

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***ARABİDOPSIS THALIANA*'NİN SÜKSİNAT DEHİDROGENAZ (SDH)
(KOMPLEKS II) EKSİK BİTKİLERİNDE TUZ STRESİ ALTINDA
HÜCRESEL REDOKS DÜZENLEMESİNİN ARAŞTIRILMASI**

Oğuzhan YILMAZ

Tez Danışmanı : Prof. Dr. İsmail TÜRKAN

Biyoloji Anabilim Dalı

Genel Biyoloji Yüksek Lisans Programı

Bornova-İZMİR

2019

Oğuzhan YILMAZ tarafından YÜKSEK LİSANS tezi olarak sunulan “Arabidopsis thaliana’nın süksinat dehidrogenaz (SDH) (kompleks II) eksik bitkilerinde tuz stresi altında hücrel redoks düzenlemesinin 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 22.01.2019 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

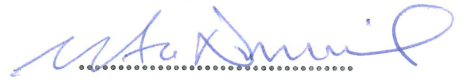
Jüri Başkanı : Prof. Dr. İsmail TÜRKAN



Raportör Üye: Dr. Öğretim Üyesi Barış UZİLDAY



Üye : Prof. Dr. Mehmet Ali DEMİRAL



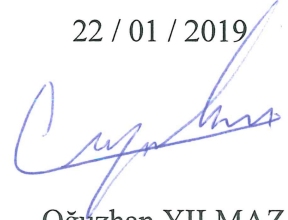


EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Arabidopsis Thaliana’nın Süksinat Dehidrogenaz (SDH) (Kompleks II) Bitkilerinde Tuz Stresi Altında Hücresel Redoks Düzenlemesinin Araştırılması” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

22 / 01 / 2019



Oğuzhan YILMAZ

ÖZET***ARABIDOPSIS THALIANA*'NİN SÜKSİNAT DEHİDROGENAZ (SDH) (KOMPLEKS II) EKSİK BİTKİLERİNDE TUZ STRESİ ALTINDA HÜCRESEL REDOKS DÜZENLEMESİNİN ARAŞTIRILMASI**

YILMAZ, Oğuzhan

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Yöneticisi: Prof. Dr. İsmail TÜRKAN

Ocak 2019, 68 sayfa

Tuz stresi, bitki performansını olumsuz etkileyen bir abiyotik stres türüdür. Tuz stresiyle birlikte hücrede çeşitli metabolik süreçler arasındaki dengenin bozulması nedeniyle reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi artmakta, bu moleküller belirli bir seviyeye kadar sinyal görevi görmekte ancak aşırı üretilmeleri ise biyolojik moleküllerde zarar oluşturmaktadır. Sonuçta oluşan oksidatif stres fotosentez ve solunumu olumsuz etkileyerek büyümeyi yavaşlatmakta, stresin ileri safhalarında ise hücre ölümünü tetiklemektedir. Mitokondri, kloroplast ile birlikte hücrede önemli ROS kaynaklarından biridir. Mitokondriyal kompleks II (süksinat dehidrogenaz, SDH) mitokondri iç zarına periferik olarak yerleşen, hem elektron taşıma zincirinde (ETS) hemde sitrik asit döngüsünde görev alan bir enzimdir. Daha önce memelilerde ve bitkilerde yapılan çalışmalarda SDH kökenli ROS'ların hücrede sinyal görevi gördüğü, hücre büyümesini ve savunma yanıtlarını düzenlediği ortaya konmuştur. Ancak bu kompleksin hücre redoksunun düzenlenmesi üzerine etkileri hakkında literatürde bilgi yoktur. Bu çalışmada kompleks II kökenli ROS'ların, SDH inhibitörü olan malonat kullanılarak, tuz stresi altında hücre redoksunu nasıl etkilediğinin araştırılması amaçlanmıştır.

Anahtar Sözcükler: Arabidopsis, Mitokondri, Süksinat Dehidrogenaz, Reaktif Oksijen Türleri, ROS, Antioksidant Enzimler, H₂O₂, Tuz Stresi.



ABSTRACT

**INVESTIGATION OF CELLULAR REDOX REGULATION IN
SUCCINATE DEHYDROGENASE (SDH) (COMPLEX II)
DEFICIENT PLANTS OF *ARABIDOPSIS THALIANA* UNDER SALT
STRESS**

YILMAZ,Oğuzhan

MSc in Biology

Supervisor: Prof. Dr. İsmail TÜRKAN

January 2019, 68 pages

Salt stress is one of the abiotic stresses that affects plant growth and performance. Disruption of balance in metabolic processes resulting from salt stress, there usually be an increase in reactive oxygen species (ROS) production. These molecules have a signalling role up to a certain level but when that level is exceeded, they are harmful for biomolecules. These ROS's are affecting processes like photosynthesis and respiration causing inhibition of plant growth and even cell death. Mitochondria is a major ROS source in the cell along with chloroplast. Complex II of mitochondri (Succinate dehydrogenase, SDH) localizes in the inner membrane of mitochondria, operating in both TCA cycle and ETC. Previously works on mammal and plants showed that SDH derived ROS has signalling role in cellular growth and defence responses. But there is no information on how SDH regulating cellular redox. In our work, using a spesific inhibitor of SDH, malonate, our intent is to investigate how SDH is regulating cellular redox under salt stress.

Keywords: Arabidopsis, Mitochondri, Succinate Dehydrogenase, Reactive Oxygen Species, ROS, Antioxidant Enzymes, H₂O₂, Salt Stress



ÖNSÖZ

Tez konumun belirlenmesi, akademik hayatın teorik kısmından pratik kısmına geçişimi gerçekleştirmiştir. Bu noktadan itibaren başlayan dönem yayınlanmış makalelerdeki işlerin nasıl yapıldığı ve ne kadar emeğin söz konusu olduğunun öğrenildiği bir dönemdir. Temel bilimlerde tezli yüksek lisans yapan her öğrencinin göreceği ve çok çalışmanın nasıl bir his olduğunun öğrenileceği bir süreçtir. Ülkemizin akademisinin gelişmesi ve kişinin bilim kariyeri açısından önemli bir dönüm noktası sayılabilir.

İZMİR

22/01/2019

Oğuzhan YILMAZ



İÇİNDEKİLER

Sayfa

TUTANAK.....	iii
ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI.....	v
ÖZET.....	ix
ABSTRACT.....	xiii
ÖNSÖZ.....	xvii
KISALTMALAR DİZİNİ.....	xviii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Mitokondriyal Elektron Taşıma Sistemi (ETS) ve Tuz Stresi İlişkisi	2
2.2. Kompleks II (SDH, Süksinat Dehidrogenaz)	4
2.3. Mitokondriyal ROS (mtROS) ve Üretim Yolakları	6
2.4. Tuz Stresi ve Mitokondriyal ROS ilişkisi	7
2.5. Malonat.....	9
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	11
3.1. Tohumların Temini	11
3.2. Tohumların Sterilizasyonu	11
3.3. Tohumların Ekimi	11
3.4. Bitkilerin Yetiştirilmesi ve Deneme Deseni	11
3.5. Fizyolojik Parametreler	12
3.5.1. Büyüme parametreleri.....	12
3.5.2. Bağlı büyüme hızı (RGR).....	12
3.5.3. Bağlı su içeriği (RWC)	12

İÇİNDEKİLER (devam)

3.6. Biyokimyasal Parametreler.....	12
3.6.1. Lipid peroksidasyonu	12
3.6.2. Antioksidan enzim ekstraksiyonu ve aktivite analizleri.....	13
3.6.3. Protein miktarının belirlenmesi.....	13
3.6.4. Katalaz (CAT) enzim aktivitesinin belirlenmesi.....	13
3.6.5. Peroksidaz (POX) enzim aktivitesinin belirlenmesi	14
3.6.6. NADPH oksidaz (NOX) aktivitesinin belirlenmesi	14
3.6.7. Askorbat peroksidaz (APX) enzim aktivitesinin belirlenmesi.....	14
3.6.8. Antioksidan enzimlerin izoenzim tayini	15
3.6.9. Süperoksit dismutaz (SOD) izoenzim tayini	15
3.6.10. Peroksidaz (POX) izoenzim tayini.....	16
3.6.11. H ₂ O ₂ miktarı tayini.....	16
4. BULGULAR	17
4.1. Fizyolojik Parametreler.....	17
4.1.1. Uygun malonat derişimi	17
4.1.2. Tuz stresi sırasında SDH'nin inhibisyonu.....	18
4.1.3. SDH inhibisyonunun tuz stresi sonrası iyileşme (recovery) sürecine etkisi	19
4.2. Enzim ve İzoenzim Aktiviteleri.....	21
4.2.1. Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi ve izoenzim deseni	21
4.2.2. Peroksidaz (POX) aktivitesi	23
4.2.3. NADPH oksidaz (NOX) aktivitesi ve izozim deseni	24
4.2.4. Katalaz (CAT) aktivitesi ve izozim deseni	26
4.2.5. Askorbat peroksidaz (APX) aktivitesi.....	28
4.2.6. Prolin içeriğı	30
4.2.7. H ₂ O ₂ miktarı	30
4.2.8. Lipit Peroksidasyonu.....	31
4.3. Gen İfadesindeki Değişiklikler.....	32
5. TARTIŞMA	34
6. SONUÇ.....	38

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil

Sayfa

Şekil 1.1 Mitokondriyal elektron taşınım sistemi.....	3
Şekil 1.2 Süksinat (solda) ve malonat (sağda).....	9
Şekil 2.1 Deneme desenindeki gruplar	11
Şekil 3.1 Farklı derişimlerde malonat (MA) uygulanmış uygulama gruplarının fizyolojik parametreleri. Uygulama grupları: (K) Kontrol, (50MA) 50 μ M Malonat, (100MA) 100 μ M Malonat, (250MA) 250 μ M Malonat, (500MA) 500 μ M Malonat. (A) gövde uzunluğu, (B) gövde yaş ağırlık, (C) gövde turgorlu ağırlık, (D) gövde kuru ağırlık, (E) kök boyu, (F) kök yaş ağırlık, (G) kök kuru ağırlık.	18
Şekil 3.2 Tuz, malonat ve tuz+malonat kombinasyonları uygulanmış grupların fizyolojik parametreleri. Uygulama grupları: (K) Kontrol, (50N) 50 mM NaCl, (100N) 100 mM NaCl, (100MA) 100 μ M Malonat, (50N+MA) 50 mM NaCl+100 μ M Malonat, (100N+MA) 100 mM NaCl+100 μ M Malonat. (A) gövde yaş ağırlık, (B) gövde kuru ağırlık, (C) kök yaş ağırlık, (D) kök kuru ağırlık.	19
Şekil 3.3 Tuz stresi sonrası iyileşme (recovery) periyotunda SDH inhibisyonunun fizyolojik parametrelere etkisi. Uygulama grupları (K) Kontrol, (R) İyileşme, (R+MA) İyileşme+malonat. (A) gövde boyu, (B) gövde yaş ağırlık, (C) kök yaş ağırlık, (D) kök kuru ağırlık.	20
Şekil 3.4 7 gün uygulama yapılmış gruplardaki SOD izozim aktiviteleri, Native-PAGE. Uygulama grupları: Kontrol (K), 50 mM NaCl (50N), 100 mM NaCl (100N), 100 μ M Malonat (100MA), 50 mM NaCl+100 μ M Malonat (50N+MA), 100 mM NaCl+100 μ M Malonat (100N+MA). Her kuyucuk 50 μ g protein içermektedir. Std: 0.5 U bovine karaciğeri SOD standartı.	22
Şekil 3.5 7 gün uygulama yapılmış gruplardaki total POX aktivitesi. Uygulama grupları: Kontrol (K), 50 mM NaCl (50N), 100 mM NaCl (100N), 100 μ M Malonat (100MA), 50 mM NaCl+100 μ M Malonat (50N+MA), 100 mM NaCl+100 μ M Malonat (100N+MA) (p<0.05).	23
Şekil 3.6 (K) Kontrol, (R) İyileşme, (R+MA) İyileşme+malonat gruplarının total POX aktivitesi (p<0.05).	24
Şekil 3.7 7 gün uygulama yapılmış gruplardaki total NOX ve NOX izozim aktiviteleri, Native-PAGE. Uygulama grupları: Kontrol (K), 50 mM NaCl (50N), 100 mM NaCl (100N), 100 μ M Malonat (100MA), 50 mM NaCl+100 μ M Malonat (50N+MA), 100 mM NaCl+100 μ M Malonat (100N+MA). Her kuyucuk 50 μ g protein içermektedir.	25

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

- Şekil 3.8 7 gün uygulama yapılmış gruplardaki CAT izozim ve total CAT aktiviteleri, Native-PAGE. Uygulama grupları: Kontrol (K), 50 mM NaCl (50N), 100 mM NaCl (100N), 100 µM Malonat (100MA), 50 mM NaCl+100 µM Malonat (50N-MA), 100 mM NaCl+100 µM Malonat (100N-MA). Her kuyucuk 50µg protein içermektedir. ($p<0.05$). 27
- Şekil 3.9 7 gün uygulama yapılmış gruplardaki total CAT aktivitesi. Kontrol (K), İyileşme (R), İyileşme+malonat (R+MA) ($p<0.05$). 28
- Şekil 3.10 7 gün uygulama yapılmış gruplardaki total APX aktivitesi, Uygulama grupları: Kontrol (K), 50 mM NaCl (50N), 100 mM NaCl (100N), 100 µM Malonat (100MA), 50 mM NaCl+100 µM Malonat (50N+MA), 100 mM NaCl+100 µM Malonat (100N+MA) ($p<0.05$). 29
- Şekil 3.11 7 gün uygulama yapılmış gruplardaki total APX aktivitesi. Uygulama grupları: Kontrol (K), İyileşme (R), İyileşme+MA (R+MA) ($p<0.05$). 29
- Şekil 3.12 3 gün uygulama yapılmış gruplardaki prolin içerikleri. Uygulama grupları: Kontrol (K), İyileşme (R), İyileşme+MA (R+MA) ($p<0.05$). 30
- Şekil 3.13 7 gün uygulama yapılmış gruplardaki H_2O_2 içerikleri. Uygulama grupları: (K) Kontrol, (R) İyileşme ve (R+MA) İyileşme+malonat. 31
- Şekil 3.14 7 gün uygulama yapılmış gruplardaki TBARS içerikleri. Uygulama grupları: Kontrol (K), 50 mM NaCl (50N), 100 mM NaCl (100N), 100 µM Malonat (100MA), 50 mM NaCl+100 µM Malonat (50N+MA) ($p<0.05$). . 31
- Şekil 3.15 7 gün uygulama yapılmış gruplardaki TBARS içerikleri. Uygulama grupları: Kontrol (K), İyileşme (R), İyileşme+malonat (R+MA). ($p<0.05$). 32
- Şekil 3.16 7 gün uygulama yapılmış gruplardaki oksidatif stres markır qRT-PCR sonuçları. (A) 1O_2R , (B) H_2O_2R1 . Uygulama grupları: Kontrol (K), Sodyum klorür (NaCl), İyileşme (R), İyileşme+MA (R+MA). 33

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	Glutatyon redüktaz
GSH	Glutatyon
GSSG	Glutatyon disülfid
AsA	Askorbik asit
MDHA	Monodehidroaskorbik asit
DHA	Dehidroaskorbik asit
MDHAR	Monodehidroaskorbat redüktaz
DHAR	Dehidroaskorbat redüktaz
MDA	Malondialdehit
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
MA	Malonik asit
mtROS	Mitokondri kökenli ROS

1. GİRİŞ

Biyotik veya abiyotik stres faktörleri bitkilerin fotosentez ve solunum mekanizmalarını etkileyerek, elektron taşıma sistemlerindeki dengeyi bozar ve bu durum hücre içinde reaktif oksijen türleri (ROS) üretiminde artışa sebep olur. Bitki hücrelerinde ROS'un kaynakları kloroplast, mitokondri ve peroksisomdur. Yeşil dokularda ana ROS kaynağı kloroplastken, toprak altı dokularda ise ROS özellikle mitokondride üretilir. Çevresel streslerin etkisiyle, ROS'un hücrede aşırı birikimi nükleik asitler, proteinler, solunum ve fotosentezle ilgili zarlara zarar vermektedir (Sairam et al., 2002; Vaidyanathan et al., 2003; Demiral et al., 2005; Koca et al., 2007; Miller et al., 2010).

Tuzluluk, ROS üretimine sebep olan en büyük abiyotik stres faktörlerinden biridir. Ana kayadan toprağa karışan ve okyanus kökenli tuzlar gibi doğal sebepler dışında, tarımsal işlemler de topraktaki artan tuzluluğun önemli sebeplerinden biridir. “Tuzluluk” terimi genelde topraktaki aşırı tuzu ifade etsede, NaCl topraktaki tuzun çoğunu oluşturur ve bu da bitkilerin NaCl birikimini engellemek ve dışarı atılımlarını sağlamak için neden birçok mekanizma geliştirdiklerini açıklar. Yüksek tuz oranı ozmotik ve iyonik stres oluşturarak en sonunda bitkinin ölümüne sebep olur (Türkan et al., 2009).

