

T.C.
ANAkkALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DOKTORA TEZİ

***ARABIDOPSIS THALIANA* (L.) HEYNH. BİTKİSİNDE
PHELIPANCHE RAMOSA (L.) POMEL PARAZİTİNİN VE
TUZ STRESİNİN NEDEN OLDUĞU FİZYOLOJİK,
BİYOKİMYASAL VE GEN İFADESİ DÜZEYİNDEKİ
DEĞİŞİMLERİN ARAŞTIRILMASI**

Sefer DEMİRBAŞ

Biyoloji Anabilim Dalı

Tezin Sunulduğu Tarih: 18/02/2011

Tez Danışmanı

Yrd. Doç. Dr. Okan ACAR

ANAkkALE

DOKTORA TEZİ SINAV SONUÇ FORMU

SEFER DEMİRBAŞ tarafından YRD. DOÇ. DR. OKAN ACAR yönetiminde hazırlanan “*ARABIDOPSIS THALIANA* (L.) HEYNH. BİTKİSİNDE *PHYLIPANCHE RAMOSA* (L.) POMEL PARAZİTİNİN VE TUZ STRESİNİN NEDEN OLDUĞU FİZYOLOJİK, BİYOKİMYASAL VE GEN İFADESİ DÜZEYİNDEKİ DEĞİŞİMLERİN ARAŞTIRILMASI” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş olup, kapsamı ve niteliği açısından bir doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Yrd. Doç. Dr. Okan ACAR

Danışman

Prof. Dr. Filiz ÖZDEMİR

Jüri Üyesi

Doç. Dr. K. Melik TAŞKIN

Jüri Üyesi

Doç. Dr. Melike BOR

Jüri Üyesi

Yrd. Doç. Dr. Hüseyin ERDUĞAN

Jüri Üyesi

Sıra No:

Tez Savunma Tarihi: 18/02/2011

Prof. Dr. İsmail TARHAN

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI

Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

Sefer DEMİRBAŞ

TEŞEKKÜR

Doktora çalıőmam sırasında tez konusunun belirlenmesi, ilerleyen süreçlerdeki yardım ve önerilerini benden esirgemeyen, daima önümü açan sayın doktora hocam Yrd. Doç. Dr. Okan ACAR, Ege Üniversitesi Biyoloji Bölümü öğretim üyelerinden sayın Prof. Dr. Filiz ÖZDEMİR, Prof. Dr. İsmail TÜRKAN, Yrd. Doç. Dr. A. Hediye SEKMEN ESEN ile Dr. Burcu SEÇKİN ve Dr. Ceyda ÖZFİDAN, bölümümüz öğretim üyelerinden sayın Doç. Dr. Cüneyt AKI, Selanik Aristo Üniversitesi Biyoloji Fakültesi öğretim üyelerinden Dr. Konstantinos E. VLACHONASİOS ve aynı üniversiteden çalıőmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen arkadaşım Dr. Athanasios KALDİS' e teşekkürü bir borç bilirim.

Doktora çalıőmam sırasında manevi desteğini ve sabrını benden esirgemeyen sevgili eőim Zeycan Aydan DEMİRBAŞ' a, ailem ve tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Sefer DEMİRBAŞ

SİMGELER VE KISALTMALAR

4cl	4-kumarat-koenzim A ligaz kodlayan gen
AAO	ABA-aldehit redüktaz
ABA	Absisik asit
ABRE	ABA' e yanıt veren element
ACaM5	Kalmodulin kodlayan gen
acc2	1-aminosiklopropan-1-karboksilaz sentaz kodlayan gen
act1	Aktin kodlayan gen
aoc	Allen oksit siklaz kodlayan gen
aos	Allen oksit sentaz kodlayan gen
APX	Askorbat peroksidaz
asa1	Antiranilat sentaz alfa altbirimi
avr	Avirulens
BSA	Bovin serum albümin
BTH	Benzo (1, 2, 3) tiadiazol-7-karbotioik asit S-metil ester
c4h	Sinnamat-4-hidroksilaz
Ca	Kalsiyum
CAT	Katalaz
CCoAOMT	Kafeonil-CoA 3-O-metiltransferaz kodlayan gen
Cl	Klorür
COR	Soğukla düzenlenen
Cu	Bakır
cys	Sistein
DHA	Dehidroaskorbat
dI	Deiyonize
dk	Dakika

dNTPs	Serbest nükleotidler (deoksiribonükleosit triptofosfatlar)
DRE	Kuruma yanıt elementi
dS/m	Desi Simens/ metre
E	Enfeksiyon grubu
EC	Elektriksel iletkenlik
E.C.	Uluslararası enzim komisyonu
ef-1 α	Uzama faktörü 1- α kodlayan gen
ERD	Kurumaya karşı erken duyarlı
Fe	Demir
GA	Gibberellik asit
glu	Glutamin
gly	Glisin
GR	Glutasyon redüktaz
GSH	İndirgenmiş glutasyon
GPx	Glutasyon peroksidaz
GSSG	Oksidize glutasyon
GST1	Glutasyon s-transferaz kodlayan gen
GST11	gst1' in homolog geni
HCl	Hidroklorik asit
hmg	3-hidroksi-3-metilglutaril-coA redüktaz
HMGR	3-hidroksi-3-metilglutaril CoA redüktaz
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HO ₂ ⁻	Hidroperoksil
HR	Aşırı duyarlı yanıtlar
IAA	Indol-3-asetik asit
ISR	Uyarılmış sistemik dayanıklılık

INA	2,6,-dikloro-izonikotirik asit
JA	Jasmonik asit
K	Potasyum
KIN	Soğukla uyarılabilen
latex allergen	Lateks allerjeni kodlayan gen
LEA	Embriyogenezin son evresinde bollaşan
lox	Lipoksigenaz kodlayan gen
LTI	Düşük sıcaklıkla uyarılabilen
Mb	Megabaz
MDHA	Monodehidroaskorbat
MBP	Mirosinaza bağlanan proteini kodlayan gen
MDA	Malondialdehit
Mg	Magnezyum
mg	Miligram
ng	Nanogram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
Mn	Mangan
ms	Milisaniye
Na	Sodyum
NaCl	Sodyum klorür
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NCED	9'-cis-epoksikarotenoid dioksigenaz
nm	Nanometre
NO	Azot oksit
O ₂ ⁻	Süperoksit radikali

$^1\text{O}_2$	Tekil oksijen
OH \cdot	Hidroksil radikali
P	Fosfor
pai1	Fosforibosilantranilat izomeraz kodlayan gen
pal1	Fenilalanin amonyum-liyaz kodlayan gen
PHÖ	Programlanmış hücre ölümü (veya PCD)
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PDF1.2	Defensini kodlayan gen
PMEi,	Pektin metil esteraz kodlayan gen
PMSR	Peptid metiyonin sülfoksit redüktaz kodlayan gen
POX	Peroksidaz
pox	Peroksidazı kodlayan gen
PR	Patojenle ilişkili
PVPP	Polivinilpolipirolidon
rbcl	Rubisko enziminin büyük alt birimini kodlayan gen
Rc kinaz	Reseptör kinazı kodlayan gen
RD	Kurumaya duyarlı
RNA	Ribonükleik asit
R-SG	Polar S-glutatyonile olmuş reaksiyon ürünü
ROT	Reaktif oksijen türleri
rps2	Ribozomal protein S2' yi kodlayan gen
rps23	Ribozomal protein S23' ü kodlayan gen
SA	Salisilik asit
SAR	Sistemik kazanılmış dayanıklılık
SH	Sülfidril
sn	Saniye

SOD	Süperoksit dismutaz
SO ₄ ⁻²	Sülfat
SUC1	Sükroz taşıyıcısını kodlayan gen
T	100 mM NaCl (tuz) uygulanan grup
TE	Canavar otu enfeksiyonu sonrası 100 mM NaCl (tuz) uygulanan grup
TBA	Tiobarbitürik asit
TCA	Trikloroasetik asit
thi2.1	Tiyonin kodlayan gen
Ws.	Wassilewskija
ubq5	Ubikutin kodlayan gen
ZEP	Zeaksantin epoksidaz
Zn	Çinko
γ-ECS	γ-glutamil sistein sentetaz

ÖZET

***ARABIDOPSIS THALIANA* (L.) HEYNH. BİTKİSİNDE *PHELIPANCHE RAMOSA* (L.) POMEL PARAZİTİNİN VE TUZ STRESİNİN NEDEN OLDUĞU FİZYOLOJİK, BİYOKİMYASAL VE GEN İFADESİ DÜZEYİNDEKİ DEĞİŞİMLERİN ARAŞTIRILMASI**

Sefer DEMİRBAŞ

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Okan ACAR

18/02/2011, 106

Canavar otu (*Orobancha* ve *Phelipanche* spp.) fotosentez yeteneğini kaybetmiş, su, organik karbon ve azot için tamamen konukçusuna ihtiyaç duyan tam kök paraziti bir bitkidir. Canavar otu bitkileri içinde yer alan *Phelipanche ramosa* (L.) Pomel, domates, patlıcan, patates, tütün, kenevir, kanola, mercimek, kavun gibi bitkilerde verim kayıplarına neden olmaktadır. Önemli bir abiyotik stres olan tuzluluk ise, Dünya karasal alanlarının yaklaşık % 20' sini, sulu tarım yapılan alanların ise yaklaşık olarak % 50' sini etkilemektedir.

Bu çalışmada, *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. bitkisinde *P. ramosa* ve tuz stresinin toplam klorofil, klorofil a, klorofil b ve karotenoid pigmentlerinin içeriğine, lipit peroksidasyonu miktarına, SOD, POX, CAT, APX ve GR enzimlerinin aktivitesine ve *COR78*, *COR6.6*, *RD29B*, *PR1*, *PDF1.2*, *GOLS3* ve *GST1* genlerinin bağlı gen ifade düzeylerindeki değişime olan etkileri araştırılmıştır.

Arabidopsis bitkisinde NaCl, enfeksiyon ve enfeksiyona NaCl etkisinin incelendiği tüm gruplarda antioksidatif savunma sistemi enzimlerinden SOD, POX, CAT ve GR aktivitelerinin zamana bağlı olarak arttığı, bitkilerin pigment içeriğinin ise zamana bağlı olarak azaldığı saptanmıştır.

RD29B hariç *COR78*, *COR6.6* ve *GOLS3* genlerinin kontrol bitkilerine kıyasla her üç grupta zamana bağlı olarak artarak uyarılması, ozmoprotektanların sentezlenmeye başladığını ve böylece su kaybının önlenmeye çalışıldığına işaret etmektedir. *Arabidopsis* bitkilerinde *PDF1.2* geninin ifadesinde meydana gelen artış etilen ve JA yolağına bağlı savunma sisteminin uyarılmış olduğunu, *PR1* geninin baskılanmış olmasının SA' e bağlı savunma sistemini baskılamış olabileceğini, *GST1* genin uyarılması ise oksidatif stresin meydana geldiğini işaret etmektedir.

Anahtar sözcükler: *Arabidopsis thaliana*, *Phelipanche ramosa*, tuz stresi, antioksidan enzimler, gen ifadesi.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF PHYSIOLOGIC, BIOCHEMICAL AND GENE EXPRESSION LEVEL CHANGES CAUSED BY *PHELIPANCHE RAMOSA* (L.) POMEL AND SALT STRESS IN *ARABIDOPSIS THALIANA* (L.) HEYNH.

Sefer DEMİRBAŞ

Çanakkale Onsekiz Mart University

Graduate School

Chair for Biology Thesis of Ph.D of Science

Advisor: Assistant Prof. Dr. Okan ACAR

18/02/2011, 106

Broomrape (*Orobanche* and *Phelipanche* spp.) is a root holoparasitic plant which is devoid of photosynthetic ability, needs host plant for water, organic carbon and nitrogen. *Phelipanche ramosa* (L.) Pomel which is involved in broomrapes causes high yield losses on plants such as tomato, eggplant, potato, tobacco, hemp, oil rapeseed, lentil and melon. Salinity which is an important abiotic stress, affects 20 % of land area and approximately 50 % of irrigated area in world.

In this study, alteration in content of total chlorophyll, chlorophyll a, chlorophyll b and carotenoid pigments, lipid peroxidation content, activities of SOD, POX, CAT, APX and GR enzymes and relative expression levels of *COR78*, *COR6.6*, *RD29B*, *PR1*, *PDF1.2*, *GOLS3* and *GST1* genes caused by *P. ramosa* and salt stress in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. was researched.

All groups studied the effects of NaCl, infection, and infection with NaCl in *Arabidopsis* plant, it was determined that activities of antioxidative defense system enzymes, such as SOD, POX, CAT and GR, was increased whereas pigment content of plants was decreased.

The inducing of *COR78*, *COR6.6* and *GOLS3* genes except *RD29B* depends on time in every three groups compared with control plants indicates that the synthesis of

osmoprotectants starts and so the water loss might be prevented. The increase of *PDF1.2* gene expression in *Arabidopsis* plants, indicates that pathway of ethylene- and JA-dependent defense system is induced; the inhibition of *PR1* gene indicates that SA dependent defense system could be inhibited. The inducing of *GST1* gene also indicates that oxidative stress is occurred.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, *Phelipanche ramosa*, salt stress, antioxidant enzymes, gene expression.

İÇERİK	Sayfa
DOKTORA TEZİ SINAV SONUÇ FORMU	ii
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	v
ÖZET	x
ABSTRACT.....	xii
BÖLÜM 1-GİRİŞ.....	1
1.1. <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh. Bitkisi	5
1.2. Canavar Otu Parazit Bitkileri	5
1.3. Parazit-Konukçu Arasındaki Sinyal İletimi.....	10
1.4. Tuz Stresi	12
1.5. Bitki Savunma Sistemi.....	16
BÖLÜM 2-ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	34
BÖLÜM 3-MATERYAL VE YÖNTEM.....	39
3.1. Bitkisel Materyal	39
3.2. Bitkilerin Yetiştirilmesi	39
3.3. Bitki Analiz Yöntemleri.....	42
3.3.1. Pigment içeriğinin belirlenmesi.....	42
3.3.2. Lipit peroksidasyonu miktarının belirlenmesi	42
3.3.3. Toplam protein analizi.....	43
3.3.4. Antioksidan enzim aktivitelerinin saptanması	43
3.3.4.1. Süperoksit dismutaz (SOD; EC 1.15.1.1) aktivitesinin belirlenmesi.....	43
3.3.4.2. Peroksidaz (POX; EC 1.11.1.7) aktivitesinin belirlenmesi.....	44
3.3.4.3. Katalaz (CAT; EC 1.11.1.6) aktivitesinin belirlenmesi	44
3.3.4.4. Askorbat peroksidaz (APX; EC 1.11.1.11) aktivitesinin belirlenmesi ..	44
3.3.4.5. Glutasyon redüktaz (GR; EC 1.6.4.2) aktivitesinin belirlenmesi	44

3.3.5. Gen ifade değişimlerinin belirlenmesi	45
3.3.5.1. RNA izolasyonu ve toplam RNA miktarının hesaplanması	45
3.3.5.2. Reverse (Ters) transkripsiyon (RT) PCR	45
3.3.5.3. Genlerin PCR' da çoğaltılması	46
3.3.5.4. Gen ifadesinin elektroforezde saptanması	48
3.3.6. İstatistiksel analiz	49
BÖLÜM 4-ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	50
4.1. Araştırma Bulguları	50
4.1.1. Fotosentetik pigment içeriği	50
4.1.2. Lipit peroksidasyonu miktarı	54
4.1.3. Antioksidan enzim aktivitelerindeki değişim	55
4.1.3.1. SOD aktivite sonuçları	55
4.1.3.2. POX aktivite sonuçları	56
4.1.3.3. GR aktivite sonuçları	57
4.1.3.4. CAT aktivite sonuçları	58
4.1.3.5. APX aktivite sonuçları	59
4.1.4. Gen ifadesinde meydana gelen değişimler	60
4.1.4.1. COR6.6 gen ifade sonuçları	61
4.1.4.2. COR78 gen ifade sonuçları	62
4.1.4.3. RD29B gen ifade sonuçları	63
4.1.4.4. GOLS3 gen ifade sonuçları	64
4.1.4.5. GST1 gen ifade sonuçları	65
4.1.4.6. PR1 gen ifade sonuçları	66
4.1.4.7. PDF1.2 gen ifade sonuçları	67
4.1.5. İstatistiksel sonuçlar	68

4.2. Tartışma	69
BÖLÜM 5-SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	72
KAYNAKLAR	74
Çizelgeler	I
Şekiller	II
Özgeçmiş	IV

BÖLÜM 1**GİRİŞ**

Bitkiler, yaşam döngüleri sırasında farklı stres etmenleri ile karşı karşıya kalırlar. Bu etmenlerden bir veya bir kaçının bitkiler üzerinde birlikte veya ayrı ayrı özel etki yarattığı ve bitkilerin bu stres etmenlerine karşı verdikleri yanıtlarda farklı metabolik yolları kullandıkları bilinmektedir. Bitkilerin karşı karşıya kaldığı stres etmenleri abiyotik ve biyotik olarak iki sınıf altında toplanabilir (Çizelge 1).

Çizelge 1. Abiyotik ve biyotik stres etmenleri (Sadiqov, 2001)

Abiyotik Stres Etmeni	Biyotik Stres Etmeni
Topraktaki Besin Miktarı	Virüsler
Rüzgar	Bakteriler
Karbondioksit	Mikoplazma
Oksijen	Mantarlar
Radyasyon	Böcekler
Aşırı Sulama	Herbivorlar
Soğuk	Nematodlar
Sıcak	Protozoa
Oksidatif Stres	Kemirgenler
Tuzluluk	Parazit Bitkiler
Kuraklık	
Kimyasallar	
Diğer Kirleticiler	

Bitkiler, habitatlarındaki biyotik ve abiyotik etmenler tarafından sürekli şekilde uyarılırlar. Bu uyarıcılar hücre zarında bulunan algılayıcılar tarafından algılanarak sinyal iletim yoluyla hücre içerisindeki gerekli yerlere iletilirler. Bu durum konukçu-patojen ilişkileri açısından incelendiğinde, patojenlerin *avr* genlerinin ürünleri, konukçunun *R* geninin proteini tarafından tanınmaktadır. Bu *R* genleri, fosforilasyon yoluyla diğer genleri

harekete geçirerek bitkideki tepki ve savunma mekanizmasını aktif hale getirir. Sonuç olarak bitki hücresi intihar edebildiği gibi (programlanmış hücre ölümü veya apoptozis; PCD veya PHÖ) kendisine saldıran patojeni de öldürebilmektedir (Tör, 1996).

Parazit veya patojen olarak zarar veren birçok canlıya karşı bitkilerin geliştirmiş oldukları savunma mekanizmaları çok farklılık göstermektedir. Dirençli etkileşim sırasında patojenin tanımlanması, bitki savunma sistemini harekete geçiren sinyal iletim mekanizmasını aktive etmektedir. Savunma sisteminin aktivasyonu ile salisilik asit (SA), glukonaz, kitinaz, fitoaleksin gibi moleküllerin birikimi ve hücre duvarının yoğunlaşması sağlanır. PHÖ, aşırı duyarlı yanıtlar (HR), antioksidatif savunma sistemi, K^+ - H^+ değişimini içeren iyon akışı, hücresel farklılaşma ve patojenle ilişkili (PR) proteinlerin sentezi gibi olaylarla uyumlu bir şekilde çalışmaktadır (Sadiqov, 2001).

Bitkilerin normal yaşamı süresince tüm kısımlarında meydana gelebilen senesens olayı; organ seviyesinde yapraklarda, hücresel düzeyde ise trake elemanlarının farklılaşması sırasında meydana gelir. Bazı hücreler sayesinde gerçekleşen bu süreç, özel senesens programı olarak ifade edilen PHÖ' nü aktive eder. Moleküler mekanizması sıkça çalışılan PHÖ, hayvanların gelişiminde de önemli bir göreve sahiptir. PHÖ, hücre bölünmesinde DNA'nın kendini eşlemesi sırasında meydana gelen hataların sonucu oluşan özel sinyal molekülleri tarafından başlatılır. PHÖ' nün önemli işlevlerinden biri de bitkiyi patojenik organizmalara karşı korumaktır. Bitki patojenik bir organizma tarafından enfekte olduğunda, patojen kaynaklı sinyal molekülleri (elisitör) enfeksiyon bölgesindeki hücrelerde hızlı bir şekilde zehirli fenolik bileşiklerin birikmesine neden olur. Bu birikimin yüksek seviyelere ulaşmasıyla o bölgedeki hücreler ölmeye başlar. Ölü hücrelerin meydana getirdiği küçük dairesel adacıklar, nekrotik lezyon olarak adlandırılmaktadır. Bu bölgeler sağlıklı hücreleri, zehirli ve besince yoksun bölgeden izole eder ayrıca, o bölgeyi patojene karşı korur. Bu hızlı patojen saldırısıyla meydana gelen bölgesel hücre ölümü, HR olarak bilinmektedir (Taiz ve Zeiger, 2002).

HR yanıtlar, enfeksiyonun olduğu bölgede uyarılmış dayanıklılık olarak bilinen savunma sistemini tetikler. Uyarılmış dayanıklılığın iki şekli vardır: sistemik kazanılmış dayanıklılık (SAR) ve uyarılmış sistemik dayanıklılık (ISR). ISR işleyişi, fizyolojik ve biyokimyasal SAR' tan farklıdır. SAR, bitki için virulent, avirulent, patojen olmayan mikroorganizmalarla ya da SA, 2,6-dikloro-izonikotinik asit (INA) veya benzo (1, 2, 3) tiadiazol-7-karbotioik asit S-metil ester (BTH) gibi kimyasallarla suni olarak

uyarılabilir. SAR'ın oluşumu bitki ve elisitöre bağlı olarak belli bir zamana ihtiyaç duyar. Bu zaman periyodu içinde bitkinin her bölgesinde SA ve PR proteinlerinin (ve transkriptlerinin) birikimi gerçekleşmektedir. ISR' ta ise PR proteinleri ve SA birikimi gerçekleşmemektedir. Bunların yerine, jasmonat¹ ve etilen, savunma reaksiyon yollarını düzenlenmektedir (Vallad ve Goodman, 2004). PHÖ ile ilişkili olan antioksidatif savunma sistemi, enzimik ve enzimik olmayan şekilde gerçekleşir. Enzimik savunma sistemi sırasında oluşan reaktif oksijen türleri (ROT), antioksidan enzimler veya diğer antioksidan moleküller sayesinde temizlenmektedir. Bu savunma sisteminde görevli olan enzimler, ROT' nin kararsız yapısını biyokimyasal reaksiyonlarla ya kararlı hale getirmekte ya da farklı bir ROT' nin oluşmasına neden olmaktadır (Scandalios, 1997). Fotosentezin yavaşlamış hızı ROT' nin oluşumunu arttırmaktadır. Bu artış detoksifikasyonda görevli enzimlerin aktivitesinde artışa neden olmaktadır. Bitkiler değişmiş olan çevreye alıştıklarında, yaprak morfolojisinde, kloroplast pigment bileşiminde ve biyokimyasal işlevlerin aktivitesinde meydana gelen değişimleri düzenlerler. Fotosentez olayını oksidatif hasardan koruyan bu düzenlemeler iki aşamada gerçekleşmektedir. İlk aşamanın birinci basamağında, ksantofil pigmentleri vasıtasıyla aşırı ışığın meydana getirdiği ısının dağıtılır. İkinci basamakta ise, su dışında diğer oksijen alıcılarına elektronlar taşınarak fotoinhibisyon engellenir. İkinci aşamada ise, ROT seviyesinin ayarlanmasında görevli olan süperoksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APX), katalaz (CAT) ve çeşitli peroksidazlar (POX) gibi anahtar enzimlerin miktarının artmasını zorunlu kılmaktadır. Hücrenin farklı yapılarında bu enzimlerin birbiri ile olan uyumlu aktiviteleri sayesinde, ROT' nin oluşumu ve uzaklaştırılması arasındaki denge sonucu hücre sinyalleşme mekanizması için gerekli olan hidrojen peroksidin (H₂O₂) seviyesi korunur (Munns ve Tester, 2008).

Stres yanıtı sırasında uyarılmış birçok gen, erken ve geç yanıt geni olarak sınıflandırılmaktadır. Erken ifade olan genler, stres başlangıcından dakikalar içinde uyarılır ve çok kısa bir sürede ifade olur. Bunun tam tersi olarak birçok gen ise saatlerce sürebilecek şekilde uyarıldıktan sonra aktifleşmektedir. Erken ifade olan genler, geç ifade olan ana stres yanıt genleri için gerekli olan transkripsiyon etmenlerini (düzenleyici proteinler) kodlarlar. Geç yanıt genlerinin ifadesinden sonra ise stres toleransında işleve sahip olan birçok madde üretilmiş olur. Bu maddeler arasında çeşitli ozmolitler,

¹ Jasmonik asit (JA) ve metil jasmonat (MeJA)'ın içinde bulunduğu grubun genel adı.

antioksidan maddeler, moleküler şaperonlar ve LEA (embriyogenezin son evresinde bollaşan) benzeri olan proteinler yer alır (Zhu, 2002; Mahajan ve Tuteja, 2005).

Dünya üzerinde 800 milyon hektardan daha fazla karasal alan tuz etkisi altındadır. Bu alan Dünya üzerindeki toplam karasal alanlarının % 6' dan fazlasına denk gelmektedir (Munns ve Tester, 2008). Değişen iklimsel koşullar ve tarımsal faaliyetlerdeki yanlış sulama işlemleri gibi etkenlerden dolayı toprak tuzlanmasının önemi her geçen gün daha da artmaktadır. Tuzlanma, düşük yağış alan bölgeler için genel bir sorundur. Bitki kökleri gelişimini sürdürürken suyun topraktan alımı sırasında ozmoz kuralları işlemektedir. Toprakta bulunan tuz genellikle sodyum (Na^+), kalsiyum (Ca^{+2}), magnezyum (Mg^{+2}), klor (Cl^-) ve sülfat (SO_4^{-2}) iyonlarından oluşmaktadır. Magnezyum sülfat (MgSO_4) ve sodyum klorür (NaCl) en yaygın ve çözünebilen tuz formlarıdır. Toprakta tuz yoğunluğu arttığında suyun bitki köklerine doğru olan akışı azalacaktır. Tuzlanma daha yüksek seviyeye ulaştığında ise toprak, kök hücrelerindeki suyu çeker duruma geçecektir. Bunun sonucunda çoğu bitkide oluşacak su kaybından dolayı bitki önce solar daha sonra da ölüm gerçekleşir. Tuzun bitkiler üzerindeki zarar etkileri yalnızca ozmotik kuvvetlerden değil aynı zamanda Na^+ ve Cl^- 'ün toksik seviyesinden de kaynaklanmaktadır (FAO, 2005; Galvani, 2007).

Tuzlanma, topraktaki çözülmüş tuzların yüksek derişime ulaşması olarak tanımlanmaktadır. Topraktaki elektriksel iletkenlik (EC) 4 dS/m veya üzerinde ise böyle topraklar "tuzlu" olarak ifade edilir. Bu değer 0,2 MPa ozmotik basınç ve 40 mM NaCl olarak değerlendirilmektedir. Bu seviye birçok tarım ürününün verimini düşürebilecek niteliktedir. Doğal olarak tuzlu topraklarda yaşayan halofit bitkiler, glikofitlere göre kökler tarafından suyun alınması sırasında Na^+ ve Cl^- iyonlarını toprağa vermede daha etkin bir mekanizmaya sahiptirler (Munns ve Tester, 2008).

Yeryüzünde yayılış gösteren yaklaşık 4000 parazit angiosperm bitki türü, kendileri için gerekli olan su ve besin maddelerini diğer bitkilerden temin etmek zorundadırlar. Biyotik stres etmenleri arasında yer alan parazit bitkiler, bitki-bitki etkileşiminde önemli bir yere sahiptir. Parazitizm, 17 bitki familyası üzerinde etkili olan bir ilişki şeklidir. Parazit bitkiler iki grup altında incelenmektedir: (1) fotosentez yapabilme kabiliyeti olan yarı parazitler (hemiparazit) ve (2) canavar otu gibi tamamen klorofilden yoksun, bu yüzden de zorunlu olarak konukçusuna bağlı olan tam parazitler (holoparazit) (Thorogood ve ark., 2009).

Parazit bitki tohumları, konukçu veya konukçu olmayan bitkilerin köklerinden çıkan çimlenme uyarıcıları sayesinde çimlenirler. Bu etkileşim sırasında konukçu bitkinin parazit bitkiye karşı olan duyarlılık veya dayanıklılık seviyesi bu ilişkinin sürekliliğini belirler (Elzein ve Kroschel, 2003).

1.1. *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Bitkisi

Arabidopsis thaliana bitkisi, günümüzde bitki biyolojisi araştırmaları için model organizma olarak kullanılmaktadır. Genom sekansı tamamlandığından dolayı bu bitki, genom araştırmaları için diğer bitkilere kıyasla çok daha avantajlıdır. *Brassicaceae* familyasının bir üyesi olan *Arabidopsis* bitkisinin yetiştirilmesi kolay ve ucuz bir işlemdir. Seralarda, büyütme kabinlerinde, basit büyütme odalarında ya da yalnızca pencere kenarları veya dış ortamlarda saksı içlerinde kolayca yetiştirilebilmektedir. Bu bitkiler, aynı zamanda da tanımlanmış katı veya sıvı doku kültürü ortamlarında kolay, hızlı ve kontaminasyon olmaksızın da yetiştirilebilmektedirler. İlk olgun tohumu kısa bir sürede vererek yaşam döngüsünü altı hafta gibi kısa bir sürede tamamlamasından dolayı *A. thaliana* bitkisi, zirai bir öneme sahip olmamasına rağmen genetik ve moleküler biyoloji çalışmalarında kullanıldığında büyük kolaylık sağlamaktadır. 2000' li yıllarda yapılan çalışmalar sonucunda bu bitkiye ait genomun 114,5 Mb/125 Mb' lik dizisi saptanmıştır. Birçok mutant hatta sahip olan *Arabidopsis* bitkisinin akademik ve endüstriyel laboratuvarlarında en çok Landsberg erecta (Ler.), Columbia (Col.) ve Wassilewskija (Ws.) ekotipleri kullanılmaktadır (Weigel ve Glazebrook, 2002).

Tuz stresi altında, glikofit bir bitki olan *A. thaliana* bitkisinde büyümede baskılanma ve hasarlar meydana gelmektedir (Xiong ve Zhu, 2002).

1.2. Canavar Otu Parazit Bitkileri

Canavar otu bitkileri son yıllara kadar yapılan taksonomik çalışmalarda, çok açık olmamakla birlikte, yalnızca *Orobanch* genusu altında toplanmaktaydı. Dünya çapında yayılış gösteren bu bitkiler dört seksiyon altında bulunmaktadır. Bunlar sect. *Orobanch* (=sect. *Osproleon* Wallr.), sect. *Trionychon* Wallr. (Eski Dünya Canavar Otları), sect. *Gymnocaulis* Nutt. ve sect. *Myzorrhiza* (Philippi) Beck. (Yeni Dünya Canavar Otları) seksiyonlarıdır. Taksonomik karakter ve gelişen filogenetik analiz teknikleriyle *rbcL* ve *rps2* sekanslarının kullanılması, eski dünya canavar otu bitkilerinin *Orobanch* ve *Phelipanche* olarak iki genusta isimlendirilmesine neden olmuştur. Buna göre; *P. ramosa*

(L). Pomel ve *P. aegyptiaca* (Pers.) Pomel şeklinde düzenlenirken, *Orobancha crenata* Forsk., *O. cernua* Loefl., *O. cumana* Wallr., *O. minor* Smith ve *O. foetida* Poir. bitkilerinin isimlerinde herhangi bir değişim olmamıştır (Çizelge 2) (Joel, 2009).

