif enzimler üzerine etkileri. yüksek lisans tezi, Dumlupınar üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kütahya.
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, (227), 680-685.
- Laloi, C., Rayapuram, N., Chartier, Y., Grienemberger, J.M., Bonnard, G., Meyer, Y., 2001. Identification and characterization of a mitochondrial thioredoxin system in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 14144-14149.
- Lambers, H., 1997. Oxidation of mitochondrial NADH and the synthesis of ATP. in Dennis, D.T., Turpin, D.H., Lefebvre, D.D., Layzell, D.B. eds, *Plant Metabolism*. Longman Singapore Publishers, Singapore, pp 200-219.
- Larcher, W., 2001. *Ökophysiologie der pflanzen* (Stuttgart: Eugen Ulmer) p. 302.
- Laties, G. G., 1982. The cyanide-resistant, alternative path in higher plant respiration. *Annu Rev Plant Physiol.*, (33), 519-555.

- Lauchli, A., Grattan, S. R., 2007. Plant growth and development under Salinity stress. M. A. Jenks *et al.* (eds.), *Advances in molecular breeding toward drought and salt tolerant crops*, 1–32.
- Law, M. Y., Charles, S. A., Halliwell, B., 1983. Glutathione and ascorbic acid in spinach (*Spinacea oleracea*) chloroplasts. *Biochem. J.*, (210), 899-903.
- Lee, B. R., Kim, K.Y., Jung, W. J., Avice, J. C., Ourry, A., Kim, T. H., 2007. Peroxidases and Lignification in relation to the intensity of water-deficit Stress in white clover (*Trifolium repens* L.), *J. Exp. Bot.*, (13), 1-9.
- Lemaire, S. D., Richardson, J. M., Goyer, A., Keryer, E., Lancelin, J. M., Makhatadze, G. I., Jacquot, J. P., 2000. Primary structure determinants of the pH and temperature-dependent aggregation of thioredoxin. *Biochim. Biophys. Acta*, (1476), 311-323.
- Lennon, A. M., Neuenschwander, U. H., Ribas-Carbo, M., Giles, L., Ryals, J. A., Siedow, J. N., 1997. The effect of salicylic acid and tobacco mosaic virus infection on the alternative oxidase of tobacco. *Plant Physiol.*, (115), 783-791.
- Levitt, J., 1980. Responses of plants to environment stress: chilling, freezing and high temperature stress, 2nd ed., Academic Press, New York.
- Li, C. R., Liang, D. D., Li, J., Duan, Y. B., Li, H., Yang, Y. C., and Qin R. Y. 2013, Unravelling mitochondrial retrograde regulation in the abiotic stress induction of rice Alternative oxidase 1 genes. *Plant Cell Environ* 36: 775–788.
- Li, J. T., Qiu, Z. B., Zhang, X. W., Wang, L. S., 2010. Exogenous hydrogen peroxide can enhance tolerance of wheat seedlings to salt stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, (33), 835-842.
- Li, J., Yan, X. F., Zu, Y. G., 2000. Generation of activated oxygen and change of cell defense enzyme activity in leaves of Korean pine seedling under low temperature. *Acta Botanica Sinica*, (2), 148-152.
- Liu, E. H., 1973. A simple method for determining the relative activities of individual peroxidase isoenzymes in a tissue extract, *Anal. Biochem.*, (56), 149-154.
- Lyons, J. M., 1973. Chilling injury in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, (24), 445-466.
- Mahajan, S. and Tuteja, N., 2005. Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Arch. Biochem. Biophys.*, (444), 139-158.
- Maxwell, D. P., Wang, Y., McIntosh, L., 1999. The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, (96), 8271-6.
- McCord, J. M. and Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase, an enzymatic function for erythrocyte. *J. Biol. Chem.*, (244), 6049-6055.
- McIntosh, L., 1994. Molecular biology of the alternative oxidase. *Plant Physiol.*, (105), 781-786.
- McIntosh, L., Eichler, G., Gray, G., Maxwell, D., Nickels, R., Wang, Y., 1998. Biochemical and genetic controls exerted by plant mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, (1365), 278-84.
- Meeuse, B. D. J., 1975. Thermogenic respiration in aroids. *Annu Rev Plant Physiol.*, (26), 117–26.
- Mehlhorn, H., Lelandais, M., Korth, H. G., Foyer, C. H., 1996. Ascorbate is the natural substrate for plant peroxidases. *FEBS Lett.*, (378), 203-6.
- Meister, A., 1983. Selective Modification of Glutathione Metabolism. *Science.*, (220), 472- 477.

