

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**KURAKLIK STRESİ ALTINDA KARNİTİN'İN ROS
SİNYALİ VE ANTİOKSİDAN SİSTEM ÜZERİNDEKİ
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Esra ÇANCIOĞLU

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Hediye SEKMEN ESEN

Biyoloji Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 401.01.00

Sunuş Tarihi : 08.01.2014

Bornova-İZMİR

2014

Esra ÇANCIOĞLU tarafından YÜKSEK LİSANS tezi olarak sunulan “Kuraklık Stresi Altında Karnitin’ in, ROS Sinyali ve Antioksidan Sistem Üzerindeki Etkisinin Araştırılması” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 08.01.2014 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Doç. Dr. Hediye SEKMEN ESEN

Raportör Üye: Doç. Dr. Çağlar KARAKAYA

Üye : Prof .Dr. İsmail TÜRKAN

ÖZET

KURAKLIK STRESİ ALTINDA KARNİTİN' İN, ROS SİNYALİ VE ANTIOKSİDAN SİSTEM ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

ÇANCIOĞLU, Esra

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı
Tez Yöneticisi: Doç. Dr. Hediye SEKMEN ESEN
Ocak 2014, sayfa 88

Kuraklık gibi çevresel stresler, hücrelerdeki su dengesini bozarak bitkinin büyüme ve üretkenliğini sınırlayan temel faktörlerdir. Bitkiler, abiyotik streslerden biri olan kuraklığa karşı fizyolojik ve moleküler düzeyde yanıtlar vermektedir. Bu yanıtlardan birisi de ozmotik düzenlemedir. Ozmotik düzenlemenin en önemli basamağı hücre içinde ozmotik dengeyi sağlayan uyumlu bileşiklerin, yani ozmolitlerin depolanmasıdır. Prolin, glisin betain, mannitol gibi ozmolitlerin kuraklık-tuzluluk gibi stres koşulları altındaki işlevleri bilinmesine rağmen hayvan ve bakterilerde ozmolit ve antioksidan olarak görev alan karnitin bitkilerdeki bu tip işlevleri hakkında bir çalışma bulunmamaktadır. Ayrıca, karnitin' in reaktif oksijen türleri (ROS) sinyalleme üzerinde oluşturduğu etkiler ile ilgili literatürde herhangi bir çalışma yoktur.

Bu amaçla, *Arabidopsis thaliana*' nın yaban tip kolombiya (Col-0) ekotipi 48 saat kuraklığa maruz bırakılmış; bağıl büyüme hızı, bağıl su içeriği, lipid peroksidasyonu, ROS oluşumu (H_2O_2 miktarı, NADPH oksidaz (NOX) aktivitesi), antioksidant savunma sistemi (süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), peroksidaz (POX), askorbat peroksidaz (APX), glutatyon redüktaz (GR), monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR), dehidroaskorbat redüktaz (DHAR) enzimlerinin aktiviteleri ve izoenzimleri) incelenmiştir.

Bu çalışma ile karnitinin antioksidan savunma sistemini nasıl etkilediği, su-su döngüsündeki rolü ve kuraklık altında dışarıda karnitin uygulamasının bitki üzerindeki etkileri aydınlatılmıştır. Sonuç olarak karnitin uygulamasının kuraklığın hücreye verdiği hasarı antioksidan savunma sistemini etkileyerek azalttığı bulunmuştur.

Anahtar Sözcükler: *Arabidopsis thaliana*, Karnitin, Antioksidan Enzimler, H₂O₂, Kuraklık stresi.

ABSTRACT**INVESTIGATION OF THE EFFECTS CARNITINE ON REACTIVE OXYGEN SPECIES SIGNALLING AND ANTIOXIDANT SYSTEM UNDER DROUGHT STRESS**

CANCIOGLU, Esra

MSc in Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Hediye SEKMEN ESEN

January 2014, pages 88

Environmental factors such as drought impair the cell- water balance and cause an inhibition on plant growth and yield. Plants give molecular and physiological responses to drought. One of these response is osmotic regulation. Accumulation of osmolytes – compatible solutes is an important stage of osmotic regulation. The roles of osmolytes such as proline, glycine betaine, mannitol has been identified under salinity and drought. However, there is no study on the functions of carnitine which is determined as osmolyte and antioxidant in bacteria and animals. Additionally, the effects of carnitine on the reactive oxygen signalling (ROS) is not known. With this aim, *Arabidopsis thaliana* wild type (Col-0) was subjected to 48 hours drought stress. And growth parameters, relative water content, lipid peroxidation, ROS production (H_2O_2 content, NADPH oxidase activity) antioxidant defence system (activities of SOD, CAT, POX, APOX , GR, MDHAR, DHAR enzymes and isoenzymes) were measured.

In this study, how the application of carnitine affects and antioxidant defence mechanism, the role of carnitine in water-water cycle and what is the effects of exogenous application of carnitine under drought stress were enlightened.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, Carnitine, Antioxidant Enzymes, H_2O_2 , Drought Stress.

TEŞEKKÜR

Lisansüstü öğrenimim boyunca ve tez dönemimde bilgisi, laboratuvar deneyimini ve paylaşımcı tavrıyla beni cesaretlendiren, desteğini her zaman hissettiğim tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Hediye SEKMEN ESEN'e, tez sürecimde engin bilgisini, deneyimini ve desteğini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. İsmail TÜRKAN' a, teşekkürü bir borç bilirim.

Laboratuvar çalışmalarında ve ders dönemimde engin bilgilerinden yararlandığım hocalarım Sayın Prof. Dr. Filiz ÖZDEMİR, Sayın Doç. Dr. Melike BOR' a, teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmam süresince desteklerini esirgemeyen ve tezimi yazmamda büyük yardımı olan çalışma arkadaşlarım Uzm. Rengin ÖZGÜR'e, Uzm. Barış UZİLDAY' a, her zaman varlıklarını hissettiğim Uzm. Özgecan TANYOLAÇ' a, Uzm. Ahmet DİNÇ' e, Uzm. Tolga YALÇINKAYA' ya, laboratuvar çalışmam boyunca her zaman yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen Azime GÖKÇE' ye, Turgut Yiğit AKYOL' a, Gönül DÜNDAR' a ve lisansüstü eğitime başladığımız günden beri her an yanımda olan, çalışmalarım boyunca büyük yardımını ve desteğini gördüğüm Burcu ÇEBİ' ye teşekkür ederim.

Öğrenim yaşamım boyunca beni her yönden destekleyen, eğitimimi herşeyden önde tutan ve bu konuda verdiği kararlarda arkamda duran, babam Bedrettin ÇANCIOĞLU, annem Nejla ÇANCIOĞLU ve kardeşim Emre ÇANCIOĞLU' na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	v
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
KISALTMALAR DİZİNİ	xix
1. GİRİŞ	1
1.1.Kuraklık boyunca farklı organellerdeki ROS' un düzenlenmesi	4
1.1.1.Kloroplast	4
1.1.2.Peroksizom	5
1.1.3.Mitokondri	6
1.1.4.Apoplast	7
1.2.Kuraklık stresi boyunca enzimatik olmayan ROS süpürücüleri	7
1.3.Kuraklık stresi boyunca ROS ve hormonal düzenlenmesi	8
1.4.Kuraklık stresi boyunca ROS seviyesini düzenleyen ozmolitler	11
1.4.1.Karnitin	14
2.MATERYAL VE METOD	23

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.1.Bitkilerin yetiştirilmesi ve deneme deseni.....	23
2.1.1.Tohum sterilizasyonu	23
2.1.2.Büyüme koşulları ve stres uygulamaları	23
2.2.Fizyolojik parameterler	24
2.2.1.Büyüme parametreleri	24
2.2.2.Bağıl büyüme hızı (RGR).....	24
2.2.3.Bağıl su içeriği (RWC).....	24
2.2.4.Yaprak su potansiyeli (ψ_{II}).....	24
2.3.Biyokimyasal parametreler	25
2.3.1.Lipit peroksidasyonu	25
2.3.2.H ₂ O ₂ miktarı.....	25
2.3.3.Antioksidant enzim ekstraksiyonu ve aktivite analizleri.....	26
2.3.4.Antioksidant enzimlerin izoenzim tayini	28
3.BULGULAR	29
3.1.Fizyolojik parametreler	29
3.1.1. Büyüme parametreleri.....	29

İÇİNDEKİLER (devam)Sayfa

3.1.2. Bağlı büyüme hızı (RGR).....	30
3.1.3.Bağlı su içeriği (RWC).....	31
3.1.4. Su potansiyeli (ψ II)	32
3.1.5.Enzim ve izoenzim aktiviteleri.....	33
3.1.6.H ₂ O ₂ Miktarı.....	46
3.1.7.Lipit Peroksidasyonu (TBARS miktarı).....	47
4.TARTIŞMA.....	48
5.SONUÇLAR	54
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	55
ÖZGEÇMİŞ.....	67

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Memelilerdeki karnitin biyosentez yolağı (Vaz and Wanders, 2002' den)..	16
1.2 Memelilerde iç mitokondriyal açıl CoA/CoA oranının düzenlenmesinde ve mitokondriyal uzun zincirli yağ asitlerinin oksidasyonun taşınmasında karnitinin fonksiyonu. yolağı (VazandWanders, 2002' den).....	17
1.3 Oksidatif, su ve abiyotik streslerde ABA, H ₂ O ₂ , NO arasındaki sinyal etkileşimi.....	21
3.1 Kuraklık stresinin ve karnitin uygulamasının <i>Arabidopsis thaliana</i> sürgünlerinin RGR üzerine etkisi.	30
3.2 Kuraklık stresinin ve karnitin uygulamasının <i>Arabidopsis thaliana</i> köklerinin RGR üzerine etkisi.	31
3.3 Kuraklık stresinin ve karnitin uygulamasının <i>Arabidopsis thaliana</i> sürgünlerinin RWC üzerine etkisi.	31
3.4 Kuraklık stresinin ve karnitin uygulamasının <i>Arabidopsis thaliana</i> sürgünlerin ψ II değerleri üzerine etkisi.....	32

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil

Sayfa

3.5 Kuraklık stresinin ve karnitin uygulamasının *Arabidopsis thaliana*

köklerinin $\psi\Pi$ değerleri üzerine etkisi.....33

3.6 Kuraklık stresinin ve karnitin uygulamasının *Arabidopsis thaliana*

sürgünlerinde SOD aktivitesi üzerine etkisi.....33

3.7 Kuraklık stresinin ve karnitin uygulamasının *Arabidopsis thaliana*

köklerinde SOD aktivitesi üzerine etkisi.....34

3.8 *Arabidopsis thaliana* bitkilerinin SOD izoenzimleri ve bu izoenzimlerin

kuraklık ve karnitin uygulamasının 48 saat içerisinde değişimi.....35

3.9 Kuraklık stresinin ve karnitin uygulamasının *Arabidopsis thaliana*

sürgünlerinde POX aktivitesi üzerine etkisi.....35

3.10 Kuraklık stresinin ve karnitin uygulamasının *Arabidopsis thaliana*

köklerinde POX aktivitesi üzerine etkisi.....36

3.11 Kuraklık stresinin ve karnitin uygulamasının *Arabidopsis thaliana*

sürgünlerinde CAT aktivitesi üzerine etkisi.....37

3.12 Kuraklık stresinin ve karnitin uygulamasının *Arabidopsis thaliana*

köklerinde CAT aktivitesi üzerine etkisi.....37

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.14 <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkilerinin CAT enziminin kuraklık ve karnitin uygulamasının 48 saat içerisinde değişimi.....	38
3.15 Kuraklık stresinin ve karnitin uygulamasının <i>Arabidopsis thaliana</i> sürgünlerinde APOX aktivitesi üzerine etkisi.....	38
3.16 Kuraklık stresinin ve karnitin uygulamasının <i>Arabidopsis thaliana</i> köklerinde APOX aktivitesi üzerine etkisi.....	39
3.17 Kuraklık stresinin ve karnitin uygulamasının <i>Arabidopsis thaliana</i> sürgünlerinde DHAR aktivitesi üzerine etkisi.....	40
3.18 Kuraklık stresinin ve karnitin uygulamasının <i>Arabidopsis thaliana</i> köklerinde DHAR aktivitesi üzerine etkisi.....	40
3.19 Kuraklık stresinin ve karnitin uygulamasının <i>Arabidopsis thaliana</i> sürgünlerinde MDHAR aktivitesi üzerine etkisi.....	41
3.20 Kuraklık stresinin ve karnitin uygulamasının <i>Arabidopsis thaliana</i> köklerinde MDHAR aktivitesi üzerine etkisi.....	42
3.21 Kuraklık stresinin ve karnitin uygulamasının <i>Arabidopsis thaliana</i> sürgünlerinde GR aktivitesi üzerine etkisi.....	42

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.22 Kuraklık stresinin ve karnitin uygulamasının <i>Arabidopsis thaliana</i> köklerde GR aktivitesi üzerine etkisi.....	43
3.24 <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkilerinin GR izoenzimleri ve bu izoenzimlerin kuraklık ve karnitin uygulamasının 48 saat içerisinde değişimi.....	44
3.25 Kuraklık stresinin ve karnitin uygulamasının <i>Arabidopsis thaliana</i> sürgünlerinde NOX aktivitesi üzerine etkisi.....	45
3.26 Kuraklık stresinin ve karnitin uygulamasının <i>Arabidopsis thaliana</i> köklerinde NOX aktivitesi üzerine etkisi.....	45
3.27 Kuraklık stresinin ve karnitin uygulamasının <i>Arabidopsis thaliana</i> sürgünlerinde H ₂ O ₂ miktarı üzerine etkisi.....	46
3.28 Kuraklık stresinin ve karnitin uygulamasının <i>Arabidopsis thaliana</i> köklerinde H ₂ O ₂ miktarı üzerine etkisi.....	47
3.29 Kuraklık stresinin ve karnitin uygulamasının <i>Arabidopsis thaliana</i> sürgünlerinde TBARS miktarı (lipit peroksidasyonu) üzerine etkisi.....	47
3.30 Kuraklık stresinin ve karnitin uygulamasının <i>Arabidopsis thaliana</i> köklerinde TBARS miktarı (lipit peroksidasyonu) üzerine etkisi.....	48

KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
ROS	Reaktif oksijen türleri
SOD	Süperoksit dismutaz
NOX	NADPH oksidaz
POX	Peroksidaz
CAT	Katalaz
APX	Askorbat peroksidaz
GR	Glutasyon redüktaz
GSH	Glutasyon
GSSG	Glutasyon disülfid
AsA	Askorbik asit
MDHA	Monodehidroaskorbik asit
DHA	Dehidroaskorbik asit
MDHAR	Monodehidroaskorbat redüktaz
DHAR	Dehidroaskorbat redüktaz
MDA	Malondialdehit
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
ABA	Absisik asit

<u>Semboller</u>	<u>Açıklama</u>
O_2	Moleküler oksijen
1O_2	Tekli oksijen
H_2O_2	Hidrojen peroksit
$O_2^{\cdot -}$	Süperoksit radikali
$HO^{\cdot}$	Hidroksit radikali

1. GİRİŞ

Kuraklık gibi çevresel stresler, hücreler arası su dengesini bozarak bitkinin büyüme ve üretkenliğini sınırlayan temel faktörlerdir (Epstein et al., 1980; Boyer, 1982; Yancey ve et al., 1982). Bitkiler, abiyotik streslerden biri olan kuraklığa karşı fizyolojik ve moleküler yanıtlar vermektedir. Bu yanıtlar; turgor kaybı, yaprak alanının azaltılması, yaprak absisyonunun uyarılması, köklerin toprağın derinliklerindeki nemli bölgelere doğru uzaması, stoma kapanması, fotosentez hızının azalması, çözünen madde konsantrasyonunun artması, turgor kaybı, yaprak senesensinin artması, oksidatif stresin artması, absisik asit (ABA) birikiminde artış, zar akışkanlığı ve kompozisyonundaki değişim, protein-protein etkileşiminde ve protein-lipit etkileşiminde değişimler olarak sıralanabilir (Chaves et al, 2003).

Bu yanıtlardan biri olan turgor kaybı önemlidir. Çünkü, bitki dokularında turgor, dehidrasyona tolerans sağlayarak ve/veya dehidrasyondan kaçınarak korunmaktadır (Kramer and Boyer 1995). Turgorun korunmasında en önemli mekanizma, köklerden su alınımının artmasıdır. Dehidrasyondan kaçınma ve toleransla turgorun korunması kök kalınlığı, kök derinliği, kütlesi ve bitkilerin su alınımını artıran köklerin sıkıştırılmış toprak katmanlarına nüfuz etme yeteneği dahil olmak üzere gelişimsel ve morfolojik özellikler ile kontrol edilmektedir (Pathanet et al, 2004). Bu fenotipik özellikler (örneğin, kök kalınlaşması) kuraklığa dayanıklı bitkilerde normal koşullarda bile gözlenmektedir. Ayrıca, kuraklığa dayanıklı bitkilerde, osmotik ayarlama ve dehidrasyon toleransı gibi adaptif özelliklerde belirlenmiştir (Serraj and Sinclair, 2002)

Bitkilerin ortamdaki değişimlere alışması, farklı hücresel bölmelerde bulunan birden fazla yolak arasında hassas bir denge ile sağlanan hücresel dengenin, değişen ortam koşullarında da sağlanması gerekmektedir. Ancak, bu koordinasyon, kuraklık gibi stres faktörleri sonucu su potansiyelinin hızlı bir şekilde düştüğü durumlarda bozulmaktadır (Mittler et al. 2006). Yüksek enerjili duruma sahip elektronlar reaktif oksijen türlerini (ROS) oluşturmak için moleküler oksijene (O_2) aktarılır (Takahashi & Asada 1988; Mittler 2002).

Tekli oksijen ($^1\text{O}_2$), hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit radikali ($\text{O}_2^{\cdot-}$) ve hidroksit radikali ($\text{HO}^{\cdot}$) gibi ROS' lar protein, DNA ve lipitlerde oksidatif hasara neden olabilen toksik moleküllerdir (Apel & Hirt 2004). ROS, hücrede normal koşullar altında, peroksizom, mitokondri ve kloroplast gibi organellerde düşük seviyelerde üretilmektedir. Ancak, stres boyunca ROS' ların üretim hızı önemli ölçüde artmaktadır. Stres sırasında ROS birikimi büyük ölçüde ROS süpürülmesi ve ROS üretimi arasındaki dengeye bağlıdır (Mittler et al., 2004).

Kloroplastlarda, elektron taşıma zincirindeki aşırı indirgenmesi ile stres sırasında CO_2 fiksasyonunun sınırlandırılması ROS üretiminin ana nedenidir. Mitokondride elektron taşıma zincirinin aşırı indirgenmesi stres sırasında ROS üretiminin ana mekanizmasıdır (Davidson & Schiestl 2001). Peroksizomlarda, glikolat, fotorespirasyon sırasında gliksilik asit'e yükseltgendiğinde H_2O_2 üretilir (Mittler et al. 2004). Peroksidoksin (PrxR) ve glutatyon peroksidaz (GPX), katalaz (CAT), askorbat peroksidaz (APX), süperoksit dismutaz (SOD) gibi ROS süpürücü enzimler ve glutatyon (GSH) ve askorbik asit (AsA) gibi antioksidantlar ROS detoksifikasyonu için önemlidir (Takahashi & Asada 1988; Apel & Hirt 2004; Mittler et al. 2004; Dietz et al., 2006). Bu mekanizmaların tüm hücre bölmelerinde ROS detoksifikasyonunda önemli olduğu bilinmektedir (Mittler et al., 2004).

Ozmotik stres ve tuzluluk gibi çevresel koşullar hücrede ROS üretiminde artışa neden olmaktadır (Serrato et al. 2004; Borsani et al., 2005; Miao et al., 2006; Abbasi et al., 2007; Zhu et al. 2007; Giraud et al., 2008). ROS artışı hücrelerde oksidatif hasara neden olma potansiyeline sahip olsa da, son çalışmalar ROS' un farklı gelişimleri uyarmada, programlanmış hücre ölümünde, çevresel streslerde, patojen enfeksiyon cevabının iletilmesinde sinyal iletim molekülü olarak rol aldıklarını göstermektedir (Mittler et al. 2004; Torres & Dangl 2005). Örneğin, stress koşulları, Rboh genlerinin kodladığı zarla ilişkili NADPH oksidaz enziminin H_2O_2 üretmesine neden olmakta ve bu olay 'oksidatif patlama' olarak adlandırılmaktadır. Bu süreçte oluşan ROS' ların çeşitli hücre yollarında sinyal molekülü olarak görev aldıkları bilinmektedir (Mittler et al., 2004; Torres & Dangl 2005). NADPH oksidazın stres sırasında oluşturduğu ROS üretimi, oksidatif strese karşı savunma mekanizmalarında sinyal olarak iş görmektedir (Mittler et al., 2004; Davletova et al., 2005a; Miller, Shulaev & Mittler, 2008).

ROS' ların hücre içindeki rolleri iki yönlüdür: hem toksik moleküllerdir hem de farklı streslere cevap olarak üretilen sinyal molekülleri olarak iş görmektedirler. Kuraklık boyunca hücrelerdeki ROS sinyalini kontrol eden mekanizmaların aydınlatılması bu çevresel stres koşullarına ürünlerin toleransını geliştirmek için güçlü bir strateji sağlayabilir (Miller et al., 2009).

Bitkiler su alınımasını kolaylaştırmak için kuraklığa cevapta glisinbetain (GB), prolin (Pro) gibi çözünebilir bileşikler biriktirmektedirler (Hare & Cress, 1997; Ashraf & Foolad, 2007). Bu ozmotik düzenlemeye ilave olarak, bu ozmolitler stres koşulları altında ROS birikim seviyesinin artmasına karşı hücre korumasında önemli olduğu ileri sürülmektedir. Bu çözünebilir bileşiklerden biri olan karnitinin bakteri, mantar ve hayvanlarda detoksifikasyon, strese adaptasyon, stres toleransı, hormonal faaliyetler ve enerji metabolizması gibi temel biyolojik fonksiyonlara katılmaktadır. Temel metabolik fonksiyonu yanında, karnitinin son yıllarda elverişsiz hücresel çevrelere taşınım ile ilişkili yeni rolleri belirlenmiştir. Örneğin, Memelilerde karnitinin rolü hücrelerde metabolize edilemeyen ilaç türevli yağ asitleri, karnitin esterler gibi, doku atımını kolaylaştırarak detoksifikasyonda rol almaktadır (Bieber et al., 1996; Arrigoni-Martelli and Caso, 2001). Aynı zamanda, memelilerde (Sener et al., 2004; Gómez-Amores et al. 2007; Silva-Adaya et al. 2008) ve mayalarda (Franken et al. 2008) antioksidan özelliği belirlenmiştir. Bakterilerde, karnitin tuz ile uyarılan ozmotik stres (Canovas et al., 2007) veya bakteri hücrelerinin soğuk ile uyarılmasının üstesinden gelmesine yardım ederek (Angelidis and Smith, 2003) ozmolit gibi davranır ve sitoplazmik fonksiyonları değiştirmeden hücre içinde yüksek seviyelerde birikebilen “uyumlu” çözünenidir. Aynı zamanda karnitin muhtemelen çevresel hipertoniye karşı bazı hayvansal dokularda hücrelerin adaptasyonuna katılmaktadır (Peluso et al., 2000; Cotton et al., 2009). Önceki çalışmalardan bazıları karnitinin bitki hücrelerinde uyumlu çözünen olduğu düşünülmektedir. Arabidopsis' in normal karnitin içeriği mikromolar konsantrasyonda olduğu bilinmektedir, herhangi bir gelişim bozukluğu neden olmadan bir ekzojen kaynağına cevap olarak milimolar konsantrasyona kadar biritirebilmektedir (Charrier et al., 2012). Ozmolit özelliği nedeniyle bitkilerde kuraklık stresi altında ROS sinyali ve antioksidan sistemleri üzerinde oluşturdıkları yanıtlar ile ilgili çalışmalar sınırlıdır.

Bu nedenle kuraklığa karşı gösterdiği antioksidant savunma sistemlerindeki rolünün açığa kavuşturulması için bağıl büyüme hızı (RGR), bağıl su içeriği (RWC), ROS oluşumu (H_2O_2 miktarı, NADPH oksidaz (NOX) aktivitesi), antioksidant savunma sistemleri (SOD, CAT, POX, APX, DHAR, MDHAR ve GR enzimleri ile isoenzimleri) ve lipid peroksidasyonu çalışılmıştır. Elde edilen sonuçların daha iyi anlaşılabilmesi için bitkilerin stres altında oluşturduğu yanıtların ve antioksidant sistemin bu yanıtlardaki rolünün detaylı olarak bilinmesi gerekmektedir. Bu sebepten dolayı sonraki bölümlerde bu konular detaylı olarak anlatılacaktır.