Bitki hücresinde mitokondri ve kloroplast, hem ana enerji kaynakları hemde ROS üretim merkezleridir (Mittler et al., 2004). Özellikle yeşil olmayan dokularda veya karanlık periyotta, mitokondri, ana enerji ve ROS kaynağıdır (Navrot et al., 2007). Mitokondri içinde ROS üretiminin merkezi elektron taşıma sistemi (ETS)'dir. ETS içinde; kompleks I (NADH dehidrogenaz), kompleks III (Sitokrom bc₁ kompleksi)'ün ROS kaynağı olduğu uzun zamandır bilinmektedir (Lambert et al., 2004; Muller et al., 2003). Yapılan çalışmalarla birlikte kompleks II (süksinat dehidrogenaz (SDH))'nin de ROS üretebildiği ortaya konmuştur

(Yankovskaya et al., 2003). Ayrıca, son yıllarda yapılan çalışmalarla birlikte SDH kaynaklı ROS'un organizmada; büyüme, gelişme, tohum sayısı ve kalitesi ve stres yanıtlarının düzenlenmesi gibi hayati işlevlerdeki rolü ortaya konmuştur (Navrot et al., 2007; Leon et al., 2007; Fuentes et al., 2011; Gleason et al., 2011).

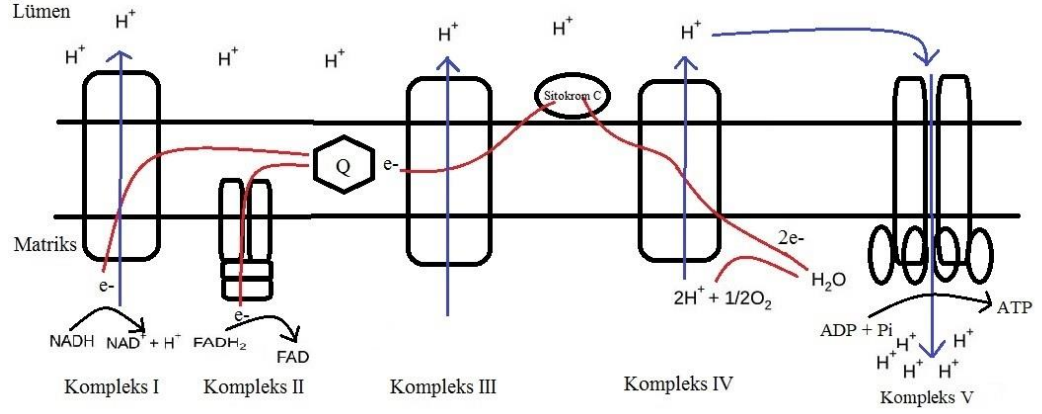
SDH aktivitesinin, abiyotik stres altındaki rolünün belirlenmesinde son yıllarda yapılan çalışmalar olsa da (Hamilton and Heckathorn., 2001; Gleason et al., 2011; Jardim-Messeder et al., 2015), tuz stresi altında SDH aktivitesinin kısmen inhibe edilmesinin, tuz stresi sırasında ve sonrasında hücredeki redoks değişikliğine etkisi araştırılmamıştır. Bu nedenle çalışmamızda tuz stresi altında SDH aktivitesinin kısmen inhibe edilmesinin, tuz stresi sırasında ve sonrasında (i) büyüme parametrelerine etkisi, (ii) antioksidant sistem üzerindeki etkisi, (iii) hücrel redoksa etkisi ve (iv) bazı markır genler üzerine etkisi araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mitokondriyal Elektron Taşıma Sistemi (ETS) ve Tuz Stresi İlişkisi

Mitokondri, yeşil dokularda kloroplastla birlikte ana enerji kaynağıyken, karanlıkta ve yeşil olmayan dokularda ana enerji kaynağıdır. Mitokondride üretilen enerjinin büyük çoğunluğu ise oksidatif fosforilasyonla ETS'den sağlanır. ETS, kendi içinde 5 protein kompleksi barındırır. Bunlar sırasıyla; kompleks I (NADH dehidrogenaz), kompleks II (Süksinat dehidrogenaz), kompleks III (Sitokrom bc₁ kompleksi), kompleks IV (Sitokrom c oksidaz) ve kompleks V (ATP sentaz)'dir (Sun et al., 2005). Özet olarak, ETS'de ATP üretimi için NADH'ın dehidrasyonu ile kompleks I'den ve süksinat'ın dehidrasyonu ile kompleks II'den gelen elektronlar ile ubiquinon (UQ) indirgenir. Daha sonra elektronlar kompleks III yoluyla sitokrom c'ye aktarılır. Sitokrom c'nin kompleks IV tarafından yükseltgenmesi ve elektronların en son moleküler oksijene aktarılmasıyla su oluşur. Elektronlar aktarılırken, kompleks I, kompleks III ve kompleks IV yoluyla lümene proton pompalanıp bir elektrokimyasal gradient

oluşturulur. Daha sonra protonlar gradient yönüne doğru, kompleks V'ten geçerek hareket ederler. Kompleks V'ten protonların geçişiyle ATP üretilir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 Mitokondriyal elektron taşınım sistemi

Bitkilerdeki mitokondriyal ETS, memeliler ve mayalardaki ETS'den daha karışık ve daha esnektir. Bunun sebebi ise alternatif NAD(P)H dehidrogenazlar ve bir kinol oksidaz olan alternatif oksidaz (AOX)'dır. ETS komplekslerinin aktivitelerinin $MgCl_2$ ve KCl gibi tuzlarla, *in vitro* koşullarda inhibe olabildiği yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Krab et al., 2000). Yüksek NaCl derişimlerinde ise komplekslerin aktiviteleri, protein denaturasyonu ve kompleks alt birimlerinin dağılımları sonucu tamamen inhibe olmaktadır. Dolayısıyla tuz stresi, komplekslerin elektron alma ve iletme hızlarını değiştirebilmektedir. Bu durumda bazı bölgeler aşırı indirgenecek ve O_2 'e sızan elektronlar sonucunda ROS üretimi gerçekleşecektir. Bu durum alternatif oksidaz (AOX)' ın aşırı ifade edildiği *Arabidopsis thaliana* bitkilerinde artan tuz direncini de açıklamaktadır. Yükselen AOX kapasitesi, ubikinon havuzundaki aşırı yüklenmeyi azaltır (Smith et al., 2008).

Tuz stresi altındaki makarnalık buğday (*Triticum durum*) ve arpa (*Hordeum vulgare*) fidelerinden izole edilen mitokondrilerin solunum hızlarında önemli

düşüşler olduğu daha önce yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Bu düşüş makarnalık buğdayda mannitol stresine kıyasla, tuz stresi altındayken çok daha fazladır (Jolivet et al. 1990; Trono et al. 2004; Flagella et al. 2006). Bu da, tuz stresinin iyonik bileşeninin (iyonik toksisite) ETS üzerine etkisinin, ozmotik bileşeninden daha fazla olduğunu gösterir. ETS’de bu inhibisyonun hangi bileşen üzerinden olduğu araştırmaların ana konusu olmuştur. Daha önce tuz stresinin kompleks I’in ve kompleks II’nin aktivitelerini inhibe ettiği ve ısı şoku proteini 22 (Hsp22)’nin kompleks I aktivitesini, uyumlu ozmolitlerin ise kompleks II aktivitesini korudukları ortaya konmuştur (Hamilton et al., 2011). ETS bileşenlerinin tuz stresine karşı duyarlı olmaları ve ETS’den sızan elektronlarla büyük miktarda ROS üretilmediği düşünüldüğünde, ETS’nin tuz stresinin olumsuz etkilerinden korunması ROS üretimini azaltacaktır.

Bitki mitokondrisinde kompleks I ve II’den gelen elektronların taşınabildiği iki ayrı yolak bulunmaktadır. Bunlardan ilki sitokrom yolağı, diğeri ise alternatif yolağıdır. Tuz stresi altındayken sitokrom yolağının aktivitesi düşerken, alternatif yolağın aktivitesi artar veya en azından sabit kalır (Jolivet et al., 1990; Kong et al., 2001; Marti et al., 2011). Bu durum, iyonik strese karşı belirgin işlevsel bir farklılığın da ortada olduğunu göstergesidir. Bu farkın en önemli sebebi, iki yolağın bulundukları ortamlardır. Ubikinon havuzu, zarın içinde çalışır ve iyonik tuzlardan, zar sayesinde korunur. Sitokrom C ise zarlar arası alanda çalışır, zarla elektrostatik olarak etkileşir ve iyonik stresin zararına daha açıktır. Dolayısıyla alternatif yolağı, sitokrom c yolağı sınırlı çalışırken bir baypass mekanizması olarak çalışır.

2.2. Kompleks II (SDH, Süksinat Dehidrogenaz)

Mitokondriyal kompleks II, mitokondride hem matrikste gerçekleşen sitrik asit döngüsünde süksinatın fumarata oksitlenmesini sağlayıp hem de mitokondri iç zarında süksinattan gelen elektronları FAD yoluyla ubikinon havuzuna aktararak elektron taşınım zinciri ve sitrik asit döngüsü arasında bir bağ oluşturur.

SDH, tüm ökaryotlarda 4 alt birimden oluşmaktadır. Bunlar; flavin alt birimi (SDH1), demir-kükürt alt birimi (SDH2) ve hem zara tutunmayı sağlayan hemde ubikinon bağlanma bölgesini bulunduran alt birimlerdir (SDH3-SDH4) (Rutter et al., 2010; Fuentes et al., 2011). SDH'nin ROS üretebildiği erken bir çalışmayla ortaya konmuştur (Yankovskaya et al., 2003). Ancak SDH tarafından üretilen ROS'un sinyal görevinin ortaya konması daha geç olmuştur. İlk olarak Leon et al., (2007) kompleks II'nin (*sdh1-1*) flavoprotein mutantlarında vejetatif safhada ve çiçeklenme safhasında bitkide bir farklılık olmadığını, tohum oluşturma döneminde, yaban tipe göre %33 daha az ve kısır tohum üretimi görüldüğünü bildirmiştir. Başka bir çalışmada *sdh1-1* mutantlarında ve RNAi yoluyla SDH1-1 miktarı azaltılmış bitkilerde normal koşullarda, yaban tipe göre daha fazla büyüme görülmektedir (Fuentes et al., 2011). Ayrıca *sdh1-1* mutantlarında stoma büyüklüğü ve sayısı arttığı için stoma iletkenliği artmakta ve henüz belirlenemeyen bir mekanizmayla artan CO₂ alınımla birlikte fotosentetik hız artmaktadır. Ancak tohum oluşturma safhasında Leon et al. (2007)'ın bulgularına benzer şekilde oluşan tohumların %60'ı mutant alleli taşımakta ve %33 daha az tohum oluşturmaktadır (Fuentes et al., 2011). Başka bir çalışmada *Arabidopsis thaliana* bitkilerinde bir T-DNA mutasyonu sonucunda, salisilik asit uygulamasıyla görülen GSTF8 aktivitesinin eksik olduğu görülmüştür ve bu mutasyona “disrupted stress response 1” (*dsr1*) adı verilmiştir. *dsr1* bitkilerinde DNA dizilemesinin ardından mutasyonun SDH'nin SDH1 alt biriminde olduğu görülmüştür. Bu mutasyon sonucunda *dsr1* bitkilerinin stres altında daha az mitokondriyal ROS ürettikleri, fungal ve virulent patojenlere karşı daha savunmasız olduklarının görülmesi ve bunun sebebi olarak GSTF8'in ifadesindeki azalma yüzünden virulent patojen enfeksiyonlarına karşı yanıtsızlık gösterdiğini ortaya koymuştur (Gleason et al., 2011). Diğer bir çalışmada ise SDH'nin ürettiği aşırı ROS, hücre bölünmesiyle ilgili siklin (*CYC*) genleri, siklin bağımlı kinaz (*CDK*) genlerini ve histon 4 (*H4*) geni ifadelerini azaltarak bitki kök ve gövde

gelişimini inhibe edebiliyor. Ayrıca yarışmacı bir inhibitör olan malonat uygulaması ile SDH kökenli ROS üretimi azaltıldığında GST sınıfı genlerden *GSTF5* ve *GSTF10* ifadesinin de azaldığı görülmektedir (Jardim-Messeder et al., 2015). Bu sonuçlardan da görülebileceği gibi SDH kökenli ROS'ların hem büyüme ve gelişme üzerinde hemde stres yanıtlarının düzenlenmesinde önemli rolü vardır.

2.3. Mitokondriyal ROS (mtROS) ve Üretim Yolakları

Bitki hücrelerinde reaktif oksijen türleri (ROS) diyerek tanımladığımız moleküller; süperoksit ($O_2^{\bullet -}$), ozon (O_3), hidrojen peroksit (H_2O_2), tekli oksijen (1O_2) ve hidroksil radikali ($OH^{\bullet}$)dir (Millar et al., 2010; Huang et al., 2016). Bitki mitokondrisinde ozon ve singlet oksijen radikallerinin üretimine dair güvenilir bilgi yoktur ve hidroksil radikalının çok kısa yarılanma ömrü sebebiyle, bu radikalın hedef bir bileşikle etkileşerek sinyal iletiminde görev alması zordur. Bu durum, süperoksit ve hidrojen peroksit radikallerini mitokondride üretilip sinyal görevi görebilen ROS'lar olarak görebilmemizi sağlar. Süperoksit, oksijenin 1 elektronla indirgenmesi sonucu oluşur. Mitokondriyal kompleks I, II ve III önemli süperoksit üretim yerleridir ancak hepsi farklı üretim hızları ve düzeni gösterirler. Bitki çalışmaları, mitokondriyal ROS'un üretilme şekli hakkında bir fikir verse de (Gleason et al., 2011; Jardim-Messeder et al., 2015), detaylı tüm bilgiler memelilerde yapılan çalışmalardan gelmektedir (Li et al., 2003; Guzy et al., 2006; Quinlan et al., 2012). Süperoksit radikali hücrede normal metabolik koşullar altında üretilmektedir. Stres altında veya solunumun herhangi bir etmenden etkilendiği durumlarda, örneğin; azalan ADP miktarı veya elektron taşınım sisteminin (ETS) inhibe olması gibi, süperoksit radikali üretim hızı büyük miktarlarda artmaktadır.

Mitokondriyal ETS tarafından süperoksit üretimi, mitokondriyal ETS'yi ve oksidatif fosforilasyonu baypas edebilen yollarla sınırlandırılabilir. Uncoupling proteinleri (UCP) zardan proton sızıntıları oluşturabilir veya NADH

dehidrogenazlar ve alternatif oksidazlar (AOX) kompleks I, III ve IV'deki elektron taşınımıyla gerçekleşen proton pompalanmasını engelleyip, zarı aşırı yüklenmekten korurlar. UCP1'in tütün bitkisinde aşırı ifade ettirilmesiyle bitkide ROS üretiminin azaldığı, antioksidan savunma sisteminin uyarıldığı ve çeşitli abiyotik streslere karşı direncin arttığı belirlenmiştir (Barreto et al., 2014).

Süperoksit kendiliğinden hidrojen peroksit ve oksijene indirgenebilir. Ancak bu tepkime mitokondriyal mangan süperoksit dismütaz (MnSOD) varlığında çok daha hızlı gerçekleşir. Alternatif olarak süperoksit, nitrik oksit gibi diğer radikallerle veya diğer proteinlerin redoks aktif merkezi metal gruplarıyla tepkimeye girebilir. Bu tepkimeler biyomoleküllerle olan tepkimelerden daha fazla gerçekleşir. MnSOD enzimin miktarının azaltılması normal koşullar altında dahi kök büyümesinde azalmaya ve matriksteki tiol redox dengesinin bozulmasına neden olur (Morgan et al., 2008).

Özellikle kompleks I ve kompleks III, üretilen ROS'un sinyal görevleri olduğu daha önce yapılan çalışmalarla oraya konmuştur. Bitkilerde kompleks I'in ürettiği ROS'un görevi tam olarak henüz bilinmemekle birlikte, Li et al., (2003)'ün bulgularına göre insanlarda mitokondri kompleks I'de aşırı ROS üretimi hücreyi apoptozise sürüklemektedir. Kompleks I dışında başka bir ROS üretim yeri olan kompleks III'te (sitokrom bc₁ kompleksi) üretilen ROS'un ise insanlarda hipoksia (O₂ yetersizliği) yanıtlarında anahtar rol alıp, bir transkripsiyon faktörü (HIF- α) üzerinden gen ifadesinde değişikliklere sebep olduğu bilinmektedir (Guzy et al., 2006).