- Meister, A., 1994. Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals. *J. Biol. Chem.*,(269), 9397-400.
- Mhadhbia, M., Fotopoulos, V., Mylonac, P., Jebara, M., Aouania, M., Polidoros, A., 2013. Alternative oxidase 1 (Aox1) gene expression in roots of *Medicago truncatula* is a genotype-specific component of salt stress tolerance. *Journal of Plant Physiology*,(170) ,111– 114.
- Michae, O. D., 1989. Characterization of the alternative respiratory pathway in soybean Ph. D. Theses. Iowa State University.ABD.
- Michel, H., Behr, J., Harrenga, A., Kannt, A., 1998. Cytochrome c oxidase: structure and spectroscopy. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, (27), 329-356.
- Millar, A. H., Wiskich, J. T., Whelan, J., Dat, A. D., 1993. Organic acid activation of the alternative oxidase of plant mitochondria. *FEBS Lett.*, (329), 259-262.
- Millar, A.H. Whelan, J., Soole, KL., Day, DA., (2011) Organization and regulation of mitochondrial respiration in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* (62), 79–104.
- Minagawa, N. and Yoshimoto, A., 1987. The induction of cyanide-insensitive respiration in *Hansenula anomala*. *J. Biochem.*, (101), 1141-1146.
- Minagawa, N., Sakajo, S., Komiyama, T., Yoshimoto, A., 1990. A 36-kDa mitochondrial protein is responsible for cyanide-resistant respiration in *Hansenula anomala*. *FEBS. Lett.*, 264(1), 149-152.
- Minibaeva, F. V. and Gordon, L. K., 2003. Superoxide production and the activity of extracellular peroxidase in plant tissues under stress conditions. *Russ. J. of Plant Physiology*, 50(3), 411-416.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., Breusegem, F.V., 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends plant science.*, (9) 490–498.
- Miyake, C. And Asada, K., 1992. Tylakoid Bound Ascorbate Peroxidase in Spinach Chloroplasts and Photoreduction of Its Primary Oxidation Product Monodehydroascorbate Radicals in the Tylakoids. *Plant Cell Physiol.*, (33), 541-553.
- Moller, I. M. and Kristensen, B. K., 2004. Protein oxidation in plant mitochondria as a stress indicator. *Photochem. Photobiol. Sci.*, (3), 730-735.
- Moller, I. M., 2002. A new dawn for plant mitochondrial NAD(P)H Dehydrogenases. *Trends in Plant Science*, 7(6), 232-240.
- Moore, A. L., Siedow, J.N. 1991. The regulation and nature of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, (1059), 121-140.
- Mutlu, S., 2009. Salisilik asidin arpada (*Hordeum vulgare* L.) soğuk toleransını sağlama ve apoplastik ile simplastik proteinler üzerine etkilerinin incelenmesi. Doktora Tezi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Nakano, Y. and Asada, Y., 1981. Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-Specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts, *Plant Cell Physiol.*, (22), 867-880.
- Nakano, Y., Asada, K., 1987. Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts: its inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. *Plant Cell Physiol.*, (28),131-40.
- Navrot, N., Rouhier, N., Gelhaye, E., Jacquot, J.P., 2007. Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria. *Physiol. Plant.*, (129), 185-195.

- Nijs, D., Kelley, P. M., 1991. Vitamins C and E donate single hydrogen atoms *in vivo*. FEBS Lett., (284), 147-51.
- Nishiyama, Y., Ikeda, H., Haramaki, N., 1998. Oxidative Stress is Related to Exercise in Tolerance in Patients With Heart Failure. Am. Heart. J., (135), 115.
- Noctor, G., and Foyer, C.H., 1998. Ascorbate and Glutathione, Keeping Active Oxygen Under Control, Ann. Review of Plant Physiol. Plant Mol. Biology, (49), 249-279.
- Ohtsu, K., Ito, Y., Saika, H., Nakazono, M., Tsutsumi, N., and Hirai A. 2002. ABA-independent expression of rice alternative oxidase genes under environmental stresses. Plant Biotech.,(19) , 187–190.
- Padh, H., 1990. Cellular functions of ascorbic acid. Biochem. Cell Biol., (68), 1166-73.
- Parida, A. K., Das, A. B., 2005. Prasanna Mohanty Defense potentials to NaCl in a mangrove, *Bruguiera parviflora*: Differential changes of isoforms of some antioxidative enzymes. J. Plant Physiol, (161), 531–542.
- Parida, A. K., Das, A. B., 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. Ecotoxicol Environ Saf, 60(3) , 324-49.