1.1. Kuraklık Boyunca Farklı Organellerdeki ROS' Un Düzenlenmesi

1.1.1. Kloroplast

Kloroplast tilakoidlerinde fotosistem I (PSI) ve fotosistem II (PSII)' nin reaksiyon merkezleri ROS oluşumunun başlıca bölgesidir. ROS' un fotoüretimi çoğunlukla çevresel ve fizyolojik faktörlerden etkilenmektedir (Asada 2006). Kuraklık koşulları altında, Mehler reaksiyonu ile PSI' de moleküler oksijene elektron transferi ile $O_2^{\cdot-}$ iyonlarının oluşumu gerçekleşir (Asada 2006). . PSI' in çevresindeki zarla ilişkili bakır/çinko süperoksit (Cu/ZnSOD) $O_2^{\cdot-}$ 'yi H_2O_2 ' ye çevirir. Bunun ardından zara bağlı tilakoid-askorbat peroksidaz (APX) H_2O_2 ' yi H_2O ' ya dönüştürür. Bu dönüşüm aynı zamanda su-su döngüsü olarak adlandırılmaktadır (Asada 2006).

Su-su döngüsü sırasında monodehidro askorbat redüktaz (MDHAR), NAD(P)H veya ferrodoksinin indirgeyici gücüyle (Miyake & Asada 1994; Rizhsky, Liang & Mittler 2003), AsA'nın oksitlenmiş bir formu olan monodehidro askorbat (MDHA)' ı AsA' ya geri çevirmektedir (Miyake & Asada, 1994; Sano et al.,2005; Asada, 2006; Rizhsky, Liang & Mittler, 2003). Bu reaksiyon ile AsA ya çevirilemeyen MDHA moleküllerinin spontan olarak reaksiyona girmesiyle bir AsA ve bir tane de dehidroaskorbat (DHA) oluşmaktadır. Burada oluşan AsA redoks reaksiyonlarında kullanıma hazır hale gelmektedir. Ancak, AsA' nın en fazla oksitlenmiş formu olan DHA' nın ise indirgenerek yeniden kullanılabilir hale gelmesi gerekmektedir. Bu reaksiyon, dehidroaskorbat redüktaz (DHAR) tarafından katalizlenmektedir.

DHAR bu reaksiyon sırasında indirgeyici güç olarak GSH' ı kullanmaktadır. Böylece hücrede en bol bulunan iki redoks çiftinin havuzları ROS' un süpürülmesi için birbirine bağlanmaktadır. DHAR tarafından üretilen GSH' ın oksitlenmiş formu olan GSSH ise glutatyon redüktaz (GR) enzimi ile NAD(P)H kullanılarak tekrar GSH' a geri çevrilmektedir.

Tekli oksijen (1O_2) elektron taşıma zinciri aşırı indirgendiğinde ışık toplayıcı komplekslerde ve P680' nin reaksiyon merkezinde uyarılmış üçlü-durum klorofil ile PSII' de oluşur (Asada, 2006) Yukarıda anlatılan su-su döngüsü electron taşıma zincirindeki yükü azaltarak, 1O_2 ' nin fotoüretimini baskılayan rahatlama sistemini oluşturmaktadır (Karpinska, Wingsle & Karpinski, 2000; Asada, 2006; Møller et al., 2007).

Kloroplastlardaki ROS üretiminin ve süpürücülerin kontrolünün, bitkilerde kuraklık toleransı için önemli olduğu gösterilmiştir (Van Camp *et al.* 1996; Mittler & Berkowitz 2001). Ayrıca, kloroplastlarda ROS süpürücü mekanizmaların eksikliğinin kuraklık stresine duyarlılığı arttırdığı bilinmektedir (Serrato et al., 2004; Wang et al., 2005).

1.1.2. Peroksizom

Peroksizomlarda birçok metabolik süreçte yüksek oranlarda H_2O_2 ve O_2^- üretilir. Stoma kapanması ve kullanılabilir suyun azalması kloroplastlarda glikolat üretimini ve fotorespirasyonu artırırken mezofil hücrelerindeki CO_2 ve O_2 oranını azaltmaktadır. Hücre içi H_2O_2 üretimi çoğunlukla peroksizomlardaki glikolat-oksidadın katalizlemesiyle glikolatın yükseltgenmesi sonucu fotorespirasyon boyunca üretilmektedir (Noctor et al., 2002; Karpinski et al., 2003). Ayrıca, süperoksit radikallerinin dismutasyonu, flavin oksidaz yolağı, yağ asidi β -oksidasyonu ile de H_2O_2 üretilmektedir (Corpas, Barroso & del Río, 2001; Palma, Corpas & del Río 2009). Peroksizomlarda ağırlıklı olarak bulunan CAT enzimi artan fotorespirasyon koşulları altında H_2O_2 ' yi detoksifiye etmektedir (Mittler et al., 2004; Vandenabeele et al., 2004). APX ve AsA–GSH döngüsü de peroksizomlarda H_2O_2 ' nin süpürülmesine katkıda bulunabilirler (Jiménez et al., 1997). Peroksizomlarda H_2O_2 üretimi ayrıca SOD ve ksantin oksidaz (XOD) aktiviteleriyle de oluşmaktadır (del Río et al., 1996; Corpas et al., 2001).

Çevresel streslerin peroksizomlarda ROS üretimini artırdığı, antioksidant mekanizmaları engellediği ve redoks dengesini bozduğu bilinmektedir (del Río et al., 1996; Nyathi & Baker, 2006).

1.1.3. Mitokondri

Mitokondride ROS üretiminin özellikle kuraklık gibi abiyotik stres koşulları altında arttığı bilinmektedir (Alscher et al. 1997; Bartoli et al., 2004; Pastore et al., 2007). Mitokondrideki ROS oluşumunun başlıca bölgeleri, elektron taşıma zincirindeki kompleks I ve kompleks III' dür (Møller 2001; Rhoads et al. 2006; Møller et al. 2007). Oksijenden gelen elektronlar ubisemikinin ara ürünü aracılığıyla kompleks I ve kompleks III arasında taşınır ve O_2^- oluşur, H_2O_2 'ye indirgenmektedir (Raha & Robinson 2000; Rhoads et al., 2006). Kuraklık stresi süresince, mitokondriyal solunumun artışına neden olan elektronların sitokrom aracılığıyla O_2 'ye taşınması sırasında ROS üretilmektedir (Norman et al., 2004). mitokondriyal elektron taşıma zincirinin fonksiyonunun bozulması ubikinon (UQ) havuzunun aşırı indirgenmesiyle sonuçlanmakta ve ROS üretiminde artışa neden olmaktadır (Rhoads et al., 2006). ROS seviyesinde değişimler retrograde (geri hareketli) sinyal tetikleyici olarak önerilen Kompleks I' in bozulmasından kaynaklanmaktadır (Rhoads et al., 2006). Mitokondriyal alternatif oksidaz (AOX) ve mangan SOD (Mn-SOD) bu sinyal yolağını kontrol etme fonksiyonuna sahip olan önemli enzimlerdir (Foyer & Noctor, 2005). AOX, UQ havuzunun indirgenmiş halinin korunmasında ve mitokondride düşük ROS üretiminden sorumludur. Mn-SOD ise ROS detoksifikasyonun ilk aşamasında O_2^- 'i H_2O_2 'ye dönüştürmektedir (Møller, 2001; Arnholdt-Schmitt, Costa & de Melo, 2006; Rhoads et al., 2006).

Son yapılan çalışmalar, mitokondriyal AOX1'i eksik Arabidopsis bitkilerinde, mitokondri kadar kloroplastlardaki antioksidant mekanizmalarını içeren transkriptlerin de ifadelerinin değiştiğini ve orta şiddetli ışık stresi ve kuraklık kombinasyonuna duyarlı olduğunu göstermektedir (Giraud et al., 2008).

1.1.4. Apoplast

Apoplastta, kuraklık gibi olumsuz çevresel koşullarına ve absisik asite (ABA)' te cevapta H_2O_2 üretiminin gerçekleştiği bilinmektedir (Hu et al., 2005; Hu et al., 2006; Jubany-Marí et al., 2009). AtRbohD ve AtRbohF Arabidopsis' in bekçi ve mezofil hücrelerinde ifade olan iki temel NOX' u kodlamaktadırlar. AtRbohD ve AtRbohF, ABA-bağımlı stoma kapanmasında gerekli olan apoplastik ROS oluşumundan sorumludur (Kwak et al., 2003; Torres & Dangl, 2005). Diğer apoplastik ROS oluşturunca enzimler poliamin oksidazlar, peroksidazlar ve hücre duvarı ile ilişkili oksidazlardır (Mittler, 2002; Moschou et al., 2008). Apoplasttaki H_2O_2 birikiminin, hücre duvarı kalınlaşması ve büyüme gibi kuraklık stresine alışma yanıtlarına dahil olduğu düşünülmektedir (Ros Barceló, 2005; Jubany-Marí et al., 2009).

1.2. Kuraklık Stresi Boyunca Enzimatik Olmayan ROS Süpürücüleri

Tokoferoller, AsA ve GSH gibi düşük molekül ağırlıklı antioksidanlar kuraklığa alıştırma yanıtlarını değiştirerek abiyotik stres ile ilişkili genlerin ifadesini etkilemektedirler (Halliwell & Foyer, 1976; Takahashi & Asada, 1988; Foyer & Noctor, 2005).

AsA bitkilerde ROS' un neden olduğu hasarları en aza indiren veya önleyen, bol bulunan, güçlü, suda çözünabilen. (N. Smirnov, 2005; H.R. Athar et al., 2008) ve birçok önemli reaksiyonda elektron vericisi olarak görev alan önemli bir antioksidandır (Smirnov & Pallanca, 1996; Noctor & Foyer, 1998; Asada, 1999; Smirnov, 2000; Mano, Hideg & Asada, 2004; Ivanov et al., 2005; Shao et al., 2008). Bitkilerde mitokondride AsA metabolizması önemli bir rol oynamaktadır. Bitki mitokondrisinde AsA hem L-galakton- γ -lakton dehidrogenaz ile hemde AsA' in okside formundan yenilenmektedir (A. Szarka et al., 2007). AsA en güçlü ROS süpürücü olarak kabul edilmektedir çünkü, enzimatik ve enzimatik olmayan reaksiyonlarda elektron vericisidir. AsA, tokoferoksil radikallerinden α -tokoferol yenilenmesiyle ve $O_2^{\cdot-}$ ve $OH^{\cdot}$ doğrudan süpürülmesi ile zarların korunmasını sağlayabilir. Kloroplastlarda AsA vanyolaksantin de-epoksidazın kofaktörüdür ve böylece aşırı enerjinin uzaklaştırılmasını sağlamaktadır (N. Smirnov, 2000).

AsA-GSH döngüsünde AsA' in önemine ek olarak prostetik geçişli metal iyonları içeren enzimlerin aktivitesinin korunmasında önemli bir rol oynamaktadır (G. Noctor and C.H. Foyer, 1998). AsA redoks sistemi MDHA, DHA ve L-askorbik asitten oluşmaktadır. DHA, AsA' i oluşturmak için GSH ile indirgenmektedir (C.H. Foyer and B. Halliwell, 1976).

GSH indirgenmiş formu tüm hücre bölmelerinde bol miktarda bulunan bir üçlü peptittir (Foyer & Noctor, 2005). GSH' in okside formu, GSSG' nin GSH' a oranı H_2O_2 ' nin parçalanması süresince hücrede redoks dengesinin korunmasında önemli rol oynamaktadır (Shao et al., 2008). Buna ilave olarak, GSH AsA-GSH döngüsünde indirgenmiş AsA'ın yenilenmesinde önemli rol oynamaktadır (Halliwell & Foyer, 1976). Ayçiçeği sürgünlerinde toplam GSH kuraklık sırasında artmıştır (Sgherri & Navari-Izzo, 1995). Redoks çifti olarak fonksiyon gösteren GSH/GSSG' in yüksek oranlarının korunması buğdayda ve domateste (*Myrothamnus flaberrifolia*) koruyucu olarak kuraklık toleransında önemli rol oynadığı gösterilmiştir (Kocsy, Szalai & Galiba, 2002; Kranner et al., 2002).

α -tokoferol (vitamin E) oksidasyonda yağları koruyabilen ve ROS süpürebilen lipid antioksidanıdır (Munné-Bosch & Alegre, 2002; Asada, 2006; Li et al., 2008). Akdeniz çalıları, biberiye ve soya fasulyesi yapraklarında dahil olduğu farklı bitkiler ile yapılan birçok çalışmada, kuraklık stresinin α -tokoferol seviyesinin arttırdığı gösterilmiştir (Munné-Bosch & Alegre, 2000; Shao et al., 2008; Munné-Bosch et al., 2009). Buna ilave olarak, vitamin E sentezi için gerekli bir enzim olan, Arabidopsis tokoferol siklazin (VTE1) aşırı ifadesi, tütünde vitamin E seviyesini ve kuraklık stresine toleransını arttırmıştır (Liu et al., 2008).

1.3. Kuraklık Stresi Boyunca ROS ve Hormonal Düzenlenmesi

Bitki hormonları yaşlanma ve absisyon gibi stres toleransını etkileyen gelişim süreçlerinin düzenlenmesi, stres yanıtlarında hidrolik iletkenlik ve stoma kapanması gibi alışma yanıtlarının aktive edilmesiyle tuzluluk ve kuraklık yanıtlarında koruyucu sinyal görevi oynamaktadır (Schroeder, Kwak & Allen, 2001; Finkelstein & Gibson, 2002; Norman et al., 2004; Miao et al., 2006; Zhang et al., 2006; Rivero et al., 2007; Boursiac et al., 2008; Sakamoto et al., 2008).

ABA' nın, mısırın embriyo, sürgün ve yapraklarında H_2O_2 seviyesi artırdığı gösterilmiştir, fakat mısır yapraklarında APX ve GR kadar, siyosolik Cu/Zn SOD ve CAT1, APX1, glutatyon redüktaz 1 (GR1) (Zhang et al., 2006) gibi ROS ağı genlerini aktifleştirdiği ve ifadesini artırdığı gösterilmiştir (Guan & Scandalios, 2000; Zhang et al., 2001; Hu et al., 2005). ABA-bağımlı stoma kapanması NADPH oksidaz aktivitesine kısmen bağlıdır (Pei et al., 2000; Kwak et al., 2003; Torres & Dangl, 2005). Mitokondriyal AtGPX3 eksikliği kuraklıktaki bitkilerin hassaslığını ve bekçi hücrelerinde H_2O_2 üretimini artırmıştır.

Arabidopsis *gpx3* bitkilerinde, redoks durumunun düzenlenmesinde kuraklık boyunca ABA' ya cevapta önemli olduğu kabul edilen ABA-duyarlı genlerin ifadesine ve kalsiyum kanallarının ABA aktivasyona hasar vermiştir (Miao et al., 2006). ABA ve kuraklık sırasıyla H_2O_2 ve O_2 üreten ksantin dehidrogenazın (XDH) ve sitosolik aldehit oksidazın (AO) aktivitesini uyardığı gösterilmiştir (Yesbergenova et al. 2005). Buna ek olarak, arabidopsis, domates ve tütün bitkilerinin ABA-eksik mutantları AO ve XDH aktivitelerinden yoksundur (Leydecker et al., 1995; Sagi, Fluhr & Lips, 1999; Schwartz et al., 1997). Her iki gen kuraklık stresinde ABA-bağımlı şekilde AO ve XDH aracılığı ile bitkilerde ROS birikimini artırabildiği kabul edilen ABA uygulaması sonrasında ROS üretebilmişlerdir (Yesbergenova et al. 2005).

Kuraklık stresi boyunca, sitokinin seviyesi (CK) stoma kapanmasına yol açan ABA' ya cevapta sürgün uzaması azalmıştır (Davies & Zhang, 1991; Goicoechea, Antolin & Sánchez-Díaz, 1997). CKs ve ABA bu stres-indüklü değişimlerde yaprak absisyonuna yol açan erken yaprak yaşlanmasını düzenler, böylelikle su kaybını indirger ve bitkinin üst tabakasını azaltmaktadır (Pospíšilová, Synková & Rulcová, 2000). Transgenik tütün bitkilerinde ifade olan CKs biyosentezinde hız sınırlayıcı adımı katalize eden bir enzimi kodlayan *izopenteniltransferaz (IPT)* geni, kuraklık toleransını artırdığı ve su verimliliğini geliştirdiği gösterilen kuraklığa bağlı yaşlanma ile ilişkili reseptör protein kinaz (SARK) promotorunun kontrolü altındadır (Rivero et al., 2007). SARK-IPT transgenik bitkiler ROS metabolizması genlerinden özellikle AsA–GSH döngüsü genlerinin ifadesini artırdığı gösterilmiştir (Rivero et al., 2007). Son zamanlarda peroksizomlarda CAT varlığının artmasıyla birlikte kuraklık boyunca fotorespirasyonun artması strese toleransa katkı sağladığı gösterilmiştir (Rivero, Shulaev & Blumwald, 2009).

Salisilik asit (SA), jasmonik asit (JA) ve etilen sistemik kazanılmış direncin uyarılması ve patojen ve böcek saldırılarına karşı savunma cevabını içeren sinyal ağının önemli düzenleyicileridir (SAR; Pieterse & Van Loon, 2004). *Zat7*, *Zat12* *WRKY25* ve *Apx1* (Rizhsky et al., 2004a) gibi ROS yanıt genlerin promotor bölgesindeki diğer elementlere ek olarak SA-, JA- ve etilene duyarlı cis elementlerinin varlığı bitki-patojen etkileşiminin ötesinde bu hormon aracılı yanıtlar için daha geniş kapsamlı bir rol olduğu dolaylı yoldan kabul edilmiştir. Benzer NaCl ve SA uygulamaları su alım kapasitesini (yani hidrolitik iletkenlik, L_p) inhibe eder ve Arabidopsis köklerinde ROS birikimini uyarmaktadır. SA-indüklü L_p 'nin inhibisyonu ROS oluşumuna bağlıdır ve kısmen H_2O_2 süpürülmesi ile etkisiz hale gelebilir olduğu gösterilmiştir (Boursiac et al., 2008). SA potansiyel olarak AOX aktivitesini artırarak mitokondriyal ROS oluşumunu değiştirebilir ki dolayısı ile UQ havuzunda sitokrom yolağı ile ROS üretimi atlatılabilir (Norman et al., 2004). Metil jasmonat (MJ) stoma kapanmasına neden olan bekçi hücrelerdeki H_2O_2 üretimini teşvik edebilir; buna ek olarak, MJ-indüklü stoma kapanması *AtrbohD/F* çift mutantta hasara uğramıştır (Suhita et al., 2004). ERF/AP2 süper ailesine ait bir alt aile olan etilene yanıt faktörleri (ERFs), abiyotik stres yanıtında bu proteinlerin rolü olduğu kabul edilen birçok strese bitkilerin toleransını artırdığı gösterilen cis-elementlerine bağlı proteinler GCC-box-, DRE-/CRT- ve CE1- 'dir (Wu et al., 2008). Ozmotik ve oksidatif strese duyarlı ERF olan transgenik tütünlerde eksprese olan *JERF3* ROS birikiminin azalmasıyla ve ROS-detoksifikasyon enzimlerinin ifadesinin artması da dahil olmak üzere tuzluluk ve kuraklığa adaptasyonu artırdığı görülmüştür (Wu et al., 2008). Absisyon normal bitki gelişiminin normal bir parçası olarak ortaya çıkar, ama tuzluluk ve kuraklık gibi çevresel streslere yol açabilir (Taylor & Whitelaw, 2001). Etilen ve oksin' nin (IAA) etilen-başlatıcı absisyon sinyalin baskılanması ve yapraklarda artan IAA etilene duyarlılığı önlediği birçok bitki türlerinde absisyonunu antogonistik ilişkiyle düzenlediği gösterilmiştir (Lewis, Leslie & Liljegren, 2006; Sakamoto et al., 2008). IAA H_2O_2 oluşumunu inhibe etmesiyle absisyon antogonistiktir, H_2O_2 üretiminin etilen-bağımlı tuz stresi ile uyarılan absisyon için gerekli olduğu gösterilmiştir (Sakamoto et al., 2008).

1.4. Kuraklık Stresi Boyunca ROS Seviyesini Düzenleyen Ozmolitler

Kuraklık stresi sırasında meydana gelen su kıtlığında bitkideki su dengesi hücrelerdeki ozmotik düzenleme ile korunur. Birçok bitki ozmolitlerin sentezi ve birikimiyle bu kuraklık stresine yanıt verir. Bitkiler, ancak su potansiyelleri (Ψ_w) ortamlarının suyununkinden daha düşük olduğu sürece suyu absorblayabilir. Ozmotik düzenleme yada hücreler tarafından çözünmüş maddelerin biriktirilmesi, su potansiyelini azaltır. Ozmotik düzenleme, hücre başına çözünmüş madde miktarının artmasıdır. Şekerler, , amino asitler ve inorganik iyonlar (özellikle K^+), organik asitler gibi, çözünmüş maddenin konsantrasyonu artırılarak gerçekleştirilir. Bitki hücrelerinin sitoplazmalarında, enzimler yüksek iyon konsantrasyonlarından çok fazla etkilenebilir.

Ozmotik düzenleme sırasında iyonlar vakuolde biriktirilir. Böylece sitosol ve hücre içi organellerde enzimlerle temas etmeleri önlenir. İyonların farklı hücre kısımlarında bölmelendirilmelerinden sonra, hücrenin içinde su potansiyeli eşitliğinin sürdürülmesi gerekir. Bunun için sitoplazmada diğer ozmolitlerin biriktirilmesi gerekir. Denge oluşturan ozmolitler enzimlerin işlevlerini etkilemeyen organik bileşiklerdir. Ozmolitler, yüksek konsantrasyonda biriktiğinde organizma için toksik olmayan, fizyolojik pH altında nötr, düşük molekül kütleli ve suda yüksek çözünürlüğe sahip moleküllerdir. Bu maddeler hücrelerde yaygın olarak birikirler. Bitkiler denge oluşturan çözünmüş maddeleri sentezleyerek kök zonunda giderek artan kuraklığa karşı düzenleme yaparlar. Dokunun su kaybetmesine yanıt olarak oluşan ozmotik düzenleme yavaş gerçekleştirilir. Birkaç günlük bir sürede, diğer değişiklikler (büyüme ve fotosentez gibi) de oluşur. Dolayısıyla, ozmotik düzenlemenin su kıtlığından bağımsız ve dolaylı bir yanıt olduğu, ancak büyüme hızındaki bir azalma gibi başka bir etmen sonucunda olduğu söylenebilir. Bununla birlikte, ozmotik düzenleme yapamayan yapraklara göre, yapabilenler su potansiyelleri düşük olduğunda turgorlarını korurlar. Turgorun korunması, su potansiyeli düşük olduğunda hücre uzamasının sürmesini sağlar. Ayrıca stoma iletkenliğini artırır. Bunlar, ozmotik düzenlemenin, su kaybına direnci arttıran bir alışma biçimi olduğunu göstermektedir. Yaprak hücrelerinde ozmotik düzenleme sonucu bitki hücreleri fazladan ne kadar su kazanabilirler?

Alınabilir suyun büyük bir bölümü boşluklarda (su ve hava ile dolu) bulunur ve kökler tarafından kolayca alınır. Toprak kurudukça ilk olarak boşluklardaki su kullanılır. Geride küçük porlara sıkıca bağlanmış küçük miktarda su kalır.