2.4. Tuz Stresi ve Mitokondriyal ROS ilişkisi

Artmış ROS üretimi, tüm abiyotik streslerin ortak bir etkisi olarak düşünülür ve bir çok çalışma tuz stresi altında hücrede ROS seviyesinin arttığını belirtmektedir (Borsani et al., 2001; Schwarzlander et al., 2009). Mitokondri,

ETS'deki sızıntılarla, hücrede önemli miktarda ROS üretir. Bunun dışında mitokondriyal redoks durumu, diğer organellerdeki antioksidan kapasiteyi de düzenleyebilmektedir (Dutilleul et al., 2003; Morgan et al., 2008). Tuz stresi altında mitokondriyal ROS üretiminin artmasından tuzluluğun ozmotik bileşeni değil, iyonik bileşenin sorumlu olduğuna dair kanıtlar bulunmaktadır. Çünkü indirgenme-yükseltgenmeye hassas yeşil floresan protein (GFP) miktarı, mannitol stresine göre tuz stresi altında daha fazladır (Schwarzlander et al., 2009).

Literatürde, Arabidopsis'in mitokondri yapısı ve işlevinin, tuz direnci mekanizmaları açısından önemli olduğuna dair birçok yayın bulunmaktadır. (Wang et al., 2004; Smith et al., 2009). Dahası, tuza dirençli genotiplerin, hassas olanlara göre daha güçlü bir mitokondriyal antioksidan savunmaya sahip olduklarına ve tuz stresinin mitokondriyal antioksidan savunma sistemini tetiklediğine dair çok değerli kanıtlar bulunmaktadır. Biri dirençli diğer hassas olan iki buğday varyetesiyle yapılan bir deneyde, tuza dirençli olan varyetede MnSOD'un bir izoformunun özellikle yüksek düzeyde ifade olduğu, AOX'un ise normal koşullar altında bile daha yüksek düzeyde bulunduğu ve hassas varyetede bu iki durumun da görülmediği ortaya konulmuştur (Jacoby et al., 2010).

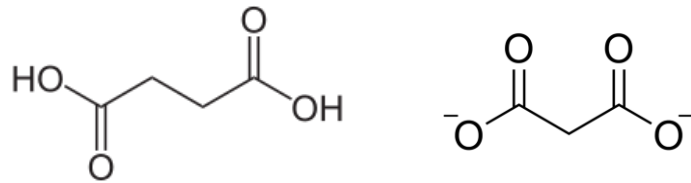
Mitokondriyal antioksidan savunma ve tuz direnci arasındaki bağlantının bir açıklaması; sağlam bir mitokondriyal ROS savunmasının stres altında solunum zincirinde daha güçlü bir elektron akışı ile açıklanabilir. Bu açıklama ROS'un belirli mitokondriyal proteinlere hasar verdiği ve tuz stresi sırasında iyon atılması, ozmotik dengelenme ve vakuolde depolama için büyük miktarlarda ATP gerektiği gerçekleriyle desteklenmektedir (Verniquet et al., 1991; Sweetlove et al., 2002).

Tuz stresi altında düşmüş solunum hızları genellikle bütünlüğü bozulmamış dokularda ve izole mitokondrilerde ölçülmektedir ve ROS hasarının bu düşüşlere etkisi çok olasıdır. Dolayısıyla sağlam bir antioksidan savunma, bu tür azalmaların önüne geçebilir.

Tuz stresi direnci ve mitokondriyal ROS savunması arasındaki güçlü bağın göstergelerinden biri de; mitokondride üretilen ROS sinyallerinin, tüm bitkinin ROS kapasitesini ve tuz stresi altında hücre ölümü veya hayatta kalma sinyallemesini yönetmesidir. Mitokondriyal retrograd sinyallemesi çalışmaları kesin olarak ortaya koymuştur ki kompleks I, MnSOD ve Hsp22 gibi önemli mitokondriyal proteinlerdeki bozulmalar diğer organelleri de etkilemektedir (Dutilleul et al., 2003; Morgan et al., 2008; Rhoads et al., 2005). Tuz stresi ve ozmotik stres, H_2O_2 'ye yanıt verebilen gen grubunun içinde farklı transkripsiyonel yanıtlar ortaya çıkarlar (Miller et al., 2010). Bu durum, tuz stresinin iyonik bileşeninin kendine özgü bir ROS parmakızı olduğunu gösterir. Mitokondrinin, hücresel H_2O_2 ve O_2^- havuzuna katkısı kesin olarak ölçülemez ancak ROS hasarına uğramış mitokondriyal proteinlerden elde edilen peptitler, özel retrograd sinyalleri nükleusa taşıyabilirler (Moller and Sweetlove 2010). Dolayısıyla, tuz stresi altında miktarı değişen proteinlerin listesi, bize tuz stresine özel, peptidler şeklinde retrograd sinyaller oluşturmak için parçalanmış aday proteinler hakkında bilgi sağlayabilir.

2.5. Malonat

Malonat, SDH'nin substratı olan süksinatın yapısal bir analogudur (Şekil 2.2).



Şekil 2.2 Süksinat (solda) ve malonat (sağda).

Malonat ayrıca bir SDH inhibitörüdür ve substratla, enzimin aktif merkezine bağlanmak için yarışır. Enziminin aktif merkezine bağlandığında ise SDH'nin doğal substratına bağlanmasını engeller. Enzimin elektron almasını engelleyip, onu yükseltgenmiş halde tutar. Böylece SDH kaynaklı ROS üretimini azaltmış

olur. Düşük dozlarda (100 μ M) oksijen tüketimini azaltmadan ROS üretimini azaltabilirken, yüksek dozlarda (500 μ M ve üzeri) hücrenin oksijen tüketimini çok fazla azalttığı için hücrenin ve bitkinin ölümüne neden olur.

Tuz stresi sırasında ve sonrasında SDH'nin aktivitesinin inhibe edilmesinin (i) bitki büyüme ve gelişmesine, (ii) hücrel redoks düzenlenmesine, (iii) hücrel antioksidan kapasitesine etkileri hakkında literatürde bir bilgi bulunmamaktadır. Bu nedenle çalışmamızda model bitki olan *Arabidopsis thaliana*' da;

- 1- Tuz stresi (50 mM ve 100 mM NaCl) sırasında 100 μ M malonat uygulamasıyla SDH aktivitesi inhibe edilen bitkilerde büyüme parametrelerindeki ve antioksidan kapasitesindeki değişim belirlenerek kompleks II kaynaklı mitokondriyal ROS üretiminin tuz stresi sırasında bitki performansına etkisinin ortaya konması amaçlanmıştır.
- 2- Tuz stresi sonrasındaki iyileşme sürecinde 100 μ M malonat uygulanmasıyla büyüme parametrelerindeki ve antioksidan kapasitesindeki değişimlerin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu amaçlara uygun olarak 14 günlük *A. thaliana* bitkilerine, 7 gün boyunca 50-100 mM NaCl uygulaması ve bu grupların 100 μ M malonat ile kombinasyonları uygulanmıştır. İyileşme (recovery) denemesinde ise tuz stresinin iyileşmesi amacıyla 7 gün boyunca bir grup bitki normal koşullara alınmış olup diğer gruba ise sadece malonat uygulanmaya devam edilmiştir. Denemeler sonrası hasat edilen bitkilerde büyüme parametreleri ve antioksidan enzim (süperoksit dismutaz (SOD) , katalaz (CAT), peroksidaz (POX), askorbat peroksidaz (APX)) aktiviteleri ile NADPH oksidaz aktivitesi, prolin miktarı, lipid peroksidasyonu miktarı parametreleri belirlenmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Tohumların Temini

Çalışmamızda, kendi tohum stoğumuzda bulunan *Arabidopsis thaliana* (Col) ve Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC)'den temin edilen kompleks II (süksinat dehidrogenaz) SDH1 alt birimi mutantı bitkiler kullanılmıştır.

3.2. Tohumların Sterilizasyonu

Tohumlar %70 etanol' de yüzey sterilizasyonuna 1 dk. maruz bırakıldıktan sonra 5 kez steril deiyonize su ile yıkandı. Sonrasında ise 10 dk. % 4 sodyum hipoklorit çözeltisi ile yüzey sterilizasyonuna maruz bırakıldıktan sonra 5 defa steril deiyonize su ile yıkanması gerçekleştirildi.

3.3. Tohumların Ekimi

Tohumlar ½ güçte Hoagland besin çözeltisi bulunan hidroponik ortam içeren, siyah renkli tanklarda, ortalama 21°C sıcaklıkta ve 12 saat aydınlık/12 saat karanlık şeklinde ışık gören sera koşullarında yetiştirilmiştir.

3.4. Bitkilerin Yetiştirilmesi ve Deneme Deseni

Tuz stresi için 100 mM NaCl, enzim inhibisyonu için ise 100µM malonat uygulanmıştır. 2.haftanın sonundan itibaren, 4.haftanın sonuna kadar 7 günde bir kök ve yaprak örnekleri alınmıştır. Alınan örnekler analiz için -80°C'de saklanmıştır.

C	Kontrol
50N	50 mM NaCl
100N	100 mM NaCl
100M	100 µM malonat
50N+100M	50 mM NaCl+100 µM malonat
100N+100M	100 mM NaCl+100 µM malonat

Şekil 3.1 Deneme desenindeki gruplar

3.5. Fizyolojik Parametreler

3.5.1. Büyüme parametreleri

Tuzluluk uygulamasından sonra her gruptan rastgele 4 bitki seçilip bu bitkilerin gövde ve köklerinin boyları cetvelle ölçülecek ve yaş ağırlıkları belirlenecektir.

3.5.2. Bağlı büyüme hızı (RGR)

Tuzluluk uygulamasından sonra her gruptan rastgele 4 bitki seçilecek ve bu bitkilerin gövde ve kök yaş ağırlıkları belirlenecektir. Bu örnekler sonra 70°C'de 72 saat etüvde bekletilecek ve sonrasında kuru ağırlıkları belirlenecektir.

3.5.3. Bağlı su içeriği (RWC)

Tuz stresi uygulanan bitkilerin her grubundan yaklaşık eş boyutlarda yapraklar alınarak yaş ağırlıkları ölçülecek ve sonrasında 6 saat deiyonize suda bekletilip turgorlu hale gelmeleri sağlanacaktır. Tartılan yaprak örnekleri daha sonra 70°C'de etüvde 72 saat bekletilip kurutulacak ve kuru ağırlıkları belirlenecektir. Tüm gruplara ait örneklerin bağlı su içerikleri aşağıdaki formüle göre belirlenecektir:

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

3.6. Biyokimyasal Parametreler

3.6.1. Lipid peroksidasyonu

Yapraklardaki lipid peroksidasyonu Madhava Rao ve Sresty (2000)' e göre tiobarbitürik asit reaktif maddeleri (TBARS) içeriği belirlenerek ölçülmüştür. TBARS 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 TBARS miktarı belirlenir. TBARS miktarı hesaplanırken ekstinksiyon katsayısı 155 mM⁻¹ cm⁻¹ kullanılmıştır.

3.6.2. Antioksidan 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 veya kök örneği 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 mM dithiothreitol (DTT)) homojenize edilmiştir. Askorbat peroksidaz aktivitesi analizi için homojenizasyon tamponuna 5 mM askorbik asit eklenmiş ve DTT yerine %2 (w/v) PVPP kullanılmıştır. Homojenizasyonun ardından örnekler 10000 g' de 5 dk. santrifüj edilmiştir. Bu aşamadan sonra elde edilen süpernatantlar protein miktarı ve enzim aktivitesi belirlenmesinde kullanılmıştır. Analizler sırasında örneklerin tekrar tekrar donup çözülmesini engellemek için elde edilen süpernatant ayrı ependorflara pay edilerek saklanmıştır.

3.6.3. Protein miktarının belirlenmesi

Protein miktarı Bradford (1976)' a göre belirlenmiştir. Ölçüm Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının asidik şartlarda proteine bağlandığında kırmızı ve/veya yeşil formundan maviye dönüşmesine dayanmaktadır. Bu mavi renk oluşumu 595 nm' de ölçülmüştür. 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.

3.6.4. Katalaz (CAT) enzim aktivitesinin belirlenmesi

Katalaz (CAT (EC 1.11.1.6)) aktivitesi, Bergmeyer (1970)' e göre H₂O₂ ' nin süpürülmesinin 240 nm' de absorbansda yol açtığı azalmanın izlenmesi ile tespit edilmiştir. Reaksiyon karışımı 0.1 mM EDTA ve %3 H₂O₂ içeren 50 mM

sodyum fosfat (pH 7,0) tamponudur. Enzimin, 1 mg total protein başına dakikada süpürdüğü $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ miktarı, 1 U ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ mg protein}^{-1} \text{ min}^{-1}$) olarak hesaplanmıştır.

3.6.5. Peroksidaz (POX) enzim aktivitesinin belirlenmesi

Peroksidaz (POX (EC 1.11.1.7)) aktivitesi Herzog ve Fahimi (1973)'e göre belirlenmiştir. 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 ($\mu\text{mol DAB mg protein}^{-1} \text{ min}^{-1}$) olarak hesaplanmıştır.

3.6.6. NADPH oksidaz (NOX) aktivitesinin belirlenmesi

NADPH oksidaz aktivitesi Jiang and Zhang (2002)'ye göre belirlenmiştir. Reaksiyon karışımı 50 mM Tris-HCl tamponu (pH 7.5), 0.5 mM XTT, ve 100 μM NADPH içermektedir. 470 nm'de XTT'nin redüksyonu izlenmiştir. Reaksiyon dışı oluşabilecek renk değişiminin belirlenmesi için 50 U SOD kullanılmıştır. $\text{O}_2^{\cdot-}$ üretimi $2.16 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ekstinksiyon kat sayısı kullanılarak hesaplanmıştır.

3.6.7. Askorbat peroksidaz (APX) enzim aktivitesinin belirlenmesi

Askorbat peroksidaz (APX (EC 1.11.1.11)) aktivitesi Nakano and 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 29 dakikada oksitlediği askorbat miktarı, 1 U (μmol askorbat mg protein⁻¹ min⁻¹) olarak hesaplanmıştır.

3.6.8. Antioksidant enzimlerin izoenzim tayini

Örneklerden elde edilen protein ekstraktları denaturasyona sebep olmayan koşullarda (SDS içermeyen) poliakrilamid jel elektroforezinde (Native-PAGE) ayrılmış ve araştırılan enzimlere özel boya solüsyonlarıyla boyanmıştır. Örneklerin hazırlanmasında aktivite analizlerinde kullanılan ekstraksiyon prosedürü kullanılmıştır. Native-PAGE Laemmli (1970)'e göre SDS kullanılmadan yapılmıştır.

Jeller Vilbert Lourmat jel görüntüleme sisteminde görüntülenmiş ve Bio-Capt yazılımı kullanılarak bant yoğunlukları analiz edilmiştir.

3.6.9. Süperoksit dismutaz (SOD) izoenzim tayini

Örnekler %12.5' lik ayırma (separating) ve %4' lük hizalama (stacking) jelinde elektroforetik ayırma maruz bırakılmıştır. Her kuyucuğa çimlenen embriyolar için 20 μg ve çimlenmeyen embriyolar için 40 μg protein yüklenmiştir. SOD boyaması, Beauchamp ve Fridovich'e (1971) göre 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 sebep olur. 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 beklenmiştir.

SOD' un izoenzim tipleri Vitória *et al.* (2001)' e göre boya solüsyonuna inhibitörler eklenerek belirlenmiştir. Cu/ZnSOD inhibisyonu için 2 mM KCN, Cu/ZnSOD ve FeSOD inhibisyonu içinde 3 mM H₂O₂ kullanılmıştır. MnSOD aktivitesi her iki inhibitörden de etkilenmemektedir.

3.6.10.Peroksidaz (POX) izoenzim tayini

Proteinlerin ayrımı için %10' luk ayırma jeli ve %4' lük hizalama jeli kullanılmıştır. Her kuyucuğa 20 µg protein yüklenmiştir. POX izoenzimlerinin boyanması Seevers *et al.* (1971)' e göre yapılmıştır. Boya solüsyonu 1.3 mM DAB ve %3 H₂O₂ içeren 200 mM sodyum asetat tamponudur (pH 5.0). Boyama peroksidaz enzimlerinin bulunduğu bölgelerde DAB'ın oksitlenmesi ile kahverengi bantlar oluşması ile gerçekleşir. Elde edilen jeller %7' lik asetik asitte fikse edilmiştir.

