

**BİTKİ SOLUNUM ZİNCİRİ:
FARKLI AZOT KAYNAKLARINA CEVAPTA
HÜCRESEL REDOKS HOMEOSTAZİSİ VE
ALTERNATİF OKSİDAZİN REDOKS YANITLARI**
Turgay ÇAKMAK
Doktora Tezi
Biyoloji Anabilim Dalı
Yrd. Doç. Dr. Rahmi DÜMLÜPINAR
2010
Her hakkı saklıdır

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**BİTKİ SOLUNUM ZİNCİRİ:
FARKLI AZOT KAYNAKLARINA CEVAPTA HÜCRESEL REDOKS
HOMEOSTAZİSİ VE ALTERNATİF OKSİDAZİN REDOKS YANITLARI**

Turgay ÇAKMAK

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ERZURUM

2010

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

BİTKİ SOLUNUM ZİNCİRİ: FARKLI AZOT KAYNAKLARINA CEVAPTA HÜCRESEL
REDOKS HOMEOSTAZİSİ VE ALTERNATİF OKSİDAZİN REDOKS YANITLARI

Yrd. Doç. Dr. Rahmi DUMLUPINAR danışmanlığında, Turgay ÇAKMAK tarafından hazırlanan bu çalışma 29/12/2010 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından. Biyoloji Anabilim Dalı'nda Doktora tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Ökkeş ATICI

İmza :

Üye : Prof. Dr. Peyami BATTAL

İmza :

Üye : Prof. Dr. Yavuz DEMİR

İmza :

Üye : Yrd. Doç. Dr. Rahmi DUMLUPINAR

İmza :

Üye : Yrd. Doç. Dr. M. Sinan TAŞPINAR

İmza :

(imza)

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum

Enstitü Müdürü

Bu çalışma BAP projeleri kapsamında desteklenmiştir.

Proje No: 2009/233

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

ÖZET

Doktora Tezi

BİTKİ SOLUNUM ZİNCİRİ: FARKLI AZOT KAYNAKLARINA CEVAPTA HÜCRESEL REDOKS HOMEOSTAZİSİ VE ALTERNATİF OKSİDAZIN REDOKS YANITLARI

Turgay ÇAKMAK

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Ana Bilim Dalı

Yrd. Doç. Dr. Rahmi DUMLUPINAR

Bu araştırmada, azot kaynağındaki değişimle birlikte durağan olmayan bir redoks ortamında homeostazisin sağlanması için kullanılan temel biyokimyasal proseslerden ve muhtemel oksidatif stresten doğacak hücrel redoks durumunda meydana gelen değişime bitki fizyolojisi ve moleküler biyolojisi çalışmalarında model organizmalar olarak kullanılan *Arabidopsis thaliana* ekotip Columbia-0 bitkisinin kök ve *Nicotiana tabacum* cv. Bright Yellow-2 hücrelerinin verdiği cevapları tanımlamak amaçlanmıştır.

Azot kaynağı olarak amonyum ve nitrat sağlanan *A. thaliana* köklerinin redoks durumu ve transkriptomlarını karşılaştırmak için fizyolojik olarak gerçekçi hidroponik büyüme sistemleri kullanıldı. Yeterli büyüklüğe ulaşan *A.thaliana* bitkileri 26 saat azot açlığına bırakılmış, daha sonra büyüme ortamlarına azot kaynağı olarak 1 mM konsantrasyonda amonyum veya nitrat ilave edilmiş ve azot kaynağı ilavesinden 0, 1.5 ve 8 saat sonra hasat edilen köklerde mikrodizi analizleri, real time PCR analizleri, NAD(H)/NADP(H) ve askorbat/glutasyon oksidasyon durumları, bazı antioksidant enzim aktiviteleri, lipid peroksidasyonu, protein karbonilasyonu ve H₂O₂ düzeylerindeki değişimler araştırılmıştır. Yine azot kaynağı olarak amonyum veya nitrat içeren besi yerinde kültüre alınan *Nicotiana tabacum* cv. Bright Yellow-2 hücrelerinin, hücrel ve alternatif solunum hızlarıyla birlikte alternatif oksidaz proteininin aktivasyon durumunda ve miktarında meydana gelen değişimler araştırılmıştır.

A. thaliana kökleri kullanılarak gerçekleştirilen mikrodizi analizlerine göre azotla regüle edilen genlerin yaklaşık %60'ı amonyum ve nitrata ortak cevaplar sergilerken, önemli oranda “nitrat-spesifik” ve “amonyum-spesifik” gen setleri de tanımlanmıştır. Sitokinin cevabında ve indirgeyici üretimi/dağılımını içeren metabolik yollar nitrata cevapta değişirken, amonyum-sağlanmış köklerde kompleks bir biotik stres cevabı ve nodulin gen ekspresyonunda değişimler tanımlanmıştır.

Azot kaynağı olarak nitrat uygulanmış *A.thaliana* köklerinde muhtemelen mitokondriyal matriksten sitosole artan oranda indirgeyicilerin transferinden dolayı H₂O₂ üretiminde hızlı bir azalma gözlenmiştir. Farklı azot kaynaklarına cevapta NAD(H)/NADP(H) ve askorbat/glutasyon oksidasyon durumunda önemli bir değişim olmadığı belirlenmiştir. Yeni azot kaynağı ilavesinden özellikle 1.5 saat sonra amonyum uygulanmış köklerde ölçülen tüm antioksidant enzimlerde kontrole (0. saat) ve nitrata kıyasla artış belirlenmiştir. Yine amonyum sağlanmış grupta protein karbonilasyonunda hem kontrole hem de nitrat grubuna kıyasla önemli artış belirlenmiş, bunun yanında lipid peroksidasyonunda önemli bir değişim gözlenmemiştir.

Azot kaynağı olarak amonyum içeren ortamlarda kültüre alınmış *N. tabacum* hücrelerinin hem hücrel ve hem de alternatif solunum hızlarının nitrat kontrollerine kıyasla daha yüksek düzeyde olduğu belirlenmiştir. Yine protein immüno blot analizleri sonucunda indirgenmiş alternatif oksidaz proteininin miktarında amonyuma cevapta çok önemli düzeyde artış olduğu belirlenmiştir.

2010, 159 sayfa

Anahtar Kelimeler: Antioksidant enzimler, *Arabidopsis thaliana*, alternatif solunum, amonyum, azot, hücrel redoks, *Nicotiana tabacum*, nitrat, oksidatif stres.

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

THE PLANT RESPIRATION CHAIN: CELLULAR REDOX HOMEOSTASIS IN RESPONSE TO DIFFERENT NITROGEN SOURCES AND REDOX RESPONSES OF ALTERNATIVE OXIDASE

Turgay ÇAKMAK

Atatürk University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Asist. Prof. Dr. Rahmi DUMLUPINAR

In this research, responses of *Arabidopsis thaliana* ecotype Colombia-0 roots and *Nicotiana tabacum* cv. Bright Yellow-2 cells, the major plant model organisms, to changes in cellular redox status which would arise from possible oxidative stress and fundamental biochemical processes required for the regulation of homeostasis in an immobile redox environment stemming from the changes in nitrogen source were aimed to be investigated.

Physiologically realistic hydroponic growth systems were used to compare the transcriptomes and redox status of the roots of ammonium- and nitrate-supplied *A. thaliana* roots. When plants were grown enough, they were nitrogen-starved for 26 hours, and then the nitrogen-depleted plants were supplied with 1 mM nitrate or 1 mM ammonium just after nitrogen starvation, and microarray analysis, real time PCR analyses, NAD(H)/NADP(H) and ascorbate/glutathione oxidation states, enzymatic antioxidant activities, lipid peroxidation, protein carbonilation and changes in H₂O₂ levels were investigated in the roots harvested at 0, 1.5 and 8 hours after new nitrogen source supply. Besides this, *Nicotiana tabacum* cv. Bright Yellow-2 cells, cultured in nutrient media including ammonium or nitrate as a sole nitrogen source, were used in order to examine the changes in cellular and alternative respiration levels, and the activation state of alternative oxidase protein and its quantity responsive to ammonium or nitrate.

According to the microarray analysis of *A. thaliana* root transcriptome while approximately 60% of nitrogen-regulated genes displayed common responses to both ammonium and nitrate, significant “nitrate-specific” and “ammonium-specific” gene sets could be identified. Pathways involved in cytokinin response and reductant generation/distribution were specifically altered by nitrate, while a complex biotic stress response and changes in nodulin gene expression were characteristic of ammonium-supplied plant roots.

A rapid decrease in H₂O₂ production was observed in nitrate-supplied *A. thaliana* roots, potentially due to an increased export of reductant from the mitochondrial matrix to the cytosol. Ascorbate/glutathione, and NAD(H)/NADP(H) oxidation state did not differentiate responsive to different nitrogen sources. When compared to control (time 0) and nitrate, all antioxidant enzymes studied showed increased activities in response to ammonium especially 1.5 hours after new nitrogen source supply. Besides, protein carbonilation levels increased in ammonium-supplied roots while lipid peroxidation levels did not change.

N. tabacum cells, cultured in nutrient media including ammonium as a sole nitrogen source, showed higher cellular and alternative respiration levels in comparison to their nitrate controls. Protein immunoblot analysis revealed that reduced alternative oxidase protein quantity showed significant increase in response to ammonium.

2010, 159 Pages

Keywords: Antioxidant enzymes, *Arabidopsis thaliana*, alternative respiration, ammonium, cellular redox, *Nicotiana tabacum*, nitrate, nitrogen, oxidative stress.

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışma Atatürk Üniversitesi Araştırma Fon Saymanlığı tarafında desteklenmiş olup çalışmalarımın önemli bir kısmı, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Bitki fizyolojisi laboratuvarlarında yürütülmüştür. Bunun yanında tamamı yurt dışı kaynaklı sağladığım burslar ile çalışmalarımın bir kısmını 2008 yılında İsveç'te bulunan Lund Üniversitesi, Hücre ve Organizma Biyolojisi Bölümünde Allan Rasmusson'un laboratuvarında ve 2009 yılında ABD'nin Kaliforniya eyaletinde bulunan Kaliforniya Devlet Üniversitesi Biyolojik Bilimler Bölümünde Matthew Escobar'ın laboratuvarında gerçekleştirerek doktora tezimin çalışmalarını tamamladım.

Araştırmalarımın yürütülmesi ve değerlendirilmesinde çok önemli desteklerini gördüğüm başta danışmanım ve kıymetli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Rahmi DÜMLUPINAR'a, Sayın Mr. Allan RASMUSSEN'a, Sayın Mr. Matthew ESCOBAR'a, tez izleme komitesi üyelerinden Sayın Prof. Dr. Peyami BATTAL'a, Sayın Prof. Dr. Yavuz DEMİR'e, Sayın Yrd. Doç. Dr. M. Sinan TAŞPINAR'a, ve bir bilim öğrencisi olarak yaptığım tüm çalışmalarda mutlak katkıları olmuş, destek ve deneyimlerini esirgemeyen saygı ve övgüye değer hocam sayın Prof. Dr. Ökkeş Atıcı'ya şükranlarımı sunarım.

Doktora tezimi, hayatımın her döneminde beni destekleyen ve yol gösteren başta fedakar babam ve aileme, ve on yıldır sürekli benimle bir olan dün sınıf arkadaşım bugün hayat ortağım sevgili eşime armağan ediyorum.

Turgay ÇAKMAK

Aralık 2010

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
SİMGELER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
1.1.Farklı Azot Kaynaklarına Cevapta Hücrel Redoks Homeostazisi	1
1.2. <i>Arabidopsis thaliana</i> L.	2
1.3. <i>Nicotiana tabacum</i> L.	5
1.4. Azot Alınımı.	7
1.4.1. Toprakta Azot	7
1.4.1.a. Azotun orjinleri ve formları	7
1.4.1.b. Kök yapısı	11
1.5. Azot Asimilasyonu.	13
1.5.1. Organik Azot asimilasyonu.	13
1.5.2. İnorganik Azot asimilasyonu.	14
1.6. Alternatif Oksidazın Redoks Yanıtları.	20
2. KAYNAK ÖZETLERİ	26
3. MATERYAL ve YÖNTEM	44
3.1. Materyal	44
3.1.1. Yararlanılan alet ve cihazlar	44
3.1.2. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanış biçimleri	45
3.2. Yöntem	49
3.2.1. <i>Arabidopsis thaliana</i> ekotip Kolombiya-0 tohumlarının hazırlanması ve hidroponik kültür ortamı	49
3.2.2. Nitrat tayini	52
3.2.3. Amonyum tayini	53
3.2.4. Nitrat Redüktaz enzim aktivitesinin belirlenmesi	54

3.2.5. RNA izolasyonu, cDNA sentezi, ve real time PCR.....	55
3.2.6. Mikrodizi hibridizasyonu ve veri analizi.....	58
3.2.7. NAD(P)(H) ekstraksiyon ve analizi.....	60
3.2.8. Hidrojen peroksit miktarının belirlenmesi.....	62
3.2.9. Toplam protein miktarının belirlenmesi	62
3.2.10. Askorbat ve glutatyon tayini.....	63
3.2.10.a. Ekstraksiyon.....	63
3.2.10.b. Askorbat tayini.....	64
3.2.10.c. Glutatyon tayini	65
3.2.11. Hücresel antioksidan enzim aktivitelerinin belirlenmesi.....	66
3.2.11.a. Katalaz aktivitesinin belirlenmesi.....	67
3.2.11.a. Guaiakol peroksidaz aktivitesinin belirlenmesi.....	67
3.2.11.a. Süperoksit dismutaz aktivitesinin belirlenmesi	68
3.2.11.a. Glutatyon redüktaz aktivitesinin belirlenmesi	69
3.2.11.a. Askorbat peroksidaz aktivitesinin belirlenmesi	70
3.2.12. Protein karbonilasyonu tayini	71
3.2.13. Lipid peroksidasyonu tayini	71
3.2.14. <i>Nicotiana tabacum</i> cv. BY2 hücre kültürü şartları	72
3.2.15. Hücrelerin oksijen tüketimi hızlarının ölçümü.....	73
3.2.16. Örneklerin SDS-PAGE jelde yürütülmesi ve western blotlama.....	74
3.2.16.a. Sodyum dodesil sülfat-Poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)	74
3.2.16.b. Western blotlama	75
3.3. İstatistiksel Analiz	77
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	78
4.1. Gen Ekspresyon Analizleri İle Elde Edilen Veriler.....	78
4.1.1. Büyüme ortamı ve bitki köklerinde azot kaynağında meydana gelen değişimler	78
4.1.2. Mikrodizi analizlerinden elde edilen sonuçlar.....	81
4.2. Azot Kaynaklarına Cevapta Hücresel Redoksun Düzenlenmesi ve Reaktif Oksijen Türleri.....	106
4.3. Azot Kaynaklarına Cevapta Alternatif Oksidazın Redoks Yanıtları.....	118
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	124

KAYNAKLAR.....	140
ÖZGEÇMİŞ	160

SİMGELER DİZİNİ

AOX	Alternatif oksidaz
AP	Askorbat peroksidaz
ASC	Askorbat
dNTP	Deoksinükleotid Tri Fosfat
GSH	Glutasyon (İndirgenmiş)
GSSG	Glutasyon (Yükseltgenmiş)
GR	Glutasyon redüktaz
GDH	Glutamat dehidrogenaz
GOGAT	Glutamat-2-oxoglutarat aminotransferaz
GS	Glutamin sentetaz
KAT	Katalaz
MDA	Malondialdehit
NR	Nitrat Redüktaz
NiR	Nitrit Redüktaz
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotid
NADP	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
POD	Guaia kol peroksidaz
ROT	Reaktif oksijen türleri
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SOD	Süperoksit dismutaz
UQ	Ubikinon
xg	Yerçekimi ivmesinin katı
rpm	Devir/dakika
mM	Milimolar
μ M	Mikromolar
μ l	Mikrolitre
v/v	Hacim / Hacim
w/v	Ağırlık / Hacim

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Azot döngüsü	9
Şekil 1.2. Bitkisel hücrelerde NO_3^- alımı, indirgenmesi ve asimilasyonunun şematik gösterimi.	15
Şekil 1.3. Azot kaynaklarındaki farklılıktan doğan indirgeyici gereksinimindeki değişime cevapta mitokondrial solunum zincirinin alternatif yollarının redoks dengelemesi üzerine bir model	17
Şekil 1.4. Bitki mitokondri iç zarlarında yerleşmiş elektron taşıma sisteminin düzenlenişi ve ATP sentezi	21
Şekil 1.5. Alternatif oksidazın redoks aktivasyonu.....	24
Şekil 3.1. Hidroponik olarak yetiştirilen <i>Arabidopsis</i> bitkileri (10 günlük).	51
Şekil 3.2. <i>Arabidopsis</i> büyüme aşamaları (Boyes et al., 2001).....	51
Şekil 3.3. Nitrat tayininde kullanılan standart grafik	52
Şekil 3.4. Amonyum tayininde kullanılan standart grafik	53
Şekil 3.5. Nitrat Redüktaz enzim aktivitesi tayini için hazırlanan standart grafik.....	54
Şekil 3.6. NAD, NADH, NADP ve NADPH ölçümleri için kullanılan standart grafikler	61
Şekil 3.7. H_2O_2 ölçümü için hazırlanmış olan standart grafik.....	62
Şekil 3.8. Protein tayini için hazırlanmış olan standart grafik	63
Şekil 3.9. Askorbat ölçümü için hazırlanmış olan standart grafik	64
Şekil 3.10. İndirgenmiş glutatyon (GSH) ölçümünde kullanılan standart grafik	65
Şekil 3.11. Yükseltgenmiş glutatyon (GSH) ölçümünde kullanılan standart grafik.....	66
Şekil 4.1. Azot kaynağı olarak nitrat içeren büyüme ortamında yetiştirilmiş <i>A. thaliana</i> köklerinde azot açlığını takiben nitrat konsantrasyonunun zamana bağlı olarak değişimi	79
Şekil 4.2. Hidroponik ortamda yetiştirilmiş <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkilerinin köklerinde (A,C) ve büyüme ortamındaki (B,D) nitrat ve amonyum konsantrasyonlarının zamana göre değişimi	80
Şekil 4.3. Azot kaynaklarına cevapta NR aktivitesinin zamana bağlı değişimi.....	81
Şekil 4.4. Azot kaynağı ilavesinden 0.5 (A), 1.5 (B), ve 8 (C) saat sonra yalnızca nitrat, yalnızca amonyum, veya her ikisine cevapta farklı şekilde ifade olan <i>Arabidopsis</i> genlerinin Venn diyagramları ile gösterimi	84
Şekil 4.5. MapMan programı kullanılarak elde edilen nitrat-spesifik gen setinden (1,5 saat) sağlanan ekspresyon verilerinin metabolik harita üzerindeki kroki görüntüsü.....	96
Şekil 4.6. MapMan programı kullanılarak elde edilen amonyum-spesifik gen setinden (1,5 saat) sağlanan ekspresyon verilerinin metabolik harita üzerindeki kroki görüntüsü.....	97
Şekil 4.7. MapMan programı kullanılarak elde edilen nitrat-spesifik gen setinden (8 saat) sağlanan ekspresyon verilerinin metabolik harita üzerindeki kroki görüntüsü.....	98
Şekil 4.8. MapMan programı kullanılarak elde edilen amonyum-spesifik gen setinden (8 saat) sağlanan ekspresyon verilerinin metabolik harita üzerindeki kroki görüntüsü.....	99

Şekil 4.9. Nitrat ve amonyuma cevapta nodulin genlerinin ifadelerindeki farklılıklar.	100
Şekil 4.10. Nitrat ve amonyum tarafından farklı şekilde regüle edilen genlerin real time PCR analiz sonuçları	102
Şekil 4.11. Glutamin sentetaz'ın inhibitörü olan MSX'in amonyumla aktive olan genlerin ekspresyonları üzerine etkileri.....	104
Şekil 4.12. <i>Arabidopsis</i> köklerinde amonyum ve asidik ekstrasellular pH tarafından düzenlenen genlerin karşılaştırılması	105
Şekil 4.13. MapMan programı ile mitokondriyal taşıyıcı proteinlerin ve elektron transport sistemi komponentlerinin regülasyon analizi.....	107
Şekil 4.14. MapMan programı ile mitokondriyal taşıyıcı proteinlerin regülasyon analizi	108
Şekil 4.15. <i>Arabidopsis</i> köklerinde farklı azot kaynaklarına cevapta zamana bağlı olarak H ₂ O ₂ düzeyinde meydana gelen değişiklikler	109
Şekil 4.16. <i>Arabidopsis</i> köklerinde farklı azot kaynaklarına cevapta hücrel indirgeyici metabolitler NAD(H) ve NADP(H) oksidasyon durumları	110
Şekil 4.17. <i>Arabidopsis</i> köklerinde farklı azot kaynaklarına cevapta askorbat oksidasyon durumu ve konsantrasyonları	111
Şekil 4.18. <i>Arabidopsis</i> köklerinde farklı azot kaynaklarına cevapta glutatyon oksidasyon durumu ve konsantrasyonları	112
Şekil 4.19. <i>Arabidopsis</i> köklerinde farklı azot kaynaklarına cevapta Askorbat Peroksidaz (AP) ve Glutatyon redüktaz (GR) aktivitelerinin zamana bağlı değişimi	114
Şekil 4.20. <i>Arabidopsis</i> köklerinde farklı azot kaynaklarına cevapta [A] Katalaz (KAT), [B] Süperoksid dismutaz (SOD), ve [C] Guaiakol peroksidaz (POD) aktivitelerinin zamana bağlı değişimi	115
Şekil 4.21. <i>Arabidopsis</i> köklerinde azot açlığı ve sonrasında farklı azot kaynaklarına verilen cevapta zamana bağlı olarak protein karbonilasyonunun durumundaki değişim	116
Şekil 4.22. <i>Arabidopsis</i> köklerinde azot açlığı ve sonrasında farklı azot kaynaklarına verilen cevapta zamana bağlı olarak malondialdehit bileşiklerinin miktarındaki değişim.....	117
Şekil 4.23 MS ortamında ve azot kaynağı olarak nitrat veya amonyum içeren Somerville ve Ogren besi yerinde 4 gün inkübasyondan sonra <i>Nicotiana tabacum</i> cv. BY-2 hücrelerin genel görüntüleri	120
Şekil 4.24. Amonyuma cevapta <i>Nicotiana tabacum</i> cv. BY-2 hücrelerinin hücrel ve alternatif solunum yollarında meydana gelen değişimler.....	122
Şekil 4.25. <i>Nicotiana tabacum</i> cv. BY-2 hücrelerinde Alternatif oksidaz proteininin western analizi	123
Şekil 5.1. <i>Arabidopsis</i> köklerinde inorganik azot sinyali üzerine bir model	130

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Real time PCR analizi için kullanılan primerlerin listesi.....	57
Çizelge 4.1. Sadece amonyum veya nitrat tarafından düzenlenen gen setlerinde çok önemli düzeyde ifade olmuş fonksiyonel kategoriler	85
Çizelge 4.2. Nitrat-spesifik gen setlerinin BioMaps analiz sonuçları	87
Çizelge 4.3. Amonyum-spesifik gen setlerinin BioMaps analiz sonuçları	87
Çizelge 4.4. Hem amonyum ve hemde nitrat tarafından ortak ifade olunan (İnorganik azot ortak) gen setlerinin BioMaps analiz sonuçları	90
Çizelge 4.5. Hem amonyum ve hemde nitrat tarafından ortak baskılanan (İnorganik azot ortak) gen setlerinin BioMaps analiz sonuçları	93

1. GİRİŞ

1. 1. Farklı Azot Kaynaklarına Cevapta Hücrel Redoks Homeostazisi

Işığın, suyun ve mineral besinlerin varlığı, bitki büyümesi için temel gereksinimlerdir. Mineral besinler topraktan genellikle inorganik iyon formunda alınan elementlerdir ve tüm organizmalarda birinden diğerine sürekli bir döngü içinde olmalarına rağmen biyosfere çoğunlukla bitkilerin kök sistemleri ile girerler. Köklerin geniş yüzey alanları ve toprak çözeltisinden düşük konsantrasyonlarda inorganik iyonları absorbe edebilme yetenekleri bitkilerin gerçekleştirdiği mineral absorpsiyonunu çok etkili bir süreç haline getirmektedir. Mineral elementler kökler tarafından alındıktan sonra çeşitli biyolojik görevlerde kullanılmak üzere bitkinin değişik kısımlarına taşınır. Mikoriza mantarları ve azot fiske eden bakteriler gibi diğer organizmalar genellikle besinlerin alınımında köklere yardımcı olurlar.

Esansiyal mineral besinler arasında azot (N) en fazla gereksinim duyulan ve bununla birlikte büyüme ve gelişme üzerine sınırlayıcı etkisi çoğu durumda en yüksek olan elementtir. Bitkiler gelişim evrelerinin hemen her döneminde azota ihtiyaç duyarlar. N bitki kuru ağırlığının yaklaşık %2'sini oluşturur ve proteinlerin yapı taşı olan nükleozit fosfatlar ve aminoasitlerin, nükleik asitler, birçok kofaktör ve bitki sekonder ürününün bileşeni olması sebebiyle metabolizmadan kaynak paylaşımına, büyüme ve gelişmeye kadar bitki fonksiyonlarının tüm düzeylerinde önemli roller oynar (Crawford 1995; Stitt and Krapp 1999).

Bu doktora tezinde farklı azot kaynaklarına cevapta hücrel redoks homeostazisinin sağlanması için kullanılan temel biyokimyasal proseslerden ve muhtemel oksidatif strese doğacak hücrel redoks durumunda meydana gelen değişime bitki fizyolojisi

çalışmalarında model olarak kullanılan *Arabidopsis thaliana* bitkisinin kök ve *Nicotiana tabacum* cv. BY-2 hücrelerinin verdiği cevapları tanımlamak hedeflenmiştir.

1.2. *Arabidopsis thaliana* L.

Alem	:	Plantae
Bölüm	:	Magnoliophyta
Sınıf	:	Magnoliopsida
Takım	:	Brassicales
Familya	:	Brassicaceae
Alt Familya	:	Brassicoideae
Cins	:	<i>Arabidopsis</i>
Tür	:	<i>Arabidopsis thaliana</i> L.



Arabidopsis thaliana (tere otu), yaşam döngüsünün nispeten kısa olması nedeniyle bitki biyolojisi ve genetik çalışmalarında model bir organizma olarak kullanılmaktadır. *Arabidopsis* genomu (bir organizmanın kromozomlarında bulunan genetik şifrelerin tamamını simgeler) bilinen en küçük bitki genomlarından biridir (Leutwiler *et al.* 1984) ve genomu sekanslanan ilk bitkidir. Bu çalışmada, azot kaynaklarındaki değişime cevapta hücrel redoks homeostazisinin yeniden düzenlenme mekanizmasını araştırmak amaçlı olarak kök hücrelerinin yeni azot kaynağına cevapta verdikleri transkripsiyonel ve post-trasnlasyonal cevapların anlaşılması için materyal olarak özellikle bitki moleküler biyolojisi çalışmalarında kullanılan model bir organizma olan *Arabidopsis thaliana* bitkisi kullanılmıştır.

Habitat, morfoloji ve yaşam döngüsü: *Arabidopsis thaliana*, Avrupa, Asya ve kuzeybatı Afrika’da doğal yayılım gösteren 20-25 santimetre boya kadar büyüeyebilen, gösterişsiz, kısa, tek yıllık otsu çiçekli bir rozet bitkisi olup, internodu yuvarlaktır (<http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?3769>). Dipteki yaprakları genelde

tırtıllı, buna karşın internod yaprakları genelde düzdür. Beyaz olarak çiçek açar ve çiçeklenme zamanı Nisan'dan Mayıs'a kadardır. Çiçekleri 2-4 milimetre kadardır. Meyvesi 5-20 mm uzunluğunda hardalsı, 20-30 tohum içerir (Blamey and Grey-Wilson 1989). Bundan başka, 10 cm ile 20 cm'ye kadar boya ulaşabilen bezelye kabuğu şeklinde meyveleri de vardır. Kökü ortalama 40 cm derinliğindedir. Kökleri *Bacillus megaterium* gibi rizosfer bakterileri ile interaksiyonlar oluşturabilir (Lopez-Bucio *et al.* 2007). *Arabidopsis* toplam yaşam döngüsünü altı haftada tamamlayabilir. Çiçeklenme, tohum ekildikten yaklaşık üç hafta sonra gerçekleşebilir ve çiçekler doğal olarak kendi kendine tozlaşır. Laboratuarlarda *Arabidopsis* petri kutuları, hidroponik veya saksılarda, floresans ışıklar altında veya seralarda yetiştirilmektedir.

Model organizma olarak kullanımı: *Arabidopsis*, genetik ve bitki büyümesini içeren bitki bilimleri çalışmalarında model organizma olarak geniş bir şekilde kullanılmaktadır. Fare ve meyve sineklerinin hayvan biyolojisinde oynadığı rolü bitki biyolojisinde *Arabidopsis* üstlenmiştir. Yaklaşık olarak 157 milyon baz çifti (Bennett *et al.* 2003) ve beş kromozomu ile küçük bir genomu sahip olması *Arabidopsis thaliana*'yı genetik haritalama ve sekans analizleri için kullanışlı bir model organizma haline getirmiştir. Genomu sekanslanan ilk bitkidir, tüm genom haritası 2000 yılında Arabidopsis Genome Initiative Organizasyonu tarafından çıkarılmıştır (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). *Arabidopsis thaliana* genomunun sürekli olarak en son yenilenen durumu ve değişimler “The Arabidopsis Information Resource (TAIR)” tarafından sürekli yenilenmekte ve www.arabidopsis.org sitesi aracılığıyla bilim adamlarının bilgisine ücretsiz olarak sunulmaktadır. *Arabidopsis*'in 27000 geni ve bu genlerin kodladığı 35000 proteinin fonksiyonlarını belirleme çalışmaları genom haritasının çıkarıldığı 2000 yılından bu yana hiç hız kaybetmemiştir.

Bu bitkinin boyutunun küçük ve hızlı yaşam döngüsüne sahip olması araştırmalarda kullanımı için ilave pozitif özellikleridir. Hızlı yaşam döngüsü sayesinde kolayca mutant bireyler elde edilebilmektedir. Bundan başka tek bir bitkiden binlerce tohum alınabilir. Tüm bu özellikleri sayesinde *Arabidopsis thaliana* model bir organizma olarak değer kazanmıştır.

Agrobacterium tumefaciens kullanılarak bitki genomuna DNA'nın transferi ile *Arabidopsis*'te gen transformasyonu rutin yapılan deneyler haline almıştır. Örneğin son zamanlarda popüler bir şekilde kullanılan “floral-dip” adı verilen bir metodla basitçe bir çiçeği *Agrobacterium*, ilgilenilen DNA ve bir çeşit deterjan içeren bir solusyona daldırarak gen transformasyonu gerçekleştirilebilir (Clough and Bent 1998; Zhang *et al.* 2006).

Genetik yapısı değiştirilmiş *Arabidopsis* türlerinin bulunduğu internet tabanlı özel kütüphaneler de oluşturulmuştur. İnternette kolayca erişilebilecek 300,000 in üzerinde bağımsız transgenik bitkilerin bilgilerine ve transgenik tohumlara da ulaşmak mümkündür. *Arabidopsis*'te çoğu gen için insersiyonal mutantlar bu koleksiyonlarda mevcuttur. TAIR (<http://www.arabidopsis.org/>) ve NASC (<http://arabidopsis.info/>) sitelerinden tohum ve DNA stokları hakkında bilgilere ulaşılabilceği gibi farklı *Arabidopsis* genetik ve moleküler biyoloji bilgilerine de ulaşılabilir. Bu siteler ayrıca yüzlerce gen ekspresyon profil deneylerinin sonuçlarının sürekli yenilenerek sunulduğu çok kapsamlı linkler, veritabanlarına ulaşım imkanları da sunmaktadır (örn, <http://www.arabidopsis.org/portals/express/microarray/microarrayDatasetsV2.jsp>).

Son olarak bu bitki ışık mikroskopi analizleri içinde oldukça uygundur. Genç fideler ve özellikle kökleri nispeten ışığa geçirgendir. Bununla beraber küçük boyuta sahip olmasıyla *Arabidopsis thaliana* bitkisi floresans ve konkofal lazer mikroskopisi kullanılarak canlı hücre resimleme çalışmalarında oldukça yaygın kullanılmaktadır (Moreno *et al.* 2006).

***Arabidopsis* çalışmalarının tarihçesi:** İlk kez onaltıncı yüzyılda Johannes Thal tarafından tarifi yapılmıştır. Bu bitkiyi Almanya'da Harz Sıradağları bölgesinde bulur ve *Pilosella siliquosa* adını verir. O zamandan beri adı defalarca değişir ve Carl von Linné'nin verdiği şu anki son şekliyle kalır. *Arabidopsis*'de ilk mutant 1873 de Alexander Braun tarafından rapor edilmiştir. Bu araştırmacı aynı reseptakulum üzerinde

iki çiçek açan bir fenotip tanımlamıştır (Yanofsky *et al.* 1990). Ancak ilk olarak 1943 yılında Friedrich Laibach (1907’de E. Strasburger’in yüksek lisans öğrencisi iken *Arabidopsis*’teki kromozom sayılarını yayınlamıştır) tarafından *Arabidopsis* model bir organizma olarak önerilmiştir. Onun öğrencisi Erna Reinholz 1945 de *Arabidopsis* üzerinde tezini x-ray mutagenезisi kullanarak üretilen ilk *Arabidopsis* koleksiyonunu tanımlayarak yayınlamıştır. Laibach çok sayıda *Arabidopsis* ekotiplerini toplayarak *Arabidopsis* çalışmalarına önemli katkılarda bulunmuştur. Albert Kranz’ın da katkılarıyla toplanan ekotiplerle bu gün yaklaşık olarak 750 doğal *Arabidopsis* ekotipinin temelleri atılmıştır (http://en.wikipedia.org/wiki/Arabidopsis_thaliana).