Striga, *Alectra*, *Orobancha* ve *Phelipanche* gibi kök paraziti olan angiosperm bitkiler, konukçu bitkilerinde yıkıcı etki göstermektedirler. Tüm bu kök paraziti bitkilerin tohumları çimlenebilmek için kimyasal uyarıcılara ihtiyaç duyarlar. Bu uyarıcı kimyasallar, konukçu veya konukçu olmayan bitkiler tarafından salgılanarak toprağa bırakılmaktadır (Reizelman-Lucascen, 2003). *Orobancha* ve *Phelipanche* (canavar otu) cinsi parazit bitkiler, haustoryum (emeç) adı verilen çok hücreli özel organları vasıtasıyla dikotil konukçusundan kendisi için gerekli olan su ve besin maddelerini alırlar. Bu birliktelik sayesinde hormonlar, toksinler, mRNA ve genler gibi birçok madde iletim sisteminde rahatlıkla iki yönlü olarak hareket edebilmektedir (Pérez-de-Luque ve ark., 2007; Westwood ve ark., 2009). Emeç hücrelerinin konukçu dokusunun (ksilem ve/veya floem) içine girmesi (penetrasyon), konukçu endodermal hücreleri üzerindeki mekanik baskı ve hidrolitik enzimler sayesinde gerçekleşmektedir (Elzein ve Kroschel, 2003). Tam parazit olup yaprakları bulunmayan bu bitkiler, tamamıyla kendi konukçularına bağlı olarak yaşarlar. Fotosentetik olmayan tam parazit bitkilerde, fotosentezle ilgili olan genler ya inaktiftir ya da plastid genomlarından elimine olmuştur. Bu yüzden plastidler, kloroplastları oluşturamaz ve bitkiler ışığı asla fotosentez için kullanamazlar. Işık, çevresel sinyallerin fizyolojik ve morfolojik olarak düzenlenmesinde görev almaktadır. Işık sinyal sisteminin bazı kısımları, çimlenme veya çiçeklenme için de gerekli olabilmektedir. Bu konuların fotosentezle ilişkili olmamasına karşın bu konudaki araştırmalar devam etmektedir (Okazawa ve ark., 2005).

Dünyada yayılışı bulunan toplam 638 canavar otu türünün yaklaşık 100 tanesi tam parazit olarak bilinmektedir. Bunlardan yalnızca yedi tanesi tarım yapılan alanlarda ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Bunlar; *P. ramosa*, *P. aegyptiaca*, *O. cumana*, *O. cernua*, *O. crenata*, *O. minor* ve *O. foetida* bitkileridir. Belirtilen bu türler ve parazitik etki gösterdiği konukçuları Çizelge 2' de gösterilmektedir (Labrousse ve ark., 2001; Elzein ve Kroschel, 2003; Zhou ve ark., 2004; Fernández-Aparicio ve ark., 2009; Parker, 2009).

Çizelge 2. Ekonomik verim kayıplarına neden olan canavar otu türleri ve konukçu bitkileri (Labrousse ve ark., 2001; Elzein ve Kroschel, 2003; Zhou ve ark., 2004; Fernández-Aparicio ve ark., 2009; Parker, 2009)

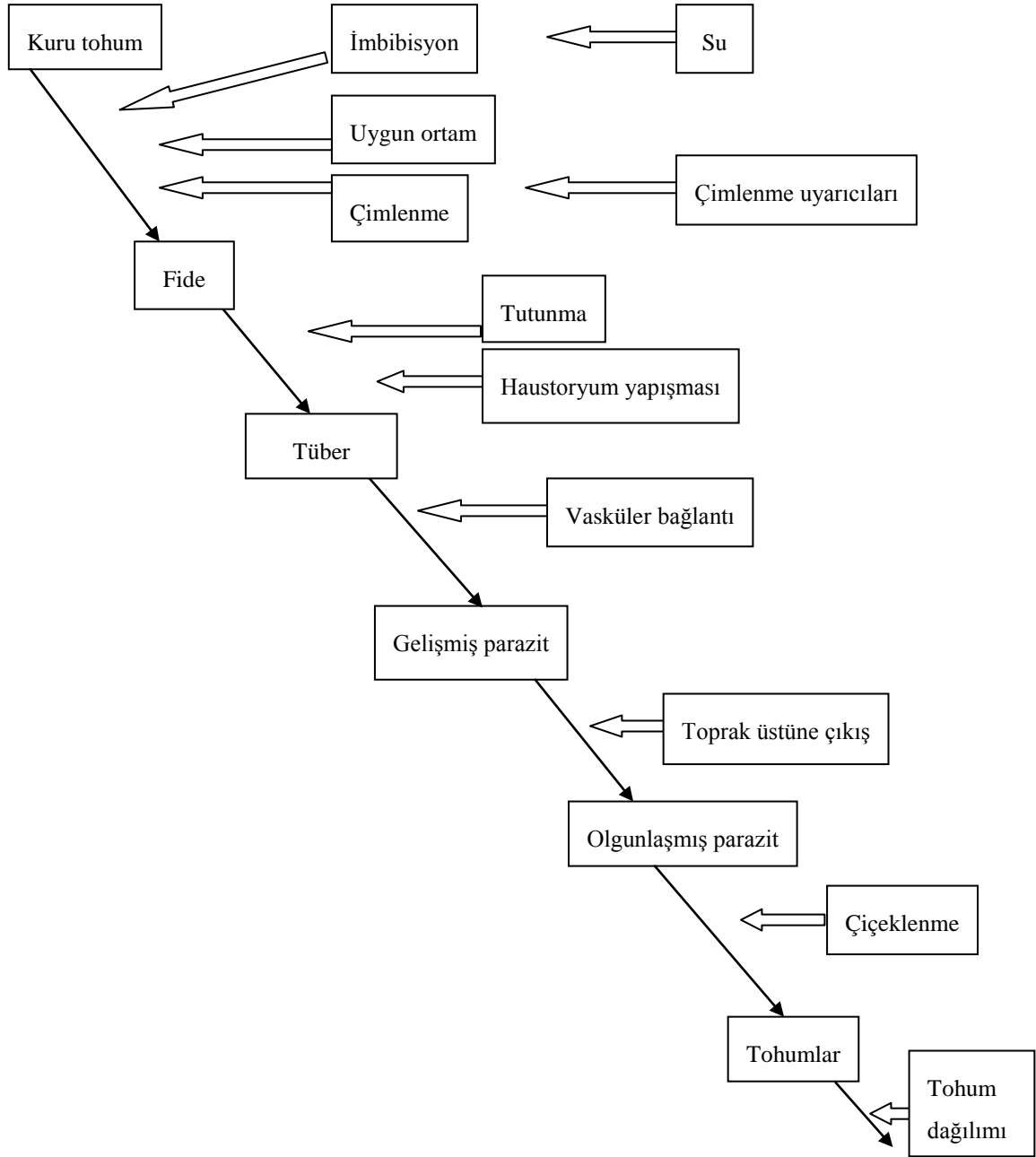
Canavar otu türü	Konukçu bitkiler
<i>O. crenata</i>	<i>Vicia faba</i> L. (bakla) <i>Pisum sativum</i> L. (bezelye) <i>Lens culinaris</i> Medik. (mercimek)
<i>P. ramosa/P. aegyptiaca</i> (<i>O. ramosa/O. aegyptiaca</i>)	<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. (domates) <i>Nicotiana tobacum</i> L. (tütün) <i>Cannabis sativa</i> L. (kenevir) <i>Solanum melongena</i> L. (patlıcan) <i>Solanum tuberosum</i> L. (patates) <i>Lens culinaris</i> Medik. <i>Brassica oleracea</i> L. (karnabahar) <i>B. juncea</i> (L.) Czern et. Cross (hardal) <i>B. napus</i> L. (kanola)
<i>O. cumana / O. cernua</i>	<i>Helianthus annuus</i> L. (ayçiçeği) <i>Nicotiana tabacum</i> L. <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.
<i>O. minor</i>	<i>Medicago sativa</i> L. (yonca) <i>Trifolium</i> spp. (üçgül) <i>Lotus corniculatus</i> L. (gazel boynuzu)
<i>O. foetida</i>	<i>Vicia faba</i> L. <i>Medicago sativa</i> L. <i>Lotus</i> sp.

Orobanchaceae familyasına ait kök parazitlerinin yaşamlarında 2 ana safha bulunmaktadır: *bağımsız safha* ve *parazitik safha*. Bağımsız safha, tohumların su alması, şişmesi ve çimlenmesiyle başlar ve konukçusunun köklerini bulup yapışmasına kadar devam eder. Bu yaşam safhası tohumlarda depo halinde bulunan yağlar sayesinde desteklenmektedir. Parazitik safhada ise, parazit tarafından konukçudan besinler alınır ve emeçler konukçu köklerini kısa bir sürede istila etmeye başlar. Sonunda da konuk ve konukçu iletim demetleri arasında köprü kurulmuş olur (Nun ve ark., 2003; Zehhar ve ark., 2003; Joel ve ark., 2007). Bu yapışma işlemi, hem mekanik hem de enzimatik ve/veya konukçu hücre duvarı tarafından salınan enzimler (selülaz, hemiselülazlar, pektin metilesteraz, peroksidaz ve proteazlar) sayesinde gerçekleşmektedir. Kurulan bu bağlantı

sayesinde parazit bitki büyümeye başlamaktadır. Belirtilen enzimler sayesinde konukçu hücre duvarı ve özellikle orta lamel kırılmalıdır. Böylelikle parazitin konukçu kökündeki ilerleyişi de kolaylaşmış olur (Veronesi ve ark., 2007). Yukarıda parazit bitkiler için belirtilen 2 safha beş ana safhada da (Şekil 1) özetlenebilir (Joel ve ark., 2007).

1. Safha: Canavar otunun konukçusuna yapışması (7-10 gün);
2. Safha: Tüber oluşumu (ilk haftadan sonra başlar);
3. Safha: Tüber üzerinden birçok kök benzeri yapıların oluşması (bir haftadan az);
4. Safha: Toprak altında gövdenin gelişmesi;
5. Safha: Konukçuya bağlı olarak değişen canavar otunun toprak üstüne çıkıp, çiçek açması ve kısa sürede tohum bağlaması olarak belirtilebilir.

Parazit bitkinin gelişim safhaları sonrasında konukçuda kuraklık stresine benzer etkiler ve solma gözlenir. Duyarlı türlerde bu etkileşim neticesinde yaprak klorozisi, fotosentezin indirgenmesi ve yavaşlamış gövde büyümesi görülür. Tüm bu olayların sonucu olarak konukçu bitkinin tohum veriminde azalma meydana gelir (Estabrook ve Yoder, 1993; Elzein ve Kroschel, 2003). Yalnızca bir bitki tarafından 100.000' den fazla tohum üretildiğinden bir sonraki yıl aynı tarlanın tekrar canavar otu etkisi altında kalması kaçınılmaz olmaktadır (Labrousse ve ark., 2001). Toprak altında çimlenme tetikleyicilerinin ulaşamadığı bölgede kalan parazit tohumları yaklaşık 15-20 yıl boyunca canlılıklarını koruyarak çimlenmeden kalabilmektedir. Parazit bitkilerin kontrol çalışmalarında karşılaşılan en büyük zorluk, tohumlarının toprak altında çimlenmeden uzun süre saklı kalması ve yüksek tohum sayısıdır. Tohumlar rüzgar, su, hayvanlar, tarım makineleri ve tarım ürünlerine yapışmış toprakla çevreye yayılmaktadır (Lu ve ark., 2000; Elzein ve Kroschel, 2003).



Şekil 1. Kök paraziti bitkilerin yaşam döngüsü (Joel ve ark., 2007).

P. ramosa bitkisi, tarım yapılan arazilerde yayılış gösteren, bitki veriminde azalmaya neden olan zorunlu bir kök parazitidir. Çanakkale yöresinde meçik otu veya kazık otu olarak bilinen bu parazitin kontrolü son derece zordur (Şekil 2). Tohumlarının boyutları yaklaşık 0.20 ile 0.35 mm çapındadır. Bu tohumlar plumula ve kotiledonlardan yoksun, kısa bir kökçükten oluşan indirgenmiş bir embriyoya sahiptir. Nemli ortamda tohumların su alıp şişmesi uygun sıcaklıkta meydana gelirse tohumlar çimlenme uyarıcılarına karşı yanıt oluşturabilirler. Bu ön hazırlık safhası “şartlandırma” olarak tanımlanır. Bu safha,

çimlenmenin gerçekleşebilmesi için gerekli olan karmaşık metabolik olayları ve her biri çok önemli olan büyüme aşamalarını içerir. Tohumların hazır konuma geldikleri aşamada solunum aşırı derecede artar ki bu artış ile gerçekleşen tüm metabolik değişimler çimlenmeye yardımcı olur. *P. ramosa* bitkisi konukçu bitki olarak tarlada tütün (*Nicotiana glauca* L.), domates (*Solanum lycopersicum* L.), patlıcan (*Solanum melongena* L.), kenevir (*Cannabis sativa* L.), kanola (*Brassica napus* L.) ve patates (*S. tuberosum* L.) bulunduğu çimlenir (Batchvarova ve ark., 1999; Joel ve ark., 2007; Parker, 2009; Rubiales ve ark., 2009;). *P. ramosa* bitkisi, Avrupa için en zararlı parazit türlerden birisidir ve benzer etki Avustralya ve Şili için de rapor edilmiştir. Bu bitki Fransa’ da kenevir, kanola, tütün ve domates bitkilerinde yüksek seviyede verim kayıplarına neden olmaktadır (El-Maarouf-Bouteau ve ark, 2008).



Şekil 2. Domates köküne tutunmuş *P. ramosa* (L.) Pomel parazit bitkisi (orijinal).

1.3. Parazit-Konukçu Arasındaki Sinyal İletimi

Parazit bitkilerin konukçuya penetrasyonu sırasında parazit bitki tohumlarının çimlenmesi, konukçuya tutunması ve diğer olaylar bugün için çok iyi bir şekilde bilinmesine karşın, parazit-konukçu arasındaki etkileşimin temeli halen tam olarak aydınlatılamamıştır (Bar-Nun ve ark., 2007).

Uygun çevre koşulları altında, canavar otu gibi kök parazitlerinin çimlenmesi konukçusunun köklerinden salınan kimyasal bileşiklere bağlıdır. Doğal yollarla konukçu köklerinden salınan birçok çimlenme uyarıcısı bulunmaktadır. Bu çimlenme uyarıcıları, seskiterpen laktonların içinde yer alan strigolaktonlardır. Bu grubun içinde strigol,

sorgolaktan, alektrol ve orobankol yer almaktadır. Bu uyarıcı moleküllerin yeni formları her geçen gün saptanmaya devam etmektedir (Hirsch ve ark., 2003; Joel ve ark., 2007). Çimlenme tetikleyicileri olarak bilinen bu kimyasalların 10^{-7} - 10^{-15} M gibi düşük derişimleri bile tohum çimlenmesini sağladığı bilinmektedir. Bu derişim aralığının altı veya üstü olduğunda ise, tohum çimlenmesi engellenebilir. Bu bileşikler, moleküler yapı olarak seskiterpen laktonlarla çok büyük benzerliğe sahiptirler. Bunların, kökteki izoprenoid metabolizmasının bir ürünü olduğu düşünölmektedir. Bu moleküllerin organik olarak nasıl sentezlendiğı bilinmesine rağmen biyosentez orijinleri henüz bilinmemektedir. Konukçu bitkide çimlenme uyarıcıları ile ilgili genler ve gerçekleşen biyokimyasal reaksiyonların aydınlatılmasıyla, parazit ve konukçusunun birlikte gerçekleşen evrimi hakkında birçok soru cevaplanabilir (Denev ve ark., 2007). Konukçu ve parazit bitki arasındaki etkileşimde etkili olduğu saptanan maddeler aşağıda belirtilmektedir.

*Sitokininler

*Bazı amino asitler

*Etilen

*Jasmonatlar

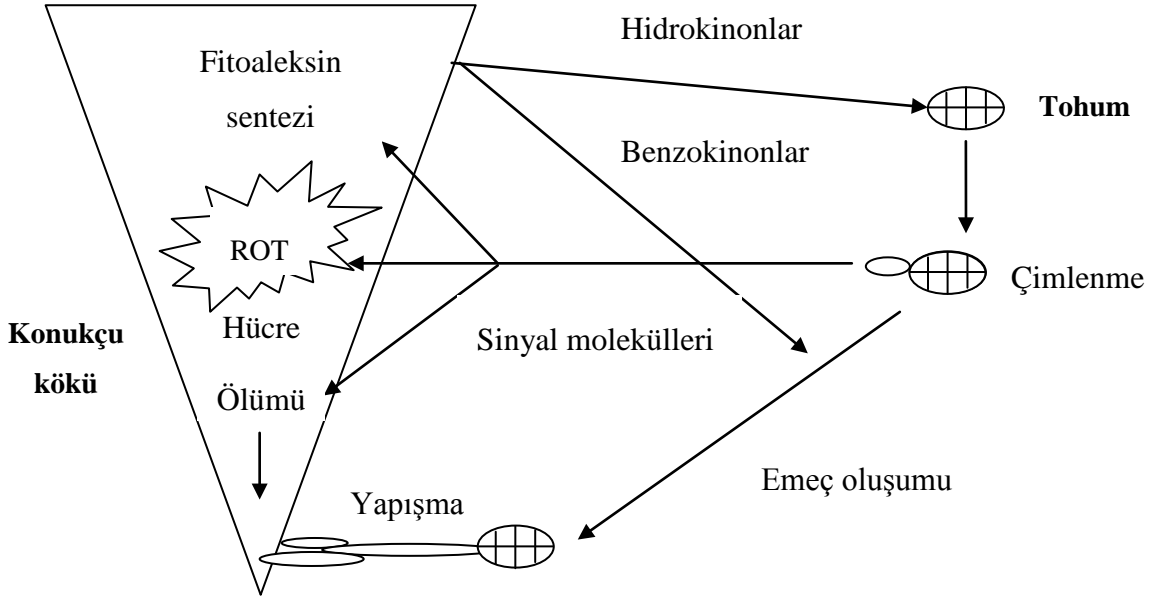
*Polioller (şeker lkolleri)

*GR24 (vb. sentetik olanlar)

Plastidlerde sentezlenen ve köklerden çevreye yayılan bu maddeler, yapraklarda çok yüksek miktarda üretilir. Köklerin de plastid içerdiği bilinmektedir. Kloroplastlar, izoprenoid hormon olan ABA (absisik asit) ve GA (giberellinler) gibi hormonların biyosentez merkezidir. Bu hormonlar bitkinin her bölgesine kloroplastlardan yayılırlar. Canavar otu gibi parazitlerin yaşam döngüsü tamamıyla konukçusunun üretmiş olduğu fotosentez ürünlerine bağlıdır. Yeşil ve etiyole *Arabidopsis* bitkileri çimlenme uyarıcıları bakımından kıyaslandığında, aynı yaştaki bitkilerde yeşil olanlara göre etiyole bitkilerin 1,5 kat daha az çimlenme uyarıcısı ürettiğı ortaya çıkmıştır. Buna göre etiyole bitkilerin yeşil olanlara kıyasla canavar otu bitkileri için daha az çekici olduğu ortaya konmuştur (Denev ve ark., 2007).

Bitki etkileşimi hakkında yapılan anatomik çalışmalarda, canavar otu-*Arabidopsis* arasındaki temas şekli ve plazmatik devamlılık açık bir şekilde ortaya konmuştur. İletim dokularının dağılımı ve konumu, indol-3-asetik asit (IAA) akışı sayesinde açıklanmıştır. Enfeksiyon sürecinde parazit ve konukçu arasındaki IAA akışının bir görevi olduğu düşünölmüne rağmen bu konuda bir çalışılma henüz yapılmamıştır (Bar-Nun ve ark., 2007).

Parazit bitkilerin yaşam döngüsündeki çimlenme ve konukçuya yapışma aşaması en kritik aşamadır. Bu aşama, seskiterpenler veya hidrokinon ve benzokinon moleküllerine bağlıdır. Bu moleküller sırasıyla, parazit bitkinin çimlenmesi ve emeç oluşmasından sorumludur. Konak bitkide parazit bitkiye karşı meydana gelen genel yanıtlar arasında PHÖ, oksidatif patlama, fitoaleksinin üretimi ve PR proteinleri gibi antimikrobiyal proteinlerin birikimi (Şekil 3) yer almaktadır (Yoder, 1999; El-Maarouf-Bouteau ve ark., 2008).



Şekil 3. Parazit tohumu ile konak arasında meydana gelen ilk farklılaşmalar (El-Maarouf-Bouteau ve ark., 2008).

Doğal koşullarda bitkilere biyotik ve abiyotik stres etmenlerinden birinin veya iki etmenin birlikte etkilediği durumlar mevcuttur. Biyotik stres etmenlerinin bitkiler üzerine etkilerinin yanında abiyotik stres etmenleri arasında tuz stresinin önemi ve etki alanı, değişen iklim koşulları, tarımsal alanlarda yapılan yanlış sulama işlemleri gibi birçok etkenden dolayı her geçen gün daha da artmaktadır.

1.4. Tuz Stresi

Fiziksel bir terim olarak stres, her hangi bir nesne ile belli bir birim alana uygulanan mekanik güç olarak tanımlanmaktadır. Uygulanan bu strese yanıt sırasında nesne boyutsal olarak değişime uğrar. Bu olay zorlanma olarak bilinir. Ancak biyolojik olarak bu terimin stresi tanımlaması zordur. Bir bitki için bir durum veya koşul onun için uygun olabilirken başka bir bitki için stres kaynağı olabilir. Bundan dolayı biyolojik bir stresin en yaygın

pratik tanımı şu şeklide yapılabilir: “Bitkilerin normal işlevlerini ve biyolojik bir sistemin olması gerektiği yapıyı baskılayan elverişsiz durumdur” (Mahajan ve Tuteja, 2005; Türkan 2008).

Çevresel streslere adaptasyon ve alışma; morfolojik, anatomik, hücrenel, biyokimyasal ve moleküler düzeyde olmak üzere, tüm organizasyon düzeylerinde ortaya çıkan, birbirine bağlı olaylar sonucu oluşur. Su kıtlığı, kök biyosferindeki tuzluluk ve yapraklardaki ısı stresi ile ilişkili bir sorundur. Bazı bitkiler birden fazla strese karşı tolerans göstermektedirler. Bir strese gösterilen tolerans diğer bir strese alışma sonucunda uyarılmaktadır. Bu olay, birden fazla strese karşı gösterilen direnç mekanizmasının ortak pek çok yönünün olduğunu göstermektedir. Su kıtlığı ve kuraklığa direnç birkaç tipte incelenir. Bunlar sırasıyla, kurumanın ertelenmesi, kurumaya karşı tolerans ve kuraklıktan kaçıştır (Türkan, 2008).

Kısa süreli su kıtlığı, başkaca herhangi bir baskının olduğu bölgelere göre, özellikle kurak alanlarda bitkinin büyümesi ve verimini çok daha fazla sınırlamaktadır. Kurak bölgelerde doğal ve zirai olarak yetişen bitki toplulukları üzerine düşük yağış ve yüksek buharlaşma ile ortaya çıkan kuraklık çok büyük sorun olabilmektedir. Herhangi bir seviyede meydana gelecek kısa süreli kuraklık, ürün veriminde büyük bir azalmaya neden olabilir. Su alınımında ister kısa süreli isterse uzun süreli meydana gelen bir azalma, bitkilerde morfolojik ve fizyolojik birçok işlevde etkiye sebep olur. Su ilişkilerinde meydana gelen karakteristik farklılıklar, türler ve hatlar arasındaki farkları yansıtmaktadır. Bu da kuraklık toleransının veya dayanıklılığının bir göstergesidir. Özellikle ozmotik ayarlama (kuraklığa yanıtta ozmotik potansiyelin aktif olarak düşürülmesi) kuraklık dayanıklılığına karşı önemli bir düzenleyici mekanizmadır (Iqbal ve ark., 2008).

Tuzluluk, özellikle kurak ve yarı kurak bölgelerde yeraltı suyuna karışan çözünbilir tuzların yüksek taban suyuyla birlikte kapillarite yoluyla toprak yüzeyine çıkması ve buharlaşma sonucu suyun uçmasıyla toprak yüzeyinde birikmesi olarak tanımlanmaktadır. Doğal yollarla meydana gelen tuzlanma olayı, tarım alanlarındaki sulama sonucunda da medyana gelmektedir (Galvani, 2007). NaCl ve MgSO₄ toprakta en fazla bulunan tuzlardır. Bu tuzlar çözünabilir oldukları için toprak profilinde suyun hareketiyle kolayca taşınabilirler. Bu taşınım kurak ve yarı kurak alanlarda biraz daha zordur. Çünkü bu alanlardaki yağış, tuzları yaklaşık olarak bir metre derinliğe kadar taşıyabilir (Cullen, 2003).

Tuz stresi, bitki üretimi için çok önemli bir sınırlayıcı etkidir. Toprakta oluşan tuzluluğa karşı çeltik, mısır, soya fasulyesi ve fasulye gibi glikofit bitkiler çok duyarlıdır (Mahajan ve Tuteja, 2005). Tuzluluğun, bitki gelişimi üzerine doğrudan ve dolaylı olmak üzere iki şekilde etkisi vardır:

(1) Doğrudan etki; toprak çözeltisinin yoğunluğunu arttırarak bitki gelişimine zararlı etki yapan iyonların bitkinin kök alanına yığılması,

(2) Dolaylı etki; toprağın fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerinin bozulmasına neden olarak bitkinin normal gelişimini engellemesidir.

Tuzlu koşullarda tuz çeşidi ne olursa olsun genellikle çimlenme baskılanır, büyüme yavaşlar, verim azalır ve bazı hallerde bitki hayat devresini tamamlayamadan ölür (Giba, 1998).

Yüksek tuz içeren topraklarda yetişen bitkiler, genellikle bodur ve bu bitkilerin yaprakları mavimsi ve donuk renklidir. Hücre bölünmesi ve uzamasının yavaşlamasıyla bitkinin gelişim hızı azalır, yaprak alanının artış hızı yavaşlar ve bitki normal büyüklüğe ulaşamaz. Fotosentezin yavaşlaması, büyüme bölgelerindeki büyüme etmenlerinin etki alanlarını, yaprak alanını ve yaprak genişleme oranını sınırlamaktadır. Bu sınırlamaya, stomaların kapanması ya da fotosentetik yapılar üzerine tuzun doğrudan etkisi neden olmaktadır. Düşük su potansiyelindeki yaprak hücrelerinde turgor basıncı düştüğü için stomalar kapanır ve transpirasyon (terleme) azaltılmış olur. Hücrede, ABA birikimi artar. Yaprak alanının küçülmesi, su eksikliğine verilen erken bir cevaptır. Bitkideki su miktarı azaldığı için hücreler daralır ve hücre duvarları gevşer. Böylece karbon ve enerji tüketimi azalır. Yaşlı yaprakların erken dökülerek transpirasyon yüzeyini azaltmaları da su kaybını önlemek için başka bir yoldur (Taflıoğlu, 2002).

Bitkilerde tohum çimlenmesini etkileyen önemli etmenlerden biri olan tuzluluk, dünyada olduğu gibi ülkemizde de sulu tarım yapılan alanlarda düşük yağışla birlikte en önemli sorundur. Tuzluluk ve ozmotik stresler hem çimlenmenin engellenmesinden hem de geciktirilmesinden sorumludurlar. Bu koşullar altında çimlenme sırasında suyun alınımında bir azalma oluşur. Ayrıca, tuz stresi aşırı iyon alınımına da sebep olabilir (Kaya ve ark., 2006).

Bitkiler, büyüme ve gelişmeleri için mineral maddelere ihtiyaç duyarlar. Ancak toprakta aşırı seviyede bulunan çözünebilir tuzlar bitkilerin çoğu için zararlıdır. Dünya

çapında bitki büyümesini sınırlayacak dozda toksik tuz yoğunluğunun bulunmamasına rağmen ekilebilen alanların en az % 20' sinin tuzlanma etkisi altında olduğu ve sulama yapılan alanlarda bu oranın % 50 seviyesinde olduğu tahmin edilmektedir (Xiong ve Zhu, 2002; Yokoi ve ark., 2002).

Tuz stresi ile ilgili çalışmalar genellikle dört kategoride yer almaktadır.

a. Tuz toksisitesi ve tuz toleransının fizyolojisi: Bu konudaki çalışmalar, tuza karşı hücrel metabolik yanıtları ve tüm bitki yanıtlarını içerir.

b. Bitkilerde hücre zarları boyunca veya daha uzun mesafelerde tuz taşınım mekanizması: Bu alandaki çalışmalar, tuzun emilimi, çekilmesi, ayrılması ve uzun mesafelerdeki taşınımının kontrolünde yer alan çeşitli iyon taşıyıcılarının fizyolojik ve moleküler tanımlanmasını içerir.

c. Tuz stresiyle düzenlenen genlerin ifadelerinin araştırılması.

d. Tuz toleransı belirleyicileri ve tuz stres sinyalleşmesinin mutasyon uygulamalı analizi (Xiong ve Zhu, 2002).

Hücre apoplastlarındaki yüksek tuz derişimi, bitkilerin hayatta kalmasında, büyümesinde ve gelişiminde primer ve sekonder etkilere neden olmaktadır. Primer etkiler, iyonik toksisite ve dengesizlik ile yüksek ozmolitedir. Na^+ ve Cl^- iyonları, sitozolik ve organel işlevleri için baskılayıcı bir özelliğe sahiptir. Tuz konsantrasyonu 0,4 M seviyesinin üzerine çıktığında birçok enzimin çalışması, protein yapısının kararlılığı için gerekli olan hidrofobik-elektrostatik dengede meydana gelen kararsızlıktan dolayı baskılanır. Na^+ konsantrasyonunun 0,1 M olması bile sitotoksik bir seviye olup özel biyokimyasal ve fizyolojik süreçleri doğrudan etkileyebilmektedir. Tuzun yüksek derişimi, su potansiyelinin düşürülmesiyle oluşan turgor kaybı sonucunda hücre genişlemesinin baskılanmasına bağlı olarak hücrede yüksek ozmotik şok etkisine yol açar. Hücrel su kaybını, yeterli seviyedeki negatif apoplastik su potansiyelinin uyardığı kuruma yönetir. NaCl stresinin en önemli sekonder etkileri şunlardır: K^+ eldesinin dağılımının bozulması, membran fonksiyonlarının bozulması, fotosentezin ve diğer biyokimyasal süreçlerin zayıflaması, ROT' nin oluşumu ve PHÖ' dür. K^+ , bitkiler için gerekli bir elementtir. Özellikle çevresel madde derişimi besinlerden daha yüksek seviyede olduğunda Na^+ , K^+ ile hücre içine alım sırasında bir rekabete girer. Ca^{+2} iyonu ise Na^+ iyonunun toksik etkisini

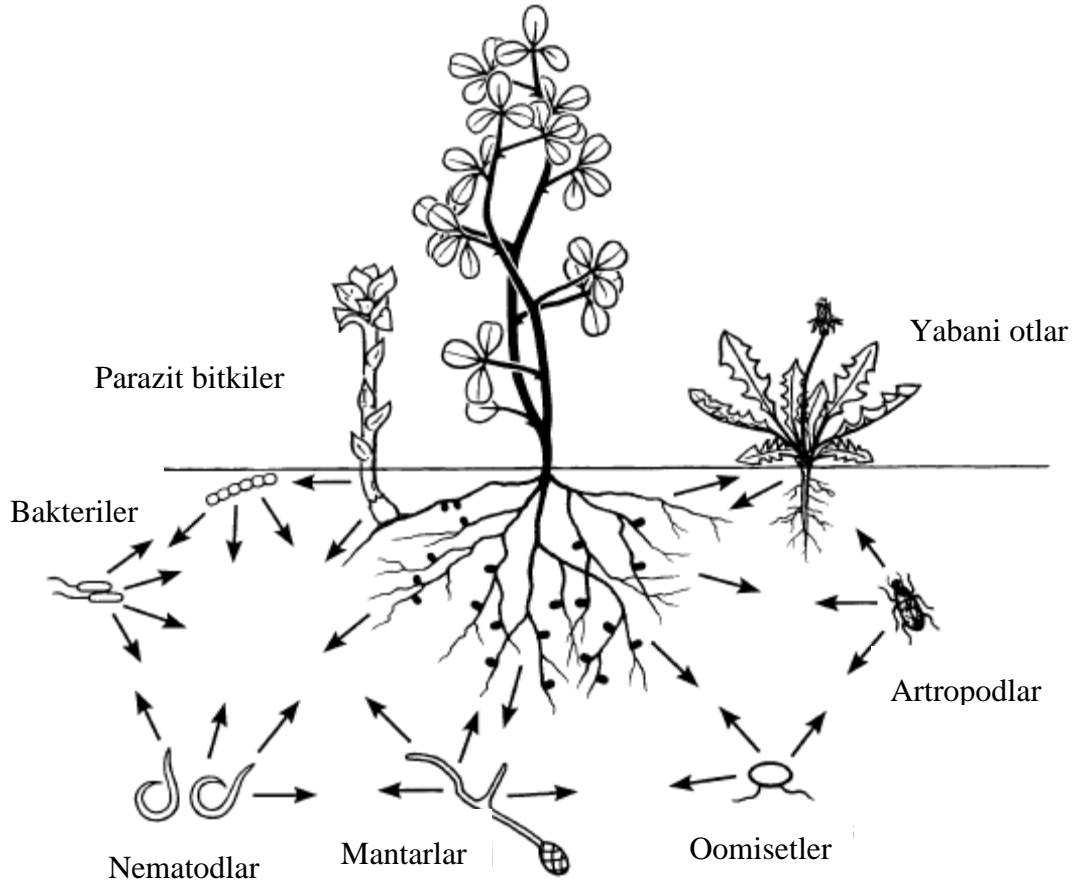
farklı mekanizmalarla hafifletmektedir. Bunlar arasında K^+/Na^+ seçici birikiminin kontrolü ve diğer açıklanmış mekanizmalar yer alır (Botella ve ark., 2005).