3.6.11.H₂O₂ miktarı tayini

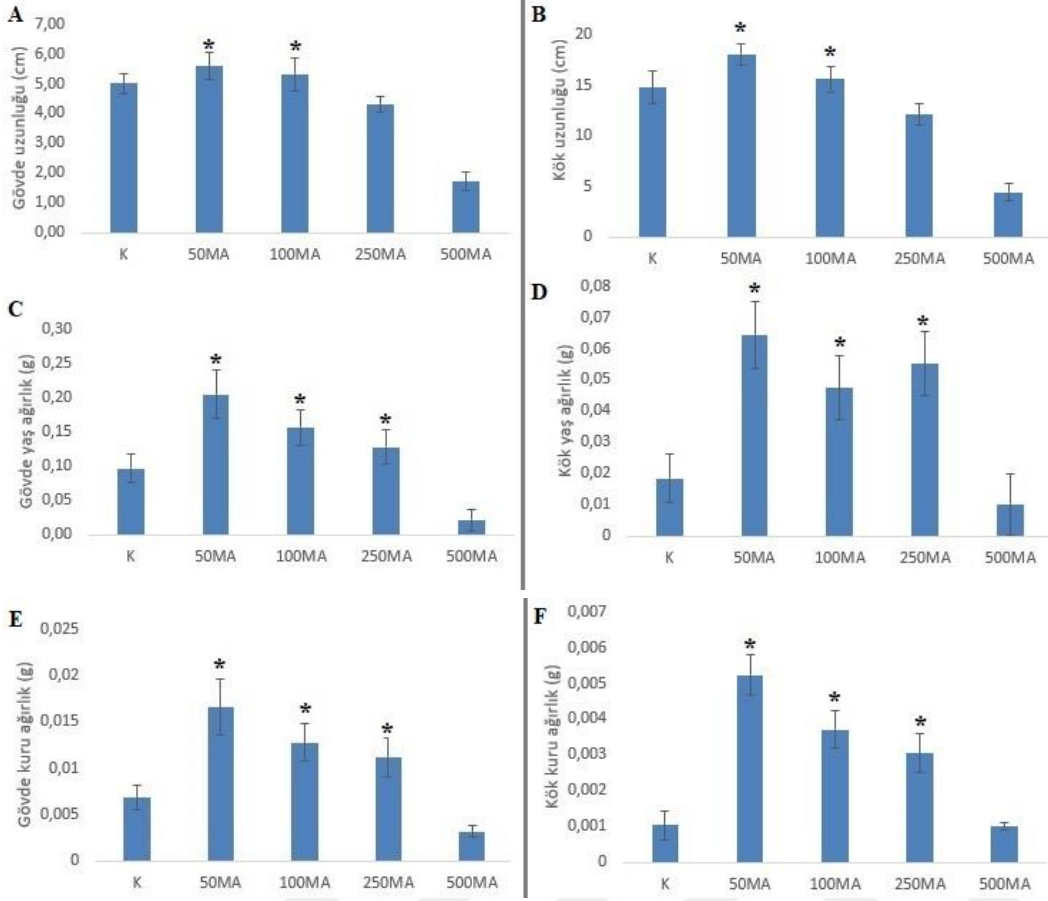
H₂O₂ miktarı Cheeseman (2006)'nın yöntemine göre bazı değişiklikler yapılarak belirlenmiştir. Standart H₂O₂ analizinde 25 mM H₂SO₄ (Sülfirik asit) içinde; 100 µM D-Sorbitol, 250 µM ferrous amonyum sülfat (Amonyum demir(II) sülfat heksahidrat) ve 100 µM xilenol orange çözülmeştir. Bu yöntemde içinde ferrous amonyum sulphate/xilenol orange bulunan eFOX tamponuna %1 etil alkol (EtOH) eklenmiştir. Analizde kullanılacak örnekler analize kadar sıvı azot içinde muhafaza edilmiştir. Eğer örnekler, -80 °C veya -20 °C derecede saklanırsa H₂O₂ miktarında kısa sürede çok büyük (%60) kayıplar görülebilmektedir (Cheeseman, 2006). 0,1 g yaprak örneği sıvı azotla toz haline getirilip sonra soğuk aseton (-20 °C) ile hazırlanmış 25 mM H₂SO₄ ile homojenize edilmiştir. Homojenatlar 4000 g' de 4 °C' de 5 dk. santrifüj yapılmıştır. Elde ettiğimiz süpernatanttan 50 µl alınıp, üstüne 1 ml eFOX tamponu eklenmiştir. Elde edilen karışım en az 15 dakika bekletildikten sonra 550 ve 800 nm dalga boyunda absorbans ölçölüp, sonuçlar absorbansların farkı alınarak bulunur.

4. BULGULAR

4.1. Fizyolojik Parametreler

4.1.1. Uygun malonat derişimi

Deneylerimizde, 0 μM , 50 μM , 100 μM , 250 μM , 500 μM ve 1 mM derişimlerde malonat uygulanmış bitkilerde, büyüme parametreleri ölçüldüğünde; 50 μM malonat (50MA grubu) derişiminde, kontrol grubuna göre büyümede artış görülmüştür (Şekil 4.1.A-F). Büyümedeki artış gövde yaş ağırlığında 2 kat (Şekil 4.1.C), kök yaş ağırlığında ise 3 kattan fazladır (Şekil 4.1.D). Bu farklar gövde kuru ağırlığında 3 kat, kök kuru ağırlığında ise 5 kattır (Şekil 4.1.E ve .F). İnhibitör derişimi 100 μM 'a (100MA grubu) çıkarıldığında ise kontrol grubuna göre gövde uzunluğundaki artış önemsizken (Şekil 4.1.A), gövde yaş ağırlığında %60 artış görülmüştür (Şekil 4.1.C). Aynı grupta, gövde kuru ağırlığında ise %87 artış görülmüştür (Şekil 4.1.E). Kök boyundaki artış önemsizken (%5), kök yaş ağırlığında 1.5 kat, kök kuru ağırlığındaki artış ise 3 kattır. Malonat derişimini 250 μM 'a (250MA grubu) çıkarıldığında gövde boyunda %14 azalma görülürken gövde yaş ağırlığında %30, gövde kuru ağırlığında %64 artış görülmüştür. 250 μM malonat uygulanan bitkilerde, kök boyunda %18'lik bir azalma görülürken (Şekil 4.1), kök yaş ağırlığında 2 kat, kök kuru ağırlığında 1.9 katlık bir artış görülmektedir (Şekil 4.1). Uygulanan derişim 2 katına çıkarıldığında ise (500 μM , 500MA grubu) tüm büyüme parametrelerinde önemli düşüşler görülmüştür (Şekil 4.1). Bu sonuçların ışığında, daha sonraki denemelerde büyümeyi inhibe etmeyen en yüksek konsantrasyon olan 100 μM malonat kullanılmasına karar verilmiştir.

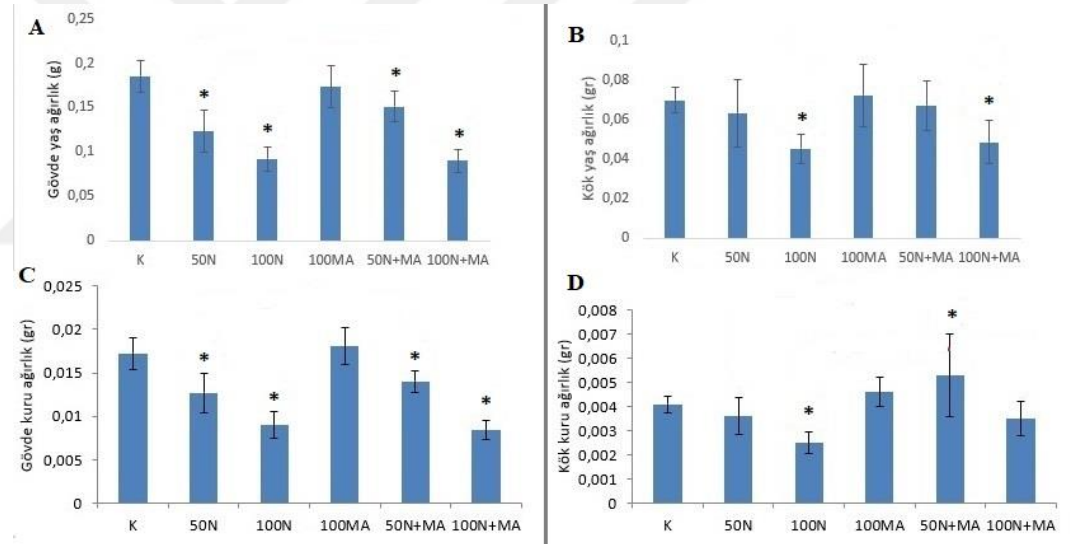


Şekil 4.1 Farklı derişimlerde malonat (MA) uygulanmış uygulama gruplarının fizyolojik parametreleri. Uygulama grupları: (K) Kontrol, (50MA) 50 μM Malonat, (100MA) 100 μM Malonat, (250MA) 250 μM Malonat, (500MA) 500 μM Malonat. (A) gövde uzunluğu, (B) kök uzunluğu, (C) gövde yaş ağırlık, (D) kök yaş ağırlık, (E) gövde kuru ağırlık, (F) kök kuru ağırlık.

4.1.2. Tuz stresi sırasında SDH'nin inhibisyonu

Deneyimizde, tuz stresi sırasında SDH'nin aktivitesindeki azalmanın stres altındaki bitkiye etkilerini görebilmek için, 2 haftalık olan bitkilere 50 veya 100 mM NaCl (50N ve 100N grupları) ve 50 mM NaCl-100 μM malonat (50N+MA) ve 100 mM NaCl-100 μM malonat (100N+MA) kombinasyonları şeklinde uygulama yapılmıştır. 1 haftalık uygulamanın sonucunda NaCl uygulanmış grupların büyüme performanslarında doza bağlı düşüşler gözlenmiştir. Ancak hem malonat hemde NaCl uygulanmış gruplarda kök- gövde yaş ve kuru ağırlıklarda sadece NaCl uygulanan gruplara göre belirgin iyileşmeler belirlenmiştir (Şekil 4.2). Gövde yaş ağırlığında, kontrole göre 50N grubunda %33, 100N grubunda ise %50 düşüş görülürken 100MA grubundaki değişim istatistiksel olarak önemli değildir (Şekil 4.2.A). 50N+MA

grubunda %18'lik bir düşüş görülürken 100N+MA grubunda %52'lik bir düşüş görülmüştür. Gövde yaş ağırlığı 50N grubuna göre 50N+MA grubunda %26 artış gösterirken, 100N grubuna göre 100N+MA grubunda belirgin bir değişiklik görülmemiştir (Şekil 4.2.A). Gövde kuru ağırlıkları ise 50N grubuna göre 50N+MA grubunda %10 artış göstermiştir (Şekil 4.2.C). Kök yaş ağırlığında 50N grubuna göre 50N+MA grubunda değişim istatistiksel olarak anlamsızken, 100N uygulanan grubuna göre 100N+MA grubunda %8 artış gözlenmiştir (Şekil 4.2.B). Kök kuru ağırlığı ise 50N grubuna göre 50N+MA grubunda %47 artış gösterirken, 100N grubuna göre 100N+MA grubunda %40 artış göstermiştir (Şekil 4.2.D).

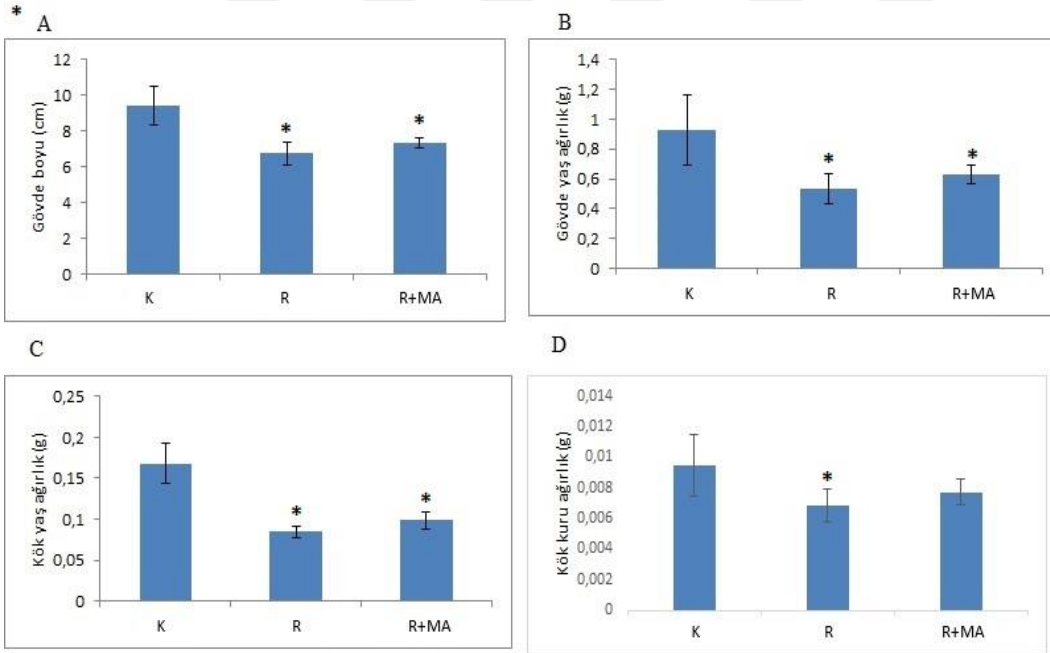


Şekil 4.2 Tuz, malonat ve tuz+malonat kombinasyonları uygulanmış grupların fizyolojik parametreleri. Uygulama grupları: (K) Kontrol, (50N) 50 mM NaCl, (100N) 100 mM NaCl, (100MA) 100 μ M Malonat, (50N+MA) 50 mM NaCl+100 μ M Malonat, (100N+MA) 100 mM NaCl+100 μ M Malonat. (A) gövde yaş ağırlık, (B) kök yaş ağırlık, (C) gövde kuru ağırlık, (D) kök kuru ağırlık.

4.1.3. SDH inhibisyonunun tuz stresi sonrası iyileşme (recovery) sürecine etkisi

Tuz stresi sonrası, ortam koşulları normale döndüğünde bitkiler iyileşme (recovery) dönemine girerler. Bu süreçte hücrenin artık ihtiyacı olmayan büyük bir protein, karbohidrat ve uyumlu ozmolit havuzu vardır. Bu durum, stres altında

biriktirilen tüm bileşiklerin katabolizması sırasında hücrenin üzerinde büyük bir yük oluşturur (Millar et al., 2009). Bu nedenle, deneyimizde iyileşme döneminde SDH'ın malonatla inhibe edilmesinin fiyolojik parametrelere etkisini görmek için, 7 gün boyunca 100 mM NaCl uygulanmış bitkiler, sadece Hoagland besin çözeltisiyle (tuzsuz ortam) (R grubu) ya da Hoagland besin çözeltisi + 100 μ M malonat (R+MA grubu) ile 7 günlük iyileşme dönemine bırakılmıştır (Şekil 4.3). Bu dönemin sonunda; R+MA grubunun gövde boyu, R grubuna göre %8 daha fazla büyüme göstermiştir (Şekil 4.3.A). Gövde yaş ağırlığı R+MA grubunda, R grubuna göre %17 fazladır. (Şekil 4.3.B). Kök yaş ağırlığında R+MA grubunda, R grubuna göre %16 fazla büyüme görülürken (Şekil 4.3.C), kök kuru ağırlığında ise R+MA grubunda, R grubuna göre %12 fazla büyüme kaydedildi (Şekil 4.3.D).



Şekil 4.3 Tuz stresi sonrası iyileşme (recovery) periyotunda SDH inhibisyonunun fiyolojik parametrelere etkisi. Uygulama grupları (K) Kontrol, (R) İyileşme, (R+MA) İyileşme+malonat. (A) gövde boyu, (B) gövde yaş ağırlık, (C) kök yaş ağırlık, (D) kök kuru ağırlık.