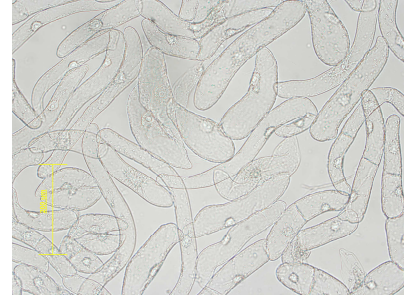
John Langridge ve George Redei (1950-1960’larda) biyolojik laboratuvar deneyleri için kullanışlı bir organizma olarak *Arabidopsis*’in kullanımı konusunda önemli katkılarda bulunmuşlardır. Redei bu model bitkiyi bilimsel topluma tanıtmak için çok sayıda derleme yayınlamıştır. Arabidopsis Araştırma Topluluğunun (ARA) temelleri 1964 de atılmış ve Arabidopsis Bilgi Servisi (AIS) olarak adlandırılan bir haber bülteni serisi ile başlamıştır. İlk uluslararası *Arabidopsis* konferansı Almanya’nın Göttingen kentinde 1965 yılında düzenlenmiştir (http://en.wikipedia.org/wiki/Arabidopsis_thaliana).

Arabidopsis tüm dünyada bitki araştırma laboratuvarlarında yaygın bir şekilde kullanılmaya 1980’lerde başladı. Tütün, mısır ve petunya ile birlikte çok sayıda model organizma arasında idi. Petunya ve tütün mevcut teknolojiyle kolayca transforme edilebilir oldukları için oldukça rağbet görmekteydi, mısır da bitki biyologları için genetik bir model olarak yaygın kullanılmaktaydı. Tercih edilen bir model bitki olarak kullanılmaya başlanacak olan *Arabidopsis* için dönüm noktası T-DNA aracılığıyla gerçekleştirilen ilk transformasyon çalışması (Lloyd *et al.* 1986), ve bununla birlikte klonlanan ve yayınlanan ilk genin *Arabidopsis*’te rapor edildiği 1986 yılıdır. Bu tarihten 3 yıl sonra 2000 yılına kadar tüm genetik haritası çıkarılmış olan *Arabidopsis thaliana* bitki biyologları için model bir bitki olarak kullanılmaktadır.

1.3. *Nicotiana tabacum* L.

Hücre kültürü, hücrelerin kontrollü şartlar altında yetiştirilmesi sürecidir. Hücre kültüründe belirli bir hücre serisinden çoğaltılan hücrelerde çeşitli çalışmalar yapılarak canlı ortamında (*in vivo*) yapılamayan denemeler yapılabilir ve burdan yola çıkılarak sonuçlara ulaşılabilir. Farklı azot kaynaklarına cevapta bir bitkisel hücrenin solunum oranında meydana gelecek muhtemel değişiklikler ve bununla birlikte alternatif solunum yollarının kalbi durumunda olan alternatif oksidaz enziminin aktivasyon durumunu *in vivo* olarak belirlemek amacıyla Tobacco BY-2 hücrelerinden faydalanıldı.

Alem	:	Plantae
Sınıf	:	Magnoliopsida
Alt takım	:	Solanales
Familya	:	Solanaceae
Cins	:	<i>Nicotiana</i>
Tür	:	<i>Nicotiana tabacum</i>
Kültivar	:	<i>Nicotiana tabacum</i> cv Bright Yellow-2



Tobacco BY-2 hücreleri *Nicotiana tabacum* cv. BY-2 (tütün bitkisinin Bright Yellow-2 kültürü) bitkisinin kallusundan (organize olmamış parankima hücrelerinin kitlesel yapısı) elde edilmiş bitki hücreleridir.

Tobacco BY-2 hücreleri yeşil olmayan, hızlı büyüme gösteren bitki hücreleridir. İyi kültür şartlarında ve yeterli kültür ortamında bir haftada sayılarını 100 kata kadar artırabilirler. Tütün bitkisinin bu kültürü genellikle hücre kültürü ve özellikle hücre süspansiyon kültürü şeklinde muhafaza edilir. Hücre süspansiyon kültürlerinde, hücrelerin her biri kültür ortamında bağımsız veya birbirine bağlı kısa hücre zincirleri oluşturmuş şekilde yüzerler. Kültür ortamında bulunan hücrelerin her biri birbirlerine benzer özellikler sergiler. İnsan çalışmaları için kullanılan HeLa hücreleri (ilk olarak 1952 de bir insan servikal karsinomasından alınmış olan sürekli büyüme yeteneği

sergileyen hücreler süspansiyon kültürler şeklinde insan kanser çalışmalarında model hücre serileri olarak kullanılmaktadır) ne ise bitki biyolojisi çalışmaları için de Tobacco BY-2 hücreleri odur. Organizmanın nispeten basit olması biyolojik süreç çalışmalarını daha kolay hale getirmekte ve daha karmaşık organizmaların mekanizma işleyişlerini anlamak açısından çoğu çalışmada ilk basamağı oluşturmuştur.

Önemi: Tobacco BY-2 hücreleri yüksek homojenizasyonları ve bir bitki hücresinin genel özelliklerini sergileyen yüksek büyüme hızları sayesinde özellikle bitki fizyologları ve moleküler biyologlar tarafından model hücre sistemleri olarak kullanılmaktadır. Doğal olarak büyüyen bir bitkide herhangi bir bölgede bulunan hücre tiplerinin değişimi bitki hücrelerinin *in vivo* olarak genel biyokimyasal mekanizmalarını anlama çalışmalarını oldukça güç hale sokar. Tobacco BY-2 gibi hücre süspansiyon kültürleri hücre ve doku düzeyinde yüksek homojenizasyon göstermeleri sebebiyle *in vivo* çalışmalar için iyi bir model sistem ödevi görür. Hücreler çoğunlukla birbirlerinden ayrı olduklarından hücrelerin birbirleri üzerine olan etkileri canlı bitki dokusundaki kadar önemli değildir. Dolayısıyla uygulama yapıldıktan sonra gözlenen *in vivo* değişimlerin uygulamanın etkisinden mi kaynaklandığı sorusunu şüpheye sokacak muhtemel organizmal etkiler elimine edilmiştir. Bu model bitki sistemi özellikle hücre bölünmesi, sitoskeletonlar, bitki hormon sinyali, intrasellular haberleşme ve organel farklılaşması çalışmalarında çok yaygın olarak kullanılmaktadır.

1.4. Azot Alınımı

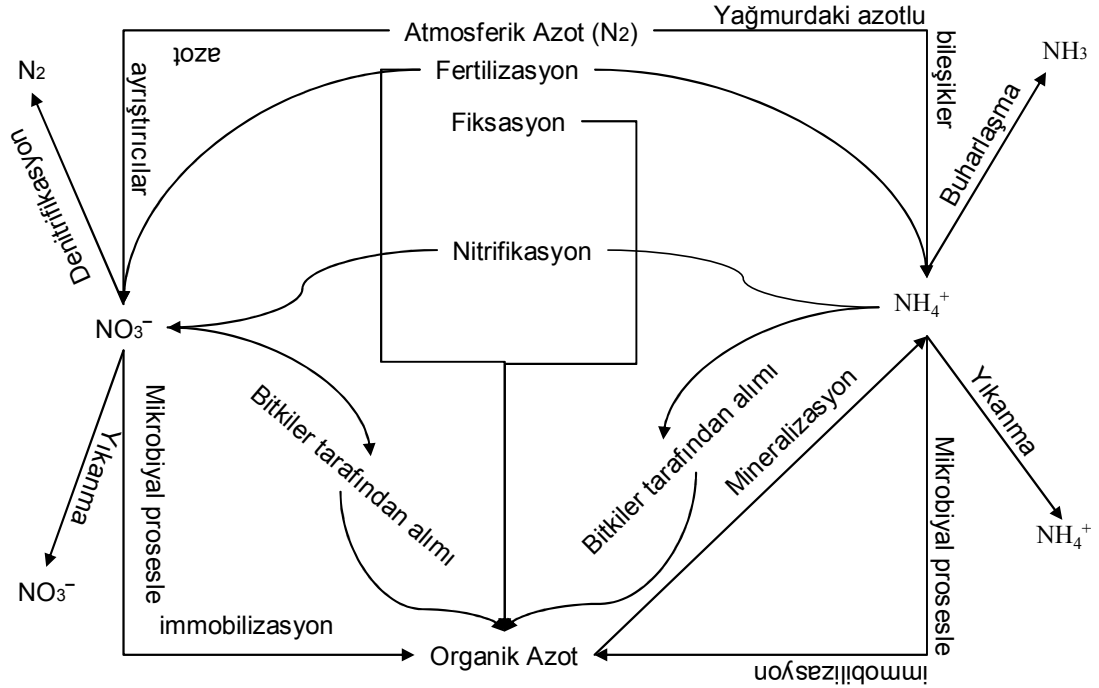
1.4.1. Toprakta Azot

1.4.1.a. Azotun orjinleri ve formları

Azot bitki dokularında oksijen, karbon ve hidrojenden sonra miktarsal olarak en bol bulunan elementtir, ancak bitkiler atmosferik azotun (N_2) yalnızca çok küçük bir

miktarını (%0.00024) kökler tarafından direkt olarak asimile edebilirler (Rosswall 1983). Doğal süreçte yaklaşık 90×10^{12} gr/yıl atmosferik azotun şimşek, fotokimyasal reaksiyonlar veya biyolojik azot fiksasyonu sayesinde toprağa bağlanmaktadır. Şimşek azot fiksasyonunun yaklaşık %8'inden sorumludur. Şimşek su buharı ve oksijeni yüksek derecede reaktif hidroksil serbest radikalleri, serbest hidrojen atomları ve serbest oksijen atomlarına dönüştürür. Onlarda moleküler azot (N_2) ile reaksiyona girerek nitrik asiti (HNO_3) oluşturur. Nitrik asit sonradan yağmurla birlikte yeryüzüne düşer. Azot fiksasyonunun yaklaşık olarak %2'si, HNO_3 üreten nitrik oksit (NO) ile ozon (O_3) gazları arasındaki fotokimyasal yollardan sağlanır. Nihayet geriye kalan %90'ı da, bakteri veya mavi-yeşil alglerin N_2 u NH_4^+ şeklinde bağladığı biyolojik azot fiksasyonunun sonucudur. Toprakta bulunan bazı mikroorganizmalarla simbiyotik işbirliği içerisinde atmosferik azotu fikse edebilme yeteneğine sahip olan bir grup bitki türlerinin yanında çoğu bitki topraktan inorganik azot formlarının direkt alımını tercih etmiştir.

Toprakta azot organik ve inorganik formlarda kompleks bir karışım olarak bulunur ve mevsimsel ve diurnal değişimlerle de toprak içerisinde heterojen dağılımlarında oransal değişimler gözlenebilir. Bir azot formunun diğerine dönüşümü ve organik Azotun mikrobiyal olarak uygun forma dönüştürülmesi ve bitkiler tarafından absorpsiyonu gibi olaylar “azot döngüsü” olarak bilinir (Şekil 1.1). Topraktaki azotun büyük bir kısmı toprak mikroorganizmaları tarafından (bakteri ve funguslar) mineralizasyonla NH_4^+ formunda kompleks organik molekül formları şeklinde bulunur. Amonyum daha sonra nitrifikasyon adı verilen bir prosesle nitrata (NO_3^-) okside edilir (Nitrosomonas spp.: $NH_3 + 1/2 O_2 \rightarrow NO_2^- + H_2O + H^+$, Nitrobacter spp.: $NO_2^- + 1/2 O_2 \rightarrow NO_3^-$). Düşük toprak pH'sı, anaerobik şartlar, toprak suyunun azlığı ve 5 °C nin altındaki ve 40 °C üzerindeki sıcaklıklar nitrifikasyonu negatif yönde etkiler. Benzer şekilde denitrifikasyon olarak bilinen nitratin elektron akseptörü olarak O_2 yerine kullanımı ile nitrat da nitrojen gazlarına (N_2 , N_2O , NO, NO_2^-) dönüşebilir. Denitrifikasyon O_2 miktarının az, NO_3^- konsantrasyonunun fazla, toprak neminin yüksek, toprakta kullanılabilir karbohidrat miktarının yüksek ve toprağın sıcak olduğu durumlarda meydana gelir (Luo *et al.* 2000; Strong and Fillery 2002).



Şekil 1.1. Azot Döngüsü. Azot atmosferde çok bol miktarda bulunur fakat inert formda (N_2) bulunan bu azotu bitkiler direkt olarak kullanamaz. Azot döngüsünde, mevcut atmosferik azotun bir kısmı biyolojik olarak kullanılabilir formlara dönüştürülür.

Mikroorganizmalar da ortamda yeterli karbon bulunduğunda inorganik azotu kullanırlar ve bu durum bitkiler için mevcut kullanılabilir N miktarının azalmasına yol açabilir. Toprak azotu için mikroorganizmalar ve bitkiler arasındaki rekabetin kapsamı, azotun değişen miktarlarda ve oranlarda bulunduğu farklı şekilde döngüye uğramasından ve mikorizal simbiyozis gibi olaylardan dolayı oldukça karmaşıktır (Hodge *et al.* 2001).

Bitkiler için kullanılabilir N varlığı mineralizasyon, nitrifikasyon ve denitrifikasyon arasındaki dengeye bağlıdır. Mineralizasyon oranı toprağın havalanması, su içeriği, sıcaklığı gibi mikrobiyal aktiviteleri etkileyen faktörlere bağlıdır (Lewis 1986). Eğer mineralizasyon hızlı ise, amonyumun amonyağa buharlaşması durumu gerçekleşebilir. Bu durum toprak pH'sının bazik olduğu durumlarda gerçekleşebilir ve toprağın asidifikasyonu ile sonuçlanabilir (Dejoux *et al.* 2000). Temel olarak N döngüsünün biyolojik komponentlerinin bir sonucu olarak topraktaki NO_3^- ve NH_4^+ miktarları

mevsimlere, bölgelere göre değişir ve toprak profilindeki N formunda yıkanma, toprak sıcaklığı ve topraktaki su miktarına bağlı olarak değişiklik gösterir (Bloom 1988).

Bölgelere göre oldukça değişkenlik göstermekle birlikte organik N ayrışımı ile toplam toprak azotunun %0.1-50'si oluşur (Barber,1984). Üre-tabanlı gübrelerle olan zirai tercih topraktaki organik N miktarının artmasına katkıda bulunmaktadır. Organik N peptid ve protein formlarında (%99.5'i protein-humus kompleksleri ve peptidler şeklinde) ve geri kalanı da serbest aminoasitler şeklindedir (Jones *et al.* 2002). Toprak mikroorganizmaları proteinleri ve peptidleri aminoasit ünitelerine parçalayacak olan proteazları toprağa salgırlar (Owen and Jones 2001). Bu aminoasitler toprak partiküllerine güçlü bir şekilde bağlanmazlar, böylece toprakta serbest aminoasitler şeklinde bulunurlar. Zirai topraklarda aminoasit konsantrasyonlarının genel olarak 1 ila 100 μM arasında değiştiği rapor edilmiştir (Owen and Jones 2001). Topraktaki aminoazotun en önemli kaynakları olarak vejetasyon, fauna, mikroorganizmalar ve topraktaki yaş ve kuru tortular gösterilmektedir. Bitki dokularındaki aminoasitlerin konsantrasyonu genel olarak 1-10 mM arasında değişir ve bu da bitkileri toprak için organik azot kaynağı bakımından önemli bir faktör yapar. Aminoasitler yüksek enlemlerdeki ekosistemlerde baskın N formu olabilir. Mineralizasyon toprak sıcaklığına bağlı olduğu için soğuk anaerobik topraklar N mineralizasyonunu ve aerobik nitrifikasyonunu kısıtlar ve bu da bu tür topraklarda amino bileşiklerin miktarının artmasıyla sonuçlanır (Atkin 1996). Tersine, sıcak iklimlerin görüldüğü çoğu aerobik topraklar mineralizasyonun hızlı olmasından dolayı az miktarda amino N içerirler.

Bitkiler tarafından kullanılan inorganik N formları NO_3^- ve NH_4^+ 'dur. Topraktaki nitrit miktarı toprakta ve rizosferdeki N bileşiklerinin transformasyonu ve organik atıklar sebebiyle veya düşük oksijen stresi durumlarında NO_3^- içeren köklerde artabilir (Breteler and Luczak 1982). Azotun kullanıma daha hazır bir formu olan NH_4^+ yerine çoğu zirai topraklarda bitki kökleri azotu çoğunlukla NO_3^- formunda alırlar. Bunun sebebi nitratin genel olarak nitrit veya amonyumdan daha bol miktarlarda bulunması ve toprağın negatif yükle yüklenmeye olan eğiliminden dolayı kök içerisinde serbest taşınımı gerçekleştirilebilmesi olabilir (Reisenauer 1978). Nitratin toprakta difüzyon

hızının yüksek olması yıkanma ile topraktaki miktarının daha kolay azalmasına katkıda bulunur. Yıkanma ile topraktaki kullanılabilir NO_3^- miktarının bazı topraklarda yaklaşık olarak yılda %30 olabildiği rapor edilmiştir (De Willigen 1986). Nitratın tarımsal arazilerde konsantrasyonu 1-5 mM düzeyindedir (Owen and Jones 2001). Topraktaki nitratın bitkiler ve mikroorganizmalar tarafından kullanılması ve nitratın topraktan kolay süzülebilirliği sebeplerinden dolayı topraktaki NO_3^- miktarı çok değişkenlik gösterebilmektedir. Doğal sistemlerde N nispeten etkili bir biçimde kullanılır. Bununla birlikte değişen miktarlarda N denitrifikasyon ve yıkanma (süzülme) ile kaybedilir, örneğin doğal sistemlerin suyla yıkandığı yerler 5-10 μM gibi çok düşük konsantrasyonlarda NO_3^- içerir (Hagedorn *et al.* 2001).

Zirai topraklardaki amonyum konsantrasyonu genel olarak 20-200 μM arasında değişir (Owen and Jones 2001). Ancak, düşük pH, düşük sıcaklık, toprakta fenol-kaynaklı allelopatik bileşiklerin birikimi ve anaerobik topraklar nitrifikasyonu inhibe eder ve bu da toprakta NH_4^+ birikimiyle sonuçlanır (Britto and Kronzucker 2002). Amonyum toprakta nitrate nazaran toprak partiküllerine daha güçlü bağlanır ve daha zor süzülür. Bundan başka insan kaynaklı zirai ve endüstriyel aktiviteler çoğu zirai topraklarda NH_4^+ birikimi ile sonuçlanır. Böylece bazı sistemlerde NH_4^+ konsantrasyonları bazı ormanlarda 2 mM ve bazı tarım alanlarında 20 mM a kadar yükselebilmekte ve buda amonyumuu baskın N kaynağı yapmaktadır (Britto and Kronzucker 2002). Amonyumun bu yüksek konsantrasyonları bazı bitki türleri için toksiktir ve bu toksisitesinin pH dengesinde meydana getirdiği değişimden (Raven and Smith 1976), anyon/kasyon dengesizliğinden (Chaillou and Lamaze 2001), ve/veya iyon akışından kaynaklanan enerji boşalmasından (Britto and Kronzucker 2002) kaynaklandığı rapor edilmiştir.

1.4.1.b. Kök yapısı

Kök sisteminin boyutu ve morfolojik yapısı yeterli N alımı için önemli özelliklerdir. Kökün morfolojik yapısı kök dallanmasıyla belirlenir. Kök sistemlerinin morfolojik yapısı ve türe özgü boyutu ayrıca pek çok fiziksel, kimyasal ve biyolojik faktörler

tarafından da belirlenmektedir. Genel olarak toprakta N sınırlı konsantrasyonlarda bulunduğunda bitkinin diğer kısımlarına oranla kök uzunluğu ve toplam kütlesi artar. Azot açlığı yapraklarda nişasta birikimine ve fotosentetik ürünlerin köklere taşınımında artışa sebep olur ki bu da gövde/kök uzunluğu oranında bir azalmaya sebep olur (Rufty *et al.* 1988). Vessey and Layzell (1987) *Glycine max*'a artan konsantrasyonlarda azot uyguladıklarında ancak köklerde gereksinimi karşılandıktan sonra arta kalan azotun gövde ve yapraklara taşındığını göstermişlerdir. Bu da N kıtlığında önceliğin köklerdeki N ihtiyacını karşılamak olduğunu göstermiştir. Böylece azot açlığında veya kıtlığında kök büyümesi, diğer organlara kıyasla artar.

Köklerde N varlığının büyüme üzerine etkileri ve karbon paylaşımında etkileri ile ilgili çeşitli çalışmalar rapor edilmiştir. Nitrata Redüktaz (NR) enzimini kodlayan gen baskılanmış *A. thaliana* (Zhang *et al.* 1999) ve *Nicotiana plumbaginifolia* (Scheible *et al.* 1997) bitkilerinde yapılan çalışmalarda ortama N kaynağı olarak NO_3^- verildiğinde NO_3^- birikimi ile ortaya çıkan sistemik sinyallerin kök büyümesini hızlandırdığı rapor edilmiştir. Bu çalışmalarda ileri sürülen anafikir takibeden çalışmalarla desteklenmiş ve ilave olarak, N kaynağı şeklinde *Arabidopsis*'e glutamin (Tranbarger *et al.* 2003) veya NH_4^+ (Zhang *et al.* 1999) verildiğinde *Arabidopsis* köklerinde kök büyümesinin baskılanmadığı raporlarıyla desteklenmiştir. Bundan başka, azotun kök morfolojik yapısına etkisi üzerine yapılan çalışmalar N durumu ile ilgili olan kök büyümesini düzenleyen sistemik sinyalin hormonal olarak oksin (Zhang and Forde 2000) veya absisik asit (Signora *et al.* 2001) olduğu da rapor edilmiştir. Azot açlığında gövde/kök büyümesi oranındaki azalmanın bitkilerin N kazanım kapasitesini artırmak amaçlı olduğuna dair çok sayıda çalışma da rapor edilmiştir (Brouwer 1981; Khamis and Lamaze 1990; Rufty *et al.* 1990). Ancak her durumda kökün absorptif yüzey alanı üzerine çok büyük bir etkisi olan kök tüylerinin sayısı, boyutu ve yerleşimi belkide N alımında en önemli parametrelerdir.

1.5. Azot Asimilasyonu

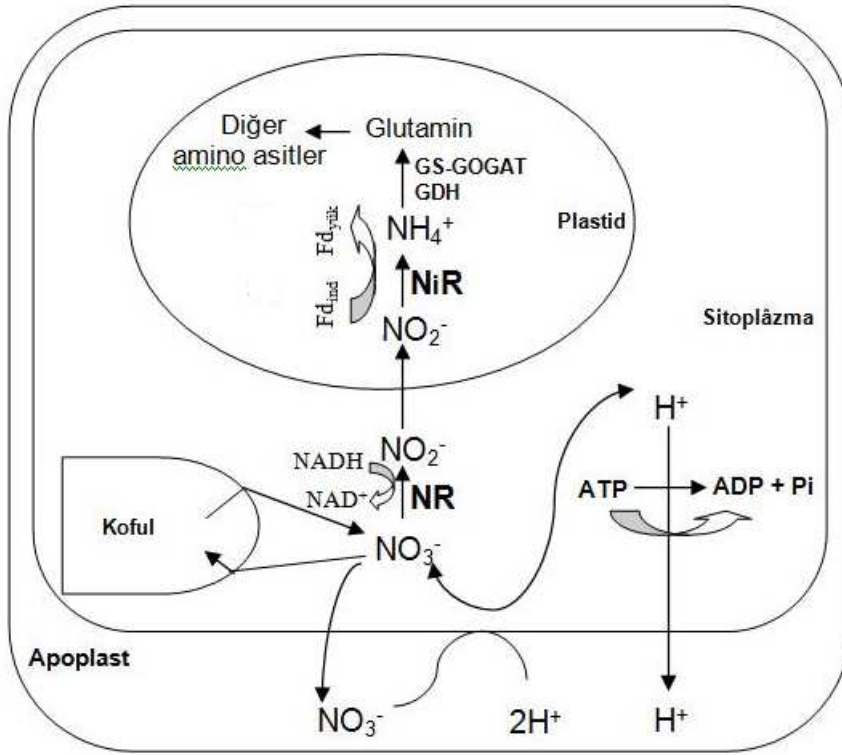
1.5.1. Organik Azot asimilasyonu

Üre en yaygın N gübresi olarak kullanılmakta ve en önemli kaynağını da hayvan türevli artıklar oluşturmaktadır. Organik kaynaklardan gelen ürenin genel olarak inorganik azot formu olan amonyuma dönüştürüldüğü ve böylece amonyumun bitkiler tarafından kullanıldığı kabul edilmektedir. Ancak bitkilerin yapraklarına üre uygulandığında (Leacox and Syversten 1995) ve steril kültürlerde azot kaynağı olarak üre verildiğinde üreyi direkt N kaynağı olarak kullanabildikleri de bilinmektedir (Harper 1984). Hidroponik olarak yetiştirilmiş domates bitkilerinin N kaynağı olarak yalnızca üre verildiğinde önemli miktarda ^{15}N -üre yi kullandıkları gösterilmiştir (Tan *et al.* 2000). Ancak, alınan ^{15}N -üre nin %84-94'ünün tekrar üreye dönüştürüldüğü gözlenmiştir. Bu da domateste köklerle ürenin alım hızına oranla üre metabolizmasının çok yavaş olduğunu göstermiştir. Üreaz, bitkisel organizmaların tüm organlarında bulunan ve arginin katabolizmasından üre oluşumunu katalizleyen bir enzimdir. Ortamdaki üre miktarının üreaz enziminin aktivitesi üzerine etkili olduğu yönünde iddialar olsa da bu durumun bakterial üreaz aktivitesini artırdığı, bitkilerde içsel üreaz aktivitesi üzerine etkisi olamayacağı rapor edilmiştir. Patates (Witte *et al.* 2002) ve kolza yapraklarına (Gerendas and Sattelmacher 1999) üre uygulandığında üreaz aktivitesinde bir artış gözlenmemiştir. Ancak, Witte *et al.* (2002) uygulanan üre metabolizmasıyla bitkilerdeki üreaz aktivitesi arasında bir ilişki olduğunu göstermişlerdir. Benzer şekilde Gerendas and Sattelmacher (1997), kabakta (*Cucurbita pepo*) nikel eksikliğinin, aktivasyonu için nikel ihtiyacı duyan üreaz enzimi ve üre metabolizmasını inhibe ettiğini göstermiştir. Üreaz aktivitesinin yaşlı dokularda artması da senesense uğrayacak yapraklardan N kazanımında önemli bir rol oynayabileceği de rapor edilmiştir (Witte *et al.* 2002). Ürenin toprakta çok hızlı bir şekilde hidrolize edildiği için bu formuyla köklere alınma olasılığı çok kuvvetli değildir. Bu sebepten dolayı bitkilerde üre asimilasyonu topraktan N kazanımında öncelikli ve önemli düzeyde bir yeri olduğu söylenemez.

1.5.2. İnorganik Azot asimilasyonu

Bitkiler tarafından kullanılan mineral besinler arasında inorganik azot yükseltgenmiş (NO_3^-) veya indirgenmiş (NH_4^+) formda bulunan tek mineraldir. Neredeyse bütün bitkiler azot kaynağı olarak nitrat veya amonyumu kullanabilirler ve kök hücrelerinde bu azot formları için özelleşmiş transmembran taşıyıcılarına sahiptirler. Nitrat genel olarak toprakta bulunan baskın azot formudur, ancak bazı çevrelerde (asidik ve/veya çoğunlukla tropik ve kuzey ılıman ikliminin görüldüğü bölgelerdeki suya doymuş topraklar) azot formu olarak amonyumunda bol miktarda bulunmasıyla birlikte çok değişkenlik gösterebilir (Falkengren-Grerup 1995; Herrera-Estrella 1999).

Topraktan alınan amonyum asimilasyon için direkt olarak plastidlere taşınabilir. Ancak kökler tarafından $\text{H}^+ - \text{NO}_3^-$ simporter yolu ile alınan nitratın asimilasyonu nitratın sitosole taşınması ve burada nitrat redüktazın nitratı nitrite indirgemesi ile devam eder. Daha sonra nitrit redüktaz plastidlerde nitriti amonyuma indirger ve son olarak ta glutamin sentetaz - glutamat sentaz enzimatik reaksiyonlarıyla (GS-GOGAT) amonyum, aminoasitlerin yapısına katılır (Şekil 1.2.). Burada nitrat indirgenmesi için NAD(P)H , nitrit indirgenmesi için ise ferrodoksin indirgeyicileri kullanılır. İndirgeyiciler yeşil dokularda elektron transportundan, diğer dokularda ise oksidatif pentoz fosfat yolundan gelirler (Crawford 1995; Heldt 1997; Stitt and Krapp 1999). Bununla birlikte nitrat redüksiyonu ile OH^- iyonları üretildiğinden dolayı, amonyumun aminoasitlerin yapısına katılması ve hücrel pH'nın devamlılığı için organik asitler gereklidir (Escobar *et al.* 2006). Azotun bitki metabolizmasındaki merkezi rolü bir yana, N asimilasyonu için gerekli reaksiyonlar serisi bitkilerde en büyük redoks havuzlarından birisidir (Crawford and Forde 2002; Escobar *et al.* 2006). Fotosentezden kalan indirgeyicilerin yaklaşık %12-25'i ve Calvin yolunda karbon asimilasyonu için kullanılanlardan arta kalan indirgeyicilerin büyük çoğunluğu nitrat indirgenmesinde kullanılır.



Şekil 1.2. Bitkisel hücrelerde NO_3^- alımı, indirgenmesi ve asimilasyonunun şematik gösterimi.

*NR, nitrat redüktaz; NiR, nitrit redüktaz; GS, glutamin sentetaz; GOGAT, glutamat-2-oxoglutarat aminotransferaz; GDH, glutamat dehidrogenaz; $\text{Fd}_{\text{ind/yük}}$, indirgenmiş veya yükseltgenmiş ferredoksin. (Crawford *et al.* (2000) den modifiye edilmiştir). Nitratın asimilasyonu esnasında oluşan nitrit son derece reaktif ve toksik potansiyele sahip bir iyon olduğundan dolayı hızla sitosolden yapraklardaki kloroplastlara ve köklerdeki plastidlere gönderilir. Nitritin amonyuma indirgenmesi eğer kök hücrelerinde gerçekleştiriliyorsa köklerde NAD(P)H harcanır.

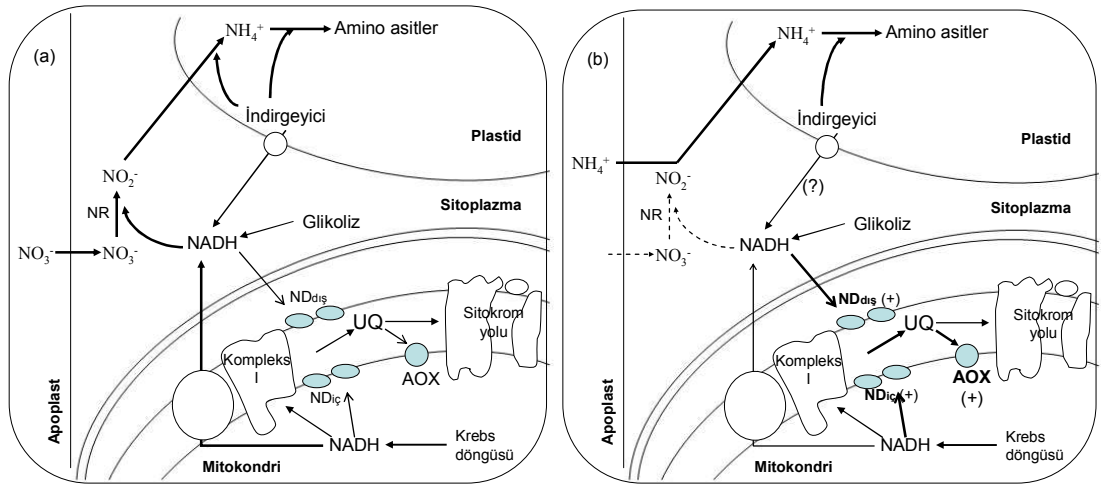
Hücrel enerji düzeylerindeki ve redoks durumundaki zıt etkilerinin yanında azot kaynağı olarak amonyum ve nitrat sağlanan bitkiler arasında çok sayıda fizyolojik farklılıklar tanımlanmıştır. Örneğin, azot kaynağı olarak nitrat sağlanmış bitkilerde amonyum sağlananlara nazaran organik asit içerikleri daha yüksek düzeyde iken, aminoasit düzeyleri daha düşük düzeyde oldukları belirlenmiştir (Chaillou *et al.* 1991; Cramer and Lewis 1993; Pasqualini *et al.* 2001). NiR ve NR dahil çok sayıda enzimin nitratla aktivasyonunun hızlandığı gözlemlenirken glutamat dehidrogenaz, çok sayıda alternatif oksidazlar, ve çeşitli tip II NAD(P)H dehidrogenazların da yalnızca amonyum tarafından aktive oldukları rapor edilmiştir (Goodchild and Givan 1990; Frechilla *et al.* 2002; Escobar *et al.* 2006). Nitrat ve amonyum her ikisinin alımıyla da temelde karbonhidrat sentezinin yavaşlaması ve organik asit sentezi için karbon akışının

hızlanması olaylarıyla birlikte metabolizma aslında yeniden düzenlenir (Larsen *et al.* 1981; Scheible *et al.* 1997). Bu benzerliklere rağmen azot kaynağı olarak nitrat ve amonyum ne fonksiyonel olarak ve ne de fizyolojik olarak birbirlerinin yerini tam olarak tutarlar. Nitrat alımı toprak alkalizasyonunun ve amonyum alımı toprak asidifikasyonunun artmasına sebep olur. Bu suretle nitrat ve amonyum ekstrasellular pH üzerine farklı etkilere sahiptirler (Crawford and Forde 2002). Bununla birlikte, uzun dönemlerde azot kaynağı olarak yalnız amonyum sağlanan bitkilerde büyüme oldukça yavaş gerçekleşir ve bu sebebin altında yatan “amonyum toksisitesi” mekanizmaları henüz yeterince anlaşılamamıştır. Amonyum ve nitrat asimilasyonunun hücrel indirgeyicilere olan talepleri oldukça farklıdır. Şekil 1.3’de görüldüğü üzere nitrat asimilasyonu ilave NADH (sitosolde) ve NADPH lara (plastidte) ihtiyaç duyduğundan amonyuma nazaran enerji gereksinimi çok daha fazladır (Salsac *et al.* 1987).