- Parsons, H. L., 1998. The role of alternative pathway respiration in plant cells growing under phosphorus limitation: A study using transgenic *Nicotiana Tabacum* cells lacking the alternative oxidase. Master Thesis. University of Toronto.
- Patykowski, J. and Urbanek H., 2003. Activity of enzymes related to H₂O₂ generation and metabolism in leaf apoplastic fraction of tomato leaves infected with *Botrytis cinerea*. Journal of Phytopathology, (151), 153–161.
- Pitcher, L. H., Brennan, E., Hurley, A., Dunsmuir, P., Tepperman, J.M., Zilinskas, B.A. 1991. Overproduction of petunia chloroplastic copper / zinc superoxide dismutase does not confer ozone tolerance in transgenic tobacco. Plant Physiol., (97), 452-455.
- Pitman, M.G., A, Läuchli., 2002. Global impact of salinity and agricultural ecosystems. In: Salinity: Environment – Plants – Molecules. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 3–20.
- Plummer, D. T., 1980. Assay methods. in: Plummer (Ed.), D.T., An Introduction to Practical Biochemistry. British Library, London, pp. 119-159.
- Purvis, A. C. and Shewfelt, R.L., 1993. Does the alternative pathway ameliorate chilling injury in sensitive plant tissues? Physiol Plant., (88), 712-718.
- Purvis, A. C., 1997. Role of the alternative oxidase in limiting superoxide production by plant mitochondria. Physiologia Plantarum, 100(1), 165-170.
- Ranieri, A., Castagna, A., Scebba, F., Careri, M., Zagnoni, I., Predieri, G., Pagliari, M., Sanità di Toppi, L., 2005. Oxidative stress and phytochelatin characterisation in bread wheat exposed to cadmium excess. Plant Physiol. Biochem., (43), 45-54.
- Ranieri, A., D'Urso, G., Nali, C., Lorenzini, G., Soldatini, G.F., 1996. Ozone stimulates apoplastic antioxidant systems in pumpkin leaves. Physiol. Plant., (97), 381-87.
- Rausser, W. E., 1987. Changes in glutathione content of maize seedlings exposed to cadmium. Plant Sci., (51), 171-75.
- Rennenberg, H., and Lamourex, G.L., 1990. Physiological Processes That Modulate The Concentration of Glutathione in Plant Cells. In: Sulfur Nutrition and Assimilation in Higher Plants, Fundamental Environmental and Agricultural Aspects, Rennenberg, H., Brunold, C., De Kok, L.J., Stulen, I., Ed., SPB Academic Publication., The Hague, 53-65.

- Rout, G. R., Samantaray, S., Das, P., 2000. *In vitro* rooting of *Psoralea corylifolia* Linn: Peroxidase activity as a marker, *Plant Growth Regul.*, (305), 215–219.
- Saika, H., Ohtsu, K., Hamanaka, S., and Nakazono, M., 2002 AOX1c, a novel rice gene for alternative oxidase, comparison with rice AOX1a and AOX1b. *Genes Genet Syst*, (77) ,31–38.
- Saika, H., Ohtsu, K., Hamanaka, S., Nakazono, M., Tsutsumi, N., Hirai, A., 2002. AOX1c, a novel rice gene for alternative oxidase; comparison with rice AOX1a and AOX1b. *Genes Genet Syst* 77(1), 31-8.
- Sairam, R. K. and Srivastava, G.C., 2000. Induction of oxidative stress and antioxidant activity by hydrogen peroxide treatment in tolerant and susceptible wheat genotypes. *Biologia Plantarum*, 43(3), 381-386.
- Sanchez-Fernandez, R., Fricker, M., Corben, L.B., White, N.S., Sheard, N., 1997. Cell proliferation and hair tip growth in the *Arabidopsis* root are under mechanistically different forms of redox control. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, (94), 2745-50.
- Scandalios, J. G., 1990. Response of plant antioxidant defense genes to environmental stress, in: J.G. Scandahos and T.R.F. Wright (Eds.), *Advances in Genetics*. Vol. 28, *Genomic Responses to Environmental Stress*. Academic Press, San Diego, pp, 1-41.
- Scandalios, J. G., 1993. Oxygen Stress and Superoxide Dismutase. *Plant Physiol.*, (101), 7-12.
- Scheller, H. V., Huang, B., Hatch, E., Goldsbrough, P.B., 1987. Phytochelatin synthesis and glutathione levels in response to heavy metals in tomato cells. *Plant Physiol.*, (85), 1031-35.