Ozmotik düzenleme, sıkıca tutulan suyun büyük bir bölümünün bitki tarafından alınmasını sağlar; ancak toplam kullanılabilir sudaki artış küçüktür. Dolayısıyla, bitkinin kullanılabilir su bulması açısından yaprakta ozmotik düzenlemenin maliyeti kazancını hızla azalmasıyla bastırılır. Ozmotik düzenlemenin, kurumaya karşı toleransı arttırdığını, ancak verimlilik üzerinde büyük bir etkisinin bulunmadığını gösterilmiştir (McCree ve Richardson 1987). Her ne kadar yapraklardaki kadar yoğun çalışılmamış ise de, ozmotik düzenleme köklerde de yapılır. Köklerdeki düzenlemenin mutlak büyüklüğü yapraklardakinden daha küçük olmasına karşın, ilgili dokudaki çözünmüş madde potansiyeli (Ψ_s) yüzdesi olarak, köklerde yapraklardakinden daha büyük olabilir. Yapraklardaki gibi, bu değişiklikler, önceden su kaybetmiş topraktan su alınımını bir miktar artırır. Bununla birlikte, kök meristemlerinde de ozmotik düzenleme yapılabilir. Köklerde ozmotik düzenleme, turgor artışını ve kök büyümesinin sürmesini sağlar. Toprakta su azaldıkça, meristem hücrelerinde ozmotik basıncın düzenlenmesi, kök büyüme özelliklerinde oluşan değişikliklerin önemli bir elemanıdır (Taiz and Zeiger, 2010)

Bu ozmotik düzenlemede bitkiler su alınımını kolaylaştırmak için kuraklığa yanıt olarak kuaterner amin denge oluşturan çözünmüş maddelerden olan glisinbetain (GB) ve prolin (Pro) gibi çözünebilir bileşikler yani ozmolitleri biriktirmektedir (Hare & Cress, 1997; Ashraf & Foolad, 2007). Ayrıca ozmolitler stres koşulları altında ROS birikimine karşı hücre korumasında da görev almaktadır. Pro stres sırasında sitosolde ve vakuolde birikmektedir (Aubert et al., 1999; McNeil, Nuccio & Hanson, 1999) ve 1O_2 veya $HO\cdot$ in neden olduğu hasarlara karşı bitki hücrelerini koruduğu gösterilmiştir (Matysik, Alia, Bhalu & Mohanty, 2002). Doğrudan $HO\cdot$ in süpürülmesi ve 1O_2 nin suya verilmesiyle, prolinin protein, DNA ve hücre zarlarını koruduğu belirlenmiştir (Smirnoff & Cumbes, 1989; Matysik et al., 2002).

Doğrudan HO·' in süpürülmesine ilave olarak, prolin HO· oluşumunun neden olduğu hasara karşı biyolojik dokuları korur ve redoks-aktiviteli metal iyonlarını bağlayabilmektedir (Matysik et al., 2002).

Yaban tipten daha fazla prolin biriktiren transgenik buğday bitkilerinin, kuraklık sırasında daha az lipid peroksidasyon oranına sahip oldukları belirlenmiş ve yüksek prolin miktarlarının ROS hasarının azalmasında da iş gördüğü ortaya konmuştur (Vendruscolo et al., 2007). Prolin sentezi sırasında, NADPH kuraklık stresi boyunca redoksa duyarlı yolların düzensizliğini önleyen NADP⁺/NADPH oranının artırdığı gibi, stres sırasında PSI' in aşırı indirgenmesinin giderilmesi için gerekli olan ve NADP⁺' nın kullanabildiğini arttıran glutamatın indirgenmesinde de kullanılmaktadır (Hare & Cress 1997). Buna bağlı olarak, prolinin kuraklık boyunca lipid peroksidasyonunu önlediği ve PSII' nin fotokimyasal verimliliğini koruduğu bilinmektedir (Molinari et al. 2007).

Prolinin aksine, glisin betain (GB) abiyotik stresler boyunca doğrudan ROS süpürülmesinde görevli değildir (Smirnoff & Cumbes 1989; Chen & Murata 2008). Ancak, GB abiyotik stresler sırasında oksidatif hasara karşı hücreleri korumaktadır (Park et al., 2007; Chen & Murata, 2008). GB ağırlıklı olarak kloroplastlarda birikir ve stres koşulları altında PSII' nin verimliliğinin korunmasıyla ilişkilendirilmektedir (Génard et al., 1991; Ashraf & Foolad, 2007; Ben Hassine et al., 2008). Yaprğa GB uygulaması kuraklık stresi altındaki pamuk bitkilerinin içsel GB seviyesini ve fizyolojik süreçlerini etkilememiştir (Meek et al., 2003). Kuraklık stresi altındaki bitkilerin büyümesinde ve ürün verimi üzerinde ekzojen GB uygulamasının olumlu etkilerinin olduğunu gösteren birçok yayın vardır. Örneğin, *Phaseolus vulgaris* ' de GB uygulanan bitkiler kuraklık stresi sırasında uyulama yapılmayan bitkilere göre daha sonra solma geliştirmiş ve yaprak su potansiyeli daha yavaş düşüş göstermiştir (WeiBing and Rajashekar, 1999). Kuraklık stresi koşulları altında büyüyen pamuğa (*Gossypium hirsutum*) hem tohumu hemde yaprğa ekzojen olarak GB uygulaması yapılmış ürün verimini ve stres toleransını arttırmada etkili olduğu görülmüştür (Naidu et al., 1998).

Abiyotik stresler sırasında çözünebilir şekerler ozmotik ayarlamaların yanısıra ROS sinyalizasyonunun düzenlenmesinde de rol almaktadır (Vinocur & Altman, 2005; Seki et al., 2007). Çözünebilir şekerler oksidatif pentoz fosfat yolağı, fotosentez ve mitokondriyal solunum gibi ROS süpürücü yollarda ve ROS üretiminin korunmasına ve metabolizmasına katılırlar (Couée et al., 2006).

Bu şekerlerden biri olan mannitolün stres boyunca özellikle OH[•] in neden olduğu fotooksidatif hasara karşı hücreleri koruyabileceğı bilinmektedir. Mannitol üretimi arttırılan transgenik tütün bitkilerinin oksidatif strese karşı OH[•] in süpürölme kapasitesini fazlalaştırdığı gösterilmiştir (Shen, Jensen & Bohnert, 1997a,b).

Disakarit trehaloz stres koşulları altında ABA metabolizması ve karbonu düzenleyen sinyal molekülü olarak bilinmektedir (Avonce et al., 2004). Önceki çalışmalarda, trehaloz geninin aşırı ifadesinin kuraklık süresince transgenik bitkilerde toleransı arttırdığı anlaşılmıştır (Garg et al., 2002; Penna, 2003; Miranda et al., 2007). Kuraklığa yanıt mekanizmalarından birinde trehaloz olduğu belirlenmiştir. *E. coli* trehaloz biyosentetik genini ifade eden transgenik çeltik bitkilerinde yaban tip bitkiler ile karşılaştırıldığında kuraklık boyunca PSII' de fotosentetik hasarının azaldığı bilinmektedir (Garg et al., 2002).

1.4.1. Karnitin

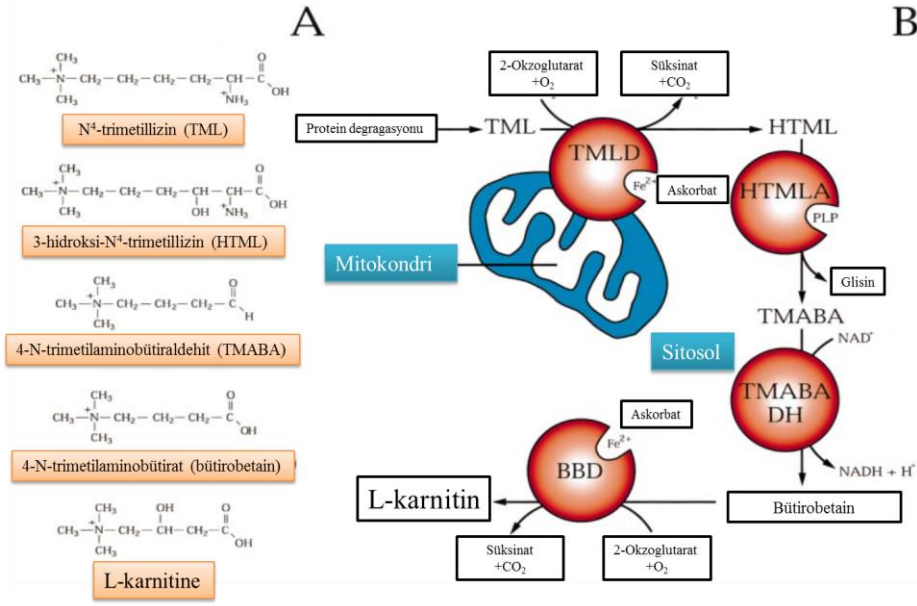
Karnitin mikrobiyal, bitkiler ve hayvanlar alemleri üyelerinde yaygın olarak bulunan ve çeşitli metabolik ve fizyolojik işlevleri olan bir ozmolittir. Dörtlü amonyum bileşığı olan karnitin, strese adaptasyonu, stres toleransı, detoksifikasyonu ve enerji metabolizması gibi temel biyolojik fonksiyonlara sahiptir (Charrier et al., 2012).

Mayalarda karnitin yağ aside metabolizmasına alternatif bir mekik sisteminin parçasıdır. Bu sistem glioksilat döngüsünü atlayarak asetatin peroksizomdan mitokondriye taşınımına izin verir ve Krebs döngüsünü beslemektedir (Bourdin et al. 2007). Mayalarda yağ asit yıkımı genellikle peroksizomlarda gerçekleşir. *Saccharomyces cerevisiae*' da, glioksilat döngüsü engellendiğinde, karnitin mitokondriye glioksizomlardan asetil-CoA taşınmasında rol alabilir (Van Roermund et al., 1999).

Bu durum karnitin translokaz aktivitesiyle ve her iki organelde karnitin transferazların varlığıyla asetat gruplarının karnitin ve CoASH ile çift taraflı değişimi yoluyla gerçekleşmektedir. *Saccharomyces cerevisiae*’ da oleatın β -oksidasyonu ile üretilen asetil-CoA, glioksilat döngüsü boyunca süksinat kaynağıdır. Ayrıca Asetil-CoA peroksisomal karnitin asetil transferaz (CAT2) enzimi ile karnitine de bağlanabilir (Elgersma et al., 1995). Elde edilen asetilkarnitin mitokondriye taşınır. Mayalarda oleatın tek karbon kaynağı olduğu durumlarda süksinat ve asetilkarnitin yolları ile büyüme devam ettirebilmektedir (van Roermund et al., 1995, 1999). Peroksisomal CAT2 veya glioksizomal döngüsünün anahtar enzimi olan peroksisomal sitrat sentazın (CIT2) tekli mutasyonları oleat üzerinden büyümeyi etkilemez. Ancak, CAT2 ve CIT2’ nin her ikisinde inaktive edilen ikili mutantlar oleat üzerinde büyüyemezler (van Roermund et al., 1995, 1999).

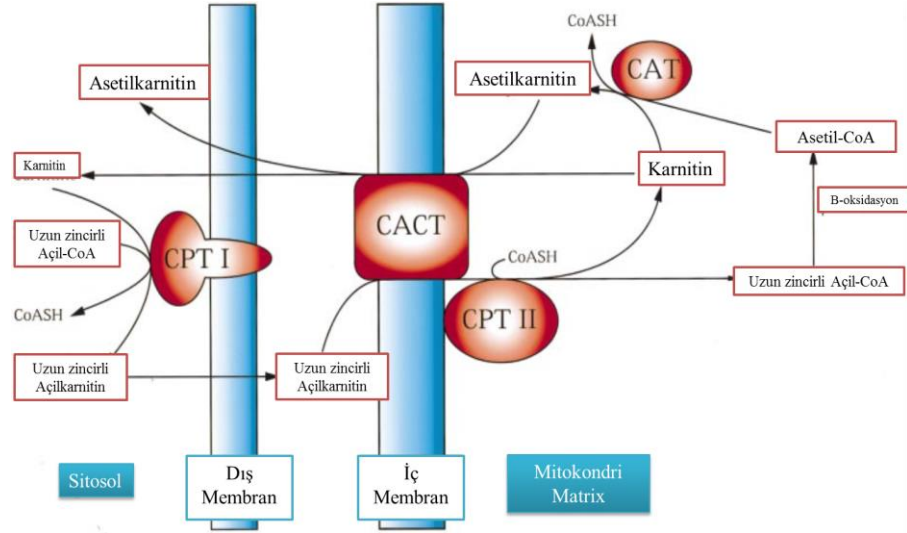
Neurospora crassa ve *Candida albicans* gibi mantarlarda karnitin üretirler (R.A. Kaufman & H.P. Broquist, 1977 and K. Strijbis et al., 2009) *Aspergillus nidulans* ‘ da oleat-büyüyen mutantlarda tanımlanan acuH lokusu karnitin açıl taşıyıcısı (CAC) benzeri protein kodlamaktadır. Benzer şekilde, bu fonksiyonun mitokondriyal açıl karnitin taşıyıcısı olduğu kabul edilir (DeLucas et al., 1999).

Hayvanlarda karnitin dışarıdan gıda ile alınabilirken , aynı zamanda karaciğer, böbrek ve beyinde de sentezlenebilir (F.M. Vaz & R.J. Wanders, 2002). Karnitin öncülü olan 6-N-trimetillizin (TML) lizozomal veya proteozomal protein degradasyonu ile oluşturulmakta ve dört aşamalı bir yolak sonucu karnitini oluşturmaktadır (şekil 2). Bu bileşik ilk olarak TML dioksigenaz (TMLD; EC 1.14.11.8) ile hidroksillenir ve elde edilen 3-hidroksi-6-N-trimetillizin (HTML) HTML aldolazın katalizlemesiyle (HTMLA; EC 4.1.2.X) 4-N-trimetilaminobütiraldehit (TMABA) ve glisine ayrılır. TMABA dehidrogenaz (TMABADH; EC 1.2.1.47) TMABA’ ı 4-N-trimetilaminobutirat (γ -bütirobetain, γ -BB) dönüştürür. Son olarak γ -BB karnitini üretmek için γ -BB dioksigenaz (BBD; EC 1.14.11.1) tarafından hidroksillenir.



Şekil 1.1 Memelilerdeki karnitin biyosentez yolağı (Vaz and Wanders, 2002' den).

Hayvan hücrelerinde, β -oksidasyon yolağı peroksizom ve mitokondride gerçekleşir. Karnitin, β -oksidasyonunda taşınan aktive edilmiş yağ asitlerinin peroksizomlardan mitokondriye hareketinden dolayı yağ asidi metabolizmasına katıldığı bilinmektedir (R.R. Ramsay, 2001). Karnitin metabolizmasına karnitinin katılımı aşırı veya yetersiz asetil-CoA sağlandığı durumlarda mitokondriyal asetil-CoA havuzunun tamponlanmasını kapsar (Bieber et al. 1982; Lysiak et al. 1988; Stephens et al. 2007). Yağ asitlerinin peroksizomlardan mitokondriye taşınımını sağlayan karnitin mekik sistemi, yağ asitleri üzerinden karnitin ve koenzim A' nın çift yönlü değişimini yapabilen ve hücre içi zarlar boyunca karnitin esterlerinin taşınmasından sorumlu karnitin/açilkarnitin traslokazı (CACT) olan karnitin açıl transferazları (CAT) içerir.



Şekil 1.2 Memelilerde iç mitokondriyal açıl CoA/CoA oranının düzenlenmesinde ve mitokondriyal uzun zincirli yağ asitlerinin oksidasyonun taşınmasında karnitin fonksiyonu. yolağı (Vaz and Wanders, 2002' den).

CoA esterleri olarak mevcut olan sitosolik uzun zincirli yağ asitleri, mitokondrinin dış zarındaki karnitin palmitoiltransferazın (CPT I) katalize ettiği reaksiyonda karnitini oluşturmak üzere transesterleştirilir. Bu reaksiyonda, CoA' dan uzun zincirli yağ asitlerinin açıl kısımları, karnitin hidrosil grubuna aktarılır. Elde edilen uzun zincirli açıl karnitin esterleri, spesifik taşıyıcı olan CACT ile mitokondrinin iç zarı üzerinden taşınır. Mitokondriyal zarın matriks tarafında, uzun zincirli yağ asitleri CoA ile transesterifiye edilir, bu reaksiyon karnitin palmitoiltransferaz II (CPT II) ile katalize edilir. Serbest bırakılan karnitin taşınım için CACT yoluyla mitokondriden ayrılır. Mitokondriyal matriksteki, karnitin asetil transferaz enzimi iç mitokondriyal karnitini kullanarak açilkarnitinleri kısa ve orta zincirli açılCoA' lara yeniden dönüştürmesi mümkündür. Bu açıl karnitinler CACT yoluyla mitokondriden ayrılabilirler. Bu mekanizmada açılasyon geri dönüşümlüdür, karnitin serbest CoA ve açıl-CoA' nın hücre içi konsantrasyonunu düzenler.

Çeşitli karnitin açıl taşıyıcı (CAC) protein mutantları insan, Drosophila ve solucanlarda tanımlanmıştır. Karnitin hayvanlarda, hormonal faaliyetlerin düzenlenmesinde, yetersiz metabolize edilen açillerin salınımında, açıl karnitin formunda enerji depolanmasında, koenzim A' nın içsel dengesinin sağlanmasında ekstra rollere sahiptir (F.M. Vaz and R.J.A.Wanders, 2002).

Bitki hücrelerindeki, yağ asidi degregasyon yolağı ve konumu hayvan hücrelerinden farklıdır. Bitkiler tohum gelişimi ve embriyogenez boyunca tohumda depolanan besinlere bağımlıdır. Depo moleküllerin yıkımı karbon ve enerji kaynağı olan şekerleri üreten fotosentetik kloroplastların oluşması için malzeme ve enerji sağlar. Arabidopsis gibi yağlı tohumlarda embriyonun kotiledon hücreleri içindeki yağ cisimciklerini içeren triaçilgliserid (TAG) formundaki lipidler çimlenme sonrası büyüme için gerekli olan enerji deposunun bir parçasıdır. Yağlı tohumlar çimlendiğinde, peroksizomların özel bir formu olan glioksizomlarda TAG parçalanması ile eş zamanlı olarak farklılaşma meydana gelir (Olsen and Harada, 1995; Olsen, 1998).

Bitki glioksizomları β -oksidasyonu süresince yağ asitlerinin tamamının parçalanması için gerekli enzimleri içerdiği gösterilmiştir (Kleiter and Gerhardt, 1998; Hayashi et al., 1999). Bitki hücrelerinde karnitin varlığını ve mitokondriyal zarlar boyunca açıl moleküllerin taşınması da dahil olmak üzere bitki metabolizmasındaki rolünü açıklayan pek çok yayın vardır (Wood et al., 1992). Karnitin açıl transferaz CAT kabak mitokondrisinden saflaştırılmıştır (Schwadbiedenis-Gerbling and Gerhardt, 1995). Ancak, yağlı tohumların çimlenmesi boyunca ve yağ asitlerinin parçalanmasında karnitin-bağımlı taşınmanın biyolojik rolü açık değildir. Yağ asitlerinin parçalanmasıyla üretilen asetil-CoA glioksilat döngüsüyle süksinata dönüşmektedir. Daha sonra süksinat mitokondriye taşınmaktadır (ap Rees, 1987; Gerhardt, 1993). Süksinat solunumda ATP üretim için subsurattır ve glükoneojenez ile şeker sentezi için sitoplazmadan taşınabilen malata dönüştürülür.

Işığa bağımlı olan hasarlı çimlenme sonrası fenotipe yol açan Arabidopsis mutantlarından BOU tanımlanmıştır. Işıktaki büyüdüğünde, mutant bitkiler ototrofik büyümeye devam edememişlerdir. Ancak, sürgünler karanlıkta çimlendirildiği zaman veya ortama seker eklendiğinde gelişmeye devam etmişlerdir. Transpozon ile bozulan mutantlarda BOU geni tanımlanmıştır. BOU kodlama dizisi mitokondriye asetat (asetilkarnitin) veya yağ asitlerinin karnitin esterlerinin (açilkarnitin) translokasyonuna katılan CAC-benzeri protein ailesi ile homoloji göstermiştir. BOU proteini mitokondride bulunmaktadır. BOU ışık ile düzenlenen yolaklarda tanımlanması, çimlenme sonrası büyüme boyunca glioksilat döngüsüne alternatif olabileceğini göstermektedir (Lawand et al., 2002).

Arabidopsis thaliana ve diğ er bitki türlerinin (Bourdin et al., 2007) dokularında serbest karnitinin yanında açıl-karnitinlerinde miktarı belirlenmesi bitki lipid metabolizmasını karnitinin katılımını göstermektedir.

Karnitinin metabolik fonksiyonununa ek olarak karnitin, son yıllarda elverişsiz olan hücresel ortamların işlenmesi ile ilişkili yeni rolleri belirlenmiştir. Sitoplazmik fonksiyonları değiştirmeden hücre içinde yüksek seviyelerde birikebilen ‘‘uyumlu’’ bileşiktir. Bakterilerde birikiminin, ozmotik stres (Canovas et al. 2007) ve soğuk stresinin üstesinden gelmede işlevi olduğu bildirilmiştir (Angelidis and Smith 2003). Ayrıca karnitinin soğuk stresinde zar lipidlerinin adaptasyon sürecinde gerekli olan yağ asitlerinin (FA) hücre içine taşınmasında görev aldığı ileri sürülmüştür (A.S. Angelidis & G.M. Smith, 2003). Memelilerde, FA metabolizmasına katılımı ile bağlantılı olarak karnitin hücre tarafından metabolize edilemeyen ilaç t revili karnitin esterleri gibi yağ asitlerinin, doku atılımını kolaylaştırarak detoksifikasyona yardımcı olur (E. Arrigoni-Martelli, & V. Caso, 2001). Buna ilave olarak, karnitin memelilerde (G. Sener et al., 2004 and D. Silva-Adaya et al., 2008) ve mantarlarda (J. Franken et al., 2008) antioksidan özelliğe sahiptir. Aynı zamanda karnitin muhtemelen çevresel hipertoniye karşı bazı hayvansal dokularda hücrelerin adaptasyonuna katılır (Peluso et al. 2000; Cotton et al. 2009).

Bakterilerde, hayvanlarda ve tek hücrelilerde olduğu gibi su stresindeki bitkilerde de ozmolit ve/veya antioksidan özelliklere sahip olabileceği belirtilmiştir. *Arabidopsis*’ de normal koşullarda hücre içi karnitin miktarının mikromolar düzeyde olduğu bilinmektedir. *Arabidopsis* herhangi bir gelişim bozukluğuna neden olmadan karnitin ekzojen kaynağına cevap olarak milimolar konsantrasyona kadar biriktirebilmektedir. Karnitinin tuz ve ozmotik stres koşullarında *A. Thaliana* sürgünlerinde iyileşme ve gelişimin arttırması bitkilerde abiyotik stres toleransını sağladığını göstermiştir (Charrier et al., 2012).

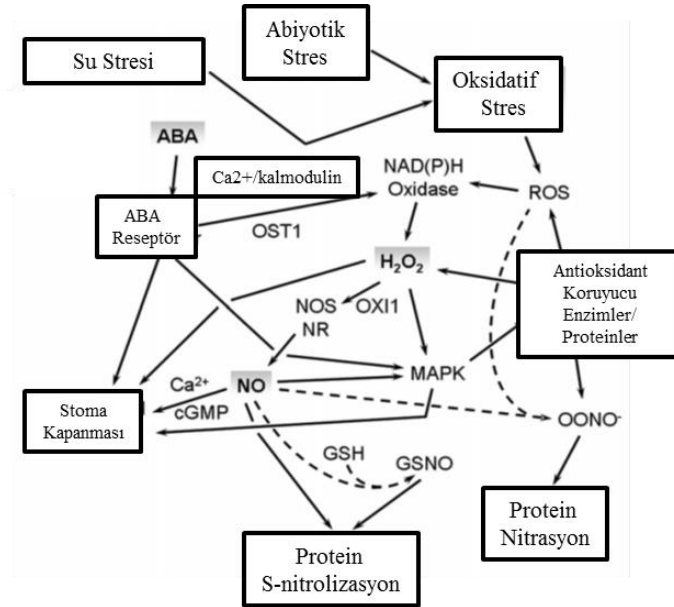
Abiyotik stres toleransını sağlamada, ozmolit etkisinin yanı sıra karnitin tuz stresi sırasında tonoplast ve plazma membranındaki çeşitli sodyum iyonu taşıyıcılarının düzenlenmesi ile sodyumun toksik etkisini azaltabilmektedir.

Hücre içi Na^+ birikiminin engellenmesi; girişin engellenmesi, çıkışın kolaylaştırılması vakuolar biriktirme yoluyla gerçekleştirilir (Tuteja 2007; Pardo 2010). Memelilerde, hücre içine karnitin alınımı Na^+ /karnitin simporterı olan OCTN2 taşıyıcısı ile gerçekleştirilmektedir (Tamai et al., 2001). Bitkilerde OCTN2' yide içeren altı adet organik katyon taşıyıcısı (OCT) tanımlanmıştır. Plazma membranında var olan varsayılan karnitin taşıyıcısı (AtOCT1) tanımlanmıştır (Lelandais-Brière et al., 2007). Diğer beş OCT, tonoplastta yer alır, OCTN2 benzer şekilde hareket eder, vakuolde Na^+ biriktirilmesine izin verir ve tuz, kuraklık, soğuk gibi streslere cevapta ifadeleri artmaktadır (Küfner and Koch, 2008).