Nitrata nazaran, bitki metabolizmasında, asimilasyonu için daha az enerjiye gereksinimi olduğu göz önünde bulundurulunca teorikte N kaynağı olarak amonyumun tercih edilmesi mantıklıdır. Diğer taraftan nitrat asimilasyonu sitosolik NADH ların ve plastidlerdeki indirgenmiş ferrodoksinlerin oksidasyonu için önemli bir indirgeyici havuz oluşturduğu (Noctor and Foyer 1998) göz önüne alınırsa buradan da hücrel redoks durumunun, N kaynağı olarak amonyum veya nitrat ile beslenen bitkilerde ve hatta N kaynağı değiştirilen aynı bitkide farklı olması / yeniden düzenlenmesi sonucu çıkarılabilir.

Azot kaynağı olarak nitrat alındığı zaman nitratın sitoplâzmada nitrite ve nitritin de plastidlerde amonyuma indirgenmesi reaksiyonları bitkilerde sitoplazmik NADH’lar ve plastidlerdeki indirgeyiciler (ışık reaksiyonları veya pentoz fosfat yolundan sağlanan ferrodoksin veya NADPH) için önemli bir indirgeyici havuz oluşturur. Köklerde nitratın nitrite indirgenmesi için gerekli olan indirgeyiciler (NAD(P)H) sitoplâzmada glikoliz reaksiyonlarından, muhtemelen plastidlerde meydana gelen pentoz fosfat yolundan (sitosol ve plastidlerde pentoz fosfat yolu ile ilave indirgeyiciler oluşturulur ve bu indirgeyiciler peroksizomlarda ve kloroplastlarda amonyumun asimilasyonu için kullanılır) ve çok kuvvetli bir ihtimalle mitokondrilerde meydana gelen krebs

döngüsünden sağlanır (Şekil 1.3a). Ancak eğer kökler tarafından azot kaynağı olarak amonyum alınırsa, nitratin indirgenmesinden kaynaklanan bir indirgeyici havuz olmayacağından (Şekil 1.3b) nitrat indirgenmesi ile kullanılacak olan bu indirgeyicilerinin akıbetini araştırmak amonyumun nitratla eşit konsantrasyonlarda alındığında (mM düzeyinde) neden toksisiteye sebep olduğu sorusunun mekanizmasını anlamak açısından akla gelen ilk yöntem olmalıdır. Çünkü bu indirgeyicilerin oksidasyon düzeylerinde meydana gelecek bir değişiklik hücrel redoks durumunda değişimlere sebep olacaktır.



Şekil 1.3. Azot kaynaklarındaki farklılıktan doğan indirgeyici gereksinimindeki değişime cevapta mitokondrial solunum zincirinin alternatif yollarının redoks dengelemesi üzerine bir model.

*Nitrat (a) veya amonyum (b) asimilasyonu sonucu azot ve indirgenmiş elektronların izlediği yol oklarla gösterilmiştir. (b) şeklinde kesikli oklar inaktif yolları ve ok kalınlıklarındaki değişiklikler indirgenmiş elektronlar ve Azotun akış yolunu göstermektedir. Bir reaksiyon için gösterilen daha kalın ok reaksiyonlar arasında akış hızında muhtemel bir artış olduğunu gösterir. Kısaltmalar: NR, nitrat redüktaz; UQ, ubikinon. (Escobar *et al.* (2006) dan modifiye edilmiştir).

Bitki metabolizmasında nitrat ve amonyumun farklı etki göstermelerine rağmen 15 yılı aşkın yapılmakta olan inorganik azotla beslenme çalışmaları tarımsal uygulamalarda nitratin daha büyük önemi olmasından dolayı neredeyse tamamen nitrat üzerine odaklı yürütülmüştür. Özellikle bitkilerde nitrat regülasyonundan sorumlu gen ekspresyon analizleri yaygın olarak mikrodiziler kullanılarak çalışılmaktadır (Wang *et al.* 2000, 2003, 2004; Scheible *et al.* 2004; Gifford *et al.* 2008). Bütün bu çalışmalarda azot kaynağı olarak nitrat içeren büyüme ortamlarında yetiştirilmiş ve daha sonra bir süre

azot açlığına bırakılmış *A. thaliana* fidelerine azot kaynağı olarak nitratin yeniden verilmesi ile transkript düzeylerindeki global değişimlerin monitörize edildiği benzer deneysel dizaynlar kullanılmıştır. Bu azot kaynağında “şok yenilemenin”; amino asit ve nükleik asit biyosentezi, transkripsiyon ve RNA işlenmesi, hormon biyosentezi, azot asimilasyonu, indirgeyici yenileme ve trehaloz metabolizmasının da dahil olduğu metabolik yolların regülasyonu gibi kitlesel bir transkripsiyonel cevabı teşvik ettiği rapor edilmiştir (Wang *et al.* 2003; Scheible *et al.* 2004; Gifford *et al.* 2008). Ancak, bu esansiyal makroelementin aniden varlığı ile tetiklenen “azota karşı verilen genel cevapların” ve hangilerinin nitrata verilen spesifik cevaplar (ve nitratin hücrel redoks durumu üzerine olan global etkileri) olduğu hala müphemdir.

Şu ana kadar, amonyum ve nitrata karşı farklı düzeylerde cevap veren proteinler ve spesifik genler hakkında çok az bilgiye ulaşılmıştır ve azot kaynaklarının redoks dengeleme, antioksidant havuzlar, ve reaktif oksijen türleri (ROT) üretimi üzerine etkileri hakkında herhangi bir kayıt bulunmamaktadır. Beklenebileceği gibi, nitrat redüktaz, nitrit redüktaz, ve nitrat taşıyıcısını (NRT2) kodlayan genler yalnızca nitrat tarafından eksprese edilir (Patterson *et al.* 2010). Bununla birlikte sadece bazı amonyum taşıyıcıları yalnızca amonyum tarafından aktive edilir (Migge and Becker 1996; Joo *et al.* 2001; Sonoda *et al.* 2003). Son zamanlarda küçük çaplı bir mikroyarray (5500 gen) çalışması ile uzun süreli amonyum toksisitesine maruz bırakılan *A. thaliana* bitkisinde β -oksidasyon ile ilgili genlerin eksprese oldukları gösterildi (Hoffmann 2007). Ancak gelişimsel olarak kıyaslanabilecek nitrat ile beslenmiş grubun olmayışı bu çalışmadan elde edilen sonuçları yorumlamada büyük kısıtlamalar getirmektedir. Bu noktada yapılmış olan daha uygun bir çalışma, *A. thaliana* fidelerinde azot kaynağı olarak yalnızca nitrat veya amonyum+nitrat gruplarını karşılaştırmak için seri gen ekspresyon analizleri (SAGE) kullanan Fizames *et al.* (2004) tarafından yapılan çalışmadır. 270'i nitrat veya nitrat+amonyum varlığında istatistiksel olarak önemli düzeyde farklılık sergileyen 4000 bireysel genin (*A. thaliana* ya ait genlerin %15'i) sekans analizleri yapıldı. Bir çok akuaporin, NAD izositrat dehidrogenaz, ve malat dehidrogenaz genlerinin azot kaynağı olarak amonyum+nitrat verilmiş *A. thaliana*' da yüksek düzeylerde eksprese oldukları kaydedilmiştir. Bu sonuçlar amonyum ve nitratin farklı

etkileri üzerine ilginç görüşler sağlamasına rağmen genel taslak hala belirsizdir, çünkü sonuçlar birbirinden oldukça farklı mekanizmaları işaret etmektedir.

Toprakta N kaynağı olarak hem amonyum ve hem de nitrat bulunduğu veya doğal şartlarla N kaynağının değiştiği durumlarda bitkiler yeni bir inorganik azot kaynağını asimile ederken meydana gelecek redoks dengesizliğinden kaçınmak için hücrel indirgeyici havuzları köklerde dinamik olarak ayarlanmalıdır. Bu durumla ilgili olarak, Escobar *et al.* (2006) tarafından yapılan çalışmayla amonyum ve nitrat asimilasyonunda farklılaşan indirgeyici gereksinimlerinin *A. thaliana* mitokondriyal solunum zincirindeki aktivite değişiklikleri ile paralellik gösterdiği belirlendi. N kaynağı olarak amonyum kullanıldığında solunum zinciri aktivitelerinde ve birçok gen familyasının ekspresyonunda (özellikle mitokondrilerde kristallerin iç ve dış zarlarına yerleşmiş olan NAD dehidrogenaz enzimlerini kodlayan genlerde) önemli bir artış gözlemlenirken, nitrat kullanıldığında tam tersi bir etki kaydedilmiştir. Bu sonuçlar; *A. thaliana* solunum zincirinin redoks düzenlemede kritik bir rol oynadığını ve bununla birlikte *A. thaliana* bitkisinin, basit ve fizyolojik olarak gerçekçi beslenme manipülasyonlarının hücrel redoks dengesini hızlı bir şekilde değiştirmek için kullanılabilecek evrensel bir model olarak hizmet edebileceğini gösterir.

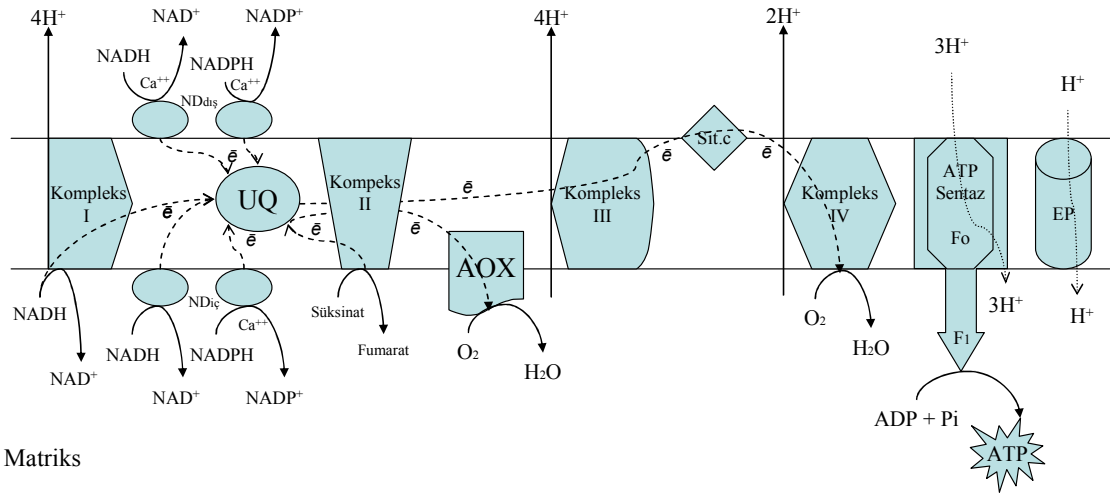
Heyecan verici olmakla birlikte şu ana kadar kaydedilen veriler bize mitokondride redoks dengeleme mekanizmaları ile ilgili sınırlı bir görüş açısı sunmaktadır. *A. thaliana*'da azot asimilasyonunun merkezi enzimatik reaksiyonları sitosöl ve plastidlerde meydana geldiği için, redoks dengeleme mekanizmaları buralarda da işlemelidir. Böylece, Hücrel redoks homeostazisi bütünüyle bir hücrel süreç olarak dikkate alınmalıdır. Doktora tezinin bu bölümündeki temel amaç, azot kaynağındaki değişimle birlikte durağan olmayan bir redoks ortamında homeostazisin sağlanması için kullanılan temel biyokimyasal proseslerden ve oksidatif strese doğan hücrel redoks durumunda meydana gelen *A. thaliana* kök hücrelerinin vereceği cevabı ayrıntılı olarak tanımlamaktır.

1. 6. Alternatif Oksidazın Redoks Yanıtları

Aerobik organizmalarda glikoliz, trikarboksilik asit döngüsü (TCA), ve mitokondriyal elektron transport sistemi (miETS) biyoenerjetik ve karbon metabolizmasının temelini oluşturur. Solunum bütün bitkilerde büyüme, hayatın devamı ve karbon dengesi için en temel ögedir. Solunum enzimlerinin büyük çoğunluğu tüm organizmalarda aynı olsa da bitki solunum sistemi, diğer çoğu organizmalarda bulunmayan metabolik bir ağ ile kuşatılmıştır. Bitkiler sitosolik glikolizis, TCA döngüsü ve miETS de değişik alternatif enzimlere sahiptirler. Bitkilerde solunum metabolizmasının değişken doğası ATP üretiminin yanı sıra çok değişik ve önemli biyosentetik role de sahip olduğunu gösterir.

Bitkiler, hayvanlar ve çoğu mantar ve tek hücrelilerde solunum zinciri temel olarak dört büyük enzim kompleksi içerir (Şekil 1.4). Kompleks I, matriksdeki NADH ları okside eder ve elektronları Ubikinon (UQ) havuzuna transfer ederek UQ'u Ubikinol (UQH₂) a indirir. Kompleks II (Süksinat dehidrogenaz), süksinatın oksidasyonu ile UQ'u indirgeyen bir membran-bağlı sitrik asit yolu enzimidir. Elektronlar; kompleks III (Sitokrom *bc₁* kompleksi), sitokrom *c* ve kompleks IV (sitokrom *c* oksidaz) den oluşan sitokrom yolunu takip eder. O₂'in H₂O'ya indirgenmesini sağlayan kompleks IV, elektron transportunda son basamağı oluşturur. Kompleks I, III ve IV mitokondri iç zarı üzerinden protonların translokasyonu için gerçekleştirilen elektron transportu ile oluşan elektrokimyasal proton gradientinden kaynaklanan enerjiyi kullanır. Zarlar arası boşluğa pompalanan protonların ATP sentaz üzerinden matrikse gelmesiyle birlikte ATP üretimi gerçekleşir (Browse *et al.* 2006). Bütün bunların yanında mitokondriyal iç zarlarda yerleşmiş fakat solunum zincirine dâhil olmayan “eşleşmeyi engelleyen proteinler” olarak adlandırılmış özel bir protein grubu da vardır. Bu proteinler ATP üretimi olmaksızın protonların zarlar arası boşluktan matrikse geçişine izin verir (Veresi 2001; Fernie *et al.* 2004).

Zarlar arası boşluk



Matriks

Şekil 1.4. Bitki mitokondri iç zarlarında yerleşmiş elektron taşıma sisteminin düzenlenişi ve ATP sentezi.

*Kompleks I-IV, ATP sentaz ve eşleşmeyi engelleyen proteinler (EP) genel olarak yüksek yapılı ökaryotlarda bulunurlar. Mitokondri iç zarlarındaki üç enzim kompleksi tarafından protonların matriksten zarlar arası boşluğa pompalanmasıyla ATP sentazın kullandığı bir proton gradyanı oluşur. Bitkiler, bunlara ilave olarak Alternatif Oksidaz (AOX) ve NAD(P)H'ların oksidasyonunu sağlayan dört ayrı, proton pompalamayan ve rotenon duyarsız NAD(P)H dehidrogenaz enzim sistemleri (ND) içerir. Ca^{++} bazı enzim aktiviteleri için gereklidir. Ubikinon (UQ) havuzu solunum zincirinin indirgenen (UQ) ve yükseltgenen (UQH₂) formlarını barındırır.

Bitkilerde spesifik alternatif solunum yollarının varlığı, proton pompalamayan tip II NAD(P)H dehidrogenazlar, elektronları direkt ubikinon havuzundan alan alternatif oksidazlar, bypass proteinleri ve eşleşmeyi engelleyen proteinlere sahip olan bitki mitokondrilerinin en seçici özelliğidir (Rasmusson *et al.* 2004; Vanlerberghe and McIntosh 1997; Vercesi 2001). Bu alternatif yollar proton pompalamaz ve elektron transfer sisteminin aşırı indirgenmesini önleyen ATP üretimiyle gelen elektronların eşleşmemesini sağlar.

Hayvanların aksine bitki, mantar ve bazı protistler, son elektron alıcısı olan O₂'e NADH ve NADPH dan gelen elektronların taşınımı için ilave enzimler içerirler (Vanlerberge and McIntosh 1997; Rasmusson *et al.* 2004). Bunlar, küçük, her biri bir tip polipeptitten oluşan ve proton pompalamayan enzimlerdir. Bununla birlikte proton pompalamayan ve iç mitokondri membranının iç ve dış yüzeylerine yerleşmiş NAD(P)H dehidrogenazlar içerirler (Şekil 1.4). Böylece bitki mitokondrileri, bu

dehidrogenazlar sayesinde matriks ve sitosölden gelen NADH ve NADPH'ları direkt olarak okside edebilme yeteneğine sahiptirler (Rasmusson *et al.* 2004). Bitki solunum zinciri ayrıca UQH₂'i okside eden ve O₂'i indirgeyen ve yine proton pompalamayan alternatif oksidaz (AOX) içerir.

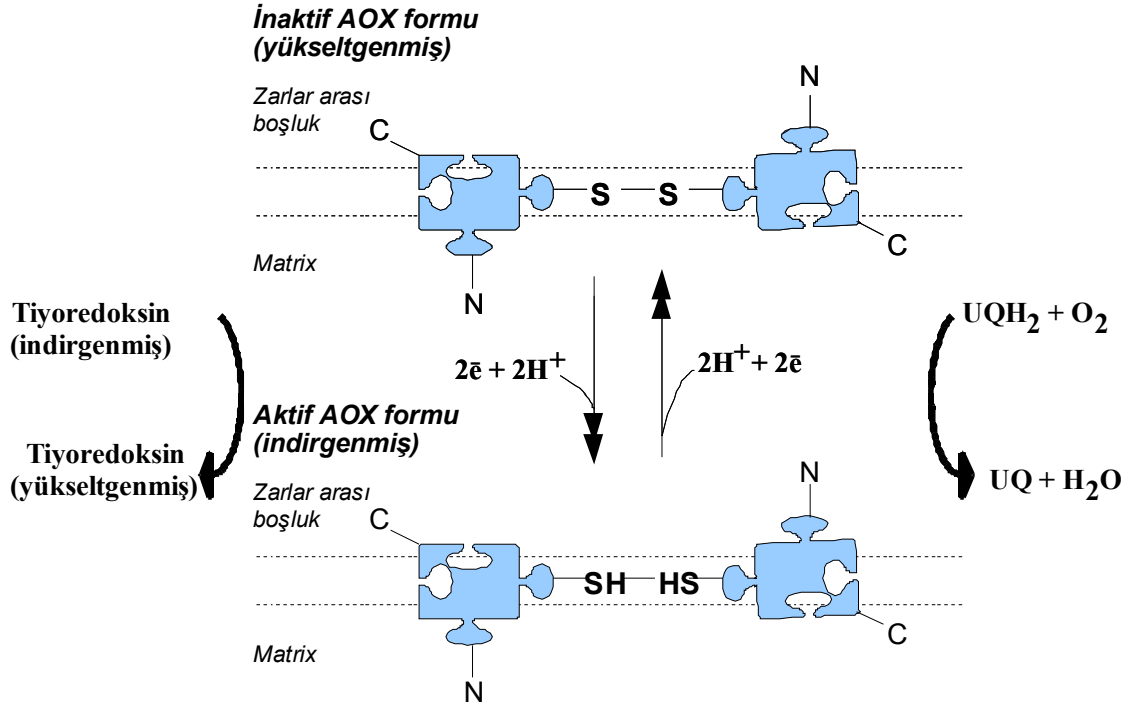
AOX üzerinden elektron transportu ile elektronlar, proton pompalanan üç bölgenin ikisinden (Kompleks III ve IV) geçmez ve alternatif yolda UQ ve oksijen arasında enerji elde etme yeri bulunmadığından bu yol ile elektronların transportundan kaynaklanan enerji ısı olarak yayılır (Vanlerberghe and McIntosh 1997; Millenaar and Lambers, 2003). Termojenik bitkilerde belirlenmiş ısı üretiminin aşırı durumları artan O₂ tüketimi ile ilgilidir. Örneğin, ortam sıcaklığı 5 °C iken *Philodendrum selloum* çiçekleri sıcaklıklarını yaklaşık 40 °C civarında tutabilir (Nagy *et al.* 1972). Bir nilüfer türünde (*Nelumbo nucifera*), termogenezis süresince O₂'e elektron transferi çoğunlukla AOX üzerinden gerçekleştiği gözlemlenmiştir (Watling *et al.* 2006). Bu yolla ısı üretiminin anterlerde aromatik bileşikler buharlaştırmak suretiyle pollinatörleri cezbetmek için kullanıldığı da ileri sürülmüştür (Meeuse 1975). Diğer taraftan çiçeklerde termoregülasyonun, pollinasyonu sağlayan böcekler için termal bir ödül olduğunu gösteren deliller de vardır (Seymour *et al.* 2003). Bütün bunlarla birlikte termojenik olmayan dokularda AOX aktivitesi organ sıcaklığı üzerine hemen hiç etki göstermez (Watling *et al.* 2006).

Sitokrom yolunun aksine AOX, antimisin A ve siyanide dayanıklıdır. Siyanid ve antimisin A- dayanıklı O₂ tüketimi bütün angiospermelerde, çoğu mantar ve protistlerde yaygındır (Vanlerberghe ve McIntosh 1997). AOX sorumlu genler, *Arabidopsis*, soya fasülyesi ve pirinç gibi bazı bitkilerde tanımlanmıştır. Bu genler küçük bir nükleer gen familyasında organize olmuş çok sayıda *aox* homologları içerirler (Whelan *et al.* 1996; Ito *et al.* 1997; Saisho *et al.* 1997). *aox1a*, *aox1b*, *aox1c*, *aox1d* ve *aox2* homologları *Arabidopsis*'te tanımlanmıştır (Saisho *et al.* 1997). Bunlardan *aox1a* *Arabidopsis*'te organizma düzeyinde eksprese olurken *aox1b-d* ve *aox2* daha çok organ-spesifik ekspresyon özellikleri sergiler (Finnegan *et al.* 1997; McCabe *et al.* 1998; Clifton *et al.* 2006). *Arabidopsis* (Umbach *et al.* 2005) ve bütün bitkilerinde (Maxwell *et al.* 1997)

aox1a mutantları ile yapılmış çalışmalarda AOX'ın oksidatif strese karşı koruma rolü üstlenebileceği, ve yine soğuk aklımasyonu esnasında bir fonksiyonu olduğunu (Fiorani *et al.* 2005) gösteren deliller sunulmuştur.

Bitkilerde okside edilen solunum substratlarının büyüme, depolama veya ATP sentezi için gereksinim duyulandan daha fazla olması durumunda, alternatif yolun bu substratların okside edildiği, diğer bir deyişle “enerji fazlalığı” yolu olarak işlev gördüğü ileri sürülmüştür (Lambers 1982). Bu görüşe göre, ancak elektronların esas solunum yolu aktivitesinin doygunluğa ulaşmasından sonra alternatif yolu kullandıkları belirtilmiştir. Fakat unutulmaması gereken önemli bir nokta, *in vivo* da eğer solunum hızı hücrenin ATP ihtiyacını karşılarsa (ve ADP seviyesi çok düşerse) ancak o zaman doygunluk meydana gelebilir. Bununla birlikte sitokrom yolunun doygunluğa ulaşmasından önce de alternatif oksidazın aktif olabileceği gösterilmiştir (Fiorani *et al.* 2005). Böylece alternatif oksidaz, mitokondriye biyosentetik reaksiyonlarda kullanılan karbon iskeletinin sentez ve ATP'nin nispi üretim hızlarını ayarlama olanağını sağlar.

Alternatif yolun diğer bir işlevinin, mitokondride solunumu engelleyen çeşitli streslere (fosfat eksikliği, soğuk, kuraklık, osmotik stres v.s.) karşı bitkilerin oluşturduğu bir yanıt olabileceği belirtilmiştir (Wagner and Krab 1995). Elektron taşıma zincirinden elektronların boşalmasıyla alternatif yol ubikinon havuzunun aşırı indirgenme potansiyelini engeller. Eğer bu yapılmazsa, söz konusu elektronlar süperoksit anyonları ve hidroksil radikalleri gibi zararlı reaktif oksijen türlerinin oluşumuna yol açabilir. Bu şekilde alternatif yol, solunum üzerindeki stresin zararlı etkilerini azaltabilir (Wagner and Krab 1995; Moller 2001).



Şekil 1.5. Alternatif oksidazın redoks aktivasyonu.

*C ve N, proteinin C- ve N-terminal uçlarını gösterir. Alternatif oksidaz, gri şekillerle resmedilmiştir.

Bitkilerde mitokondri iç zarına sıkıca bağlanmış integral membran proteini olan AOX homodimer formda bulunur ve indirgenmiş (dimer 70 kDa) veya yükseltgenmiş (monomer, 36 kDa) formlarda bulunabilir. AOX enzimi, disülfid bağlarının indirgenmesi ile aktive olur (Şekil 1.5) (Umbach and Siedow, 1993). Disülfid bağlarının indirgenmesi, NADPH'lar tarafından başlangıçta indirgenen mitokondriyal tiyoredoksinler tarafından gerçekleştirilir (Şekil 1.5) (Laloi *et al.* 2001; Gray *et al.* 2004). Tiyoredoksinler, disülfid bağlarını indirgemek suretiyle enzimleri düzenler ve bu düzenlemede muhtemelen redoks-aktif sisteinler de rol alır. *In vitro*da AOX homologlarının çoğunun da yine başlangıçta piruvat ve diğer keto asitlerle stimüle edildikleri ileri sürülmüştür (Millar *et al.* 1993; Vanlerberghe *et al.* 1995; Rhodas *et al.* 1998). Bu yüzden, AOX aktivitesinin, mevcut piruvat miktarına ve/veya matriksin indirgenme durumuna bağlı olduğu söylenebilir. Ancak, şimdiye kadar AOX aktivasyon mekanizması ile ilgili *in vivo*da yapılmış herhangi bir çalışmanın olmayışı bu delillere sadece teorikte anlam kazandırır.

Doktora tezinin bu kısmında, azot kaynağı olarak amonyum veya nitrat içeren solüsyonlarda kültüre alınan *Nicotiana tabacum* cv. Bright Yellow 2 hücrelerinin solunum hızlarına ilaveten, bu azot kaynaklarının alternatif oksidazın aktivasyonu üzerine etkileri araştırılmıştır. Böylece, bitki bünyesinde en büyük ikinci redoks havuzu görevini gören nitrat indirgenmesinde kullanılan indirgeyicilerin, azot kaynağı değiştiği durumlardaki akıbetleri ile ilgili bilgiler edinmek hedeflenmiştir.

Temelde bütün organizmalar oksidasyon-redüksiyon (redoks) sistemleridirler. Bu sıfatla, organizmalar hücresel enzim düzeylerini belli bir seviyede tutmak ve indirgeyici havuzlarının (NAD, NADP, FAD gibi) diğer hücresel gereksinimlere göre sürekli oksidasyon durumunda kalması gibi bir durumla karşı karşıya kalırlar (Foyer and Noctor 2003). Hücresel indirgeyicilere olan sürekli gereksinim ve bu gereksinimi karşılamak için yenilerinin üretilmesi durumları göz önünde bulundurulunca indirgeyiciler, gelişimsel ve çevresel şartlara cevapta hücresel redoks homeostazisini sürdürmek için gerekli olan dinamik ve son derece hassas mekanizmalara bağlı olarak çok değişkenlik gösterirler. Redoks dengesizliğinden kaynaklanacak olan aşırı ROT üretimi, oksidatif stres, hücre döngüsünün sekteye uğraması – durması ve apoptotik veya nekrotik hücre ölümleri gibi sonuçları göz önünde bulundurulunca redoks dengeleme mekanizmaları hücresel (ve organizmal) canlılığın sürdürülebilmesi için hayati öneme sahiptir. Bu doktora tezinin genel amacı, azot kaynağındaki değişimle birlikte durağan olmayan bir redoks ortamında homeostazisin sağlanması için kullanılan temel biyokimyasal proseslerden ve muhtemel oksidatif stresten doğacak hücresel redoks durumunda meydana gelen değişime bitki fizyolojisi çalışmalarında model olarak kullanılan *Arabidopsis thaliana* ekotip Colombia bitkisinin kök ve *Nicotiana tabacum* cv. Bright Yellow-2 hücrelerinin verdiği cevapları tanımlamaktır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Azotla beslenmenin bitki büyüme ve gelişmesi, morfolojik ve biyokimyasal prosesler üzerine etkileri hakkında yayınlanmış çok sayıda makale ve derleme bulunmaktadır (Redinbaugh and Campbell 1991; Crawford 1995; Bloom 1997; Stitt 1999).

Şimdiye kadar yapılmış çalışmalarla çoğu bitkinin azot kaynağı olarak nitrat, amonyum, üre ve aminoasitleri kullanabildikleri, fakat farklı azot kaynaklarına cevabın türe göre farklılık gösterdiği rapor edilmiştir (Haynes and Goh 1978; Crawford 1995; Glass and Siddiqi 1995; Omata 1995; Von Wiren *et al.* 1997). Örneğin domates bitkileri nitrat/amonyum oranı 3/1 olan topraklarda optimal büyüme gösterirken amonyum konsantrasyonlarının yüksek olduğu durumlarda büyümenin baskılandığı bildirilmiştir (Bloom *et al.* 1993). Diğer taraftan beyaz ladin ağaçları (Kronzucker *et al.* 1997) ve bazı arktik kamışların (Chapin *et al.* 1993) azot kaynağı olarak büyük oranda amonyumu tercih ettiği gözlenmiştir. Yine çilek (Claussen and Lenz, 1999), pirinç (Qian *et al.* 2004), biber (Xu *et al.* 2001) ve mısırda (Lewis *et al.* 1998) azot kaynağı olarak öncelikli tercih amonyum iken, *Arabidopsis* dahil çok sayıda bitkiye azot kaynağı olarak yalnızca amonyum verildiğinde nitrat uygulanmış gruplara kıyasla büyüme, gelişme ve fizyolojik ve biyokimyasal proseslerde transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel düzeyde azalmalar olduğu rapor edilmiştir (Wilcox *et al.* 1977; Chaillou *et al.* 1986; Lips *et al.* 1990; Magalhaes and Huber 1991; Feil 1994; Raab and Terry 1994; Claussen and Lenz 1999; Walch-Liu *et al.* 2000; Guo *et al.* 2002). Genel olarak bakıldığında amonyum ve nitrat her ikisini de kullanabilmek için özelleşmiş membran taşıyıcılarına sahip olmalarının yanında *Arabidopsis* dâhil yeryüzünde bitkilerin büyük bir oranı azot kaynağı olarak nitrat alımını tercih etmişlerdir (Crawford and Forde 2002).

Azot kaynağı olarak amonyumla beslenen bitkilerin nitratla beslenenlere nazaran daha dar yaprak yüzey alanlarına sahip olduğu rapor edilmiştir (Chaillou *et al.* 1986; Heuer, 1991; Leidi *et al.* 1992; Khan *et al.* 1994; Raab and Terry 1994; Walch-Liu *et al.* 2000).

Amonyumun bu negatif etkisinin azalan osmotik regülasyon, (Chaillou *et al.* 1986; Heuer, 1991; Leidi *et al.* 1992), hücre genişlemesi oranında azalma (Raab and Terry 1994), veya kök-gövde arasındaki hormonal düzenleme (Walch-Liu *et al.* 2000) ile ilgili olduğu ileri sürülmüştür. Yaprak yüzey alanının daralması amonyumla beslenen bitki yapraklarında düşük karbon birikimi ile sonuçlanabilir.

Farklı azot kaynaklarının bitki organlarında kuru ağırlık ve karbonhidrat tüketimi oranlarını da etkilediği ile ilgili yayınlanmış değerli çalışmalar bulunmaktadır (Guo *et al.* 2002). Azot kaynağı olarak sadece amonyum sağlanmış olan buğday (Lewis *et al.* 1989; Cramer and Lewis 1993a ; Hawkins and Lewis 1993), şeker kamışı (Raab and Terry 1994), mısır (Lewis *et al.* 1989), fasulye (Guo *et al.* 2002), ve domates (Pill and Lambeth 1977) bitkilerinin kök büyümelerinin, azot kaynağı olarak nitrat veya amonyumnitrat (NH_4NO_3) sağlanmış bitkilere nazaran azaldığı rapor edilmiştir.

Yapraklarda, nitrat iyonları sitosolde nitrat redüktaz (NR) enzimi tarafından nitrite indirgenir ve nitrit de nitrit redüktaz (NiR) enzimi ile kloroplastlarda amonyuma indirgenir ve amonyum yine kloroplastlarda glutamin ve glutamat sentaz (GS/GOGAT) mekiği ile glutamat aminoasitinin yapısına katılır (Heldt 1997). 1 mol nitratin amonyuma indirgenmesi için yeşil hücrelerde 16 proton (Raven 1985) harcanır ki bu durum nitrat asimilasyonunu yapraklarda elektronlar için önemli bir indirgeyici havuz yapar (Gerendas *et al.* 1997). 1 mol nitratin absorpsiyonu, transportu, indirgenmesi ve asimilasyonu için yaklaşık 32 mol proton harcanır (Raven 1985). Bezelye bitkilerinde karbon katabolizmasının %25 i nitrat alım ve asimilasyonu için kullanıldığı rapor edilmiştir (Bloom *et al.* 1992). Fotosentetik CO_2 asimilasyonu ile kıyaslanınca nitratin glutamata asimilasyonunun fotosentetik elektron akışı için önemli bir havuz oluşturduğu söylenebilir (Champigny and Foyer 1992).