- Schonbaum, G. S., Bonnet, W. D. J., Storey, B. T., Bahr, J. T., 1971. Specific inhibition of the cyanide-insensitive respiratory pathway in plant mitochondria by hydroxamic acids. *Plant Physiol.*, (47), 124-128.
- Schürmann, P. and Jacquot, J.P., 2000. Plant Thioredoxin Systems Revisited. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, (51), 371-400.
- Schwarzländer, M., Fricker, M., Sweetlove, L., 2009. Monitoring the in vivo redox state of plant mitochondria: Effect of respiratory inhibitors, abiotic stress and assessment of recovery from oxidative challenge. *Biochim. Biophys. Acta*, (1787), 468–475.
- Shao, H. B., Chu, L. Y., Shao, M. A., Jaleel, C. A., Mi, H. M., 2008. Higher plant antioxidants and redox signaling under environmental stresses. *CR Biol.*, (331), 433–441.
- Shaul, O., Mironov, V., Burssens, S., Van Montagu, M., Inze, D., 1996. Two *Arabidopsis* cyclin promoters mediate distinctive transcriptional oscillation on synchronised tobacco 3Y-2 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, (93), 4868-72.
- Siedow J.N. and Moore, A.L., 1993. A kinetic model for the regulation of electron transfer through the cyanide-resistant pathway in plant mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*, (1142), 165-174.
- Siedow, J. N., Umbach, A.L., Moore, A.L., 1995. The active site of the cyanide-resistant oxidase from plant mitochondria contains a coupled binuclear iron center. *FEBS Lett.*, (362), 10-14.
- Simons, B. H. and Lambers, H., 1999. The alternative oxidase: is it a respiratory pathway allowing a plant to cope with stress? In: Lerner HR (ed) *Plant*

- Responses to Environmental Stress: From Phytohormones to Gene Reorganization. Marcel Dekker Inc, New York, pp, 265-286.
- Slesak, I., Libik, M., Karpinska, B., Karpinski, S., Miszalski, Z., 2007. The Role of Hydrogen Peroxide in Regulation of Plant Metabolism and Cellular Signalling in Response to Environmental Stresses. *Acta Biochim. Pol.*, (54), 39-50.
- Smith, C. A., Melino, V. J., Sweetman, C., Soole, K.L., 2009. Manipulation of alternative oxidase can influence salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum*, (137), 459–472.
- Sramkovaa, Z., Gregovab, E., Sturdíka, E., 2009. Chemical composition and nutritional quality of wheat grain. *Acta Chimica Slovaca*, 2(1), 115-138.
- Stahl, W. and Sies, H., 2002. Introduction: Reactive Oxygen Species, Research Monographs, 1-2.
- Steponkus, P. L., 1992. Preface, *Advances in Low Temperature Biology*, (1), 9-11.
- Stock, D., Gibbons, C., Arechaga, I., Leslie, A.G., Walker, J.E., 2000. The Rotary mechanism of ATP synthase. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, (10), 672-679.
- Streb, P., Aubert, S., Gout, E., Bligny, R., 2003. Cold- and light-induced changes of metabolite and antioxidant levels in two high mountain plant species *Soldanella alpina* and *Ranunculus glacialis* and a lowland species *Pisum sativum*. *Physiologia Plantarum*, 118, 96-104.
- Taiz, L. and Zeiger, E., Çeviri; Türkan, I., 2008. Bitki fizyolojisi. 236 s., İzmir.
- Takumi, S., Tomioka, M., Eto, K., Naydenow, N., and Nakamura C. 2002. Characterization of two non-homologous nuclear genes encoding mitochondrial alternative oxidase in common wheat. *Genes Genet Syst*, (71) 77–88.
- Taşğın, E., 2004. Düşük sıcaklık ve salisilik asidin kışlık buğday yapraklarındaki donma toleransı, oksidatif enzim aktiviteleri ve apoplastik proteinler üzerine etkileri. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Tuteja, N., 2007. Mechanisms of high salinity tolerance in plants. *Methods Enzymol* (428), 419–438.
- Umbach, A. L., Siedow, J.N., 1993. Covalent and noncovalent dimers of the cyanide-resistant alternative oxidase protein in higher plant mitochondria and their relationship to enzyme activity. *Plant Physiol.*, (103), 845-54.
- Van Camp, W., Van Montagu, M., Inze, D., 1994. Superoxide dismutases. In: Foyer, C.H. and Mullineaux, P.M.(eds), *Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants*. CRC Press Inc. Boca Raton., 317-341.
- Vanacker, H., Carver, T.L.W., Foyer, C.H., 1998. Pathogen-Induced Changes in the Antioxidant Status of the Apoplast in Barley Leaves. *Plant Physiol.*, (117), 1103-1114.