4.2. Enzim ve İzoenzim Aktiviteleri

4.2.1. Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi ve izoenzim deseni

NaCl ve NaCl+malonat uygulanan bitkilerde kontrol grubuna kıyasla, sadece 50N grubunda SOD aktivitesi %18 artarken, 100N grubunda %20, 100MA grubunda %26, 50N+MA grubunda %25 ve 100N+MA grubunda %17 azalmıştır. Uygulama gruplarının tamamında SOD aktivitesi kontrol grubundan azdır. 50N grubuna kıyasla 50N+MA grubunda SOD aktivitesinde %36'lık bir düşüş görülmüştür. (Şekil 4.4)

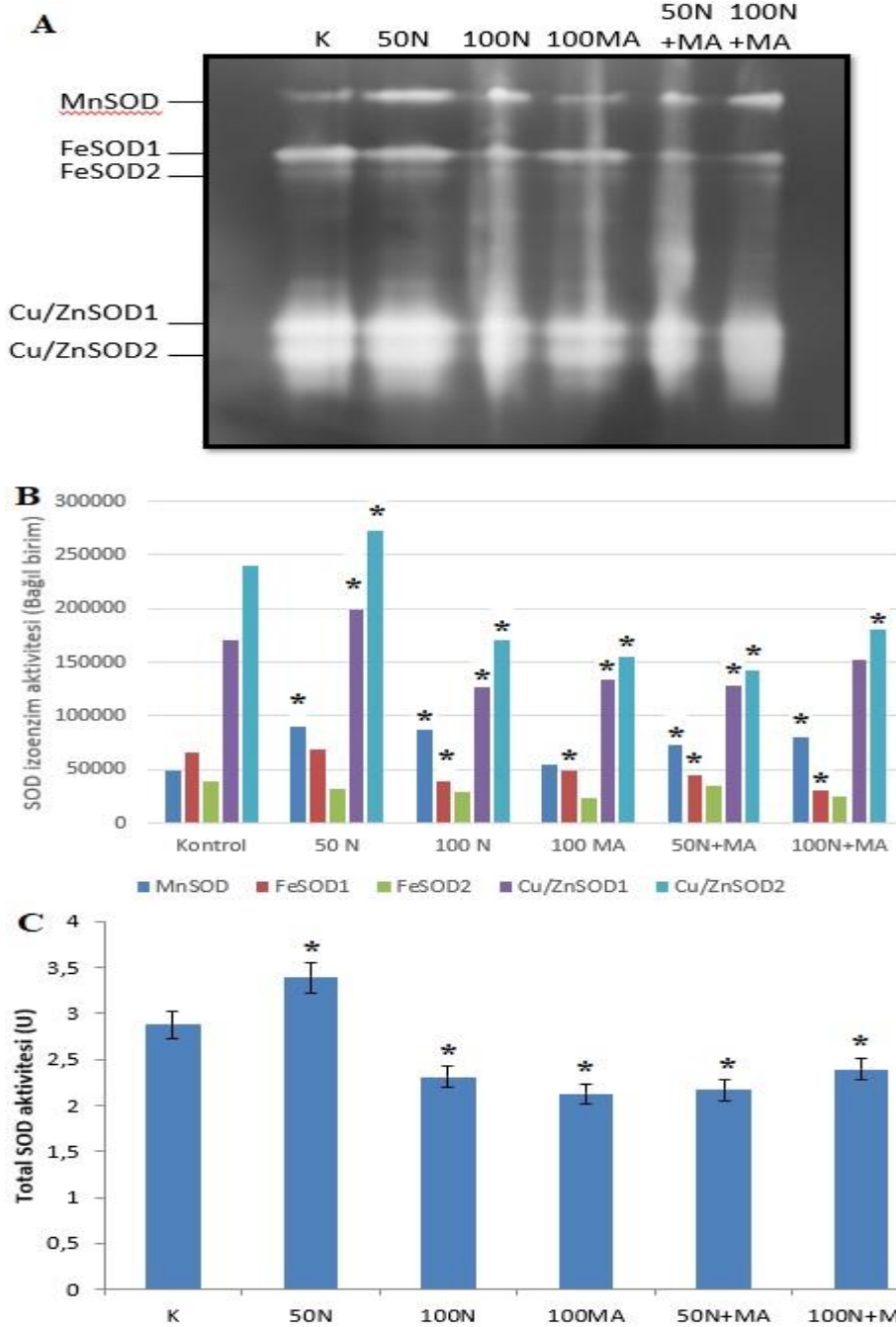
Tüm uygulama gruplarında 1 MnSOD, 2 FeSOD ve 2 Cu/ZnSOD olmak üzere 5 SOD izozimi tanımlanmıştır. MnSOD izozim aktivitesi kontrole göre tüm uygulama gruplarında artmıştır. 50N grubunda %86, 100N grubunda %79, 100MA grubunda %12, 50N+MA grubunda %51, 100N+MA grubunda ise %70 artış görülmüştür.

FeSOD1 izozim aktivitesi, kontrole göre 50N grubundaki değişim istatistiksel olarak önemli değilken, 100N grubunda %40'lık bir düşüş görülmüştür. 100MA grubunda kontrole göre %25'lik bir düşüş görülürken, 50N+MA grubunda %33, 100N+MA grubunda %54'lük bir düşüş kaydedilmiştir. FeSOD1 aktivitesi 50N grubuna göre 50N+MA grubunda %35, 100N grubuna göre 100N+MA grubunda %24 düşmüştür.

FeSOD2 izozim aktivitesinde kontrole göre 50N grubunda %15, 100N grubunda %25, 100MA grubunda %40, 50N+MA grubunda %9 ve 100N+MA grubunda %37 düşüş kaydedilmiştir. FeSOD2 aktivitesinde 50N+MA grubunda, 50N grubuna göre %8 artış gösterirken, 100N+MA grubunda 100N grubuna göre %16 düşüş görülmüştür.

Cu/ZnSOD1 izozim aktivitesi, kontrole göre 50N grubunda %17 artarken, 100N grubunda %26, 100MA grubunda %21, 50N+MA grubunda %25 ve 100N+MA grubunda %11 azalmıştır. Cu/ZnSOD1 aktivitesi 50N+MA grubunda 50N grubuna göre %36 azalırken, 100N+MA grubunda 100N grubuna göre %20'lik bir artış görülmüştür.

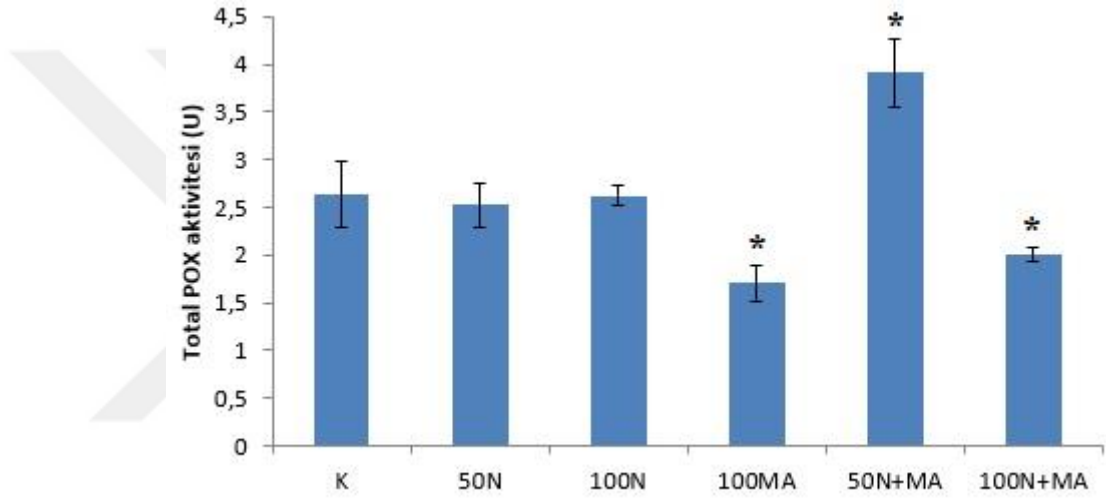
Cu/ZnSOD2 izozim aktivitesi, kontrole göre 50N grubunda %13,5 artarken, 100N grubunda %29, 100MA grubunda %35, 50N+MA grubunda %40,5 ve 100N+MA grubunda %24,5 azalma göstermiştir. Cu/ZnSOD2 aktivitesi 50N+MA grubunda 50N grubuna göre %48 azalırken, 100N+MA grubunda 100N grubuna göre %6,5'lik bir artış göstermiştir.



Şekil 4.4 7 gün uygulama yapılmış gruptaki SOD izozim aktiviteleri, Native-PAGE. Uygulama grupları: Kontrol (K), 50 mM NaCl (50N), 100 mM NaCl (100N), 100 µM Malonat (100MA), 50 mM NaCl+100 µM Malonat (50N+MA), 100 mM NaCl+100 µM Malonat (100N+MA). Her kuyucuk 50µg protein içermektedir. Std: 0.5 U bovine karaciğeri SOD standardı.

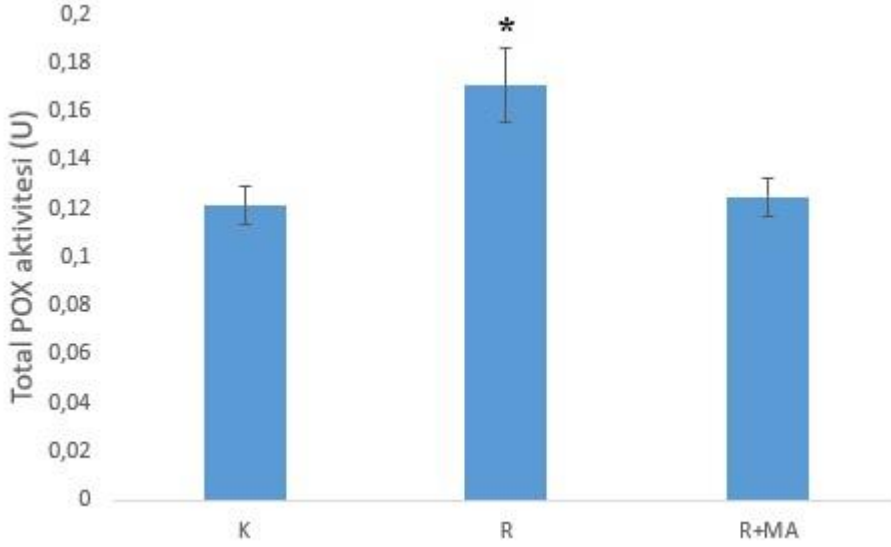
4.2.2. Peroksidaz (POX) aktivitesi

50N ve 100N gruplarında POX aktivitesinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemsiz değişiklikler olmuştur. 100MA grubunda %35'lik bir azalma görülürken, 50N+MA grubunda %49'luk bir artış ve 100N+MA grubunda ise %24'lük bir azalma kaydedilmiştir. POX aktivitesinde 50N+MA grubunda 50N grubuna göre %55'lik bir artış görülürken, 100N+MA grubunda 100N grubuna göre %24'lük bir azalma kaydedilmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5 7 gün uygulama yapılmış gruptaki total POX aktivitesi. Uygulama grupları: Kontrol (K), 50 mM NaCl (50N), 100 mM NaCl (100N), 100 µM Malonat (100MA), 50 mM NaCl+100 µM Malonat (50N+MA), 100 mM NaCl+100 µM Malonat (100N+MA) ($p < 0.05$).

Tuz stresinden sonraki iyileşme (recovery) döneminde bitkilerde POX aktivitesi, kontrol grubuna göre R grubunda %40 artarken, R+MA grubundaki değişim istatistiksel olarak önemsizdir. R+MA grubunda POX aktivitesi R grubuna göre %27 azalmıştır (Şekil 4.6).



Şekil 4.6 (K) Kontrol, (R) İyileşme, (R+MA) İyileşme+malonat gruplarının total POX aktivitesi ($p < 0.05$).

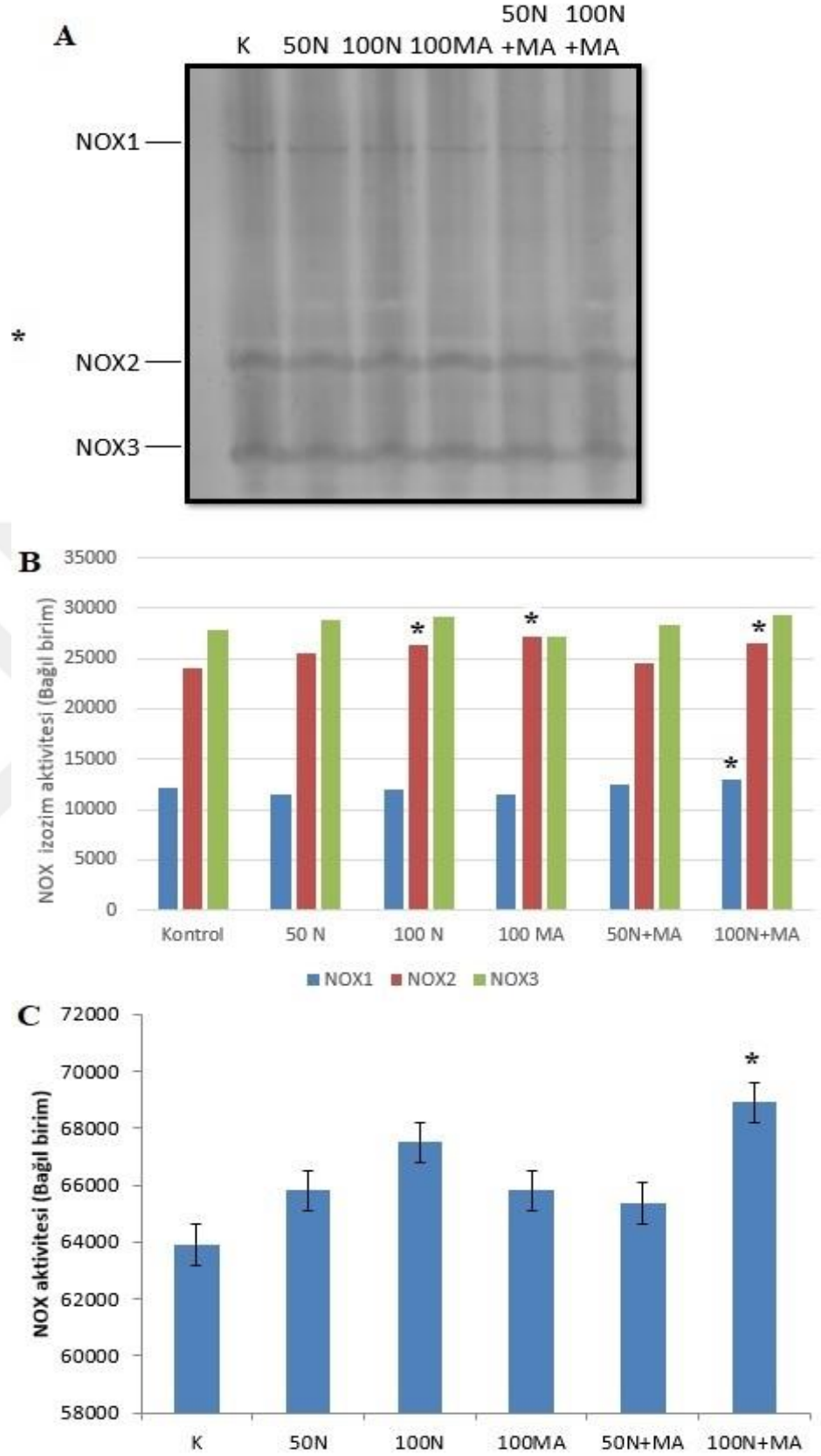
4.2.3. NADPH oksidaz (NOX) aktivitesi ve izozim deseni

Tuz stresi sırasında total NOX aktivitesi tüm uygulama gruplarında, kontrol grubuna göre artış göstermiştir. 50N, 100N, 100MA ve 50N+MA gruplarındaki değişimler istatistiksel olarak önemsizdir. Kayda değer tek artış 100N+MA grubunda %8 olarak görülmüştür (Şekil 4.7.C)

Çalışmamızda 3 adet NOX izozimi belirlenmiştir. NOX1 aktivitesi 50N, 100N ve 100MA gruplarında düşmüş, 50N+MA ve 100N+MA gruplarında artmıştır ancak bu değişimler istatistiksel olarak anlamlı değildir. NOX1 aktivitesi 50N+MA grubunda 50N grubuna göre %8 ve 100N+MA grubunda 100N grubuna göre %8 artış görülmüştür (Şekil 4.7.B).

NOX2 aktivitesinin, kontrol grubuna göre 50N ve 50N+MA gruplarında gösterdiği değişim istatistiksel olarak anlamlı değilken, 100N grubunda %10, 100MA grubunda %13 ve 100N+MA grubunda %10 arttığı görülmüştür. NOX2 aktivitesinin 50N ve 100N gruplarına göre 50N+MA ve 100N+MA gruplarındaki değişimleri istatistiksel olarak anlamsızdır (Şekil 4.7.B).

NOX3 izozim aktivitesinin uygulama grupları arasındaki değişimleri istatistiksel olarak anlamsızdır (Şekil 4.7.B).