Bitkiler köklerinde amonyumun toksik etkisinden alınan amonyumu hızla aminoasitlere dönüştürerek kaçınma yoluna giderler. Cruz *et al.* (2005) glutamin sentaz (GS) aktivitesinin bitkilerde amonyum toleransını artırmada önemli olduğunu rapor etmiştir. Bu hipotez glutamat dehidrogenaz (GDH) enziminin yüksek yapılı bitkilerin köklerinde

amonyum detoksifikasyonuna katkı sağladığı bulgularıyla birlikte Majerowicz and Kerbaux (2002) ve Terce-Laforge *et al.* (2004) tarafından da desteklenmiştir.

Azot formlarının bitki büyümesi üzerine etkilerinin ışık yoğunluğu, toprak sıcaklığı, azot konsantrasyonu, ortamın pH'sı ve K^+ iyonlarının yoğunluğu gibi çevresel faktörlere bağlı olduğuda rapor edilmiştir. Örneğin amonyumla beslenmenin bitki büyümesi üzerine inhibe edici etkisinin yüksek ışık yoğunluğu altında arttığı rapor edilmiştir (Magalhaes and Wilcox 1983, 1984; Zhu *et al.* 2000). Toprak sıcaklığının arttığı durumlarda bitkilerin amonyuma toleransının düştüğü rapor edilmiştir (Ganmore-Neumann and Kafkafi 1980,1983). Bitki köklerinin bulunduğu ortamın K^+ konsantrasyonu 0.1 mM dan 1.6 mM a çıkarıldığında, azot kaynağı olarak amonyumla beslenen mısır bitkilerinin yaprak kuru ağırlıkları nitratla beslenenlere nazaran % 49 oranında arttığı kaydedilmiştir (Gerendas *et al.* 1995). Mısır bitkisinde ayrık kök sistemi (aynı bitkinin kökleri ikiye ayrılır ve bir yarısı azot kaynağı olarak amonyum, diğer yarısı da nitrat içeren besin çözeltilerine yerleştirilir) ile yaptığı çalışmada Schortemeyer *et al.* (1993) ortamın pH sı 4'den 5.5'e çıkarıldığında amonyum içeren solüsyonda bulunan köklerin kuru ağırlığında artış, nitrat içeren solüsyonda bulunan köklerin kuru ağırlığında azalma rapor etmişlerdir.

Farklı azot formlarının fotosentez üzerine etkilerinin stomatal iletkenlik ve hücreler arası CO_2 kısmi basıncı ile ilgili olduğuna dair yayınlanmış önemli çalışmalar vardır. Raven and Ferquhar (1990) amonyumla beslenen bitkilerde hücreler arası kısmi CO_2 basıncının nitrata kıyasla daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir. Amonyumla beslenen bitkilerin nitrat kontrollerine nazaran daha yüksek stomal iletkenliğine ve karbon izotop ayırımına sahip oldukları rapor edilmiştir (Hogh-Jensen and Schjoerring, 1997; Guo *et al.* 2002). Bu sonuçlar nitrat ve amonyumun yapraklarda stomatal iletkenlik ve hücreler arası kısmi CO_2 basınçları gibi gaz değişim parametreleri üzerine farklı etkileri olduğunu gösteriyor. Farklı azot formlarının yüksek bitkilerde fotosentez ve fotorespirasyon üzerine etkileri göz önüne alınınca atmosferik CO_2 konsantrasyonunun artması ile birlikte, azot kaynağı olarak nitratı tercih eden bitkilerin de azot kaynağı olarak amonyumu tercih edebilecekleri veya nitrat asimilasyonunu

tamamen köklerde gerçekleştirebilecekleri ile ilgili spekülasyonlar da ortaya atılmıştır (Rachmilevitch *et al.* 2004)

Yüksek yoğunlukta ışık bulunan şartlarda amonyumun nitratla beslenmeye nazaran fotorespirasyon hızını artırdığı rapor edilmiştir (Zhu *et al.* 2000). Bitkiler yapraklarda stomatal iletkenlik ve kısmi CO₂ yoğunluğu üzerine etkileri ve kök-yaprak arasında karbon paylaşımı etkilerinin yanı sıra su alınımları ve transportu da azot kaynaklarına cevapta farklılıklar sergilerler. Azot kaynağı olarak nitrat sağlananlara kıyasla amonyum sağlanan bitkilerde düşük su tüketiminin yaprak alanının daralmasından kaynaklandığı ileri sürülmüştür. Amonyumla beslenen beyaz üçgül (*Trifolium repens* L.) ve buğday (*Triticum aestivum* L.) bitkilerinin nitratla beslenenlere kıyasla daha düşük su kullanma kapasitesine sahip olduğu rapor edilmiştir (Hogh-Jensen and Schjoerring 1997; Yin and Raven 1998).

Bitkilerin azot gereksinimleri nitrat veya amonyum iyon asimilasyonlarının her ikisiyle de karşılanabilir (Lasa *et al.* 2002). Toprakta 20-200 µM konsantrasyonlarında amonyumun bitkilerin gelişimi üzerine pozitif etkilerinin olduğu, ancak daha yüksek konsantrasyonlarda toksik etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir (Miller and Cramer 2004; Loque and Von Wiren 2004). Yenilebilir bitki parçalarında nitratın birikimi ve azotun yıkanmayla kaybolmasını azaltmak için bazı şartlarda azot kaynağı olarak amonyum tercih edilebilir (Gangolli *et al.* 1994). Schumacher and Sommer (2001) kontrollü olarak sürekli düşük konsantrasyonlarda (0.2 mM) amonyum iyonları uyguladıklarında patates veriminin %15-30 arttığını ve optimum ürün eldesi için gerekli azot miktarının nitrat kontrollerine göre %30 oranında azaldığını rapor etmişlerdir. Yine Roosta *et al.* (2009) tarafından rapor edilen bir çalışmada tek azot kaynağı olarak, amonyum toksisitesine hassas bir tür olan salatalık (*Cucumis sativus* L.) bitkisinin yetiştirilmesi için, 1 mM konsantrasyonda amonyumun sürekli verilmesinin, aynı konsantrasyonda nitrat veya amonyumnitrata (amonyum nitrate) nazaran büyümeyi hızlandırdığını bildirilmişlerdir.

Nitrat veya amonyum kullanımı bitkilerin enerji ekonomisini ve karbohidrat metabolizmalarını etkileyebilir (Blacquiere 1987). Nitrat iyonları kofullarda depolanabilir ve bu yüzden çoğu bitki nitrata indirgenmesi ve asimilasyonu için yapraklarına gönderebilir ve en küçük bir toksisite semptomu göstermeksizin yüksek konsantrasyonlarda nitrata tolerans gösterebilirler (Blacquiere 1987). Ancak bitkiler tarafından alınan amonyum tuzları toksik etkisinden dolayı çoğu bitki az veya hiç amonyum bulunmadığı durumlara tolerasyon gösterebildiği için hızlı bir şekilde organik azot bileşiklerine dönüştürülmelidir (Chaillou *et al.* 1994; Barker *et al.* 1996). Böylece hemen bütün amonyum iyonlar köklerde asimile edilmelidir. Azot kaynağına bitkilerin verdiği cevaptaki bu farklılık bitkilerin karbon ihtiyaçlarında da farklılığa sebep olur ki bu karbon kaynakları da çoğunlukla TCA dan sağlanır ve böylece solunum hızlarında farklılığa sebep olur (Lasa *et al.* 2002). Bazı araştırmacılar, nitrata beslenmeye kıyasla amonyumla beslenmenin köklerde solunum hızını artırdığını ve bu artışın alternatif yolların aktivasyonunu da stimüle ettiğini öne sürmüşlerdir (Barneix *et al.* 1984; Blacquiere 1987; Tischner 2000; Lasa *et al.* 2002; Escobar *et al.* 2006).

Bitkinin türüne bağlı olarak, nitrat indirgenmesi köklerde veya yapraklarda gerçekleşebilir (Oaks and Hirel 1985; Andrews 1986; Pate and Layzell 1990; Vuylstekker *et al.* 1997; Silveira *et al.* 2001; Schilling *et al.* 2006). Bu özelliğinden dolayı bitkiler üç gruba ayrılırlar: nitrata öncelikle köklerinde indirgeyen türler, yapraklarında indirgeyen türler, ve her ikisinde indirgeyen türler. Nitrata amonyuma indirgenmesi için gerekli C maliyeti nitrat indirgenmesinin gerçekleştiği bölgeye göre değişkenlik gösterir (Schilling *et al.* 2006).

Bitkiler tarafından alınan N formu N-asimilasyonu, katyon-anyon dengesi, solunum (Matsumoto and Tamura 1981; Escobar *et al.* 2006), su ilişkileri (Ragab 1980), fotosentez (Siddiqi *et al.* 2002) ve sekonder metabolizma (Wang and Below 1996) gibi çok sayıda fizyolojik prosesi etkiler. Genel manada bitkiler azot kaynağı olarak yalnızca amonyum alındığında zararlı etkileri gözlemlenirken (Lamb *et al.* 1993; Xu *et al.* 2001; Kotsiras *et al.* 2005) özellikle yüksek konsantrasyonlarda depolanabildiği için bitkiler azot kaynağı olarak önemli oranda nitrata kullanırlar (Miller and Cramer 2004).

Amonyumla beslenmeye cevap bitki türüne ve çevresel şartlara göre değişir. Örneğin pirinç ve koniferler gibi bitkiler azot kaynağı olarak amonyumu tercih ederler (Britto and Kronzucker 2002; Britto *et al.* 2004) ancak salatalık ve domates gibi bitkiler de yalnızca düşük amonyum konsantrasyonlarına tolerans gösterirler (Roosta *et al.* 2009). Bitki yaşı, sıcaklık, ışık yoğunluğu, pH ve büyüme ortamındaki besin konsantrasyonları bitkilerin amonyuma toleranslarını etkiler (Kotsiras *et al.* 2005). Normal şartlarda, 5 mM amonyumun, nitrat kontrollerine kıyasla büyümeyi yavaşlattığı ve 10 mM konsantrasyonda yüksek derecede toksik etki gösterdiği rapor edilmiştir (Roosta and Schjoerring 2007). Bitkiler amonyuma, eğer amonyum asimilasyonu köklerde gerçekleşiyorsa daha toleranslıdır (Lasa *et al.* 2001). Köklerde amonyum detoksifikasyonu yeterli miktarda enerji ve karbon iskeleti sağlayacak olan karbohidrat rezervlerinin miktarı ile yakından ilişkilidir (Claussen and Lenz 1995; Finnemann and Schjoerring 1999). Ortamın pH'nın dengelenmesi, ışık rejiminin optimizasyonu, etilen biyosentez inhibitörlerinin uygulanması, potasyum ve nitratın ko-provizyonu bitkilerde amonyum toksisitesini azaltabildiği rapor edilmiştir (Britto and Kronzucker 2002).

Wang *et al.* (2010) *Hydrilla verticillata* bitkisine azot kaynağı olarak 0.1 - 3 mM konsantrasyonlarda amonyum uyguladıklarında nitrat konsantrasyonlarına kıyasla 1.5-3 mM konsantrasyonlarda amonyumun fotosentetik pigmentlerin miktarında azalmaya sebep olduğunu ve bununla birlikte bu bitkide antioksidatif cevabın arttığını rapor ettiler.

Sucul ekosistemlerde amonyum, nitrit ve nitrat azotun en yaygın aktif formlarıdır (Rabalais 2002; Camargo and Alonso 2006). Bu azot bileşikleri içerisinde amonyum ve amonyak suda yaşayan hayvanların üreme kapasiteleri, büyüme ve canlılıkları üzerine toksik etkiye sahiptir (Dave and Nilsson 2005; Camargo and Alonso 2006; Romano and Zeng 2007). Bununla birlikte yüksek konsantrasyonlarda amonyumun bitkiler üzerine olan toksik etkilerinin hayvanlara kıyasla daha şiddetli olduğu rapor edilmiştir (Zhu *et al.* 2000; Medici *et al.* 2004).

Amonyum toksisitesinin sebep olduğu semptomlar ve artan amonyum miktarlarının bitkilerde primer metabolizma üzerine etkileri hakkında önemli derlemeler ve makaleler bulunmaktadır (Gerendas *et al.* 1997; Britto and Kronzucker 2002; Krupa 2003). Bu çalışmalarda fotosentetik pigmentlerin ve çözülebilir karbohidratların azaldığını, serbest amonyumlu-asitlerin miktarının arttığı ve hormonal dengeninde bozulduğu rapor edilmiştir. Amonyum stresinin amonyum döngüsü için tüketilen enerjinin artması sonucunu doğurduğu da rapor edilmiştir (Britto *et al.* 2001). Amonyumla beslenen bitkilerde nitratla beslenenlere nazaran aminoasit konsantrasyonlarında azalma gözlenirken (Blacqui re *et al.* 1988, Majerowicz *et al.* 2000) malik asit miktarında azalma olduğu rapor edilmiştir (Goodchild and Givan 1990; Leport *et al.* 1996).

Reaktif oksijen türleri (ROT) bitkisel hücrelerde özellikle mitokondri, kloroplast ve peroksizomlarda üretilir (Apel and Hirt 2004). Normalde ROT bitki biyolojisinde büyüme, hücre döngüsü, programlanmış hücre ölümü, hormon sinyali ve gelişme gibi önemli biyolojik proseslerde anahtar düzenleyiciler olarak rol oynarlar (Mittler 2002). Ancak, aşırı ROT üretimi stres altındaki bitkilerde nükleik asitlere ve proteinlere zarar verebilir ve bu proses de lipid peroksidaz ve hücresel metabolizmanın bazı özelliklerinde artışla ilişkili olarak devam eder (Asada 1994; Mittler 2002; Halliwell 2006; Hansen *et al.* 2006).

Stres şartları altında ROT üretimi bitkilerde üretkenlikte azalmalar, yaralanma ve ölüm gibi sonuçlara yol açabilir (Greene 2002). Bununla birlikte, aşırı ROT üretimi ile birlikte çok sayıda ROT-detoksifikasyon mekanizmaları da çoğu bitkide devreye girer. Bu mekanizmalar SOD, KAT, POD, AP, GR gibi antioksidant enzimler ve glutatyon ve askorbik asit gibi antioksidanları da içerir. Antioksidatif cevabın hızlı gelişmesi değişik stres şartlarına maruz kalan bitkiler için önemlidir (Sharma and Dietz 2008), ancak farklı bitki türleri arasında sürekli olarak farklı antioksidatif cevabın verildiği de bir gerçektir (Tamas *et al.* 2008). Şu ana kadar elde edilen veriler ışığında amonyum hassasiyetinin bitkinin türüne göre değişiklik gösterdiği ve azota hassas türlerin azot kaynağı olarak amonyum ilave edilen zirai topraklarda hassas türlerin ilk olarak ortadan

kalktığı bilinmektedir (Cao *et al.* 2004; Nimptsch and Pflugmacher 2007; Wang *et al.* 2008).

Ortamda 0.1 – 0.5 mmol/L konsantrasyonlarda bulunduğunda amonyumun geniş ölçüde toksik etki gösterdiği rapor edilmiştir (Schenk and Wehrmann 1979; Peckol and Rivers 1995). Örneğin amonyuma hassas bir bitki olan arpada artan amonyum konsantrasyonlarında yapraklarda klorozis ve büyümenin çok önemli düzeyde baskılandığı rapor edilmiştir (Breteler 1973; Holldampf and Barker 1993; Gerendas *et al.* 1997). Hassas türler arasında ürün kaybı %15-60 oranlarında olabilmektedir (Chaillou *et al.* 1986) ve hatta amonyum toksisitesi ölümle de sonuçlanabilir (Gigon and Rorison 1972, Pearson and Stewart 1993, De Graaf *et al.* 1998). Gözle görülmeyen fakat oldukça önemli olan semptomları arasında mikorizal ilişkide azalma da rapor edilmiştir (Van der Eerden 1998; Boukcim *et al.* 2001; Hawkins and George 2001). Son olarak tohum çimlenmesi ve erken büyümenin de amonyum toksisitesi ile inhibe olduğu da rapor edilmiştir (Barker *et al.* 1970; Westwood and Foy 1999).

Dominguez-Valdivia *et al.* (2008) amonyuma hassas olan ıspanak ve tolerant bitki olan bezelye ile yaptıkları çalışmalarda amonyum toksisitesinin sebep olduğu redoks değişimlerinin oksidatif stres markırları olan ROT miktarında önemli değişimlere ve ROT detoksifiye edici enzimatik antioksidan (KAT, POD, SOD) aktivitelerinde ve enzimatik yapıda olmayan antioksidan (ASC, GSH) miktarlarında önemli değişimlere sebep olmadığını ancak protein karbonilasyonunda meydana getirdiği artışla birlikte amonyum toksisitesinin antioksidant sistemle alakalı olmayıp protein oksidasyonu ile meydana gelen değişimlerden kaynaklandığını ileri sürmüşlerdir.

Şimdiye kadar tartışmalı sonuçlar rapor edilse de genel olarak kültüre alınmış bitkilerin yabani türlere nazaran amonyuma daha hassas oldukları ileri sürülmüştür (Martins-Louçao and Cruz 1999; Britto and Kronzucker 2002). Amonyum toksisitesi üzerine yapılan araştırmalarda kontrol grubu olarak nitrat kullanılmasını eleştiren bu çalışmalarda esas çelişkinin bitkilerin amonyuma toleransının köklerde bulunan

amonyum konsantrasyonuna, köklerin amonyumu ve nitratı depolayabilme kapasitelerinin farklı olduğundan dolayı uygun olmadığı şeklinde eleştirilmiştir.

Uygun konsantrasyonlarda (1-10 mM) nitrat uygulamasının bitkilerde yan kök oluşumunu stimüle ederken (Drew 1975; Zhang *et al.* 1999), 10 mM dan yüksek konsantrasyonlarda yan kök oluşumu (Stitt and Feil 1999; Zhang *et al.* 1999; Guo *et al.* 2005) ve primer kök oluşumu (Linkohr *et al.* 2002; Tian *et al.* 2005) üzerine inhibe edici etkiler gösterdiği rapor edilmiştir. Nitratın yan kök oluşumu üzerine stimüle edici etkisinin nitrat iyonunun bir besin elementi olmasının ötesinde bir sinyal olarak rol oynadığı hipotezini destekler veriler sunulmuştur (Zhang *et al.* 1999). Nitratın sistemik inhibe edici etkisinin bitkilerde içsel N durumu tarafından kontrol edildiği rapor edilmiştir (Forde 2002). Scheible *et al.* (1997) yapraklardaki nitrat içeriği ile total kök büyümesi arasında önemli düzeyde negatif bir korelasyon belirlemiş ve kök büyümesini düzenleyen ve içsel N durumunu yansıtan bir sinyal olarak rol oynayabileceğini ileri sürmüşlerdir.

İnorganik azotun organik azotlu bileşiklerin yapısına katılması bitkiler için hayati öneme sahiptir. İnorganik azotun aminoasitlerin yapısına katılması için GS/GOGAT yolunun kullanılması yaşam için önemlidir çünkü üretilen glutamat ve glutamin büyüyen bitkide ihtiyaç duyulan aminoasitler/proteinler, nükleik asitler, klorofiller, poliaminler ve sekonder metabolitler (örneğin alkaloidler) gibi azotlu bileşiklerin biyosentezi için gerekli olan temel amino-donörlerdir. N-asimilasyonu bitkilerde karbon metabolizması ile yakından ilgili olmalıdır çünkü GS aktivasyonu için ATP, ve GOGAT aktivasyonu için C-iskeletleri ve indirgenmiş ferrodoksin (yapraklarda) veya NADH (köklerde) indirgeyicilerine ihtiyaç duydukları çok sayıda makale ile rapor edilmiştir (Huppe and Turpin 1994; Lancien *et al.* 2000; Stitt *et al.* 2002; Britto and Kronzucker 2005; Foyer *et al.* 2006). Toprakta düşük konsantrasyonlarda alınan veya nitratın asimilasyonu ile üretilen amonyumun esas olarak GS/GOGAT yolu ile asimile edildiği şu anki bilgilerimizle sabittir fakat bu durum amonyumun glutamin sentaz (GS) enzimine afinitesinin yüksek olmasından kaynaklandığı bildirilmiştir (Mifflin and Lea 1980). Genel olarak, amonyum asimilasyonu üzerine yapılmakta olan çalışmalarda

yüksek GS aktivitesine sahip olan bitkilerin amonyum toksisitesine daha dayanıklı olduğu rapor edilmiştir (Magalhaes *et al.* 1992; Glevarec *et al.* 2004).

Diğer taraftan geri dönüşümlü olarak 2-oxoglutarattan glutamat sentezleyen GDH enziminin fizyolojik rolü üzerine tartışmalı sonuçlar bildirilmiştir. GDH enziminin hücrelerde yüksek amonyum konsantrasyonlarında aktif olan bir stres enzimi olduğu rapor edilmiştir (Loulakakis *et al.* 1994; Harrison *et al.* 2000). GDH enzimini kodlayan genleri aşırı ifade olmuş tütün bitkilerinin herbisitlere ve amonyumun toksik etkilerine karşı daha dayanıklı olduğu ve bununla birlikte bitki biyomasında artışa ve strese toleransının daha yüksek olduğu rapor edilmiştir (Ameziane *et al.* 2000). Öyle görünüyor ki GDH aşırı miktarda amonyumun hücrelerde bulunduğu şartlarda amonyumun asimilasyonunda veya glutamatın katabolize edilmesinde, ve sitosolik GS tarafından asimilasyonu için gerekli transport bileşiklerinin (2-oxoglutarat) sağlanmasında rol oynayabilir. Nitekim GDH enziminin glutamatın yeniden kullanımı (2-oxoglutarata dönüştürerek) üzerine rol oynadığı da rapor edilmiştir (Robinson 2001). Ancak GDH enziminin, hücrel amonyum konsantrasyonları yüksek bulunduğu durumlarda GS varlığında ve yokluğunda da (GS kodlayan geni baskılanmış bitkilerde) amonyum asimilasyonuna karıştığı ve böylece hücrel amonyum ve nitrat konsantrasyonlarının değişiminde de rol oynadığı rapor edilmiştir (Srivastava and Singh 1987; Frechilla *et al.* 2002). Yapılmış olan çalışmalardan elde edilen sonuçlara genel olarak bakınca bitki metabolizmasında GDH enziminin rolü üzerine net bir cümle yazmak oldukça zor ve çok daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyduğu açıktır.

Amonyumla beslenen bitkiler üzerine nitratın yararlı etkilerinin mekanizmasını anlamak üzere tasarlanmış bir çalışmada Garnica *et al.* (2009) amonyumla beslenen buğday bitkilerinde etilen üretiminin ve poliamin (özellikle spermidin) içeriğinin ortamdaki azot kaynağı olan amonyum, nitratla değiştirildiğinde arttığını rapor ettiler. Hatta yüksek konsantrasyonda (5 mM) nitrat uygulandığında amonyum kontrollerine kıyasla putresin konsantrasyonunda azalma olduğunu gözlemlediler.

Çok sayıda çalışma ortamda bulunan amonyumdan kaynaklanan negatif etkilerin bazı bitkilerde yine ortamda bulunan nitrat iyonları tarafından bertaraf edildiğini göstermiştir (Britto and Kronzucker 2002; Cruz *et al.* 2003). Hatta bu etkinin besin solüsyonunda çok düşük konsantrasyonlarda nitrat bulunduğu durumlarda da gözlemlendiği rapor edilmiştir (Rahayu *et al.* 2005). Amonyumla beslenen bitkilere uzun ve kısa dönemli nitrat sağlandığında bitkilerin yaprak büyümesinin kök-kaynaklı sitokinin aktivasyonu sayesinde stimüle edildiği rapor edilmiştir (Rahayu *et al.* 2005). Ancak nitratın amonyumla beslenme üzerine bu yararlı etkilerinin fizyolojik ve biyokimyasal doğası hakkında bilinen çok az veri bulunmaktadır. Bazı çalışmalar bu yararlı etkinin fizyolojik pH da meydana gelen değişimlerden (Babourina *et al.* 2007), uygun karboksilat düzeylerinin sürdürülmesinden (Feng *et al.* 1998), veya poliaminler gibi bazı hormonlardan ve prolin düzeylerinde meydana gelen değişimlerden (Houdusse *et al.* 2005) kaynaklanabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Bitkilerde kök yapısı (Zhang and Forde 1998), yaprak gelişimi (Walch-Liu *et al.* 2000), tohum dormansisi (Alboresi *et al.* 2005) ve çiçeklenme (Stitt *et al.* 2002) gibi bitki büyümesi ve gelişmesi üzerine azot kaynaklarının ve miktarlarının etkili olduğu rapor edilmiştir.

Azot kaynaklarına cevapta bitkilerde meydana gelen metabolik, fizyolojik ve gelişimsel adaptasyonlar bir dereceye kadar gen ekspresyonunda meydana gelen değişikliklerden kaynaklanır. *Arabidopsis* ve diğer bitkilerde global gen ekspresyonu üzerine nitrat ve nitratın indirgenmesi ile elde edilen azotlu bileşiklerin sinyal moleküller olarak rol oynadıkları bildirilmiştir. Çok sayıda mikrodizi çalışmaları azot-sorumlu genlerin çok değişik metabolik yollarda rol oynadıklarını göstermiştir (Wang *et al.* 2000, 2003, 2004, 2007; Scheible *et al.* 2004; Palenchar *et al.* 2004; Price *et al.* 2004; Gutierrez *et al.* 2007, 2008; Gifford *et al.* 2008).

Nitrat bitkilerde değişik metabolik yollarla ilgili olduğu keşfedilen binlerce genin ekspresyonunu düzenler. Bu genlerin çoğu 100 nM gibi çok düşük konsantrasyonlarda uygulandığında bile dakikalar içerisinde (uygulamadan yaklaşık 20 dk sonra bile) bu

genlerin çoğunun farklı ekspresyon örnekleri sergiledikleri rapor edilmiştir (Wang *et al.* 2003, 2004; Palenchar *et al.* 2004; Price *et al.* 2004; Gifford *et al.* 2008). Örneğin nitrat kendi başına nitratın alımı ve asimilasyonu; nitrat redüktaz, nitrit redüktaz enzimleri, ve nitratın indirgenmesi için gerekli olan indirgeyicilerin sağlandığı oksidatif pentoz fosfat ve glikoliz yollarını da kontrol eder (Wang *et al.* 2004; Guitierrez *et al.* 2007; Gifford *et al.* 2008). Nitrat ayrıca karbon metabolizmasına karışan genlerin ekspresyonunu da düzenler, böylece inorganik azotun amoniasitlere asimilasyonu için gerekli organik asitlerin üretimini de kontrol eder (Wang *et al.* 2000, 2003; Palenchar *et al.* 2004; Price *et al.* 2004).

Azot ve karbon (C) metabolizması arasındaki ilişki bitkilerin normal büyüme ve gelişmeleri için hayati öneme sahiptir (Huppe and Turpin 1994). Son zamanlarda genomik yaklaşımlar C ve N arasındaki interaksiyonların metabolik yolların ötesinde yakın ilişkili olduğunu rapor etmişlerdir (Gutierrez *et al.* 2007, 2008; Palenchar *et al.* 2004; Price *et al.* 2004). Nitrata cevap veren genlerin çoğunun karbona da cevap vermeleri C ve N sinyal yollarının gen ekspresyonunu düzenlemek için birlikte çalıştıklarını göstermektedir. Nitratla regüle olan diğer yollar hormon metabolizması ve transportu, protein sentezi ve sinyal iletim yollarıdır (Wang *et al.* 2003,2004; Scheible *et al.* 2004).

Bir sinyal molekül olarak nitratın, nitrat asimilasyonu ile elde edilen metabolitlerin sinyal etkilerinden ayırmak için Wang *et al.* (2004) nitrat redüktaz enzimini kodlayan genleri baskılanmış mutant ve yabancı tip *Arabidopsis* bitkilerinde nitrat indirgenmesi ve asimilasyonu çalışmaları yaptılar. NR enziminin olmayışı nitrat indirgenmesini önler ve aşağı yönlü metabolik sinyallerin üretimini bloke eder. Yabancı tip ve mutant bitkilerde nitrat tarafından benzer şekilde düzenlenen genlerin sadece nitrat iyonları tarafından düzenlendiği düşünülmüştür. Bu deneyler nitratın yüzlerce genin sadece nitrat iyonlarının hücre içindeki miktarı (ve böylece sinyal molekülü olarak rolü) ile düzenlendiğini göstermiştir. Nitrat transportu, nitrat redüksiyonu ve asimilasyonu, bunun için gerekli enerji, metabolizma, glikolizis, glukoneogenezis, aminoasit

metabolizması, azot ve kükürt kullanımı *Arabidopsis*'te nitratla düzenlenen prosesler arasında olduğu rapor edilmiştir (Wang *et al.* 2004).

Genomiks yaklaşımlar bitkilerin nitrat uygulamalarına cevaplarının hücre-spesifik ve hatta doku, organ-spesifik cevaplar olabileceğini göstermiştir (Wang *et al.* 2004; Gifford *et al.* 2008). Nitratla düzenlenen genlerin yalnızca bir organda %67'sinin ifade olduğu ve %82'sinin de baskılandığı bildirilmiştir (Wang *et al.* 2004). Hücre spesifik cevapların detaylı analizi ile *Arabidopsis* köklerinde hücre-spesifik cevapların daha önce yapılmış global analizlerde belirtilmeyen transkriptlerin lokal olarak düzenlendiğini ortaya çıkarıldı (Gifford *et al.* 2008).

Nitrata verilen cevaplara kıyasla diğer azotlu metabolitlerin hücresel doku-spesifik veya hücre-spesifik cevapları hakkında bilinen oldukça azdır. Nitrat indirgenmesinin ilk ürünü olan nitritin *Arabidopsis* köklerinde gen ekspresyonunun düzenlenmesi için önemli bir sinyal molekülü olduğu rapor edilmiştir (Wang *et al.* 2007). Bu çalışmada, oksidatif pentoz fosfat yolu, karbon metabolizması ve amonyum asimilasyonunu da içeren nitratla düzenlenen genlerin %50 sinden fazlasının nitrit uygulamasından 20 dakika sonra farklı şekillerde düzenlendiği rapor edilmiştir (Wang *et al.* 2007). Çok sayıda genin de nitrit spesifik cevaplar vermesi nitrit iyonunun *Arabidopsis* köklerinde gen ekspresyonunun düzenlenmesinde bir sinyal molekül olarak rol oynayabileceğini göstermiştir. Bu çalışmada nitrite verilen cevapların amonyum uygulamaları veya nitrat redüktaz (NR) enzimini kodlayan geni baskılanmış mutantta da herhangi bir regülasyon örneği sergilemediği rapor edilmiştir. Bu sonuçlara dayanarak Wang *et al.* (2007), *Arabidopsis* köklerinin nitrat indirgenmesinin direkt ürünü olan amonyuma veya nitrik okside (nitrit NR enzimiyle nitrik okside dönüştürülebilir) cevap vermediğini fakat nitriti direkt olarak fark eden bir sinyal sistemine ve bir sensöre sahip olduğunu ileri sürdüler.

Arabidopsis'te inorganik azota verilen gen cevaplarını (örneğin nitrat, nitrit ve amonyum) azotun asimilasyonu ile elde edilen ürünlere (örneğin glutamat) verilen gen cevaplarından ayırmak için inorganik azot (nitrat ve amonyum), glutamat, ve glutamin

sentetazın inhibisyonunu ve böylece amonyumun aminoasitlerin yapısına katılmasını engelleyen methionine sulfoximine (MSX) kombinasyonları kullanarak dikkate değer bir çalışma Gutierrez *et al.* (2008) tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma, azotla düzenlenen genlerin önemli bir oranının organik azota cevap verdiklerini göstermiştir. Araştırmacılar bu çalışmada organik azot sinyalleri ile hücre duvarı biyosentezinin teşvik edilirken aminoasit ve karbohidrat metabolizmasının da baskılandığını rapor ettiler (Gutierrez *et al.* 2008). Bu sonuçlar azot asimilasyonu ve diğer hücresel proseslerin regülasyonunun organik azot (bu çalışmada glutamat) tarafından gerçekleştirildiğini göstermektedir.

Genomiks yaklaşımlar bitkilerin azot kısıtlamasına (Bi *et al.* 2007; Peng *et al.* 2007), veya yokluğuna (Scheible *et al.* 2004) global cevaplarını tanımlamada oldukça açıklayıcı olmuştur. *Arabidopsis*'te azot yokluğunun fotosentezde, klorofil sentezinde, plastidlerde gerçekleşen reaksiyonlarda (amonyum asimilasyonu, pentoz fosfat yolu gibi), ve protein sentezinde çok sayıda genin baskılanması, mitokondriyal elektron transportunun yeniden programlanması ve sekonder metabolizmada rol oynayan çok sayıda genin ifade düzeylerinin artması sonuçlarını doğurduğu rapor edildi (Scheible *et al.* 2004). Diğer taraftan, nitrat kısıtlaması ile protein degradasyonu, antosiyaninin biyosentezi ve fenilpropanoid yollarından sorumlu genlerin ifade düzeylerinde artış gözlenirken fotosentez ve klorofil, proteinler ve nükleotidler gibi azotlu bileşiklerin sentezinden sorumlu genlerin ifadelerinin baskılandığı rapor edilmiştir (Bi *et al.* 2007; Peng *et al.* 2007). Azot kısıtlamasına ve yokluğuna cevap veren çok sayıda genin transkripsiyon faktörleri, sinyal iletimi ve hormon sentezi ile hormonal cevap için gerekli proteinleri kodladığı rapor edilmiştir (Bi *et al.* 2007; Peng *et al.* 2007). Bitkilerde düzenleyici rol oynayan bu faktörlerin daha detaylı araştırılması gerekmektedir.