1.5. Bitki Savunma Sistemi

Bitkiler yaşamları boyunca elverişsiz koşullara karşı hücrel metabolizmalarını adapte edebilmek için karmaşık sinyal mekanizmaları geliştirmişlerdir. Bitkiler çevresel biyotik ve abiyotik streslerin tüm şekillerine yanıt oluşturmak ve hayatta kalabilmek için bu zararlı koşullardan kendilerini korumak zorundadırlar.

Dış kaynaklı bu uyarıcılar, hücre zarında bulunan algılayıcılar tarafından alınarak sinyal iletim yoluyla hücre içerisindeki gerekli yerlere iletilirler. Alınan bu sinyallere karşı bitkide bir tepki oluşur. Tepkinin oluşmasında etkili olan bu elisitörlerin genel bir kimyasal yapısı bulunmamaktadır. Bu moleküller oligosakkarit, lipit, protein ve peptid olabilirler. Elisitör moleküller iki grupta toplanabilirler: genel elisitörler ve ırka özel elisitörler. Genel elisitör moleküller hem konukçu hem de konukçu olmayan bitkilerin savunma sistemini uyarırken ırka özel elisitörler ise yalnızca özel konukçu çeşitlerinde hastalık dayanıklılığında işleve sahip savunma yanıtlarının uyarılmasında görevlidirler. Söz konusu durum konukçu-patojen ilişkileri açısından incelendiğinde, patojenlerin *avr* genlerinin ürünleri konukçunun *R* geninin proteini tarafından tanınmaktadır. Bu *R* genleri, fosforilasyon yoluyla diğer genleri harekete geçirerek bitkideki tepki ve savunma mekanizmasını aktif hale geçirir (Tör, 1996; Montesano ve ark., 2003).

Konukçu bitki ile toprakta bulunan mutailistik veya parazitik olarak yaşayan prokaryotik veya ökaryotik organizmalar arasında sinyal iletişimi karmaşık bir şekilde gerçekleşmektedir (Hirsch ve ark., 2003). Bu etkileşimin ne şekilde olduğu Şekil 4' te anlatılmaya çalışılmıştır.



Şekil 4. Bitkilerin kök çevresinde etkileşim içinde buldukları organizmalar (Hirsch ve ark., 2003).

Parazit ve patojen terimleri çoğu zaman yanlış anlamlarda kullanılmaktadır. Bir organizmanın başarılı bir parazit olabilmesi için konukçuda yaşayabilmesi ve orada çoğalabilmesi gerekir. Bunun yanında hastalık oluşturması gerekmez. Bu parazit konukçuya zarar verir ve hastalık meydana getirirse o zaman patojen olarak adlandırılır (Gündüz ve ark., 2008).

Doğal koşullarda mantar, bakteri ve böcekler bitkiler üzerinde parazit olarak yaşar. Bu birliktelik konukçu bitki ile parazit arasında ortaklaşa bir evrimin gerçekleşmesine olanak sağlamıştır. Bu olay birlikte evrimleşme olarak tanımlanmaktadır. Bu etkileşim sırasında konukçu ile patojen genleri arasında bir özelleşme olur. Patojenin bitkiye zarar verdiği durumlarda zarar gören genotiplerin sayısı zaman içinde azalır. Ancak bitki topluluğu içinde bu patojene karşı dayanıklılık geni (*R*) taşıyanların sayısında bir artış olur. Bu genotip doğada baskın duruma geçer. Böylelikle patojen baskı altına girer, saldırgan

gen taşımayan patojenin populasyon yoğunluğu azalır. Ancak patojen populasyonunda virulans gen taşıyanlar bitkilerde hastalık oluşmasına neden olur. Bu kez doğada hastalığa yakalanan genotiplerin sayısı azalır. Eğer bitki populasyonunda bu yeni patotipe karşı dayanıklı bitkiler bulunursa bunların yoğunluğu artmaya başlar. Bu olay sürekli tekrarlanır ve hem bitkide hem de patojende karşılıklı yeni genler oluşur. Patojende oluşan genlere virulans veya avirulans, bitkide oluşan genlere de dayanıklılık veya duyarlılık genleri denir (Odjakova ve Hadjiivanova, 2001).

Bitki ve patojen birlikteliği sırasında patojenin normal yaşamını devam ettirdiği durumda konukçu bitki hassas, patojen virulent ve konukçu ile patojen arasındaki ilişki de uyumlu olarak adlandırılır. Buna karşılık patojen, bitkide herhangi bir zarar meydana getirmiyor, kendi yaşamını devam ettiriyor ve bitkiyi istila ederek çoğalmasını sürdürüyorsa bu bitki o patojene karşı toleranslıdır denir. Ancak, bitki bu patojenin gelişme ve çoğalmasını çeşitli nedenlerle tamamıyla durduruyor ise bitki dayanıklı ve patojen de avirulent olarak adlandırılmaktadır. Dayanıklı bitki ile patojen arasındaki ilişki de uyumsuz olarak kabul edilir. Burada anlatılan ilişkiler Çizelge 3' te anlatılmaktadır (Tör, 1998; Gündüz ve ark., 2008).

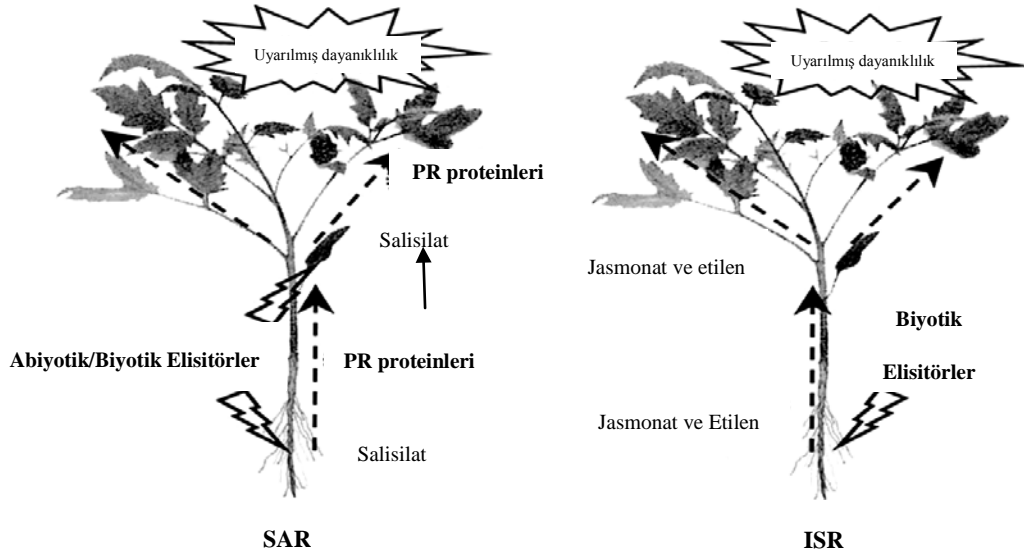
Çizelge 3. Bitki-Patojen ilişki durumları (Tör, 1998)

Patojen	Konukçu		Konukçu Olmayan Dayanıklı
	Dayanıklı	Hassas	
Avirulent	Uyumsuz (Hastalanmaz)	Uyumlu (Hastalanır)	Uyumsuz (Hastalanmaz)
Virulent	Uyumlu (Hastalanır)	Uyumlu (Hastalanır)	Uyumsuz (Hastalanmaz)

Bitki patojen arasındaki tanıma olayı, konukçu hücresi ile patojen arasındaki moleküler temas sayesinde ortaya çıkan ve bitkide belirli bir kimyasal ve/veya morfolojik tepkiye yol açan bilgi iletişimi olarak tarif edilmektedir. Bitkinin patojenden korunmak için mevcut biyokimyasal ve yapısal savunmalarını harekete geçirmesi için, bitki tarafından

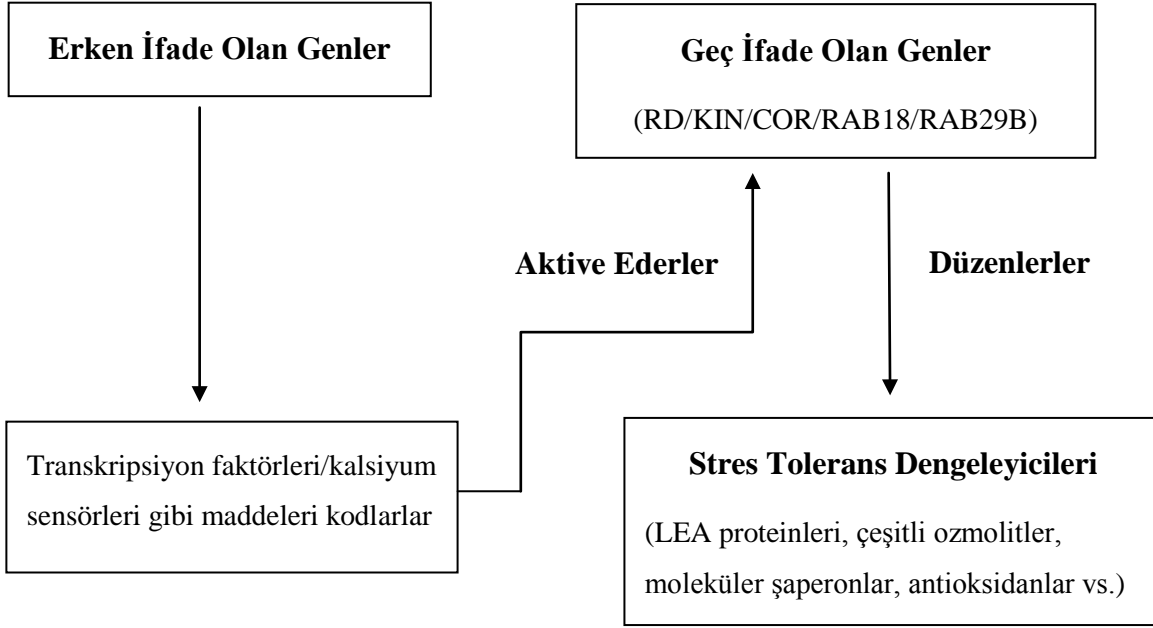
patojenin ilk tanındığı basamak çok önemlidir. Konukçu-patojen ilişkisinde ilk basamak, patojen ile konukçu bitki arasında fiziksel bir temasın kurulmasıdır. Moleküler temas, mikroorganizmaların dış yüzeyinde bulunan ve çoğunlukla glikoprotein karakterinde olan elisitörler ile bitki hücresi dış yüzeyinde bulunan ve elisitörleri bağlama yeteneğinde olan proteinler (lektinler) arasında olmaktadır. Bu temas bitkinin toprak üstü organlarında olduğu gibi, bitkinin toprak altında kalan kısımlarında da olabilir (Montesano ve ark., 2003).

HR yanıtlar, enfeksiyonun olduğu bölgede uyarılmış dayanıklılık olarak bilinen savunma sistemini tetiklemektedir. Uyarılmış dayanıklılığın iki şekli bulunmaktadır: SAR ve ISR. (Vallad ve Goodman, 2004). SAR ve ISR' nin bitki yapısında çalıştığı yol Şekil 4' te karşılaştırılmalı olarak gösterilmektedir.



Şekil 5. Bitkilerde uyarılmış dayanıklılık: SAR ve ISR yolları (Vallad ve Goodman, 2004).

Stres yanıtı sırasında uyarılmış olan birçok gen, erken ve geç yanıt geni olarak sınıflandırılmaktadır. Erken ifade olan genler, stres başlangıcından birkaç dakika sonra uyarılır ve çok kısa bir sürede ifade olurken birçok gen ise saatler sürebilen çok daha geç bir sürede aktive olur. Erken ifade olan genler, geç ifade olan ana stres yanıt genleri için gerekli olan düzenleyici proteinleri kodlamaktadırlar. Erken ve geç ifade olan genlerin ifade yolları Şekil 6' da gösterilmektedir.

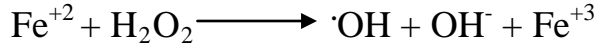
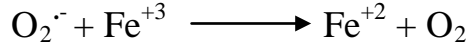


Şekil 6. Abiyotik stres koşullarına yanıtta erken ve geç ifade olan genlerin ifade akışı (Mahajan ve Tuteja, 2005).

Oksijen eksikliği veya anoksik koşullar, bitkilerin yaşamları boyunca karşılaştıkları en genel çevresel sorundur. Oksijen eksikliği durumunda meydana gelen hücresel ve fizyolojik değişimler şu şekilde sıralanabilir: Zar işlevlerinde düzensizlik, redoks dengesinde değişim, sitoplazmik Ca^{+2} konsantrasyonunda artış, anaerobik fermantasyon, sitoplazmik asitlenme ve adenilasyon enerji yükünde azalma (Blokina ve ark., 2003).

Moleküler oksijen, reaktif olmayan bir moleküldür. Ancak yaşamları süresince oksijene gereksinim duyan bitkilerde, oksijenin suya indirgenmesi sırasında bir yandan enerji sağlanırken diğer yandan karmaşık zarar ortaya çıkmaktadır. Tamamlanmamış bir indirgenme, ROT oluşumuna neden olmaktadır. Moleküler oksijenin dört aşamalı indirgenmesi sırasında oluşan kısa ömürlü ROT, DNA, protein ve lipit gibi birçok biyolojik moleküle reaksiyona girerek onların kararlı yapılarını bozmaktadır. Oksijen indirgenmesinin ilk aşamasında hidroperoksil (HO_2^-) ve süperoksit radikali (O_2^-) (2-4 μs) oluşur. O_2^- , histidin, metiyonin ve triptofan gibi amino asitleri oksidize eder. Ayrıca bu radikal, hücrede lipit peroksidasyonuna da neden olur. Oksijenin ikinci indirgenme aşaması sırasında, üretildiği bölgeden daha uzak mesafelere difüze olabilen uzun ömürlü (1 ms) H_2O_2 oluşur. Bu reaktif, amino asitlerin sülfidril (SH) gruplarının oksidasyonu aracılığıyla biyolojik toksisiteye neden olur. Bu radikalın miktarı, Fenton veya Haber-Weiss reaksiyonları sırasında bakır (Cu^+) ve demir (Fe^{+2}) gibi metal katalizörler varlığında artar

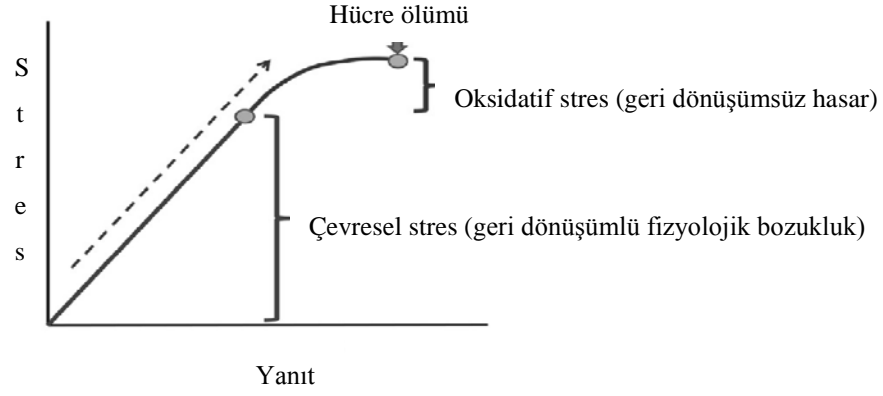
(Şekil 7). Bu reaksiyon serisinin son aşamasında, biyolojik moleküllere karşı yüksek bir ilgi ve çok kuvvetli bir toksik potansiye sahip, 1 μ s' den daha az bir yarılanma ömrü olan hidroksil radikali (OH \cdot) oluşur (Dat ve ark., 2000).



Şekil 7. Fenton veya Haiber-Weiss reaksiyonu (Dat ve ark., 2000; Vreeburg ve Fry, 2005).

Hücre içerisinde ROT olarak adlandırılan O $_2^{\cdot-}$, $^1\text{O}_2$, H $_2\text{O}_2$ ve OH $^-$ gibi moleküllerinin derişimi arttıkça oksidatif stres uyarılır. Bu moleküller oksijenli-hücrel süreçler (mitokondri veya kloroplastta elektron taşınımı veya ışık solunumu sırasında) sonucunda oluşmaktadır (Botella ve ark., 2005). Bu moleküller hücrel yapıyı bozduğu gibi biyotik ve abiyotik stres koşullarında erken sinyal molekülü olarak da işlevsel olabilmektedirler. H $_2\text{O}_2$ ve O $_2^{\cdot-}$, bitki patojen etkileşimleri sırasında HR yanıtların oluşumunda önemli bir göreve sahiptirler. Patojen saldırılarına karşı dayanıklılıkta Cu/Zn SOD izoziminin, HR yanıtın tetiklenmesinde anahtar enzim olarak görev aldığı ileri sürülmektedir (Herbette ve ark., 2003).

Bitki dokuları üzerine etki eden birçok çevresel stres, oksijen metabolizmasında değişime neden olur. ROT' i hızlı bir şekilde temizlenemediği durumlarda meydana gelen oksidatif stres, hasar gören hücre yapılarının tamir hızının hasar hızıyla olan uyumun bozulmasıdır. Eğer bu durum devam ederse, geri dönüşümsüz hasar fizyolojik yeteneğin kaybına ve er geç meydana gelecek olan hücre ölümüne neden olur. Ancak, çevresel streslerin ayarlanmasının sonucu olarak yapraklarda meydana gelen ROT, aynı zamanda sistemik ve bölgesel sinyalleşme görevine de sahiptir. Bu gibi durumlarda ROT' nin üretimi, bitkiyi koruyan fakat oksidatif stresle sonuçlanmayan savunma sistemini de uymaktadır (Şekil 8). ROT oluşumunun artışı oksidatif stresin oluşumundan çok kısa bir süre önceye kadar geri dönüşümlüdür. Daha sonrasında ise hücre ölümü gerçekleşir (Mullineaux ve Baker, 2010).



Şekil 8. Çevresel streslere karşı verilen yanıtta ROT' nin oluşumu, oksidatif stres ve hücre ölümü arasındaki ilişkinin modellenmesi (Mullineaux ve Baker, 2010).

Bitkiler, büyüme ve gelişimlerinin yeniden düzenlenmesi ve hayatta kalabilmek için oksidatif stres düzeyini hafifletmek zorundadırlar. Bitki hücrelerinde, stres veya normal fizyolojik süreçler sırasında oluşan ROT' nin seviyesinin kontrolünü sağlayan ve lipit peroksidasyonu ürünlerini detoksifiye eden enzimler (Çizelge 4) ile düşük moleküler kütleli antioksidanlar bulunmaktadır. Bu sistemde görevli olan enzimlere SOD, CAT, POX, GPx, GST, fosfolipit-hidroperoksit glutasyon peroksidaz ve APX; düşük moleküllü antioksidanlara ise askorbat, glutasyon, fenolik bileşikler ve tokoferoller örnek verilebilir. Burada sayılan enzimlerin tamamı antioksidanların (MDAR, DHAR ve GR) aktif formlarının yeniden düzenlenmesi için gereklidir (Blokhina ve ark., 2003).

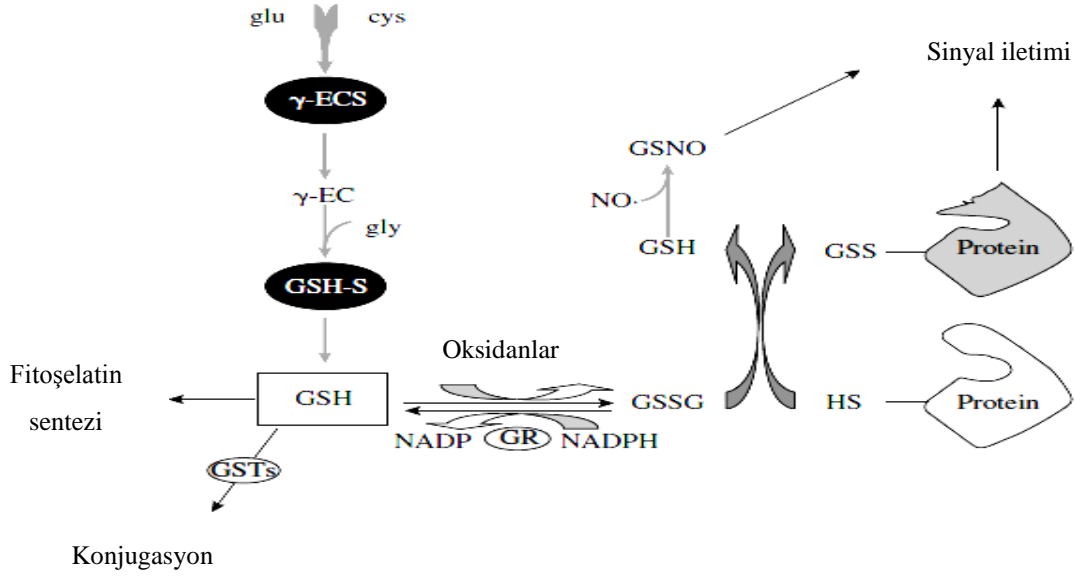
Bitki dokularında yoğun bir şekilde bulunan tripeptit (gly-cys-glu) glutasyon, hemen hemen tüm hücre organelinde (sitozol, endoplazmik retikulum, vakuol ve mitokondri) bulunmaktadır. İndirgenmiş glutasyon (GSH), bu organelerde çok sayıda işleve sahiptir. Primer kükürt metabolizmasının bir ürünü olan GSH, taşıyıcı olarak işlev gördüğü gibi kükürt elementinin de ana depo şeklidir. Sisteinle (cys) birlikte sülfat alımı ve özümlemesini düzenleyen sinyallerin birikiminin bir kısmını oluşturur. Aynı zamanda fitoşelatin sentezi için substrat olarak işlev görür. Bu şekilde kadmiyum ve nikel gibi ağır metallerin detoksifikasyonunda görevlidir. Glutasyon ile oksidize glutasyon (GSSG) hücrel organellerin redoks dengesinin korunmasında beraber çalışmaktadır. GSH: GSSG arasındaki oran GR enzimi tarafından ayarlanmaktadır. Bu enzim GSSG molekülünü 2 adet GSH molekülüne indirgemek için NADPH' ı kullanmaktadır. Merkezi nükleofilik sistein kalıntısı, GSH' un yüksek indirgeyici potansiyelinden sorumludur. Bu molekül, sitotoksik H₂O₂ molekülünü süpürür ve diğer ROT (¹O₂, hidroksil radikali ve süperoksit

radikali) ile enzimik olmayan yollarla reaksiyona girer (Şekil 9). GSH' un antioksidatif savunma sistemindeki ana görevi, askorbat-glutatyon döngüsü yoluyla diğer kuvvetli suda çözünen antioksidan olan AA oluşturmaktır (Vanacker ve ark., 1998; Blokhina ve ark., 2003; Foyer ve ark., 2005).

Çizelge 4. Antioksidan enzimler ve detoksifikasyon reaksiyonları (Blokhina ve ark., 2003)

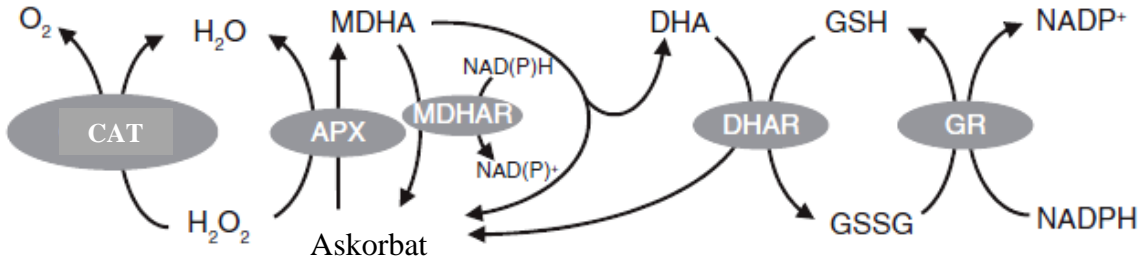
Enzim	E.C. numarası	Katalizlediği reaksiyon
Süperoksit dismutaz	1.15.1.1	$O_2^{\cdot-} + O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightleftharpoons 2H_2O_2 + O_2$
Katalaz	1.11.1.6	$2H_2O_2 \rightleftharpoons 2H_2O + O_2$
Glutatyon peroksidaz	1.11.1.12	$2GSH + PUFA-OOH \rightleftharpoons GSSG + PUFA + 2H_2O$
Glutatyon S-transferaz	2.5.1.18	$RX + GSH \rightleftharpoons HX + R-S-GSH^*$
Fosfolipit-hidroperoksit glutatyon peroksidaz	1.11.1.9	$2GSH + PUFA-OOH(H_2O_2) \rightleftharpoons GSSG + 2H_2O^{**}$
Askorbat peroksidaz	1.11.1.11	$AA + H_2O_2 \rightleftharpoons DHA + 2H_2O$
Guaiacol tip peroksidaz	1.11.1.7	$Verici + H_2O_2 \rightleftharpoons oksidize\ verici + 2H_2O^{***}$
Monodehidroaskorbat redüktaz	1.6.5.4	$NADH + 2MDHA \rightleftharpoons NAD^+ + 2AA$
Dehidroaskorbat redüktaz	1.8.5.1	$2GSH + DHA \rightleftharpoons GSSG + AA$
Glutatyon redüktaz	1.6.4.2	$NADPH + GSSG \rightleftharpoons NADP^+ + 2GSH$

*R molekülü alifatik, aromatik veya heterosiklik; X ise sülfat, nitrit veya halid grubu olabilir. ** H₂O₂ ile reaksiyon yavaş gerçekleşir. *** AA: Askorbik asit.



Şekil 9. Bitkilerde glutatyon metabolizması (Foyer ve ark., 2005).

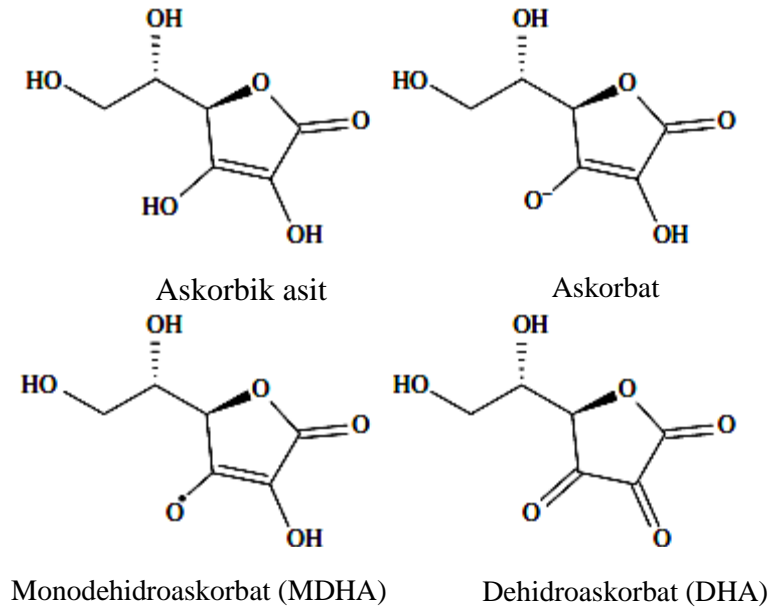
Bitki yapraklarında meydana gelen fungal enfeksiyon, askorbat-glutatyon döngüsünün farklı basamaklarını (Şekil 10) ve antioksidan savunma sistemini uyarmaktadır. HR, hüresel yapıyı maksimum seviyede koruyabilmek için glutatyon-S-transferazlar (GST) ve glutatyon peroksidazlara (GPx) ilave olarak spesifik SOD ve CAT genlerinin transkripsiyonunu artırır (Vanacker ve ark., 1998; Foyer ve Noctor, 2009).



Şekil 10. Askorbat-Glutatyon döngüsü (Foyer ve Noctor, 2009).

Kuvvetli bir antioksidan madde olan askorbik asit (vitamin C), kuru tohumlar hariç bitki hücre tiplerinin çoğunda, organellerde ve apoplastta bulunmaktadır. Yapraklarda glutatyonundan 5-10 kat daha fazla bulunan askorbik asit, küçük molekül bir yapıya sahiptir (Şekil 11). Normal fizyolojik koşullarda askorbik asit yaprak ve kloroplastlarda çoğunlukla indirgenmiş halde bulunur (Smirnoff, 2005). Kloroplast stromasında 20-300 mM, sitosolde ise 20 mM derişimde bulunur. Bu molekül doğrudan, O₂, OH⁻ ve ¹O₂' i

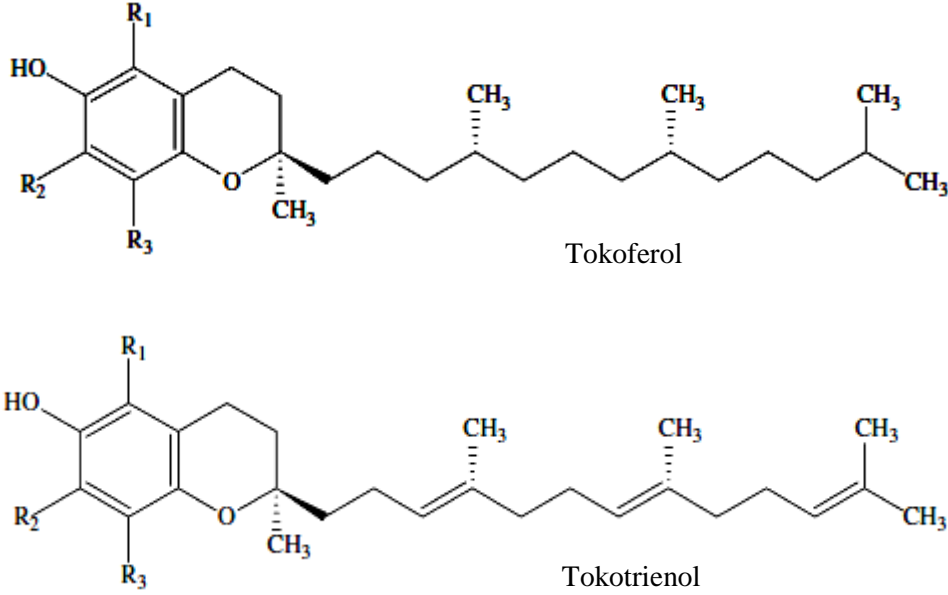
temizlerken H_2O_2 ' i suya askorbat-peroksidaz reaksiyonu ile indirger. Kloroplastlarda viyoloksantin de-epoksidazın kofaktörü olarak işlev görür. Hücre zarının korunması amacıyla tokoferoksil radikalinden tokoferol oluşumunu sağlar. Bu işlevlerinin dışında hücrede antioksidatif olmayan birçok işlevde yer alır. Bunlar arasında hücre bölünmesini, hücre döngüsünde G_1 fazından S fazına geçişi ve hücre uzamasını düzenleme işlevi bulunur (Blokhina ve ark., 2003).



Şekil 11. Askorbik asit ve oksidasyon ürünlerinin kimyasal yapısı (Smirnoff, 2005).

Bitkiler plastidlerinde çeşitli izoprenoid moleküllerini sentezlerler. Plastokinon gibi, sentezlenen bu moleküller bitkiyi ışığın zararlı etkisinden korumada (karotenoidler) ve antioksidan (karotenoidler, tokoferoller ve tokotrienoller) olarak savunma da işlev görürler. Uzun izoprenoid zincirine sahip bu moleküller hidrofobik özelliğe sahiptirler ve hücre zarlarıyla ilişkilidirler. Tokoferoller (vitamin E) ve tokotrienoller (Şekil 12) biyolojik zarların ana bileşenleri olarak hem antioksidatif hem de antioksidatif olmayan işlevlere sahiptirler (Smirnoff, 2005). Dört adet tokoferol ve tokotrienol izomeri (α -, β -, γ - ve δ -) vardır. Bitki ve algler tarafından sentezlenen tokoferoller bitkilerin tüm kısımlarında bulurlar. Yüksek bitkilerin kloroplast zarlarında öncü baskın tokoferol izomeri olarak bulunan α -tokoferol, fotooksidatif hasara karşı koruma işlevine sahiptir. Tokoferoller, özellikle 1O_2 olmak üzere oksijen radikallerinin kimyasal temizleyicisi olarak görevlidir. Antioksidan özelliğin yanı sıra vitamin E' nin hücre zarında antioksidan olmayan

işlevlerde de etkin olduğu rapor edilmiştir. Bunlar arasında glukoz ve protonların digalaktosildiasilgliserol veziküllerinden geçişini düşürdüğü ve fotosistem II ile - tokoferol ve α -tokoferol kinon arasında bir etkileşim olduğu hakkında bilgiler de bulunmaktadır (Blokhina ve ark., 2003)



Şekil 12. Tokoferol ve tokotrienol moleküllerinin kimyasal yapısı (Smirnoff, 2005).