Charrier et al, (2012)' ye göre transkriptomik analizler, hücre içi karnitin birikimi ABA-duyarlı genlerin düzenlenmesine yol açtığından dolayı ABA yolağının düzenlenmesinde etkili olduğu düşünülmektedir. ABA' nın lateral kök uzaması üzerindeki inhibitör etkisi göz önüne alındığında, karnitinin ABA ile antagonistik çalışması, Arabidopsis sürgünlerinde karnitin uygulaması ile uyarılan kök büyümesindeki artışı açıklayabilir (Lelandais-Brière et al., 2007). Tuz stresi uygulanan sürgünlerin iyileşmesinde karnitinin pozitif etkisi ABA ile antagonistik çalışması ile açıklanabilir; ABA mutantlarında erken sürgün gelişimi ve çimlenme boyunca tuz toleransı gelişmiştir (Léon-Kloosterziel et al., 1996), bu muhtemelen olumsuz su koşulları altında çimlenmenin fizyolojik olarak durdurulmamasından kaynaklanmaktadır (González-Guzmán et al. 2002). Karnitin ve proline karşı abi1-1 mutatinin duyarlılık göstermesi her iki bileşikte ABA sinyal iletim yolağıyla veya aracılığıyla etki etmektedir. ABA' nın kontrolü stres adaptasyonu sağlayan tüm ozmolitlerin özelliği değildir, ama ozmolitler ABA yolağı ile uyarılan büyümenin inhibisyonunun bastırılmasından sorumlu olabilirler (Charrier et al., 2012).

Hayvan hücrelerine uygulanan karnitin, NO (nitrik oksit) üretimini artırmaktadır (Neill et al. 2008), NO, ABA-bağımlı ve bağımsız yollar aracılığıyla Arabidopsiste abiyotik stres toleransı ile ilişkili sinyal molekülüdür. Bu artış şu şekilde olmaktadır; karnitin arginaz aktivitesini düşürür ve NOS (nitrik oksit sentaz) aktivitesi için gerekli arginin seviyesini artırır (Ishii et al., 2004), böylece NO seviyesi artmaktadır (Erbaş et al., 2007). Hücrelerde turgor kaybuna neden olan kuraklık stresi ABA biyosentezini tetiklemektedir.

ABA, ABA reseptörünü içeren sinyal yolağı üzerinden NADPH oksidaz vasıtasıyla H_2O_2 üretmektedir. H_2O_2 nitrat redüktaz ile NO'yu uyarır ve NOS benzeri enzimler aracılığıyla OXI1 protein kinaz ve Ca^{2+} içeren sinyal yolağına katılabilir. NO, MAPKs, cGMP, and Ca^{2+} gerektiren adımlarla stoma kapanmasına neden olmaktadır. ABA ve H_2O_2 den gelen sinyallerle NO' dan bağımsız olarak stoma kapanması gerçekleşebilir. NO, MAPK ve tanımlanmamış diğer sinyaller aracılığıyla antioksidan gen ve enzim aktivitesini artırmaktadır. NO, S-nitrosilasyon ve nitrasyon sonucunda proteinlerin konformasyon değişikliklerini uyarabilmektedir. Bu NO' nun ikincil haberci olduğunu göstermektedir (Neill et al.,2002).



Şekil 1.3 Oksidatif, su ve abiyotik streslerde ABA, H_2O_2 , NO arasındaki sinyal etkileşimi (Neill et al., 2008' den).

Karnitinin bakteri, mantar ve hayvanlarda belirlenen ozmolit ve/veya antioksidan özelliğindeki metabolik rolleri, ABA ve NO ile ilişkisi ile ilgili bilgiler bitkilerde sınırlıdır. Karnitin' in bitkilerde kuraklık stresi sırasında stres iyileştirilmesindeki rolünün açıklanması amacıyla su kültüründe büyütülen *Arabidopsis thaliana* (Col.) bitkilerine 48 saat süreyle PEG6000 uygulaması yapılmıştır ve böylece fizyolojik kuraklık yaratılmıştır.

Karnitinin aynı zamanda stres faktörlerine karşı koruyucu rollerinin aydınlatılması amacıyla dışarıdan karnitin uygulaması yapılan *Arabidopsis thaliana* bitkilerinde hem normal koşullarda hemde kuraklık koşullarında ROS sinyalleme ve antioksidan savunma yanıtı araştırılmıştır. Çalışmada kontrol, kuraklık (%10 PEG 6000), karnitin (3 μ M), kuraklık-karnitin (%10 PEG 6000+ 3 μ M karnitin) olmak üzere 4 ayrı grup kullanılmıştır.

Bu çalışmada, (i) Arabidopsis' te kuraklık ve karnitin uygulamasının fizyolojik parametreler üzerindeki etkisi, (ii) kuraklık stresi altındaki bitkilerde ROS düzenlenmesini ve bu ROS' ların süpürülmesinden sorumlu bazı antioksidan enzimlerin aktivitelerini nasıl etkilediği, (iii) kuraklık stresine maruz bırakılan bitkilere dışarıdan karnitin uygulamasıyla ROS düzenlenmesinin ve antioksidan savunma sisteminin nasıl değiştiği, (iv) stres uygulanma süresince karnitin ve ROS düzenlenmesi arasındaki ilişkinin nasıl olduğu araştırılmıştır. Bu nedenle çalışmamızda,

- 1- Kuraklık stresi (%10' luk PEG) uygulaması altında fizyolojik parametreler
 - 2- Karnitin (3 μ M) uygulaması altında fizyolojik parametreler
 - 3- Kuraklık stresi (%10' luk PEG) ve karnitin (3 μ M) uygulaması altında fizyolojik parametreler
 - 4- Yukarıda belirtilen koşullara bağlı olarak H_2O_2 miktarı ve NOX aktivitesi ve izoenzimlerin aktivitesi ölçülerek ROS düzenlenmesi
 - 5- ROS süpürülmesinden sorumlu olan SOD, CAT, POX, APOX, GR, DHAR, MDHAR gibi antioksidan enzimlerin aktiviteleri ve SOD, CAT, POX, GR izoenzimlerin aktivitesi
 - 6- Hücre zarında lipid peroksidasyon seviyesi
- hem sürgünlerde ve hem de köklerde belirlenmiştir.

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Bitkilerin Yetiştirilmesi ve Deneme Deseni

2.1.1. Tohum sterilizasyonu

Arabidopsis thaliana yaban tip kolombiya (col-0) ekotipine ait tohumlar 1 dk. boyunca %70 etanol' de yüzey sterilizasyonuna maruz bırakılmıştır. Ardından 5 defa steril deiyonize su ile yıkanmıştır. Sonrasında 10 dk. boyunca % 4 sodyum hipoklorit çözeltisi ile yüzey sterilizasyonuna maruz bırakılmıştır. Ardından 5 defa steril deiyonize su ile yıkanmıştır.

2.1.2. Büyüme koşulları ve stres uygulamaları

Tohumların ekimi ve bitkinin büyümesi için hidrofonik ortam kullanılmıştır. Hidrofonik ortamda yarım kuvvet hoagland çözeltisi kullanılmıştır (Hoagland and Arnon, 1950). Her biri 54 adet tohum alabilen platforma ekilen *Arabidopsis thaliana* col-0 tohumları iki gün içerisinde çimlenmiştir.

Çimlenmenin ardından 17 gün boyunca hidrofonik ortamda 16/8 saat (aydınlık/karanlık) foto periyotta, 25 °C sıcaklıkta, % 60-70 nem içeren ortamda led ışık yardımı ile büyütülmüştür. 15 günlük bitkilere uygulanma yapılmıştır. Uygulamada bitkiler gruplandırılarak 4 farklı bitki grubu oluşturulmuştur. Kontrol bitki gruplarına yarım kuvvet hoagland uygulanırken , kuraklık uygulamasına maruz kalan bitki gruplarına % 10' luk PEG içeren yarım kuvvet hoagland uygulanmış, ozmolit (karnitin) uygulaması yapılan bitki gruplarına 3µM karnitin içeren yarım kuvvet hoagland uygulanmış ve son olarak stres ve ozmolit uygulaması yapılan bitki gruplarına % 10' luk PEG ve 3µM karnitin içeren yarım kuvvet hoagland uygulanmıştır. Kuraklık stresi ve ozmolit uygulaması 48 saat boyunca devam etmiştir ve 17 günlük bitkiler hasat edilmişlerdir. Alınan örnekler analizler için - 80°C dolapta depo edilmiştir.

2.2. Fizyolojik Parameterler

2.2.1. Büyüme parametreleri

Kuraklık ve karnitin uygulamasını takiben 48 saat sonra her bir gruptan rastgele 5 adet bitki seçilmiş ve bu bitkilerin gövdeleri ve köklerinin boyları ölçülmüş ve yaş ağırlıkları belirlenmiştir.

2.2.2. Bağlı büyüme hızı (RGR)

Kuraklık ve karnitin uygulamasını takiben 48 saat sonra her bir gruptan rastgele 5 adet bitki seçilmiş ve bu bitkilerin gövdeleri ve köklerinin yaş ağırlıkları belirlenmiştir. Bu örnekler 70 °C’de 72 saat etüvde bekletilmiş ve ardından kuru ağırlıkları da belirlenmiştir.

2.2.3. Bağlı su içeriği (RWC)

Stres uygulamasını takip eden 48 saat sonrasında her bir gruptaki bitkilerden yaklaşık olarak eş boyutlarda yaprak örnekleri alınarak yaş ağırlıkları ölçülmüştür ve ardından yapraklar 6 saat boyunca deiyonize su bulunan petrilere bekletilerek turgorlu hale gelmeleri sağlanmıştır. 6 saatlik sürenin ardından yapraklar tartılmış ve turgorlu ağırlıkları belirlenmiştir. Tartılan yaprak örnekleri 70 °C’de 72 saat etüvde kurutulmuş ve bu süre sonunda yaprakların kuru ağırlıkları belirlenmiştir. Her bir gruba ait yaprak örneklerinin bağlı su içeriği aşağıdaki formüle göre % olarak hesaplanmıştır.

Bağlı su içeriği (%) = [(Yaş ağırlık – Kuru ağırlık) / (Turgorlu ağırlık – Kuru ağırlık)] x 100

2.2.4. Yaprak su potansiyeli (ψ_n)

Wescor Vapro 5520 ozmotik potansiyel ölçüm cihazı kullanılarak yaprak ve kök su potansiyelinin ölçümü yapılmıştır. Hasat sırasında, her gruptan 3 adet bitkinin yaprak ve kökleri ayrı ayrı 1,5 ml’lik bir ependorflarda cam baget yardımıyla ezilmiştir ve örnekler 10000 rpm’de 5 dk. santrifüj edilmiştir.

Ependorfun dibinde biriken yaprak ve kök sıvısının 10 µl'si ozmotik potansiyelinin ölçülmesi için kullanılmıştır. MPa cinsinden su potansiyeli, elde edilen ozmotik potansiyel verilerini Santa-Cruz *et al.* (2007)' ye göre $2,408 \times 10^{-3}$ katsayısı ile çarpılarak hesaplaması yapılmıştır.

2.3. Biyokimyasal Parametreler

2.3.1. Lipit peroksidasyonu

Madhava Rao ve Sresty (2000)' e göre yapraklar ve köklerdeki lipit peroksidasyonu, malondialdehit (MDA) içeriği belirlenerek ölçümü yapılmıştır. Lipit peroksidasyonunun son ürünü olan MDA' nın miktarının belirlenmesi için thiobarbiturik asit (TBA) reaksiyonu kullanılmıştır. MDA konsantrasyonu 532 nm ve 600 nm' de ölçülen absorbans değerlerine göre hesaplanmıştır. 600 nm' de ölçülen absorbans spesifik olmayan turbiditedir ve 532 nm' de ölçülen absorbanstan çıkartılarak gerçek MDA miktarı belirlenir. MDA miktarı hesaplanırken ekstinksiyon katsayısı $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ kullanılmıştır.

2.3.2. H₂O₂ miktarı

Cheeseman (2006)' ya göre H₂O₂ miktarı bazı değişikliklerle belirlenmiştir. Standart H₂O₂ analizinde 100 µM sorbitol, 250 µM ferrous amonyum sülfat ve 100 µM xilenol orange, 25 mM H₂SO₄ içinde çözülmetedir. Bu yöntemde ferrous amoniyum sulphate/xilenol orange (FOX) tamponuna %1 etanol (EtOH) eklenerek hazırlanmıştır. Analizde kullanılacak örnekler sıvı azot içinde muhafaza edilmiştir. Eğer örnekler, -80 °C veya -20 °C derecede saklanırsa H₂O₂ miktarında 1 haftada % 60' a varan kayıplar gözlenebilmektedir (Cheeseman, 2006). 0,1 g yaprak ve kök örneği soğuk aseton(-20 °C) ile hazırlanmış 25 mM H₂SO₄ ile homojenize edilmiştir. Homojenizatlar 14000 rpm' de 4 °C' de 10 dk. santrifüj yapılmıştır. Elde edilen süpernatanttan 50 µl örnek alınmış ve üzerine 1 ml eFOX tamponu ilave edilmiştir. Elde edilen karışım 30 dakika bekletildikten sonra 550 ve 800 nm dalga boyunda ölçülür ve ölçülen absorbansların farkı alınır.

2.3.3. Antioksidant enzim ekstraksiyonu ve aktivite analizleri

Bu aşamadaki bütün işlemler proteaz aktivitesini minimum seviyede tutmak için 4 °C' de gerçekleştirilmiştir. Protein ve enzim ekstraktlarının hazırlanması için 0,1 gr yaprak ve kök örnekleri ilk olarak sıvı azotta ezilerek toz haline getirilmiştir. Bunun ardından 0,5 ml ekstraksiyon tamponunda (50 mM Tris-HCl pH 7.8, 0,1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 0,2% (v/v) Triton-X100, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and %2 (w/v) PVPP) homojenize edilmiştir. Askorbat peroksidaz aktivitesi analizi için homojenizasyon tamponuna 5 mM askorbik asit eklenmiştir. Homojenizasyonun yapıldıktan sonra örnekler 14000 g' de 10 dk. santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra elde edilen süpernatantlar protein miktarı ve enzim aktivitesi belirlenmesinde kullanılmıştır.

2.3.3.1 Protein miktarının belirlenmesi

Bradford (1976)' a göre protein miktarı belirlenmiştir. Ölçüm Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının asidik şartlarda proteine bağlandığında kırmızı ve/veya yeşil formundan maviye dönüşmesine dayanmaktadır. Mavi renk oluşumunun 595 nm' de ölçülmü yapılmıştır. Standart olarak bovine serum albumin (BSA) kullanılmıştır. Standart aralığı 0,02 – 0,2 mg/ml' dir. Bitki ekstraktlarının protein miktarları elde edilen bu standart ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır.

2.3.3.2 Katalaz (CAT) enzim aktivitesinin belirlenmesi

Bergmeyer (1970)' e göre katalaz (CAT (EC 1.11.1.6)) aktivitesi H_2O_2 ' nin süpürülmesinin 240 nm' de absorbansda yol açtığı azalmanın izlenmesi ile ölçüm yapılmıştır. Reaksiyon karışımı 0.1 mM EDTA ve %3 H_2O_2 içeren 50 mM sodyum fosfat (pH 7,0) tamponudur. Enzimin, 1 mg total protein başına dakikada süpürdüğü μ mol H_2O_2 miktarının, 1 U (μ mol H_2O_2 mg protein⁻¹ min⁻¹) olarak hesaplaması yapılmıştır.

2.3.3.3 Peroksidaz (POX) enzim aktivitesinin belirlenmesi

Herzog ve Fahimi (1973)' e göre peroksidaz (POX (EC 1.11.1.7)) aktivitesinin ölçümü yapılmıştır. Yöntem reaksiyon karışımındaki 3,3'-diaminobenzidine-tetra hidroklorid dihidrat (DAB)' ın ekstrakttaki peroksidazlar tarafından H_2O_2 ' yi süpürmek için substrat olarak kullanılması ve buna bağlı renk oluşumunun ölçümüne dayanır. Reaksiyon karışımı DAB, %0,1 (w/v) jelatin, %0,6 H_2O_2 içeren 150 mM sodyum fosfat sitrat tamponudur (pH 4,4). 465 nm' deki absorbans 3 dk. boyunca gözlenmiştir. Enzimin, 1 mg total protein başına dakikada oksitlediği DAB miktarı, 1 U (imol DAB mg protein⁻¹ min⁻¹) olarak hesaplaması yapılmıştır.

2.3.3.4 Askorbat peroksidaz (APX) enzim aktivitesinin belirlenmesi

Askorbat peroksidaz (APX (EC 1.11.1.11)) aktivitesi Nakano ve Asada (1981)' e göre belirlenmiştir. Ölçüm, askorbatın oksitlenmesine bağlı olarak 290 nm' deki absorbansın azalmasının izlenmesine dayanmaktadır. Reaksiyon karışımı 0,1 mM EDTA, 0,1 mM H_2O_2 ve 0,5 mM Askorbat içeren 50 mM potasyum fosfat tamponudur (pH 7,0). Oksitlenen askorbat miktarı, ekstinksiyon katsayısı 2,8 mM⁻¹ cm⁻¹ kullanılarak hesaplanmıştır. Enzimin, 1 mg total protein başına dakikada oksitlediği askorbat miktarı, 1 U (μmol askorbat mg protein⁻¹ min⁻¹) olarak hesaplanmıştır.

2.3.3.5 Glutasyon redüktaz (GR) enzim aktivitesinin belirlenmesi

Glutasyon redüktaz (GR (EC 1.6.4.2)) aktivitesi Foyer ve Halliwell (1976)' ya göre ölçülmüştür. Yöntem GSSG' yi redüklemek için GR tarafından oksitlenen NADPH' ın izlenmesine dayanır. Reaksiyon karışımı 0,5 mM GSSG, 0,12 mM NADPH içeren 25 mM sodyum fosfat (pH 7.8) tamponudur. NADPH oksidasyonu 340 nm' de takip edilmiştir. Oksitlenen NADPH miktarı ekstinksiyon katsayısı 6.2 mM⁻¹ cm⁻¹ kullanılarak belirlenmiştir. Enzimin, 1 mg total protein başına dakikada oksitlediği NADPH miktarı, 1 U (μmol NADPH mg protein⁻¹ min⁻¹) olarak hesaplanmıştır.

2.3.3.6 NADPH oksidaz (NOX) aktivitesinin belirlenmesi

Jiang and Zhang (2002)' ye göre NADPH oksidaz aktivitesinin ölçümü yapılmıştır . Reaksiyon karışımı 50, 0.5 mM XTT, ve 100 μ M NADPH içeren mM Tris-HCl tamponudur (pH 7.5). 470 nm' de XTT' nin redüksyonu izlenmiştir. Reaksiyon dışı oluşabilecek renk değişiminin belirlenmesi için 50 U SOD kullanılmıştır. O₂.- üretiminin $2.16 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ekstinksiyon kat sayısı kullanılarak hesaplaması yapılmıştır.

2.3.4. Antioksidant enzimlerin izoenzim tayini

Yaprak ve kök örneklerinden elde edilen protein ekstraktları denaturasyona sebep olmayan koşullarda (SDS içermeyen) poliakrilamid jel elektroforezinde (Native-PAGE) ayrılmış ve araştırılan enzimlere özel boya solüsyonlarıyla boyanmıştır. Aktivite analizlerinde kullanılan ekstraksiyon prosedürü örneklerin hazırlanmasında kullanılmıştır. Laemmli (1970)'e göre Native-PAGE, SDS kullanılmadan yapılmıştır. Jeller Vilbert Lourmat jel görüntüleme sisteminde görüntülenmiş ve Bio-Capt yazılımı kullanılarak bant yoğunluklarının analizi yapılmıştır.

2.3.4.1 Süperoksit dismutaz (SOD) izoenzim tayini

Örnekler % 12.5' lik ayırma (separating) ve %4' lük hizalama (stacking) jelinde elektroforetik ayırımına maruz bırakılmıştır. Her bir kuyucuğa yapraklar için 45 μ g ve kökler için 40 μ g protein yüklenmiştir., Beauchamp ve Fridovich'e (1971) göre SOD boyaması, riboflavin ve nitrobluetetrazolium (NBT) boyası ile belirlenmiştir. Riboflavin ışıkla birlikte süperoksit anyonu (O₂⁻) üretme özelliğine sahiptir, üretilen O₂⁻ NBT' yi oksitleyerek mavi-mor renkte formazan oluşumuna neden olmaktadır. Boyamanın prensibi jel üzerinde SOD lokalize olmuş bölgelerde NBT oksitlenmesinin inhibisyonu ile beyaz bantlar oluşmasının sağlanmasıdır. Jeller 60 dk karanlıkta boya solüsyonunda bekletildikten sonra ışık altında çalkalanarak bantların oluşması sağlanmıştır.

3. BULGULAR

3.1. Fizyolojik Parametreler

3.1.1. Büyüme parametreleri

Sürgünlerin uzunlukları, kontrol grupları ile karşılaştırılan karnitin uygulanan gruplarda % 2,6 artış gözlenirken, kuraklık uygulanan gruplarda % 27 azalma gözlenmiştir. Kontrol grupları ile karşılaştırılan kuraklık-karnitin uygulanan gruplarda ise % 23,1 azalma gözlenmiştir. Karnitin uygulanan gruplar ile kuraklık-karnitin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında % 25 azalma görülürken, kuraklık uygulanan gruplar ile kuraklık-karnitin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında % 5 artış gözlenmiştir.

Köklerin uzunlukları, kontrol grupları ile karşılaştırılan karnitin uygulanan gruplarda % 2,8 azalma gözlenirken, kuraklık uygulanan gruplarda % 13,5 azalma gözlenmiştir. Kontrol grupları ile karşılaştırılan kuraklık-karnitin uygulanan gruplarda ise % 8,7 azalma gözlenmiştir. Karnitin uygulanan gruplar ile kuraklık-karnitin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında % 6,1 azalma görülürken, kuraklık uygulanan gruplar ile kuraklık-karnitin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında % 2,5 artış gözlenmiştir.

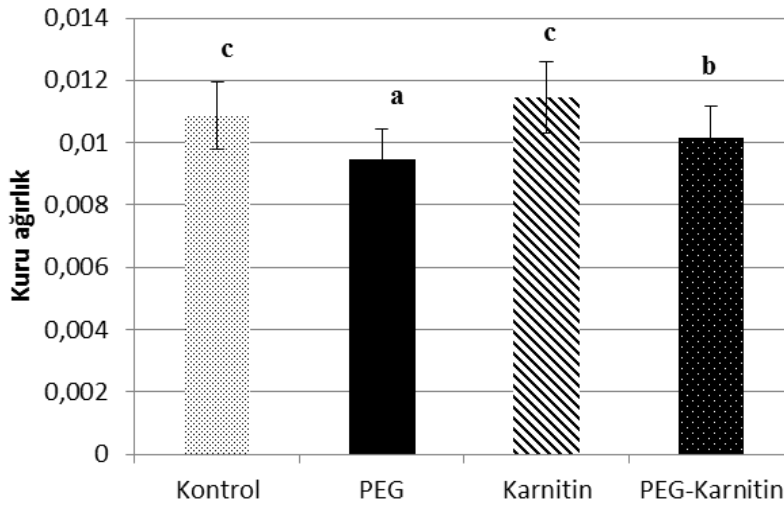
Sürgünlerin yaş ağırlıkları, kontrol grupları ile karnitin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında % 4 artış gözlenirken, kuraklık uygulanan gruplar ile karşılaştırıldığında % 52 azalma gözlenmiştir. Kontrol grupları ile karşılaştırılan kuraklık-karnitin uygulanan gruplarda ise % 44 azalma gözlenmiştir. Karnitin uygulanan gruplar ile kuraklık-karnitin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında % 46,2 azalma gözlenirken, kuraklık uygulanan gruplar ile kuraklık-karnitin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında % 16,7 artış gözlenmiştir.

Köklerin yaş ağırlıkları, kontrol grupları ile karnitin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında kayda değer bir değişiklik gözlenmemiştir, kuraklık uygulanan gruplar ile karşılaştırıldığında % 50 azalma gözlenmiştir. Kontrol grupları ile karşılaştırılan kuraklık-karnitin uygulanan gruplarda ise % 25 azalma gözlenmiştir.

Karnitin uygulanan gruplar ile kuraklık-karnitin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında % 25 azalma gözlenirken, kuraklık uygulanan gruplar ile kuraklık-karnitin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında % 50 artış gözlenmiştir.