Bitkilerde fosfat ve sülfat açlığına cevapta mRNA stabilitesinin mikroRNA'larla (mikroRNA'lar kodlanmayan RNA molekülleridir, yani DNA'dan transkripsiyonu yapılan ancak proteine çevirisi yapılmayan genler tarafından kodlanırlar. Bunlar mRNA ile eşleşerek mRNA çokluğunu ve çevirisini kontrol ederler) post-transkripsiyonal

düzenlenmesinin önemli olduğu gösterilmiştir (Jones-Rhoades *et al.* 2004; Fujii *et al.* 2005; Bari *et al.* 2006). Son zamanlarda yapılmış çalışmalar mikroRNA ların bitki N cevaplarında da önemli roller üstlenebileceğini göstermiştir. Yapılmış iki önemli mikrodizi analizi ile çok sayıda mikroRNA hedeflerinin nitrat ve/veya sukroz uygulamalarıyla düzenlendiğini ve böylece nitrat ve/veya sukroz tarafından düzenlenen gen ekspresyonunun mikroRNA larla kontrol edildiğini göstermiştir (Wang *et al.* 2000; Gutierrez *et al.* 2007). Azot uygulamalarının protein sentezi ve degradasyonunu gerektiren proteinlerin transkript düzeylerinin, çok sayıda protein kinazların ve protein fosfatazların düzeylerinin düzenlenmesinde de rol oynadıkları gösterilmiştir (Wang *et al.* 2003, 2004; Scheible *et al.* 2004; Gutierrez *et al.* 2007). Bu çalışmalarda araştırmacılar azotun çoğunlukla post-transkripsiyonal, translasyon ve/veya post-translasyonel düzeyde değişimlere sebep olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Fitohormonlar bitki büyümesi ve gelişiminde önemli roller oynayan anahtar regülatörlerdir. Genetik ve fizyolojik deliller N durumunun ve mevcudiyetinin bitkilerde hormon homeostazisi ve/veya sinyali ile meydana gelen morfolojik değişimleri tetiklediğini göstermiştir. N varlığı ve miktarı ile ilişkili olduğu ileri sürülen iki hormon oksin ve sitokinidir. Sitokin hormonunun köklerdeki azot miktarının gövdeye bildirilmesinde sinyal rol üstlendiği rapor edilmiştir (Takei *et al.* 2002). Bu çalışmada bitki köklerine nitrat sağlandığında köklerde sitokin düzeylerinde önemli artışlar ve sitokin hormonunun ksilem damarlarına translokasyonunun hızlandığı rapor edilmiştir. Nitratin, sitokin biyosentezi için anahtar bir enzim olan *IPT3* transkript düzeylerinde önemli artışlara sebep olduğu bildirilmiştir (Wang *et al.* 2004; Takei *et al.* 2004). Nitrata verilen cevaplarda iki önemli sinyal yolunun olduğu rapor edilmiştir: nitrat-spesifik yol ve sitokin-bağımlı yol (Sakakibara *et al.* 2003). Nitrat asimilasyonu ve aminoasitlerin ve nükleotidlerin sentezinde rol alan nitrat spesifik genlerin ve sitokin-bağılı genlerin protein sentezi için artan kapasite ve gelişimsel programlarla ilgili olduğu rapor edilmiştir (Sakakibara *et al.* 2006).

Nitratla düzenlenen genlerin network analizleri ile oksin-nitrat bağlantısı ortaya çıkarılmıştır (Gutierrez *et al.* 2007). Oksin hormonunun, yan kök oluşumunun nitratin

yüksek konsantrasyonlarda olduğu durumlarda inhibisyonunda rol oynayan yapraklardan köklere bir sinyal rolü üstlendiği ileri sürülmüştür (Forde 2002; Walch-Liu *et al.* 2006). Bu hipotez mantıklıdır çünkü oksin hormonunun yan köklerin gelişimini düzenlediği artık iyi bilinmektedir (Bhalerao 2002). Sürekli olarak yüksek konsantrasyonlarda (50 mM) nitrat içeren büyüme ortamında yetiştirilen *Arabidopsis* bitkilerinin köklerinde, azot kaynağı olarak düşük konsantrasyonlarda nitrat (0.1 mM) içeren grupta nitrat konsantrasyonundaki azalmayla paralel olarak oksin miktarında artış rapor edilmiştir (Walch-Liu *et al.* 2002). Qiuyiing *et al.* (2008) mısırdaki artan konsantrasyonda nitratın sebep olduğu kök büyümesinin inhibisyonunun köklerde oksin düzeyleri ile ilgili olduğunu rapor ettiler. Bu sonuçlar yüksek konsantrasyonlarda nitratın oksin biyosentezini inhibe ettiği ve yapraklardan köklere translokasyonunu engellediğini gösterir. Ancak oksine de bağlı olan bir yolla (De Smet *et al.* 2003) yüksek nitrat konsantrasyonlarında yan kök oluşumunun engellenmesinde absisik asitin (Walch-Liu *et al.* 2002; Zhang *et al.* 2007) de rol oynadığı ileri sürülmüştür.

Sessil yaşam şekillerinden dolayı bitkiler sürekli olarak biyotik ve abiyotik stres faktörleriyle yüzleşmek zorundadırlar. Solunum metabolizması bitkilerin yaralanma, düşük sıcaklık, hipoksia, besin kıtlığı, tuzluluk ve patojen enfeksiyonu gibi değişik stres şartlarına biyokimyasal düzeyde aklimasyonlarında önemli roller oynadıkları çeşitli araştırmacılar tarafından önemli bulgularla birlikte rapor edilmiştir (Givan 1999; Siedow and Umbach 2000; Möller 2001; Tiwari *et al.* 2002; Millenaar and Lambers, 2003; Vance *et al.* 2003; McDonald and Vanlerberghe 2005; Ribas-Carbo *et al.* 2005; Plaxton 2005). Glikoliz ve TCA döngüsünün çoğu enzim ve ara ürünü stres aklimasyonunu kolaylaştırmak için değişikliğe gider. Örneğin P_i veya Fe_2^+ eksikliği, veya Al_3^+ toksisitesi durumlarında çoğu bitkide önemli miktarda sitrik asit ve malik asitin köklerden dışarı salındığı rapor edilmiştir (Neumann and Rumheld 1999; Lopez-Millan *et al.* 2000; Ma *et al.* 2001; Massonneau *et al.* 2001; Ryan *et al.* 2001; Tesfaye *et al.* 2001; Schulze *et al.* 2002; Vance *et al.* 2003; Shane *et al.* 2004; Cramer *et al.* 2005).

Bitkilerin yeşil kısımlarında fotosentetik elektron transport zinciri bitkilerde ROT üretiminin ana kaynağı konumunda iken miETS de yeşil olmayan dokularda ve

karanlıkta fotosentetik dokularda ROT üretiminin en fazla gerçekleştiği bölgelerdir (Møller 2001; McDonald and Vanlerberghe 2006). Bununla birlikte bu genel görüşe aykırı sonuçlar da rapor edilmiştir. Örneğin buğday yaprak mitokondrilerinin kloroplast ve peroksizomlarından çok daha fazla ROT-modifiye proteinler içerdiği rapor edilmiştir (Bartoli *et al.* 2004). Çünkü zararlı ROT üretimi aerobik solunumun kaçınılmaz sonucudur. Değişik biyotik ve abiyotik stres şartları altında Mitokondriyal ETS tarafından artan *in vivo* ROT üretiminin arttığı gösterilmiştir (Møller 2001; McDonald and Vanlerberghe 2005). Örneğin kronik oksidatif strese maruz bırakılan *Arabidopsis* hücrelerinin miETS akış hızında ve O₂ alımında artışla birlikte ROT üretiminde artma, ATP üretiminde azalma ve programlı hücre ölümleri rapor edilmiştir (Tiwari *et al.* 2002).

Süperoksit ve peroksit gibi reaktif oksijen türlerinin üretimi aerobik metabolizmanın kaçınılmaz sonuçlarıdır. Yeşil olmayan bitki hücrelerinde miETS ROT üretiminin en önemli kaynağıdır. Bitkilerde reaktif oksijen türleri özellikle kloroplastlarda (Foyer *et al.* 1994), mitokondrilerde (Chance *et al.* 1979) ve azot fikse eden nodüllerde (Becana *et al.* 2000) istenmeyen ürünler olarak oluşurlar. ROT üretimi özellikle peroksizomlarda gerçekleşen değişik metabolik yollarda da gerçekleşir ve bu reaksiyonlarla üretilen ROT patojen istilası gibi değişik stres faktörlerine karşı bir silah olarak kullanılır. ROT proteinlere, lipidlere ve DNA ya zarar verebileceği için ROT üretimi ve etkisiz hale getirilmesi mekanizmaları tam bir denge halinde işlemelidir. Bu yüzden bütün hücre kompartmanları ROT sebebiyle kaynaklanan zararların onarılmasında ve aşırı ROT üretiminin engellenmesinde rol oynamalıdır.

Memelilerin mitokondrilerinde toplam oksijen tüketiminin %1-5'inin (Chance *et al.* 1979) bitki mitokondrilerde ise yaklaşık %1'inin ROT üretimi ile sonuçlandığı rapor edilmiştir (Puntarulo *et al.* 1988). Diğer taraftan bitki mitokondrilerinde solunumla ROT üretiminin artan AOX aktivasyonu ile azaldığı rapor edilmiştir (Purvis 1997; Braidot *et al.* 1999). AOX aktivasyonu ile ROT üretiminin düşüşü durumunun, artan AOX aktivasyonu ile birlikte ubikinonun aşırı indirgenmesinin azalması mekanizmaları ortaya atılmıştır (Lambers 1982; Hoefnagel *et al.* 1995; Rasmusson *et al.* 2009).

AOX kapasitesinin, protein miktarının ve AOX kodlayan mRNA transkript miktarının çeşitli biyotik ve abiyotik stres şartları altında arttığı birçok araştırmayla rapor edilmiştir (Simons *et al.* 1999; Djajanegara *et al.* 2002; Sieger *et al.* 2005; Rasmusson *et al.* 2009). AOX proteinindeki bu değişimler stres şartları altında artan ROT miktarının AOX proteinini kodlayan gen ekspresyonunu artırdığı şeklinde bir yaklaşımla açıklanmıştır. Mitokondriler, özellikle kompleks I ve III bulunduğu kısımlardaki salınımın büyük katkısıyla ROT üretiminin bitkilerde kloroplastlardan sonra en yaygın olduğu bitki organelidir (Noctor *et al.* 2007). Stres şartları altında AOX gen ekspresyonunun artması durumu AOX in ubikinon indirgenme düzeyini azaltmak ve böylece ROT üretiminin azalması şeklinde yorumlanmıştır (Purvis and Shewfelt 1993; Møller 2001; Rhoads and Subbaiah 2007). Bununla birlikte AOX aktivitesinin ortamdaki moleküler oksijen miktarının azalmasına katkıda bulunarak ROT üretiminin engellenmesine yardımcı olabileceği de bildirilmiştir (Gupta *et al.* 2009).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Yararlanılan alet ve cihazlar

Nanodrop Spektrofotometre	: Thermo Scientific, USA.
Elisa Okuyucusu	: Fuke, USA
Real Time PCR Sistemi	: Corbett Research, Sydney, Australia
Thermal Cycler (PCR)	: Gene Tool, Model: PTC-225, USA
Affymetrix GeneChip Scanner 3000	: Affymetrix, Santa Clara, CA, USA
Kuru Blok Isıtıcı	: Cole-Parmer, UK
Santrifüj	: IEC Clinical santrifüje, USA.
Ultra mini santrifüj	: Spectra Scientific Ltd. KD1200 R.O.C.
Soğutmalı santrifüj	: Juan CR4-12, USA
Spektrofotometre	: Cecil Instruments. UK.
pH metre	: Perkin-elmer, Coleman 28c Metrion.
Hassas terazi	: Shimadzu AY 220, Japonya
Otomatik pipetler	: Fischer Comp.
İklim Dolabı	: Binder KBW 400, Almanya
Çalkalayıcı	: GFL Comp.
Isıtıcılı manyetik karıştırıcı	: IKA Cambing RCO
Derin Dondurucu (-20°C)	: Kirsch, Almanya
Derin Dondurucu (-85°C)	: Thermo Scientific, USA
Elektroforez Sistemi	: Bio-Rad, USA
Western Blotlama Sistemi	: Bio-Rad, USA
Kar makinesi	: ZBE 250 Ziegra, UK
Çalkalayıcı	: Model SK-600 Montreal Biotech Inc.
Otoklav	: Model PS/RSV/SH450 Priorclave, UK

3.1.2. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanış biçimleri

Araştırma süresince kullanılan çözeltilerin kullanıldığı yerler ve hazırlanış biçimleri aşağıda sunulmuştur. Çalışmalarımızda kullanılan kimyasal maddeler Sigma, Fluka, Merck ve Fischer firmalarından temin edilmiştir.

1. Somerville ve Ogren besin çözeltisi (*Arabidopsis* hidroponik kültürleri için önerilen makrobesin elementleri x0.5 oranında ve Tobacco BY-2 hücre kültürü için x1 oranında kullanılmıştır): 2,5 mM KH_2PO_4 (pH5.6), 2 mM MgSO_4 , 2 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 50 μM Fe-EDTA ve azot kaynağı olarak 1 mM KNO_3 veya 1 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ makro besin elementleri (azot kaynağı olarak 1 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ kullanılmış gruplarda KNO_3 yerine KCl ve $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ yerine aynı konsantrasyonda CaCl_2 kullanılmıştır) ile 70.0 mM H_3BO_3 , 14 mM MnCl_2 , 0.5 mM CuSO_4 , 1 mM ZnSO_4 , 0.2 mM NaMoO_4 , 10 mM NaCl ve 0.01 mM CoCl_2 mikro besin elementleri içeren çözelti.
2. Tobacco BY-2 besin çözeltisi (Tobacco BY-2 hücre kültürü için kullanılmıştır): 1 litre hacimde x1 oranında Somerville ve Ogren besin çözeltisine %2 sakkaroz, 1mg Thiamine HCl, 100mg myo-inositol ve 0,2 mg 2,4-D ilave edilmiş, ortamın pH sı 5.0 a ayarlanmış ve ortamın pH sı 5mM MES tamponu ile sabitlenmiştir.
3. %1 fenol-%0.005 sodyum nitroprusid solüsyonu (amonyum tayini için kullanılmıştır): 1 gr fenol sıcaklığı 45-50°C ye getirilmiş 100 ml hacimde ddH₂O içerisinde çözölmüş ve daha sonra 0.005 gr sodyum nitroprusid ilave edilerek hazırlanmıştır.
4. %1 sodyum hipoklorid - %0.5 sodyum hidroksit solüsyonu (amonyum tayini için kullanılmıştır): 1 ml sodyum hipoklorit 100 ml ddH₂O içerisinde karıştırılmış ve bunun içerisinde 0.5 gr sodyum hidroksit çözölererek hazırlanmıştır.
5. Nitrat redöktaz ekstraksiyon tamponu (nitrat redöktaz aktivite ölçümü için kullanıldı): İçerisinde 250 mM Tris (pH 8.0), 0.1 mM EDTA, 1 μM Na_2MoO_4 , 5 μM FAD, 3 mM DTT, %1 BSA, 12 mM β -mercaptoethanol, ve 250 μM PMSF içeren çözelti.
6. Nitrat redöktaz reaksiyon karışımı (nitrat redöktaz aktivite ölçümü için kullanıldı): 100 mM KNO_3 , 100 mM MKH_2PO_4 (pH 7.5) ve 0.2 mM NADH içeren çözelti.

7. %1 sulfanilamide çözeltisi (nitrat redüktaz aktivite ölçümü için kullanıldı): 100 mg sulfanilamide 10 ml hacimde ve 3N konsantrasyonda HCl çözeltisi içerisinde çözülerek hazırlanır.
8. Ayırma jeli (elektroforez işlemleri için kullanılmıştır): 14.7 ml ddH₂O, 7.5 ml – 1.5M Tris/Cl (pH 8.8), 300 µl SDS (%10), 7.5 ml akrilamid (%40), 150 µl amonyum persulfat (%10), ve 10 µl TEMED den elde edilen karışım.
9. Yığılma jeli (elektroforez işlemleri için kullanılmıştır): 12.8 ml ddH₂O, 5 ml – 0.5 M Tris/Cl (pK 6.8), 200 µl SDS (%10), 2 mL akrilamid (%40), 100µl amonyum persulfat (%10) ve 20 µl TEMED den elde edilen karışım
10. TBE tamponu (elektroforez işlemleri için kullanılmıştır): 45 mM Tris, 89 mM borik asit ve 1 mM EDTA içeren çözelti.
11. Yükleme tamponu (elektroforez işlemleri için kullanılmıştır): TBE tamponu içerisine %40(w/v) oranında sakaroz ve % 0.25(v/v) oranında bromo-fenol blue ilave edilerek hazırlanmıştır.
12. Yürütme tamponu (elektroforez işlemleri için kullanılmıştır): 1 litre ddH₂O da 3g Tris, 14.5g glisin, ve 1g SDS ile hazırlanmıştır.
13. Master-mix (Real time PCR ölçümleri için kullanılmıştır): her reaksiyon için; 11,6µl ddH₂O, 2 µl 10xPCR tamponu (ticari olarak sağlanmış), 2.2 µl-25mM MgCl₂, 1.6 µl-2.5 mM dNTP, 0.2 µl SYBR-green solüsyonu, 0.2 µl Taq polimeraz, 0.1 µl primer#1 (50 µM), ve 0.1 µl primer#2 (50 µM) içeren karışım. Her bir örneğe ait PCR ölçümü için 18 µl master-mix ve 2 µl de cDNA kullanılmıştır.
14. Transfer tamponu (western blotlama işlemleri için kullanılmıştır): ddH₂O içerisinde çözülerek hazırlanmış olan 10 mM CAPS çözeltisi içerisinde %20 (v/v) oranında olacak şekilde metanol ilave edilmiş ve NaOH pelletleri ile pH 11 e ayarlanarak hazırlanmıştır.
15. TBST tamponu (western blotlama işlemleri için kullanılmıştır): 1 litresinde 2.42 gr Tris, 8 gr NaCl, 1.2 ml konsantre HCl, 1 ml Tween-20 içeren çözelti.
16. ECL solüsyonu (western blotlama ile jelden nitroselüloz membrana aktarılan proteinlerin röntgen kağıtlarına transferi işleminde kullanılmıştır): solüsyon 1: 0.13 mM Luminol, 0.017 mM p-Coumaric acid, 0.01 M Tris (pH 8.5) + solüsyon 2: 0.033 mM H₂O₂, 0.01 M Tris (pH 8.5).
17. 20 mM NADH solüsyonu (NADH standart grafik hazırlanması için kullanılmıştır):

15.6 mg NADH (763 g/mol) 1 ml hacimde 100 mM konsantrasyonda NaOH içerisinde çözülerek hazırlanmış ve -80 °C de muhafaza edilmiştir. Kullanılmadan önce örnekler 95°C de 10 dk ısıtılmıştır.

18. 20 mM NADPH solüsyonu (NADPH standart grafik hazırlanması için kullanılmıştır): 17.2 mg NADPH (833.4 g/mol) 1 ml hacimde 100 mM konsantrasyonda NaOH içerisinde çözülerek hazırlanmış ve -80°C de muhafaza edilmiştir. Kullanılmadan önce örnekler 95°C de 10 dk ısıtılmıştır.

19. 20 mM NAD solüsyonu (NAD standart grafik hazırlanması için kullanılmıştır): 13.4 mg NAD (663.4 g/mol) 1 ml hacimde ddH₂O içerisinde çözülerek hazırlanmış, kullanıma kadar örnekler -20 °C de muhafaza edilmiştir.

20. 20 mM NADP solüsyonu (NADP standart grafik hazırlanması için kullanılmıştır): 15.2 mg NADP (734.4 g/mol) 1 ml hacimde ddH₂O içerisinde çözülerek hazırlanmış, kullanıma kadar örnekler -20°C de muhafaza edilmiştir.

21. NAD(H) reaksiyon karışımı (örneklerdeki NAD ve NADH miktarlarının tayininde kullanılmıştır): 0.3 M Tricine/KOH (pH 9.0), 12 mM Na₂-EDTA, 0.3 mM PES, 1.8 mM MTT, 1.5 M EtOH ve 18 U/ml Alcohol Dehydrogenase içeren karışım.

22. NADP(H) reaksiyon karışımı (örneklerdeki NADP ve NADPH miktarlarının tayininde kullanılmıştır): 0.3 M Tricine/KOH (pH 9.0), 12 mM Na₂-EDTA, 0.3 mM PMS, 1.8 mM MTT, 9 mM Glukoz-6-P ve 9 U/ml Glukoz-6-P Dehidrogenaz içeren karışım.

23. Glutatyon reaksiyon karışımı (toplam glutatyon miktarının belirlenmesi için kullanılmıştır): 10 mM NaH₂PO₄ (pH 7.8), 0.6 mM DTNB, 6 mM EDTA ve 0.1 mM NADPH içeren karışım.

24. Total protein ekstraksiyon tamponu (örneklerin protein miktarlarını belirlemek ve KAT, POD, SOD, GR enzim aktivitelerini ve protein karbonilasyon düzeylerini belirlemek amaçlı protein ekstraksiyonu için kullanılmıştır): %2 (w/v) çözülebilir polyvinylpyrrolidon ve 1 mM EDTA içeren 10 mM KH₂PO₄ tamponu (pH 7.0).

25. Total protein ekstraksiyon tamponu (örneklerin protein miktarlarını belirlemek ve askorbat peroksidaz enzim aktivitesini belirlemek amaçlı protein ekstraksiyonu için kullanılmıştır): %2 (w/v) çözülebilir polyvinylpyrrolidon, 1 mM askorbik asit ve 1 mM EDTA içeren 50 mM KH₂PO₄ tamponu (pH 7.8).

26. POD reaksiyon karışımı (guaiakol peroksidaz enzim aktivitesi ölçümünde

kullanılmıştır): 1 mM guaiakol ve 0.5 mM H_2O_2 içeren 50 mM NaH_2PO_4 (pH 5.5) tampon çözeltisi.

27. SOD reaksiyon karışımı (süperoksit dismutaz enzim aktivitesi ölçümünde kullanılmıştır): 13 mM methionin, 75 μM NBT, 2 μM riboflavin ve 0.1 mM EDTA içeren 50 mM KH_2PO_4 (pH 7.8) tampon çözeltisi.

28. GR reaksiyon karışımı (glutatyon redüktaz enzim aktivitesi ölçümünde kullanılmıştır): 0.5 mM GSSG ve 0.12 mM NADPH- Na_4 içeren 0.025 M NaH_2PO_4 (pH 7.8) tampon çözeltisi.

29. AP reaksiyon karışımı (askorbat peroksidaz enzim aktivitesi ölçümü için kullanılmıştır): 0.5 mM askorbik asit, 0.3 mM H_2O_2 ve 0.1 mM EDTA- Na_2 içeren 50mM KH_2PO_4 (pH 7.0) tampon çözeltisi.

30. Oksijen tüketimi ölçüm çözeltisi (Tobacco BY-2 hücrelerinin solunum hızları ve alternatif oksidaz kapasitesi ölçümleri için kullanılmıştır): 100 mM HEPES, 100 mM mannitol, 50 mM KCl içeren çözelti.

3.2. Yöntem

3.2.1. *Arabidopsis thaliana* ekotip Kolombiya-0 tohumlarının hazırlanması ve hidroponik kültür ortamı

Lehle Seeds (2366 Round Rock, TX 78680-2366 USA) şirketinden temin edilen *Arabidopsis thaliana* Ekotip Kolombiya-0 tohumları *Arabidopsis* hidroponik büyütme sistemi (Araponics, Liege, Belgium) kullanılarak hidroponik olarak yetiştirildi.

Tohumlar %0.65 agaroz içeren tohum tutuculara yerleştirildi ve böylece tohum tutucular içerisinde 1.9 litre besin çözeltisi içeren hidroponik saksılara (onsekiz adet tohum tutucu bir saksıya) yerleştirildi. Kullanılan besin çözeltisi Somerville ve Ogren (1982) tarafından rapor edilen, fakat yarım konsantrasyonda (2.5 mM KNO₃, 1.25 mM KH₂PO₄ (pH5.6), 1 mM MgSO₄, 1 mM Ca(NO₃)₂, 25 µM Fe-EDTA) makronutrient bileşikleri ile yine bu bilim adamları tarafından rapor edilen mikrobesein elementleri (70.0 mM H₃BO₃, 14 mM MnCl₂, 0.5 mM CuSO₄, 1 mM ZnSO₄, 0.2 mM NaMoO₄, 10 mM NaCl and 0.01 mM CoCl₂) 1x konsantrasyonda kullanıldı. Fizyolojik olarak gerçekçi büyüme ortamı hazırlamak adına büyüme ortamına herhangi bir karbon kaynağı (sakaroz gibi) ilave edilmemiştir.

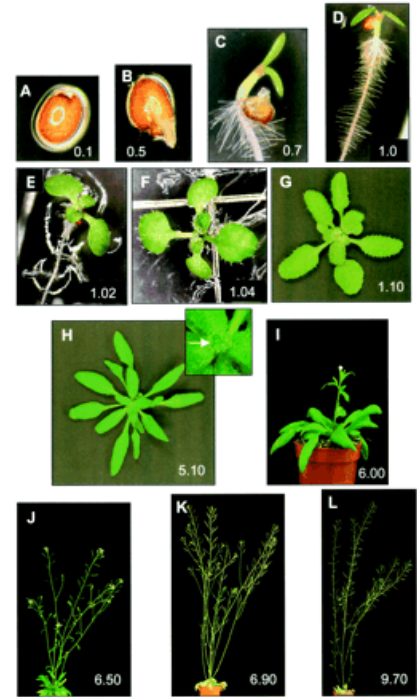
Hidroponik kutular (tohumlarla beraber) 4°C’de 2 gün boyunca inkübe edildi ve daha sonra 16 saat ışık (100 µmol m⁻²sn⁻¹), 8 saat karanlık şeklinde ayarlanmış ve içerişi 22/20°C gün/gece ye ayarlanmış iklim dolabına transfer edildi. Yaklaşık 10 gün sonra fidelerin besin çözeltileri yenilendi ve çözeltilerin sürekli havalandırılması işlemi de başlatıldı (Şekil 3.1). Böylece bitkiler Boyes et al. (2001) tarafından tanımlanan büyüme etabı 5.10’a (Şekil 3.2) gelinceye kadar yetiştirildi (yaklaşık 10 gün). Büyüme etabı 5.10’a kadar yetişmiş olan bitkiler azot kaynağı içermeyen (KNO₃, KCl ile ve Ca(NO₃)₂, CaCl₂ ile değiştirildi) besin çözeltilerine aktarıldı. 26 saat sonra (bu süre bitkilerin kök hücrelerinin kofullarında depo ettikleri nitratın yaklaşık olarak %80’ini tüketmeleri için yeterli idi) besin çözeltilerine gruplara göre farklı azot kaynağı olarak 1

mM KNO₃ veya 0.5 mM (NH₄)₂SO₄ ilave edildi. Ortama 1 mM konsantrasyonunda nitrat ilave etmek için ek olarak 1 M potasyum ve 1mM konsantrasyonunda amonyum ilave etmek için 0.5 M ek sülfat iyonu ilave edildiği için elde edilecek olan değişimlerin ilave edilen bu iyonlardan mı kaynaklandığı konusunda şüphe bırakmamak için kontrol olarak bir gruba da 0.5 mM K₂SO₄ ilave edildi. Yeni azot kaynağı ilavesinden hemen önce (0. saat) ve azot kaynağı ilavesinden 1.5 ve 8 saat sonra bitkilerin kökleri hasat edilerek yapılacak deneysel analizler için -80°C ye ayarlanmış derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.1. Hidroponik olarak yetiştirilen *Arabidopsis* bitkileri (10 günlük).

- (A) Etap 0.1, imbibisyon.
- (B) Etap 0.5, radikulanın çıkışı.
- (C) Etap 0.7, hipokotil ve kotiledonlar tohum kabuğundan çıkmış.
- (D) Etap 1.0, kotiledonlar tamamen açılmış.
- (E) Etap 1.02, İki rozet yaprak >1 mm uzunluğunda.
- (F) Etap 1.04, dört rozet yaprak >1 mm uzunluğunda.
- (G) Etap 1.10, On rozet yaprak >1 mm uzunluğunda. Rozetlerin yarısı olgun, normal büyüklükte
- (H) Etap 5.10, ilk çiçek tomurcukları belirgin (ok ile gösterilmiş).
- (I) Etap 6.00, ilk çiçek açmış.
- (J) Etap 6.50, çiçeklenmenin orta dönemleri.
- (K) Etap 6.90, çiçeklenme tamamlanmış.
- (L) Etap 9.70, senesens ve tohum hasatı için hazır.
- (A) - (F) erken analiz platformuna (hidroponik, agar) göre belirlenmiş.
- (G) - (L) toprak-tabanlı büyüme platformuna göre belirlenmiştir.

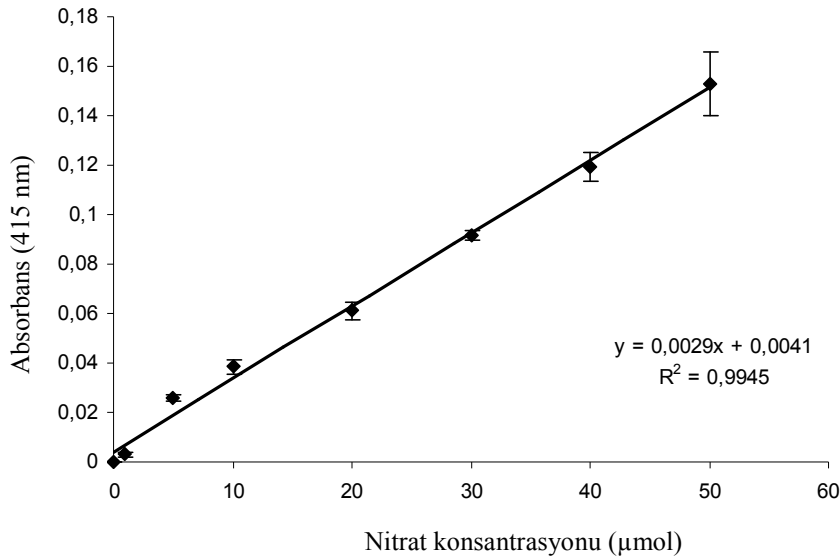


Şekil 3.2. *Arabidopsis* büyüme aşamaları (Boyes *et al.* 2001)

3.2.2. Nitrat tayini

Hücre ve dokulardaki nitrat tayini Cataldo *et al.* (1975)'e göre yapılmıştır. Örnekler sıvı azotta dondurulduktan sonra 6 kat hacimde ddH₂O ile homojenize edilmiştir. Homojenat 4°C'de maksimum hızda 15 dk santrifüjlenmiş ve süpernatant -20°C derin dondurucuda kullanım için saklanmıştır.

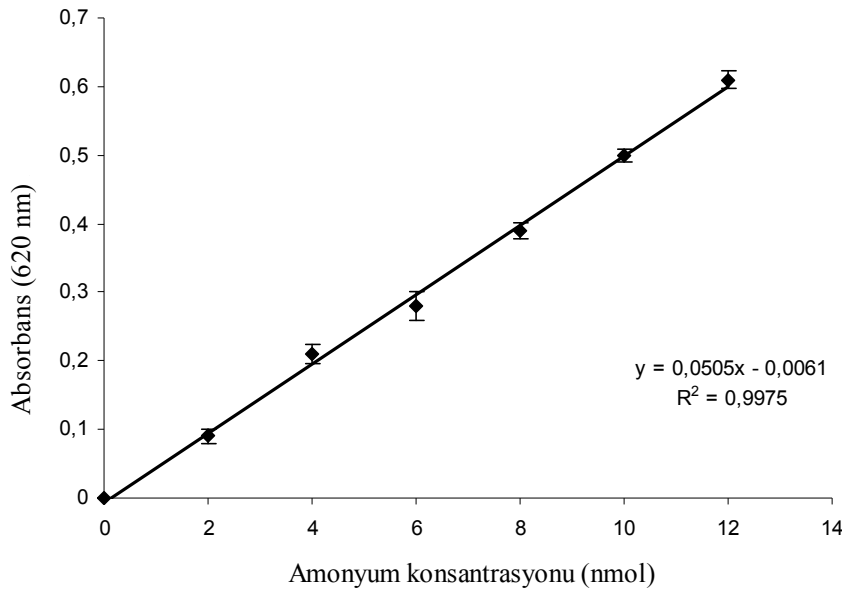
Kullanım için, örnekler safsızlıklardan arındırılmak amacıyla 3 dk yüksek hızda tekrar santrifüjlenmiş (eğer besiyeri çözeltisindeki nitrat konsantrasyonu ölçülecekse çözeltiden 40 µL alınarak takip eden adımlar aynen izlenmiştir), ve 40 µL süpernatant 160 µl, konsantre H₂SO₄ ile hazırlanmış %5 (w/v) salisilik asit çözeltisi ile oda şartlarında 20 dk boyunca inkübe edilmiştir. Daha sonra 3.8 ml, 2M NaOH ilave edilmiş ve örnekler buz banyosunda 5 dk soğutulduktan sonra 415 nm'deki absorban değerleri okunarak KNO₃ ile hazırlanmış standart grafikten faydalanılarak örneklerdeki nitrat miktarları tayin edilmiştir. Kör numune olarak salisilik asit kullanılmaksızın tüm işlemler aynen uygulanan örnekler kullanılmıştır.



Şekil 3.3. Nitrat tayininde kullanılan standart grafik.