Bitkiler, büyüme ve gelişmeleri sırasında gerekli olmayan birçok organik bileşik sentezlemektedirler. Sekonder metabolit (ikincil ürün veya doğal ürün) olarak tanımlanan bu bileşiklerin çoğunun, bitkilerde görevinin ne olduğu hala bilinmemekle birlikte genel olarak bu bileşiklerin, bitkileri herbivor ve patojenlere karşı savunmada, allelopatik etkileşimde, hayvanları cezbetmede, ışığın zararlı etkilerinden korumada, mekanik destek oluşturmada görev aldığı bilinmektedir. Biyosentetik orijinleri bakımından sekonder metabolitler 3 ana grup altında toplanmaktadır: terpenoidler, azotlu bileşikler ve fenolik bileşikler (Grace, 2005; Sökmen, 2008). Bitki dokularında yoğun bir şekilde bulunan fenolik bileşikler (flavonoidler, taninler, hidroksisinnamat esterleri ve lignin), *in vitro* şartlarda askorbik asit ve tokoferollerden daha etkili antioksidan özelliğine sahiptirler. Polifenollerin antioksidan özelliği; hidrojen ve elektron vericisi olarak yüksek reaktivitesinden, polifenol kaynaklı radikal özelliğini kararlı hale getirmek ve çiftleşmemiş elektronun yerini değiştirebilme ve metal iyonlarının geçişini şelatlayabilme yeteneğinden gelmektedir. Bu özelliklerinin yanında H₂O₂ radikalinin temizlemesi, zar akışkanlığını

düşürme ve lipit paketlenme düzeninin değişimi aracılığıyla peroksidasyon kinetiğini değiştirmeden de sorumludur (Blokhina ve ark., 2003).

Tuzluluk, kuraklık ve düşük sıcaklık stresi gibi çevresel stresler, serbest radikal üretiminde artışa ve lipit peroksidasyonuna neden olmaktadır. Fizyolojik düzeyde tuz stresinin iyon toksisitesi ve su kıtlığı gibi çok yönlü etkilerinin, fotosentezin bozulmasını ve ROT oluşumunu hızlandırdığı bilinmektedir (Miller ve ark., 2010). Son yıllarda yapılan çalışmalarda, oluşan bu ROT' nin hücre sinyal iletiminde ikinci sinyal mesajcısı olarak hayati bir öneme sahip olduğu belirtilmektedir. ROT ile birlikte nitrik oksit (NO) de çevresel streslere karşı yanıtta yer alan önemli bir haberci moleküldür. Stres tarafından uyarılan ABA birikiminde, ROT' nin görevinin olduğu da bazı çalışmalarda anlatılmaktadır. Redoks düzenlenmesi, gen ifadesinin kontrolünde ve çevresel streslere karşı hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda önemli işlevlere sahiptir (Zhang ve ark., 2006).

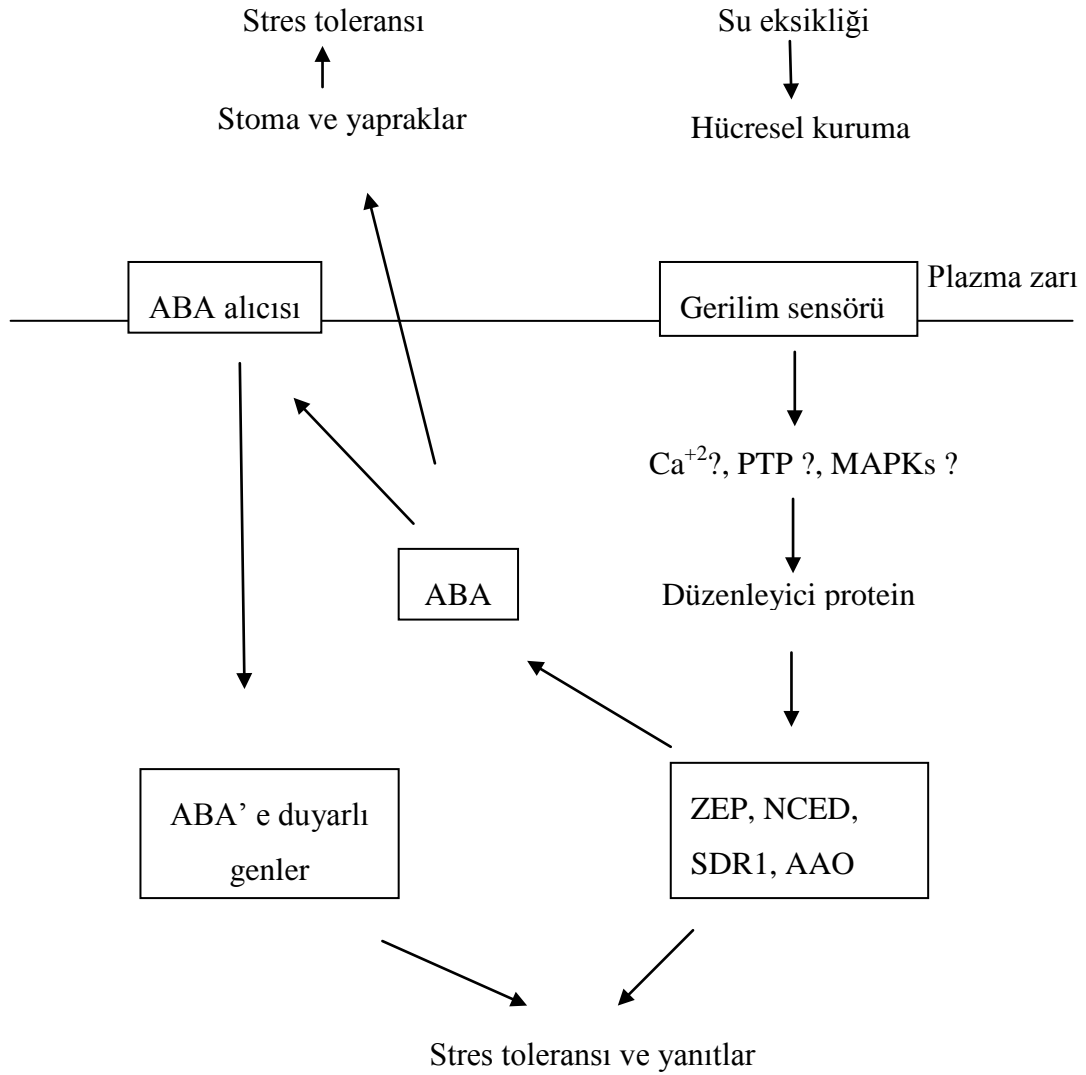
Bu gibi stres etmenlerinin bitki gelişimi ve ürün verimini azaltan bir etkiye sahip olduğu da bilinmektedir. Bu koşullara karşı oluşturulan fizyolojik yanıt, hücresel düzeydeki gen ifadesinde ortaya çıkmaktadır. Bazı genlerin ifadesi, bu etmenler tarafından uyarılma olduğunda ortaya çıkar. Bu gen ürünleri iki grup altında incelenmektedir: (1) *çevresel streslere karşı doğrudan koruyanlar* ve (2) stres yanıtında *gen ifadesi ve sinyal iletimini düzenleyenler*. İlk grup, hücreleri dehidrasyondan (kuruma) koruyan işleve sahip proteinler (çeşitli ozmoprotektantların biyosentezi için gerekli olan enzimler), LEA proteinleri, antifiriz proteinleri, şaperonlar ve detoksifikasyon enzimlerinden oluşur. İkinci grup gen ürünleri olarak; düzenleyici proteinler, protein kinazlar, fosfoinositit metabolizmasında işlev gören enzimler bulunmaktadır. *Arabidopsis* bitkisinde kurumayla uyarılan genlerin ifade analizleri, kurumaya yanıtta genlerin uyarılmasında en az dört bağımsız sinyal yolunun olduğunu göstermektedir. Bunlardan 2 tanesi ABA' e bağılıken diğer ikisi ABA' ten bağımsızdır. ABA' ten bağımsız iki yolun birincisi soğuğa olan yanıtla aynı şekilde ifade olmaktadır. ABA tarafından düzenlenen genlerin promotörleri altı nükleotid dizisi içerir. Bu diziler ABA' e yanıt veren element (ABRE) olarak bilinir. Bu molekül ABA' e bağılı genlerin aktifleşmesinde yer alan düzenleyici proteinlere bağlanır. Bu yolla düzenlenen genlerin promotörleri dokuz nükleotidli alternatif bir düzenleyici element içerir. Bu element, "TACCGACAT" dizisine sahip kuruma yanıt elementi (DRE) olarak isimlendirilir. ABA' ten bağımsız yolla gen ifadesinin

düzenlenmesinde iki sinyal yolu bilinmektedir. Ozmotik strese yanıt veren genlerin promotörlerindeki DRE elementine bağlanarak iş gören düzenleyici proteinleri (DREB1 ve DREB2), ABA' ten bağımsız bir sinyal dizisi ile aktifleştirilir. Stresle uyarılan birçok gen, örneğin *RD29A*, bu grup içinde yer almaktadır. *RD29A* geninin promotör bölgesinde tanımlanan aynı etkili (cis-acting) element, kuruma ve soğukla uyarılmış ifadeden sorumludur (Kasuga ve ark., 1999; Thomashow, 1999; Xiong ve Zhu, 2002; Türkan, 2008).

ABA' in bitki su dengesinin düzenlenmesinde önemli bir göreve sahip olduğu bilinmektedir. Toprakta başlayan kurumunun sonucunda su kaybeden köklerde amiloplastlarda üretilen ABA ksileme taşınır. Gövdeye taşınan ABA, yaprak büyümesi ve stoma kapanmasını düzenler. Bu mekanizma ksilemdeki iyon dengesi ve pH tarafından düzenlenmektedir. ABA' in stoma kapanmasındaki mekanizması çok uzun yıllardan beri çalışılan bir konudur. Bu çalışmalarda sitoplazmik Ca^{+2} iyonundaki artışın önemli bir basamak olduğu ve sinyal iletim sürecinde bu molekülün ikinci haberci olarak işlev gördüğü ortaya konmuştur. Son yıllarda yapılan çalışmalarda NO' in bitkilerin kuraklığa uyum aşaması yanıtlarında ABA' e bağlı stoma kapanmasında bekçi hücrelerde birikiminin gerekli olduğu saptanmıştır. ABA ile ilgili mutant bitkilerle yapılan çalışmalarda su stresi sırasında meydana gelen sinyal iletiminin iki ana yolunun olduğu ortaya konmuştur: ABA' e bağımlı ve ABA' ten bağımsız gen ifade yolu (Şekil 13). ZEP, NCED ve AAO gibi maddeleri kodlayan genler de kuraklık ve tuz stresi tarafından düzenlenmektedir (Zhang ve ark., 2006).

Arabidopsis bitkisinde bulunan *COR* (cold regulated) genleri dört gen ailesini kapsamaktadır. Bu genler *LTI* (low temperature-induced), *KIN* (cold-inducible), *RD* (responsive to desiccation) ve *ERD* (early responsive to dehydration) olarak adlandırılmaktadır. Düşük sıcaklık ve su ile ilişkili yüksek tuzluluk, kuraklık ve ABA gibi diğer çevresel koşullarda bu genlerden en az biri uyarılmaktadır. Bu genlerden *COR78* (*AT5G52310*), *COR6.6* (*AT5G15970*) ve *COR15* (*AT2G42540*) gen çiftlerinin “kaynayan çözünebilir” hidrofilik polipeptidleri kodladığı saptanmıştır. *COR47* (*AT1G20440*) geni ise, kaynayan çözünebilir hidrofilik polipeptidlerin içinde yer alan LEA II protein ailesine ait dehidrin ve LEA D11 proteinlerini kodlamaktadır. Bilindiği üzere LEA proteinleri, hücre zarlarının korunmasında vejetatif dokularda birikir. Hidrofilik özellikte olan bu

proteinler, suyun kaybını önlerler ve hücre içi proteinler ile diğer moleküllerin kristalleşmesini önleyerek zar yapısını korurlar (Thomashow, 1999; Türkan, 2008).



Şekil 13. Su kısıtlılığına karşı hücre ABA birikiminde sinyal iletim yolları ve yanıtlar (Zhang ve ark., 2006).

AAO (ABA-aldehit redüktaz): ABA-aldehidi ABA'ye dönüştürmeden sorumludur; **MAPKs**: Protein kinazlar tarafından aktive olan mitojen; **NCED** (9'-cis-epoksikarotenoid dioksigenaz): 9'-cis-neoksantin ksanoksine oksidatif parçalanmasını katalizler; **PTP**: protein tirozin fosfataz; **SDR1** (Kısa-zincir dehidrogenaz/redüktaz): glukoz sinyal iletiminde ve sitoplazmada ksantoksin türevlenen plastid ve karotenoidin absisik aldehide dönüştürür; **ZEP**: Zeaksantin epoksidaz.

Soğukla düzenlenen genlerin birçoğu *Arabidopsis* bitkisinden izole edilmiştir. Bu genlerden *COR78*; aynı zamanda *LTI78*, *M78*, ve *RD29A* olarak da bilinmektedir ve 78-

kD' luk hidrofilik bir polipeptidi kodlar (Horvath ve ark., 1993; Xiong ve Zhu, 2002; Rekarte-Cowie ve ark., 2008). Soğukla düzenlenen diğer birçok gen gibi *COR78* geni de hem ABA hem de kuraklığa verilen yanıtta sorumludur. *Arabidopsis* bitkisinin *abi* mutantının kullanıldığı ve *COR78* gen transkript seviyelerinin belirlendiği çalışmada, *COR78* gen ifadesi (*COR6.6* ve *COR47* genleri için de aynı ifade kullanılabilir) için ABA' in herhangi bir aşamada etkili olmadığı saptanmıştır. Bu çalışmaya göre ilgili genlerin soğuk ve ABA ile düzenlenmiş ifadesinin, ayrı sinyal iletim yollarından uyarıldığı belirlenmiştir (Horvath ve ark., 1993). Soğukla uyarılan bir başka gen olan *RD29B* (*LTI65*), soğuk uygulamalarına karşı her zaman yanıt oluşturmasa da kuraklık, tuz stresi ve dışarıdan ABA uygulamasına karşı çok yüksek seviyede yanıt oluşturur. (Thomashow, 1999; Zhang ve ark., 2006, Park ve ark., 2009). Bu gene ait olan transkripsiyon elementi ABRE' dir (Zhu, 2002).

Arabidopsis bitkisinin soğuğa alıştırılması sırasında sentezlenen birçok soğuk-düzenleyen polipeptid, bilinen proteinlerle az yada benzer hiçbir amino asit dizisine sahip değildir (Horvath ve ark., 1993; Uemura ve ark., 1996). *COR* genleri tarafından kodlanan proteinlerin metabolik yolları, doğrudan donma toleransını etkileyen son ürünleri (örneğin, membran yağ yapısındaki değişimler) değiştirme potansiyelindedir. *COR* genlerinden 6,6-kD büyüklüğündeki bir polipeptidi kodlayan *COR6.6* geninin sitoplazmada bulunduğu düşünülmektedir. *COR6.6* ve *COR15am* genleri hidrofilik bir özelliğe sahiptir ve kaynama noktasından sonra bile çözünebilir olarak kalabilmektedir. Bu genlerin amino asit dizi analizi neticesinde amfipatik* a-heliks yapısına sahip olduğu tahmin edilmektedir. *In vivo* şartlar altında soğuk alıştırması sırasında *COR* polipeptitlerinin miktarının arttığı çeşitli çalışmalarda ortaya konmuştur (Uemura ve ark., 1996).

Galaktinol sentaz ile ilgili iki stres (*GOLS2* ve *GOLS3*) geninin bitki hücrelerinde ozmoprotektan oligosakkaritlerin rafinoz ailesinin sentezinde görevli olduğu saptanmıştır (Ballou ve ark., 2007; Nishizawa ve ark., 2008). *In vitro* şartlar altında galaktinol ve rafinoz moleküllerinin, salisilat molekülünü OH⁻ radikallerinin saldırısından etkili bir şekilde koruduğu ve stres altındaki bitkilerde AA ve GSH seviyesinin düzenlenmesi sırasında etkili olabileceği saptanmıştır. Tuzluluk, kuraklık ve üşüme gibi durumların *Arabidopsis* bitkisinde *GOLS* genlerinin ifadesini aşırı seviyede uyardığı bilinmektedir (Nishizawa ve ark., 2008).

* Hidrofilik ve hidrofobik bölgelere sahip molekül.

Çizelge 5. Çalışmada kullanılan genler ve gen tanımları

Gen	İşlevi	Protein özelliği	mRNA uzunluğu (bç)	Kaynak
<i>COR78</i> (<i>LTI78, M78, RD29A</i>)	ABA, tuz, soğuk, kuraklık yanıtı	78-kD' luk hidrofilik bir polipeptid	280	Horvarth ve ark., 1993; Rekarte-Cowie ve ark., 2008
<i>COR6.6</i>	ABA, tuz, soğuk, kuraklık yanıtı	6,6-kD' luk bir polipeptid	104	Thomashow, 1999
<i>RD29B</i> (<i>LTI65</i>)	ABA, tuz, kuraklık yanıtı	Hidrofilik protein	350	Park ve ark., 2009
<i>GOLS3</i>	Tuz, kuraklık, soğuk yanıtı Salisilat'ı OH. zararından korur	Galaktinol sentaz 3, rafinoz, galaktinol	160	Nishizawa ve ark., 2008
<i>PR1</i>	Virüs ve diğer patojen saldırısına yanıtta SAR moleküler işaretçisi (SA yanıt geni)	Antifungal (?)	419	Bowling ve ark., 1994; Vieira Dos Santos ve ark., 2003b
<i>PDF1.2</i> (<i>PR12</i>)	JA yanıt geni, bakteri ve mantar enfeksiyonuna yanıtta	Defensin	202	Vieira Dos Santos ve ark., 2003b; Leon-Reyes ve ark., 2010
<i>GST1</i> (<i>ERD11</i>)	Tuz, bakterilere karşı yanıtta Oksidatif stres işaretçisi	GST' in alt birimi	155	Dixon ve ark., 2002; Vieira Dos Santos ve ark., 2003b

Bitkilerde, patojenlerin enfeksiyonu sırasında PR proteinlerini kodlayan genlerin ifade olması, patojenlere direnç oluşturan sistemik bir sürecin başlamasına neden olmaktadır. PR genleri, hücre dışı asidik proteinler ve hücre içi (vakuolar) bazik proteinler

olmak üzere iki tip proteinleri kodlamaktadır (Sadiqov, 2001). PR proteinleri önceleri 5 tip olarak bilinirken daha sonraki çalışmalarla bu sayı 14 olmuştur (Çizelge 6).

Çizelge 6. PR genleri ve kodladıkları proteinler (Edreva, 2005)

PR 1	PR 2	PR 3	PR 4	PR 8	PR 11	PR 5
Antifungal?	β -glukanazlar		Kitinazlar			Taumatın ve ozmotin
PR 6	PR 7	PR 9	PR 10	PR 12	PR 13	PR 14
Proteinaz inhibitörü	Endoproteinaz	Peroksidazlar	Ribonükleaz benzeri	Defensin	Thionin	Lipit transfer proteini

PR proteinleri ve SAR arasındaki bağlantı saptanmış olmasına rağmen PR genlerinin ifadesinin zamanlaması SAR'ın başlaması ve devamlılığıyla ilişkilidir. Ayrıca, bitkilerdeki PR proteinlerinden bazılarının artması bazı patojenlere karşı dayanıklılık oluşturduğunu göstermektedir. *PR1* genin işlevi hakkında çok az bilgi olmasına rağmen bu genin ifadesiyle virüs ve funguslara karşı toleransın arttığı saptanmıştır. Transgenik tütün bitkileri temel olarak kitinaz üretimi artışıyla *Rhizoctonia solani* patojenine karşı dayanıklıdır. *PR-1a* geninin temel seviyedeki ifadesinin olduğu bitkiler, fungal patojenlerden *Phytophthora parasitica* ve *Peronospora tabacina*'ya karşı dayanıklıdır. Patojen dayanıklılığı ile ilgili olan bu ilişkiden dolayı PR gen ifadesi, SAR için moleküler işaretçi olarak kullanılmaktadır. PR genlerinin ifadesi ve sistemik dayanıklılığı yönlendiren sinyal yolunun çok az bilinmesine rağmen SAR için sinyal molekülü olan SA'ın önemi çok iyi şekilde tanımlanmıştır (Bowling ve ark., 1994).

Bitki patojen etkileşimi sırasında bitki savunma sistemini uyaran çeşitli genlerin ifade olduğu bilinmektedir. Bu genlerden *PLANT DEFENSIN1.2 (PDF1.2)* geni konukçu bitkide, etkileşim sırasında bakteri ve mantarların neden olduğu hasara karşı bitkiyi koruma ve plazmoliz olayını yönetmede yardımcı olarak işlev görmektedir. *PDF1.2* geni aynı zamanda *PR12* geni olarak da belirtilmektedir (Edreva, 2005). Bu gen, bitki savunma yanıtının oluşması sırasında etilen ve jasmonat sinyal yolu arasındaki etkileşim hakkındaki çalışmalarda kullanılmıştır. Patojen enfeksiyonu sırasında etilen ve jasmonat sinyal

yollarının her ikisinin birlikte uyarılmasıyla bu genin aktive olduğu gösterilmiştir. Buradan yola çıkarak steril koşullar altında yetiştirilen bitkilerde *PDF1.2* geninin uyarılmasında etilen ve metil jasmonat arasında sinerjistik bir etkinin olduğu saptanmıştır (Penninckx ve ark., 1998). *Arabidopsis* bitkisinde SA yanıt geni olan *PRI* ile JA yanıt geni olan *PDF1.2*'nin sinerjistik olarak çalıştığını gösteren çalışmalar vardır. Ancak dışarıdan uygulanan JA ve SA konsantrasyonunun artması, bu etkileşimi ters yönde etkilediği de bilinmektedir (Leon-Reyes ve ark., 2010).

Bitki parazit etkileşiminde antioksidatif savunma sisteminin çalışıp çalışmadığını saptamak için *Glutasyon-S-Transferaz 1 (GST1)* geni gibi bazı işaretçi genler kullanılmaktadır. *GST1* geni, GST enziminin alt birimini kodlar. GST' lar (GSTs; EC 2.5.1.18) yaklaşık 50 kDa moleküler kütleyle sahip, çözünebilen ve 2 polipeptit alt birimden oluşan proteinlerdir. Klasik olarak GST enzimleri, polar S-glutasyonile olmuş reaksiyon ürününü (R-SG) oluşturmak için tripeptit glutasyonun (γ -glutamil-sisteinil-glisin; GSH) reaktif elektrofilik merkez içeren kosubstrata (R-X) olan taşımasını katalizlerler. Mısır bitkisinde "chloro-S-triazine atrazine" herbisitine karşı *gst* gen aktivitesinin artışının bitkinin korunmasıyla ilişkili olduğu saptanmıştır. Yetmişli yıllardan günümüze kadar, GST aktiviteleri ya da onunla bağlantılı enzimler veya gen dizilimleri tüm hayvan, bitki ve mantarlarda tanımlanmıştır (Dixon ve ark., 2002).

Tuz stresi ve canavar otu bitkilerinin çeşitli bitkiler üzerinde meydana getirdiği streslerin tek başına neden olduğu etki, birçok kaynakta anlatılmaktadır. Bugüne kadar biyotik ve abiyotik stres faktörlerinin bir arada bitkiler üzerinde neden olduğu etkiler çalışılmamıştır.

Bu çalışmada, *Arabidopsis* ve canavar otu etkileşimi sırasında tuz uygulaması yapılarak *Arabidopsis* bitkisinde meydana gelen fizyolojik, biyokimyasal ve bazı genlerin ifadelerindeki değişimler incelenmiştir. Bu amaçla, *Arabidopsis* bitkisinin pigment içeriği (klorofil a, klorofil b, toplam klorofil ve karotenoid), lipid peroksidasyonu (MDA) miktarı, antioksidan enzim (SOD, POX, GR, CAT ve APX) aktivitelerindeki değişimler ve etkileşim sırasında ifade olan bazı genlerin (*COR6.6 (AT5G15970)*, *COR78 (AT5G52310)*, *RD29B (AT5G52300)*, *GOLS3 (AT1G09350)*, *PDF1.2 (AT5G44420)*, *GST1 (AT1G02930)* ve *PRI (AT2G14610)* genlerinin bağli ifade seviyeleri araştırılmıştır.

BÖLÜM 2**ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR**

Canavar otu bitkileri ve konukçuları arasındaki etkileşim ile ilgili olan çalışmalar yerli ve yabancı birçok dergide yer almaktadır. Bu bölümde, yapılan çalışmaların sunulan araştırma konusuyla ilgili olanları kısaca özet halinde verilmektedir.

Singh ve Singh (1993) *Brassica campestris* ve *O. aegyptiaca* bitkilerinin etkileşimi sırasında proteaz, ksilanaz, selüloz ve poligalakturonaz enzimlerinin hücre duvarının yıkımındaki aktivitelerini saptamışlardır. Buna göre, canavar otu bitkilerinin köklerindeki proteaz, poligalakturonaz ve selüloz enzimlerinin aktiviteleri tuber ve gövdesindekinden daha fazla olarak saptanmıştır. Ksilanaz aktivitesi ise gövdede kök ve tuberdekinden daha yüksek olarak saptanmıştır. Canavar otu tarafından meydana getirilen enfeksiyonun konukçu köklerinde yüksek selüloz aktivitesine neden olduğu saptanmıştır. Araştırmacılar selüloz ve poligalakturonaz enzimlerinin emeç bağlantılarının oluşturulması sırasında görevli olan ana enzimler olduğunu ve proteaz enziminin ise konukçu dokusundaki zarların ve hücre duvarlarının protein ve lipoproteinlerinin yıkımına neden olabileceğini saptamışlardır.

Ayçiçeği ve *O. cumana* parazit bitkisi arasındaki etkileşiminin araştırıldığı bir çalışmada, ayçiçeği sekonder metabolitlerinden şikimik asit ve 7-hidroksillenmiş kumarin bileşiklerinin köklerden salındığı rapor edilmektedir. Ayçiçeği köklerinden salınan bu fenolik bileşiklerin (şikimik asit, flavonoid ve kumarinler) canavar otu tohumlarının çimlenmesine uyarıcı olarak etki etmediği, ancak skopoletin ve ayapin gibi kimyasalların GR24 bileşiğinin çimlenmeyi uyarıcı etkisini baskıladığı belirlenmiştir (Pérez-de-Luque ve ark., 2000).

Canavar otu parazit bitkisinin zirai bitkilerde oluşturduğu zarar çok sayıda araştırmacı tarafından incelenmiştir. Bu araştırmalara bakıldığında; canavar otunun ayçiçeği köklerine yapıştığı noktada ayçiçeğinin bir tür fitoaleksinin sentezini gerçekleştirdiği ve bu yolla parazitik istilayı fiziksel ve kimyasal olarak engellediği saptanmıştır (Serghini ve ark., 2001).

Antioksidatif enzimlerden POX aktivitesi ile ilgili olarak 1996' da gerçekleştirilen ilk çalışmada Antonova ve Ter Borg, ayçiçeği bitkilerine zarar veren *O. cumana* parazitinin C ve D ırkları arasındaki farkın histokimyasal tespitinde radikula hücrelerindeki

peroksidaz içeriğini araştırmışlardır. Çalışmada, C ırkındaki hücre dışı peroksidazın konukçunun lignin öncülleri olan fenolik bileşiklerle reaksiyona girdiği saptanmıştır. Araştırmacılar bu durumu, ayçiçeklerinin dayanıklılığında *Or3* genine sahip kültivarların lignin tabakasının yapısından kaynaklandığını saptamışlardır. Aynı parazitin D ırkı için ise hücre dışı peroksidazın bulunmayışının lignin oluşumunu koruduğunu ve parazitin konukçunun iletim sistemine yapışmasını kolaylaştırmış olduğunu saptamışlardır.

Goldwasser ve ark. (1999) yaptığı çalışmada, *O. aegyptiaca* parazitine dayanıklı *Vicia atropurpurea* cv. *Popany* bitkisinde, duyarlı varyete *V. sativa* cv. *Yovel* bitkisine kıyasla enfeksiyonun ardından yüksek konsantrasyonda bağlı fenolikler, serbest fenolikler ve lignin saptanırken yüksek peroksidaz aktivitesinin de bunlara eşlik ettiği saptanmıştır.

Levine (2004) tarafından önerilen hipotezde, *O. aegyptiaca* bitkilerinin *Arabidopsis* bitkilerine penetrasyonu sırasında konukçunun savunma mekanizmasını etkili bir şekilde nasıl kırdığı açıklanmaya çalışılmıştır. Araştırmacıya göre enfeksiyonun erken safhasında O_2^- ve H_2O_2 üretiminin tüber oluşumuna kadar çok yüksek seviyede olmadığı saptanmıştır.

Castillejo ve ark. (2004) *O. crenata* parazit bitkisi ve *Pisum sativum* bitkisinin dayanıklı (*Ps624*) ve duyarlı (*Mesire*) çeşitleriyle yaptıkları çalışmada, dayanıklı veya duyarlı çeşitlerin parazit tohumların çimlenmesinde anlamlı etkiye sahip olmadığını saptamışlardır. Bununla beraber tuber oluşumunun ve gelişiminin duyarlı çeşit üzerinde daha iyi bir şekilde gerçekleştiği saptanmıştır. Aynı zamanda bu iki bitki arasında meydana gelen etkileşim sırasında kontrol ve enfekte bitkilerde 22 farklı proteinin sentezlendiğini saptamışlardır. Bu proteinler arasında sistein proteaz, endokitinaz, profukosidaz, -1,3-glukanaz ve ABA-yanıt proteini olduğu saptanmıştır. Duyarlı çeşitte fruktokinaz, fruktoz-bifosfat aldolaz, ferrodoksin-NADP redüktaz, alternatif oksidaz 2 enzimlerinin seviyesinde azalma saptanmasına rağmen dayanıklı olan çeşitte glutamin sentetaz, PR proteinlerinden β -1,3- glukanaz ve peroksidazların seviyesinin arttığı saptanmıştır.

Pérez-de-Luque ve ark. (2005) yapmış oldukları araştırmada, *P. sativum* bitkisi ile *O. crenata* arasındaki etkileşimde dayanıklı bezelyelerin köklerindeki toplam çözülebilir fenoliklerin miktarında ve peroksidaz aktivitesinde artış olduğunu saptamışlardır.

González-Verdejo ve ark. (2006) yaptıkları çalışmada; tütün, domates, patates ve *Arabidopsis* bitkilerinde önemli ürün kayıplarına neden olan *O. ramosa* tohumlarının, çimlenmenin ardından uzama sırasında parazit radikulasının uç kısımda peroksidaz aktivitesinde artış olduğunu saptamışlardır. Histokimyasal yöntemlerin kullanıldığı bu

çalışmada, peroksidaz aktivitesinin göstergesi olan kırmızı renk oluşumunun yalnızca uç bölgede meydana geldiğini saptamışlardır. Araştırmacılar, çalışmalarının sonuçlarını desteklemek için, çimlenmiş tohumlardan elde ettikleri toplam RNA' yı kullanarak Northern hibridizasyon analizi ile *O. ramosa* tohumunun gelişim safhasında *PRX1* geninin ifade edildiğini tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada, lignifikasyon ve hücre uzamasında görevli olan apoplastik class III peroksidaz enziminin kodlanmasından sorumlu bu geninin ürünü olan amino asitin dizisi de saptanmıştır.