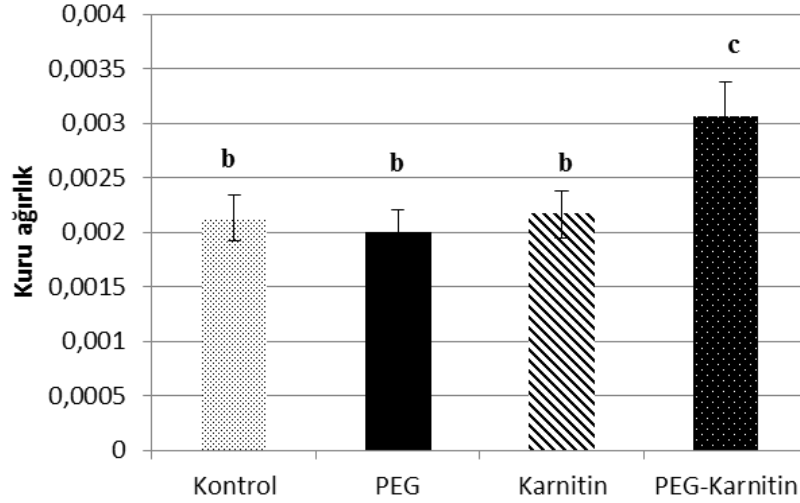
3.1.2. Bağlı büyüme hızı (RGR)

Sürgünlerde kontrol grupları ile karnitin ve kuraklık uygulanan grupların RGR değerleri karşılaştırıldığında sırasıyla % 5,4 artış ve % 12,7 azalma gözlenirken kuraklık-karnitin uygulanan gruplarda ise % 6,4 azalma gözlenmiştir. Karnitin uygulanan gruplar ile kuraklık-karnitin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında % 11,2 azalma gözlenirken, kuraklık uygulanan gruplar ile kuraklık-karnitin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında % 7,3 artış gözlenmiştir.



Şekil 3.1 Kuraklık stresinin ve karnitin uygulamasının *Arabidopsis thaliana* sürgünlerinin RGR üzerine etkisi.

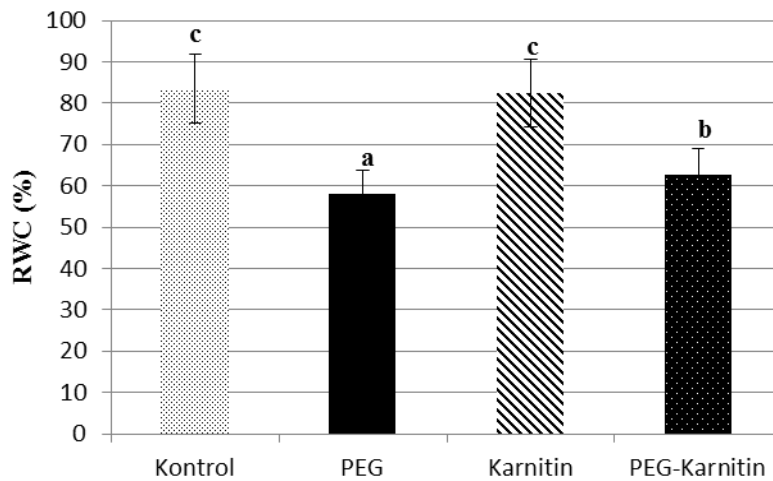
Köklerde RGR değerleri, kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında karnitin uygulanan gruplarda % 2 artış gözlenirken, kuraklık uygulanan gruplar ile karşılaştırıldığında % 6,1 azalma gözlenmiştir. Kontrol grupları ile karşılaştırılan kuraklık-karnitin uygulanan gruplarda ise % 44,1 artış gözlenmiştir. Karnitin uygulanan gruplar ile kuraklık-karnitin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında % 41,5 artış gözlenirken, kuraklık uygulanan gruplar ile kuraklık-karnitin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında % 53,5 artış gözlenmiştir.



Şekil 3.2 Kuraklık stresinin ve karnitin uygulamasının *Arabidopsis thaliana* köklerinin RGR üzerine etkisi.

3.1.3. Bağlı su içeriği (RWC)

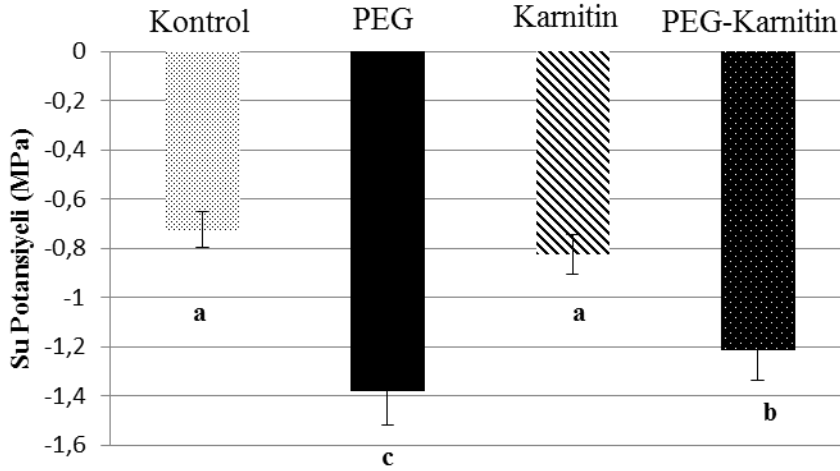
Sürgünlerde kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında karnitin uygulanan gruplarda RWC’ de bir değişim gözlenmezken, kuraklık uygulanan gruplar ile karşılaştırıldığında % 25,5 azalma gözlenmiştir. Kontrol grupları ile karşılaştırılan kuraklık-karnitin uygulanan gruplarda ise % 20,7 azalma gözlenmiştir. Karnitin uygulanan gruplar ile kuraklık-karnitin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında % 19,6 azalma gözlenirken, kuraklık uygulanan gruplar ile kuraklık-karnitin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında % 4,8 artış gözlenmiştir.



Şekil 3.3 Kuraklık stresinin ve karnitin uygulamasının *Arabidopsis thaliana* sürgünlerinin RWC üzerine etkisi.

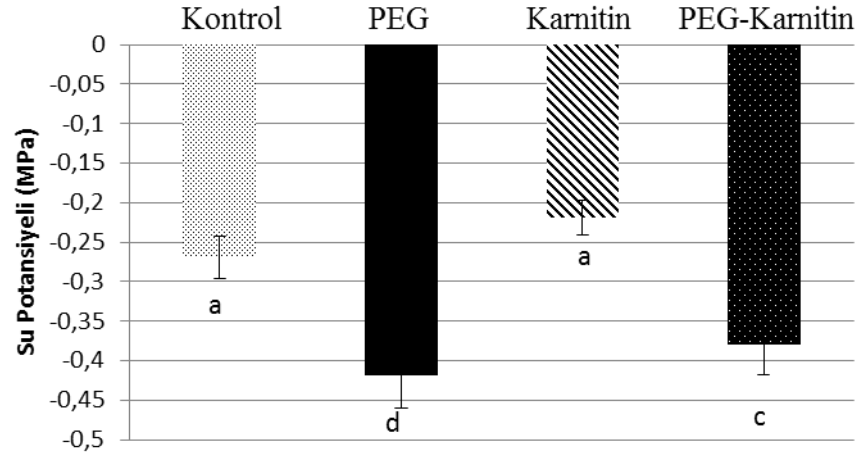
3.1.4. Su potansiyeli (ψ_{II})

Sürgünlerde kontrol grupları ile karnitin ve kuraklık uygulanan grupların ψ_{II} değerleri karşılaştırıldığında sırasıyla % 13,7, % 90,4 ve kuraklık-karnitin uygulanan gruplarda ise % 67,6 azalma gözlenmiştir. Karnitin uygulanan gruplar ile kuraklık-karnitin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında % 47,4 azalma gözlenirken, kuraklık uygulanan gruplar ile kuraklık-karnitin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında % 12 artış gözlenmiştir.



Şekil 3.4 Kuraklık stresinin ve karnitin uygulamasının *Arabidopsis thaliana* sürgünlerin ψ_{II} değerleri üzerine etkisi.

Köklerde ψ_{II} değerleri, kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında karnitin uygulanan gruplarda % 18,6 artış gözlenirken, kuraklık uygulanan gruplar ile karşılaştırıldığında % 55,1 azalma gözlenmiştir. Kontrol grupları ile karşılaştırılan kuraklık-karnitin uygulanan gruplarda ise % 41 azalma gözlenmiştir. Karnitin uygulanan gruplar ile kuraklık-karnitin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında % 73,1 azalma gözlenirken, kuraklık uygulanan gruplar ile kuraklık-karnitin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında % 9,1 artış gözlenmiştir.

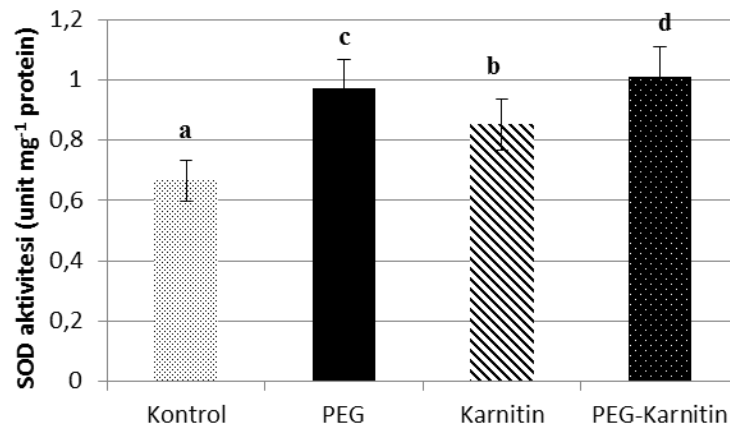


Şekil 3.5 Kuraklık stresinin ve karnitin uygulamasının *Arabidopsis thaliana* köklerinin ψII değerleri üzerine etkisi.

3.1.5. Enzim ve izoenzim aktiviteleri

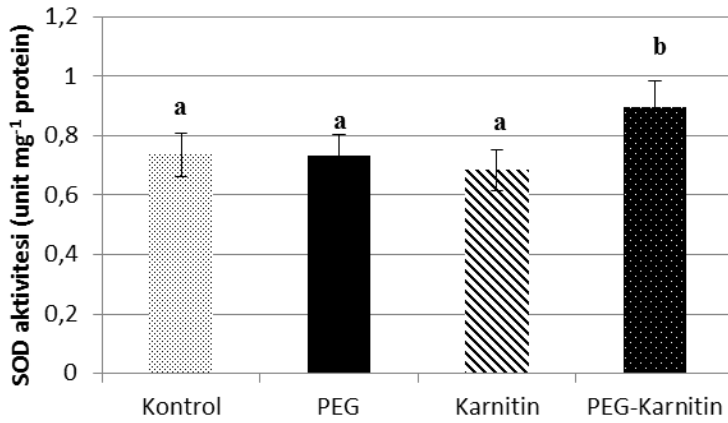
3.1.5.1 Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi ve izoenzimleri

SOD aktivitesi, sürgünlerde kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında karnitin uygulanan gruplarda % 28,1 artmıştır, kuraklık uygulanan gruplarda ise % 45,7 artış gözlenmiştir. Kontrol grupları ile karşılaştırılan kuraklık-karnitin uygulanan gruplarda ise % 51,4 artış gözlenmiştir. Karnitin uygulanan gruplar ile kuraklık-karnitin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında % 18,3 artış gözlenirken, kuraklık uygulanan gruplar ile kuraklık- karnitin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında ise % 3,9 artış gözlenmiştir.



Şekil 3.6 Kuraklık stresinin ve karnitin uygulamasının *Arabidopsis thaliana* sürgünlerinde SOD aktivitesi üzerine etkisi. Değişik harfler istatistiksel olarak farklıdır ($p < 0.05$).

SOD aktivitesi, köklerde kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında karnitin uygulanan gruplarda % 8,1 azalmıştır, kuraklık uygulanan gruplarda ise % 1,4 azalma gözlenmiştir. Kontrol grupları ile karşılaştırılan kuraklık-karnitin uygulanan gruplarda ise % 21,6 artış gözlenmiştir. Karnitin uygulanan gruplar ile kuraklık-karnitin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında % 32,4 artış gözlenirken, kuraklık uygulanan gruplar ile kuraklık- karnitin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında ise % 23,3 artış gözlenmiştir.

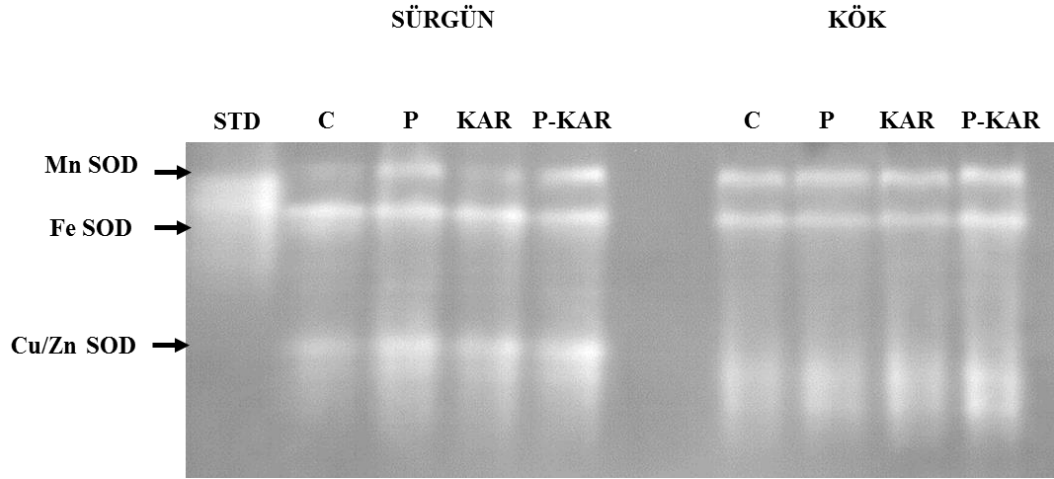


Şekil 3.7 Kuraklık stresinin ve karnitin uygulamasının *Arabidopsis thaliana* köklerinde SOD aktivitesi üzerine etkisi. Değişik harfler istatistiksel olarak farklıdır ($p < 0.05$).

Arabidopsis thaliana sürgünlerinde ve köklerinde toplam üç adet aktivite bandı (izoenzim) belirlenmiştir. Sürgün ve kök grupları arasında üç SOD izoenzimi de ortak olarak bulunduğu tesbit edilmiştir.

Sürgünlerde MnSOD yoğunluğunda kuraklık uygulanan gruplarda 2,1 kat, kuraklık-karnitin uygulanan gruplarda 2,2 kat artış gözlenirken, karnitin uygulanan gruplarda ise 1,4 kat artış gözlenmektedir. FeSOD yoğunluğunda gruplar arasında değişim gözlenmemiştir. Cu/ZnSOD ise kuraklık uygulanan gruplarda 1,8 kat, kuraklık-karnitin uygulanan gruplarda 2 kat, karnitin uygulanan gruplarda ise 1,5 kat artış gözlenmektedir.

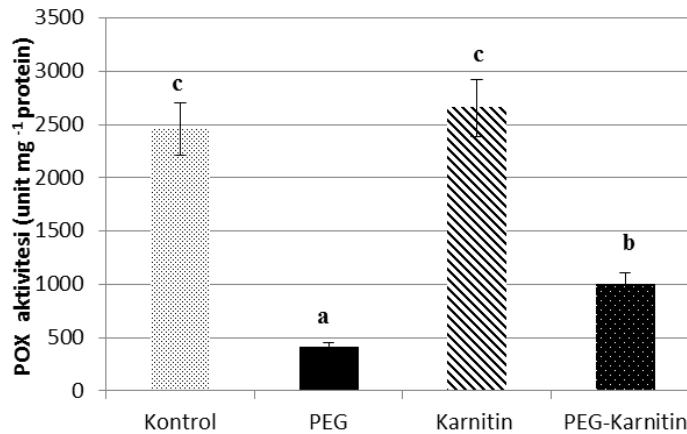
Köklerde ise MnSOD yoğunluğunda gruplar arasında değişim gözlenmemiştir. Kuraklık-karnitin uygulanan gruplarda FeSOD ve Cu/ZnSOD sırasıyla 1,3 ve 1,2 kat artış gözlenmektedir. Diğer gruplarda ise FeSOD ve Cu/ZnSOD yoğunluğunda bir değişim gözlenmemektedir.



Şekil 3.8 *Arabidopsis thaliana* bitkilerinin SOD izoenzimleri ve bu izoenzimlerin kuraklık ve karnitin uygulamasının 48 saat içerisinde değişimi. Her kuyucuk 40µg protein içermektedir. Std: 1U bovine karaciğeri SOD standardı, K: Kontrol, P: Kuraklık stresi, KAR: Karnitin, P-KAR: Kuraklık stresi-Karnitin.

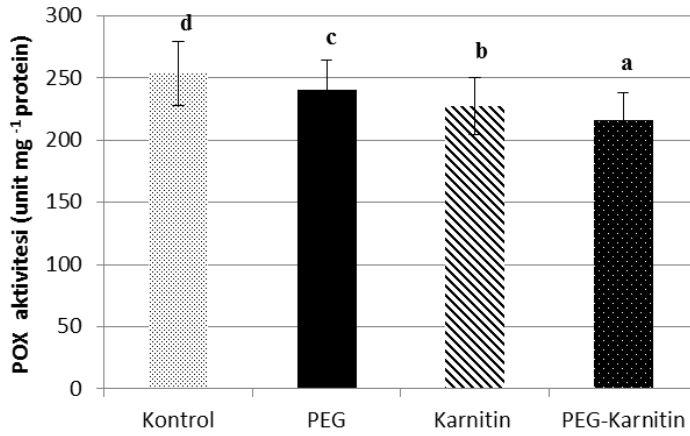
3.1.5.2 POX aktivitesi

POX aktivitesi, sürgünlerde kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında karnitin uygulanan gruplarda % 8,2 artmıştır, kuraklık uygulanan gruplarda ise % 83,3 azalma gözlenmiştir. Kontrol grupları ile karşılaştırılan kuraklık-karnitin uygulanan gruplarda ise % 59,1 azalma gözlenmiştir. Karnitin uygulanan gruplar ile kuraklık-karnitin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında % 62,2 azalma gözlenirken, kuraklık uygulanan gruplar ile kuraklık- karnitin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında ise % 145 artış gözlenmiştir.



Şekil 3.9 Kuraklık stresinin ve karnitin uygulamasının *Arabidopsis thaliana* sürgünlerinde POX aktivitesi üzerine etkisi. Değişik harfler istatistiksel olarak farklıdır (p<0.05).

Köklerde, POX aktivitesi kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında karnitin uygulanan gruplarda % 10,3 azalmıştır, kuraklık uygulanan gruplarda ise % 5,3 azalma gözlenmiştir. Kontrol grupları ile karşılaştırılan kuraklık-karnitin uygulanan gruplarda ise % 14,8 azalma gözlenmiştir. Karnitin uygulanan gruplar ile kuraklık-karnitin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında % 4,8 azalma gözlenirken, kuraklık uygulanan gruplar ile kuraklık- karnitin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında ise % 10,1 azalma gözlenmiştir.

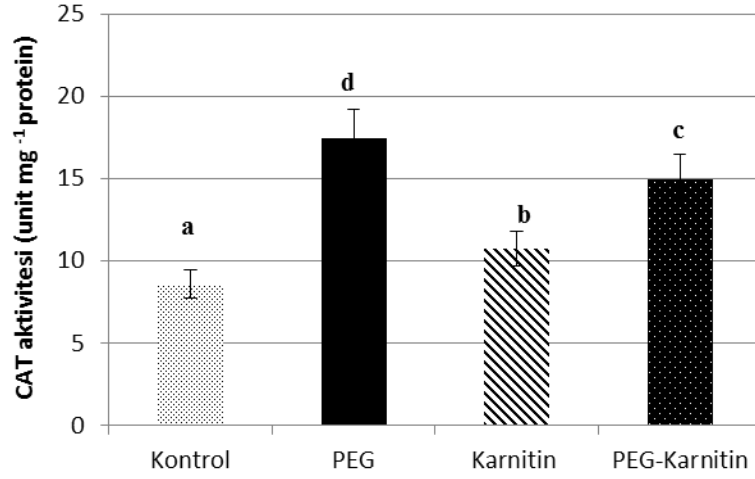


Şekil 3.10 Kuraklık stresinin ve karnitin uygulamasının *Arabidopsis thaliana* köklerinde POX aktivitesi üzerine etkisi. Değişik harfler istatistiksel olarak farklıdır ($p < 0.05$).

3.1.5.3 CAT aktivitesi

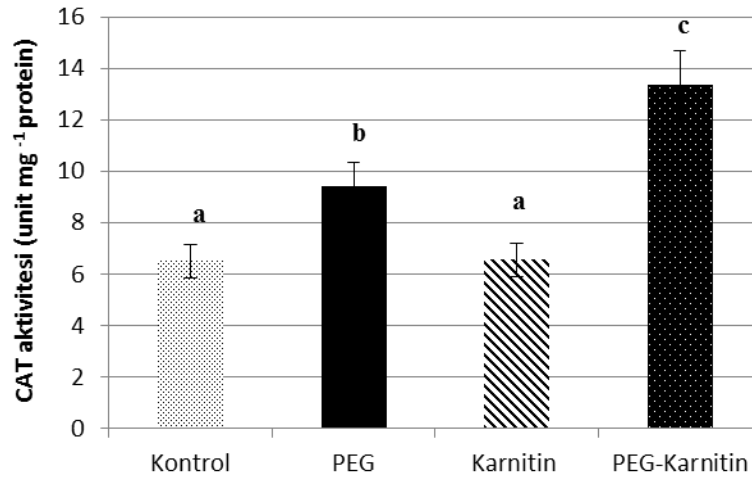
CAT aktivitesi sürgünlerde, kontrol grupları ile karnitin ve kuraklık uygulanan gruplar karşılaştırıldığında sırasıyla % 25,3 ve % 103,5 artış gözlenmiştir. Kontrol grupları ile karşılaştırılan kuraklık-karnitin uygulanan gruplarda ise % 74,6 artış gözlenmiştir.

Karnitin uygulanan gruplar ile kuraklık-karnitin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında % 39,3 artış gözlenirken, kuraklık uygulanan gruplar ile kuraklık-karnitine uygulanan gruplar karşılaştırıldığında % 14,2 azalma gözlenmiştir.



Şekil 3.11 Kuraklık stresinin ve karnitin uygulamasının *Arabidopsis thaliana* sürgünlerinde CAT aktivitesi üzerine etkisi. Değişik harfler istatistiksel olarak farklıdır ($p < 0.05$).

Köklerde, CAT aktivitesinde kontrol grupları ile karnitin ve kuraklık uygulanan gruplar karşılaştırıldığında sırasıyla % 0,8 ve % 44,2 artış gözlenmiştir. Kontrol grupları ile karşılaştırılan kuraklık-karnitin uygulanan gruplarda ise % 104,8 artış gözlenmiştir. Karnitin uygulanan gruplar ile kuraklık-karnitin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında % 103,2 artış gözlenirken, kuraklık uygulanan gruplar ile kuraklık-karnitin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında % 42 artış gözlenmiştir.



Şekil 3.12 Kuraklık stresinin ve karnitin uygulamasının *Arabidopsis thaliana* köklerinde CAT aktivitesi üzerine etkisi. Değişik harfler istatistiksel olarak farklıdır ($p < 0.05$).

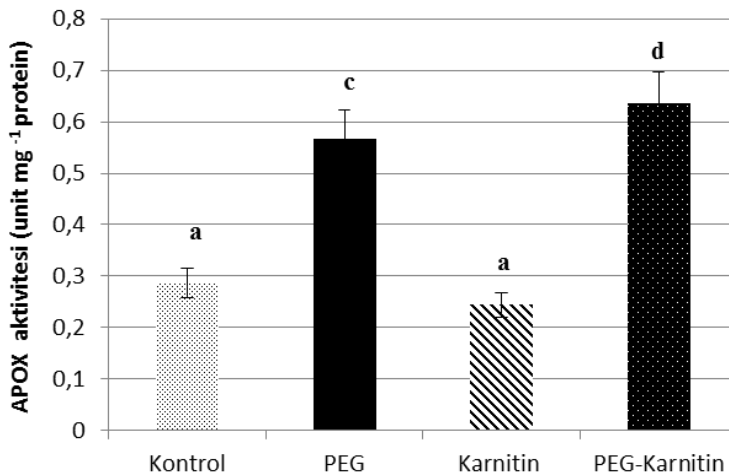
Arabidopsis thaliana sürgün ve köklerinde CAT aktivite bandı gözlenmiştir. Kuraklık ve karnitin uygulaması 48 saat içinde sürgünlerde CAT yoğunluğunda anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır. Köklerde CAT yoğunluğu kuraklık ve kuraklık-karnitin uygulaması 2,4 kat artışa neden olmaktadır.