3.2.3. Amonyum tayini

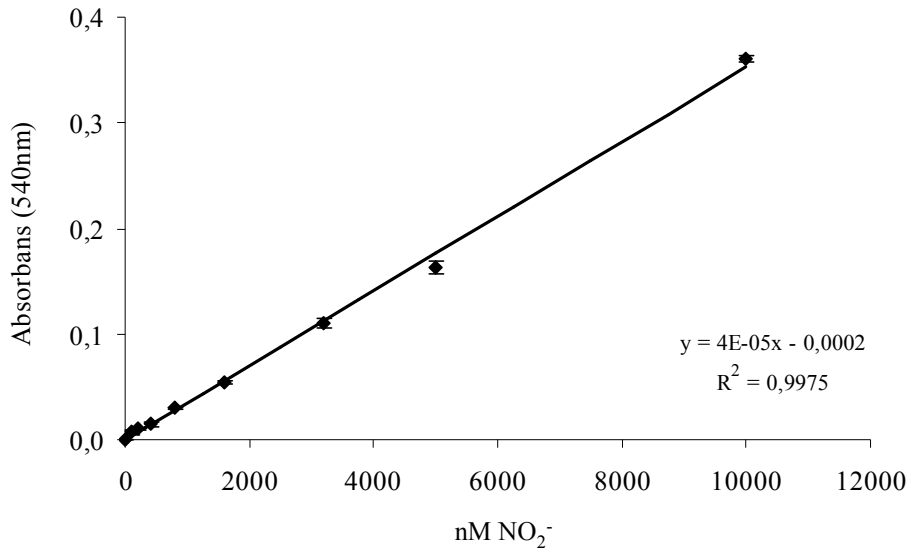
Hücre ve dokulardaki nitrat tayini Brautigam *et al.* (2007) e göre yapılmıştır. Örnekler sıvı azotla homojenize edilmiş ve 100 mg Homojenat 1 ml hacimde 100 mM konsantrasyonda HCl içerisinde homojenize edilmiş ve üzerine 500 µl kloroform eklenmiştir. Sonra örnekler 4°C de 15 dk bekletilmiş ve 12000 g devirle 10 dk boyunca 8°C de santrifüjlenmiştir. Süpernatant içerisinde asitle yıkanmış aktif kömür bulunan başka bir tüpe aktarılmış, karıştırılmış ve 20000g devirle 5 dk boyunca 8°C de santrifüjlenmiştir. Daha sonra süpernatant alınmış ve 1:1 (v/v) oranda 10 mM HCl ile seyreltilmiştir (eğer ortam amonyum miktarı tayin edilecekse sıvı örnekten 1 ml alınarak eşit hacimde 10 mM HCl ile seyreltilmiş ve sonraki adımlar aynen takip edilmiştir). Bu solüsyonun 20 µl si 100 µl %1 (w/v) fenol- %0.005 (w/v) sodyum nitroprusid solüsyonu ile karıştırılmış ve üzerine 100 µl %1 (v/v) sodyum hipoklorid - %0.5 (w/v) sodyum hidroksit solüsyonu ilave edilmiştir. Örnekler 37°C de 30 dk boyunca inkübe edilmiş ve 620 nm de verdikleri absorpsiyon değerleri kaydedilmiş ve standart grafikten faydalanarak dokulardaki amonyum konsantrasyonları hesaplanmıştır.



Şekil 3.4. Amonyum tayininde kullanılan standart grafik

3.2.4. Nitrat Redüktaz enzim aktivitesinin belirlenmesi

Nitrat redüktaz enzim aktivitesi tayini Xiaodan *et al.* (1998)'e göre yapılmıştır. Derin dondurucuda (-80°C) bulunan donmuş kök örneklerinden 200 mg alınarak sıvı azotta homojenize edildi ve içerisinde 1 ml ekstraksiyon çözeltisi bulunan eppendorf tüpüne aktarıldı ve vortekslendi. Homojenat 10000g devirde 10 dk santrifüjlendi. 150 µl süpernatant alınarak 850 µl reaksiyon çözeltisi (100 mM KNO₃, 100 mM KH₂PO₄ (pH 7.5) ve 0.2 mM NADH içeren çözelti) ile birleştirildi ve karışım oda sıcaklığında karanlıkta 2 saat boyunca inkübe edildi. 2 saat inkübasyonun sonunda reaksiyon tüplere 200 µl %1 lik sulfanilamid ve 100 µl %0.1'lik N-(1-napthyl) ethylendiamyene hydrochloride ilave edilerek durduruldu. Son olarak solüsyonun absorbansı 540 nm de okunarak üretilen NO₂⁻ konsantrasyonu belirlenmiş oldu. Örneklerdeki üretilen NO₂⁻ konsantrasyonlarını belirlemek için ticari NO₂⁻ ile hazırlanmış standart grafikten faydalanıldı.



Şekil 3.5. Nitrat Redüktaz enzim aktivitesi tayini için hazırlanan standart grafik.

3.2.5. RNA izolasyonu, cDNA sentezi, ve real time PCR

Qiagen Plant RNeasy kit kullanılarak üretici firmanın önerilerine göre yapılmış olan RNA ekstraksiyonunda şu yollar izlenmiştir;

1. Yaklaşık 100'er mg doku örneği havanda sıvı azot içerisinde ezilmiş ve steril 2ml- mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır.
2. Mikrosantrifüj tüplerine 450 µl RLC* tamponu ilave edilmiş ve vortekslenmiştir.
3. Elde edilen lizat, QIAshredder tüpüne transfer edilmiş ve 2 dk boyunca tam hızda santrifüjlenmiştir ve elde edilen süpernatant bir RNeasy hız kolonuna transfer edilmiştir.
4. RNeasy hız kolonuna ½ hacimde etanol (%96-100) ilave edilmiş ve 15 sn 9000xg'de santrifüjlenip süpernatant atılmıştır.
5. 700 µl RW1* tamponu ilave edilmiş ve 9000 xg'de 15 sn santrifüjlenip süpernatant atılmıştır.
6. 400 µl RPE* tamponu ilave edilecek ve 9000 xg'de 15 sn santrifüjlenip süpernatant atılmıştır.
7. 500 µl RPE* tamponu ilave edilecek ve 9000 xg'de 2 dk santrifüjlenip süpernatant atılmıştır.
8. Elde edilen RNA'yı ayırtırmak amacıyla 30-50 µl RNaz-free su ilave edilip 9000 xg'de 1dk santrifüjlenmiş ve RNA konsantrasyonu 260 ve 280 nm dalga boylarında ölçümler yapılmak suretiyle hesaplanmıştır. Eğer RNA miktarı >30 µg çıkarsa seyreltme işlemi tekrarlanarak konsantrasyon ayarlanmıştır.

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

* Solüsyonlar ticari olarak hazır elde edilmiştir.

1. 0.9 gr agaroz 50 ml TBE tamponu (45 mM Tris, 89 mM Borik asit, 1 mM EDTA) ile karıştırılmış ve agaroz tamamen çözülünceye dek kaynatılmıştır. Solüsyon soğuyunca (60°C'nin altına düşünce) 2 µl etidyum bromid ilave edilmiş ve jel kasetlere dökülüp kuruyuncaya kadar (yaklaşık 1 saat) beklenerek yüklemeye hazır hale getirilmiştir.
2. Analiz için her örneğe ait içerisinde 600 ng RNA bulunan ikişer tüp kullanılmış, bunlardan birisi yüklemeye önce 20 dk, 37°C'de inkübe edilmiş ve diğeri de buz banyosunda tutulmuştur.
3. Jele yüklemeye önce kaset sistemine yükleme tamponu (TBE, %40 sukroz, %0.25 bromo-fenol blue) ilave edilmiş, eşit hacim ve miktardaki örnekler jellere Hamilton pipetleri yardımıyla yüklenmiştir. Jelde yürütme işlemi 72Volt'ta gerçekleştirilmiştir.
4. Son aşama olarak jelde elde edilen bantlar gözlemlenerek RNA'nın saflığı kontrol edilmiştir.

Elde edilmiş olan RNA'nın saflığı belirlendikten sonra PCR amplifikasyonu için uygun first-strand cDNA sentezine geçilmiştir. Sentez için ticari olarak sağlanmış olan “RevertAid-H kiti” kullanılmış ve üreticilerin önerilerine göre şu yollar takip edilmiştir;

1. First-strand cDNA sentezi için hazırlanmış olan reaksiyon karışımı (500 ng RNA, 0.5 µl oligo(dT) primer, 5.5 µl RNaz-free su) 70°C'de 5 dk inkübe edilmiş ve soğuyuncaya kadar buz banyosunda tutulmuştur.
2. Yine buz banyosu üzerinde reaksiyon karışımına 4 µl reaksiyon tamponu*, 1 µl Ribonükleaz inhibitörü* ve 10 mM dNTP karışımından* 2 µl ilave edilmiş ve son karışım 37°C'de 5dk boyunca inkübe edilmiştir.
3. İnkübe edilmiş son karışıma 1 µl RevertAid-H Minus M-MuLV RT (200 u/µl) ilave edilmiş ve bu karışım 42°C'de 60 dk boyunca inkübe edilmiştir.
4. Son olarak 70°C'de 10 dk inkübe edilmiş ve buz banyosuna alınarak reaksiyon durdurulmak suretiyle first-strand cDNA sentezi tamamlanmıştır.

* Solüsyonlar ticari olarak sağlanmıştır.

Elde edilmiş olan cDNA'lar RNaz-free su ile 5 veya 10 kat seyreltilmiş ve real-time PCR işlemine geçilmiştir. Bu işlemde takip edilen basamaklar şu şekildedir;

1. PCR reaksiyonları için hazırlanmış olan master-mix (her reaksiyon için; 11,6 µl ddH₂O, 2 µl 10xPCR tamponu, 2.2 µl-25mM MgCl₂, 1.6 µl-2.5 mM dNTP, 0.2 µl SYBR-green solüsyonu, 0.2 µl Taq polimeraz, 0.1 µl primer#1 (50µM), ve 0.1 µl primer#2 (50µM)) solüsyonu pipet yardımıyla iyice karıştırılmış, ve önceden soğutulmuş metal PCR bloğu içerisine yerleştirilmiş PCR tüplerine 18 µl master-mix ilave edilmiştir.
2. Bir örnek için kullanılmış olan üç ayrı tüple sırasıyla, 2 µl standart (pozitif kontrol), 2 µl cDNA, ve 2 µl ddH₂O (negatif kontrol) ilave edilmiş ve Real-Time PCR cihazına yerleştirilmiştir.
3. PCR cihazında döngüler;
 - 1 döngü 2 dk 40 sn 94°C,
 - 35 döngü 30 sn 94°C, 30 sn 60°C, 1dk 72°C
 - 1 döngü 5 dk 72°C, 1 dk 25°C

şeklinde ayarlanmıştır. Nisbi transkript kantitasyonu Rotor Gene software version 1.7.87 kullanılarak analiz edilmiştir. Real time PCR analizi için kullanılan primerlerin listesi çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Real time PCR analizi için kullanılan primerlerin listesi

Gen	AGI #	Forward primer sekansı (5' > 3')	Reverse primer sekansı (5' > 3')
76 kDa alt ünite, Kompleks I	At5g37510	AAGTTGCTGGGGTTCAGGAT	TTGAGGTCAAGGCTCCAACA
Glutamat dehidrogenaz 2	At5g07440	CACTGGAAAGCCCATGATCT	TGTCGCTTACTGCAACCACT
Nitrat redüktaz 1	At1g77760	AAAAGGCTACGCTTATTCTGGAG	ACTTGTTTCGGTTTCTCCTGGT
PINOID-bağlayıcı protein 1	At5g54490	GGAGATCTAACGACGACGA	TGACGCTTCCATCAATTCAG
WRKY70 transkripsiyon faktör	At3g56400	AATGCCAAATCCCAAGAAG	GGAGTTTCTGCGTTGGTGTTAC
Nodulin-benzeri protein	At2g39510	AAATTGCGACTGAACCAAGG	TCTTCGGCCGTATTTTCTATC
CBL-etkileşimli protein kinaz 13	At2g34180	AGAAGGTGGACAAGGAGCAA	TTCTAGCCTCACGCTCCAAT
Myo-inositol oxigenaz 4	At4g26260	ATTGGACGGAGGATTTTCG	TCAGCCCTCATCTTTTTCACA
Prolin oksidaz	At5g38710	GCATAACACAGACTCGGGTAAAC	CGCCGGATAAGGTATGGAAT
NAC-domain transkripsiyon faktör 47	At3g04070	GATCCATGGGATTACCAGC	CATGAAACCCTTCACCATTTG

3.2.6. Mikrodizi hibridizasyonu ve veri analizi

Mikrodizi teknolojisi nükleik asitlerin seçici ve farklılığa dayanan hibridizasyon yöntemi ile elde edilen gen ekspresyon analiz sonuçlarını kullanır. Bu teknolojiye ilk olarak iki farklı koşulda tutulan iki ayrı örnekten izole edilen messenger RNA (mRNA)'lardan RT yöntemi ile cDNA'lar sentezlenir. Sonra bu örneklerin biri siyanin 3 (cyanine, Cy3) ve diğeri siyanin 5 (cyanine, Cy5) boyasıyla etiketlenip işaretlenerek iki farklı probu oluşturur. Cy5 ve Cy3 iki farklı boya (dyes) olup farklı emme ve uyarılma (excitation) özelliğine sahip olmalarından dolayı iki farklı renk, kırmızı ve yeşil, üretirler. Bu iki farklı boyayla etiketlenip işaretlenen ve iki farklı örnekten elde edilen cDNA'lar karıştırılır ve oligonükleotidleri veya cDNA baz dizilerini içeren ve binlerce geni ifade eden DNA mikrodizileriyle hibridizasyon için kullanılır. Genomdaki her bir geni temsil eden bu cDNA parçacıkları hibridizasyon sırasında farklı sinyaller vermektedir. Hibridizasyon sırasında üretilen sinyallerin yoğunluğu örneklerdeki mRNA miktarları ile orantılıdır. Sonra bağlanmayan probları uzaklaştırmak için yıkama işlemi yapılır. Daha sonra boyaların ışıkla uyarılmasıyla oluşan kırmızı ve yeşil renkteki Cy3 ve Cy5 sinyalleri array tarayıcıları yardımıyla farklı dalga boylarında okunur. İki farklı dalga boyunda elde edilen Cy3 ve Cy5 sinyallerinin oranları bir cDNA parçacığının iki farklı probdaki yoğunluğunu ifade eder. Bu sinyallerin yoğunluklarını karşılaştırmak ve analiz sonuçlarını sayısal olarak belirlemek için bu amaçla hazırlanmış bilgisayar programları kullanılır. Bu programlar sayesinde hibridizasyon sonucunda mikrodiziden elde edilen sinyaller bilgisayarda birleştirilerek üç farklı renkte görüntülenir. Elde edilen bu görüntüde kırmızı renk, herhangi bir mRNA'nın prob 1'de prob 2'ye göre fazla olduğunu, sarı renk, mRNA'nın iki farklı probda da eşit miktarlarda bulunduğunu, yeşil renk ise, mRNA'nın prob 2'de prob 1'e göre daha fazla olduğunu ifade eder. Daha sonra her bir sinyalin ortalaması alındıktan sonra mikrodizide kendiliğinden oluşabilecek sinyal çıkartılıp ve her bir değer için normalizasyon işlemi farklı koşullarda ekspresyonu değişmeyen temel bir genle (housekeeping gene) veya sinyal yoğunluğu bilinen herhangi bir mRNA kullanılarak yapılır. Normalleştirilen bu veriler gen ekspresyon profillerinin belirlenmesinde

kullanılır (Detaylı bilgi için: Aharoni and Vorst 2001; Moody 2001; Donson *et al.* 2002;).

Genel prosedür: Her örnek için total RNA dan 1 µg alınarak bundan biotin-etiketli aRNA (mikrodizi analizi için etiketlenmiş olan RNA için bu terim kullanılacaktır) sentezlenmesi “Message Amp II-Biotin Enhanced aRNA synthesis kit (Ambion, Austin, TX, USA)” kullanılarak gerçekleştirildi. Gerçekleştirilen işlemler özetle;

4. Örneklerden alınan RNA lar 10 µl ye kadar RNaz free su ile seyreltildi
5. Üzerine 10 µl revers transkripsiyon master mix^{*} ilave edildi
6. 42°C’de 2 saat inkübe edildi
7. Tüplere 80 µl second strand master mix^{*} çözeltisinden ilave edildi
8. Örnekler 16°C’de 2 saat inkübe edildi.
9. Örnekler üzerine 250 µl cDNA bağlayıcı solüsyonu^{*} ilave edildi
10. Karışım bir cDNA filtresinden geçirilerek cDNA ların filtrede kalması sağlandı
11. cDNA lar 22 µl yıkama tamponu^{*} ile yıkandı
12. Önceden 55°C’ye ısıtılmış nükleaz-free su ile cDNA lar saflaştırılmış olarak yeni bir tüpe aktarıldı
13. Üzerine 20 µl IVT master mix^{*} ilave edildi ve çalkalandı
14. 12 saat 37°C’de inkübe edildi
15. 60 µl nükleaz-free su ilave edildi
16. 350 µl aRNA bağlayıcı tamponu^{*} ilave edildi pipet yardımıyla karıştırıldı
17. 250 µl %100 etanol ilave edildi ve pipet yardımıyla karıştırıldı
18. Örnekler aRNA filtresinden geçirildi
19. Filtre 650 µl yıkama tamponu^{*} ile yıkandı
20. aRNA lar önceden 55°C’ye ısıtılmış nükleaz-free su ile yıkanarak saflaştırılmış aRNA lar yeni bir tüpe aktarıldı
21. Kullanım için saflaştırılmış olan aRNA lar mikrodizi analizi için gönderilmek üzere -80°C’de saklandı.

* Solüsyonlar ticari olarak sağlanmıştır.

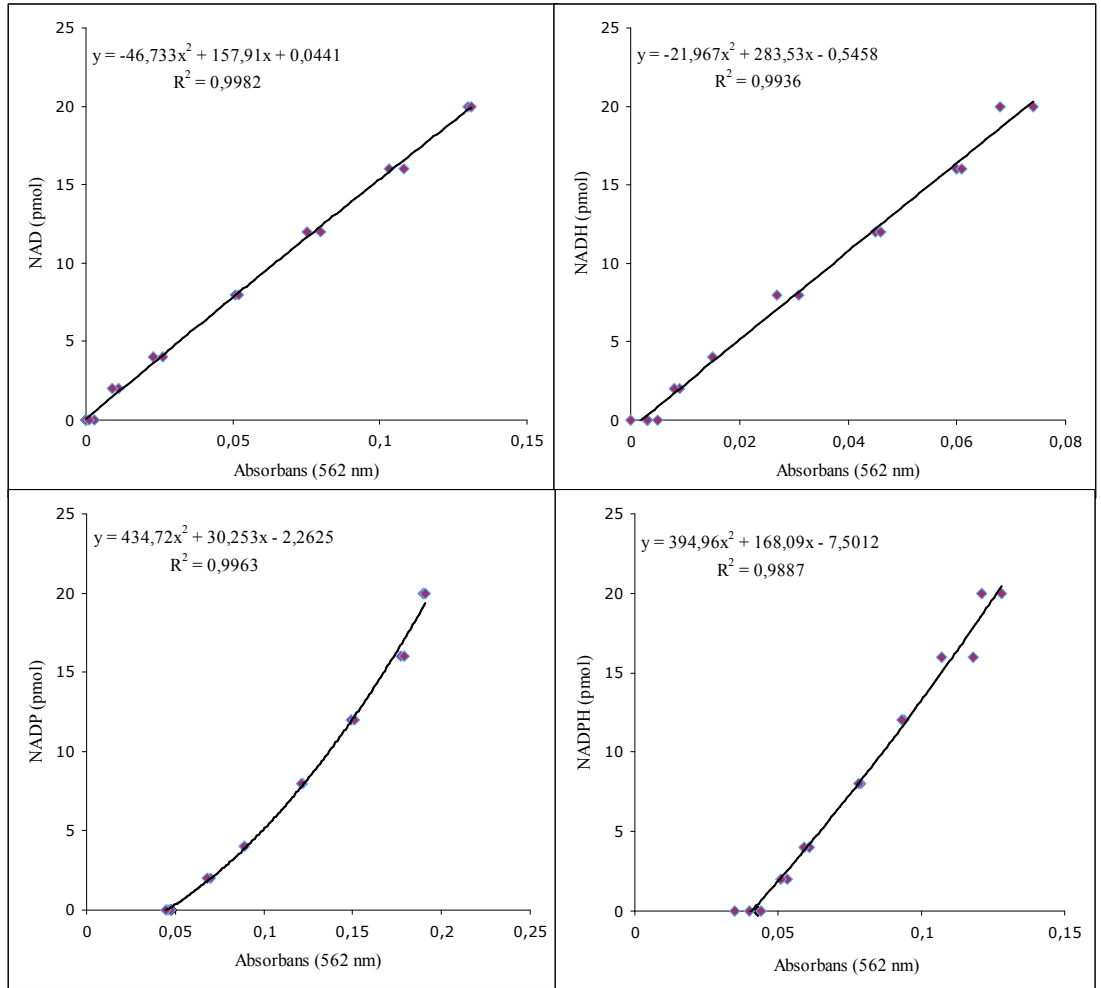
Mikrodizi hibridizasyonu için Affymetrix ATH1 çipleri (*Arabidopsis thaliana* için tasarlanmış özel çiplerden) tercih edildi. Elde edilen ham mikrodizi verileri Robust Multichip Average (RMA) programı kullanılarak normalize edildi (Bolstad et al., 2003). Kontrole göre gen ifadelerinde görülen “-katı değişimler” ve standart hatalar her bir gen için “Limma programı” adı verilen linear bir model uygulanarak tahmin edildi (Smyth, 2004). Mikrodizi analizleri aynı örneğe ait en az üç biyolojik tekrar kullanılarak gerçekleştirildi. Farklı mikrodizi çiplerinden elde edilen sonuçların birbiri ile örtüşüp örtüşmediği “Pearson’s Chi-square test” programı kullanılarak belirlendi. Bu programdan elde edilen sonuçlara göre veriler standardize edildi.

Mikrodizi verileri son halleri ile elde edildikten sonra global düzeyde hücresel fonksiyonlarda meydana gelen farklılığı (hangi metabolik fonksiyonların hızlanıp, hangilerinin baskılandığını) görebilmek için BioMaps programı adı verilen bir paket kullanılarak analiz edildi (<http://virtualplant.bio.nyu.edu/cgi-bin/vpweb2/>). Yine mikrodizi verileri, hangi metabolik yolda ne gibi değişikliklerin gerçekleştiğini gözlemsel olarak sunan MapMan programı kullanılarak analiz edildi (Usadel et al., 2005).

3.2.7. NAD(P)(H) ekstraksiyon ve analizi

Arabidopsis köklerinde NAD(P)(H) ekstraksiyonu Liu *et al.* (2008) a göre yapılmıştır. Belli miktarda örnek sıvı azotta homojenize edilmiş ve homojenat iki eşit parçaya bölünmüş, bunlardan birisi 15 kat hacimde 0,1 M HClO₄ (NAD ve NADP ekstraksiyonu için), diğeri ise 0,1 M KOH (NAD ve NADP ekstraksiyonu için) içerisinde 2 dk kaynar suda bekletilmiş ve buz banyosunda soğutulduktan sonra 4°C ve 10000xg’de 15 dk santrifüjlenmiştir. Elde edilen süpernatanttan 0,5mL alınıp içerisinde 0,1 mL 1 M Tris (pH 7.4) bulunan eppendorf tüplerine alınmış ve asit ekstraktı 0,5 mL bazla, baz ekstrakt ise 0,5 mL asitle nötralize edilerek elde edilen NAD(P)(H) ekstraktları -80°C derin dondurucuda analiz için saklanmıştır.

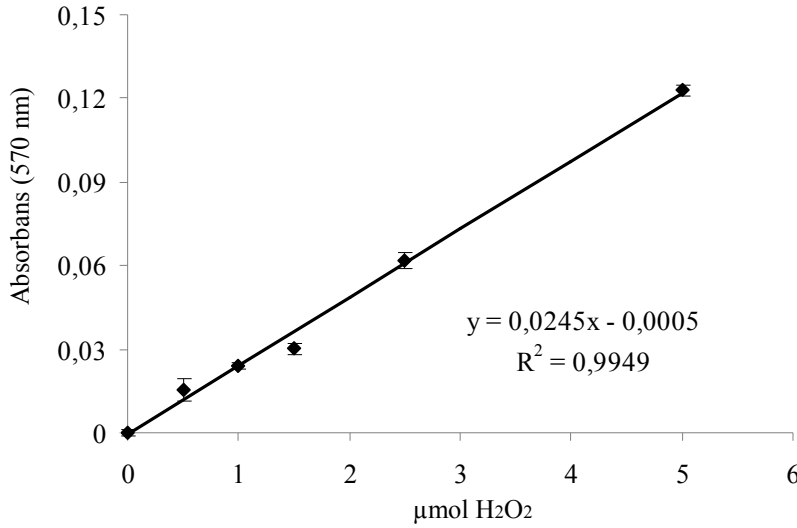
Örnek ekstraktlarından NAD(P)(H) analizi Gibon *et al.* (2004)'e göre yapılmıştır. 25 μ L NAD(H) ekstraktı 50 μ L reaksiyon karışımı (0.3 M Tricine/KOH (pH 9.0), 12 mM Na₂-EDTA, 0.3 mM PES, 1.8 mM MTT, 1.5 M EtOH, ve 18 U/ml Alcohol Dehydrogenase) ile, ve yine 25 μ L NADP(H) ekstraktı 50 μ L reaksiyon karışımı (0.3 M Tricine/KOH (pH 9.0), 12 mM Na₂-EDTA, 0.3 mM PMS, 1.8 mM MTT, 9 mM Glucose-6-P ve 9 U/ml Glucose-6-P Dehydrogenase) ile karanlıkta 30°C ortam sıcaklığında 30 dk (NAD(H) için) veya 60 dk (NADP(H) için) inkübe edildikten sonra 562 nm de meydana gelen absorbans değişimleri okunmuş ve ticari satın alınmış olan NAD, NADP, NADH, NADPH ile hazırlanan standart grafikten faydalanarak örneklerdeki NAD(P)(H) miktarları hesaplanmıştır.



Şekil 3.6. NAD, NADH, NADP ve NADPH ölçümleri için kullanılan standart grafikler.

3.2.8. Hidrojen peroksit miktarının belirlenmesi

Doku ve hücrelerdeki H_2O_2 miktarı tayini Shin *et al.* (2005)'e göre yapılmıştır. 100 mg örnek sıvı azotta ezildikten sonra üzerine 1 mL fosfat tamponu (20 mM K_2HPO_4 , pH 6.5) ilave edilmiş ve 12000g devir hızında 5 dk santrifüjlenmiştir. 50 μ L süpernatant, oda şartları ve karanlıkta 100 μ M Amplex Red bileşiği (10-acethyl-3,7-dihydrophenoxazine) ve 0,2 U/ml horseradish peroxidase ile 10 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra 570 nm de ölçülen absorbans değerleri, hazırlanmış olan standart grafikten yola çıkarak örneklerdeki H_2O_2 miktarları hesaplanmıştır.

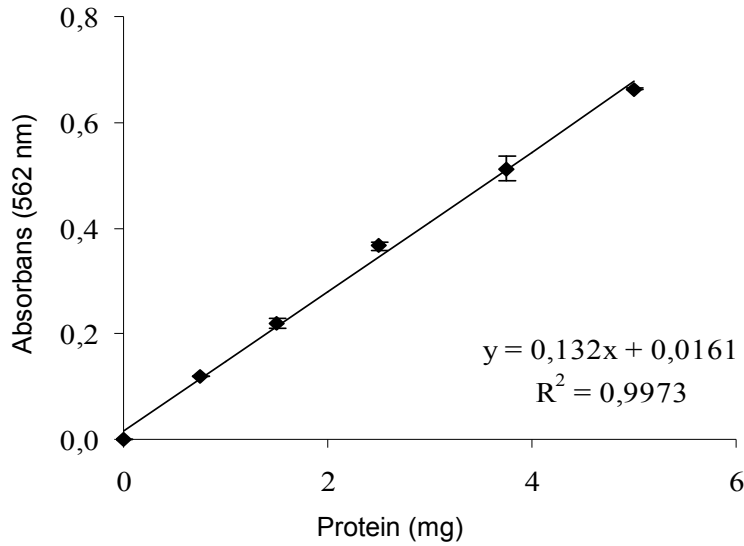


Şekil 3.7. H_2O_2 ölçümü için hazırlanmış olan standart grafik

3.2.9. Toplam protein miktarının belirlenmesi

Örneklerdeki protein miktarı Bichinconinic acid (BCA) metodu kullanılarak belirlenmiştir (Smith *et al.* 1985). Metod, proteindeki peptid bağlarının $CuSO_4$ çözeltisindeki Cu^{+2} iyonlarının Cu^{+1} iyonlarına indirgenmesi ve Cu^{+2} iyonlarının indirgenmesiyle paralel olarak meydana gelen renk değişiminin spektrometrede okunması esasına dayanır.

Bir miktar doku materyali alınarak 10 kat hacimde 10 mM KH_2PO_4 (pH=7.0) tampon çözeltisi içerisinde homojenize edilmiş ve homojenat 16000g'de 3dk santrifüjlenmiş, elde edilen süpernatanttan 2 μL alınıp; 200 μL Bicinchoninic asit çözeltisi (1 kat %4 bakır sülfat / 50 kat Bicinchoninic asit) ile 60°C'de 30 dk boyunca inkübasyona bırakılmış, ve inkübasyon sonunda örnekler 5dk oda sıcaklığında bekletilmiş ve meydana gelen renk değişimi 562 nm de okunmuştur. Elde edilen değerler, bovin serum albumin ile hazırlanmış olan standart grafikten yola çıkılarak mg protein/gr doku olacak şekilde hesaplanmıştır.



Şekil 3.8. Protein tayini için hazırlanmış olan standart grafik

3.2.10. Askorbat ve Glutatyon tayini

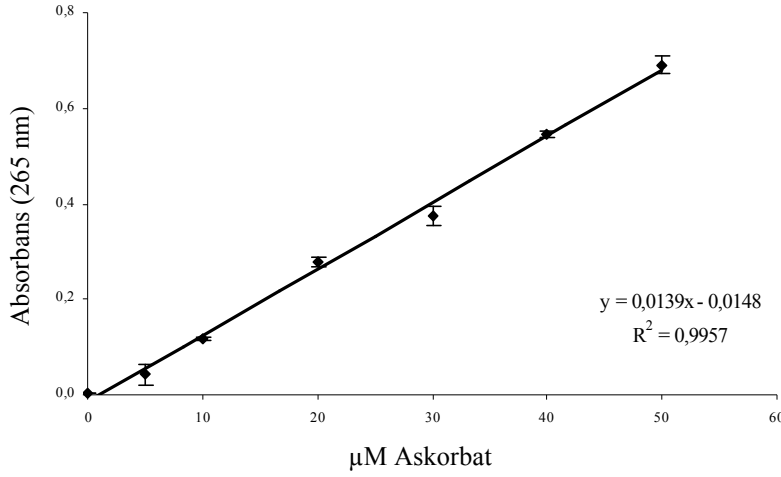
3.2.10.a. Ekstraksiyon

Tüm ekstraksiyon aşamaları +4°C'de gerçekleştirildi ve örnekler 10 misli hacimde (tercihen 100 mg/ ml) ekstraksiyon çözeltisi içerisinde homojenize edildi. 100 mg örnek sıvı azotta ezildi ve içerisinde 1 ml 0.2 N HCl bulunan eppendorf tüpleri içerisinde

alınarak vortekslendi. Homojenat +4°C’de 16000 g devirde 10 dk boyunca santrifüjlendi. 0.5 ml süpernatant 50µl 0.2M NaH₂PO₄ (pH 5.6) ve 0.46ml 0.2M NaOH ile nötralize edildi. Nötralize süpernatantın son pH sı 5-6 arasında idi.

3.2.10.b. Askorbat tayini

Dokulardaki askorbat tayini Queval and Noctor (2007)’a göre yapılmıştır. Askorbat ölçümü için her 1.5 ml ependorf tüpünün içerisine 200 µl 0.2 M NaH₂PO₄ (pH 5.6), 150 µl ddH₂O ve 40 µl nötralize süpernatant ilave edilip tüp karıştırıldı. Buradan 195 µl reaksiyon karışımı alındı ve üzerine 5 µl askorbat oksidaz (40 U/ml) ilave edildi. Solüsyon karıştırıldı ve 265 nm deki absorbans değeri 5dk boyunca ölçüldü. Aynı yolla ticari olarak sağlanmış askorbattan hazırlanmış standart grafikten yola çıkarak gr doku başına askorbat miktarı belirlendi.



Şekil 3.9. Askorbat ölçümü için hazırlanmış olan standart grafik

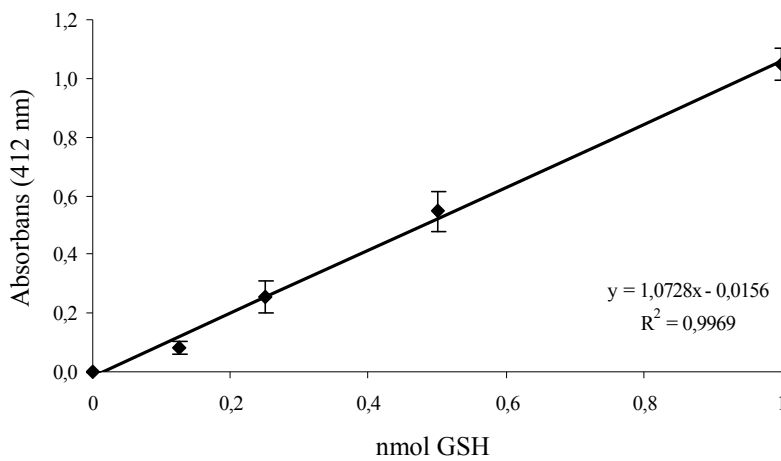
Askorbatın nisbeten oksidize olmuş formu olan dehidroaskorbat miktarı, örneğin dithiothreitol (DTT) gibi tiollerle inkübasyonu yoluyla dehidroaskorbatın askorbata indirgenmesi ile örnekteki toplam askorbat miktarının belirlenmesi ve tiollerle inkübasyon yapılmaksızın yukarıda anlatıldığı gibi deney aşamaları takip edilerek elde edilen askorbat değerlerinin toplam askorbat miktarından çıkarılması ile elde edilir.

Toplam askorbat tayini için 0.1 ml nötrale süpernatant 0.14 ml 0.12 M NaH_2PO_4 (pH 7.5) ve 10 μl DTT ile 30 dk boyunca oda şartlarında inkübe edildi ve askorbat ölçümünde izlenen yollar takip edilerek hazırlanmış olan standart grafikten yola çıkılarak “toplam askorbat miktarı” hesaplandı.