Pérez-de-Luque ve ark. (2006) *O. crenata* ve bezelye bitkilerini kullandıkları çalışmalarında, dayanıklı bezelye bitkisinde (*Pf651*) parazitin merkezi silindire ulaşmadan önce kök korteksinde durdurulduğu saptanmıştır. Histokimyasal olarak yapmış oldukları çalışmada engelleme olduğu bölgede H₂O₂, peroksidaz ve kalloz birikiminin olduğunu saptamışlardır. Yapmış oldukları *in situ* hibridizasyon çalışmaları göstermiştir ki, dayanıklı çeşitte yapışma bölgesinin yakınındaki hücrelerde peroksidaz ve β -glukanaz enzimleri aktivite göstermektedir.

Letousey ve ark. (2007) *O. cumana* parazite dayanıklı (*LRI*) ve duyarlı (*2603*) ayçiçeği çeşitleriyle yaptıkları çalışmada, farklı metabolik yollarda (fenil propanoitler, JA, etilen) ve/veya mikroorganizmalara karşı savunma mekanizmalarıyla ilişkili 11 genin ifade düzeyini saptamışlardır. Bunlar arasında *LRI* çeşidinde SA-yanıt geni olan DEF (defensin) geninin dayanıklılıkla ilişkili olduğunu belirlenmiştir. Ancak ne JA ne de SA birikimi her iki çeşitte de ister enfekte olsun ister olmasın ölçülemez. Metiyonin sentetaz, glutatyon-S-transferaz ve kinon oksidoredüktaz enzimlerini kodlayan genlerin uyumlu olmayan ilişkisi sırasında parazitin yapışmasının ilk gününde yüksek seviyede uyarıldığı saptanmıştır.

Veronesi ve ark. (2007) *O. ramosa* parazit tohumlarının çimlenmesi sırasında çevrelerine bazı proteinleri hızlı bir şekilde salgıladıklarını saptamışlardır. Bu proteinler arasında pektinolitik enzimler, poligalakturonaz ve ramnogalakturonaz yer almaktadır. Çimlenmenin başlamasından 4-8 gün arasında bu enzimlerin salgılanmasının en yüksek seviyeye ulaştığı ve daha sonrasında da seviyelerini koruduklarını saptamışlardır. Altı gün sonra salınan bu proteinlerin POX aktivitesi gösterdikleri saptanmıştır. Canavar otu tohumlarından hücre dışına salınan POX' ın *OrPOX1* adlı gen tarafından kodlandığı da aynı çalışmada saptanmıştır. Belirtilen bu enzimlerin parazitin konukçuya yapışması ve emeçlerin oluşumunda da görevli oldukları belirtilmektedir.

Mor ve ark. (2008) *Arabidopsis* ve *O. aegyptiaca* bitkilerinin etkileşimi sırasında POX aktivitesinin işlevi hakkındaki araştırmalarında, parazitin radikula uç kısmında meydana gelen POX aktivitesinin, konukçu köküne yapışmasının gerçekleşmesi için hücre duvarının gevşemesinde etkili olduğunu saptamışlardır. Araştırmacılar ayrıca, parazit kökünün uzaması sırasında da POX enziminin görevli olabileceğini saptamışlardır.

Ayçiçeği bitkisinde *O. cumana* parazit bitkisine dayanıklı olarak bilinen *Pioneer 4223*, duyarlı *Isera* ve ilaçla dayanıklı *Sanay* çeşitleri ile yapılan çalışmada; dayanıklı çeşit kök dokularında *O. cumana* penetrasyonundan sonra kontrol bitkilerine kıyasla uygulama bitkilerinde SOD ve POX enzimlerinin aktivitesinde artış olduğu saptanmıştır. *Isera* çeşidinde ise 7. güne kadar meydana gelen SOD aktivitesindeki artışın 9. günde önemli seviyede azaldığı saptanmıştır. Bu sonuçlar, ayçiçeği-canavar otu etkileşiminde antioksidatif savunma sisteminin öncül enzimlerinin işlevsel olabileceğine işaret etmektedir (Demirbaş ve Acar, 2008).

El-Maarouf-Bouteau ve ark. (2008) çimlenmiş ve çimlenmemiş canavar otu tohumlarının, süspanse halde hücre kültürü yapılan *Arabidopsis* bitkilerinin bulunduğu ortama bırakılmasından sonraki 48 saatlik süreçte ortam H₂O₂ seviyesindeki değişimleri saptamışlardır. *Arabidopsis* ve *O. ramosa* parazit bitkilerinin etkileşiminin ilk 24 saatlik sürecinde *Arabidopsis* bitkilerinde enfeksiyon olmaksızın ortam H₂O₂ miktarında artış olduğu saptanmıştır. 48. saatte bu artış, yerini azalışa bırakmıştır. *Arabidopsis* bitkilerinde ilk 24 saatlik süreçte kamaleksinin biyosentezinde herhangi bir uyarılma olmazken 48. saatte çimlenmiş canavar otu tohumlarının kamaleksinin sentezini önemli seviyede uyardığı da saptanmıştır.

Joel ve Portinoy (1998) tütün bitkisiyle yapmış oldukları çalışmada, *O. aegyptiaca* parazit emeçlerinin duyarlı tütün bitkisinin kök bölgesine yapışması sonrasında *PR1* genin ifade olduğunu saptamışlardır. Tütün bitkisinde oluşan bu yanıt, yapışmanın olduğu bölgenin X-gluc adlı boya ile maviye boyanmasıyla gösterilmiştir.

Westwood ve ark. (1998) transgenik tütün bitkileriyle yapmış oldukları çalışmada, *O. aegyptiaca* parazit bitkilerinin tütün bitkilerinin köklerinde, yapışmadan sonra 3-hidroksi-3-metilglutaril CoA redüktazın (HMGR) savunmayla ilişkili izogeni olan *HMG2* geninin hızlı bir şekilde ifade olduğunu göstermişlerdir. *HMG2* geni ile birlikte *PR1* geninin de savunma yanıtı olarak ifade olduğu aynı çalışmada belirtilmektedir. Bu genlerin uyarılması sonucunda fitoaleksinler, lignin öncülleri ve litik enzimlerin sentezi artmaktadır.

Vieira Dos Santos ve ark. (2003a) çalışmalarında, *A. thaliana* ekotip Ws. ve *O. ramosa* etkileşimi sırasında etkili olduğunu düşündükleri 13 genin (*RC KINAZ*, *ACAM5*, *SUC1*, *PMEi*, *GST1*, *GST11*, *PMSR*, *LATEX ALLERGEN*, *LOX1*, *MBP*, *POX*, *CCOAOMT* ve bilinmeyen bir proteini kodlayan) ifade düzeylerini saptamışlardır. Bu amaçla çimlendirilmiş olan canavar otu fideleri *Arabidopsis* köklerine bırakılmış ve yapışmanın gerçekleştiği 7. güne kadar farklı zaman aralıklarında örnekleme yapmışlardır. Canavar otu fidelerinin ortama bırakılmalarından sonraki 1., 2., 5. ve 8. saatte *GST1* genin yüksek seviyede uyarıldığını saptamışlardır. Daha sonra aynı genin yapışmanın olduğu güne (7.gün) kadar tekrar ifade olmadığı saptanmıştır. Yapılan çalışmaya göre yapışmanın olduğu gün enfeksiyon sonrası hücre duvarının yeniden onarılması sırasında *PMEi*, *POX* ve *CCOAOMT* genlerinin ifadesinde artış olduğu, SA ve kamaleksine bağlı yolların aktive olmamasına karşın JA/ET yolunun bu etkileşimde etkili olduğunu saptamışlardır.

Vieira Dos Santos ve ark. (2003b) çalışmalarında, *Arabidopsis* ve *O. ramosa* bitkilerinin etkileşimi sırasında 20 genin (*GST1*, *PR1*, *PR2*, *PR5*, *PR8*, *ASA1*, *PAI1*, *ACC2*, *HMG2*, *C4H*, *4CL*, *LOX1*, *LOX2*, *AOS*, *PR3*, *THI2.1*, *PDF1.2*, *HMG1*, *PAL1* ve *AOC*) ifade düzeylerini araştırmışlardır. *Arabidopsis* bitkisinin köklerine *O. ramosa* parazit bitkisinin yapışma gerçekleşmeden önce *PR3*, *PDF1.2*, *THIONIN*, *PMEi*, ROT' ni süpüren proteinler, *GST1*, *GST11* ve *PMSR* ifade olduğu saptamışlardır. Bu çalışmaya göre *Arabidopsis* bitkisinin canavar otu fidelerini algılamasının yapışma gerçekleşmeden önce başladığı saptanmıştır. Ayrıca, *Arabidopsis* bitkilerinde enfeksiyon sonrası ilk 24 saat içinde peroksidaz mRNA birikiminin olduğu saptanmıştır.

BÖLÜM 3**MATERYAL VE YÖNTEM****3.1. Bitkisel Materyal**

Bu çalışmada bitkisel materyal olarak *Arabidopsis thaliana* (L.) Heyh. ekotip Wassilewskija (Ws.) ve ekotip Columbia (Col.) ile *Phelipanche ramosa* (L.) Pomel (Canavar otu) kullanıldı. Ws. ve Col. ekotiplerine ait tohumlar Selanik Aristo Üniversitesi (Yunanistan) Biyoloji Fakültesi Botanik Bölümünden temin edildi. *P. ramosa* tohumları, 2008 Ağustos ayında canavar otu ile enfekte olmuş Çanakkale Kumkale kasabesindeki domates tarlalarından toplandı ve çalışmada kullanılmaya kadar uygun koşullarda saklandı.

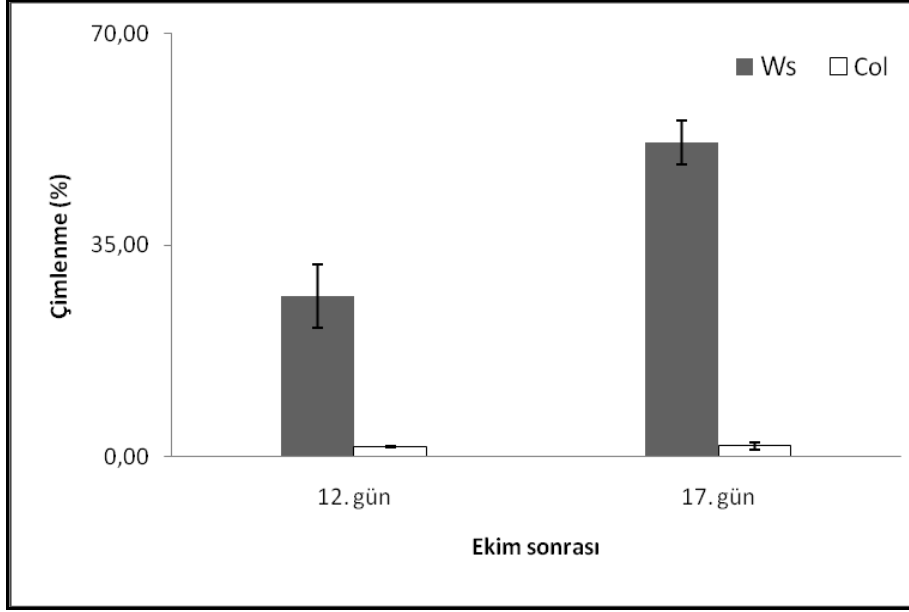
Arabidopsis tohumları % 20' lik çamaşır suyunda 5 dakika bekletilip daha sonra 3 kez steril saf suyla yıkanarak yüzeysel sterilizasyon işlemi yapıldı. Tohumların eş zamanlı çimlenmeleri için stratifikasyon +4 °C'de 2 gün süreyle gerçekleştirildi.

Canavar otu tohumlarının yüzeysel sterilizasyonu % 70' lik etanol çözeltisinde 2 dakika, % 5' lik çamaşır suyunda 10 dakika (2 kez) ve 3 kez steril saf suyla yıkama yapılarak gerçekleştirildi.

3.2. Bitkilerin Yetiştirilmesi

Bitkiler, iki farklı ortamda yetiştirilmiştir. Gen ifadesi ile ilgili yetiştirme işlemleri, Selanik Aristo Üniversitesi Biyoloji Fakültesi Botanik Bölümü bitki büyütme odasında gerçekleştirildi. Biyokimyasal ve fizyolojik yanıtların araştırılmasında kullanılan bitkiler ise Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Botanik Araştırma Laboratuvarı bitki büyütme dolabında gerçekleştirildi.

Arabidopsis bitkisinin iki ekotipin *P. ramosa* ile olan etkileşiminin incelendiği bu çalışmada, Col. ekotipinin *P. ramosa* tohumlarının çimlenmesini yeteri kadar teşvik etmemesinden (~% 2) dolayı çalışma Ws. ekotipi (~% 52) kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 14).



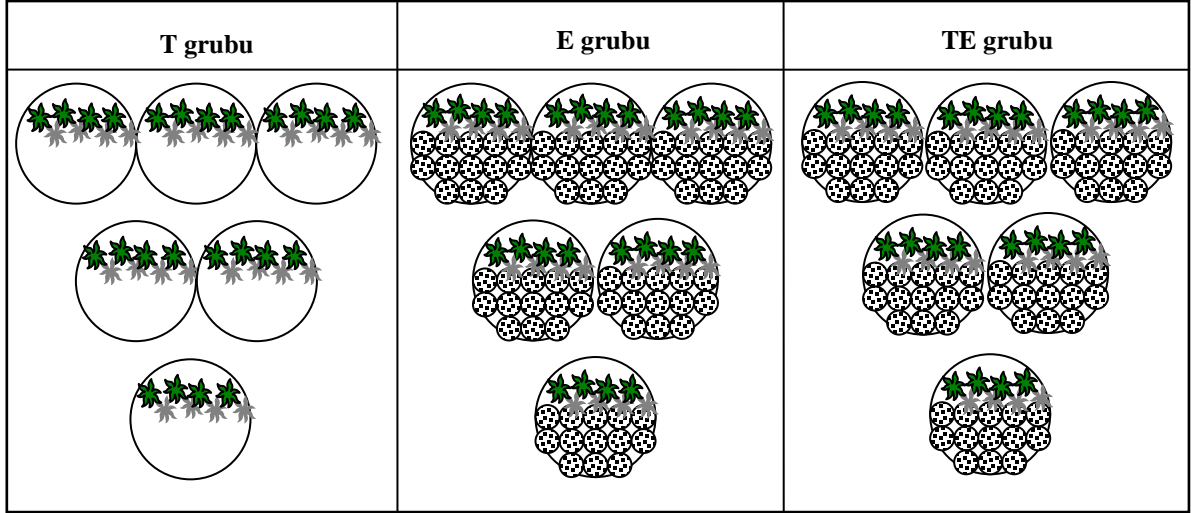
Şekil 14. Ws. ve Col. ekotiplerinin *P. ramosa* tohumlarının çimlenmesine etkisi.

Arabidopsis ve canavar otu bitkilerinin yetiştirilmesi sırasında üç grup tasarlandı. Birinci grupta (T), *Arabidopsis* bitkilerine 100 mM NaCl etkisi, ikinci grupta (E) canavar otu enfeksiyonunun etkisi ve üçüncü grupta (TE) ise enfekte bitkilere 100 mM NaCl etkisi araştırılmıştır. T grubuna petri kabı başına 50 adet *Arabidopsis* tohumu, E ve TE grubu petri kaplarına *Arabidopsis* tohumlarıyla (50 adet) birlikte canavar otu tohumları (~2000 adet) ekildi. Ekim sonrası her gün canavar otu tohumlarının çimlenmesi kontrol edildi ve çimlenmenin ekim sonrası 10. günde başladığı saptandı. Her üç gruptaki bitkiler, canavar otu tohumlarının *Arabidopsis* bitkilerinin köklerine yapışmanın olduğu güne (18. gün) kadar yetiştirildi (Şekil 15-16) (22 °C sıcaklık, 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık yoğunluğu ve 16 saatlik fotoperiyot). Bitkilerin yetiştirilmesi için Gamborg B5 besi ortamı (% 1 sükröz) (Gamborg ve ark., 1968) kullanıldı.

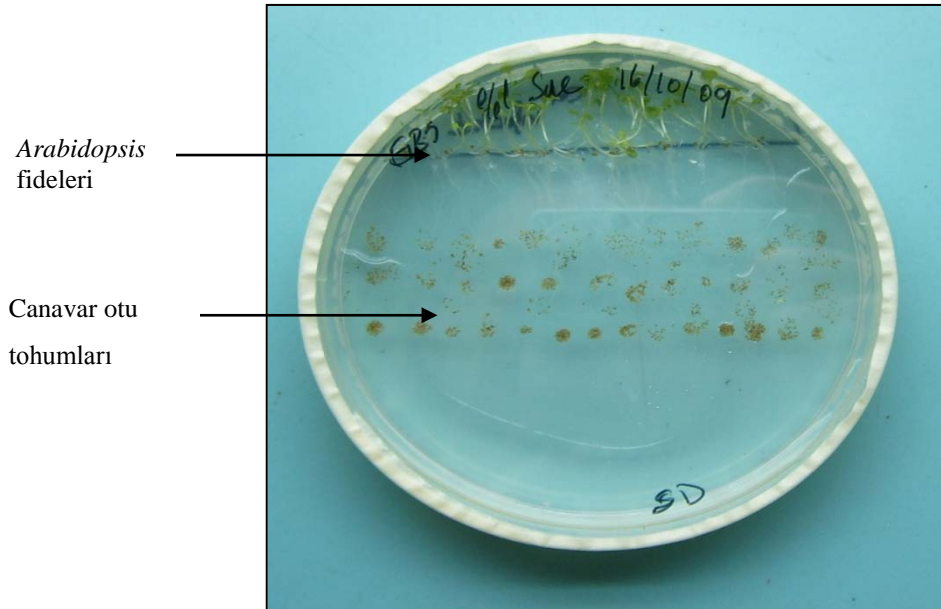
Bitki başına ortalama 10 canavar otu enfeksiyonunun (yapışmanın) gerçekleştiği gün (Şekil 17), *Arabidopsis* bitkilerinden 0. saat (kontrol) örnekleme yapıldı ve bitkilere 100 mM NaCl uygulandı (T). Örnekleme yapıldıktan sonra enfeksiyona NaCl etkisinin gözlenmesi için TE grubundaki bitkilere 100 mM NaCl çözeltisi uygulandı.

Tuz uygulamaları petri kabı başına 25 ml olacak şekilde gerçekleştirildi. *Arabidopsis* bitkilerinin gövdelerinden (topraküstü kısımlarının tamamı) her gruptan tuz uygulamasından sonra 3. ve 6. saatte örnekleme yapıldı.

Bu örneklerden *Arabidopsis* bitkilerinin antioksidan enzimlerinin aktiviteleri (SOD, POX, GR, APX ve CAT), MDA miktarı ve bağıl gen ifadeleri (*COR6.6*, *COR78*, *RD29B*, *GOLS3*, *PDF1.2*, *GST1* ve *PR1*) saptandı. Ayrıca aynı örnekleme periyodunda bitki yapraklarının pigment (klorofil a, klorofil b, toplam klorofil ve karotenoid) içeriğinde meydana gelen değişimler de saptandı. Örnekleme sırasında bitki materyalleri önce sıvı azota alındı, sonrasında çalışmanın yapılacağı güne kadar derin dondurucuda (-85 °C) saklandı.



Şekil 15. Çalışma sırasında uygulanan yetiştirme ve örnekleme modeli.



Şekil 16. *Arabidopsis* ve canavar otu bitkilerinin yetiştirildiği ortam(orijinal).



Şekil 17. *Arabidopsis* köklerine canavar otu yapışmasının olduğu gün. Oklar yapışma bölgelerini işaret etmektedir (orijinal).

3.3. Bitki Analiz Yöntemleri

3.3.1. Pigment içeriğinin belirlenmesi

Pigment içeriğinin belirlenmesi için Arnon (1949) yöntemi kullanıldı. Bunun için bitki yapraklarından alınan 0,5 g'lık materyal, % 80'lik aseton içerisinde homojenize edildi. Özütten alınan spektrofotometrik okumalar aracılığıyla yönteme uygun olarak hesaplamalar yapıldı. Spektrofotometrik okumalar sırasında Shimadzu 1208 cihazı kullanıldı. Absorbans değerleri kullanılarak aşağıda verilen formül yardımıyla bitkilerin pigment içerikleri (mg/g yaş ağırlık) hesaplandı.

$$\text{Klorofil a} = (A_{663} \times 12,70) - (A_{645} \times 2,69)$$

$$\text{Klorofil b} = (A_{645} \times 22,90) - (A_{663} \times 4,68)$$

$$\text{Karotenoid} = (A_{480} + (A_{663} \times 0,114) - (A_{645} \times 0,638)) / 112,5$$

$$\text{Toplam klorofil} = (20,2 \times A_{645}) + (8,02 \times A_{663})$$

3.3.2. Lipit peroksidasyonu miktarının belirlenmesi

Bu analiz sırasında lipit peroksidasyonunun son ürünü olan malondialdehit (MDA) seviyesinin ölçülmesi ile lipit peroksidasyonu derecesi belirlenmektedir (Madhava ve Sresty, 2000). Her gruptan 0,5 g bitki örneği, % 0,1'lik trikloroasetik asit (TCA) çözeltisi

ile homojenize edildi. Özütler 10000 rpm' de 5 dk +4 °C' de santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra üst faza TCA ve TBA (tiobarbitürik asit) içeren reaksiyon karışımı eklendi ve örnekler daha sonra 95 °C' de 30 dk sıcak su banyosunda bekletildi. Tüpler su banyosunun ardından buz banyosuna konuldu. Örnekler soğuk şokunun ardından 10000 rpm' de 15 dk santrifüjlendi. Oluşan üst fazın 532 nm ve 600 nm' deki absorbans değerleri alındı ve MDA derişimi, ekstinksiyon katsayısından ($\epsilon=155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) yararlanılarak hesaplandı. Sonuçlar nmol g yağ ağırlık⁻¹ şeklinde ifade edildi.

3.3.3. Toplam protein analizi

Antioksidan enzim aktivite analizleri için her iki deneme serisinden üçer tekrarlı olarak alınan 0,2 g taze bitki örnekleri, soğuk ortamda, 1 mM EDTA ve % 2 (w/v) polivinilpolipirrolidon (PVPP) içeren 1 ml 0,05 M sodyum fosfat tamponunda (pH 7,8) homojenize edildi. Özütler +4 °C' de 13000 rpm' de 30 dk santrifüj edildikten sonra üst faz enzim ve protein analizleri sırasında kullanıldı. Tüm işlemler +4 °C' de gerçekleştirilmiştir.

Bitki örneklerinin toplam protein içeriği Bradford (1976) yöntemiyle saptanmıştır. Bu yöntem için protein standart grafiği, Bovine Serum Albumin (BSA) kullanılarak hazırlandı. Hazırlanan örnekler spektrofotometrede 595 nm dalga boyunda köre karşı okundu ve örneklere ait toplam protein miktarı (mg/g), standart grafik üzerinden hesaplandı. Spektrofotometrik okumalar Shimadzu 1208 cihazı ile gerçekleştirildi. Elde edilen protein değerleri, antioksidan enzimlerin aktivitesinin hesaplanması sırasında kullanıldı.

3.3.4. Antioksidan enzim aktivitelerinin saptanması

3.3.4.1. Süperoksit dismutaz (SOD; EC 1.15.1.1) aktivitesinin belirlenmesi

SOD enzim aktivitesi, Beauchamp ve Fridovich (1971) ve Giannipolities ve Ries, (1977)' e göre belirlendi. Buna göre özütte meydana gelen aktivite, 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ışıklı 25 °C' de 10 dk süresince gerçekleştirilen reaksiyon sonunda meydana gelen renk değişiminin spektrofotometrede 560 nm dalga boyunda ölçülmesiyle saptandı. Analiz sırasında kullanılan reaksiyon karışımı 0,05 M sodyum fosfat tamponu (pH 7,8), 0,01 M L-Metiyonin, 33 μM Nitro BlueTetrazolium (NBT), 0,66 mM EDTA.Na₂ ve 0,0033 mM riboflavin içerir. Spesifik enzim aktivitesi, enzim ünitesi mg protein⁻¹ olarak belirtildi. Spektrofotometrik okumalar Shimadzu 1208 cihazı ile gerçekleştirildi.

3.3.4.2. Peroksidaz (POX; EC 1.11.1.7) aktivitesinin belirlenmesi

POX enziminin aktivitesi, Kanner ve Kinsella (1983)' nın metoduna göre belirlendi. Bitki örnekleri, 1 ml 0,05 M sodyum asetat tamponu (pH 6,5) ile homojenize edildikten sonra 13000 rpm' de 15 dk süreyle +4 °C' de santrifüj edildi. Spektrofotometrede yapılan okumalar sırasında kullanılan reaksiyon karışımında; 0,05 M sodyum asetat tamponu (pH 6,5), 0,1 M pyrogallol, 0,09 M H₂O₂ ve süpernatant (üst faz) kullanıldı. Analiz için belirlenen oranda bitki örneği reaksiyon karışımına alındıktan sonra son hacim 1 ml' ye tamamlandı. Renk değişimi spektrofotometrede 300 nm dalga boyunda 120 sn süresince izlendi. Spesifik enzim aktivitesi, enzim ünitesi mg protein⁻¹ olarak belirtildi.

3.3.4.3. Katalaz (CAT; EC 1.11.1.6) aktivitesinin belirlenmesi

CAT enziminin aktivitesi, Bergmeyer (1970)' in yöntemi kullanılarak belirlendi. 240 nm' de 3 dk süre ile H₂O₂ miktarında oluşan azalma izlendi. Analiz sırasında kullanılan reaksiyon karışımı; 1 mM EDTA, 0,05 M sodyum fosfat tamponu (pH 7,0), dI-H₂O ve % 3 H₂O₂ içerir. Dakikada tüketilen µmol H₂O₂ miktarı, 1 enzim ünitesi olarak saptandı. Spesifik enzim aktivitesi, enzim ünitesi mg protein⁻¹ g olarak belirlendi.

3.3.4.4. Askorbat peroksidaz (APX; EC 1.11.1.11) aktivitesinin belirlenmesi

APX enziminin aktivitesi, Nakano ve Asada (1981)' nın yöntemi kullanılarak saptandı. Aktivitenin hesaplanmasında, 290 nm' de askorbatın oksitlenmesiyle oluşan absorbans değeri ve ekstinksiyon katsayısı (2,8 mM⁻¹ cm⁻¹) kullanıldı. Reaksiyon karışımında; 0,05 M sodyum fosfat tamponu (pH 7,0), 0,5 mM askorbat, 0,1 mM EDTANA₂, 1,2 mM H₂O₂ bulunur. Özütün reaksiyon karışımının ilavesi ile askorbat oksidasyonu başlatıldı ve 3 dk boyunca reaksiyon izlendi. Okside olan askorbat miktarı, ekstinksiyon katsayısından hesaplanır. Buna göre 1 enzim ünitesi, dakikada okside olan 1 µmol ml⁻¹ askorbat miktarıdır. Spesifik enzim aktivitesi, enzim ünitesi mg protein⁻¹ olarak belirtildi.

3.3.4.5. Glutatyon redüktaz (GR; EC 1.6.4.2) aktivitesinin belirlenmesi

GR enziminin aktivitesi, Foyer ve Halliwell (1976)' in metoduna göre belirlenir. NADPH varlığında okside glutatyon miktarındaki azalma 3 dakika süre ile 340 nm' deki absorbans azalması izlenerek hesaplanır. Glutatyon redüktaz için ekstinksiyon katsayısı 6,2 mM⁻¹ cm⁻¹, dir. Hesaplama sırasında bu katsayı kullanılarak GSSG düzeyi belirlenir. 1

enzim ünitesi, dakikada okside olan glutasyon ($\mu\text{mol ml}^{-1}$) miktarıdır. Spesifik enzim aktivitesi, enzim ünitesi $\text{mg protein}^{-1} \text{ g}$ olarak belirtilir.

3.3.5. Gen ifade değişimlerinin belirlenmesi

Arabidopsis bitkilerine NaCl, canavar otu ve her iki stres etmeninin, (*COR6.6* (*AT5G15970*), *COR78* (*AT5G52310*), *RD29B* (*AT5G52300*), *GOLS3* (*AT1G09350*), *PDF1.2* (*AT5G44420*), *GST1* (*AT1G02930*) ve *PRI* (*AT2G14610*) genlerinin ifade değişimlerine olan etkisi saptandı. Ayrıca, bu çalışmada *RAB18* (*AT5G66400*) ve *PR5* (*AT1G75040*) genlerinin etkileşim sırasında ifade olmadığı da saptanmıştır (sonuçlar gösterilmemektedir). NaCl, enfekte ve enfekte+NaCl etkisinin belirlendiği gruplardan enfekte oluşum başlamasıyla birlikte 18 günlük bitkilerden 0., 3. ve 6. saatte örnekleme yapıldı. Bitki gövde (toprak üstü organlar) örnekleri, sıvı azota alındı ve $-85\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de RNA izolasyonunun yapılacağı güne kadar saklandı.

3.3.5.1. RNA izolasyonu ve toplam RNA miktarının hesaplanması

Arabidopsis bitki gövdelerinden RNA izolasyonu için Macherey-Nagel firmasının "Nucleo Spin RNA Plant Kit" kullanıldı. Yöntem, önerilen protokole uygun olarak gerçekleştirildi. İzolasyon sırasında 100 mg taze bitki örneği sıvı azot içinde homojenizasyon çubukları yardımıyla parçalandı. İzolasyon sonrasında elde edilen RNA, ependorf tüplerinde $-85\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de saklandı.

İzole edilen toplam RNA miktarının tayini için $\text{O.D.}_{260\text{nm}}$ de spektrofotometrede okuma yapıldı. Okumada her örnek, 20 μl RNA özütünün 480 μl RNase-free H_2O ile sulandırılmasıyla yapıldı. Okuma sonunda elde edilen absorbans değerleri aşağıda belirtilen formülde yerine konularak RNA içeriği saptandı (Çizelge 7).

$$C (\mu\text{g/ml}) = \text{O.D.}_{260\text{nm}} \times 40 \times \text{sulandırma faktörü}$$

$$C (\mu\text{g/ml}) = \text{O.D.}_{260\text{nm}} \times 40 \times (500/20) = \text{O.D.}_{260\text{nm}} \times 1000$$

$$C (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \text{O.D.}_{260\text{nm}}$$

3.3.5.2. Reverse (Ters) transkripsiyon (RT) PCR

İzole edilen RNA' ların derişimleri 0,020 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ olacak şekilde RNase free H_2O ile seyreltildi. Her örnekten cDNA sentezi için 2 μl (40 ng) RNA kalıbı kullanıldı. RT-PCR işlemi sırasında "Reverse Transcriptase System" kiti (Promega) kullanıldı. Yöntem aşağıdaki çizelgede belirtildiği biçimde uygulandı (Çizelge 7).

Çizelge 7. RT-PCR sırasında izlenen yöntem

Aşama	Miktar veya süre		
1	RNA kalıbı	2 µl	
2	10 mM Kapa dNTP	4 µl	
3	10 µM Oligo-dT=98KB	1 µl	Karışım I
4	Nuclease-free H ₂ O	5 µl	
5	70 °C	5 dk	Denatürasyon
6	MgCl ₂	8 µl	
7	10X Tampon	4 µl	
8	AMV. Rev. Transcriptase	0,35 µl	Karışım II
9	Nuclease-free Water	7,65 µl	
10	20 °C	10 dk	İnkübasyon
	37 °C	59 dk	

3.3.5.3. Genlerin PCR' da çoğaltılması

PCR sırasında, Kapa firmasına ait KAPA2G™ FAST PCR kit kullanılmıştır. Çoğaltılmak istenen gen; 2 µl cDNA (40 ng), 5X tampon (MgCl₂ içinde) ilgili genin primerleri, H₂O, dNTPs, Taq polimeraz ile hazırlanan karışım içersinde PCR' da çoğaltıldı (Çizelge 8). Genlere ait çoğaltma işleminde kullanılan primerler Çizelge 9' da, PCR aşamaları ise Çizelge 10' de gösterilmektedir. Bu çalışmada, PCR döngü optimizasyonu ön denemeler yapıldıktan sonra belirlenmiştir ve referans gen hariç tüm genlerin döngü sayısı 38 olarak belirlenmiştir.