Şekil 3.13 *Arabidopsis thaliana* bitkilerinin CAT enziminin kuraklık ve karnitin uygulamasının 48 saat içerisinde değişimi. Her kuyucuk 10 µg protein içermektedir. Std: 1U bovine karaciğeri CAT standardı, K: Kontrol, P: Kuraklık stresi, KAR: Karnitin, P-KAR: Kuraklık stresi-Karnitin.

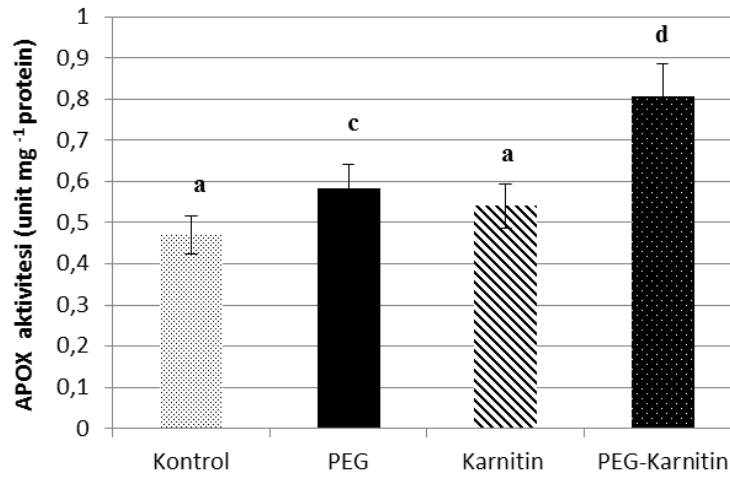
3.1.5.4 APOX aktivitesi

APOX aktivitesi sürgünlerde, kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında karnitin ve kuraklık uygulanan gruplarda sırasıyla % 14,9 azalma ve % 97,6 artış gözlenmiştir. Kontrol grupları ile karşılaştırılan kuraklık-karnitin uygulanan gruplarda ise % 121,7 artış gözlenmiştir. Karnitin uygulanan gruplar ile kuraklık-karnitin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında % 161 artış gözlenmiştir. Kuraklık uygulanan gruplar ile kuraklık-karnitin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında % 12,2 artış gözlenmiştir.



Şekil 3.14 Kuraklık stresinin ve karnitin uygulamasının *Arabidopsis thaliana* sürgünlerinde APOX aktivitesi üzerine etkisi. Değişik harfler istatistiksel olarak farklıdır (p<0.05).

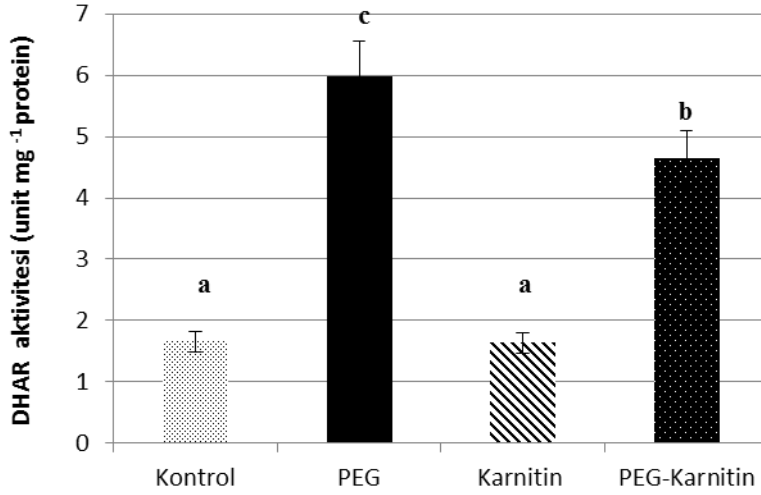
Köklerde, APOX aktivitesi kontrol grupları ile karşılaştırıldığında karnitin grupları ve kuraklık uygulanan gruplar sırasıyla % 15 ve % 24 artış gözlenmiştir. Kontrol grupları ile karşılaştırılan kuraklık-karnitin uygulanan gruplarda ise % 71,5 artış gözlenmiştir. Karnitin uygulanan gruplar ile kuraklık-karnitin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında ise % 49,1 artma gözlenmiştir. Kuraklık uygulanan gruplar ile kuraklık-karnitin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında % 38,3 artma gözlenmiştir.



Şekil 3.15 Kuraklık stresinin ve karnitin uygulamasının *Arabidopsis thaliana* köklerinde APOX aktivitesi üzerine etkisi. Değişik harfler istatistiksel olarak farklıdır (p<0.05).

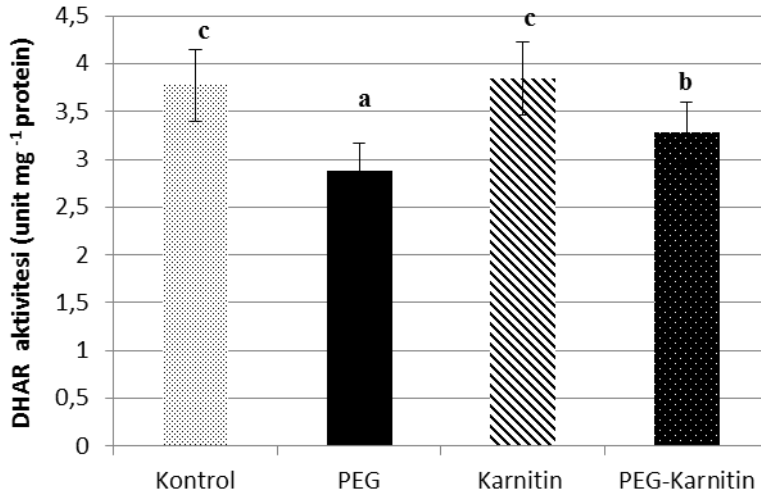
3.1.5.5 DHAR aktivitesi

DHAR aktivitesi sürgünlerde, kontrol gruplar ile karnitin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında % 1,3 azalma gözlenirken, kuraklık uygulanan gruplar ile karşılaştırıldığında ise % 260,4 artış gözlenmiştir. Kontrol grupları ile karşılaştırılan kuraklık-karnitin uygulanan gruplarda ise % 180,1 artış gözlenmiştir. Karnitin uygulanan gruplar ile kuraklık-karnitin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında % 184 artış gözlenirken, kuraklık uygulanan gruplar ile kuraklık-karnitin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında % 22,3 azalma gözlenmiştir.



Şekil 3.16 Kuraklık stresinin ve karnitin uygulamasının *Arabidopsis thaliana* sürgünlerinde DHAR aktivitesi üzerine etkisi. Değişik harfler istatistiksel olarak farklıdır ($p < 0.05$).

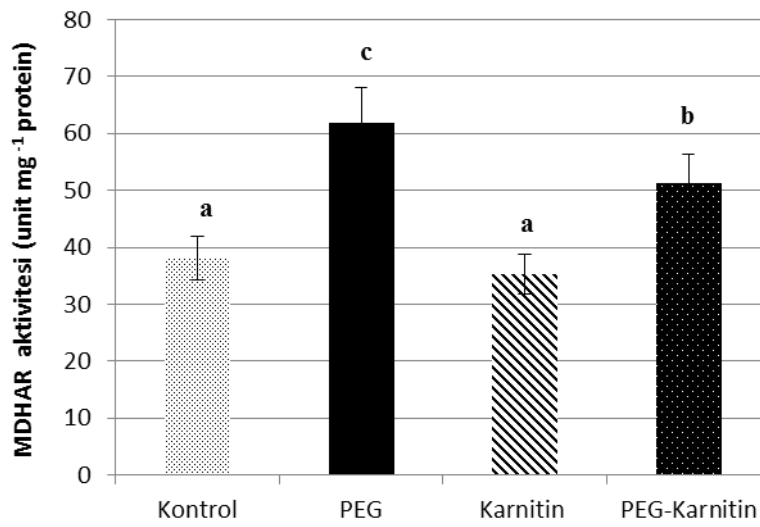
Köklerde, kontrol grupları ile karnitin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında % 2 artış gözlenirken, kuraklık uygulanan gruplar karşılaştırıldığında % 24 azalış gözlenmiştir. Kontrol grupları ile karşılaştırılan kuraklık-karnitin uygulanan gruplarda ise % 13,2 azalma gözlenmiştir. Karnitin uygulanan gruplar ile kuraklık-karnitin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında % 15 azalma gözlenirken, kuraklık uygulanan gruplar ile kuraklık-karnitin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında % 14 artış gözlenmiştir.



Şekil 3.17 Kuraklık stresinin ve karnitin uygulamasının *Arabidopsis thaliana* köklerinde DHAR aktivitesi üzerine etkisi. Değişik harfler istatistiksel olarak farklıdır ($p < 0.05$).

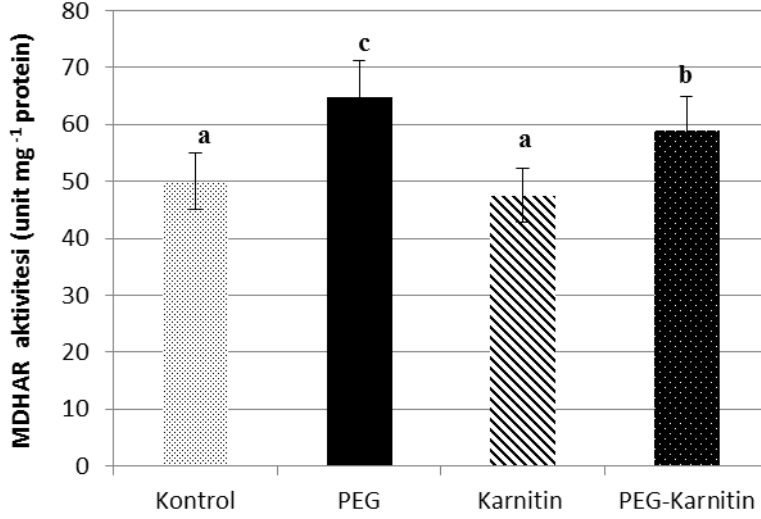
3.1.5.6 MDHAR aktivitesi

MDHAR aktivitesi sürgünlerde, kontrol grupları ile karnitin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında % 7,3 azalma gözlenirken, kuraklık uygulanan gruplar ile karşılaştırıldığında % 62,5 artış gözlenmiştir. Kontrol grupları ile karşılaştırılan kuraklık-karnitin uygulanan gruplarda ise % 34,6 artış gözlenmiştir. Karnitin uygulanan gruplar ile kuraklık uygulanan gruplar karşılaştırıldığında % 45,2 artış gözlenmiştir. Kuraklık uygulanan gruplar ile kuraklık-karnitin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında % 17,2 azalma gözlenmiştir.



Şekil 3.18 Kuraklık stresinin ve karnitin uygulamasının *Arabidopsis thaliana* sürgünlerinde MDHAR aktivitesi üzerine etkisi. Değişik harfler istatistiksel olarak farklıdır ($p < 0.05$).

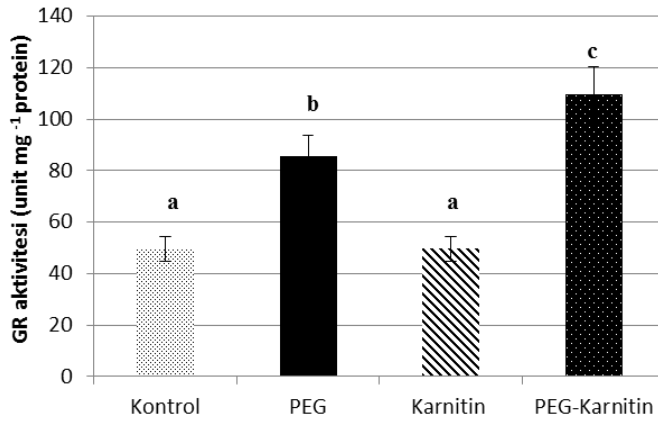
Köklerde, kontrol grupları ile karnitin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında % 5 azalma gözlenirken, kuraklık uygulanan gruplar ile karşılaştırıldığında % 29,4 artış gözlenmiştir. Kontrol grupları ile karşılaştırılan kuraklık-karnitin uygulanan gruplarda ise % 18 artış gözlenmiştir. Karnitin uygulanan gruplar ile kuraklık-karnitin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında % 24, 2 artış gözlenmiştir. Kuraklık uygulanan gruplar ile kuraklık-karnitin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında % 8,8 azalma gözlenmiştir.



Şekil 3.19 Kuraklık stresinin ve karnitin uygulamasının *Arabidopsis thaliana* köklerinde MDHAR aktivitesi üzerine etkisi. Değişik harfler istatistiksel olarak farklıdır ($p < 0.05$).

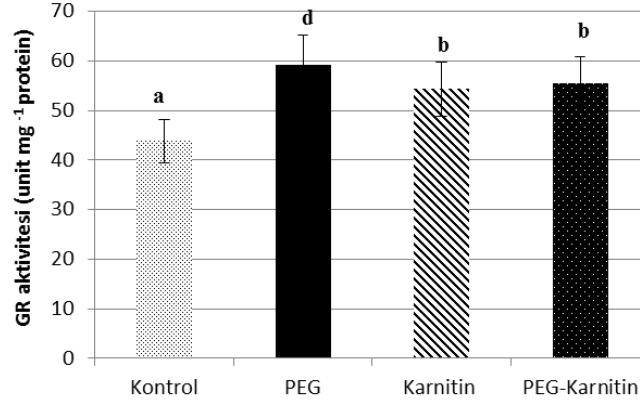
3.1.5.7 GR aktivitesi ve izoenzimleri

GR aktivitesi sürgünlerde, kontrol grupları ile karnitin grupları karşılaştırıldığında GR aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır. Kontrol grupları ile kuraklık uygulanan gruplar karşılaştırıldığında % 72 artış gözlenmiştir. Kontrol grupları ile karşılaştırılan kuraklık-karnitin uygulanan gruplarda ise % 120,6 artış gözlenmiştir. Karnitin uygulanan gruplar ile kuraklık-karnitin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında % 121 artış gözlenirken, kuraklık uygulanan gruplar ile kuraklık-karnitin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında ise % 28,3 artış gözlenmektedir.



Şekil 3.20 Kuraklık stresinin ve karnitin uygulamasının *Arabidopsis thaliana* sürgünlerinde GR aktivitesi üzerine etkisi. Değişik harfler istatistiksel olarak farklıdır ($p < 0.05$).

Köklerde, kontrol grupları ile karşılaştırılan karnitin ve kuraklık uygulanan gruplarda sırasıyla % 24,1 ve % 35,4 artış gözlenmiştir. Kontrol grupları ile karşılaştırılan kuraklık-karnitin uygulanan gruplarda ise % 26,6 artış gözlenmiştir. Karnitin uygulanan gruplar ile kuraklık-karnitin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında % 2 artış gözlenirken, kuraklık uygulanan gruplar ile kuraklık-karnitin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında % 6,5 azalma gözlenmektedir.



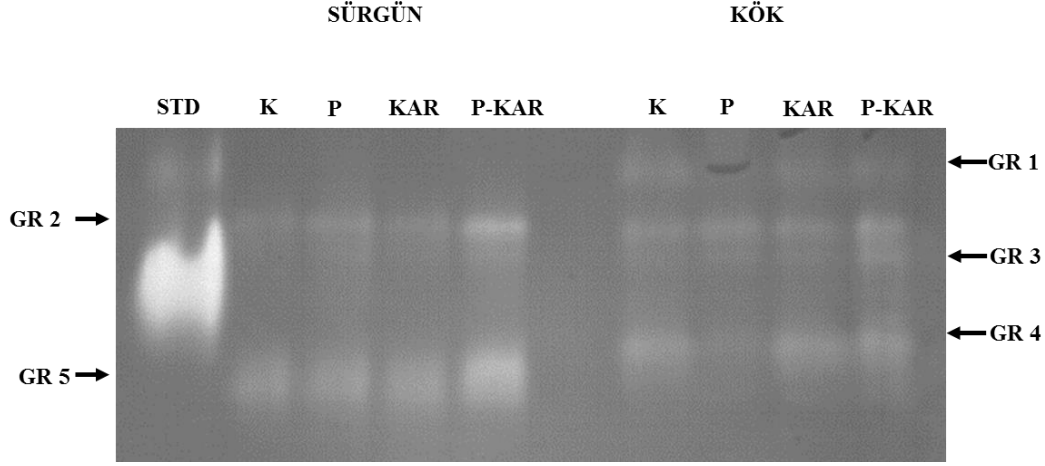
Şekil 3.21 Kuraklık stresinin ve karnitin uygulamasının *Arabidopsis thaliana* köklerde GR aktivitesi üzerine etkisi. Değişik harfler istatistiksel olarak farklıdır ($p < 0.05$).

Arabidopsis thaliana sürgün ve köklerinde toplam 5 adet GR aktivite bandı (izoenzim) gözlenmiştir. Sürgün ve köklerde bulunan GR 2 izoenzim ortaktır. Sürgünlerde GR 2 ve GR 5 izoenzimleri gözlenirken, köklerde ise GR1, GR 2, GR 3 izoenzimlerinin varlığı tesbit edilmiştir.

Kuraklık ve karnitin uygulamasının 48 saat içinde sürgünlerde, GR 2 ve GR 5 yoğunluğunda karnitin uygulamasıyla kayda değer bir değişime neden olmamıştır. GR 2' nin yoğunluğu kuraklık uygulaması ile 1,5 kat, kuraklık-karnitin uygulamasıyla 2,4 kat artmaktadır. GR 5 yoğunluğu kuraklık uygulaması ile 1,4 kat, kuraklık-karnitin uygulamasıyla 2,1 kat artış gözlenmiştir.

Kuraklık ve karnitin uygulamasının 48 saat içinde köklerde, GR 1 ve GR 2, GR 3 ve GR 4 yoğunluğunda karnitin uygulaması değişime neden olmamıştır. GR 1 yoğunluğu kuraklık uygulanan gruplarda değişim gözlenmezken, kuraklık-karnitin uygulanan gruplarda 0,5 kat azalma gözlenmiştir. Kuraklık ve karnitin uygulamalarında GR 2 ve GR 3 yoğunluğunda değişim gözlenmemektedir.

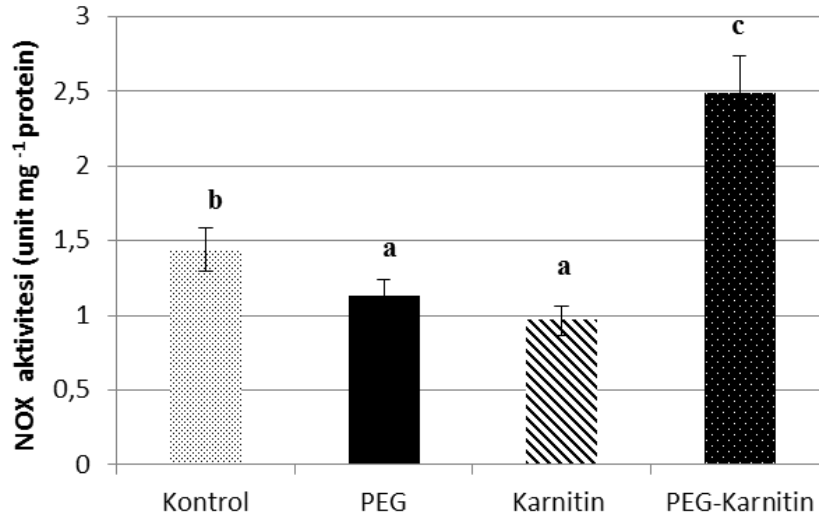
GR 4 yoğunluğunda ise kuraklık uygulamasıyla 0,5 kat azalma gözlenirken, diğer gruplarda değişim gözlenmemektedir.



Şekil 3.22 *Arabidopsis thaliana* bitkilerinin GR izoenzimleri ve bu izoenzimlerin kuraklık ve karnitin uygulamasının 48 saat içerisinde değişimi. Her kuyucuk 40µg protein içermektedir. Std: 1U bovine karaciğeri GR standardı, K: Kontrol, P: Kuraklık stresi, KAR: Karnitin, P-KAR: Kuraklık stresi-Karnitin.

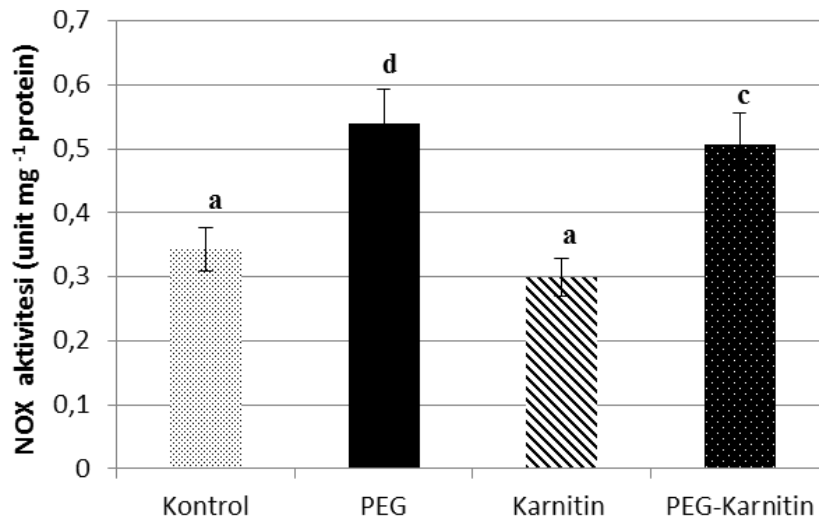
3.1.5.8 NOX aktivitesi

NOX aktivitesi sürgünlerde, kontrol grupları ile karnitin ve kuraklık uygulanan gruplar karşılaştırıldığında sırasıyla % 32,8 ve % 22 azalış gözlenmiştir. Kontrol grupları ile karşılaştırılan kuraklık-karnitin uygulanan gruplarda ise % 72,9 artış gözlenmiştir. Karnitin uygulanan gruplar ile kuraklık-karnitin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında % 157,4 artış gözlenirken, kuraklık uygulanan gruplar ile kuraklık-karnitin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında % 121 artış gözlenmiştir.



Şekil 3.23 Kuraklık stresinin ve karnitin uygulamasının *Arabidopsis thaliana* sürgünlerinde NOX aktivitesi üzerine etkisi. Değişik harfler istatistiksel olarak farklıdır ($p < 0.05$).

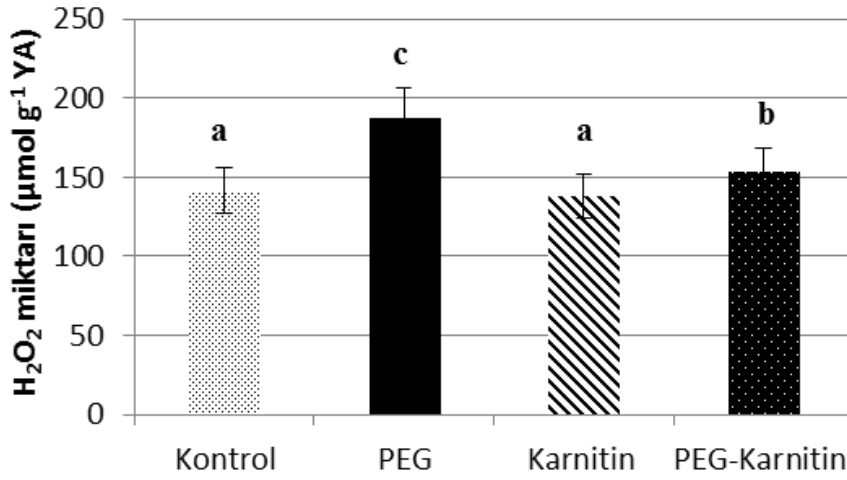
Köklerde ise, NOX aktivitesi kontrol grupları ile karnitin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında % 12,8 azalış gözlenirken, kuraklık uygulanan gruplarıyla karşılaştırıldığında ise % 57,1 artış gözlenmiştir. Kontrol grupları ile karşılaştırılan kuraklık-karnitin uygulanan gruplarda ise % 47,5 artış gözlenmiştir. Karnitin uygulanan gruplar ile kuraklık-karnitin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında % 69,3 artış gözlenirken, kuraklık uygulanan gruplar ile kuraklık-karnitin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında ise % 6,1 azalış gözlenmiştir.