3.2.10.c. Glutasyon tayini

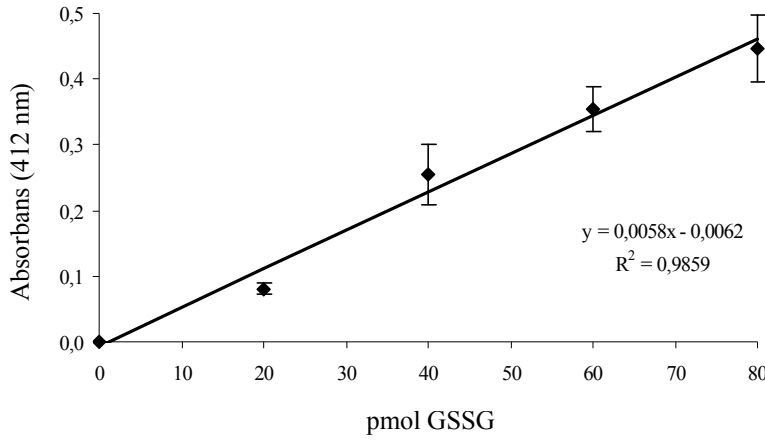
Örneklerdeki glutasyon tayini Noctor ve Foyer (1998)’e göre yapılmıştır. Metod 5-5'-dithiobis (2-nitro-benzoik asit) (DTNB) in glutasyon redüktaza bağlı indirgenmesinin 412nm de monitörize edilmesi esasına dayanır.

Toplam glutasyon miktarını belirlemek için içerisinde toplam 1 ml hacimde 120 mM NaH_2PO_4 (pH 7.8), 0.6 mM DTNB, 6 mM EDTA ve 0.1 mM NADPH bulunan spektrofotometre küvetine 20 μl nötrale süpernatant ve son olarak 5 μl (0.6 U) glutasyon redüktaz enzimi ilave edilerek başlatılan reaksiyondaki değişim 5dk boyunca takip edildi. Ticari olarak sağlanmış indirgenmiş glutasyon (GSH) ile hazırlanmış olan standart grafikten yola çıkılarak örnekteki toplam glutasyon miktarı hesaplandı.



Şekil 3.10. İndirgenmiş glutasyon (GSH) ölçümünde kullanılan standart grafik

Yükseltgenmiş glutatyon, glutatyon disülfid (GSSG), miktarını belirlemek için 0.2 ml nötralize süpernatant 1 µl 2-Vinylpyridine (VPD) ile oda şartlarında 30 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında artık VPD yi ortamdan uzaklaştırmak için örnekler iki kez santrifüjlendi ve 20 µl süpernatant alınarak yukarıda ifade edilen deneysel aşamalar tekrarlandı. Hazırlanmış olan standart GSSG grafiğinden faydalanılarak örneklerdeki yükseltgenmiş glutatyon miktarları belirlendi.



Şekil 3.11. Yükseltgenmiş glutatyon (GSSG) ölçümünde kullanılan standart grafik

3.2.11. Hücresel antioksidan enzim aktivitelerinin belirlenmesi

Hücresel antioksidan enzimlerden katalaz (KAT; EC 1.11.1.6), süperoksit dismutaz (SOD; EC 1.15.1.1), glutatyon redüktaz (GR; EC 1.6.4.2) ve fenolik peroksidazlardan guaiakol peroksidaz (POD; EC 1.11.1.7), aktivite ölçümleri için 500 mg doku örneği %2 (w/v) polyvinylpyrrolidon ve 1 mM EDTA içeren 5 mL 10 mM KH₂PO₄ tamponu (pH 7.0) içerisinde homojenize edilmiş ve homojenat 12000g devir hızında 30 dk santrifüjlendikten sonra elde edilen süpernatant enzim ekstraktı olarak kullanılmıştır.

Askorbat peroksidaz (AP; EC 1.11.1.11) aktivite ölçümü için 500 mg doku örneği %2 (w/v) polyvinylpyrrolidon, 1 mM askorbik asit ve 1 mM EDTA içeren 5 mL 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7.8) içerisinde homojenize edilmiş ve homojenat 22000 g

de 15 dk santrifüjlendikten sonra elde edilen süpernatant enzim ekstraktı olarak kullanılmıştır. Enzim ekstraktlarının hazırlanması sırasında bütün işlemler 0-4°C’de gerçekleştirilmiştir.

3.2.11.a. Katalaz aktivitesinin belirlenmesi

Katalaz aktivitesi tayini için kullanılan yöntem Beers and Sizer (1952) tarafından önerilen yöntemdir. Bu metotla aktivite ölçümü, KAT aktivite ölçüm ortamındaki KAT aktivitesine bağlı olarak H₂O₂ miktarında meydana gelen azalmanın 240 nm dalga boyunda izlenmesi esasına dayanır.

KAT aktivite ölçümü için içerisinde 2.75 ml hacimde 19 mM H₂O₂ içeren 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7.0) bulunan 4 ml lik spektrofotometre küvetine 25 µl enzim ekstraktından ilave edildikten sonra 240 nm dalga boyunda reaksiyon çözeltisindeki KAT enzim aktivitesine bağlı olarak reaksiyon karışımında meydana gelen–H₂O₂ miktarındaki azalma 3 dk boyunca takip edilerek kaydedildi. Enzim ekstraktındaki protein miktarı belirlendikten sonra KAT spesifik aktivitesi;

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

şeklinde bir formülasyon ile hesaplandı. Formüldeki “43.6” H₂O₂ için ekstinksiyon katsayısıdır.

3.2.11.b. Guaiakol peroksidaz aktivitesinin belirlenmesi

Guaiakol peroksidaz (POD) aktivite tayini, guaiakolün ortamda H₂O₂ bulunduğu şartlarda POD aktivitesi ile oksidasyonu ve oksidasyon ürünü olan tetraguaiakol miktarındaki artıştan kaynaklanan absorbands artışının 470 nm’de izlenmesi esasına dayanmaktadır (Upadhyaya *et al.* 1985).



Aktivite ölçümü için içerisinde 3 ml hacimde, 1 mM guaiakol ve 0.5 mM H₂O₂ içeren 50 mM NaH₂PO₄ (pH 5.5) bulunan reaksiyon karışımına 10 µl enzim ekstraktından ilave edilmiş ve 470 nm dalga boyunda 5 dk boyunca meydana gelen absorbans artışı 1 dk aralıklarla kaydedilmiş ve absorbansın doğrusal olarak arttığı kısımdaki absorbans artışı 1 dk ya oranlanmıştır. 25 °C de POD enzim aktivitesine bağlı olarak 1 µmol H₂O₂ nin dönüşümü ile 1 dakikada absorbansta görülen 0.01 birimlik artış 1 enzim ünitesi olarak kabul edilmiş ve böylece enzim ünitesi “µmol H₂O₂/mg protein/dk” şeklinde ifade edilmiştir.

3.2.11.c. Süperoksit dismutaz aktivitesinin belirlenmesi

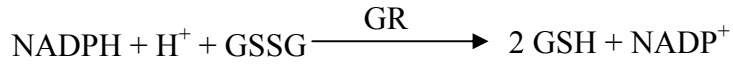
Süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesi, nitro blue tetrazolium (NBT) bileşiğinin ortamda riboflavin varlığında süperoksit radikalleri ile mavi renkli formazana fotokimyasal indirgenmesi reaksiyonunun SOD enzimi tarafından engellenmesinin spektrometrik olarak belirlenmesi esasına dayanır (Plumb-Dhindsa and Thorpe 1981).

Reaksiyon karışımı (3 ml); 50 mM KH₂PO₄ (pH 7.8), 13 mM methionin, 75 µM NBT, 2 µM riboflavin ve 0.1 mM EDTA içermektedir. Aktivite ölçümü için 4 ml spektrofotometre küvetine yukarıdaki riboflavin içermeyen reaksiyon karışımından 2.84 ml alınmış ve üzerine 100 µl enzim ekstraktı ilave edilmiştir. Reaksiyon, tüp üzerine 100 µM'lık riboflavin çözeltisinden 60 µl pipetlenip karıştırıldıktan hemen sonra beyaz bir ışık kaynağı önüne yerleştirilmek suretiyle başlatılmıştır. Tüp, ışık kaynağının karşısında 15 dk tutulmuş ve reaksiyon ışık kaynağının kapatılmasıyla durdurulmuştur. 15 dk içerisinde NBT'nin renk açılma yoğunluğu 560 nm'de kör numuneye karşı okunmuştur. Kör numune, aynı işlemin enzimsiz örneğinden oluşmaktadır. SOD

aktivitesinin 1 ünitesi, 560 nm de gözlenen NBT indirgenmesinin %50 inhibisyonuna neden olan enzim miktarı, 1 enzim ünitesi olarak kabul edilmiş ve değerler EÜ/mg protein şeklinde sunulmuştur.

3.2.11.d. Glutasyon redüktaz aktivitesinin belirlenmesi

Glutasyon redüktaz (GR) glutasyon disülfidin (GSSG) glutatyona (GSH) indirgenmesi için gerekli olan bir flavoproteindir. Bu enzim aynı zamanda nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) ı da yükseltir. Yani glutasyon redüktaz enzimi GSSG in GSH a indirgenmesinde NADPH-bağımlı bir reaksiyonu katalizler. Reaksiyon;



şeklinde gösterilebilir. Glutasyon redüktaz enzim aktivitesinin belirlenmesi NADPH ın NADP^+ a oksidasyonu ile meydana gelen absorbans azalmasının 340 nm de ölçülmesi esasına dayanır (Foyer and Halliwell 1976).

Reaksiyon karışımı (0.9 ml); 0.025 M NaH_2PO_4 (pH 7.8), 0.5 mM GSSG, 0.12 mM NADPH- Na_4 içermektedir. Aktivite ölçümü için 2 ml spektrofotometre küvetine yukarıdaki reaksiyon karışımından 0.9 ml ilave edilmiş ve bunun üzerine 0.1 ml enzim ekstraktından ilave edilmiştir. NADPH'ın oksidasyonundan kaynaklanan absorbanstaki düşüş 340 nm dalga boyunda 3 dk boyunca takip edilmiştir. 1 dakikada mg protein başına 1 μM NADPH'ın oksidasyonu 1 enzim ünitesi olarak kabul edilmiştir. Örneklerdeki GR aktivitesi;

Spesifik aktivite (μmol yükseltgenmiş NADPH/mg protein/dk) = $([\Delta A_{340 \text{ nm}}/6.22]/\text{mg protein})$

şeklinde bir formülasyonla hesaplanmıştır. Formülde kullanılan “6.22” değeri NADPH in ekstinksiyon katsayısı, ve mg protein ise 0.1 ml enzim ekstraktında bulunan protein miktarını göstermektedir.

3.2.11.e. Askorbat peroksidaz aktivitesinin belirlenmesi

Askorbat peroksidaz (AP) enzim aktivitesi Nakano and Asada (1981) tarafından önerilen protokole göre yapılmıştır. Metod AP aktivitesi ile H₂O₂ bağımlı askorbik asit oksidasyonundan kaynaklanan absorban düşüşünün 290 nm dalga boyunda okunması esasına dayanır. Enzimin katalizlediği reaksiyon;



şeklinde gösterilebilir. Bir ünite AP aktivitesi dakikada 1 µmol askorbik asiti oksidize edebilen enzim miktarı olarak gösterildi.

Reaksiyon karışımı (1 ml); 50mM KH₂PO₄ tamponu (pH 7.0), 0.5mM askorbik asit, 0.3 mM H₂O₂, 0.1 mM EDTA-Na₂ ve enzim ekstraktı (tercihen 50 µl) içeriyordu. Reaksiyon ortama H₂O₂ ilave edilmesi ile başlatılmıştır. 290 nm dalga boyunda 3 dk boyunca absorbansta meydana gelen değişim kaydedilmiş ve enzim aktivitesi;

$$\text{Spesifik aktivite } (\mu\text{mol yükseltgenen askorbat/mg protein/dk}) = ([\Delta A_{290 \text{ nm}} / 2.8] / \text{mg protein})$$

şeklinde bir formülasyonla hesaplandı. Formülde kullanılan “2.8” değeri askorbik asitin ekstinksiyon katsayısını, “mg protein” ise reaksiyon karışımına ilave edilen enzim ekstraktı içerisinde bulunan protein miktarını göstermektedir.

3.2.12. Protein karbonilasyonu tayini

Oksidatif olarak modifiye edilmiş proteinlerde karbonil içeriğinin belirlenmesi Levine *et al.* (1990) tarafından önerilen metoda göre yapılmıştır. 500 mg doku örneği %2 (w/v) polyvinylpyrrolidon ve 1 mM EDTA içeren 2,5 mL 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7.0) içerisinde homojenize edilmiş ve homojenat 12000 g devir hızında 30 dk santrifüjlendikten sonra elde edilen süpernatant kaynak olarak kullanılmıştır.

Ekstraksiyon sıvısındaki protein miktarı daha önce belirtildiği şekilde tayin edilmiş ve 500 µg protein içeren ekstraksiyon sıvısı, 1.5 mL eppendorf tüpleri içerisinde, eşit hacimde, 2 M HCl içerisinde hazırlanmış 10 mM 2,4-dinitrophenylhydrazine ile oda şartlarında 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonrasında tüplere son konsantrasyonu %20 olacak şekilde trikloroasetikasit (TCA) ilave edilip 11000 g devir hızında 3 dk santrifüjlenmiş ve elde edilen pellet 3 kez 1:1 etanol-etilasetat ile yıkanıp santrifüjlenmek suretiyle safsızlıklar bertaraf edilmiştir. Tüplerin diplerinde kalan protein pelletine 0,6 mL guanidin solüsyonundan ilave edilip 37 °C de 15 dk inkübasyondan sonra örneklerin absorpsiyonları 374 nm de okunmuştur. Proteinlerdeki karbonil içerikleri;

$$\text{Protein karbonilasyonu (nmol karbonil /mg protein)} = (A_{374 \text{ nm}} / 0.022) / \text{mg protein}$$

şeklinde bir formülasyon ile hesaplanmıştır. Formüldeki “0.022” değeri okside olmuş proteinlerdeki karbonil grubunun absorpsiyon katsayısı, ve “mg protein” ise kullanılan protein miktarını göstermektedir.

3.2.13. Lipid peroksidasyonu tayini

Arabidopsis köklerinde lipid peroksidasyonu Hodges *et al.* (1999)’a göre yapılmıştır. 100 mg doku örneği 2.5 mL %80 etanol içerisinde homojenize edilmiş, homojenat 3000 g de 10 dk santrifüjlenmiş ve süpernatant eşit iki hacime bölünmüştür.

Süpernatantlardan birisine eşit hacimde % 0.65 thiobarbituric acid (TBA), % 0,01 butylated hydroxitoluene içeren %20 trichloroacetic acid (TCA) çözeltisi, ve diğerine de yine eşit hacimde %0.01 butylated hydroxitoluene içeren %20 TCA çözeltisi ilave edilip tüpler 95 °C de 20 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında örnekler buz banyosunda 5 dk tutulmak suretiyle soğutulmuş, böylece reaksiyon durdurulmuş ve tekrar 3000 g de 10 dk santrifüjlenmiş ve süpernatant kısmı alınarak absorbansı 532 nm de okunmuş ve daha sonra 440 nm (antosiyenin için) ve 600 nm (şekerler için) dalga boyundaki non-spesifik absorbsiyon için absorbans değerleri belirlenmiştir.

Örneklerde lipid peroksidasyonu ile oluşan malondialdehit (MDA) bileşiklerinin miktarları aşağıdaki formüle göre hesaplanmış, sonuçlar 1 gr dokuda bulunan MDA bileşikleri (nmol MDA / gr doku) şeklinde gösterilmiştir.

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

$$[(A^{440}_{+TBA} - A^{600}_{+TBA}) 0.0571] \rightarrow B$$

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

3.2.14. *Nicotiana tabacum* cv. BY-2 hücre kültürü şartları

Nicotiana tabacum cv. BY-2 hücre kültür ortamı için kullanılan besiyeri çözeltisi 2,5 mM KH₂PO₄ (pH5.6), 2 mM MgSO₄, 2 mM Ca(NO₃)₂, 50 µM Fe-EDTA ve azot kaynağı olarak 2,5 mM KNO₃ veya 2,5 mM (NH₄)₂SO₄ makro besin elementleri ile 70.0 mM H₃BO₃, 14 mM MnCl₂, 0.5 mM CuSO₄, 1 mM ZnSO₄, 0.2 mM NaMoO₄, 10 mM NaCl ve 0.01 mM CoCl₂ mikrobesein elementlerini içeren, Somerville ve Ogren (1982) tarafından tanımlanan besi yeri çözeltisi kullanılmıştır. Tobacco BY-2 hücrelerinin yetişmesi için uygun bir hale getirilmek amacı ile 1 litre kültür ortamı için bu besi yeri çözeltilerine %2 sakkaroz, 1 mg Thiamine HCl, 100mg myo-inositol ve 0,2 mg 2,4-D ilave edilmiş, ortamın pH sı 5.0 a ayarlanmış ve ortamın pH sı 5 mM MES tamponu ile sabitlenmiştir.

Hazırlanan kültür ortamı çözeltisi azot kaynağı olarak 2,5 mM KNO_3 veya 2,5 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ içeren (azot kaynağı olarak $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ içeren kültür ortamında 2 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ yerine 2 mM CaCl_2 kullanılmıştır), iki gruba ayrılmış, ve bu besin çözeltileri geniş boyunlu 250 ml lik erlen mayerler içerisinde 50 şer ml lik hacimlere bölünmüştür. Stok hücre kültürlerinden belli miktarlarda (tercihen 400 μg) Tobacco BY-2 hücreleri, erlen mayerler içerisinde bulunan hücre kültürlerine inoküle edilmiş ve karanlık ortamda, 125 rpm devirle çalışan çalkalayıcı üzerinde oda şartlarında 4 gün inkübasyona bırakılmıştır. Bu inkübasyon periyodunun sonunda hücreler, gerekli testlere tabi tutulmuştur.

3.2.15. Hücrelerin oksijen tüketimi hızlarının ölçümü

Dört günlük inkübasyon periyodundan sonra Tobacco BY 2 hücrelerinin taze ağırlıkları belirlenmiş, 100 mg hücre içeren kültür sıvısı alınmış ve içerisinde 100 mM HEPES, 100 mM mannitol, 50 mM KCl içeren 1 ml reaksiyon çözeltisi bulunan, 3 ml'lik O_2 elektrotlarının (Rank Brothers, Cambridge, UK) içerisine aktarılmış ve hücrelerin oksijen tüketim hızları milimetrik kâğıtta 1 dk boyunca gözlemlenmiştir. Daha sonra ortama sitokrom oksidazın inhibitörü olan potasyum siyanür (KCN) 1 mM konsantrasyonda ilave edilip 4 dk boyunca hücrelerin oksijen tüketim hızları kaydedilmiş ve sonrasında alternatif oksidazın inhibitörü olan n-propyl gallate (0,1 mM) ilavesiyle hücre solunum mekanizması tam olarak durdurulmuştur. Alternatif oksidaz kapasitesi KCN ilave edildikten sonra gözlenen oksijen tüketim oranının n-propyl gallate ilavesinden sonra gözlenen oksijen tüketim oranına farkı ile elde edildi. Toplam solunum oranı her iki solunum inhibitörü ilave edilmeden önceki oksijen tüketim oranının, bu iki solunum inhibitörü ilave edildikten sonraki oksijen tüketim oranından çıkarılması ile elde edildi.

3.2.16. Örneklerin SDS-PAGE jelde yürütülmesi ve western blotlama

Western Blotlama ile, Tobacco BY-2 hücrelerinde farklı azot kaynaklarına cevapta hücrelerdeki AOX proteinleri görüntülenerek, miktarsal karşılaştırmaları yapılmıştır. Toplam protein miktarları ölçülmüş olan örneklerden eşit miktarlarda ve hacimlerde protein (yaklaşık 30 µg) alınarak SDS-PAGE mini jel sisteminde yürütülmüş, ve sonra jeldeki proteinler nitrosellüloz membrana aktarılmış, membrandaki proteinler AOX için spesifik primer ve sekonder antibadileri ile bağlanması işlemleri gerçekleştirilmiş ve son olarak membrandaki antibadi-bağlanmış AOX proteinleri röntgen filmi üzerine aktarılarak farklı örneklere ait AOX proteinlerinin monomer ve/veya dimer formları kontrol stribi üzerinden karşılaştırılarak elde edilen sonuçlar yorumlanmıştır.

3.2.16. a. Sodyum dodesil sülfat-Poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)

Elektroforez için %10 akrilamid içeren ayırma ve yığma jel kombinasyonu kullanılmıştır.

1. Gerekli ön hazırlıklar yapıldıktan sonra ilk olarak ayırma jeli [14.7 ml ddH₂O, 7.5 ml – 1.5 M Tris/Cl (pH 8.8), 300 µl SDS (%10), 7.5 ml akrilamid (%40), 150 µl amonyum persulfat (%10), ve 10 µl TEMED den elde edilen karışım] pastör pipetleri yardımıyla kasetler arasına aktarılmış, ve üzerine yaklaşık 500 µl %20 EtOH ilave edilerek oda şartlarında yaklaşık 1 saat bekletilerek jelin polimerize olması sağlanmıştır.
2. Ayırma jelinin üzerindeki EtOH bir şırınga yardımıyla uzaklaştırılmış ve hazırlanmış olan yığma jeli [12.8 ml ddH₂O, 5 ml – 0.5 M Tris/Cl (pH 6.8), 200 µl SDS (%10), 2 mL akrilamid (%40), 100 µl amonyum persulfat (%10) ve 20 µl TEMED den elde edilen karışım] pastör pipetleri yardımıyla kasetler arasında polimerize olmuş ayırma jelinin üzerine aktarılmış, protein örneklerinin içerisine aktarılacağı kuyucukları oluşturmak amacıyla elektroforez targağı yerleştirilmiş ve oda şartlarında yaklaşık 1 saat bekletilerek jelin polimerize olması sağlanmıştır.
3. Jel hazırlandıktan sonra, tarak jelden çıkarılmış ve jeldeki kuyucuklar ddH₂O ile 2 kez yıkanarak elektroforeze hazır hale getirilmiştir. Elektroforez ortamına yeterli

miktarda yürütme tamponu (pH 8.3) (1 litre suda 3g Tris, 14.5g glisin, ve 1g SDS ile hazırlanmış) ilave edilmiştir.

4. Protein örneklerinin denatüre olması amacıyla 80°C’de 10 dk inkübe edilmiş ve oda sıcaklığına kadar soğutulmuştur. Protein örnekleri kendi içlerinde iki gruba ayrılmış, bir gruba β -merkaptoetanol ilave edilmiş (AOX ın dimer formunu görüntülemek için) ve diğerine bir ekleme yapılmamıştır (AOX ın monomer formunu görüntülemek için). Eşit hacimlerde 30 μ g protein örnekleri Hamilton şırıngası yardımıyla jeldeki kuyucuklara yüklenmiştir.

5. Protein yükleme işlemi tamamlandıktan sonra elektroforez tankı 20°C su tankına bağlanmış ve +/- uçları güç kaynağına takıldıktan sonra 50 V ile 45 dk, ve 160 V ile proteinler jelin dibine kadar ininceye kadar beklenmek suretiyle (yaklaşık 1 saat) proteinlerin ayırma işlemi tamamlanmıştır.

SDS-PAGE elektroforez ile proteinler ayrıldıktan sonra nitrosellüloz membrana aktarma işlemleri gerçekleştirilmiştir.

3.2.16.b. Western blotlama

Jelde ayrılmış proteinlerin nitrosellüloz membrana aktarılması ve daha sonra membrana aktarılmış proteinlerin AOX için spesifik primer ve sekonder antibadileri ile bağlanması işlemleri gerçekleştirilmiş ve son olarak membrandaki antibadi-bağlanmış AOX proteinleri röntgen filmi üzerine aktararak görüntülenmesi sağlanmıştır. Blotlama işlemi şu yolla gerçekleştirilmiştir;

1. Elektroforez işleminden sonra jel, transfer tamponu (10 mM CAPS, %20 methanol, pH 11) içerisinde 30dk bekletilmiş ve nitrosellüloz membrana aktarım için aktarım yığını (sırasıyla kaset içerisine, blotlama süngeri, 2 adet 3 mM filtre kâğıdı, jel, nitrosellüloz membran, 2 adet 3 mM kâğıdı, blotlama süngeri) hazırlanmış ve blotlama kaseti, içerisi transfer tamponu ile doldurulmuş Western tankına yerleştirilmiş ve tankın +/- uçları güç kaynağına takıldıktan sonra 20 dk boyunca 100V'a ayarlanmış güç kaynağına bağlanarak jelden membrana proteinlerin transferi sağlanmıştır.

2. Transferden sonra kaset açılmış, membran üzerindeki kontrol proteinlerin bantları

bellograf kalem yardımıyla işaretlenmiştir.

3. Kontrol protein bantları işaretlenmiş nitrosellüloz membran, TBST tamponu (1 litresinde 2.42 gr Tris, 8 gr NaCl, 1.2 ml konsantre HCl, 1 ml Tween-20 içeren) ile hazırlanmış %5 fat-free milk çözeltisi içerisinde oda şartlarında en az 1 saat inkübe edilmiştir.
4. Daha sonra membran, TBST tamponu ile bir-iki kez yıkanmış ve TBST içerisinde hazırlanmış olan 1:10000 oranındaki primer antibadi solüsyonu (AOX spesifik antibadi) ile 22°C'de 1 saat inkübe edilmiştir.
5. Primer antibadi ile inkübasyondan sonra membranlar 6-7 kez TBST tamponu ile yıkanmıştır.
6. Membran, TBST içerisinde 1:10000 oranında hazırlanmış olan sekonder antibadi (Anti-mouse IgG, Horse Radish Peroxidase – Koyun kanından elde edilmiş) solüsyonu ile 22°C'de 1 saat inkübe edilmiştir.
7. Sekonder antibadi inkübasyonundan sonra membranlar 6-7 kez TBST tamponu ile yıkanmış ve membrandaki proteinlerin röntgen filminde görüntülenmesi işlemine geçilmiştir.
8. Membran, karanlık odada ECL karışımı (solüsyon 1: 0.13 mM Luminol, 0.017 mM p-Coumaric acid, 0.01 M Tris pH 8.5 + solüsyon 2: 0.033 mM H₂O₂ , 0.01M Tris pH 8.5) ile 5dk inkübe edilmiş ve yine karanlık odada membran ve röntgen filmi, röntgen kaseti içerisinde üst üste tutularak farklı sürelerde bekletilmek suretiyle en iyi görüntü elde edilmeye çalışılmıştır.
9. Röntgen filmleri önce developer solüsyonunda, sonra fixing solüsyonundan ve son olarak sudan geçirilecek kurumaya bırakılmıştır.
10. Röntgen filmleri üzerinde görüntülenen alternatif oksidazın monomer ve dimer formlarının verdikleri bantların kalınlıklarına bakılarak alternatif oksidazın aktivasyon durumu ile ilgili olarak önemli somut deliller sunulmuştur.

3.3. İstatistik Analiz

Tez içerisinde sunulan sonuçlar, her bir uygulamadan en az iki biyolojik tekrar ve her bir biyolojik tekrar için en az üç tekerrür yapıldıktan sonra elde edilen en az altı değerin ortalamasıdır. Mikrodizi analizleri için nihai sonuçlar “Pearson’s Chi-square test” programı kullanılarak, diğer analizler için ise “(iki kuyruklu) Student t test” programı kullanılarak yapılmış ve 0.05 hata seviyesinde önemli bulunan değerler istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edilmiştir.

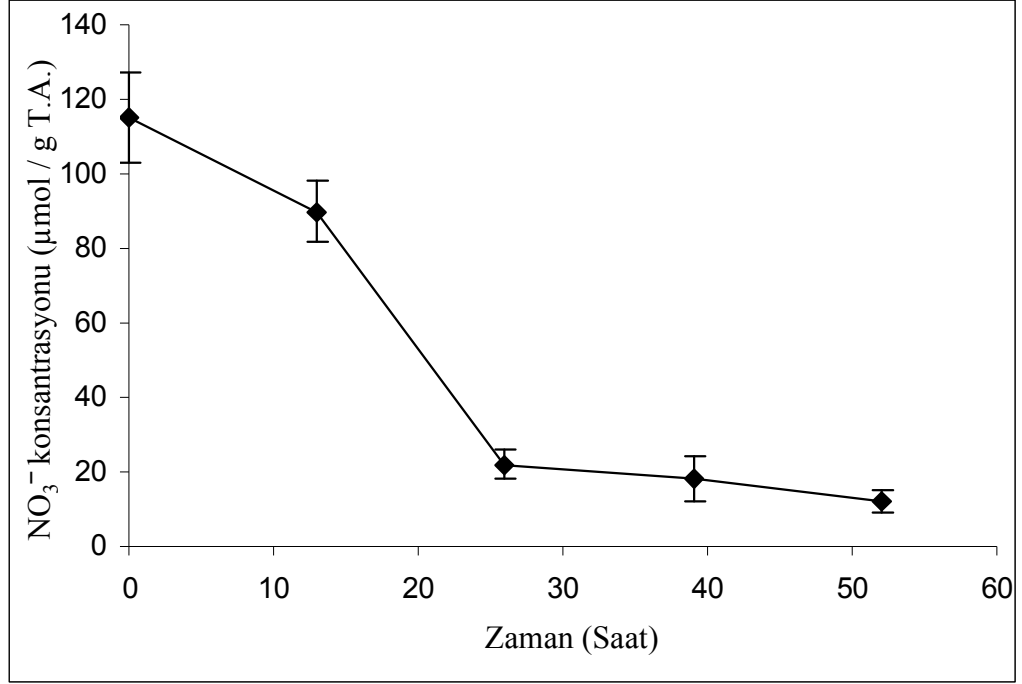
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu çalışmada, azot kaynağı olarak sadece amonyum veya sadece nitrat içeren besin çözeltisinde kültüre alınmış Tobacco BY-2 hücrelerinden elde edilen hücresel ve alternatif solunuma ait bulgular ile belli bir aşamaya kadar azot kaynağı olarak nitrat içeren hidroponik ortamda yetiştirilmiş ve daha sonra azot açlığına bırakılarak yeni azot kaynağı (amonyum veya nitrat) içeren ortama aktarılmış *Arabidopsis thaliana* köklerinde yeni azot kaynağına cevapta farklı sürelerde meydana gelen gen ifade düzeylerinde ve hücresel redoks durumunda meydana gelen değişimler ile biyokimyasal sonuçlarını gösteren bulgular, şekiller ve çizelgelerle ayrıntılı olarak sunulmuştur.

4.1. Gen Ekspresyon Analizleri İle Elde Edilen Veriler

4.1.1. Büyüme ortamı ve bitki köklerinde azot kaynağında meydana gelen değişimler

Arabidopsis thaliana bitkileri 5.10 büyüme etabına (rozetlerin %50 si olgun-normal büyüklükte) ulaşmaya kadar azot kaynağı olarak yalnızca nitrat içeren hidroponik kültürde yetiştirilmişlerdir (Şekil 3.2) . Bu aşamada bitkiler azot kaynağı bulunmayan hidroponik kültürlere aktarılmış ve 26 saat süresince azot açlığına maruz bırakılmışlardır. Bu zaman dilimi azot açlığına bırakılmayan bitkilere kıyasla köklerdeki nitratın yaklaşık olarak %80'inin indirgenmesi için yeterli idi (Şekil 4.1). Azot açlığı sonrasında köklerdeki nitrat konsantrasyonu %20'nin altına düştüğü zaman (26 saat sonra) bitkiler yeni azot kaynağına cevap vermeye hazır olarak kabul edildi.

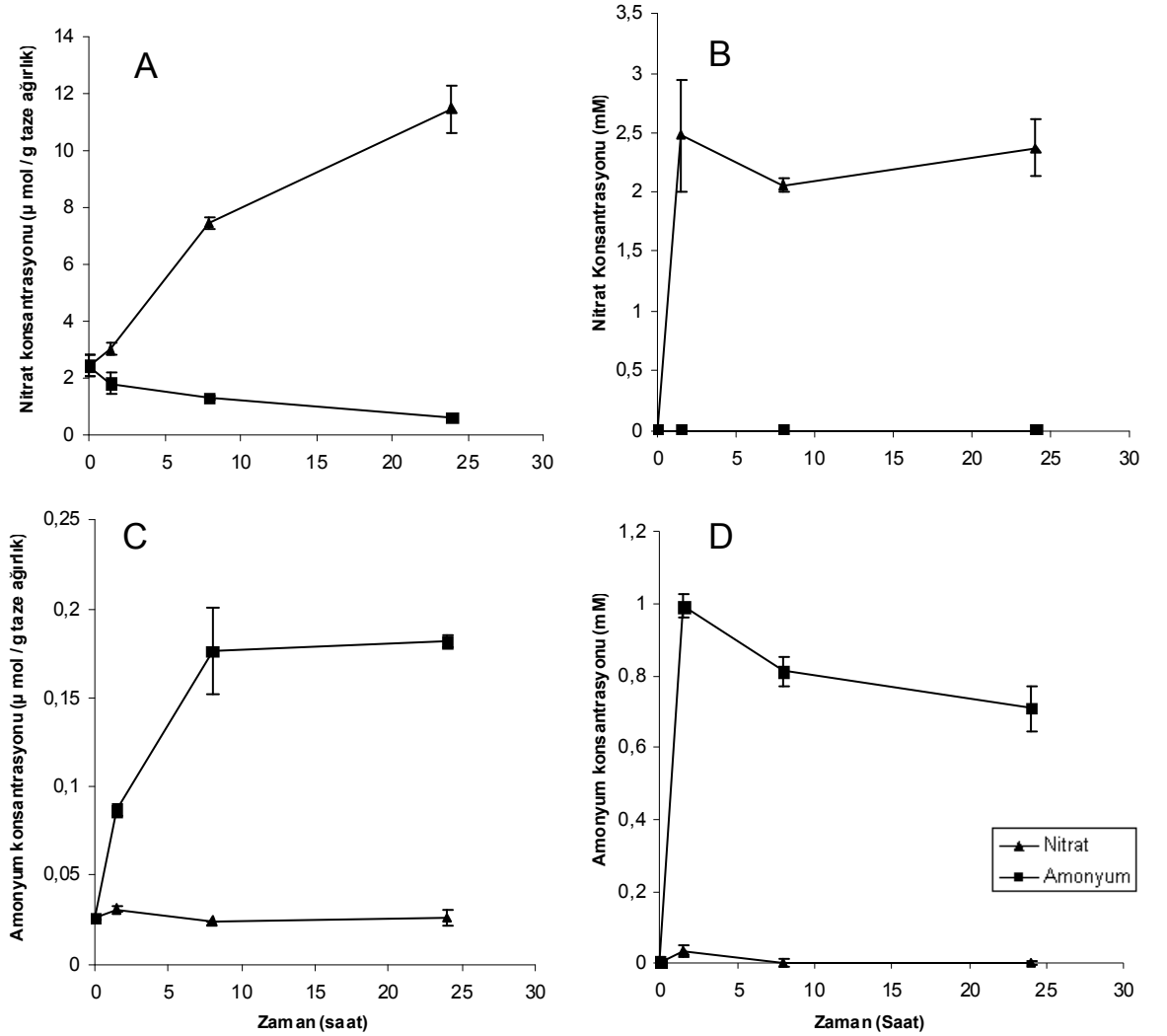


Şekil 4.1. Azot kaynağı olarak nitrat içeren büyüme ortamında yetiştirilmiş *A. thaliana* köklerinde azot açlığını takiben nitrat konsantrasyonunun zamana bağlı olarak değişimi.