Çizelge 8. PCR' da kullanılan karışımlar

	Tampon 5X	dNTPs (10 mM)	Forward (F) Primer (6 pm/μl)	Reverse (R) Primer (6 pm/μl)	Kapa Taq enzim	H ₂ O
Miktar (μl))	2,50	0,25	0,50	0,50	0,05	6,70

Çizelge 9. Çalışmada kullanılan genlere ait primer dizileri ve PCR uygulamaları

Gen	Primer Dizisi	Bağlanma sıcaklığı	Uzama süresi	Döngü
<i>PDF1.2</i>	F 5'-TCATGGCTAAGTTTGCTTCC	52	30 sn	38
	R 5'-AATACACACGATTTAGCACC			
<i>COR78</i>	F 5'- GAAAGGAGGAGGAGGAATGG	55	1 dk	38
	R 5'- AACCAGCCAGATGATTTTGG			
<i>GOLS3</i>	F 5'-GGAGTGGTTGGTCTGGCTAA	53	30 sn	38
	R 5'-TTGGTTATCCGGTGGGTA			
<i>PR1</i>	F 5'-GTAGGTGCTCTTGTCTTCC	55	30 sn	38
	R 5'-CACATAATTCCCACGAGGATC			
<i>RD29B</i>	F 5'-GTGAAGATGACTATCTCGGTGGTC	55	30 sn	38
	R 5'-GAATCAAAAGCTGGGATGGA			
<i>GST1</i>	F 5'-CAGCCACTAGAAGAGTTCTCAT	55	30 sn	38
	R 5'-CTTGAAGTCTCCATCTTCAAAGG			
<i>COR6.6</i>	F 5'- CTGGCAAAGCTGAGGAGAAG	55	30 sn	38
	R 5'- ACTGCCGCATCCGATATACT			
<i>AT4G26410</i>	F 5'-GAGCTGAAGTGGCTTCCATGAC	63	1 dk	35
	R 5'-GGTCCGACATACCCATGATCC			

Çizelge 10. PCR’da genlerin çoğaltılması

Aşama	<i>AT4G26410</i>	<i>PDF1.2</i>	<i>COR78</i>	<i>GOLS3</i>
Ön denatürasyon	95 °C 2 dk	95 °C 2 dk	95 °C 2 dk	95 °C 2 dk
Denatürasyon	94 °C 15 sn	94 °C 15 sn	94 °C 15 sn	94 °C 15 sn
Primerlerin bağlanması	63 °C 30 sn	52 °C 30 sn	55 °C 30 sn	53 °C 30 sn
Uzama safhası	72 °C 1 dk	72 °C 30 sn	72 °C 1dk	72 °C 30 sn
Döngü sayısı	35	38	38	38
Son uzama safhası	72 °C 7 dk	72 °C 7 dk	72 °C 7 dk	72 °C 7 dk

Aşama	<i>PRI</i>	<i>RD29B</i>	<i>GST1</i>	<i>COR6.6</i>
Ön denatürasyon	95 °C 2 dk	95 °C 2 dk	95 °C 2 dk	95 °C 2 dk
Denatürasyon	94 °C 15 sn	94 °C 15 sn	94 °C 15 sn	94 °C 15 sn
Primerlerin bağlanması	55 °C 30 sn	55 °C 30 sn	55 °C 30 sn	55 °C 30 sn
Uzama safhası	72 °C 30 sn	72 °C 30 sn	72 °C 30 sn	72 °C 30 sn
Döngü sayısı	38	38	38	38
Son uzama safhası	72 °C 7 dk	72 °C 7 dk	72 °C 7 dk	72 °C 7 dk

3.3.5.4. Gen ifadesinin elektroforezde saptanması

Jel, 0,8 g agarozun 100 ml 1X TAE tamponunda 120 °C’ de eritildikten sonra 5 µl etidyum bromür ilave edilerek hazırlandı. PCR’ da çoğaltılan gen ürünü her örnek için, içinde “bromfenolblue” bulunan yükleme tamponuyla birlikte 7 µl olacak şekilde % 0,8’ lik agaroz jele yüklendi ve elektroforez işlemi, 90 volt elektrik akımında 40 dk sürede gerçekleştirildi.

UV görüntüleme sisteminde fotoğrafı çekilen jelin üzerinde meydana gelen bant ışık yoğunluğu (Maximum Optic Density (Max. O.D.)), Gel-Pro v3.0 bilgisayar programı yardımıyla saptandı ve ilgili genin bağıl gen ifadesi, referans genin (*AT4G26410*) bant ışık yoğunluğuna oranlanarak hesaplandı. Örnek hesaplama Çizelge 11’ de gösterilmektedir. Hesaplanan bu değerler, Microsoft Office Excel programı yardımıyla grafiğe dönüştürülmüştür.

Çizelge 11. Bağıl gen ifadesinin hesaplanmasının bir örnekle açıklanması

	0. saat	3. saat	6. saat
Gen Bant ışık yoğunluğu	235,28	19174,00	6269,30
Referans Gen Bant ışık yoğunluğu	13111,00	16161,00	17304,00
	A=235,28/235,28	C=19174/235,28	E=6269,30/235,28
	B=13111/13111	D=16161/13111	F= 17304/13111
Bağıl gen ifade seviyesi	= A/B	= C/D	= E/F

3.3.6. İstatistiksel analiz

Deneme iki bağımsız seri şeklinde kuruldu ve örnekleme her seriden kendi içinde üçer tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Tüm biyokimyasal ve fizyolojik veriler tek yönlü varyans analizi (One Way Anova) ile incelendi ve ortalamalar arasındaki farklılıklar Tukey-Kramer Testi ile karşılaştırıldı. $p < 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Tüm istatistiksel analizler için SPSS programı (standart sürüm 17) kullanıldı. Grafik ve tablolarda verilen sonuçlar ortalama \pm standart hatayı göstermektedir.

BÖLÜM 4

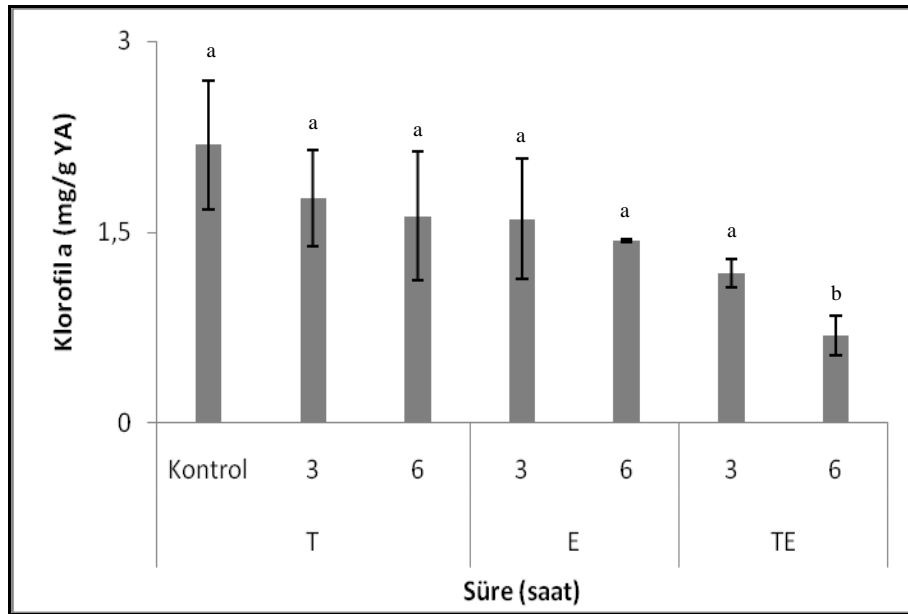
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Araştırma Bulguları

Bu bölümde *Arabidopsis* bitkisinde NaCl (T), enfekte (E) ve enfekte+NaCl (TE) uygulamalarının klorofil a, klorofil b, toplam klorofil ve karotenoid içeriklerinde; lipit peroksidasyonu seviyelerinde; SOD, POX, GR, CAT ve APX aktivitelerinde meydana getirdiği değişimler ile *COR78*, *COR6.6*, *RD29B*, *PDF1.2*, *GOLS3*, *PR1* ve *GST1* genlerin ifade değişimlerine ait sonuçlar sunulmaktadır.

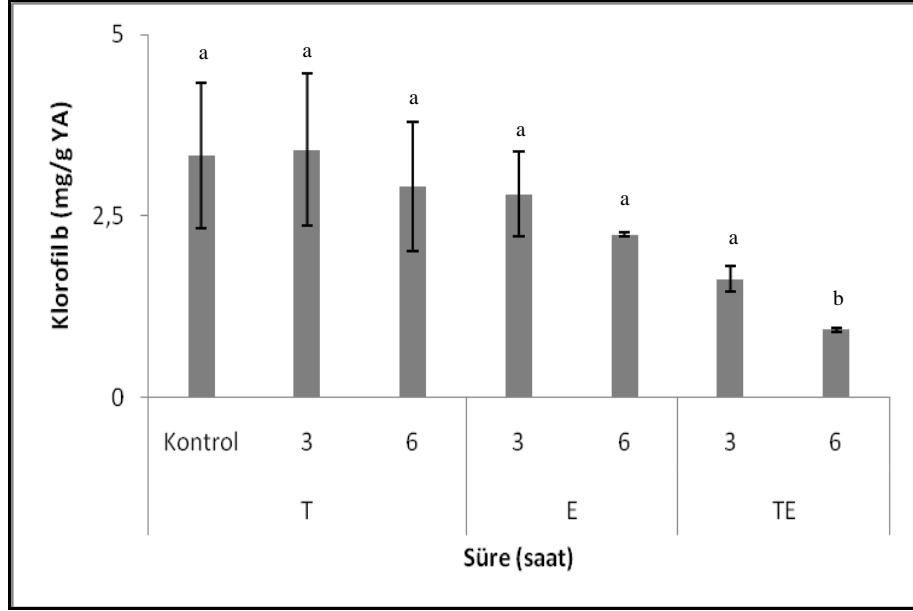
4.1.1. Fotosentetik pigment içeriği

Yapılan tüm uygulamalar klorofil a içeriğinde azalmalara neden olmuştur. T grubu *Arabidopsis* bitkilerinde kontrol bitkilerine kıyasla 3. saate % 18,81' lik, 6. saatte ise % 25,69' luk azalma saptandı. E grubu *Arabidopsis* bitkilerinin kontrol bitkilerine kıyasla klorofil a içeriği 3. saatte % 26,61' lik, 6. saatte % 34,40' lık azalma olduğu saptandı. TE grubunda 3. saatte % 48,87' lik, 6. saatte ise % 68,35' lik bir azalma olduğu saptandı (Şekil 18).



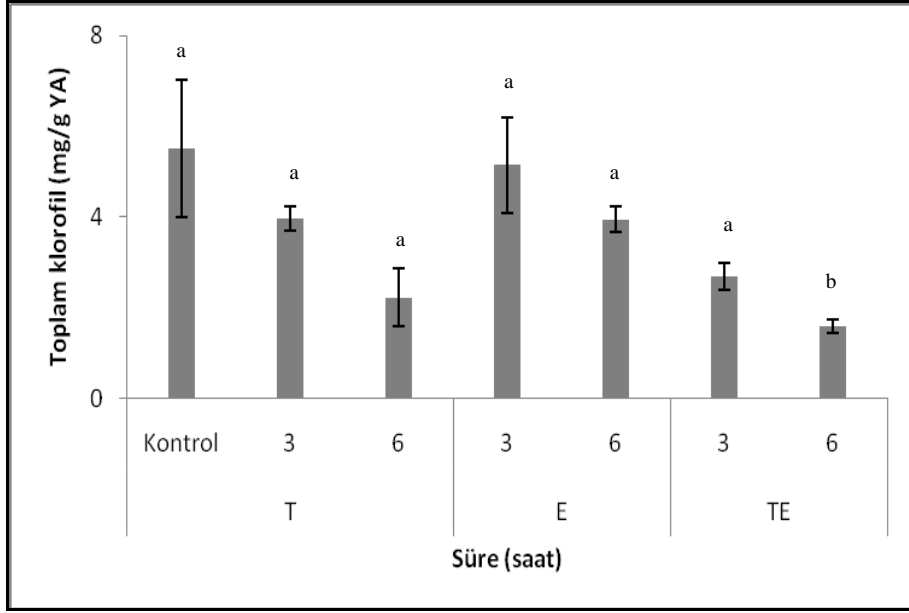
Şekil 18. Klorofil a miktarındaki değişim (mg/g YA). Değerler ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir. Ortalama değerler kendi içinde değerlendirilmiş ve sütunlar üzerinde bulunan farklı harfler arasında istatistiksel olarak önemli fark vardır ($p < 0,05$).

Klorofil b içeriği, T grubu *Arabidopsis* bitkilerinde kontrol grubuna göre 3. saate % 2,40' lık artış, 6. saatte ise % 12,91' lik azalma olduğu saptandı. E grubu *Arabidopsis* bitkilerinde kontrol bitkilerine kıyasla klorofil b içeriğinde % 15,92' lik, 6. saatte % 32,73' lük azalma olduğu saptandı. TE grubundaki bitkilerde kontrol bitkilerine kıyasla 3. saatte % 51,05' lik, 6. saatte % 72,07' lik azalma saptandı (Şekil 19).



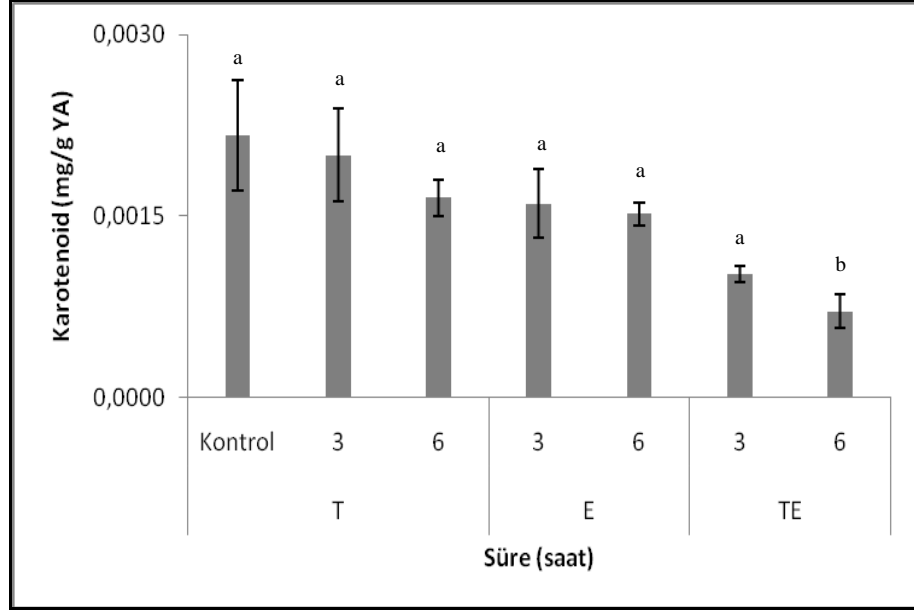
Şekil 19. Klorofil b miktarındaki değişim (mg/g YA). Değerler ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir. Ortalama değerler kendi içinde değerlendirilmiş ve sütunlar üzerinde bulunan farklı harfler arasında istatistiksel olarak önemli fark vardır ($p < 0,05$).

Arabidopsis bitkisinin toplam klorofil içeriğinde T grubu bitkilerinde kontrol bitkilerine kıyasla 3. saate % 28,08' lik, 6. saatte % 59,78' lik azalma saptandı. E grubu *Arabidopsis* bitkilerinde kontrol bitkilerine kıyasla 3. saate % 6,70' lik, 6. saatte % 28,44' lük azalma saptandı. TE grubu *Arabidopsis* bitkilerinin kontrol bitkilerine kıyasla 3. saatte % 51,27' lik, 6. saatte % 71,20' lik azalma olduğu saptandı (Şekil 20).



Şekil 20. Toplam klorofil miktarındaki değişim (mg/g YA). Değerler ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir. Ortalama değerler kendi içinde değerlendirilmiş ve sütunlar üzerinde bulunan farklı harfler arasında istatistiksel olarak önemli fark vardır ($p < 0,05$).

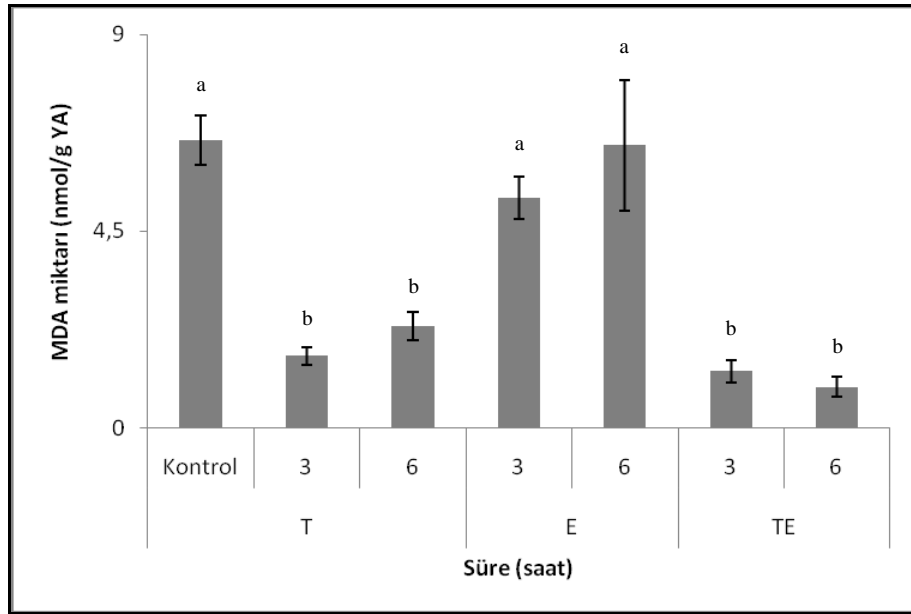
Arabidopsis bitkilerinin karotenoid içeriği, T grubu bitkilerinde 3. saatte kontrol bitkilerine kıyasla 3. saate % 9,09' luk, 6. saatte % 22,73' lük azalma olduğu saptandı. E grubu *Arabidopsis* bitkileri kontrol bitkilerine kıyasla 3. saatte % 27,27' lik, 6. saatte % 31,82' lik azalma olduğu saptandı. TE grubu bitkilerde kontrol bitkilerine kıyasla 3. saatte % 54,55' lik, 6. saatte % 68,18' lik azalma olduğu saptandı (Şekil 21).



Şekil 21. Karotenoid miktarındaki değişim (mg/g YA). Değerler ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir. Ortalama değerler kendi içinde değerlendirilmiş ve sütunlar üzerinde bulunan farklı harfler arasında istatistiksel olarak önemli fark vardır ($p < 0,05$).

4.1.2. Lipit peroksidasyonu miktarı

Arabidopsis bitkilerine tuz, enfeksiyon ve her iki stresin birlikte uygulanması sonucu bitki gövde lipit peroksidasyonu (MDA içeriği) seviyesinde meydana gelen değişimlere ait sonuçlar Şekil 22’ de gösterilmektedir. T gurubu bitkilerinin MDA içeriğinde kontrole göre 3. saatte % 75,08’ lik, 6. saatte % 64,59’ lik azalma olduğu saptandı. E grubu bitkilerin MDA içeriğinde kontrol bitkilerine kıyasla 3. saatte % 20,06’ lık, 6. saatte ise % 1,67’ lik azalma olduğu saptandı. TE grubu bitkilerin kontrol bitkilerine kıyasla 3. saatte % 80,40’ lık, 6. saatte % 85,71 oranında azalma olduğu saptandı.

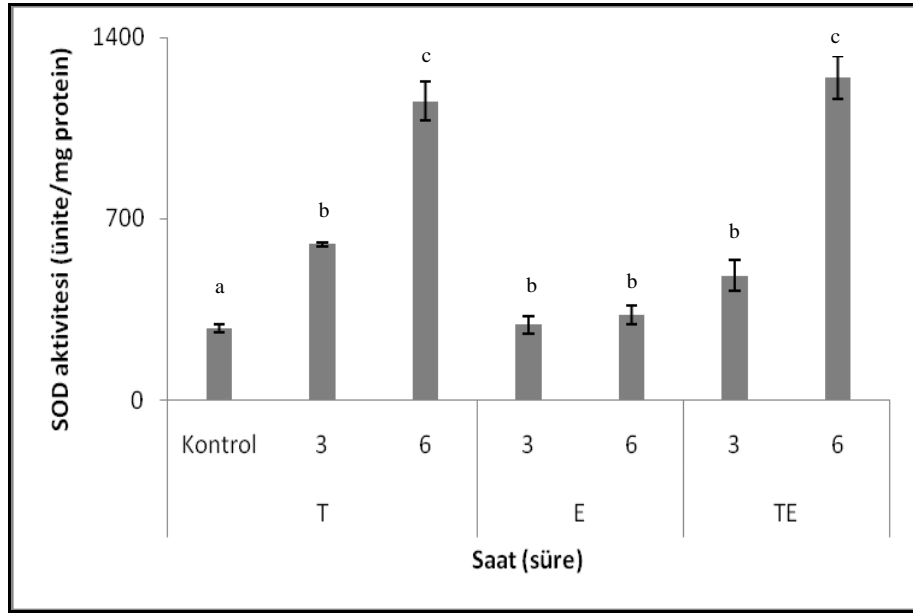


Şekil 22. MDA miktarındaki değişim (nmol/g YA). Değerler ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir. Ortalama değerler kendi içinde değerlendirilmiş ve sütunlar üzerinde bulunan farklı harfler arasında istatistiksel olarak önemli fark vardır ($p < 0,05$).

4.1.3. Antioksidan enzim aktivitesindeki değişim

4.1.3.1. SOD aktivite sonuçları

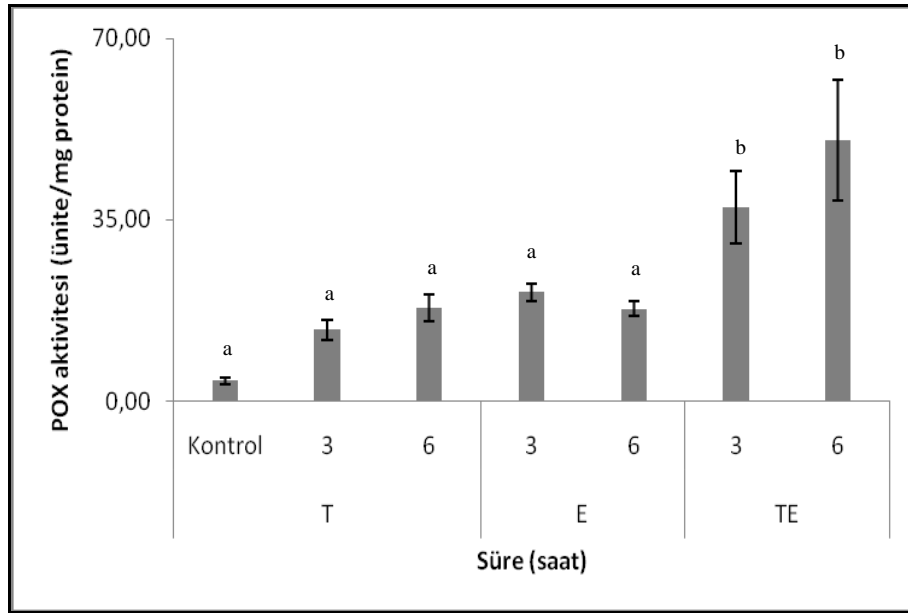
Arabidopsis bitkilerinin SOD aktivitesinde meydana gelen değişimler Şekil 23' te gösterilmektedir. T grubu bitkilerin SOD aktivitesinde kontrole göre 3. saatte % 118,24' lük, 6. saatte 3 katlık artış olduğu saptandı. E grubunda kontrole kıyasla 3. saatte % 5,32' lik, 6. saatte ise % 18,76' lık artış olduğu saptandı. TE grubu bitkilerin SOD aktivitesinde kontrole kıyasla 3. saatte % 74,19' luk, 6. saatte 3,5 katlık artış olduğu saptandı.



Şekil 23. SOD aktivitesinde meydana gelen değişim (ünite/mg protein). Değerler ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir Ortalama değerler kendi içinde değerlendirilmiş ve sütunlar üzerinde bulunan farklı harfler arasında istatistiksel olarak önemli fark vardır ($p < 0,05$).

4.1.3.2. POX aktivite sonuçları

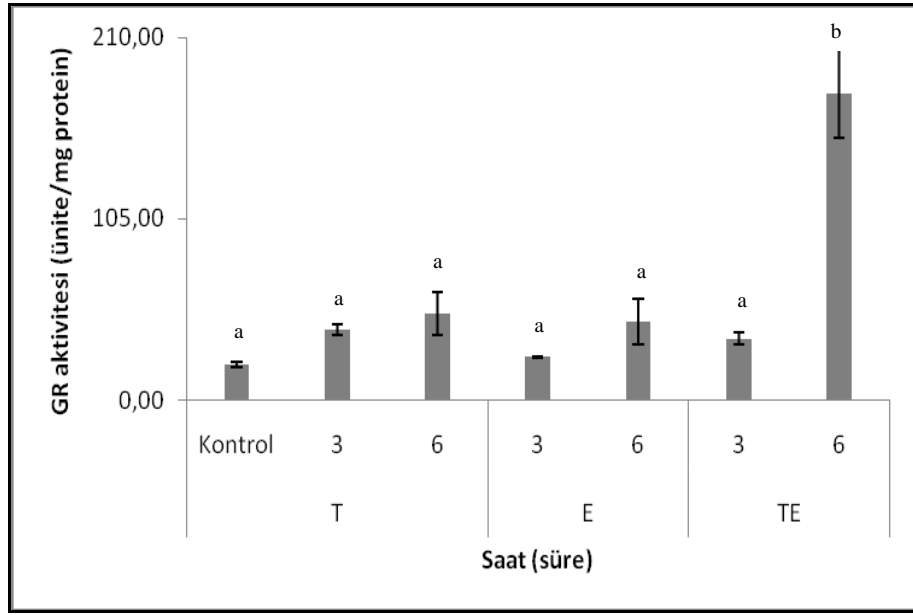
Arabidopsis bitkilerinin POX aktivitesinde meydana gelen değişimler Şekil 24' de gösterilmektedir. T grubu bitkilerin POX aktivitesinde kontrole göre 3. Saatte 2,5 katlık, 6. saatte 3,5 katlık artış olduğu saptandı. E grubu bitkilerde kontrole kıyasla 3. saatte 4,5 kat 6. saatte 3,5 kat artış olduğu saptandı. TE grubu bitkilerinde kontrole kıyasla POX aktivitesinde 3. saatte 8,5 kat arttığı 6. saatte ise artışın 12 kat seviyesine ulaştığı saptandı.



Şekil 24. POX aktivitesinde meydana gelen değişim (ünite/mg protein). Değerler ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir Ortalama değerler kendi içinde değerlendirilmiş ve sütunlar üzerinde bulunan farklı harfler arasında istatistiksel olarak önemli fark vardır ($p < 0,05$).

4.1.3.3. GR aktivite sonuçları

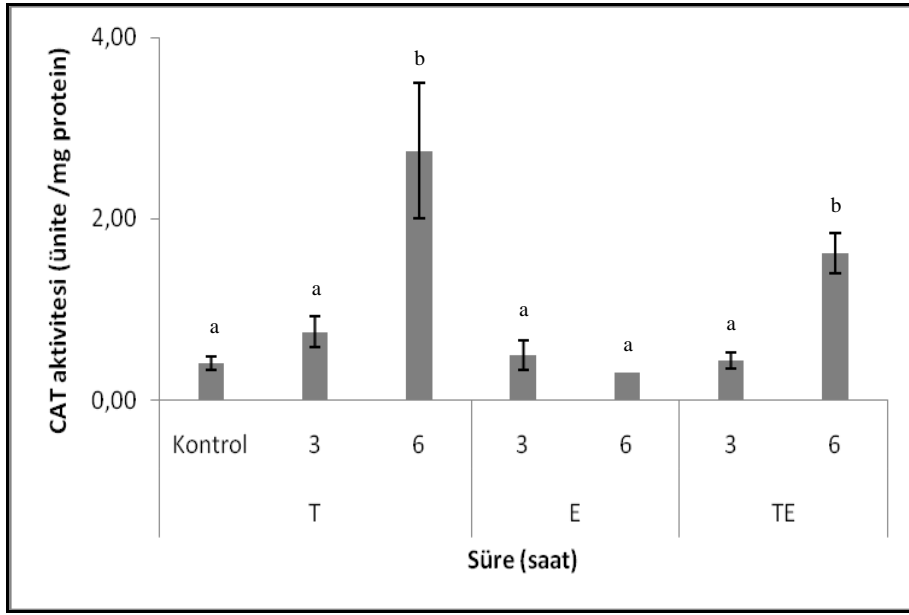
Arabidopsis bitkilerinin GR aktivitesinde meydana gelen değişimler Şekil 25' te gösterilmektedir. T grubu bitkilerin GR aktivitesinde kontrole göre 3. saatte % 99,66' lık, 6. saatte ise % 145,81' lik artış olduğu saptandı. E grubu bitkilerde kontrole göre GR aktivitesinde 3. saatte % 21,68' lik, 6. saatte % 123,34' lük artış olduğu saptandı. TE bitkilerinde GR aktivitesinin kontrole göre 3. saatte % 74,40 6. saatte ise 7,7 kat arttığı saptandı.



Şekil 25. GR aktivitesinde meydana gelen değişim (ünite/mg protein). Değerler ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir. Ortalama değerler kendi içinde değerlendirilmiş ve sütunlar üzerinde bulunan farklı harfler arasında istatistiksel olarak önemli fark vardır ($p < 0,05$).

4.1.3.4. CAT aktivite sonuçları

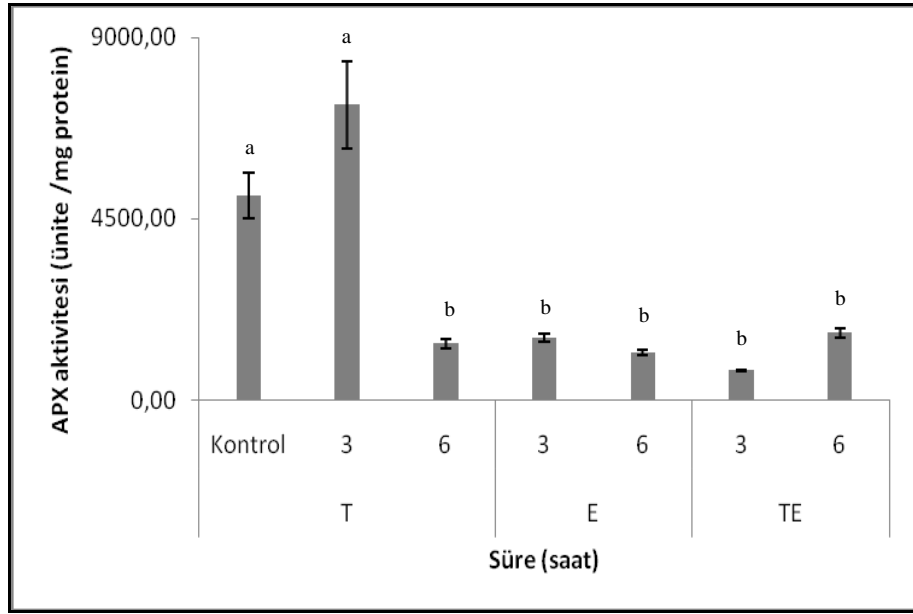
Arabidopsis bitkilerinin CAT aktivitesinde meydana gelen değişimler Şekil 26' da gösterilmektedir. T grubu bitkilerde CAT aktivitesinin kontrole göre 3. saatte % 87,50 oranında, 6. saatte ise 5,8 kat arttığı saptandı. E grubu bitkilerde enzim aktivitesinin kontrole göre 3. saatte % 22,50' lik 6. saatte ise % 25' lik azaldığı saptandı. TE grubu bitkilerinde ise kontrole göre enzim aktivitesinde 3. saatte % 10 artış saptanmasına karşın bu artışın 6. saatte 3 katlık bir seviyeye ulaştığı saptandı.



Şekil 26. CAT aktivitesinde meydana gelen değişim (ünite/mg protein). Değerler ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir. Ortalama değerler kendi içinde değerlendirilmiş ve sütunlar üzerinde bulunan farklı harfler arasında istatistiksel olarak önemli fark vardır ($p < 0,05$).

4.1.3.5. APX aktivite sonuçları

Arabidopsis bitkilerinin APX aktivitesinde meydana gelen değişimler Şekil 27' de gösterilmektedir. T grubu bitkilerde APX aktivitesinde kontrole göre 3. saatte % 44,30' luk artış saptanmasına karşın 6. saatte % 72,49' lik azalma meydana geldiği saptandı. E grubu bitkilerin enzim aktivitesinde kontrole kıyasla 3. saatte % 69,51' lik, 6. saatte % 76,59' luk artış olduğu saptandı. TE grubu bitkilerin enzim aktivitesinde 3. saatte % 85,57' lik, 6. saatte % 67,21' lik azalma olduğu saptandı.