Şekil 3.24 Kuraklık stresinin ve karnitin uygulamasının *Arabidopsis thaliana* köklerinde NOX aktivitesi üzerine etkisi. Değişik harfler istatistiksel olarak farklıdır ($p < 0.05$).

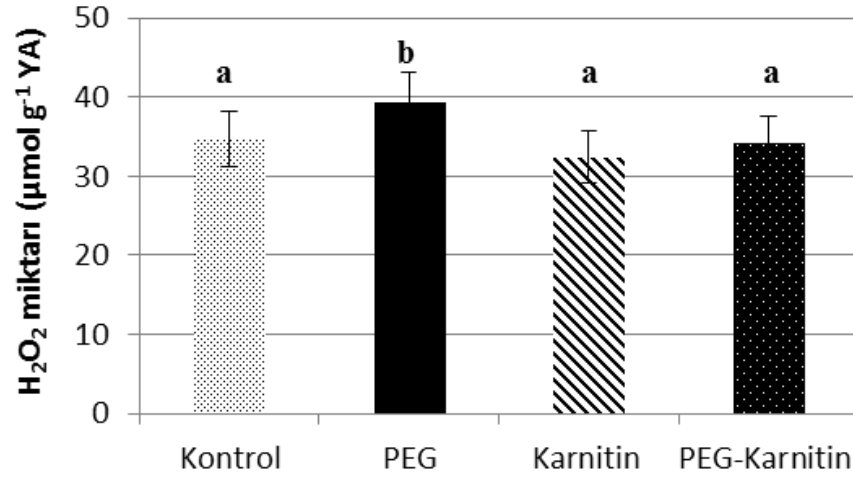
3.1.6. H₂O₂ Miktarı

H₂O₂ miktarı sürgünlerde, kontrol grupları ile karnitin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında % 2,2 azalma gözlenirken, kuraklık uygulanan gruplar ile karşılaştırıldığında % 32,4 artış gözlenmiştir. Kontrol grupları ile karşılaştırılan kuraklık-karnitin uygulanan gruplarda ise % 8,5 artış gözlenmiştir. Karnitin uygulanan gruplar ile kuraklık-karnitin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında % 11 artış gözlenirken, kuraklık uygulanan gruplar ile kuraklık-karnitin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında % 18,1 azalma gözlenmiştir.



Şekil 3.25 Kuraklık stresinin ve karnitin uygulamasının *Arabidopsis thaliana* sürgünlerinde H₂O₂ miktarı üzerine etkisi. Değişik harfler istatistiksel olarak farklıdır (p<0.05).

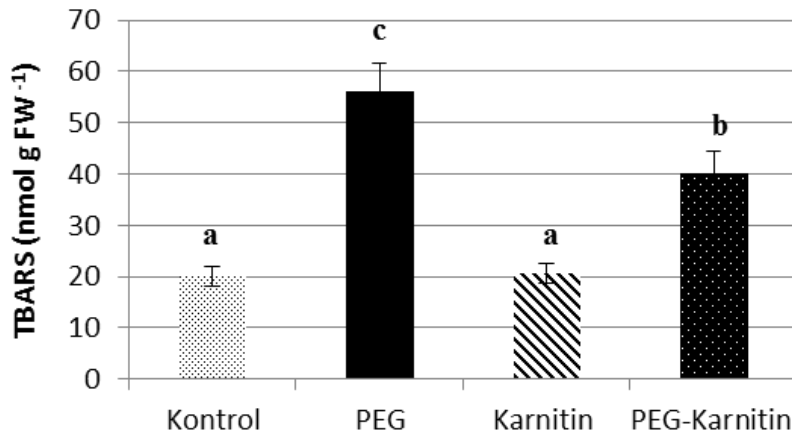
Köklerde, kontrol grupları ile karnitin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında % 6,7 azalış gözlenirken, kuraklık uygulanan gruplar ile karşılaştırıldığında % 13,2 artış gözlenmiştir. Kontrol grupları ile karşılaştırılan kuraklık-karnitin uygulanan gruplarda ise % 1,7 azalma gözlenmiştir. Karnitin uygulanan gruplar ile kuraklık-karnitin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında % 5,3 artış gözlenirken, kuraklık uygulanan gruplar ile kuraklık-karnitin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında 13,2 azalma gözlenmiştir.



Şekil 3.26 Kuraklık stresinin ve karnitin uygulamasının *Arabidopsis thaliana* köklerinde H₂O₂ miktarı üzerine etkisi. Değişik harfler istatistiksel olarak farklıdır (p<0.05).

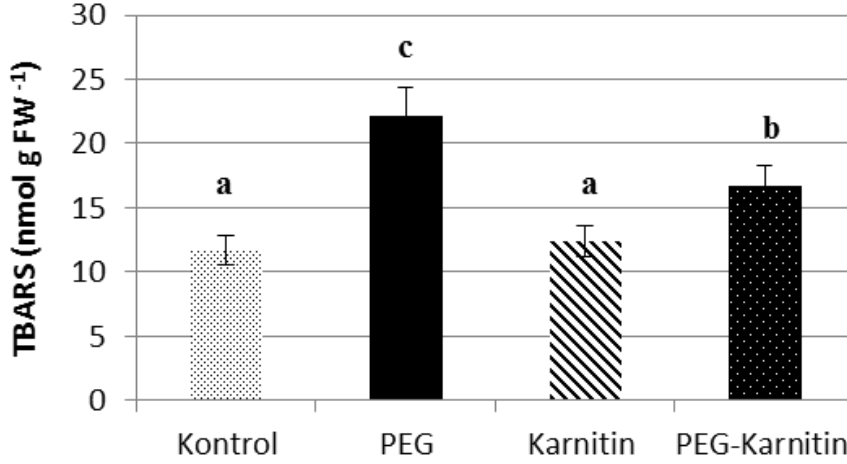
3.1.7. Lipit Peroksidasyonu (TBARS miktarı)

TBARS miktarları sürgünlerde, kontrol grupları ile karnitin ve kuraklık uygulanan gruplar karşılaştırıldığında sırasıyla % 3 ve % 180 artış gözlenmiştir. Kontrol grupları ile karşılaştırılan kuraklık-karnitin uygulanan gruplarda ise % 101,3 artış gözlenmiştir. Karnitin uygulanan gruplar ile kuraklık-karnitin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında % 95,5 artış gözlenirken, kuraklık uygulanan gruplar ile kuraklık-karnitin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında % 56 azalma gözlenmiştir.



Şekil 3.27 Kuraklık stresinin ve karnitin uygulamasının *Arabidopsis thaliana* sürgünlerinde TBARS miktarı (lipit peroksidasyonu) üzerine etkisi. Değişik harfler istatistiksel olarak farklıdır (p<0.05).

Köklerde, kontrol grupları ile karnitin ve kuraklık uygulanan gruplar karşılaştırıldığında sırasıyla % 5,6 ve % 89,4 artış gözlenmiştir. Kontrol grupları ile karşılaştırılan kuraklık-karnitin uygulanan gruplarda ise % 42,2 artış gözlenmiştir. Karnitin uygulanan gruplar ile kuraklık-karnitin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında % 34,7 artış gözlenirken, kuraklık uygulanan gruplar ile kuraklık-karnitin uygulanan gruplar karşılaştırıldığında % 25 azalma gözlenmiştir.



Şekil 3.28 Kuraklık stresinin ve karnitin uygulamasının *Arabidopsis thaliana* köklerinde TBARS miktarı (lipit peroksidasyonu) üzerine etkisi. Değişik harfler istatistiksel olarak farklıdır (p<0.05).

4. TARTIŞMA

Karnitin, *Arabidopsis*' deki diğer uyumlu bileşiklere (prolin ve glisin betain vb) benzer olarak kuraklık stresine toleransta rol aldığı bu çalışmada ilk kez gösterilmiştir. Mikroorganizmalar ve hayvanlarda olduğu gibi (Burgand Ferraris 2008) bitkilerde de hücrel su dengesizliğine karşı verilen en yaygın cevaplardan biri poliol, şeker ve amino asit gibi uyumlu bileşiklerin biriktirilmesidir (Rhodes and Hanson, 1993; Ashraf and Foolad ,2007; Munns and Tester, 2008). Bu bileşikler, dehidrasyonun, proteinler ve hücre zarı üzerindeki hasar verici etkisine karşı koruma görevi görmektedir. Ayrıca, ozmotik düzenlemeyi sağlamak amacı ile hücre içinde yüksek konsantrasyonda birirmektedirler (Yancey 2005; Kumar 2009). Uyumlu bileşiklerin kuraklık sırasında ya da öncesinde bitkiler dışarıdan uygulanmasının bitki performansında artış sağladığı gösterilmiştir.

Örneğin kuraklık stresi altında karnitin benzeri bir ozmolit olan glisin betainin (GB) tütüne dışardan uygulanması bitkilerin büyüme hızında ve veriminde artışa neden olmuştur (Agboma et al. 1997). Benzer şekilde soya, mısır, buğday bitkilerinde de GB uygulamasının kuraklık altında bitki büyümesi üzerine olumlu etkileri gözlenmiştir (Agboma et al. 1997, Borojevic et al. 1980). Çalışmamızda da kuraklık stresi sonucu *Arabidopsis*'in gövde ve kök uzunlukları ve ağırlıkları azalmıştır. Ancak, aynı koşullarda, karnitin uygulanan grupların sürgün ve kök uzunluklarındaki ve ağırlıklarındaki azalma oranının, sadece kuraklık uygulanan gruplara göre daha az olduğu gözlenmiştir.

Bitkilerin bağıl su içeriği (RWC), çevresel koşullar altında değişen ve bitkinin içinde bulunduğu ortamdaki su durumunu gösteren önemli parametrelerden biridir. Ozmolit özellikleri iyi bilinen glisin betainin çeltiğe uygulanmasıyla stres altında bitkilerin RWC içeriğinin arttığı gösterilmiştir (Demiral and Turkan 2004). Bu çalışmada da karnitinin ozmotik etkisine vurgu yapacak şekilde, kuraklık sonucu azalan bitki bağıl su içeriğinde karnitin uygulamasıyla iyileşme gözlenmiştir.

Bilindiği gibi kuraklık, hücresel metabolik dengenin bozulması ile oksidatif stresi tetiklemektedir. Oksidatif stres; DNA, protein ve lipidlere hasar veren ve membran bütünlüğünün bozulmasına yol açan ROS' ların, hücrede anormal ve toksik şekilde artmasıdır (Ashraf and Foolad 2007; Cuin and Shabala 2008). ROS' ların hücre içindeki miktarının aşırı artması, hücrede sinyal iletimini de engelleyebilir (Bailey-Serres and Mittler 2006). Dolayısıyla, stres koşullarında oksidatif hasarın azaltılması ve dolayısıyla enzimatik ve enzimatik olmayan ROS süpürülmesi, bitkilerin yaşamlarının devamlılığı için oldukça önemlidir. Bu nedenle çalışmamızda ROS süpürücü antioksidan enzimlerin aktiviteleri ve izozimleri incelenmiştir.

Karnitin, yağ asidi β -oksidasyonu sonucu oluşan asetil-CoA' nın mitokondriye taşınımında ve TCA' ya katılımında görevli olduğu bilinmektedir. Bu işlemler sırasında peroksizomlarda β -oksidasyon sonucu H_2O_2 , mitokondride ise solunum sonucu O_2^- radikali oluşmaktadır. Bunların detoksifeye edilmesinden sorumlu olan enzimler ise peroksizomlarda CAT, mitokondride ise Mn-SOD'dur.

Süperoksit dismutaz (SOD) enzimi reaktif oksijen türlerinin süpürülmesinden sorumlu antioksidan savunma sisteminin önemli bir parçasıdır. Hücre içinde mitokondride, kloroplastta, sitozolde ve peroksizomlarda yer alan SOD izozimleri bulunmaktadır ve yüksek oranda reaktif olan süperoksit anyonunu H_2O_2 ' ye çevrilmesi reaksiyonunu katalizlemektedir. Arabidopsis sürgünlerinde ve köklerinde toplam üç adet SOD izozim belirlenmiştir. Gruplar arasında üç SOD izoenzimi de ortak olarak bulunmaktadır. Kuraklık uygulanan gruplar ile kuraklık-karnitin uygulanan sürgünlerin SOD izozim aktiviteleri karşılaştırıldığında, kuraklık stresi altında karnitinin MnSOD ve Cu/ZnSOD izozimlerinin aktivitelerini arttırdığı belirlenmiştir. Köklerde ise, kuraklık-karnitin uygulanan gruplarda özellikle FeSOD ve Cu/ZnSOD izozim aktiviteleri artmıştır. Hoque et al. (2007), proline ya da glisin betainin, tuz stresi altındaki tütün BY-2 hücre kültürlerinin SOD aktivitesi üzerine etkisinin bulunmadığını göstermiştir. Diğer yandan, tuz stresine toleranslı çeltik kültüründe ise stres sonucu kontrole göre artış gösteren SOD aktivitesinin, GB uygulandıktan sonra kontrol seviyesinin altına düştüğü bilinmektedir. Tuza duyarlı kültürde ise GB uygulamasının stres grubuna göre SOD aktivitesini düşürdüğü belirlenmiştir (Demiral ve Turkan, 2004). Uyumlu bileşiklerden biri olan mannitol uygulamasının ise tuz stresi altında antioksidan sistemi nasıl etkilediğini araştıran bir başka çalışmada ise buğdayda tuz uygulamasıyla azalan SOD aktivitesinin, stres altında mannitol uygulamasıyla arttığı rapor edilmiştir (Seckin ve ark. 2009).

Özellikle kuraklık stresi gibi bitkide gaz alışverişini sınırlayan stresler sırasında kloroplast ve peroksizomlarda ROS üretiminde artış gözlenmektedir. Kloroplastlarda CO_2 fiksasyonunun veriminde düşüş yaşanması, hem karbon reaksiyonları ile ışık reaksiyonları arasındaki dengenin bozulmasına hem de CO_2 yerine RubisCo tarafından O_2 bağlanması ile fotorespirasyonda artışa neden olmaktadır. Kloroplastlarda bu durum su-su döngüsünde görev alan enzimler olan SOD, APOX, MDHAR, DHAR, GR enzimleri ile ortadan kaldırılmaya çalışılır (Baker et al., 2006). Bu nedenle çalışmamızda bu enzimlerin aktiviteleri de belirlenerek, karnitin uygulamasının stres altında su-su döngüsü üzerindeki etkisi de ortaya konmuştur.

Kloroplastlarda, peroksizomlarda yer alan askorbat peroksidaz (APOX) , su-su döngüsü süresince oluşan H_2O_2 ’ nin süpürülmesinden sorumlu ve H_2O_2 ’ ye ilgisi yüksek olan bir enzimdir. Çeşitli stres koşulları altında APOX aktivitesinin arttığı bilinmektedir. Çalışmamızda kuraklık stresi sonucunda APOX enzim aktivitesinin hem sürgün hem de kökte yükseldiği gözlenmiştir. Karnitin uygulamasının antioksidan savunma sistemini aktive ettiği ve üretilen H_2O_2 ’ ninde daha etkin süpürülebilmesi için APOX enziminin aktivitesinde artışa neden olduğu söylenebilir.

Tuz stresi altındaki bitkilere GB uygulamasının tuza toleranslı çeltiğin APOX aktivitesinde kontrole göre düşüşe neden olduğu, tuza duyarlı çeltikte ise artışa olduğu gösterilmiştir. Fakat tuza duyarlı çeltikte sadece tuza maruz bırakılan bitkilere göre GB uygulanan bitkilerin APOX aktivitelerinin düşüş gösterdiği bulunmuştur (Demiral ve Turkan, 2004). Dışardan mannitol uygulamasının ise buğdayda, tuz stresi altında APOX aktivitesini arttırdığı bulunmuştur (Seckin ve ark. 2009).

Su-su döngüsünde glutatyonun (GSH)’ ın döngüye tekrar girmesini sağlayarak GSSG/GSH oranının dengede durmasını sağlayan bir diğer önemli enzimde glutatyon redüktaz (GR)’ dir. Kuraklık stresi altında artış gösteren GR enzim aktivitesi, karnitin uygulamasıyla kontrole göre artarken sadece kuraklık uygulanan gruplara göre azalmıştır. Buğdayda, bir osmolit olan mannitol uygulamasının tuz stresiyle düşüş gösteren GR aktivitesinde artışa neden olduğu belirlenmiştir (Seckin ve ark. 2009).

Monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR), MDHA’ ya yüksek afinitesi olan ve NADPH’ ı kullanarak monodehidroaskorbatı ASC’ ye indirgeyen bir FAD enzimidir (Sofa et al. 2005). Kuraklık stresi yarattığı fotooksidasyona bağlı olarak, su-su döngüsü enzimlerinin aktivitelerinde bir artışa neden olur. MDHAR enziminin aktivitesi literatürle benzer olarak kuraklık süresince artış göstermiştir. Karnitinin olası antioksidan ve ozmolit görevlerine bağlı olarak; karnitin ve kuraklık stresine maruz bırakılan bitkilerle sadece kuraklık stresine maruz bırakılan bitkiler karşılaştırıldığında stres altında karnitin uygulamasının MDHAR aktivitesinde azalmaya neden olduğu gözlenmiştir.

Dehidroaskorbat redüktaz (DHAR) dehidroaskorbatın indirgenmiş formdaki AsA' ya dönüşümünü katalizlemektedir. DHAR aktiviteleri arttırılmış transgenik bitkilerde su kaybının azaldığı gözlenmiştir. MDHAR'ın aksine, kuraklık ve kuraklık-karnitin uygulamaları, Arabidopsis sürgünlerinde DHAR enzim aktivitesinde yüksek oranda artışa neden olmuştur.

Tütün BY-2 hücrelerinde tuz stresi altında APOX, MDHAR, DHAR, GR enzimlerinin aktivitesi düşmüştür. Prolin uygulamasıyla dört enzimin aktivitesi sadece tuz koşullarına göre artarken betain uygulamasıyla APX, DHAR, GR enzimlerinin aktivitesi artmış MDHAR enziminin aktivitesi ise azalmıştır (Hoque et al. 2007). Buğdayda iki farklı kültüvarda yapılan çalışmada ise kuraklık stresi altında GB uygulamasıyla su-su döngüsü enzimlerinden olan SOD ve APOX' un aktivitelerinin sadece kuraklık uygulanan gruplara göre arttığı gözlenmiştir (Ma et al. 2006). Su-su döngüsü enzimlerin aktivitelerindeki bu değişimler bize kuraklık stresi sırasında oluşan H_2O_2 ' nin bu enzimler tarafından süpürüldüğünü gösterebilir.

Peroksidaz (POX) enzimi hücre içinde H_2O_2 süpürülmesinden sorumlu enzimlerden biridir. Çalışmamızda Arabidopsis sürgünlerinin peroksidaz (POX) aktivitesinin kuraklık uygulaması sonrasında ciddi oranda azaldığı belirlenmiştir. Ancak karnitin ön uygulaması ile POX enziminin aktivitesi sadece kuraklık grubuna göre 2 kat artmıştır. Diğer yandan karnitin uygulamasının Arabidopsis sürgünlerinde kuraklık koşulları altında POX aktivitesini arttırdığı bulunmuştur. Köklerde ise POX aktivitesi H_2O_2 üretimindeki azalışa bağlı olarak karnitin uygulaması ile beraber azalmıştır. Tütün BY-2 hücre kültüründe prolin ya da glisin betain uygulamasının tuz stresi altında SOD aktivitesine benzer olarak POX aktivitesi üzerinde de etkisinin bulunmadığı belirlenmiştir (Hoque et al. 2007). Tuza duyarlı çeltik kültüründe yapılan çalışmada ise tuz stresi sonucu POX aktivitesinde artış gözlenmiştir. GB uygulanan tuz stresi altındaki bitkilerin POX aktivitesi ise kontrole göre yüksek olmasına rağmen sadece tuz stresi altındaki bitkilere göre azalmıştır (Demiral ve Turkan, 2004). Buğdayda tuz uygulaması ile POX aktivitesinde yüksek oranda artış gözlenirken, mannitol uygulamasıyla bu artışın azaldığı belirlenmiştir (Seckin ve ark., 2009).

Katalaz (CAT) enzimi özellikle peroksizomlarda lokalize olmuş H_2O_2 'nin suya dönüşmesini katalizleyen enzimdir. Çalışmamızda Arabidopsis gövdelerinde CAT enziminin aktivitesinin kuraklık stresiyle beraber arttığı belirlenmiştir. Bu artışın kuraklık sonucu fotorespirasyona bağlı H_2O_2 üretimindeki artıştan kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Karnitin uygulanmış sürgünlerin ile CAT aktivitesi, sadece kuraklığa maruz kalan sürgünlerinkine göre belirgin oranda azalmıştır. Bu durum, karnitin' in ozmotik düzenlemeye olan katkısı ile bitkiye su alımını kolaylaştırdığı (bkz. RWC) ve gaz alışverişinin daha etkin sürdürülmesini sağladığını göstermektedir. Böylece etkili gaz alışverişinin sürdürülmesi fotorespirasyonun karnitin uygulaması ile azalmasına ve H_2O_2 üretiminin düşmesine neden olmuştur. Köklerde ise CAT aktivitesi kuraklık stresi sonrasında artış göstermiştir. Tuz stresi altında tütün BY-2 hücre kültüründe CAT aktivitesi kontrole göre prolin ve betain uygulamaları ile düşmüştür (Hoque et al. 2007). Tuza duyarlı çeltik bitkilerinde tuz stresi sonucu CAT aktivitesi büyük oranda düşmüş, GB+tuz uygulanan bitkilerde ise sadece tuz uygulanan gruba göre CAT aktivitesi artmıştır (Demiral ve Turkan 2004). Buğdayda tuz stresi altında manitol uygulamasının da CAT aktivitesinde artışa neden olduğu belirlenmiştir (Seckin ve ark. 2009).

NADPH oksidaz (NOX) enzimi hücre zarı üzerinde yer alan ve apoplastta O_2^- üreten enzimdir. Arabidopsis köklerinde karnitin uygulaması sonucu NOX enzim aktivitesi azalırken kuraklık uygulaması ile artmıştır. Benzer olarak, karnitin uygulaması kuraklık stresi altındaki sürgünlerin NOX aktivitesini sadece kuraklık altındaki bitkilere göre azaltmıştır.

Reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunda kuraklık gibi çevresel stresler sonucunda artış gözlenir. Genel olarak ROS' ların üretimindeki artış hücre içinde hasara neden olup toksik etkiler göstermektedir. Fakat belli bir konsantrasyonun altında H_2O_2 gibi ROS' ların hücrel antioksidan savunma sistemini tetikleyici ikincil mesajcı olarak da görev yaptığıda literatürde gösterilmiştir. Kuraklık stresi Arabidopsis'lerin hem sürgünler hemde köklerde H_2O_2 üretiminde önemli miktarlarda artışa neden olmuştur. Karnitin uygulanmış kuraklık grubu bitkilerinde ise H_2O_2 üretiminin daha az olduğu belirlenmiştir.

Lipit peroksidasyonu, hücredeki oksidatif hasarın en önemli belirteçlerinden biridir. Kuraklığın birçok bitkide lipid peroksidasyonunu arttırdığı bilinmektedir. Çalışmamızda karnitin uygulaması ile kuraklık sonucu oluşan oksidatif hasarın, kök ve sürgünlerde azaldığı belirlenmiştir. Benzer olarak, sadece tuz uygulaması ile karşılaştırıldığında GB+tuz uygulamasının, çeltik sürgünlerinin lipid peroksidasyonunda azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (Demiral and Türkan, 2004). Tuz uygulaması sonucu lipid peroksidasyonunda artış gözlenen buğday bitkilerinde ise mannitol uygulamasıyla bu artışın kontrol seviyesine indiği gözlenmiştir (Seckin ve ark., 2009).

5. SONUÇLAR

Çalışmada elde edilen sonuçlar şöyle özetlenebilir:

Sadece kuraklık stresine maruz kalan *Arabidopsis thaliana*'nın sürgün ve köklerinde antioksidan enzimlerin aktivitesi artmasına rağmen H_2O_2 ve TBARS miktarlarında da belirgin bir artış gözlenmiştir. Bu durum *A. thaliana*'nın antioksidan enzim aktivitelerindeki artışlarının ortamdaki stres kaynaklı ROS'ları süpürmede yetersiz olduğunu göstermektedir.