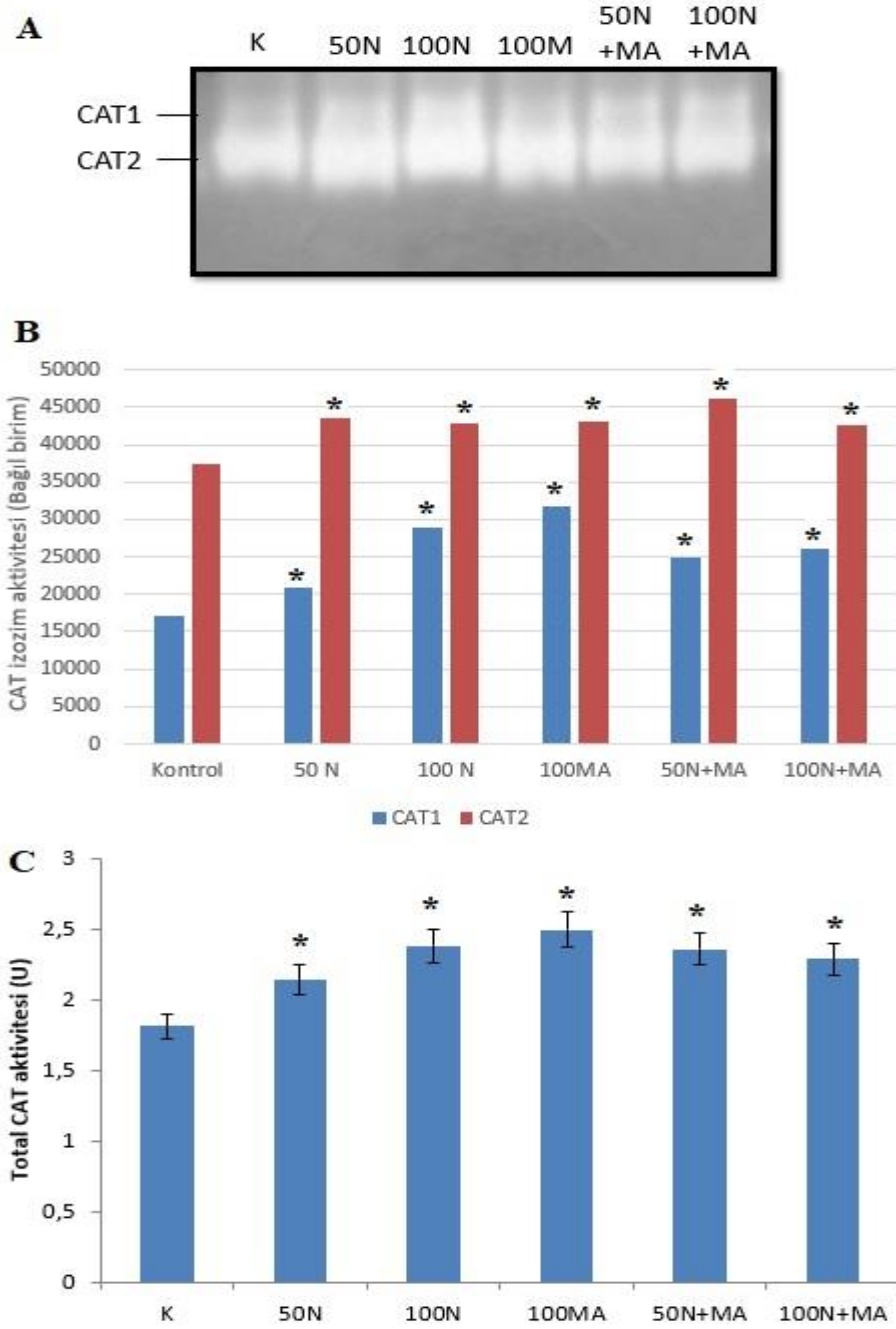
Şekil 4.7 7 gün uygulama yapılmış gruplardaki total NOX ve NOX izozim aktivite, Native-PAGE. Uygulama grupları: Kontrol (K), 50 mM NaCl (50N), 100 mM NaCl (100N), 100 µM Malonat (100MA), 50 mM NaCl+100 µM Malonat (50N+MA), 100 mM NaCl+100 µM Malonat (100N+MA). Her kuyucuk 50µg protein içermektedir.

4.2.4. Katalaz (CAT) aktivitesi ve izozim deseni

CAT aktivitesi, tuz stresi sırasında, tüm uygulama gruplarında artış göstermiştir. 50N ve 100N gruplarında, kontrole göre, %18 ve %32 artış görülmüştür. En büyük artış 100MA grubunda %38 olarak belirlenmiştir. Tuz stresine ek olarak MA uygulanan 50N+MA grubunda sadece sadece tuz stresi verilen 50N grubuna göre %10 artış görülürken, 100N+MA grubundaki 100N grubuna göre değişim istatistiksel olarak anlamsızdır (Şekil 4.8.C).

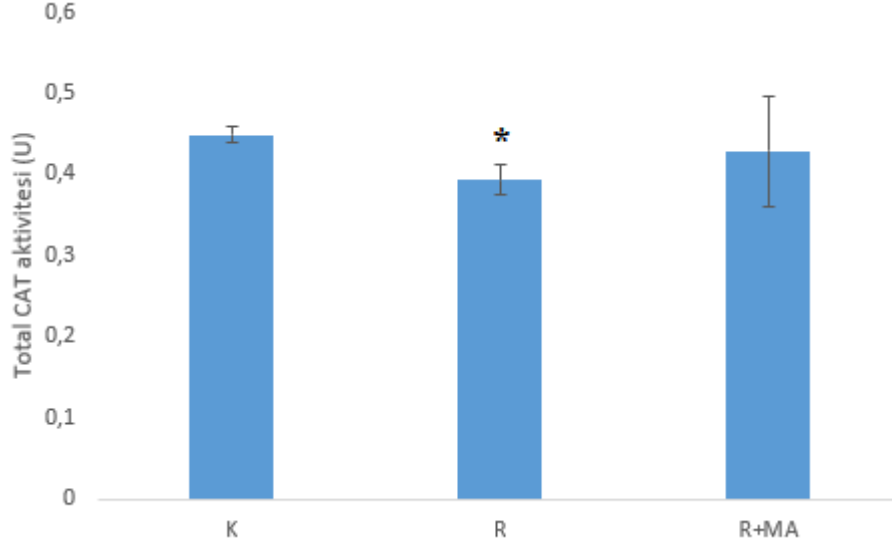
Çalışmamızda 2 adet CAT izozimi belirlenmiştir. CAT1'in tüm uygulama gruplarında, kontrole göre arttığı görülmüştür. Bu artış; 50N grubunda %22, 100N grubunda %69, 100MA grubunda %86, 50N+MA grubunda %45 ve 100N+MA grubunda %53 olarak kaydedilmiştir. Tuz stresine ek olarak MA uygulanan 50N+M grubunda sadece sadece tuz stresi 50N grubuna göre %19 artış görülürken, 100N+MA grubunda ise sadece sadece tuz stresi uygulanmış 100N grubuna göre CAT aktivitesinde %10 azalma görülmüştür (Şekil 4.8.B).

CAT2 izozim aktivitesi tüm uygulama gruplarında, kontrol grubuna göre artmıştır. Bu artış; 50N grubunda %16, 100N grubunda %14, 100MA grubunda %15, 50N+MA grubunda %23.5 ve 100N+MA grubunda %14'tür. CAT2 aktivitesinin sadece tuz uygulanmış 50N ve 100N gruplarına göre 50N+MA ve 100N+MA gruplarındaki değişimleri istatistiksel olarak anlamsızdır (Şekil 4.8.B)



Şekil 4.8 7 gün uygulama yapılmış gruplardaki CAT izozim ve total CAT aktiviteleri, Native-PAGE. Uygulama grupları: Kontrol (K), 50 mM NaCl (50N), 100 mM NaCl (100N), 100 μ M Malonat (100MA), 50 mM NaCl+100 μ M Malonat (50N-MA), 100 mM NaCl+100 μ M Malonat (100N-MA). Her kuyucuk 50 μ g protein içermektedir. ($p<0.05$).

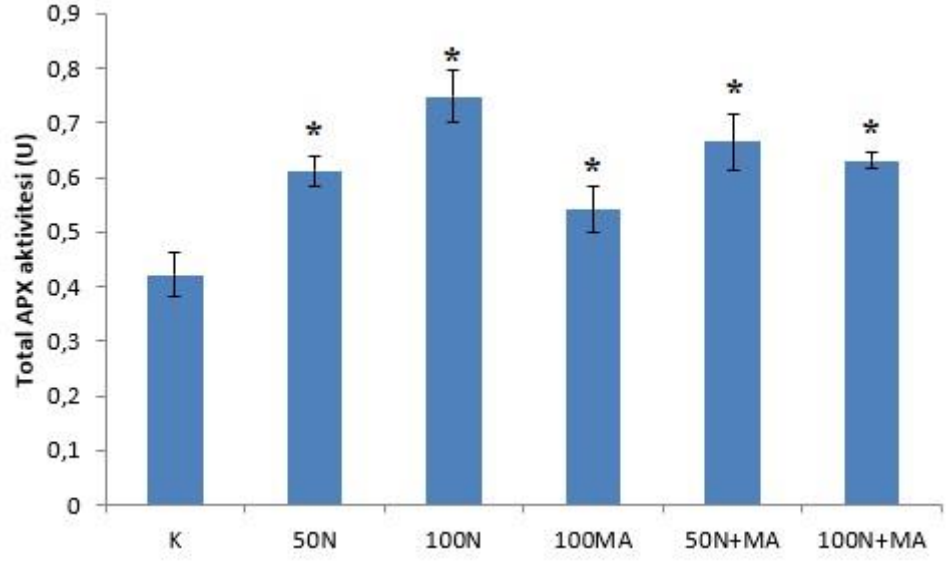
Tuz stresi sonrası iyileşme döneminde ise, R grubunda CAT aktivitesi kontrol grubuna göre %13 azalmıştır. İyileşme periyotuna ek olarak 100 μ M MA uygulanan R+MA grubundaki değişim kontrole göre istatistiksel olarak anlamsızdır. CAT aktivitesinde R grubuna göre R+MA grubunda % 9'luk bir artış görülmüştür (Şekil 4.9).



Şekil 4.9 7 gün uygulama yapılmış gruplardaki total CAT aktivitesi. Kontrol (K), İyileşme (R), İyileşme+malonat (R+MA) ($p < 0.05$).

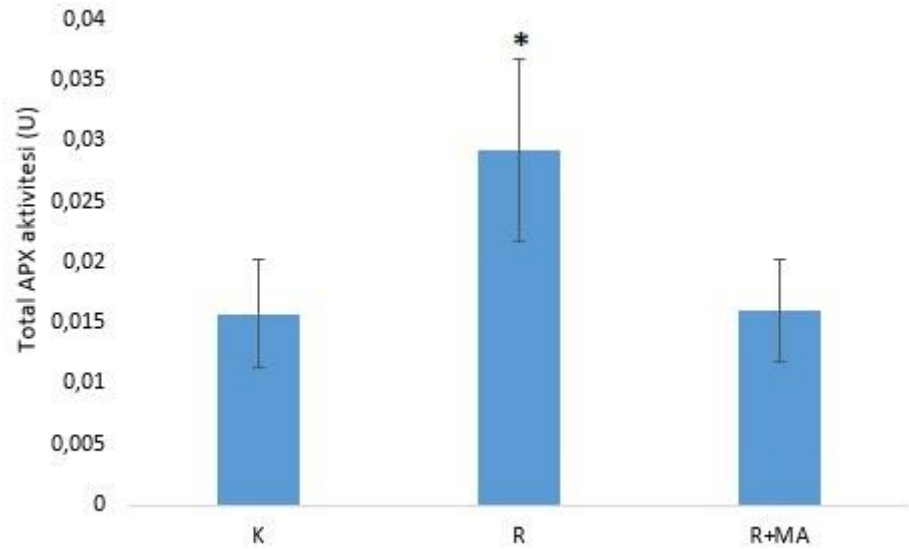
4.2.5. Askorbat peroksidaz (APX) aktivitesi

APX aktivitesi, kontrol grubuna göre, tuz stresi süresince tüm uygulama gruplarında artış göstermiştir. Sadece tuz uygulanan 50N ve 100N gruplarında sırasıyla %45 ve %76 artış görülmüştür. 100MA grubundaki artış %28'dir. Tuz stresine ek olarak 100 μ M MA uygulanan gruplardan 50N+MA grubunda, 50N grubuna göre, %8 artış görülürken, 100N+MA grubunda, 100N grubuna göre, %15 azalma görülmüştür (Şekil 4.10)



Şekil 4.10 7 gün uygulama yapılmış gruptaki total APX aktivitesi, Uygulama grupları: Kontrol (K), 50 mM NaCl (50N), 100 mM NaCl (100N), 100 μ M Malonat (100MA), 50 mM NaCl+100 μ M Malonat (50N+MA), 100 mM NaCl+100 μ M Malonat (100N+MA) ($p<0.05$).

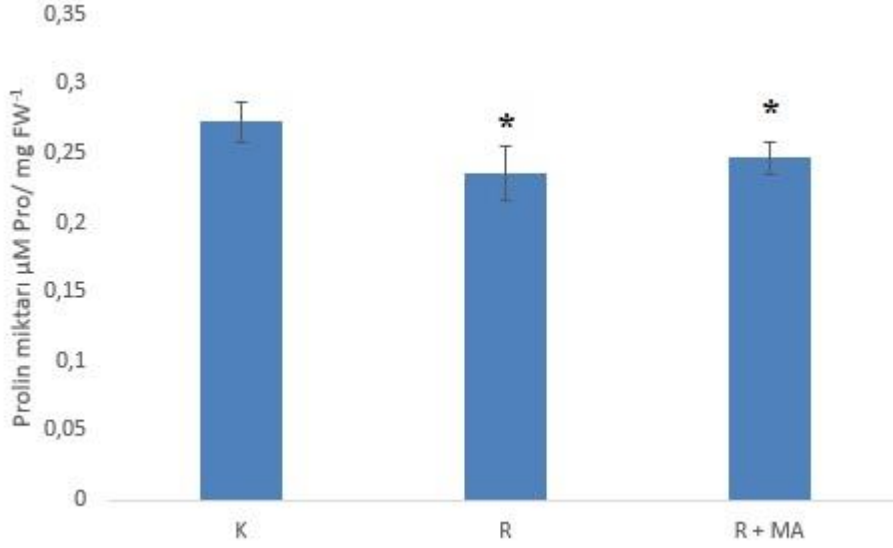
İyileşme döneminde ise APX aktivitesi, sadece iyileşme dönemindeki R grubunda, kontrole göre %87 artış gösterirken R+MA grubunun kontrole göre değişimi istatistiksel olarak anlamsızdır. İyileşme dönemine ek olarak 100 μ M MA uygulanan R+MA grubunda ise, R grubuna göre %47'lik bir azalma kaydedilmiştir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11 7 gün uygulama yapılmış gruptaki total APX aktivitesi. Uygulama grupları: Kontrol (K), İyileşme (R), İyileşme+MA (R+MA) ($p<0.05$).

4.2.6. Prolin içeriği

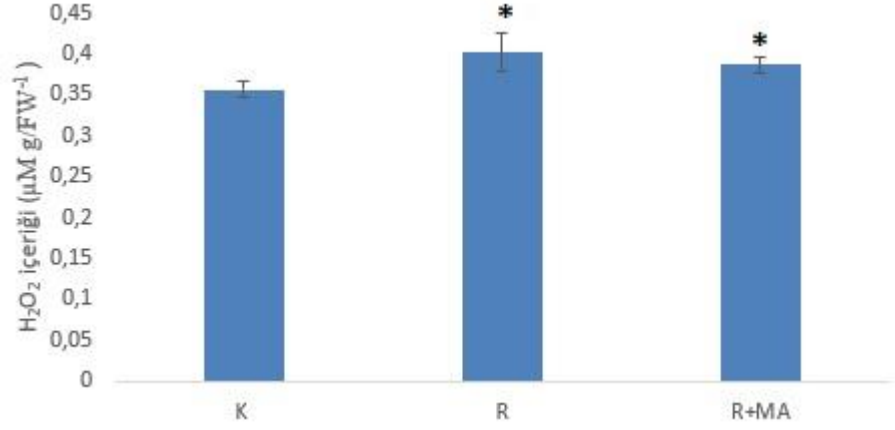
Prolin içeriği, kontrol grubuna göre, diğer uygulama gruplarında azalmıştır. Sadece iyileşme döneminde olan R grubunda, kontrol grubuna göre %14'lük bir azalma görölmüştür. R+MA grubunda ise, kontrol grubuna göre %10'luk bir düşüş görölmüştür. R+MA grubunda, R grubuna göre gerçekleşen değişiklik istatistiksel olarak anlamsızdır (şekil 4.12).



şekil 4.12 3 gün uygulama yapılmış gruplardaki prolin içerikleri. Uygulama grupları: Kontrol (K), İyileşme (R), İyileşme+MA (R+MA) (p<0.05).

4.2.7. H₂O₂ miktarı

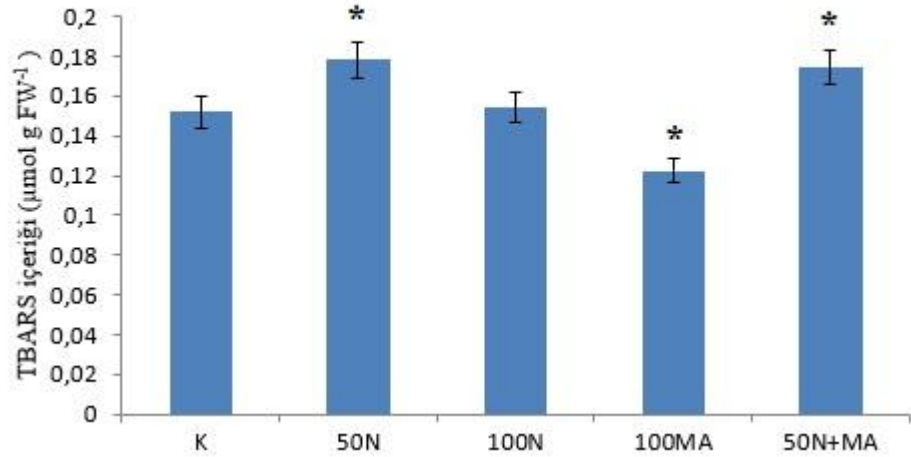
Tuz stresiyle birlikte hücrede ROS biriktiği bilinmektedir (Özgür et al., 2014; Özfıdan-Konakçı et al., 2014). Çalışmamızda iyileşme periyodunda olan R grubunda H₂O₂ miktarı kontrol grubuna göre %13'lük bir artış göstermiştir (şekil 4.13). İyileşme döneminde malonat uygulanmış olan R+MA grubunda, kontrole göre H₂O₂ miktarı %9 artış göstermiştir. R+MA grubunda H₂O₂ miktarı, R grubuna göre bir düşüş göstermiştir ancak bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı değildir.