Şekil 27. APX aktivitesinde meydana gelen değişim (ünite/mg protein). Değerler ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir. Ortalama değerler kendi içinde değerlendirilmiş ve sütunlar üzerinde bulunan farklı harfler arasında istatistiksel olarak önemli fark vardır ($p < 0,05$).

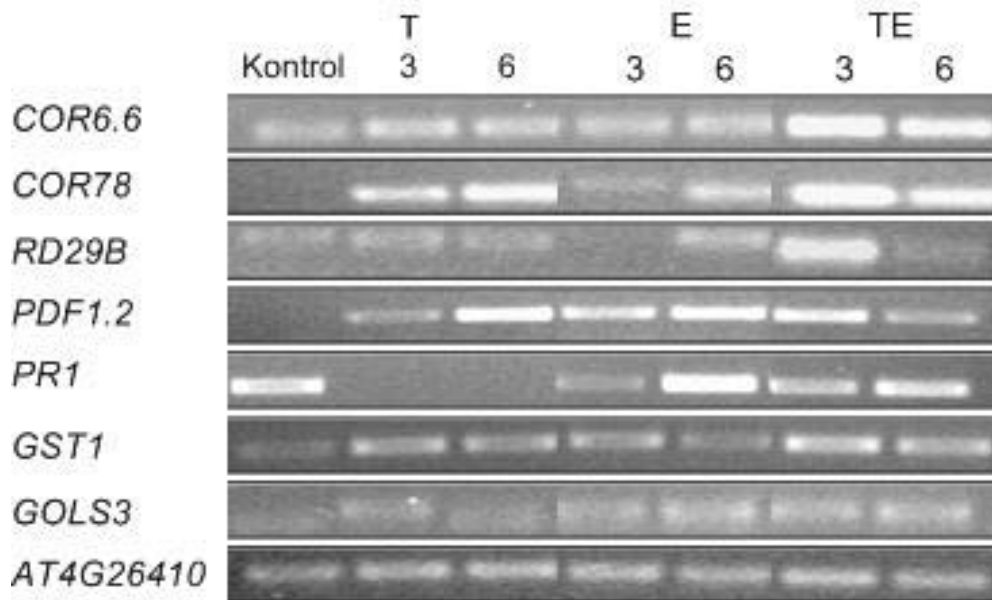
4.1.4. Gen ifadesinde meydana gelen değişimler

Kuraklık, yüksek tuzluluk ve soğuk stresi gibi koşullarda ifade bulan birçok genin, hücrelerin işlevlerinin korunması sırasında etkin bir şekilde çalıştığı saptanmıştır. Bu çalışmada, *COR6.6*, *COR78*, *RD29B*, *GOLS3*, *GST1*, *PR1* ve *PDF1.2* genlerinin ifade düzeyi incelendi. Çalışmada referans gen olarak *AT4G26410* kullanılmıştır. Bitki gövdelerinden yapılan RNA izolasyonu sonucunda Çizelge 12’ de belirtilen miktarlarda toplam RNA izole edilmiştir.

Çizelge 12. Bitki özütlerinden elde edilen RNA miktarları

		T		E		TE	
Saat	0	3	6	3	6	3	6
µg/µl	0,054	0,031	0,022	0,020	0,023	0,028	0,029

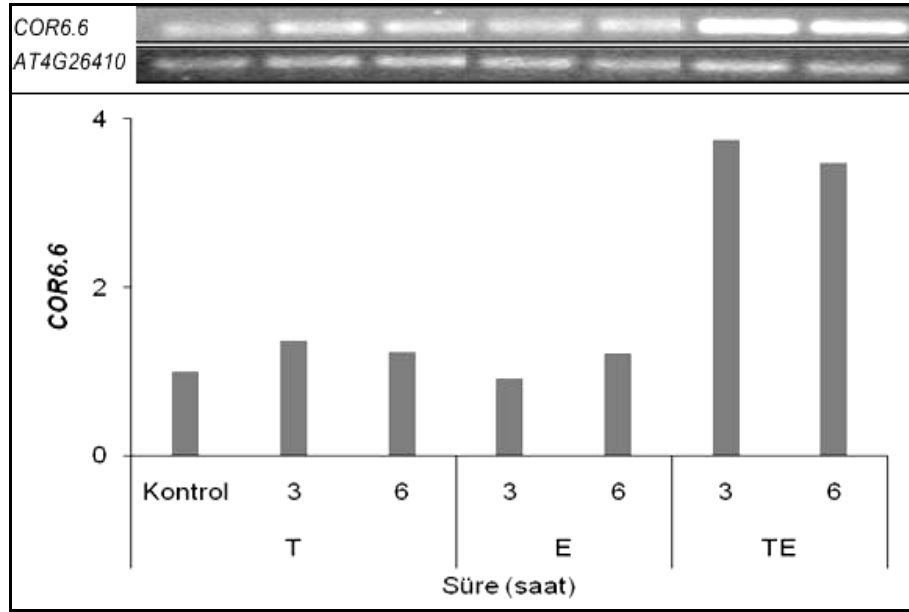
RT-PCR işlemi için RNA özütleri, en düşük konsantrasyon seviyesinde seyreltilir ve 2 µl RNA, cDNA sentezi için kalıp olarak kullanılır. Sentezlenen cDNA, her genin ifade seviyesinin belirlenmesi için kullanılmıştır. Genlerin PCR ürünlerine ait bant ışık yoğunlukları Şekil 28’ de gösterilmektedir.



Şekil 28. PCR sonucu genlere ait jel görüntüleri.

4.1.4.1. COR6.6 gen ifade sonuçları

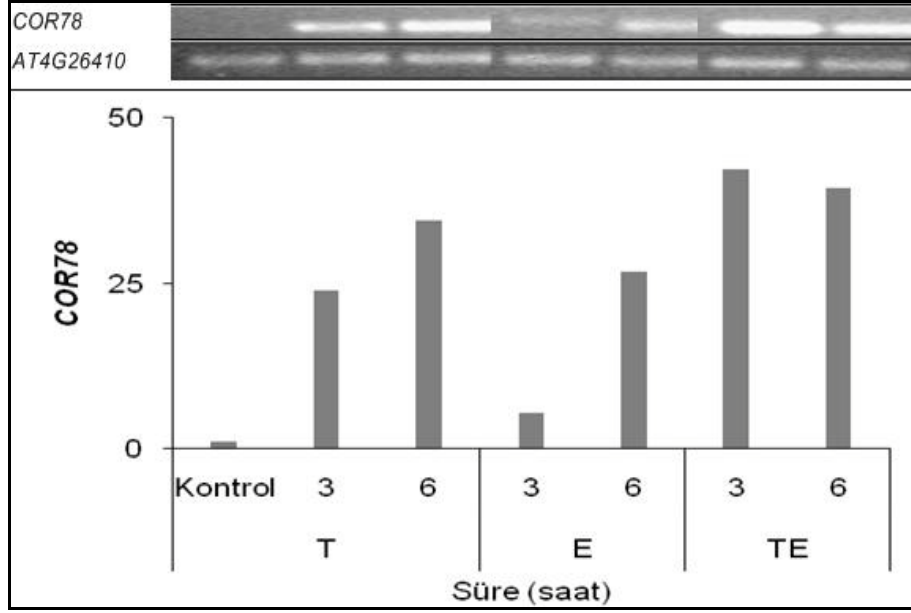
Arabidopsis bitkisinin T, E ve TE gruplarında *COR6.6* gen ifadesinde meydana gelen değişimler Şekil 29’ da gösterilmektedir. T grubu bitkilerinde kontrole göre *COR6.6* gen ifadesinde 3. saatte % 37’ lik, 6 saatte % 23’ lük artış olduğu saptandı. E grubu bitkilerin kontrole göre *COR6.6* gen ifadesinde 3. saatte % 8 azalma, 6. saatte ise % 22 artış olduğu saptandı. TE grubu bitkilerin kontrole göre gen ifadesinde 3. saatte 2,8 katlık, 6. saatte 2,5 katlık artış olduğu saptandı.



Şekil 29. *COR6.6* genine ait bağıl gen ifadesinde meydana gelen değişim.

4.1.4.2. COR78 gen ifade sonuçları

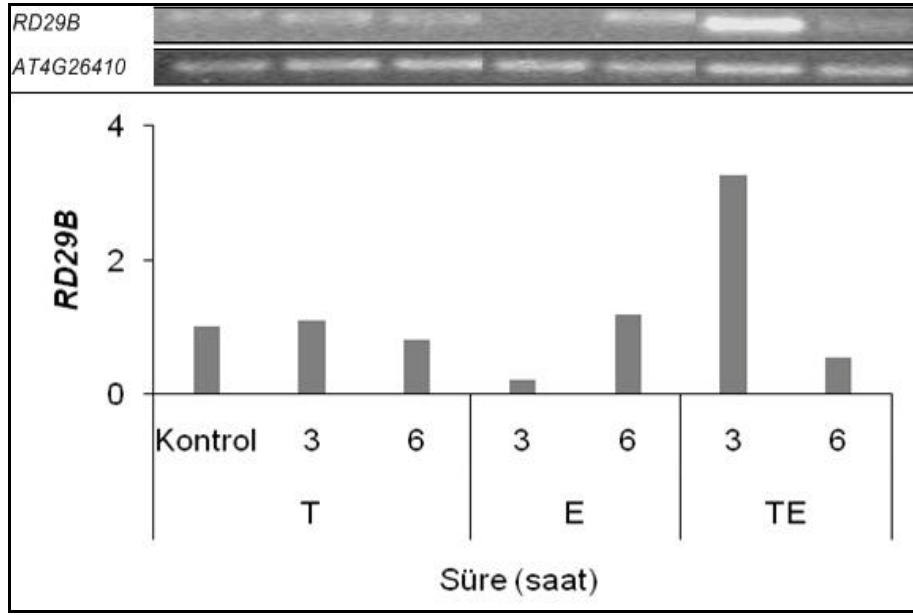
Arabidopsis bitkisinin *COR78* gen ifadesinde meydana gelen değişimler Şekil 30' da gösterilmektedir. T grubu bitkilerin *COR78* gen ifadesinde kontrole göre 3. saatte 23 kat, 6 saatte 33 kat artış olduğu saptandı. E grubu bitkilerde kontrole göre 3. saat gen ifadesinde 4,4 kat, 6. saatte ise yaklaşık 26 kat artış olduğu saptandı. TE grubunda bu genin ifadesinde 3. saatte 41 kat, 6. saatte ise 38 kat artış olduğu saptandı.



Şekil 30. *COR78* genine ait bağıl gen ifadesinde meydana gelen değişim.

4.1.4.3. *RD29B* gen ifade sonuçları

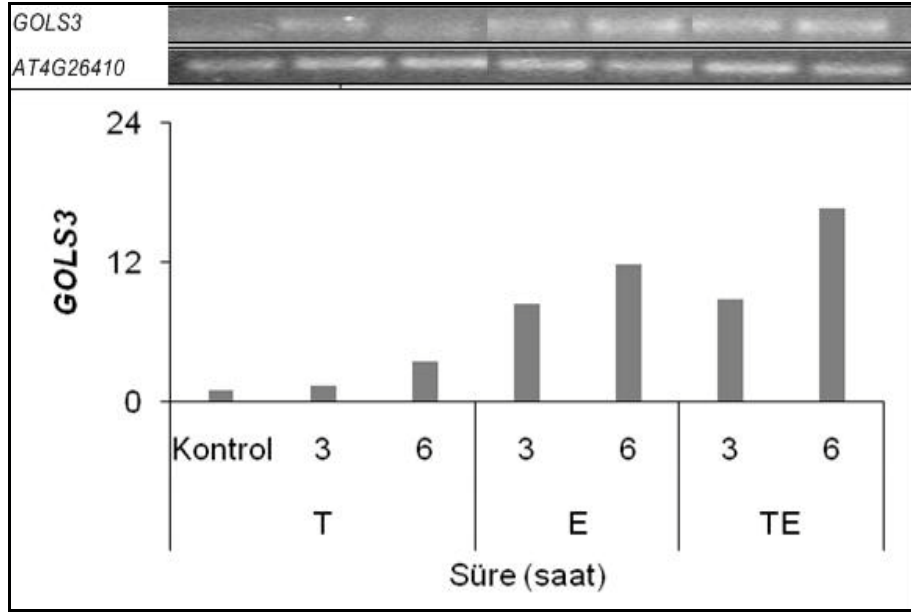
Bu çalışmada *RD29B* geninin bağıl gen ifadesiyle ilgili olan değişimler Şekil 31’ de gösterilmektedir. T grubu bitkilerinde kontrole göre *RD29B* gen ifadesinde 3. saatte % 9 artış saptanmasına rağmen 6. saatte % 18 azalma saptandı. E grubu bitkilerinde kontrole göre 3. saatte bu genin ifadesinde % 79’ lık azalma saptanırken 6. saatte % 19 artış saptandı. TE grubu bitkilerin kontrole göre gen ifadesinde 3. saatte yaklaşık 2,3 kat artış saptanırken 6. saatte % 46 azalma saptandı.



Şekil 31. *RD29B* genine ait bağıl gen ifadesinde meydana gelen değişim.

4.1.4.4. *GOLS3* gen ifade sonuçları

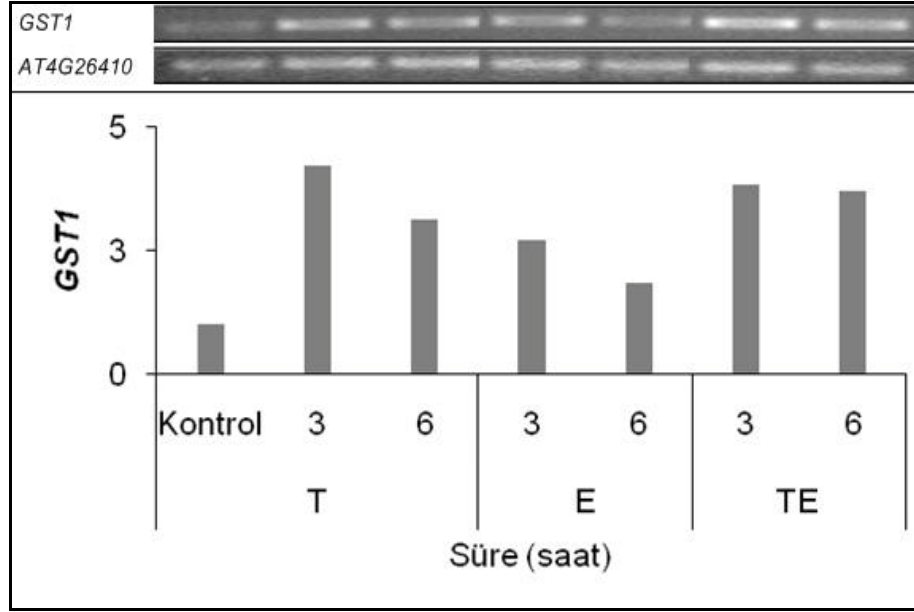
Bu etkileşim sırasında *GOLS3* gen ifadesinde meydana gelen değişimler Şekil 32' de gösterilmektedir. T grubunda *GOLS3* geninin ifadesinde 3. saatte % 38 artış saptanırken 6. saatte 2,5 kat artış saptandı. E grubu bitkilerin gen ifadesinin kontrole göre 3. saatte 7,5 kat, 6. saatte 10,8 kat arttığı saptandı. TE grubu bitkilerin gen ifadesinin kontrole göre 3. saatte 7,8 kat, 6. saatte ise 15,7 kat artış olduğu saptandı.



Şekil 32. *GOLS3* genine ait bağıl gen ifadesinde meydana gelen değişim.

4.1.4.5. *GST1* gen ifade sonuçları

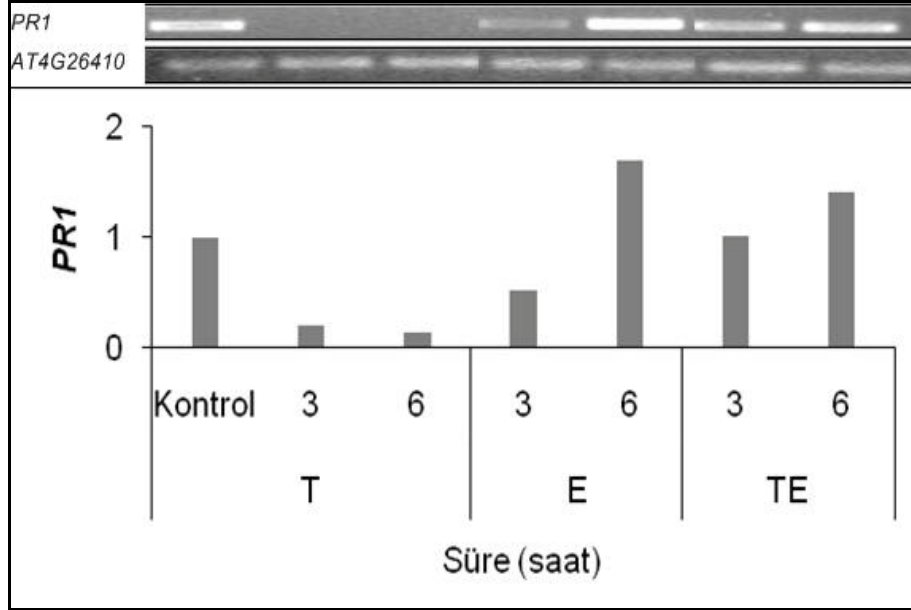
Çalışmada *GST1* geninin ifadesinde meydana gelen değişimler Şekil 33' de gösterilmektedir. T grubu bitkilerin kontrole kıyasla *GST1* gen ifadesinde 3. saatte 3 kat 6. saatte 2 kat arttığı saptandı. E grubu bitkilerin kontrole kıyasla gen ifadesinde 17 kat, 6. saatte % 86' lık artış saptandı. TE grubu bitkilerin kontrole kıyasla 3. saatte gen ifadesinde 2,9 kat, 6. saatte 2,7 kat artış olduğu saptandı.



Şekil 33. *GST1* genine ait bağıl gen ifadesinde meydana gelen değişim.

4.1.4.6. *PR1* gen ifade sonuçları

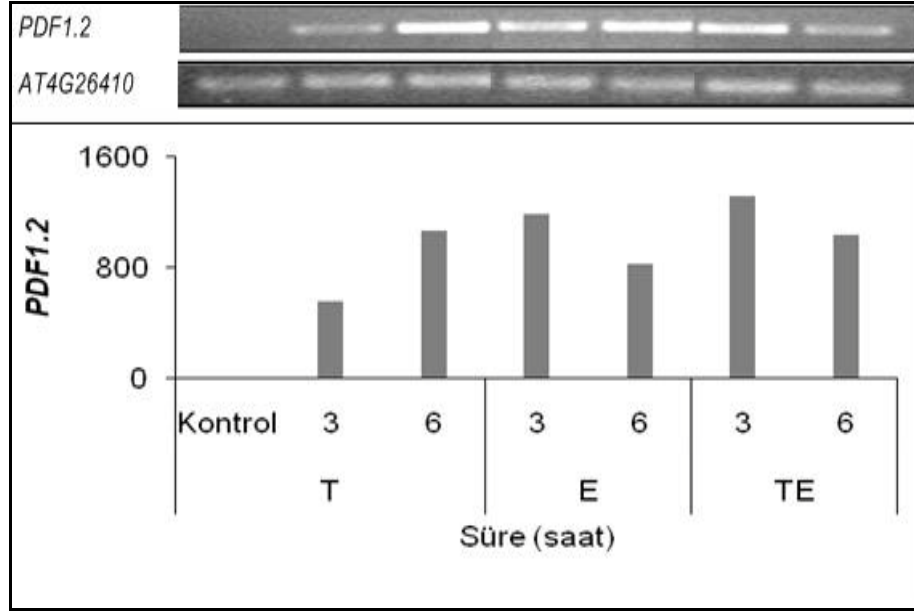
PR1 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler Şekil 34' te gösterilmektedir. T grubu bitkilerin kontrole kıyasla gen ifadesinde 3. saatte % 79, 6. saatte % 85 azalma olduğu saptandı. E grubu bitkilerin kontrole kıyasla ise gen ifadesinde 3. saatte % 48 azalma, 6. saatte ise % 70 artış olduğu saptandı. TE grubu bitkilerin kontrole kıyasla 3. saatte gen ifadesinde % 2 artış saptanırken bu oranın 6. saatte % 41 olduğu saptandı.



Şekil 34. *PR1* genine ait bağıl gen ifadesinde meydana gelen değişim.

4.1.4.7. PDF1.2 gen ifade sonuçları

PDF1.2 geninin ifadesinde meydana gelen değişimler Şekil 35' te gösterilmektedir. Bu genin ifadesinin, T grubu bitkilerin kontrole göre 3. saatte 560 kat, 6. saatte ise 1064 kat arttığı saptandı. E grubu bitkilerin gen ifadesinin kontrole göre 3. saatte 1187 kat, 6. saatte ise 827 kat arttığı saptandı. TE grubu bitkilerin gen ifadesinin kontrole kıyasla 3. saatte 1319 kat, 6. saatte ise 1034 kat arttığı saptandı.



Şekil 35. *PDF1.2* genine ait bağıl gen ifadesinde meydana gelen değişim.

4.1.5. İstatistiksel sonuçlar

Arabidopsis-canavar otu-tuz etkileşiminde elde edilen fizyolojik ve biyokimyasal verilerin (klorofil a, klorofil b, toplam klorofil, karotenoid ve MDA içeriği; SOD, POX, GR, CAT ve APX aktivitelerinin) istatistiksel karşılaştırması Çizelge 13' de verilmektedir. Rakamlar % 5 seviyesindeki F değerlerini temsil etmektedir (**p<0,001; *p<0,01; *p<0,1).

Çizelge 13. Tüm verilerin, tek yönlü varyans analiz (ANOVA) sonuçları

İncelenen parametre	Ortalama kareler	F değeri
Klorofil a	4,076	1,371
Klorofil b	15,33	1,459
Toplam klorofil	39,348	3,768*
Karotenoid	0,0000056	2,874**
MDA	171,60	31,636***
SOD	3331578,93	61,719***
POX	4246,86	7,15**
GR	54833,37	24,152***
CAT	13,27	7,88***
APX	99398103,73	69,907***

4.2. Tartışma

Duyarlı olduğu bilinen tütün ve ayçiçeği gibi bitki çeşitlerinde iki bitkinin etkileşimi sırasında yapraklarda klorozis görüldüğü ancak yaprak sayısında ise herhangi bir azalma gözlenmediği belirtilmiştir (Elzein ve Kroschel, 2003). Pigment içeriğiyle ilgili saptanan bulgular, özellikle TE grubunda enfeksiyonla belirmeye başlayan düşüşün NaCl etkisiyle şiddetlendiğini göstermektedir.

Arabidopsis bitkisine çalışma sırasında yapılan tüm uygulamalar sonucunda, kontrole kıyasla uygulama gruplarının bitki pigment içeriğinde zamana bağlı olarak azalma olduğu, ancak istatistiksel olarak en anlamlı düşüşün, TE grubunun 6. saatinde gerçekleştiği saptandı. Bu sonuçlara göre *Arabidopsis* bitkisinin pigment içeriğindeki azalmanın, fotosistemlerin hücresel düzeyde meydana gelen ROT' in zararlı etkisini engellemek için çevresel streslere karşı bir uyum mekanizması olduğu (Kranner ve ark., 2002) bilgisiyle uyumludur.

Tuz stresi; fotosentez sürecinde bozulmaya, fotorespirasyonda artışa, hücrelerin iyon dengesinin değişmesine ve ROT' nin oluşumunda artışa neden olur. Normal bitki büyümesi sırasında kloroplastta, mitokondride, peroksizomlarda ve apoplastta düşük miktarda oluşan ROT' i sinyal molekülü olarak işlev görebildiği gibi bu moleküllerin seviyesi arttıkça hücresel yapılarda toksik etki oluşur (Blokhina ve ark., 2003; Miller ve ark., 2010).

T, E ve TE gruplarında *Arabidopsis* bitkisinin antioksidatif savunma sistemi enzimlerindeki ve MDA içeriğindeki değişimlere ait sonuçlar Şekil 22-27' de gösterilmektedir. Bu verilere göre, T grubu bitkilerinde kontrol bitkilerine göre *Arabidopsis* savunma sisteminin uyarıldığı ve bunun sonucu olarak MDA içeriğinde anlamlı seviyede azalma olduğu saptandı. E grubu bitkilerinde SOD, POX ve GR aktivitesinde anlamlı artış olmasına rağmen MDA miktarında istatistiksel olarak anlamsız değişimler saptandı. TE grubu bitkilerinde, MDA miktarı azalırken SOD, POX, GR ve CAT aktivitesinde artış olduğu saptandı.

H₂O₂ üretiminin temel kaynaklarının; fotorespirasyon sırasında peroksizomlarda gliksilat oluşurken, kloroplast tilakoyit zarlarında ve apoplastta O₂⁻ radikalinin SOD ile dismutasyonu sırasında ve stromada askorbat-glutatyon döngüsü sırasında olduğu bilinmektedir (Miller ve ark., 2010). Fenton reaksiyonu sonucunda üretilen OH[·] radikali

gibi H_2O_2 ' in de bitki membranlarında lipit peroksidasyonuna neden olduğu bilinmektedir (Noctor ve Foyer, 2009).

Önceki çalışmalarda POX enziminin canavar otu bitkilerinin radikula uç kısımlarında sentezlendiği ve oluşan peroksidazların kökçük çevresine salınarak konukçu bitkinin kök hücrelerinin hücre duvarının yapısını bozduğu saptanmıştır. Bu şekilde parazit bitkinin, konukçu köküne yapışması ve buradaki gelişimine olanak sağladığı belirtilmektedir (Antonova ve Ter Borg, 1996; González-Verdejo ve ark., 2006). Diğer çalışmalarda ise konukçu bitkinin POX aktivitesinde ortaya çıkan azalışın o bitki için duyarlılığı, artışın ise dayanıklılığı işaret ettiği de bilinmektedir (Goldwasser ve ark., 1999; Castillejo ve ark., 2004; Levine, 2004; Pérez-de-Luque ve ark., 2005; Demirbaş ve Acar, 2008). Bu çalışmanın E ve TE gruplarında meydana gelen SOD, POX, CAT ve GR enzim aktivitelerindeki artış, yapışma sonrasında konukçu köklerinde oluşan H_2O_2 ' in detoksifiye edilmeye çalışıldığını düşündürmektedir.

Bitkilerin normal büyüme koşulları dahil birçok çevresel baskının olduğu durumda, moleküler oksijenin kısmen indirgenmesi sonucu ROT oluşmaktadır (Scandalios, 1997). Bu çalışmada, oluşan ROT'un temizlenmesinde SOD, POX, GR ve CAT enzimlerinin etkili oldukları saptanmıştır. Bu süreçte *Arabidopsis* bitkisinde en az 152 genin etkileşim içinde olduğu bilinmektedir (Heidarvand ve Amiri, 2010). Bunlardan *GST1* geninin ise oksidatif stresin bir indikatörü olduğu bilinmektedir (Vieria Dos Santos ve ark., 2003b). T ve E grubu *Arabidopsis* bitkilerinde *GST1* geninin ifadesi kontrol bitkilere kıyasla 3. saatte artmasına rağmen 6. saatte azalmıştır. Ancak TE grubu bitkilerde ise *GST1* gen ifadesindeki artış 6. saate kadar korunmuştur.

Bu çalışmada araştırılan *COR78*, *COR6.6*, *GOLS3* ve *RD29B* genlerinin ifadesinde meydana gelen değişimler, E ve TE gruplarında yapılan uygulamalar için ilk kez çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlar, tüm gruplarda *Arabidopsis* bitkilerinde *RD29B* dışında *COR78*, *COR6.6* ve *GOLS3* genlerinin ifadesinde zamana bağlı olarak artış meydana geldiğini göstermektedir. *RD29B* geninin E grubunun 6. saati ile TE grubunda 3. saatte yüksek seviyede ifade bulmasına karşın diğer örnekleme zamanlarında bu genin etkili bir şekilde uyarılmadığı saptanmıştır. Bu sonuçlar, enfeksiyon sürecinde ve enfekte bitkilere yapılan NaCl uygulaması sonrasında hidrofilik proteinler ve ozmoprotektan oligosakkaritlerin sentezlendiği (Horvath ve ark., 1993), aynı zamanda biyotik ve abiyotik

stres koşulları altında galaktinol ve rafinoz gibi şekerlerin birikiminde galaktinol sentazın da (Nishizawa ve ark., 2008) görevi olduğuna işaret etmektedir.

PDF1.2 geninin etilen ve JA yanıt geni olduğu (Penninckx ve ark., 1998) bilinmektedir. T grubunda bu genin ifadesinde artış olduğu saptanmıştır. Buna zıt olarak Taji ve ark., (2004) ise *Arabidopsis* bitkisinin Col. ekotipiyle yaptıkları araştırmada, bitkilere 250 mM NaCl uygulamasının *PDF1.2* geninin ifadesini baskıladığını saptamışlardır. E grubundaki gen ifadesindeki artış ise Vieira Dos Santos ve ark. (2003b)'nın çalışmasıyla benzerlik göstermektedir. TE grubu bitkilerin gen ifadesindeki artış bu çalışmayla ilk kez ortaya konmaktadır. TE grubu bitkilerin gen ifadesinde meydana gelen artış, tuz ve enfeksiyonun bu genin uyarılmasına neden olduğunun bir göstergesidir. Bitkilerin bakteri ve mantar gibi patojenlere karşı korunmasında, JA yolağının *PDF1.2* genin uyarılmasıyla tetiklendiği (Edreva, 2005) bilinmektedir. Bu bağlamda, *Arabidopsis* bitkilerinde gerçekleştirilen uygulamaların, JA' e bağlı savunma yolağının kullanımını tetiklediği akla gelmektedir.

PRI genin domates ve tütün (Niderman ve ark., 1995) gibi konukçu birçok bitkide antifungal özellik göstererek bitkiyi mantarlara karşı koruduğu belirtilmektedir. Bu çalışmada tuz uygulamasının *PRI* geninin ifadesini baskıladığı, E ve TE gruplarında 6. saatte ifade seviyesinde kontrole göre artış olduğu saptandı. Bu sonuçlar, enfeksiyon sürecinde *PRI* genini ifade olduğu Joel ve Portinoy (1998), Westwood ve ark. (1998) ile Leon-Reyes ve ark. (2010) çalışmalarıyla uyumludur.

BÖLÜM 5**SONUÇLAR VE ÖNERİLER**

Çevresel baskılar ve nüfus artışının hızlı bir şekilde devam ettiği dünyamızda, parazit bitkilerin tarım ürünlerinde neden olduğu verim kayıpları her geçen gün önemini giderek arttırmaktadır. Tuz ise başlı başına büyük bir sorun olarak tarımsal verimi sınırlandıran küresel bir sorundur (Munns ve Tester, 2008). Bitki araştırmalarında model bir organizma olarak kullanılan *Arabidopsis* bitkisinde tuz ve enfeksiyona bağlı stres etkileri bu araştırmayla ilk defa birlikte ortaya konmaktadır.

Arabidopsis bitkisine *P. ramosa* enfeksiyonu başlangıcında oluşan oksidatif hasarın, antioksidan enzimlerden özellikle SOD, POX ve GR enzimleri sayesinde giderilmeye çalışıldığı saptanmıştır.

P. ramosa enfeksiyonu sürecindeki *Arabidopsis* bitkilerine yapılan 100 mM NaCl uygulamasının tek başına yapılan tuz uygulamasına paralel şekilde antioksidan enzimlerin aktivitesini (APX hariç) arttırdığı saptanmıştır.

GST1 geninin kontrol bitkilerine kıyasla ifadesinde meydana gelen artış, bitkilerin oksidatif strese maruz kaldığının bir göstergesi olarak değerlendirilebilir.

PDF1.2 geninin ifadesinde meydana gelen artış, bu genin NaCl, enfeksiyon ve enfeksiyonla birlikte NaCl uygulamasının, etilen ve JA yolağına bağlı savunma sistemini uyardığına işaret ediyor olabilir.

Bu çalışmada incelenen genlerden *COR78*, *COR6.6*, *GOLS3* ve *RD29B* bu etkileşim için ilk kez çalışılmış olmaktadır.

COR78 geninin her uygulamada uyarılmış olması, bitkinin su stresine girmiş olduğunu ve gen ifadesinde meydana gelen artış ile bu stresi tolere etmeye çalıştığının bir göstergesi olarak kabul edilebilir.