Bu sonuçların aksine, H_2O_2 ve TBARS miktarındaki azalmadan da anlaşılacağı üzere, stres sırasında karnitin uygulamasının, bitki su durumunu koruyarak iyileşmeye neden olduğu belirlenmiştir. Bu durum, ayrıca fotosentez ve solunum gibi metabolik aktivitelerin de daha etkin sürdürülebildiğini göstermektedir. Sonuç olarak karnitin, kuraklığın hücreye verdiği oksidatif hasarı antioksidan savunma sistemini indükleyerek azalttığı bulunmuştur. Ayrıca karnitin, in vivo antioksidan aktivitesiyle de stres altında oksidatif hasar azalttığı düşünülebilir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abbasi A.R., Hajirezaei M., Hofius D., Sonnewald U. and Voll L.M.,** 2007, Specific roles of alpha- and gamma-tocopherol in abiotic stress responses of transgenic tobacco, *Plant Physiology*, 143, 1720–1738.
- Alscher R.G., Donahue J.L. and Cramer C.L.,** 1997, Reactive oxygen species and antioxidants: relationships in green cells, *Physiologia Plantarum*, 100, 224–233.
- Apel K. and Hirt H.,** 2004, Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction, *Annual Review of Plant Biology*, 55, 373–399.
- Arnholdt-Schmitt B., Costa J.H. and de Melo D.F.,** 2006, AOX – a functional marker for efficient cell reprogramming under stress?, *Trends in Plant Science*, 11, 281–287.
- Asada K.,** 1999, The water–water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons, *Annual Reviews in Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50, 601–639.
- Asada K.,** 2006, Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions, *Plant Physiology*, 141, 391–396.
- Ashraf M. and Foolad M.R.,** 2007, Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance, *Environmental and Experimental Botany*, 59, 206–216.
- Aubert S., Hennion F., Bouchereau A., Gout E., Bringly R. and Dorne A.J.,** 1999, Subcellular compartmentation of proline in the leaves of the subantarctic Kerguelen cabbage *Pringlea antiscorbutica* R. Br. In vivo ¹³C-NMR study, *Plant, Cell & Environment*, 22, 255–259.
- Avonce N., Leyman B., Mascorro-Gallardo J.O., Van Dijck P., Thevelein J.M. and Iturriaga G.,** 2004, The *Arabidopsis* trehalose-6-P synthase *AtTPS1* gene is a regulator of glucose, abscisic acid, and stress signaling, *Plant Physiology*, 136, 3649–3659.
- Bartoli C.G., Gomez F., Martinez D.E. and Guamet J.J.,** 2004, Mitochondria are the main target for oxidative damage in leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.), *Journal of Experimental Botany*, 55, 1663–1669.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ben Hassine A., Ghanem M.E., Bouzid S. and Lutts S.,** 2008, An inland and a coastal population of the Mediterranean xerohalophyte species *Atriplex halimus* L. differ in their ability to accumulate proline and glycinebetaine in response to salinity and water stress, *Journal of Experimental Botany*, 59, 1315–1326.
- Borsani O., Zhu J., Verslues P.E., Sunkar R. and Zhu J.K.,** 2005, Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in *Arabidopsis*, *Cell*, 123, 1279–1291.
- Bourdin B., Adenier H. and Perrin Y.,** 2007, Carnitine is associated with fatty acid metabolism in plants, *Plant Physiology and Biochemistry*, 45, 926–931.
- Charrier A., Rippa S., Yu A., Nguyen P.J., Renou J.P. and Perrin Y.,** 2012, The effect of carnitine on *Arabidopsis* development and recovery in salt stress conditions, *Planta*, 235, 123–135
- Chen T.H. and Murata N.,** 2008, Glycinebetaine: an effective protectant against abiotic stress in plants, *Trends in Plant Science*, 13, 499–505.
- Corpas F.J., Barroso J.B. and del Río L.A.,** 2001, Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells, *Trends in Plant Science*, 6, 145–150.
- Couée I., Sulmon C., Gouesbet G. and El Amrani A.,** 2006, Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants, *Journal of Experimental Botany*, 57, 449–459.
- Davidson J.F. and Schiestl R.H.,** 2001, Mitochondrial respiratory electron carriers are involved in oxidative stress during heat stress in *Saccharomyces cerevisiae*, *Molecular and Cellular Biology*, 21, 8483–8489.
- Davletova S., Rizhsky L., Liang H., Shengqiang Z., Oliver D.J., Coutu J., Shulaev V., Schlauch K. and Mittler R.,** 2005a, Cytosolic ascorbate peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of *Arabidopsis*, *The Plant Cell*, 17, 268–281.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Dietz K.J., Jacob S., Oelze M.L., Laxa M., Tognetti V., de Miranda S.M., Baier M. and Finkemeier I.,** 2006, The function of peroxiredoxins in plant organelle redox metabolism. *Journal of Experimental Botany* , 57, 1697–1709.
- Erbas H., Aydogdu N., Usta U. and Erten O.,** 2007, Protective role of carnitine in breast cancer via decreasing arginase activity and increasing nitric oxide, *Cell Biol.*, 31,1414–1419
- Foyer C.H. and Noctor G.,** 2005, Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses, *The Plant Cell*, 17, 1866–1875.
- Garg A.K., Kim J.K., Owens T.G., Ranwala A.P., Choi Y.D., Kochian L.V. and Wu R.J.,** 2002, Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 15898–15903.
- Génard H., Lesaos J., Billard J.P., Tremolieres A. and Boucaud J.,** 1991, Effect of salinity on lipid composition, glycine betaine content and photosynthetic activity in chloroplasts of *Suaeda maritime*, *Plant Physiology and Biochemistry*, 29, 421–427.
- Giraud E., Ho L. H. and Clifton R. ,** 2008, The absence of ALTERNATIVE OXIDASE 1a in *Arabidopsis* results in acute sensitivity to combined light and drought stress, *Plant Physiology*, 147, 595–610.
- Halliwell B. and Foyer C.H.,** 1976, Ascorbic acid, metal ions and the superoxide radical, *Biochemical Journal*, 155, 697–700.
- Hare P.D. and Cress W.A.,** 1997, Metabolic implications of stressinduced proline accumulation in plants, *PlantGrowth Regulation*, 21, 79–102.
- Hu X., Jiang M., Zhang A. and Lu J.,** 2005, Absciscic acid-induced apoplastic H₂O₂ accumulation up-regulates the activities of chloroplastic and cytosolic antioxidant enzymes in maize leaves, *Planta*, 223, 57–68.
- Hu X., Zhang A., Zhang J. and Jiang M.,** 2006, Absciscic acid is a key inducer of hydrogen peroxide production in leaves of maize plants exposed to water stress, *Plant and Cell Physiology*, 47,1484–1495.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Huang C., He W., Guo J., Chang X., Su P. and Zhang L.,**2005, Increased sensitivity to salt stress in an ascorbate-deficient *Arabidopsis* mutant, *Journal of Experimental Botany*, 56, 3041–3049.
- Ivanov B., Asada K., Kramer D.M. and Edwards G.,** 2005, Characterization of photosynthetic electron transport in bundle sheath cells of maize. I. Ascorbate effectively stimulates cyclic electron flow around PSI, *Planta*, 220, 572–581.
- Jiménez A., Hernandez J.A., del Río L.A. and Sevilla F.,** 1997, Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves, *Plant Physiology*, 114, 275–284.
- Jubany-Marí T., Munné-Bosch S., Lopez-Carbonell M. and Alegre L.,** 2009, Hydrogen peroxide is involved in the acclimation of the Mediterranean shrub, *Cistus albidus* L., to summer drought, *Journal of Experimental Botany*, 60, 107–120.
- Kamada-Nobusada T., Hayashi M., FukazawaM., Sakakibara H. and NishimuraM.,** 2008, Aputative peroxisomal polyamine oxidase, AtPAO4, is involved in polyamine catabolism in *Arabidopsis thaliana*, *Plant and Cell Physiology*, 49, 1272–1282.
- Karpinska B., Wingsle G. and Karpinski S.,** 2000, Antagonistic effects of hydrogen peroxide and glutathione on acclimation to excess excitation energy in *Arabidopsis*, *IUBMB Life*, 50, 21–26.
- Karpinski S., Gabrys H., Mateo A., Karpinska B. and Mullineaux P.M.,** 2003, Light perception in plant disease defence signalling, *Current Opinion in Plant Biology*, 6, 390–396.
- Kocsy G., Szalai G. and Galiba G.,** 2002, Induction of glutathione synthesis and glutathione reductase activity by abiotic stresses in maize and wheat, *Scientific World Journal*, 2, 1699–1705.
- Koussevitzky S., Suzuki N., Huntington S., Armijo L., Sha W., Cortes D., Shulaev V. and Mittler R.,** 2008, Ascorbate peroxidase1 plays a key role in the response of *Arabidopsis thaliana* to stress combination, *Journal of Biological Chemistry*, 283, 34197–34203.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kranner I., Beckett R.P., Wornik S., Zorn M. and Pfeifhofer H.W.,** 2002, Revival of a resurrection plant correlates with its antioxidant status, *The Plant Journal*, 31, 13–24.
- Küfner I. and Koch W.,** 2008, Stress regulated members of the plant organic cation transporter family are localized to the vacuolar membrane, *BMC*, 1, 1–10.
- Kwak J.M., Mori I.C., Pei Z.M., Leonhardt N., Torres M.A., Dangl J.L., Bloom R.E., Bodde S., Jones J.D. and Schroeder J.I.,** 2003, NADPH oxidase *AtrbohD* and *AtrbohF* genes function in ROS dependent ABA signaling in *Arabidopsis*, *EMBO Journal*, 22, 2623–2633.
- Lawand S., Dorne A. J., Long D., Coupland G., Mache R. and Carol P.,** 2002, *Arabidopsis* a bout de souffle, which is homologous with mammalian carnitine acyl carrier, is required for postembryonic growth in the light, *The Plant Cell*, 14, 2161–2173.
- Lee K.P., Kim C., Landgraf F. and Apel K.,** 2007, EXECUTER1- and EXECUTER2-dependent transfer of stress-related signals from the plastid to the nucleus of *Arabidopsis thaliana*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 10270–10275.
- Lelandais-Brière C., Jovanovic M., Torres G.A.M., Perrin Y., Lemoine R., Corre-Menguy F. and Hartmann C.,** 2007, Disruption of AtOCT1, an organic cation transporter gene, affects root development and carnitine-related responses in *Arabidopsis*, *Plant J.*, 51, 154–164
- Leshem Y., Melamed-Book N., Cagnac O., Ronen G., Nishri Y., Solomon M., Cohen G. and Levine A.,** 2006, Suppression of *Arabidopsis* vesicle-SNARE expression inhibited fusion of H₂O₂-containing vesicles with tonoplast and increased salt tolerance, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 18008–18013.
- Li Y., Wang Z., Sun X. and Tang K.,** 2008, Current opinions on the functions of tocopherol based on the genetic manipulation of tocopherol biosynthesis in plants, *Journal of Integrative Plant Biology*, 50, 1057–1069.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Liu X., Hua X., Guo J., Qi D., Wang L., Liu Z., Jin Z., Chen S. and Liu G.,** 2008, Enhanced tolerance to drought stress in transgenic tobacco plants overexpressing VTE1 for increased tocopherol production from *Arabidopsis thaliana*, *Biotechnology Letters*, 30, 1275–1280.
- McNeil S.D., Nuccio M.L. and Hanson A.D.,** 1999, Betaines and related osmoprotectants. Targets for metabolic engineering of stress resistance, *Plant Physiology* 120, 945–950.
- Mano J., Hideg E. and Asada K.,** 2004, Ascorbate in thylakoid lumen functions as an alternative electron donor to photosystem II and photosystem I, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 429, 71–80.
- Matysik J., Alia, Bhalu B. and Mohanty P.,** 2002, Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants, *Current Science*, 82, 525–532.
- Meek, C., Oosterhuis, D. and Gorham, J.,** 2003, Does foliar-applied glycine betaine affect endogenous betaine levels and yield in cotton? Online, *Crop Management* doi 10, 1094/CM-2003-0804-02-RS.
- Miao Y., Lv D., Wang P., Wang X.C., Chen J., Miao C. and Song C.P.,** 2006, An *Arabidopsis* glutathione peroxidase functions as both a redox transducer and a scavenger in abscisic acid and drought stress responses, *The Plant Cell*, 18, 2749–2766.
- Miller G., Shulaev V. and Mittler R.,** 2008, Reactive oxygen signaling and abiotic stress, *Physiologia Plantarum* 133, 481–489.
- Miller G., Suzuki N., Ciftci-Yilmaz S. and Mittler R.,** 2009, Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses, *Plant, Cell and Environment*, 1-15.
- Miranda J.A., Avonce N., Suarez R., Thevelein J.M., Van Dijck P. and Iturriaga G.,** 2007, A bifunctional TPS-TPP enzyme from yeast confers tolerance to multiple and extreme abiotic-stress conditions in transgenic *Arabidopsis*, *Planta*, 226, 1411–1421.
- Mittler R.,** 2002, Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance, *Trends in Plant Science*, 7, 405–410.
- Mittler R. and Berkowitz G.,** 2001, Hydrogen peroxide, a messenger with too many roles? *Redox Report*, 6, 69–72.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Mittler R., Kim Y., Song L., Coutu J., Coutu A., Ciftci-Yilmaz S., Lee H., Stevenson B. and Zhu J.K.**, 2006, Gain- and loss-of-function mutations in *Zat10* enhance the tolerance of plants to abiotic stress, *FEBS Letters*, 580, 6537–6542.
- Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M. and Van Breusegem F.**, 2004, Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* 9, 490–498.
- Miyake C. and Asada K.**, 1994, Ferredoxin-dependent photoreduction of monodehydroascorbate radicals in spinach thylakoids, *Plant and Cell Physiology* 35, 539–549.
- Mohapatra S., Minocha R., Long S. and Minocha S.C.**, 2009, Putrescine overproduction negatively impacts the oxidative state of poplar cells in culture, *Plant Physiology and Biochemistry*, 47, 262–271.
- Molinari H.B.C., Marur C.J., Daros E., de Campos M.K.F., de Carvalho J.F.R.P., Filho J.C.B., Pereira L.F.P. and Vieira L.G.E.**, 2007, Evaluation of the stress-inducible production of proline in transgenic sugarcane (*Saccharum* spp.): osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress, *Physiologia Plantarum*, 130, 218–229.
- Møller I.M.**, 2001, Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species, *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52, 561–591.
- Møller I.M., Jensen P.E. and Hansson A.**, 2007, Oxidative modifications to cellular components in plants, *Annual Review of Plant Biology*, 58, 459–481.
- Moschou P.N., Paschalidis K.A., Delis I.D., Andriopoulou A.H., Lagiotis G.D., Yakoumakis D.I. and Roubelakis-Angelakis K.A.**, 2008, Spermidine exodus and oxidation in the apoplast induced by abiotic stress is responsible for H₂O₂ signatures that direct tolerance responses in tobacco, *The Plant Cell* 20, 1708–1724.
- Munné-Bosch S. and Alegre L.**, 2000, Changes in carotenoids, tocopherols and diterpenes during drought and recovery, and the biological significance of chlorophyll loss in *Rosmarinus officinalis* plants, *Planta* 210, 925–931.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Munné-Bosch S. and Alegre L.**, 2002, Interplay between ascorbic acid and lipophilic antioxidant defences in chloroplasts of water stressed *Arabidopsis* plants FEBS Letters, 524, 145–148.
- Munné-Bosch S., Falara V., Pateraki I., Lopez-Carbonell M., Cela J. and Kanellis A.K.**, 2009, Physiological and molecular responses of the isoprenoid biosynthetic pathway in a drought-resistant Mediterranean shrub, *Cistus creticus* exposed to water deficit, Journal of Plant Physiology 166, 136–145.
- Naidu B.P., Cameron D.F. and Konduri S.V.**, 1998, Improving stress tolerance and productivity of plants by a biochemical approach in agronomy and plant breeding, In: Proceedings of the IX Australian Agronomy Conference, Wagga Wagga, Australia, pp, 355–358.
- Neill S., Barros R., Bright J., Desikan R., Hancock J., Harrison J., Morris P., Ribeiro D. and Wilson I.**, 2008, Nitric oxide, stomatal closure and abiotic stress, J Exp Bot., 59, 165–176.
- Niyogi K.K.**, 1999, Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 50, 333–359.
- Noctor G. and Foyer C.H.**, 1998, Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control, Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 49, 249–279.
- Noctor G., Veljovic-Jovanovic S., Driscoll S., Novitskaya L. and Foyer C.H.**, 2002, Drought and oxidative load in the leaves of C3 plants: a predominant role for photorespiration? Annals of Botany, 89, 841–850.
- Norman C., Howell K.A., Millar A.H., Whelan J.M. and Day D.A.**, 2004, Salicylic acid is an uncoupler and inhibitor of mitochondrial electron transport, Plant Physiology, 134, 492–501.
- Nyathi Y. and Baker A.**, 2006, Plant peroxisomes as a source of signalling molecules, Biochimica et Biophysica Acta 1763, 1478–1495.
- Palma J.M., Corpas F.J. and del Río L.A.**, 2009, Proteome of plant peroxisomes: new perspectives on the role of these organelles in cell biology, Proteomics 9, 2301–2312.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Park E.J., Jeknic Z., Pino M.T., Murata N. and Chen T.H.,** 2007, Glycinebetaine accumulation is more effective in chloroplasts than in the cytosol for protecting transgenic tomato plants against abiotic stress, *Plant, Cell & Environment*, 30, 994–1005.
- Pastore D., Trono D., Laus M.N., Di Fonzo N. and Flagella Z.,** 2007, Possible plant mitochondria involvement in cell adaptation to drought stress. A case study: durum wheat mitochondria, *Journal of Experimental Botany*, 58, 195–210.
- Penna S.,** 2003, Building stress tolerance through over-producing trehalose in transgenic plants, *Trends in Plant Science* 8, 355–357.
- Raha S. and Robinson B.H.,** 2000, Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing, *Trends in Biochemical Sciences*, 25, 502–508.
- Rey P., Cuine S., Eymery F., Garin J., Court M., Jacquot J.P., Rouhier N. and Broin M.,** 2005, Analysis of the proteins targeted by CDSP32, a plastidic thioredoxin participating in oxidative stress responses, *The Plant Journal*, 41, 31–42.
- Rhoads D.M., Umbach A.L., Subbaiah C.C. and Siedow J.N.,** 2006, Mitochondrial reactive oxygen species. Contribution to oxidative stress and interorganellar signaling, *Plant Physiology*, 141, 357–366
- del Río L.A., Palma J.M., Sandalio L.M., Corpas F.J., Pastori G.M., Bueno P. and Lopez-Huertas E.,** 1996, Peroxisomes as a source of superoxide and hydrogen peroxide in stressed plants, *Biochemical Society Transactions* 24, 434–438.
- Rippa S., Zhao Y., Merlier F., Charrier A. and Perrin Y.,** 2012, The carnitine biosynthetic pathway in *Arabidopsis thaliana* shares similar features with the pathway of mammals and fungi, *Plant Physiology and Biochemistry*, 60, 109–114.
- Rizhsky L., Davletova S., Liang H. and Mittler R.,** 2004a, The zinc finger protein Zat12 is required for cytosolic ascorbate peroxidase 1 expression during oxidative stress in *Arabidopsis*, *Journal of Biological Chemistry*, 279, 11736–11743.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Rizhsky L., Liang H. and Mittler R.**, 2003, The water–water cycle is essential for chloroplast protection in the absence of stress, *Journal of Biological Chemistry*, 278, 38921–38925.
- Ros Barceló A.**, 2005, Xylem parenchyma cells deliver the H₂O₂ necessary for lignification in differentiating xylem vessels, *Planta*, 220, 747–756.
- Sano S., Tao S., Endo Y., Inaba T., Hossain M.A., Miyake C., Matsuo M., Aoki H., Asada K. and Saito K.**, 2005, Purification and cDNA cloning of chloroplastic monodehydroascorbate reductase from spinach, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 69, 762–772.
- Seki M., Umezawa T., Urano K. and Shinozaki K.**, 2007, Regulatory metabolic networks in drought stress responses, *Current Opinion in Plant Biology*, 10, 296–302.
- Serrato A.J., Perez-Ruiz J.M., Spinola M.C. and Cejudo F.J.**, 2004, A novel NADPH thioredoxin reductase, localized in the chloroplast, which deficiency causes hypersensitivity to abiotic stress in *Arabidopsis thaliana*, *Journal of Biological Chemistry* 279, 43821–43827.
- Sgherri C. and Navari-Izzo F.**, 1995, Sunflower seedlings subjected to increasing water deficit stress: oxidative stress and defense mechanisms, *Physiologia Plantarum*, 93, 25–30.
- Shao H.B., Chu L.Y., Shao M.A., Jaleel C.A. and Mi H.M.**, 2008, Higher plant antioxidants and redox signaling under environmental stresses, *Comptes Rendus Biologies*, 331, 433–441.
- Shen B., Jensen R.G. and Bohnert H.J.**, 1997a, Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants by targeting mannitol biosynthesis to chloroplasts, *Plant Physiology*, 113, 1177–1183.
- Shen B., Jensen R.G. and Bohnert H.J.**, 1997b, Mannitol protects against oxidation by hydroxyl radicals, *Plant Physiology*, 115, 527–532.
- Smirnoff N.**, 2000, Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule, *Current Opinion in Plant Biology*, 3, 229–235.
- Smirnoff N. and Cumbes Q.J.**, 1989, Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes, *Phytochemistry*, 28, 1057–2060.
- Smirnoff N. and Pallanca J.E.**, 1996, Ascorbate metabolism in relation to oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, 24, 472–478.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Takahashi M. and Asada K.**, 1988, Superoxide production in aprotic interior of chloroplast thylakoids, Archives of Biochemistry and Biophysics, 267, 714–722.
- Taiz L. and Zeiger E.**, 2010, Plant physiology, 1-690.
- Torres M.A. and Dangl J.L.**, 2005, Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development, Current Opinion in Plant Biology, 8, 397–403.
- Triantaphylides C.,KrischkeM., Hoeberichts F.A.,Ksas B.,Gresser G.,Havaux M., Van Breusegem F. and Mueller M.J.**, 2008, Singlet oxygen is the major reactive oxygen species involved in photooxidative damage to plants, Plant Physiology, 148, 960–968.
- Torres M.A. and Dangl J.L.**, 2005, Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development, Current Opinion in Plant Biology, 8, 397–403.
- Van Camp W., Capiou K., Van Montagu M., Inze D. and Slooten L.**, 1996, Enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco plants overproducing Fe-superoxide dismutase in chloroplasts, Plant Physiology, 112, 1703–1714.
- Vandenabeele S., Vanderauwera S., Vuylsteke M., Rombauts S., Langebartels C., Seidlitz H.K., Zabeau M., Van Montagu M., Inze D. and Van Breusegem F.**, 2004, Catalase deficiency drastically affects gene expression induced by high light in *Arabidopsis thaliana*, The Plant Journal 39, 45–58.
- Vaz F. M. and Wanders R. J. A.**, 2002, Carnitine biosynthesis in mammals, Biochemical Society, 361, 417-429.
- Vendruscolo E.C., Schuster I., Pileggi M., Scapim C.A., Molinari H.B.,Marur C.J. and Vieira L.G.**, 2007, Stress-induced synthesis of proline confers tolerance to water deficit in transgenic wheat, Journal of Plant Physiology, 164, 1367–1376.
- Vieira Dos Santos C. and Rey P.**, 2006, Plant thioredoxins are key actors in the oxidative stress response, Trends in Plant Sciences, 11, 329–334.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Vinocur B. and Altman A.**, 2005, Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations, *Current Opinion in Biotechnology*, 16, 123–132.
- Wagner D., Przybyla D. and Op den Camp R.**, 2004, The genetic basis of singlet oxygen-induced stress responses of *Arabidopsis thaliana*, *Science*, 306, 1183–1185.
- Wang F.Z., Wang Q.B., Kwon S.Y., Kwak S.S. and Su W.A.**, 2005, Enhanced drought tolerance of transgenic rice plants expressing a pea manganese superoxide dismutase, *Journal of Plant Physiology*, 162, 465–472.
- WeiBing X. and Rajashekar C.B.**, 1999, Alleviation of water stress in beans by exogenous glycine betaine, *Plant Science*, 148, 185–192.
- Zhu J., Fu X. and Koo Y.D.**, 2007, An enhancer mutant of *Arabidopsis* salt overly sensitive 3 mediates both ion homeostasis and the oxidative stress response, *Molecular Cell Biology*, 27, 5214–5224.

ÖZGEÇMİŞ

Esra ÇANCIOĞLU, 19.11.1987’da Tokat’ ta doğmuştur. 2004’te Tokat Atatürk Lisesini bitirmiştir. Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Opsiyonundan 2011 yılında mezun olmuştur. 2012 yılında lisansüstü eğitime, Doç.Dr. Hediye SEKMEN ESEN danışmanlığında, Ege Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Genel Biyoloji A.B.D.’de başlamıştır.