Şekil 4.13 7 gün uygulama yapılmış gruplardaki H₂O₂ içerikleri. Uygulama grupları: (K) Kontrol, (R) İyileşme ve (R+MA) İyileşme+malonat.

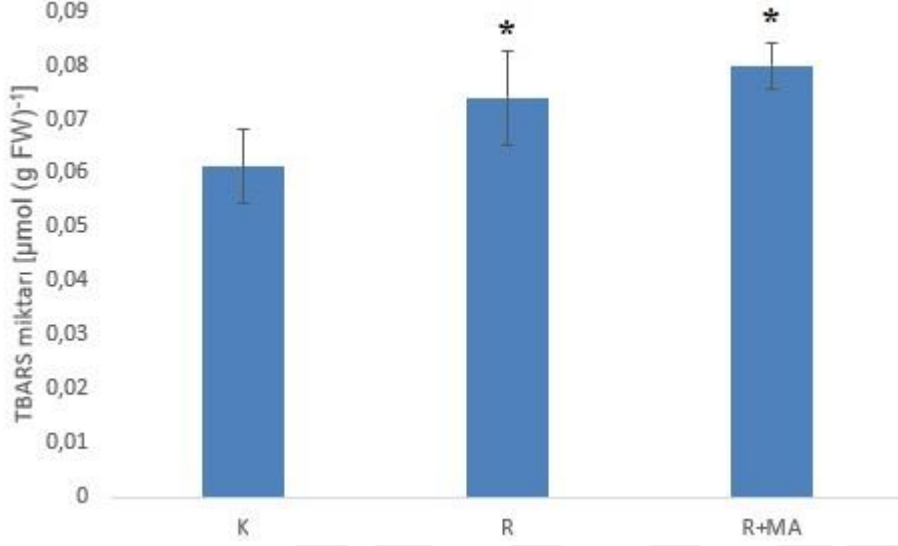
4.2.8. Lipit Peroksidasyonu

Tuz stresi sırasında uygulama gruplarının TBARS içerikleri incelendiğinde, 50N grubunda, kontrole göre %18’lik bir artış belirlenmiştir. 100N grubundaki değişiklik istatistiksel olarak anlamlı değildir. 100MA grubunda, kontrole göre %19’luk bir azalma görülürken, 50N+MA grubunda kontrole göre %15’lik bir artış görülmekte ancak 50N grubuna göre 50N+MA grubundaki değişim istatistiksel olarak anlamlı değildir (Şekil 4.14).



Şekil 4.14 7 gün uygulama yapılmış gruplardaki TBARS içerikleri. Uygulama grupları: Kontrol (K), 50 mM NaCl (50N), 100 mM NaCl (100N), 100 µM Malonat (100MA), 50 mM NaCl+100 µM Malonat (50N+MA) (p<0.05).

Tuz stresi sonrası iyileşme döneminde uygulama gruplarının TBARS içerikleri incelendiğinde kontrol grubuna göre R grubunda %21, R+MA grubunda %30.5 artış görülmektedir. R grubuna göre R+MA grubundaki değişim ise %8'dir (Şekil 4.15).

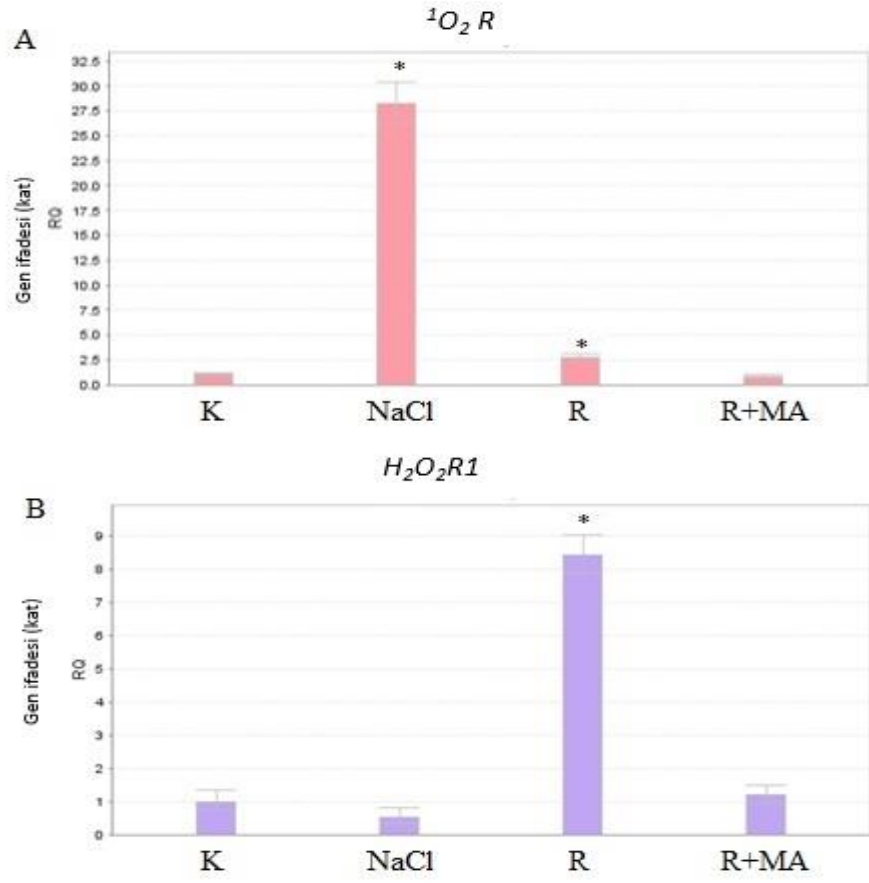


Şekil 4.15 7 gün uygulama yapılmış gruplardaki TBARS içerikleri. Uygulama grupları: Kontrol (K), İyileşme (R), İyileşme+malonat (R+MA). ($p < 0.05$).

4.3. Gen İfadesindeki Değişiklikler

Tuz stresi sonrası iyileşme döneminde bitkilere 100 μM malonat uygulandığında bitkilerde meydana gelen fizyolojik ve biyokimyasal değişikliklerin yanında, meydana gelmiş olabilecek gen ifadesi değişikliklerini görebilmek için yapılan kantitatif real time PCR (qRT-PCR) analizi sonucunda oksidatif stres belirteci olan “ $^1\text{O}_2$ responsive ($^1\text{O}_2\text{R}$)” ve “ H_2O_2 responsive 1 ($\text{H}_2\text{O}_2\text{R1}$)” genlerinde belirgin değişiklikler olduğu görülmüştür. $^1\text{O}_2\text{R}$ geninin ifadesi tuz uygulamasıyla birlikte 27.5 kat artmıştır (Şekil 4.16.A).

$\text{H}_2\text{O}_2\text{R1}$ geninin ifadesi tuz uygulaması yapılan dönemde kontrol grubuna göre düşmüştür. Genin ifadesi iyileşme döneminde, R grubunda 8.5 kat artarken, iyileşme döneminde malonat uygulanmış R+MA grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik göstermemiştir (Şekil 4.16.B).



Şekil 4.16 7 gün uygulama yapılmış gruptaki oksidatif stres markır qRT-PCR sonuçları. (A) 1O_2R , (B) H_2O_2R1 . Uygulama grupları: Kontrol (K), Sodyum klorür (NaCl), İyileşme (R), İyileşme+MA (R+MA).

5. TARTIŞMA

Tuz stresinin diğer abiyotik stresler gibi büyüme üzerine azaltıcı bir etkisi olduğu bilinmektedir (Ghoulam et al., 2002; Özgür et al., 2014; Özfidan-Konakçı et al., 2014; Yang and Guo, 2017). Fuentes et al., (2011)'ın yaptığı bir çalışmada SDH'nin, RNA interferans (RNAi) yoluyla transkript miktarı azaltıldığı veya SDH1-1/*sdh1-1* heterozigot mutanlığı olan Arabidopsis bitkilerinde, azotun sınırlayıcı olduğu koşullarda, kontrol bitkilerine göre daha iyi bir büyüme gösterdiği kaydedilmiştir. Çalışmamızda tuz stresi süresince veya sonrasında SDH'nin aktivitesinin MA ile kısmen inhibe edilmesiyle, büyüme parametrelerinde bir artış olduğu görülmektedir ve bu bulgular literatürle uyumludur. Normal koşullar altında da 100 μ M MA verilen bitkiler, kontrol bitkilerine göre daha iyi büyümüşlerdir (Şekil 4.2). Eğer malonat uygulaması tuz stresi sonrası iyileşme döneminde yapılırsa, stres süresince gösterdiği etkiye benzer bir etki yani iyileştirici bir etki göstermektedir (Şekil 4.3).

Tuz stresinin bitki büyümesini engellemesindeki sebeplerin; sodyum (Na^+) ve klor (Cl^-) iyonlarının toprakta yüksek miktarda çözünmüş olması nedeniyle bitkinin topraktan suyu ve mikro besleyici elementleri yeterince alamaması ve ikincil stres olan oksidatif stresin yaşanması olduğu bilinmektedir (Ismail et al., 2014). Şeker pancarında yapılan bir çalışmada, bitkilere tuz stresi uygulandığında yaprak ve köklerdeki Na^+ ve Cl^- 'un artmasıyla kök ve yaprakların kuru ve yaş ağırlıklarında düşüşler görülmüştür (Ghoulam et al., 2002). Tuz stresiyle birlikte hücrede ROS miktarında da bir yükseliş olmaktadır ve stres süresince ROS'un birikimi; ROS üretimi ve süpürülmesi arasındaki dengeye bağlıdır (Jacoby et al., 2011; Huang et al., 2014). Bu artışın önemli nedenlerinden birisi de, solunumda iş gören mitokondri ETS'sindeki aşırı yüklenme sonucu moleküler oksijene doğru elektron sızıntısıdır (Davidson & Schiestl 2001). MA, SDH'nin substrat bağlanma bölgesine bağlanır ve enzimin substratı olan süksinattan elektron almasını engeller. Bu durumda enzim yükseltgenmiş halde kalır ve ROS üretmez (Jardim-Messeder et al., 2015). SDH'nin MA tarafından inhibe edilmesinin, bitki gelişimine iyileştirici etkisinin ana sebebinin, SDH'nin ROS üretme kapasitesindeki düşüş olduğu düşünülmektedir. Daha önce yapılan bir çalışmada MA uygulamasıyla SDH'nin ROS üretme kapasitesi azaltıldığında büyümeyle ilgili genlerin

ifadesinin arttığı görülmüştür (Jardim-Messeder et al., 2015). Çalışmamızda hem tuz stresi sırasında hem de stres sonrasındaki iyileşme döneminde SDH kaynaklı ROS'un azaltılması, bitkilerde iyileştirici bir etki göstermiştir (Şekil 4.2, Şekil 4.3).

NADPH oksidazlar (NOX), süperoksit anyonu üretmek için NADPH tüketen, hücre zarında bulunan, büyüme, gelişme ve stres yanıtlarında çalışan bir enzimdir. Süperoksit anyonu reaktif bir moleküldür ve hücre içinde veya apoplastta bulunan çeşitli SOD izoformlarınca hidrojen peroksit (H_2O_2) dönüştürülür (Yang and Guo, 2017). NOX enzimi çevresel sinyallerin algılanması ve iletimi için gerekli ROS'un üretiminden sorumludur (Miller et al., 2008). Ayrıca tuz stresi altında NOX aktivitesinin arttığı bilinmektedir (Yazıcı et al., 2007; Özgür et al., 2014; Özfidan-Konakçı et al., 2014). Daha önce Arabidopsis bitkisinde, tuz uygulamasının ardından NOX aktivitesinde artışlar gözlenmiştir. Aktivite özellikle 30. dakikadan sonra belirgin bir artış göstermiş, 6.saatten sonra kontrol seviyelerine geri dönmüştür (Özgür et al., 2014). Başka bir çalışmada çeltik bitkisinin (*Oryza sativa*) Pokkali ve IR28 adlı iki varyetesinde yapılan bir deneyde, 120 mM tuz uygulanan bitkilerde NOX aktivitesinin kontrol bitkilerine göre belirgin düzeyde arttığı görülmektedir (Özfidan-Konakçı et al., 2014). Çalışmamızda, tuz stresiyle birlikte yükselen NOX aktiviteleri literatürle uyumludur. 100N+MA grubunda, 100 mM tuz derişiminde SDH aktivitesi MA ile kısmen inhibe edildiğinde, sadece tuz uygulanan 100N grubuna göre NOX aktivitesi artmıştır. Görevi çevresel strese karşı oluşan yanıtın ilk adımını oluşturmak olan bu enzimin aktivitesindeki artış, iyileştirici etkinin ortaya çıkmasına katkıda bulunmuş olabilir.

SOD enzimi oksidatif stres süresince bitkilerin antioksidan savunma sisteminde önemli bir yere sahiptir ve strese yanıt olarak bitkilerde, bu enzimin aktivitesinin arttığı bilinmektedir (Jacoby et al., 2011; Özgür et al., 2014; Yang and Guo, 2017). Buna rağmen daha önce börölce bitkisinde (*Vigna unguiculata*) yapılan bir çalışmada SOD aktivitesindeki artışın, tuza karşı toleransı artırmadığı da ortaya konmuştur (Cavalcanti et al., 2004). Ancak Arabidopsis'te yapılan bir çalışmada ise tuz uygulamasının ardından SOD aktivitesinin arttığı görülmektedir (Özgür et al., 2014), domates bitkisinde (*Lycopersicum esculantum*) yapılan başka bir çalışmada da tuza dirençli çeşitin, hassas çeşide göre daha fazla mitokondriyal SOD aktivitesine sahip olduğu gösterilmiştir (Mittova et al. 2003). Çalışmamızda

SOD aktivitesi 50N grubunda belirgin bir şekilde artarken, diğer tüm gruplarda kontrolden azdır. En az aktivite de 100MA grubunda görülmektedir. Tuz stresiyle birlikte mitokondrideki ROS dengesinin değişmesi bir retrograd sinyalin oluşmasına neden olur. Bu sinyalin önemli bileşenlerinden biri de MnSOD'dur (Foyer & Noctor 2005). MnSOD, süperoksit dismutaz enziminin mitokondriyal izoformudur. Enzimin aktivitesi tüm uygulama gruplarında kontrole göre yüksektir. Ancak 50 mM ve 100 mM NaCl uygulanmış gruplara göre malonat uygulaması enzim aktivitesini azaltmıştır. Bulgularımıza göre tuz uygulamasıyla birlikte mtROS artmaktadır. MA uygulaması ise bu ROS'un üretimini azaltmaktadır ki enzim aktivitesinin azalması, mitokondriyal oksidatif yükün azaldığını işaret etmektedir.

POX kloroplastlar ve sitozolde H_2O_2 'nin önemli bir kısmının süpürülmesinden sorumludur. Bu görevleri dışında, büyüme, gelişme, lignifikasyon ve süberizasyon gibi süreçlerde de önemli rollere sahiptirler (Asada and Takahashi, 1987). Enzimin aktivitesinin çeltik bitkisinde tuz stresi altında arttığı bilinmektedir (Özfidan-Konakçı et al., 2014). Tuz ve MA birlikte uygulandığı zaman, sadece tuz uygulanmasına göre POX aktivitesi artmıştır. Ancak iyileşme döneminde MA uygulaması SDH kökenli ROS'u azalttığı için, POX aktivitesinde belirgin bir düşüş görülmektedir ki, bu da POX'un, SDH kompleksi tarafından üretilen ROS'un ana süpürücülerinden biri olduğunu göstermektedir.

CAT enzimi stresle birlikte hücrede birikmeye başlayan H_2O_2 'nin peroksizomlarda süpürülmesinde önemli bir rol oynar. Bu enzimin tuz stresiyle birlikte aktivitesinin arttığı bilinmektedir. Özgür et al. (2014)'ün bulgularına göre, Arabidopsis bitkisinde CAT aktivitesi tuz uygulamasıyla birlikte artmaktadır. Kontrol grubuna kıyasla CAT aktivitesi 100MA grubunda en yüksek düzeye ulaşmıştır. Bu durum fotosentez hızının artmasıyla, peroksizomda artan fotorespirasyonla ilişkili olabilir. 50N+MA grubunda, 50N grubuna göre daha yüksekken, 100N+MA grubunda, 100N grubuna göre düşüş görülmüştür. Stres sonrası iyileşme döneminde ise R+MA grubunda, R grubuna göre daha fazla CAT aktivitesi görülmüştür. Bu da oksidatif strese daha iyi bir yanıt verildiğini göstermektedir.