- Vanlerberghe, G. C. and McIntosh, L., 1996. Signals regulating the expression of the nuclear gene encoding alternative oxidase of plant mitochondria. *Plant Physiol.*, (111), 589-595.
- Vanlerberghe, G. C. and McIntosh, L., 1997. Alternative oxidase: from gene to function. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.*, (48), 703-34.
- Vanlerberghe, G. C., and McIntosh, L., 1992. Lower growth temperature increases alternative pathway capacity and alternative oxidase protein in tobacco. *Plant Physiol*, (100), 115–119.

- Vanlerberghe, G. C., Cvetkovska, M., Wang, J., 2009. Is the maintenance of homeostatic mitochondrial signaling during stress a physiological role for alternative oxidase? *Physiol Plant.*, 137(4), 392-406.
- Vanlerberghe, G. C., Day, D. A., Wiskich, J. T., Vanlerberghe, A. E., McIntosh, L., 1995. Alternative Oxidase Activity in Tobacco Leaf Mitochondria (Dependence on Tricarboxylic Acid Cycle-Mediated Redox Regulation and Pyruvate Activation). *Plant Physiol.* 1995 October; 109(2): 353–361.
- Vanlerberghe, G. C., McIntosh, L., 1992b. Coordinate Regulation of Cytochrome and Alternative Pathway Respiration in Tobacco. *Plant Physiol.*, (100), 1846-1851.
- Wagner, A. M., Moore, A. L. 1997. Structure and function of the plant alternative oxidase: its putative role in the oxygen defence mechanism. *Biosci Rep.*, (17), 319-333.
- Wang, J., C. Vanlerberghe, G., 2013. A lack of mitochondrial alternative oxidase compromises capacity to recover from severe drought stress. *Physiologia Plantarum*, (149), 461–473.
- Wang, W., Vinocur, B., and Altman, A., 2003b. Plant Responses to Drought, Salinity and Extreme Temperature: Towards Genetic Engineering for Stress Tolerance. *Planta*, (218), 1–14.
- Whetten, R.W., MacKay, J. J., Sederoff, R. R., 1998. Recent advances in understanding lignin biosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.*, (49), 585-609.
- Wingate, V. P. M., Lawton, M. A., Lamb, C. J., 1988. Glutathione causes a massive and selective induction of plant defense genes. *Plant Physiol.*, (31), 205-211.
- Wu T., Hsu, Y., Lee, T., 2009. Effects of cadmium on the regulation of antioxidant enzyme activity, gene expression, and antioxidant defenses in the marine macroalga *Ulva fasciata*. *Botanical Studies*, 50, 25-34.
- Yamaguchi, K., Mori, H., Nishimura, M., 1995. A novel isozyme of ascorbate peroxidase localized on glyoxysomal and leaf peroxisomal membranes in pumpkin. *Plant Cell Physiol.* (36), 1157–62.
- Yankovskaya, V., Horsefield, R., Törnroth, S., Luna-Chavez, C., Miyoshi, H., Léger, C., Byrne, B., Cecchini, G., Iwata, S., 2003. Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation. *Science*, (299), 700-704.
- Yannarelli, G. G., Fernández-Alvarez, A. J., Santa-Cruz, D. M., Tomaro, M. L., 2007. Glutathione reductase activity and isoforms in leaves and roots of wheat plants subjected to cadmium stress. *Phytochemistry*, (68), 505-512.
- Yee, Y., Tam, N. F. Y., Wong, Y. S., Lu, C. Y., 2002. Growth and physiological responses of two mangrove species (*Bruguira gymnorrhiza* and *Kandelia candel*) to waterlogging. *Environ. Exp. Bot.*, 1-13.
- Yılmaz, S. ve Ozan, T. S., 2003. Meme kanserli hastalarda lipid peroksidasyonu ve bazı enzim aktiviteleri arasındaki ilişkisi. *Türk Biyokimya Dergisi*, 28(4), 252-256.
- Yordanova, R. Y., Christov, K. N., Popova L. P., 2004. Antioxidant enzymes in barley plants subjected to soil flooding. *Environ. and Exp. Botany*, (51), 93-101.
- Zhu, J-K., 2007. Plant Salt Stress. *Encyclopedia of life sciences*, a1300.pub2 M.

ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında İran'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini İran'da tamamladı. 2005 yılında girdiği Urmia Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2008 yılında lisansdan mezun oldu. Aynı yıl Marand Azad Üniversitesi'nde yükek lisansı kazandı ve 2011 yılında mezun olup aynı yılda Erzurum Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde doktorayı kazandı.