Bu araştırmada elde edilen sonuçların, parazit bitkilerin konukçuları ile olan etkileşiminin aydınlatılmasına ve parazit bitkilerin kontrolüne katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

A. thaliana ekotip Ws. ile *P. ramosa* arasındaki etkileşimin daha kapsamlı olarak ve tuz stresinin yanında farklı stres faktörlerinin de etkilerinin anlaşılması için; mikrodizi

analiz yöntemi kullanılarak özellikle antioksidan enzimleri kodlayan genlerin ifadesinde meydana gelen değişimler ile bu etkileşimde daha fazla sayıda genin ne şekilde uyarıldığına dönük daha geniş çaplı bir çalışma yapılabilir.

KAYNAKLAR

- Antonova T.S., Ter Borg S.J., 1996. The Role of Peroxidase in The Resistance of Sunflower against *Orobanche cumana* in Russia. *Weed Research* 36 (2): 113-121.
- Arnon D.I., 1949. Copper Enzymes in Isolated Chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, 24: 1-15.
- Ballou S.M., Yun K.Y., Cheng C. ve De Los Reyes B.G., 2007. Cold Sensitivity Gradient in Tuber-Bearing *Solanum* Based on Physiological and Transcript Profiles. *Crop Sci.* 47: 2027-2035.
- Batchvarova R.B., Slavov S.B. ve Bossolova S.N., 1999. In Vitro Culture of *Orobanche ramosa*. *Weed Research*, 39: 191-197.
- Beauchamp C. ve Fridovich I., 1971. Superoxide Dismutase: Improved Assay and Applicable to Acrylamid Gels. *Anal. Biochem.*, 44, 276-287.
- Bergmeyer N., 1970. Methoden der Enzymatischen Analyse. Vol.1, *Akademia Verlag*, Berlin, 636-647.
- Blokhina O., Virolainen E. ve Fagerstedt K.V., 2003. Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: a Review. *Annals of Botany*, 91: 179-194.
- Botella M.A., Rosado A., Bressan R.A. ve Hasegawa P.M., 2005. Plant Adaptive Responses to Salinity Stress. In: Jenks M.A ve Hasegawa P.M., Eds. *Plant Abiotic Stress*. Blackwell, Oxford. 37-39.
- Bowling S.A., Guo A., Cao H., Gordon S., Klessig D.F. ve Dong X., 1994. A Mutation in *Arabidopsis* That Leads to Constitutive Expression of Systemic Acquired Resistance. *The Plant Cell*, 6: 1845-1857.
- Bradford M.M., 1976. A Rapid And Sensitive Method for The Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing The Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.
- Castillejo M.A., Amiour N., Dumas Gaudot E., Rubiales D. ve Jorrín J.V., 2004. A proteomic approach to studying plant response to crenate broomrape (*Orobanche crenata*) in pea (*Pisum sativum*). *Phytochem.*, 65: 1817-1828.

- Cullen P., 2003. Salinity. In: Attiwill, P. and Wilson, B. Eds. *Ecology-An Australian Perspective*, Oxford University Press, Melbourne, Australia. 474-488.
- Dat J., Vandenaabeele S., Vranová E., Montagu M.V., Inzé D. ve Breusegem F.V., 2000. Dual Action of The Active Oxygen Species During Plant Stress Responses. *Cell. Mol. Life Sci.*, 57: 779–795.
- Demirbaş S. ve Acar O., 2008. Superoxide Dismutase and Peroxidase Activities from Antioxidative Enzymes in *Helianthus annuus* L. Roots during *Orobanche Cumana* Wallr. Penetration. *Fresenius Environ. Bull.*, 17 (8a): 1038-1044.
- Dixon D.P., Adrian Laphorn A. ve Edwards R., 2002. Plant Glutathione Transferases. *Genome Biology*, 3 (3): 3004.1-3004.10.
- Edreva A., 2005. Pathogenesis-Related Proteins: Research Progress In The Last 15 Years. *Gen. Appl. Plant Physiology*, 31 (1-2): 105-124.
- El-Maarouf-Bouteau H., Moreau E., Errakhi R. ve Sallé G., 2008. A Diffusible Signal from Germinating *Orobanche ramosa* Elicits Early Defense Responses in Suspension-Cultured *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signaling&Behavior*, 3 (3): 189-193.
- Elzein A.ve Kroschel J., 2003. Progress on Management of Parasitic Weeds. Chapter 2: Problem Weeds and Their Management in Crops and Non-Crop Situations. In: Labrada, R., Eds. *Weed Management for Developing Countries, Addendum 1*. FAO Plant Production and Protection. Rome, Italy.
- Fao, 2005. 20 Things to Know About The Impact of Salt Water on Agricultural Land in Aceh Province. *Field Guide On Salinity in Aceh-Draft Publication*, 1-7.
- Fernández-Aparicio M., Flores F. ve Rubiales D., 2009. Recognition of root exudates by seeds of broomrape (*Orobanche* and *Phelipanche*) species. *Annals of Botany*, 103: 423-431.
- Foyer C.H. ve Halliwell B., 1976. Presence of Glutathione and Glutathione Reductase in Chloroplasts: A Proposed Role in Ascorbic Acid Metabolism. *Planta*, 133: 21-25.
- Foyer C.H., Gomez L.D. ve van Heerden P.D.R., 2005. Glutathione. In: Smirnoff N., Eds. *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants*. Blackwell, Oxford. 1-24.

- Foyer C.H. ve Noctor G., 2009. Redox Regulation in Photosynthetic Organisms: Signaling, Acclimation, and Practical Implications. *Antioxidants & Redox Signaling*, 11 (4): 861-905.
- Galvani A., 2007. The Challenge of The Food Sufficiency Through Salt Tolerant. *Crops. Rev. Environ. Sci. Biotechnol.*, 6: 3-16.
- Gamborg O.L., Miller R.A. ve Ojima K., 1968. Nutrient Requirements of Suspension Cultures of Soybean Root Cells. *Exp. Cell Res.* 50: 151-158.
- Giannopolities N. ve Ries S.K., 1977. Superoxide Dismutase Occurrence in Higher Plants. *Plant. Physiol.* 59: 309-314.
- González-Verdejo C.I., Barandiaran X., Moreno M.T., Cubero J.I. ve Pietro A.D., 2006. A Peroxidase Gene Expressed during Early Developmental Stages of the Parasitic Plant *Orobanche ramosa*. *Journal of Experimental Botany*, 57, No. 1: 185–192.
- Grace S.C., 2005. Phenolics as antioxidants. In: Smirnoff N., Eds. *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants*. Blackwell, Oxford. 141-168.
- Greene R., 2002. Oxidative Stress and Acclimation Mechanisms in Plants. *The Arabidopsis Book*, doi: 10.1199/tab.0036.1.
- Heidarvand L. ve Amiri R.M., 2010. What Happens in Plant Molecular Responses to Cold Stress? *Acta. Physiol. Plant.*, 32: 419–431.
- Herbette S., Lenne C., Tourvieille de Labrouhe D., Drevet J.R. ve Roeckel-Drevet P., 2003. Transcripts of Sunflower Antioxidant Scavengers of The SOD and GPX Families Accumulate Differentially in Response to Downy Mildew Infection, Phytohormones, Reactive Oxygen Species, Nitric Oxide, Protein Kinase and Phosphatase Inhibitors. *Physiologia Plantarum*, 119 (3): 418–428.
- Hirsch A.M., Bauer W.D., Bird D.M., Cullimore J., Tyler B.M. ve Yoder J.I., 2003. Molecular Signals and Receptors: Controlling Rhizosphere Interactions Between Plants and Other Organisms. *Ecology*, 84: 858–868.
- Horvath D.P., Mclarney B.K. ve Thomashow M.F., 1993. Regulation of *Arabidopsis thaliana* L. (Heyn) *cor78* in Response to Low Temperature. *Plant Physiol.* 103: 1047-1053.

- Joel D.M. ve Portinoy V.H., 1998. The Angiospermous root parasite *Orobanche* L. (Orobanchaceae) induces expression of a pathogenesis related (PR) gene insusceptible tobacco roots. *Ann Bot.*, 81: 779-781.
- Joel D.M, Hershenhorn J., Eizenberg H., Aly R., Ejeta G., Rich P., Ransom J., Sauerborn J. ve Rubiales D., 2007. Biology and Management of Weedy Root Parasites. *Horticultural Reviews*, 33: 267-349.
- Joel D.M, 2009. The New Nomenclature of *Orobanche* and *Phelipanche*. Editors' Note. *Weed Research*, 49 (1): 6-7.
- Kanner J. ve Kinsella J.E., 1983. Lipid Deterioration Initiated By Phagocytic-Cells In Muscle Foods - Beta-Carotene Destruction by A Myeloperoxidase Hydrogen-Peroxide Halide System. *J. Agric. Food Chem.*, 31: 370-376.
- Kasuga M., Liu Q., Miura S., Yamaguchi-Shinozaki K. ve Shinozaki K., 1999. Improving Plant Drought, Salt, and Freezing Tolerance by Gene Transfer of A Single Stress-Inducible Transcription Factor. *Nature Biotechnology*, 17: 287-291.
- Kaya D.M., Okçu G., Atak M., Çıkılı Y. ve Kolsarıcı Ö., 2006. Seed Treatments to Overcome Salt and Drought Stress during Germination in Sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Europ. J. Agronomy*, 24: 291-295.
- Kranner I., Beckett R.P., Wornik S., Zorn M. ve Pfeifhofer H.W., 2002. Revival of a Resurrection Plant Correlates with Its Antioxidant Status. *The Plant Journal*, 31: 13-24.
- Labrousse P., Arnaud M.C., Serieys H., Bervilleâ A. ve Thalouarn P., 2001. Several Mechanisms are Involved in Resistance of *Helianthus annus* to *Orobanche cumana* Wallr. *Annals of Botany*, 88: 859-868.
- Leon-Reyes A., Du Y., Koornneef A., Proietti S., Körbes A.P., Memelink J., Pieterse C.M.J. ve Ritsema T., 2010. Ethylene Signaling Renders The Jasmonate Response of *Arabidopsis* Insensitive to Future Suppression by Salicylic Acid. *MPMI*, 23 (2): 187-197.
- Letousey P., Zélicourt A., Vieira Dos Santos, C., Thoiron S., Monteau F., Simier P., Thalouarn P. ve Delavault P., 2007. Molecular Analysis of Resistance Mechanisms to *Orobanche cumana* in Sunflower. *Plant Pathology*, 56: 536-546.

- Levine A., 2004. Production of Reactive Oxygen Species in Plants during Perception of Invading Organisms. *COST Action 849, WG1+WG3 Workshop, Parasitic Plant Management in Sustainable Agriculture Meeting on Mechanisms of Susceptibility and Resistance in Parasitic Angiosperm-Host Symbioses: A Comparative Approach*, Wageningen, The Netherlands, 9.
- Madhava K.V. ve Stresty T.V.S., 2000. Antioksidative Parameters in The Seedlings of Pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh) in Response to Zn and Ni Stresses. *Plant science*, 157: 113-128.
- Mahajan S. ve Tuteja N., 2005. Cold, Salinity and Drought Stresses: An Overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 444: 139-158.
- Miller G., Suzuki N., Ciftci-Yilmaz S. ve Mittler R., 2010. Reactive Oxygen Species homeostasis and Signalling during Drought and Salinity Stresses. *Plan, Cell an Environment*, 33: 453-467.
- Montesano M., Brader G. ve Palva E.T., 2003. Pathogen Derived Elicitors: Searching for Receptors in Plants. *Molecular Plant Pathology*, 4 (1): 73-79.
- Mor A., Mayer A.M. ve Levine A., 2008. Possible Peroxidase Functions In The Interaction Between The Parasitic Plant, *Orobanche aegyptiaca*, and its host, *Arabidopsis thaliana*. *Weed Biology and Management*, 8: 1-10.
- Mullineaux P.M. ve Baker N.R., 2010. Oxidative Stress: Antagonistic Signaling for Acclimation or Cell Death? *Plant Physiology*, 154: 521-525.
- Munns R. ve Tester M., 2008. Mechanisms of Salinity Tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59: 651-81.
- Nakano Y. ve Asada K., 1981. Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-Specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts. *Plant, Cell, Physiol.* 22 (3): 867-880.
- Niderman T., Genetet I., Bruyère T., Gees R., Stintzi A., Legrand M., Fritig B. Ve Mosinger E., 1995. Pathogenesis-Related PR-1 Proteins Are Antifungal. Isolation and Characterization of Three 14-Kilodalton Proteins of Tomato and of a Basic PR-1 of Tobacco with Inhibitory Activity against *Phytophthora infestans*. *Plant Physiol.* 108: 17-27.

- Nishizawa A, Yabuta Y. ve Shigeoka S., 2008. Galactinol and Raffinose Constitute a Novel Function to Protect Plants from Oxidative Damage. *Plant Physiol.*, 147 (3):1251-63.
- Odjakova M. ve Hadjiivanova C., 2001. The Complexity of Pathogen Defense in Plants. *Bulg. J. Plant Physiol.*, 27 (1-2): 101-109.
- Park M.Y, Chung M.S., Koh H.S., Lee D.J., Ahn S.J. ve Kim C.S., 2009. Isolation and Functional Characterization of The *Arabidopsis* Salt-Tolerance 32 (*AtSAT32*) Gene Associated With Salt Tolerance and ABA Signaling. *Physiologia Plantarum*, 135: 426-435.
- Parker C., 2009. Observations on the Current Status of *Orobanche* and *Striga* Problems Worldwide. *Pest Manag Sci*, 65: 453-459.
- Pérez-de-Luque A., Galindo J.C.G., Macias F.A. ve Jorrin J., 2000. Sunflower Sesquiterpene Lactone Models Induce *Orobanche cumana* Seed Germination. *Phytochemistry*, 53: 45-50.
- Pérez-de-Luque A., Jorrin J., Cubero J.I. ve Rubiales D., 2005. *Orobanche crenata* Resistance and Avoidance in Pea (*Pisum* spp.) Operate at Different Developmental Stages of the Parasite. *Weed Research*, 45: 379–387.
- Pérez-de-Luque A., González-Verdejo C.I., Lozano M.D., Dita M.A., Cubero J.I., González-Melendi P., Risueño M.C. ve Rubiales D., 2006. Protein Cross-Linking, Peroxidase and β -1,3-Endoglucanase Involved In Resistance Of Pea Against *Orobanche crenata*. *Journal of Experimental Botany*, 57 (6): 1461–1469.
- Pérez-de-Luque A., Lozano M.D., Maldonado A.M., Jorrín J.V., Dita M.A., Die J., Román B. ve Rubiales D., 2007. *Medicago truncatula* as a Model for Studying Interactions between Root Parasitic Plants and Legumes. In: Mathesius, U., Journet, E.P. ve Sumner, L.W., Eds. *The Medicago truncatula Handbook*. The Samuel Roberts Noble Foundation, Ardmore, OK. 1–31.
- Penninckx I.A.M.A., Thomma B.P.H.J., Buchala A., Métraux J.P. ve Broekaert W.F., 1998. Concomitant Activation of Jasmonate and Ethylene Response Pathways is Required for Induction of a Plant Defensin Gene in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 10, 2103–2113

- Rekarte-Cowie I., Ebshish O.S., Mohamed K.S. ve Pearce R.S., 2008. Sucrose Helps Regulate Cold Acclimation of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 59 (15): 4205-4217.
- Sadiqov S.T, 2001. Canlılarda Moleküler Düzenleme Mekanizmaları (2. baskı). Erciyes Üniversitesi Yayınları No: 217, Kayseri. 188-207.
- Scandalios J.G., 1997. Molecular Genetics of Superoxide Dismutase in Plants. In: Scandalios, J.G., Eds. *Oxidative Stres and The Molecular Biology of Antioxidant Defenses*. Cold Spring Harbor Laboratory Pres, USA. 527-565.
- Serghini K., Pérez-de-Luque A., Munoz M.C., Garcia-Torres L. ve Jorin J.V., 2001. Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Response to Broomrape (*Orobancha cernua* Loefl.) Parasitism: Induced Synthesis and Excretion of 7-Hydroxylated Simple Coumarins. *J. Experimental Botany*, 52: 2227-2234.
- Singh A. ve Singh M., 1993. Cell Wall Degrading Enzymes in *Orobancha aegyptiaca* and Its Host *Brassica campestris*. *Physiologia Plantarum*, 89: 177-181.
- Sökmen A., 2008. Sekonder Metabolitler ve Bitkisel Savunma. In: Türkan, İ., Eds. *Bitki Fizyolojisi* (3. Baskıdan Çeviri). Palme Yayıncılık, Ankara, Türkiye. 283-308.
- Smirnoff N., 2005. Ascorbate, tocopherol and carotenoids:metabolism, pathway engineering and bfunctions. In: Smirnoff N., Eds. *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants*. Blackwell, Oxford. 53-86.
- Taflioğlu A., 2002. Tuzluluk ve Stres Faktörlerinin Arpa Genomunda Meydana Getirdiği Değişimler ve Bu Değişimlere Fitohormonların Etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kayseri, Türkiye.
- Taiz L. ve Zeiger E., 2002. Chapter 16: Growth and Development. (Third Edition Plant Physiology), Sinauer Associates, 371-373.
- Taji T., Seki M., Satou M., Sakurai T., Kobayashi M., Ishiyama K., Narusaka Y., Narusaka M., Zhu J-K. ve Shinozaki K., 2004. Comparative Genomics in Salt Tolerance between *Arabidopsis* and *Arabidopsis*-Related Halophyte Salt Cress Using *Arabidopsis* Microarray. *Plant Physiology*, 135: 1697-1709.
- Thomashow M.F, 1999. Plant Cold Acclimation: Freezing Tolerance Genes and Regulatory Mechanisims. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 571-599.

- Thorogood C.J., Rumsey F.J. ve Hiscock S.J., 2009. Host-specific Races in the Holoparasitic Angiosperm *Orobanche minor*: Implications for Speciation in Parasitic Plants. *Annals of Botany*, 103: 1005-1014.
- Torres M.A., Jones J.D.G. ve Dangl J.L., 2006. Reactive Oxygen Species Signaling in Response to Pathogens. *Plant Physiology*, 141: 373–378.
- Tör M., 1998. Bitkilerde Moleküler Konukçu-Patojen İlişkilerindeki Son Gelişmeler. *Tr. J. of Biology*, 22: 271-285.
- Türkan İ., 2008. *Bitki Fizyolojisi* (3. Baskıdan Çeviri). Palme Yayıncılık, Ankara, Türkiye. 591-602.
- Gündüz E., Demirsoy A., ve Türkan İ., 2008. *Biyoloji* (6. Baskıdan Çeviri-Gözden Geçirilmiş 2. Türkçe Baskı). Palme Yayıncılık, Ankara, Türkiye. 827-829.
- Uemura M., Cilmour S.J., Thomashow M.F. ve Steponkus P.L., 1996. Effects of COR6.6 and COR15am Polypeptides Encoded by *COR* (Cold-Regulated) Genes of *Arabidopsis thaliana* on the Freeze-Induced Fusion and Leakage of Liposomes. *Plant Physiol.*, 11 (1): 313-327.
- Xiong L. ve Zhu J.K., 2002. Salt Tolerance. In: Somerville C.R. and Meyerowitz E.M. Eds. *The Arabidopsis Book*, American Society of Plant Biologists, Rockville, MD.
- Vallad G.E. ve Goodman R.M., 2004. Systemic Acquired Resistance and Induced Systemic Resistance in Conventional Agriculture. *Crop Sci.*, 44: 1920–1934.
- Vanacker H., Carver T.L.W. ve Foyer C.H., 1998. Pathogen-Induced Changes in the Antioxidant Status of the Apoplast in Barley Leaves. *Plant Physiol.*, 117: 1103-1114.
- Veronesi C., Bonnin E., Calvez S., Thalouarn P. ve Simier P., 2007. Activity of Secreted Cell Wall-Modifying Enzymes and Expression of Peroxidase-Encoding Gene Following Germination of *Orobanche ramosa*. *Biologia Plantarum*, 51 (2): 391-394.
- Vieira Dos Santos C., Delavault P., Letousey P. ve Thalouarn P., 2003a. Identification by Suppression Subtractive Hybridization and Expression Analysis of *Arabidopsis thaliana* Putative Defence Genes during *Orobanche ramosa* Infection. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 62: 297-303.

- Vieira Dos Santos C., Letousey P., Delavault P. ve Thalouarn P., 2003b. Defense Gene Expression Analysis of *Arabidopsis thaliana* Parasitized by *Orobanche ramosa*. *Phytopathology*, 93: 451-457.
- Vreeburg R.A.M. ve Fry S.C., 2005. Reactive Oxygen Species in Cell Wall. In: Smirnoff N., Eds. *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants*. Blackwell, Oxford. 215-250.
- Weigel D. ve Glazebrook J., 2002. How to Grow *Arabidopsis*: In. Weigel, D., Eds. *Arabidopsis: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York. 1-18.
- Westwood J.H., Yu X., Foy C.L. ve Cramer C.L., 1998. Expression of a defense-related 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase gene in response to parasitization by *Orobanche* spp. *Mol Plant Microbe Interact*, 11: 530-536.
- Westwood J.H., Roney J.K., Khatibi P.A. ve Stromberg V.K., 2009. RNA Translocation between Parasitic Plants and Their Hosts. *Pest. Manag. Sci.*, 65: 533-539.
- Yoder J.I., 1999. Parasitic Plant Responses to Host Plant Signals: A Model for Subterranean Plant-Plant Interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, 2: 65-70.
- Yokoi S., Bressan R.A. ve Hasegawa P.M., 2002. Salt Stress Tolerance of Plants. *JIRCAS Working Report*, 25-33.
- Zhang J., Jia W., Yang J. ve Ismail A.M., 2006. Role of ABA in Integrating plant responses to drought and salt stresses. *Field Crops Research*, 97: 111-119.
- Zhu J.K., 2002. Salt and Drought Stress Signal Transduction in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 53: 247-273.

Çizelgeler	Sayfa No
Çizelge 1. Abiyotik ve biyotik stres etmenleri (Sadiqov, 2001).....	1
Çizelge 2. Ekonomik verim kayıplarına neden olan canavar otu türleri ve konukçu bitkileri (Labrousse ve ark., 2001; Elzein ve Kroschel, 2003; Zhou ve ark., 2004; Fernández-Aparicio ve ark., 2009; Parker, 2009).....	7
Çizelge 3. Bitki-Patojen ilişki durumları (Tör, 1998).....	18
Çizelge 4. Antioksidan enzimler ve detoksifikasyon reaksiyonları (Blokhina ve ark., 2003)	23
Çizelge 5. Çalışmada kullanılan genler ve gen tanımları	31
Çizelge 6. PR genleri ve kodladıkları proteinler (Edreva, 2005).....	32
Çizelge 7. RT-PCR sırasında izlenen yöntem	46
Çizelge 8. PCR' da kullanılan karışımlar	47
Çizelge 9. Çalışmada kullanılan genlere ait primer dizileri ve PCR uygulamaları	47
Çizelge 10. PCR'da genlerin çoğaltılması.....	48
Çizelge 11. Bağlı gen ifadesinin hesaplanmasının bir örnekle açıklanması.....	49
Çizelge 12. Bitki özütlerinden elde edilen RNA miktarları.....	60
Çizelge 13. Tüm verilerin, tek yönlü varyans analiz (ANOVA) sonuçları	68

Şekiller

Sayfa No

Şekil 1. Kök paraziti bitkilerin yaşam döngüsü (Joel ve ark., 2007).	9
Şekil 2. Domates köküne tutunmuş <i>P. ramosa</i> (L.) Pomel parazit bitkisi (orijinal).....	10
Şekil 3. Parazit tohumu ile konak arasında meydana gelen ilk farklılaşmalar (El-Maarouf-Bouteau ve ark., 2008).	12
Şekil 4. Bitkilerin kök çevresinde etkileşim içinde buldukları organizmalar (Hirsch ve ark., 2003).	17
Şekil 5. Bitkilerde uyarılmış dayanıklılık: SAR ve ISR yolları (Vallad ve Goodman, 2004).	19
Şekil 6. Abiyotik stres koşullarına yanıtta erken ve geç ifade olan genlerin ifade akışı (Mahajan ve Tuteja, 2005).	20
Şekil 7. Fenton veya Haber-Weiss reaksiyonu (Dat ve ark., 2000; Vreeburg ve Fry, 2005). ..	21
Şekil 8. Çevresel streslere karşı verilen yanıtta ROT' nin oluşumu, oksidatif stres ve hücre ölümü arasındaki ilişkinin modellenmesi (Mullineaux ve Baker, 2010).	22
Şekil 9. Bitkilerde glutasyon metabolizması (Foyer ve ark., 2005).	24
Şekil 10. Askorbat-Glutasyon döngüsü (Foyer ve Noctor, 2009).	24
Şekil 11. Askorbik asit ve oksidasyon ürünlerinin kimyasal yapısı (Smirnoff, 2005).	25
Şekil 12. Tokoferol ve tokotrienol moleküllerinin kimyasal yapısı (Smirnoff, 2005).	26
Şekil 13. Su kısıtlılığına karşı hücre ABA birikiminde sinyal iletim yolları ve yanıtlar (Zhang ve ark., 2006).	29
Şekil 14. Ws. ve Col. ekotiplerinin <i>P. ramosa</i> tohumlarının çimlenmesine etkisi.	40
Şekil 15. Çalışma sırasında uygulanan yetiştirme ve örnekleme modeli.....	41
Şekil 16. <i>Arabidopsis</i> ve canavar otu bitkilerinin yetiştirildiği ortam (orijinal).	41
Şekil 17. <i>Arabidopsis</i> köklerine canavar otu yapışmasının olduğu gün. Oklar yapışma bölgelerini işaret etmektedir (orijinal).	42
Şekil 18. Klorofil a miktarındaki değişim (mg/g YA).	50
Şekil 19. Klorofil b miktarındaki değişim (mg/g YA).	51
Şekil 20. Toplam klorofil miktarındaki değişim (mg/g YA).	52
Şekil 21. Karotenoid miktarındaki değişim (mg/g YA).	53
Şekil 22. MDA miktarındaki değişim (nmol/g YA)..	54
Şekil 23. SOD aktivitesinde meydana gelen değişim (ünite/mg protein).	55
Şekil 24. POX aktivitesinde meydana gelen değişim (ünite/mg protein).	56
Şekil 25. GR aktivitesinde meydana gelen değişim (ünite/mg protein).	57

Şekil 26. CAT aktivitesinde meydana gelen değişim (ünite/mg protein).....	58
Şekil 27. APX aktivitesinde meydana gelen değişim (ünite/mg protein).....	59
Şekil 28. PCR sonucu genlere ait jel görüntüleri.....	60
Şekil 29. <i>COR6.6</i> genine ait bağıl gen ifadesinde meydana gelen değişim.....	61
Şekil 30. <i>COR78</i> genine ait bağıl gen ifadesinde meydana gelen değişim.....	62
Şekil 31. <i>RD29B</i> genine ait bağıl gen ifadesinde meydana gelen değişim.....	63
Şekil 32. <i>GOLS3</i> genine ait bağıl gen ifadesinde meydana gelen değişim.....	64
Şekil 33. <i>GST1</i> genine ait bağıl gen ifadesinde meydana gelen değişim.	65
Şekil 34. <i>PR1</i> genine ait bağıl gen ifadesinde meydana gelen değişim.....	66
Şekil 35. <i>PDF1.2</i> genine ait bağıl gen ifadesinde meydana gelen değişim.....	67

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Sefer DEMİRBAŞ

Doğum Yeri: Hayrabolu/Tekirdağ

Doğum Tarihi: 29.05.1979

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Ege Üniversitesi (1998-2003)

Yüksek Lisans Öğrenimi : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi (2004-2006)

Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a) Yayınlar – SCI - Diğer

1. Acar O., Demirbas S., Ilhan D. ve Ozdinc N., 2010. The Effects of Glyphosate Isopropylamine on Mitotic Activity, Superoxide Dismutase and Peroxidase Activities on *Allium cepa* L. root tip cells. *Fresenius Environmental Bulletin*, 19 (3): 522-525.

2. Demirbaş S. ve Acar O., 2008. Superoxide Dismutase and Peroxidase Activities from Antioxidative Enzymes in *Helianthus annuus* L. Roots During *Orobanche cumana* Wallr. Penetration. *Fresenius Environmental Bulletin*, 17 (8a): 1038-1044.

3. Acar O., Demirbaş S. ve Aydın B., 2007. Bitki Yetiştirme Teknikleri Laboratuvar Kılavuzu. *Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Yayınları Teksirler Serisi No:20*, Çanakkale.

4. Acar O. ve Demirbaş S., 2006. Bitki Fizyolojisi Laboratuvar Kılavuzu. *Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Yayınları Teksirler Serisi No:15*, Çanakkale.

5. Gönüz A., Acar O., Tosunoğlu M., Gül Ç. ve Demirbaş S., 2006. Biyoloji II (Bitki ve Hayvan Fizyolojisi) Laboratuvar Kılavuzu. *Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Yayınları Teksirler Serisi* No:14, Çanakkale.

b) Bildiriler – Uluslararası - Ulusal

1. Gonuz A., Demirbaş S., Hürkan K., Dover E. ve Kaplan M.E., 2008. The Investigation of Wetland Ecosystem in The Araplar Gorge and Its Surroundings. Conference on Water Observation and Information System for Decision Support. Book of Abstracts, Balwois. Ohrid, Republic of Macedonia. p 337.

2. Demirbaş S., Acar O., 2008. *Helianthus annuus* L. Köklerinde *Orobanche cumana* Wallr. Penetrasyonu Sırasında Meydana Gelen Kısa Süreli Antioksidatif Yanıtlar. 19. Ulusal Biyoloji Kongresi. 23-27 Haziran, Trabzon, Türkiye. s 410.

3. Acar O., Demirbaş S., Yıldız V. ve Aydın B., 2010. *Lycopersicon esculentum* Mill. Köklerinde *Orobanche ramosa* Penetrasyonu Boyunca Antioksidan Enzim Aktivitelerinin ve Lipit Peroksidasyonunun Değişimi. (20. Ulusal Biyoloji Kongresi, Posterli Sunum), 21-25 Haziran, Denizli.

4. Acar O., Demirbaş S., Yıldız V. ve Aydın B., 2010. *Lycopersicon esculentum* Mill. Yapraklarında *Orobanche ramosa* L. Stresine Karşı Antioksidan Enzim Aktivitelerinin ve Lipit Peroksidasyonunun Değişimi. (20. Ulusal Biyoloji Kongresi, Posterli Sunum), 21-25 Haziran, Denizli.

5. Acar O., Demirbaş S., Yıldız V. ve Aydın B., 2010. *Orobanche ramosa* L. Parazitinin *Lycopersicon esculentum* Mill. Bitkisinin Büyüme ve Pigment İçeriği Üzerine Olan Etkileri. (20. Ulusal Biyoloji Kongresi, Posterli Sunum) 21-25 Haziran, Denizli.

6. Aydın B., Acar O., Demirbaş S., Yıldız V. ve Görkem H.N., 2010. *Capsicum annuum* Bitkisinin Büyüme ve Pigment İçeriğine *Orobanche aegyptiaca* Pers. Bitkisinin Etkisi. (20. Ulusal Biyoloji Kongresi, Posterli Sunum), 21-25 Haziran, Denizli.

c) Katıldığı Projeler

1. Bazı Ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) Varyetelerinde *Orobanche cumana* Wallr.' nin Süperoksit Dismütaz (SOD; EC1.15.1.1) ve Peroksidaz (POD;

EC.1.11.1.7) Aktiviteleri Üzerine Etkilerinin Araştırılması, ÇOMÜ BAP 2005/27 (2005-2006), **Araştırmacı.**

2. Çanakkale İlinde Tarımı Yapılan Simita, 8354 ve Rio Grande Domates Çeşitlerinde Canavarotu (*Orobanche ramosa* L.) Parazitine Dayanıklılıkta Antioksidan Enzimlerin (SOD, POX, GR, APX ve CAT) Seviyelerindeki Değişimlerin ve Lipit Peroksidasyonun Araştırılması. Tübitak Hızlı Destek Projesi No. 107-O-905 (2008- 2009), **Bursiyer.**

İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurum ve Yıl: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü (2005-devam ediyor)

Yurt Dışı Deneyim: LLP/Erasmus Öğrenci Hareketliliği-Yerleştirme Programı Selanik Aristo Üniversitesi Biyoloji Bölümü, Yunanistan (05/10/2009-10/02/2010)

Üyesi Olduğu Kuruluşlar: Federation of European Societies of Plant Biology (FESPB) (2007-devam ediyor)

İLETİŞİM

e-posta adresi: sdemirbas@comu.edu.tr
seferdemirbas@yahoo.com