APX enzimi, indirgeyici güç olarak askorbik asiti kullanan ve H_2O_2 'nin H_2O 'ya indirgenmesini sağlayan bir enzimdir. Askorbat-glutasyon döngüsü, hücrede mitokondri, kloroplast ve peroksizom gibi organellerde ROS'ların süpürülmesinde çok önemli rol oynayan bir yolaktır (Noctor and Foyer, 1999; Miller et al., 2010). Çeltik bitkisinde yapılan bir çalışmada, tuz stresiyle birlikte kontrol bitkilerine göre APX aktivitesinde belirgin artışlar görülmüştür (Özfidan-Konakçı et al., 2014). Başka bir çalışmada ise, halofitik çok yıllık bir bitki olan puccinellia (*Puccinellia tenuiflora*) bitkisinin APX geni Arabidopsis bitkisinde aşırı ifade ettirildiğinde, bitkinin yüksek tuz oranlarına bile dayabildiği ortaya konmuştur (Sofa et al., 2015). Çalışmamızda, 50N ve 100N gruplarında, kontrole göre, APX aktivitesi dramatik artışlar göstermiştir. Tuz stresi sırasında MA uygulanmış 50N+MA grubunda 50N grubuna göre APX aktivitesi fazlayken 100N+MA grubunda 100N grubuna göre %15 daha az aktivite görülmüştür. Bu durum hücre üzerindeki oksidatif yükün azaldığının bir kanıtıdır. Stres sonrası iyileşme döneminde ise, R+MA grubunda APX aktivitesi R grubuna göre %47 daha azdır ki bu da hücrenin oksidatif yükünün azaldığını göstermektedir.

100MA grubunda ki TBARS içeriği göstermektedir ki, SDH kaynaklı ROS'un azaltılması, hücrede lipid peroksidasyonunu azaltmaktadır. Ancak, tuz stresiyle birlikte SDH'nin kısmen inhibisyonu TBARS içeriği üzerine büyük bir etki göstermemiştir.

6. SONUÇ

Çalışmamızda SDH aktivitesinin MA yoluyla kısmen inhibisyonunun tuz stresi sırasında ve stres sonrası iyileşme döneminde antioksidan sistem, ROS düzenlenmesi ve hücrel redoks düzenlenmesi üzerine etkisi araştırılmıştır. SDH'nin hücrede önemli bir ROS kaynağı olması nedeniyle, SDH kökenli ROS'un kısmen azaltılması normal koşullar altında, tuz stresi altında ve stres sonrasında bitki büyümesine iyileştirici bir etki göstermektedir. ROS miktarındaki bu azalma SOD, POX ve APX gibi enzim aktivitelerindeki azalmayla görülmektedir.



KAYNAKLAR DİZİNİ

- Asada, K. and Takahashi, M.**, 1987, Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. In: Kyle, D.J. (Ed.), *PHOTOINHIBITION*, Elsevier, Amsterdam/North Holland , 227–287p.
- Bergmeyer, N.**, 1970, Methoden der enzymatischen Analyse, *vol. 1. Akademie Verlag*, Berlin, 636–647p.
- Beuchamp, C. and Fridovich, I.**, 1973, Isoenzymes of superoxide dismutase from wheat germ, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure*, 317,50–64p.
- Bradford, M.M.**, 1976, A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of the protein–dye binding, *Anal. Biochem.*, 72,248–254p.
- Borsani, O., Valpuesta V. and Botella M.A.**, 2001, Evidence for a Role of Salicylic Acid in the Oxidative Damage Generated by NaCl and Osmotic Stress in Arabidopsis Seedlings, *Plant Physiology*, DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.126.3.1024>
- Demiral, T. and Türkan İ.**, 2005, Comparative lipid peroxidation, antioxidant defence systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance, *Environmental and Experimental Botany*, 53,247-257p.
- Dionisio-Sese, M. L. and Tobita, S.**, 1998, Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress, *Plant Science*, 135,1-9p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- del Rio, L. A., Sandalio, L. A., Corpas, F. J., Palma, M. and Barroso, J. B.,** 2006, Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in Peroxysomes. Production, scavenging and role in cell signalling, *Plant Physiology*, 141,330-335p.
- Dutilleul, C., Garmier M., Noctor G., Mathieu C., Chetrit P., Foyer, C.H. and de Paepe, R.,** 2003, Leaf mitochondria modulate whole cell redox homeostasis, set antioxidant capacity, and determine stress resistance through altered signaling and diurnal regulation, *Plant Physiology*, 15,1212–1226p.
- Flagella, Z., Torono D., Pompa, M., Di Fonzo, N. and Pastore, D.,** 2006, Seawater stress applied at germination affects mitochondrial function in durum wheat (*Triticum durum*) early seedlings. *Functional Plant Biology*, 33,357–366p.
- Fuentes, D., Meneses, M., Nesi, A. N., Araujo, W. L., Tapia, R., Gomez, I., Holoigue, L., Gutierrez, R. A., Fernie, A. R. and Jordana, X.,** 2011, A deficiency in the flavoprotein of Arabidopsis mitochondrial complex II results in elevated photosynthesis and better growth in nitrogen limiting conditions, *Plant Physiology*, 157,1114-1127p.
- Gleason, C., Huang, S., Thatcher, L. F., Foley, R. H., Anderson, C.R., Carroll, A. J., Miller, A. H. and Singh, K. B.,** 2011, Mitochondrial complex II has a key role in mitochondrial-derived reactive oxygen species influence on plant stress gene regulation and defense, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108,10768–10773p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Guzy, R. D. and Shumacker, P. T.,** 2006, Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia, *Experimental physiology*, 91(5),807-819p.
- Hamilton, E. W., and Heckathorn, S. A.,** 2011, Mitochondrial adaptations to NaCl. Complex I is protected by anti-oxidants and small heat shock proteins, whereas complex II is protected by proline and betaine, *Plant Physiology*, 126,1266-1274p.
- Hoagland, D.R. and Arnon, D.I.,** 1950, The water culture method for growing plants without soil, *California Agricultural Experiment Station Circular*, 347,1–32p.
- Ismail, A., Takeda, S. and Nick, P.,** 2014, Life and death under salt stress: same players, different timing?, *Journal of Experimental Botany*, 60(12),2963-2979p.
- Jacoby, R.P., Millar, A.H. and Taylor, N.L.,** 2010, Wheat mitochondrial proteomes provide new links between antioxidant defense and plant salinity, *Journal of Proteome Research*, 9,6595–6604p.
- Jardim-Messeder, D., Caverzan, A., Rauber, R., Souza Ferreira, E., Margis-Pinheiro, M. and Galina A.,** 2015, Succinate dehydrogenase (mitochondrial complex II) is a source of reactive oxygen species in plants and regulates development and stress responses, *New Phytologist*, 208,776–789p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Jiang, K.**, Salt and drought stress signal transduction in plants, *Annual Reviews of Plant Biology*, 53:247-273p.
- Jolivet, Y., Pireaux, J.C. and Dizengremel P.**, 1990, Changes in Properties of Barley Leaf Mitochondria Isolated from NaCl-Treated Plants, *Plant Physiology*, DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.94.2.641>
- Koca, H., Bor, M., Özdemir, F. and Türkan, İ.**, 2007, The effects of salt stress on lipid peroxidation, antioxidative enzymes and proline content of sesame cultivars, *Environmental and Experimental Botany*, 60,344-351p.
- Kong, Y., Zhou, G. and Wang, Y.**, 2001, Physiological Characteristics and Alternative Respiratory Pathway under Salt Stress in Two Wheat Cultivars Differing in Salt Tolerance, *Russian Journal of Plant Biology*, 48,595–600p.
- Krab, K., Wagner, M.J., Wagner, A.M. and Möller, M.**, 2000, Identification of the site where the electron transfer chain of plant mitochondria is stimulated by electrostatic charge screening. *European Journal of Biochemistry*, 267, 869–876.p
- Laemmli, U.K.**, 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227, 680–685p.
- Lambert, A. J. and Brand, M. D.**, 2004, Superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) depends on the pH gradient across the mitochondrial inner membrane, *Biochemical Journal*, 382,511-517p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Leon, G., Holuigue, L. and Jordana, X.,** 2007, Mitochondrial complex II is essential for gametophyte development in *Arabidopsis*, *Plant Physiology*, 143,1534-1546p.
- Li, N., Ragheb, K., Lawler, G., Sturgis, J., Rajwa, B., Melendez, J. A. and Robinson, J. P.,** 2003, Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production, *The Journal of Biological Chemistry*, 278,8516-8525p.
- Madhava Rao, K.V. and Sresty, T.V.S.,** 2000, Antioxidative parameters in the seedlings of pigeon pea (*Cajanus cajan* L. Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses, *Plant Science*, 157,113–128p.
- Marti, M.C., Sarasa, I.F., Camejo, D., Carbo, M.R., Lazaro, J.J., Sevilla, F. and Jimenes, A.,** 2011, Response of mitochondrial thioredoxin PsTrx1, antioxidant enzymes, and respiration to salinity in pea (*Pisum sativum* L.) leaves, *Journal of Experimental Botany*, 62,3863–3874p.
- Miller, G., Suzuki, N., Çiftçi-Yılmaz, S. and Mittler, R.,** 2010, Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses, *Plant and Cell Environment*, 33:453-467.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M. and Van Breusegem, F.,** 2004, Reactive oxygen gene network of plants, *Trends in Plant Science*, doi:10.1016/j.tplants.2004.08.009

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Moller, I.M. and Sweetlove, L.J., 2010, ROS signalling – specificity is required, *Trends in Plant Science*, 15,370-374p.

Muller, F. L., Roberts, A. G., Bowman, M. K. and Kramer, D. M., 2003, Architecture of the Q_o site of the cytochrome bc₁ complex probed by superoxide production, *Biochemistry*, 42,6493-6499p.

Morgan, M.J., Lehman, M., Schwarzlander, M., Baxter, C.J., Porzucek, A.S., Williams, T.C.R., Schauer, N., Fernie, A.R., Fricker, M.D., Ratcliffe, R.G., Sweetlove, L.J. and Finkemeier, I., 2008, Decrease in manganese superoxide dismutase leads to reduced root growth and affects tricarboxylic acid cycle flux and mitochondrial redox homeostasis, *Plant Physiology*, 147:101–114.

Nakano, Y. and Asada, K. , 1981, Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts, *Plant Cell Physiology*, 22,867–880p.

Navrot, N., Rouhier, N., Gelhaye, E. and Jacquot, J.P., 2007, Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria, *Physiologia Plantarum*, 129,185-195p.

Özfidan-Konakçı, C., Yıldıztuğay, E. and Küçükoduk, M., 2014, Protective roles of exogenously applied gallic acid in *Oryza sativa* subjected to salt and osmotic stress: effects on the total antioxidant capacity, *Plant Growth and Regulation*, 75,219-234p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Özgür, R., Türkan, İ., Uzilday, B. and Sekmen, A.H.,** 2014, Endoplasmic reticulum stress triggers ROS signalling, changes redox state and regulates the antioxidant defence of *Arabidopsis thaliana*, *Journal of Experimental Botany*, 65(5), 1377-1390p.
- Parida, A. K. and Das, A. B.,** 2005, Salt tolerance and salinity effects on plants: a review, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60, 324-349p.
- Raikam, S. R., Rao, K. V. and Srivastava, G.C.,** 2002, Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration, *Plant Science*, 163, 1037-1046p.
- Rhoads, D.M., White S.J., Zhou Y., Muralidharan, M. and Elthon, T.E.,** 2005, Altered gene expression in plants with constitutive expression of a mitochondrial small heat shock protein suggests the involvement of retrograde regulation in the heat stress response, *Physiologica Plantarum*, 123, 435-444p.
- Rutter, J., Winge, D. R. and Schiffman, J. D.,** 2010, Succinate dehydrogenase – Assembly, regulation and role in human disease, *Mitochondrion*, 10, 393-401p.
- Sairam, R.K., Veerabhadra, Rao K., Srivastava, G.C.,** 2002, Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration, *Plant Science*, 163, 1037-1046p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Schwarzländer, M., Fricker, M.D. and Sweetlove, L.J.,** 2009, Monitoring the in vivo redox state of plant mitochondria: effect of respiratory inhibitors, abiotic stress and assessment of recovery from oxidative challenge, *Biochimica Et Biophysica*, 1787,468–475p.
- Seevers, F.M, Daly, J.M. and Catedral, F.F.,** 1971, The role of peroxidase isozymes in resistance to wheat stem rust, *Plant Physiology*, 48,353–360p.
- Smith, C.A., Melino, V.J., Sweetman, C. and Soole, K.L.,** 2009, Manipulation of alternative oxidase can influence salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologica Plantarum*, 137,459–472p.
- Sofo, A., Scopa, A., Nuzzaci, M. and Vitti, A.,** 2015 Ascorbate peroxidase and catalase activities and their genetic regulation in plants subjected drought and salinity stresses, *International Journal of Molecular Sciences*, 16,13561-13578p.
- Sun, F., Huo, X., Zhai, Y., Wang, A., Xu, J., Su, D., Bartlam, M. and Rao, Z.,** 2005, Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II, *Cell*, 121,1043-1057p.
- Sweetlove, L.J., Heazlewood, J.L., Herald, V., Holtzapffel, R., Day, D.A., Leaver, C.J. and Millar, A.H.,** 2002, The impact of oxidative stress on *Arabidopsis* mitochondria, *The Plant Journal*, 32,891–904p.
- Tormos, K. V., Anso, E., Hamanaka, R. B., Eisenbart, J., Joseph, J., Kalyanaraman, B. and Chandel, N. S.,** 2011, Mitochondrial complex III ROS regulate adipocyte differentiation, *Cell metabolism*, 14,537-544p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Torono, D., Flagella, Z., Laus, M.N., Di Fonzo, N. and Pastore, D.,** 2004, The uncoupling protein and the potassium channel are activated by hyperosmotic stress in mitochondria from durum wheat seedlings, *Plant Physiology*, DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2003.01162.x>
- Türkan, İ. and Demiral, T.,** 2009, Recent developments in understanding salinity tolerance, *Environmental and Experimental Botany*, 67,2-9p.
- Yankovskaya, V., Horsefield, R., Törnroth, S., Luna-Chavez, C., Miyoshi, H., Leger, C., Byrne, B., Cecchini, G. and Iwata, S.,** 2003, Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation, *Science*, 299,700-704p.
- Yang, Y. and Guo, Y.,** 2017, Elucidating the molecular mechanisms mediating plant salt-stress responses, *New Phytologist*, 217,523–539p.
- Vaidyanathan, H., Sivakumar, P., Chakrabarty, R. and Thomas, G.,** 2003, Scavenging of reactive oxygen species in NaCl –stressed rice (*Oryza sativa* L.) differential response in salt –tolerant and sensitive varieties, *Plant Science*, 165,1411-1418p.
- Verniquet, F., Gaillard, J., Neuburger, M. and Douce, R.,** 1991, Rapid inactivation of plant aconitase by hydrogen peroxide, *Biochemical Journal*, 276,643–648p.
- Vitória, P.A., Lea, P.J. and Azevedo, R.A. ,** 2001, Antioxidant enzymes responses to cadmium in radish tissues, *Phytochemistry*, 57,701–710p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Wang, Y., Ying, Y., Chen, J. and Wang, X., 2004, Transgenic Arabidopsis overexpressing MnSOD enhanced salt-tolerance, *Plant Science*, 167,671–677p.



TEŞEKKÜR

Lisansüstü öğrenimim boyunca ve tez sürecimde engin bilgisini, deneyimini ve desteğini esirgemeyen tez danışmanım Sayın Prof. Dr. İsmail TÜRKAN' a, tez dönemimde bilgisi, laboratuvar deneyimini, ve paylaşımcı tavrıyla beni cesaretlendiren, desteğini her zaman hissettiğim Sayın Doç. Dr. A. Hediye SEKMEN'e 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 hocalarım Araş. Gör. Dr. Rengin ÖZGÜR UZİLDAY'a, Dr. Öğretim Üyesi Barış UZİLDAY' a teşekkür ederim.

Öğrenim yaşamım boyunca beni her yönden destekleyen, eğitimimi herşeyden önde tutan, ve bu konuda verdiğim kararlarda arkamda duran, annem Gülnaz, ve kardeşim Alper YILMAZ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZGEÇMİŞ

Oğuzhan Yılmaz, 10.10.1992’de İzmir’de doğmuştur. 2010’da Ayrancılar Çok Programlı Lisesi’ nde orta öğrenim hayatını bitirmiştir. Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Opsiyonundan 2016 yılında mezun olmuştur. 2016 yılında lisansüstü eğitimine, Prof. Dr. İsmail Türkan danışmanlığında, Ege Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Genel Biyoloji A.B.D.’de başlamıştır.