*Azot açlığını takiben 26 saat sonra köklerdeki nitrat konsantrasyonu yaklaşık olarak %80 oranında azalmış ve böylece yeni azot kaynağına bağımlı oldukları kabul edilmiştir.

Azot açlığını takiben bitkilerin bir kısmı yeni hazırlanmış olan, 1 mM nitrat veya 1 mM amonyum içeren büyüme ortamına transfer edilmişlerdir. Ortam asidifikasyonu amonyum alımının normal sonucudur. Ancak köklerde asit-kaynaklı stresi minimize etmek için deney boyunca ortam pH'sını 5.0 üzerinde tutmak amacıyla besin çözeltisinde kullanılan KH₂PO₄ tamponunun pH'sı 5.6 olarak ayarlanmıştır. Amonyum uygulanmış bitki köklerinde nitrat miktarı nitrat kontrollerine göre %20'nin altına düştüğü zaman bu bitkiler tamamen amonyum bağımlı grup olarak kabul edilmiştir. Ortam ve bitki köklerinde zamana bağlı olarak (0; 1,5; 8 ve 24. saatlerde) nitrat ve amonyum konsantrasyonlarında meydana gelen değişim Şekil 4.2 de gösterilmiştir. Azot açlığını takiben farklı azot kaynakları verilen bitkilerde amonyum veya nitrat kökler tarafından hızla alınmıştır (Şekil 4.2. A, C). Büyüme ortamlarına azot kaynağı ilavesini takiben 24 saat içerisinde büyüme ortamlarında nitrat veya amonyum düzeylerinde (Şekil 4.2. B, D) düşüşler gözlenmiş, ancak büyüme ortamlarındaki azot kaynağı (nitrat veya amonyum) konsantrasyonu hiçbir zaman 0,7 mM' ın altına düşmemiştir. Bu durum

azot kaynağı ilavesinden sonra deney süresince bitkilerin azot kaynaklarının tükenmediğini göstermektedir. Bununla birlikte büyüme ortamlarındaki pH değerleri azot kaynağı ilavesini takiben 24 saat süresince çok küçük değişimler göstermiş, amonyum sağlanmış büyüme ortamında maksimum 0.13 birimlik bir azalma ve nitrat sağlanmış büyüme ortamında maksimum 0.14 birimlik bir artış gözlenmiştir ki pH daki bu küçük değişimler önemsiz olarak kabul edilmiştir.

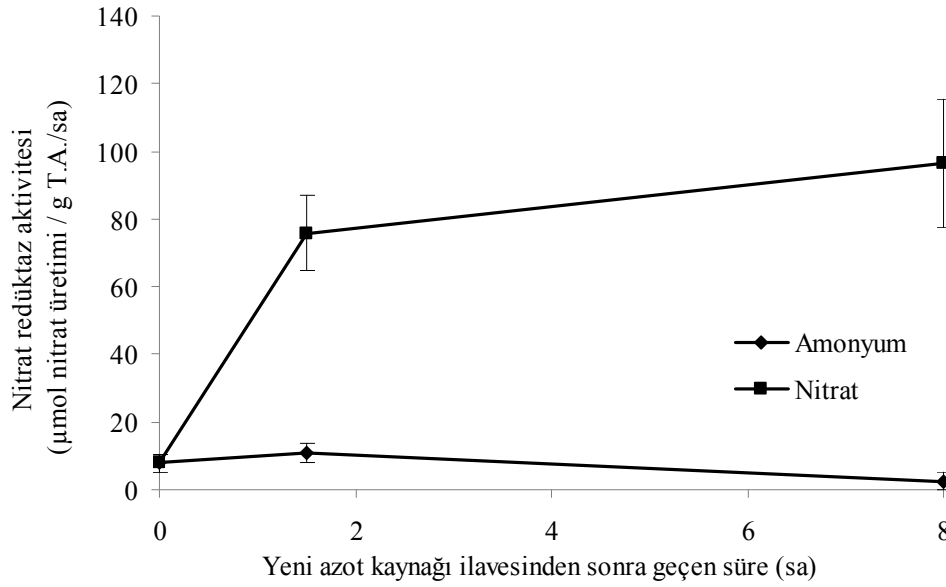


Şekil 4.2. Hidroponik ortamda yetiştirilmiş *Arabidopsis thaliana* bitkilerinin köklerinde (A,C) ve büyüme ortamındaki (B,D) nitrat ve amonyum konsantrasyonlarının zamana göre değişimi.

*Kendi içinde değerler arasındaki farklılıklar Standard Hata çubukları ($\pm SH$) şeklinde gösterilmiştir.

Her ne kadar azot kaynağı olarak amonyum ve nitrat sağlanmış köklerdeki amonyum ve nitrat konsantrasyonlarının zamana bağlı değişimine bakıldığında azot açlığı sonrasında

verilen yeni azot kaynağının kökler tarafından hızla kullanıldığı anlaşılsa da durumu biyokimyasal düzeyde de kontrol etmek için amonyum ve nitrat sağlanmış köklerdeki nitrat redüktaz (NR) enzim aktivitesinde meydana gelen değişimler belirlendi. Şekil 4.3'e bakıldığında NR enzimi amonyum sağlanmış bitkilerde aktivasyon göstermemekte, bu da 26 saatlik süre içerisinde kök hücrelerinin kofullarında depoladıkları nitratın çok büyük bir kısmını kullandıklarını, böylece azot açlığı sonrasında verilen yeni azot kaynağını hızla kullandığını göstermektedir.



Şekil 4.3. Azot kaynaklarına cevapta NR aktivitesinin zamana bağlı değişimi.

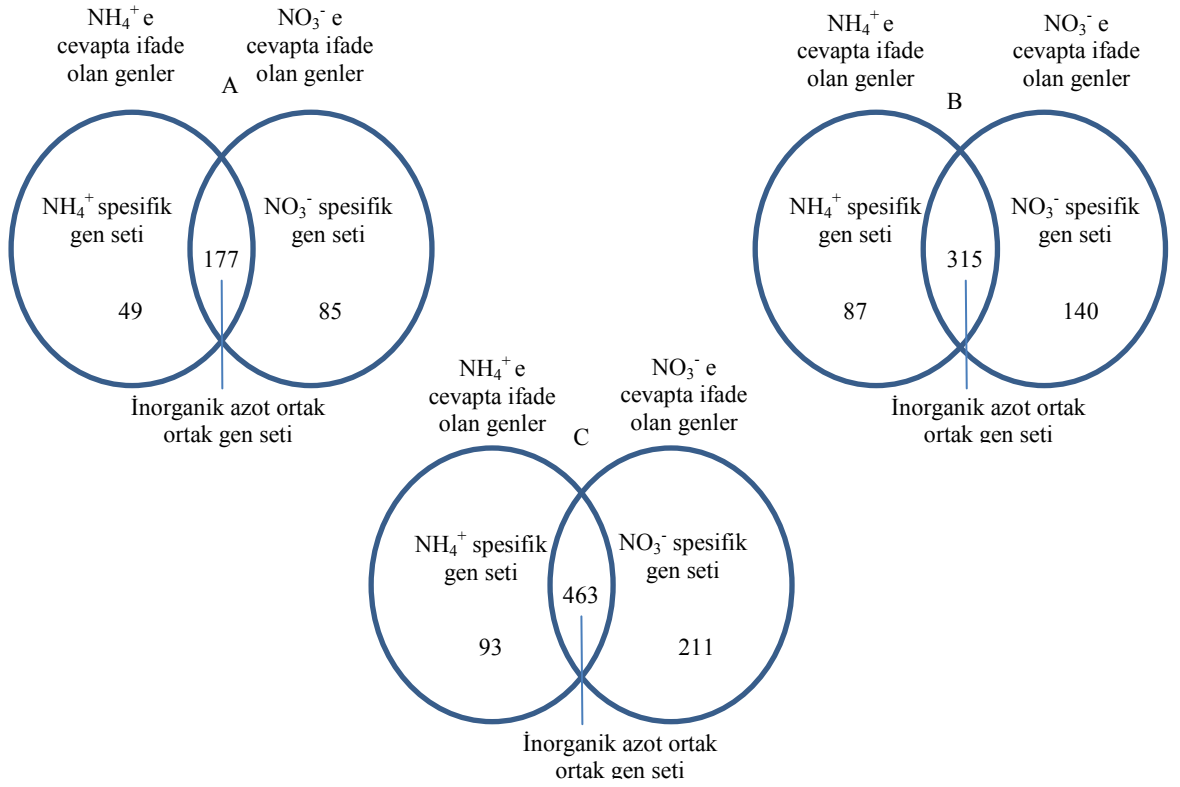
4.1.2. Mikrodizi analizlerinden elde edilen sonuçlar

Yeni bir azot kaynağına karşı verilen gen ekspresyonundaki ani global değişimleri analiz etmek için nitrat veya amonyum ilavesinden 0.5, 1.5 ve 8 saat sonra köklerde transkriptom düzeyinde meydana gelen değişiklikleri karakterize etmek amacıyla Affimetrix ATH1 mikrodizileri kullanıldı. Elde edilen veriler nitrat ve amonyum ilavesinden hemen önce (0. saat) hasat edilen örneklerle kıyaslanarak transkriptom düzeylerinde meydana gelen “-katı değişim” şeklinde tanımlandı. Transkript

yoğunluğunda en az 2 kat değişim sergileyen gen dizileri $P \leq 0.05$ düzeyinde farklı şekilde ekspresyon göstermiş olarak kabul edildi (Benjamin and Hochberg 1995).

Tüm zaman dilimleri için kaç genin sadece nitrat, sadece amonyum veya nitrat ve amonyum ile regüle edildikleri Venn diagramları kullanılarak gösterilmiştir (Şekil 4.4). Önceden yapılmış mikrodizi analizlerinden de elde edilen sonuçlarla (Wang *et al.* 2003) kıyaslandığında beklendiği gibi nitrat uygulaması *Arabidopsis* kök transkriptomunda hızlı ve geniş-çaplı değişimlere imza attı. Azot kaynağı olarak nitrat verilmesinden 0.5 saat sonra yaklaşık 250; 1.5 ve 8 saat sonra da 650' nin üzerinde genin farklı şekilde ifade olması ile *Arabidopsis* kök transkriptomlarında hızlı ve geniş ölçekli değişimler meydana gelmiştir. Azot kaynağı olarak nitrat sağlananlara nazaran amonyum sağlananlarda da her zaman diliminde genlerin ifade olma düzeyleri toplamda % 12-18 oranlarında daha düşük olmasına rağmen bu grupta da transkriptom düzeylerinde hızlı bir değişim gözlenmiştir.

Şekil 4.4'de de özetle gösterildiği gibi, her zaman diliminde farklı şekilde ifade olunan genler büyük oranda (% 56-58) amonyum ve nitrat tarafından ortak regülasyon örnekleri sergilemiştir (Çizelge 4.1). Diğer taraftan tüm resme bakıldığında, sadece amonyum veya nitrat tarafından regüle edilen genlerin oranı da oldukça yüksek düzeydedir (Çizelge 4.1). Yine çok sayıda genin de amonyum ve nitrata zıt regülasyon örnekleri sergilediği (örneğin amonyum-aktif ve aynı zamanda nitratla ifadesi baskılanmış), belirlendi. Deneysel düzeneğin zamansal akışından dolayı (örneğin tüm karşılaştırmalar 0. saate göre yapılmıştır) “genel inorganik azot” grubundaki genlerin transkript miktarlarındaki değişimlerin bazıları diurnal döngüye göre düzenlenebilir. “DIURNAL data mining tool” (Mockler *et al.* 2007) adı verilen bir program kullanarak 0.5 ve 1.5 saatlerde genel inorganik azot genlerinin %5'i ve 8. saatte de %21'inin diurnal döngü örnekleri olduğu sonucuna varıldı. Biz sadece amonyum ve nitrat sağlanan bitkilerde moleküler ve fizyolojik değişiklikleri gözlemlemek amacıyla amonyuma ve nitrata özgü gen setlerine odaklandık.



Şekil 4.4. Azot kaynağı ilavesinden 0.5 (A), 1.5 (B), ve 8 (C) saat sonra yalnızca nitrat, yalnızca amonyum, veya her ikisine cevapta farklı şekilde ifade olan *Arabidopsis* genlerinin Venn diyagramları ile gösterimi.

* Nitrat-spesifik gen seti 0. saatte hasat edilen örneklerle nazaran ≥ 2 kat-değişim gösteren, ancak amonyum uygulamasında ≤ 1.4 kat değişim gösteren genleri içerir. Amonyum-spesifik gen seti 0. saatte hasat edilen örneklerle nazaran ≥ 2 kat-değişim gösteren, ancak nitrat uygulamasında ≤ 1.4 kat-değişim gösteren genleri içerir. İnorganik azot ortak gen seti amonyum veya nitrat uygulamalarında ≥ 2 kat-değişim gösteren ve aynı zamanda alternatif azot kaynağına cevapta ≥ 1.4 -kat değişim gösteren genlerdir. Tüm karşılaştırmalar için ayarlanan P değerleri ≤ 0.05 dir.

Genel durum anlaşıldıktan sonra azot kaynağı olarak amonyum veya nitrat sağlanmış bitkilerde meydana gelen spesifik moleküler ve fizyolojik değişimleri daha iyi anlayabilmek için sadece amonyum veya nitrat tarafından regüle edilen gen setleri detaylı analiz edilmiştir. Bu amaçla, “amonyum-spesifik” ve “nitrat-spesifik” gen setleri baskılanma veya ifade olma durumlarına göre alt gruplara ayrıldı. Daha sonra bu alt gruplar, azot kaynağı olarak amonyum veya nitrat sağlanmış bitki köklerinde meydana gelecek muhtemel metabolik farklılıkları anlayabilmek için BioMaps programı (<http://virtualplant.bio.nyu.edu/cgi-bin/vpweb2/>) kullanılarak analiz edildi. BioMaps programı, mikrodizi verilerini kullanarak metabolik yollarda meydana gelen önemli düzeyde temsil olmuş fonksiyonel kategorileri istatistiksel olarak analiz etme yoluyla tanımlamaya yarayan bir programdır. Mikrodizi verilerini kullanarak BioMaps programı yardımıyla tanımlanan aşırı ifade olmuş fonksiyonel gruplar özet şekliyle Çizelge 4.1’de gösterilmiştir. Yine tüm uygulamalar ve zamanlarda gözlenen sonuçlar Çizelge 4.2, Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4’de detaylı bir şekilde sunulmuştur.

Çizelge 4.1. Sadece amonyum veya nitrat tarafından düzenlenen gen setlerinde çok önemli düzeyde ifade olmuş fonksiyonel kategoriler.

Fonksiyonel kategori*	Zanam Aralıkları (Saat)	Gözlenen Frekans (%)	Beklenen Frekans (%)	P-değeri
<i>Sadece amonyum tarafından aktive olan yollar</i>				
Bitki defans ve immün cevabı	0.5/1.5/8	8.3/4.6/8.8	0.3/0.3/0.7	$6.4 \times 10^{-4}/7.6 \times 10^{-3}/1.3 \times 10^{-5}$
Transkripsiyonal regülasyon	0.5	25,0	5,6	3.5×10^{-4}
Jasmonik asite cevap	1.5	5,7	0,5	4.0×10^{-3}
Strese Cevap	8	18,7	5,5	5.6×10^{-4}
<i>Sadece nitrat tarafından aktive olan yollar</i>				
Nikotinamid metabolik prosesi	0.5/8	5.1/2.9	0.1/0.1	$1.6 \times 10^{-4}/2.3 \times 10^{-3}$
Pentoz Fosfat Yolu	0.5	3,8	0,1	3.6×10^{-3}
Monovalent katyon transportu	1.5	5.6/4.3	0.5/0.5	$9.5 \times 10^{-4}/5.3 \times 10^{-3}$
Potasyum iyon transportu	8	2,9	0,2	7.8×10^{-3}
Sitokinine cevap	8	5,0	0,3	7.9×10^{-6}

*Bir grup içerisinde en az üç gen çok önemli düzeyde farklı regülasyon örnekleri sergilemiştir

BioMaps programı sayesinde mikrodizi analizi ile elde edilen veriler analiz edilerek genel manada katyon transport aktivasyonu, sitokinine cevap ve oksidatif pentoz fosfat yolu ile NAD(P)H üretimi olayları nitrat-spesifik cevaplar olduğu belirlenmiştir. Diğer taraftan biyotik stres/savunma ve transkripsiyonal regülasyon kategorilerinin spesifik olarak amonyuma cevapta aktive olduğu gözlenmiştir. Amonyum veya nitrat tarafından ifade olan gen seti (“inorganik azot ortak gen seti”) nitrat transportu, trehaloz biyosentezi, sitokinine cevap ve pentoz fosfat yollarını da içeren pek çok fonksiyonel kategoride aşırı ifade olma örnekleri sergilemiştir (Çizelge 4.5). BioMaps analiz sonuçlarına göre sitokinine cevap ve pentoz fosfat yollarının hem sadece nitrata özgü, hem de inorganik azota cevapta aktive olması durumu bu cevapların çoğunlukla nitrat tarafından aktive olduğu, ancak sadece nitrata özgü aktivasyon sergilemediğini gösterir. Lipid biyosentezi ve transportu gibi değişik abiyotik stres cevapları nitrat ve amonyum her iki azot kaynağına cevapta aşağı yönde regülasyon örnekleri sergilemiştir (Çizelge 4.3-5).

Çizelge 4.2. Nitrat-spesifik gen setlerinin BioMaps analiz sonuçları

<i>Nitratla aktive olan genler (0.5 saat)</i>				
<i>Fonksiyonel Kategori</i>	<i>Gözlenen Frekans</i>	<i>Beklenen Frekans</i>	<i>P-değeri</i>	<i>Genler</i>
Nikotinamid metabolik protezi	4 out of 79 genes, 5.1%	34 out of 28924 genes, 0.1%	0,00016	At5g13110 At1g64190 At5g41670 At5g14760
Piridin nükleotid metabolik protezi	4 out of 79 genes, 5.1%	38 out of 28924 genes, 0.1%	0,00026	At5g13110 At1g64190 At5g41670 At5g14760
Oksidoredüktasyon koenzim met. protezi	4 out of 79 genes, 5.1%	45 out of 28924 genes, 0.2%	0,00052	At5g13110 At1g64190 At5g41670 At5g14760
Pentoz-fosfat yolu	3 out of 79 genes, 3.8%	26 out of 28924 genes, 0.1%	0,00036	At5g13110 At1g64190 At5g41670
NADPH üretimi	3 out of 79 genes, 3.8%	27 out of 28924 genes, 0.1%	0,00404	At5g13110 At1g64190 At5g41670
Suda çözünen vitaminlerin met. protezi	4 out of 79 genes, 5.1%	79 out of 28924 genes, 0.3%	0,0049	At5g13110 At1g64190 At5g41670 At5g14760
NADP metabolik protezi	3 out of 79 genes, 3.8%	29 out of 28924 genes, 0.1%	0,00503	At5g13110 At1g64190 At5g41670
Vitamin metabolik protezi	4 out of 79 genes, 5.1%	92 out of 28924 genes, 0.3%	0,00887	At5g13110 At1g64190 At5g41670 At5g14760
Hormon salınımına cevap	9 out of 79 genes, 11.4%	702 out of 28924 genes 2.4%	0,00093	At4g34760 At3g10520 At3g17510 At2g21210 At3g02850 At2g26980 At1g59940 At3g28910 At4g34000
<i>Nitratla aktive olan genler (1.5 saat)</i>				
<i>Fonksiyonel Kategori</i>	<i>Gözlenen Frekans</i>	<i>Beklenen Frekans</i>	<i>P-değeri</i>	<i>Genler</i>
Monovalent inorganik katyon transportu	6 out of 108 genes, 5.6%	134 out of 28924 genes, 0.5%	0,00095	At3g06370 At5g47560 At4g30190 At3g02850 At4g00630 At3g60330 At5g12860 At2g38510 At1g59740 At5g47100 At4g16920 At1g33830 At1g49860 At1g77760 At3g028500 At4g3475 At4g34000 At5g27100 At4g36880 At1g17060 At3g01080 At1g59940 At2g35000 At5g50200 At4g34760 At2g41560 At2g21210 At2g46790 At2g17060 At5g24120 At5g19700
Uyarıcılara cevap	25 out of 108 genes, 23.1%	2823 out of 28924 genes, 9.8%	0,00281	
<i>Nitratla aktive olan genler (8 saat)</i>				
<i>Fonksiyonel Kategori</i>	<i>Gözlenen Frekans</i>	<i>Beklenen Frekans</i>	<i>P-değeri</i>	<i>Genler</i>
Sitokinin salınımına cevap	7 out of 140 genes, 5.0%	74 out of 28924 genes, 0.3%	7,86E-06	At5g62920 At3g48100 At2g41310 At2g26980 At1g30260 At1g59940 At3g57040
sitokinin kaynaklı sinyal	5 out of 140 genes, 3.6%	37 out of 28924 genes, 0.1%	0,0001	At5g62920 At3g48100 At2g41310 At1g59940 At3g57040
Kimyasal uyarıcılara cevap	19 out of 140 genes, 13.6%	1271 out of 28924 genes, 4.4%	0,00134	At3g48100 At2g26980 At1g49860 At5g37260 At5g2050 At5g62920 At1g34510 At4g27410 At3g02850 At4g34750 At1g80840 At2g41310 At1g59940 At1g30260 At5g24780 At1g69440 At2g21210 At3g61190 At3g57040
Nikotinamid metabolik protezi	4 out of 140 genes, 2.9%	34 out of 28924 genes, 0.1%	0,00233	At5g13110 At1g64190 At5g41670 At5g13420
Hüresel karbonhidrat met. protezi	9 out of 140 genes, 6.4%	325 out of 28924 genes, 1.1%	0,0033	At4g24620 At3g01260 At5g13420 At4g39770 At1g60140 At5g13110 At1g64190 At2g18700 At5g66530
Piridin nükleotid metabolik protezi	4 out of 140 genes, 2.9%	38 out of 28924 genes, 0.1%	0,00365	At5g13110 At1g64190 At5g41670 At5g13420
Monovalent inorganik katyon transportu	6 out of 140 genes, 4.3%	134 out of 28924 genes, 0.5%	0,00533	At5g46370 At3g02850 At1g30270 At4g00630 At4g30110 At3g60330
Oksidoredüktasyon koenzim met. protezi	4 out of 140 genes, 2.9%	45 out of 28924 genes, 0.2%	0,00718	At5g13110 At1g64190 At5g41670 At5g13420
Potasyum iyon transportu	4 out of 140 genes, 2.9%	46 out of 28924 genes, 0.2%	0,00783	At5g46370 At3g02850 At1g30270 At4g00630

Çizelge 4.3. Amonyum-spesifik gen setlerinin BioMaps analiz sonuçları

<i>Amonyumla aktive olan genler (0.5 saat)</i>				
<i>Fonksiyonel Kategori</i>	<i>Gözlenen Frekans</i>	<i>Beklenen Frekans</i>	<i>P-değeri</i>	<i>Genler</i>
Transkripsiyonal regülasyon	12 out of 48 genes, 25.0%	1617 out of 28924 genes, 5.6%	0,00035	A14g23810 A12g46400 A12g37430 A12g20880 A11g43160 A13g16350 A12g38470 A13g53600 A15g49450 A12g33710 A13g50260 A13g56400
Nükleobaz, nükleosid, nükleotid ve nükleik asit metabolik prosesi	12 out of 48 genes, 25.0%	1636 out of 28924 genes, 5.7%	0,00039	A14g23810 A12g46400 A12g37430 A12g20880 A11g43160 A13g16350 A12g38470 A13g53600 A15g49450 A12g33710 A13g50260 A13g56400
Hücrel metabolik işleyişin düzenlenmesi	12 out of 48 genes, 25.0%	1703 out of 28924 genes, 5.9%	0,00059	A14g23810 A12g46400 A12g37430 A12g20880 A11g43160 A13g16350 A12g38470 A13g53600 A15g49450 A12g33710 A13g50260 A13g56400
Transkripsiyon	12 out of 48 genes, 25.0%	1713 out of 28924 genes, 5.9%	0,00062	A14g23810 A12g46400 A12g37430 A12g20880 A11g43160 A13g16350 A12g38470 A13g53600 A15g49450 A12g33710 A13g50260 A13g56400
Bakteriye karşı savunma cevabı	4 out of 48 genes, 8.3%	93 out of 28924 genes, 0.3%	0,00064	A14g23810 A12g40000 A12g38470 A13g56400
Metabolik işleyişin düzenlenmesi	12 out of 48 genes, 25.0%	1719 out of 28924 genes, 5.9%	0,00065	A14g23810 A12g46400 A12g37430 A12g20880 A11g43160 A13g16350 A12g38470 A13g53600 A15g49450 A12g33710 A13g50260 A13g56400
DNA-bağımlı transkripsiyonun regülasyonu	9 out of 48 genes, 18.8%	934 out of 28924 genes, 3.2%	0,00073	A14g23810 A12g46400 A12g20880 A11g43160 A12g38470 A15g49450 A12g33710 A13g50260 A13g56400
RNA metabolik prosesin regülasyonu	9 out of 48 genes, 18.8%	940 out of 28924 genes, 3.2%	0,00077	A14g23810 A12g46400 A12g20880 A11g43160 A12g38470 A15g49450 A12g33710 A13g50260 A13g56400
Gen ifadesinin düzenlenmesi	12 out of 48 genes, 25.0%	1763 out of 28924 genes, 6.1%	0,00083	A14g23810 A12g46400 A12g37430 A12g20880 A11g43160 A13g16350 A12g38470 A13g53600 A15g49450 A12g33710 A13g50260 A13g56400
RNA biyosentetik proses	9 out of 48 genes, 18.8%	968 out of 28924 genes, 3.3%	0,00097	A14g23810 A12g46400 A12g20880 A11g43160 A12g38470 A15g49450 A12g33710 A13g50260 A13g56400
Hücrel işleyişin düzenlenmesi	12 out of 48 genes, 25.0%	2033 out of 28924 genes, 7.0%	0,00335	A14g23810 A12g46400 A12g37430 A12g20880 A11g43160 A13g16350 A12g38470 A13g53600 A15g49450 A12g33710 A13g50260 A13g56400
Bakteriye cevap	4 out of 48 genes, 8.3%	163 out of 28924 genes, 0.6%	0,00576	A14g23810 A12g40000 A12g38470 A13g56400
Biyolojik işleyişin düzenlenmesi	12 out of 48 genes, 25.0%	2178 out of 28924 genes, 7.5%	0,00645	A14g23810 A12g46400 A12g37430 A12g20880 A11g43160 A13g16350 A12g38470 A13g53600 A15g49450 A12g33710 A13g50260 A13g56400

Çizelge 4.3. (Devam)

Amonyumla aktive olan genler (1.5 saat)				
<i>Fonksiyonel Kategori</i>	<i>Gözlenen Frekans</i>	<i>Beklenen Frekans</i>	<i>P-değeri</i>	<i>Genler</i>
Jasmonik asit salınımına cevap	5 out of 87 genes, 5.7%	139 out of 28924 genes, 0.5%	0,00398	At1g28480 At1g19180 At3g56400 At1g70700 At2g24850
Jasmonik asit kaynaklı sinyal	3 out of 87 genes, 3.4%	30 out of 28924 genes, 0.1%	0,00623	At1g28480 At1g19180 At3g56400
Kimyasal uyarıcılara cevap	13 out of 87 genes, 14.9%	1271 out of 28924 genes, 4.4%	0,00659	At4g20830 At2g32020 At1g28480 At1g19180 At3g30775 At1g70700 At2g44080 At1g27730 At4g29140 At5g54490 At3g56400 At2g24850 At1g80840
Fungusa karşı savunma cevabı	4 out of 87 genes, 4.6%	84 out of 28924 genes, 0.3%	0,0076	At2g38470 At3g56400 At5g39580 At1g80840
Amonyumla aktive olan genler (8 saat)				
<i>Fonksiyonel Kategori</i>	<i>Gözlenen Frekans</i>	<i>Beklenen Frekans</i>	<i>P-değeri</i>	<i>Genler</i>
İmmün cevap	8 out of 91 genes, 8.8%	196 out of 28924 genes, 0.7%	1,31E-05	At3g04720 At1g19250 At5g13320 At2g26560 At3g56400 At3g12500 At1g74710 At4g11650
savunma cevabı, zıt etkileşim	7 out of 91 genes, 7.7%	133 out of 28924 genes, 0.5%	1,41E-05	At5g13320 At3g04720 At3g12500 At3g56400 At1g19250 At4g11650 At1g74710
İmmün cevap	8 out of 91 genes, 8.8%	208 out of 28924 genes, 0.7%	2,07E-05	At3g04720 At1g19250 At5g13320 At2g26560 At3g56400 At3g12500 At1g74710 At4g11650
İmmün sistem işleyişi	8 out of 91 genes, 8.8%	209 out of 28924 genes, 0.7%	2,14E-05	At3g04720 At1g19250 At5g13320 At2g26560 At3g56400 At3g12500 At1g74710 At4g11650
Savunma cevabı	11 out of 91 genes, 12.1%	641 out of 28924 genes, 2.2%	0,00035	At3g04720 At5g06860 At1g19250 At1g17615 At5g13320 At2g26560 At1g72900 At3g12500 At3g56400 At1g74710 At4g11650
Sistematiik kazanılmış dayanıklılık	4 out of 91 genes, 4.4%	38 out of 28924 genes, 0.1%	0,0004	At3g04720 At3g56400 At1g19250 At1g74710
Strese cevap	17 out of 91 genes, 18.7%	1594 out of 28924 genes, 5.5%	0,00056	At5g43580 At1g19250 At2g34390 At5g13320 At2g26560 At3g56400 At4g11650 At1g09080 At1g67090 At3g04720 At5g06860 At1g17615 At1g77120 At1g72900 At3g12500 At1g74710 At3g01420
Bakteriye karşı savunma cevabı	5 out of 91 genes, 5.5%	93 out of 28924 genes, 0.3%	0,00074	At5g13320 At3g56400 At1g19250 At4g11650 At1g74710
Fungusa cevap	5 out of 91 genes, 5.5%	133 out of 28924 genes, 0.5%	0,00419	At5g13320 At3g12500 At3g56400 At1g19250 At1g74710
Diğer organizmalara cevap	8 out of 91 genes, 8.8%	461 out of 28924 genes, 1.6%	0,00681	At3g04720 At1g19250 At5g13320 At3g56400 At3g12500 At1g74710 At4g11650 At3g01420
Fungusa karşı savunma cevabı	4 out of 91 genes, 4.4%	84 out of 28924 genes, 0.3%	0,00948	At3g12500 At3g56400 At1g19250 At1g74710

Çizelge 4.4. Hem amonyum ve hemde nitrat tarafından ortak ifade olunan (İnorganik azot ortak) gen setlerinin BioMaps analiz sonuçları

<i>İnorganik azot ortak aktive olan genler (0.5 saat)</i>				
<i>Fonksiyonel Kategorisi</i>	<i>Gözlenen Frekans</i>	<i>Beklenen Frekans</i>	<i>P-değeri</i>	<i>Genler</i>
su stresine cevap	8 out of 156 genes, 5.1%	121 out of 28924 genes, 0.4%	3,05E-05	At3g50970 At5g52310 At5g05410 At1g20450 At4g02380 At1g01470 At1g27730 At2g17840
Sıcaklık uyarımına cevap	11 out of 156 genes, 7.1%	318 out of 28924 genes, 1.1%	0,00012	At3g50970 At4g34150 At5g52310 At1g20450 At1g27730 At5g05410 At4g02380 At4g17615 At4g17090 At2g41100 At2g17840
Soğuga cevap	9 out of 156 genes, 5.8%	209 out of 28924 genes, 0.7%	0,0002	At3g50970 At4g34150 At5g52310 At1g20450 At1g27730 At4g02380 At4g17090 At4g17615 At2g17840
Abiotik uyarıcıya cevap	16 out of 156 genes, 10.3%	883 out of 28924 genes, 3.1%	0,00233	At4g34150 At4g12720 At5g49480 At5g05410 At5g62520 At1g01470 At4g17615 At4g17090 At2g17840 At3g50970 At5g52310 At1g20450 At1g27730 At1g02400 At4g02380 At2g41100
Tuz stresine cevap	7 out of 156 genes, 4.5%	183 out of 28924 genes, 0.6%	0,00605	At4g12720 At5g52310 At5g62520 At5g49480 At4g17615 At1g27730 At2g17840

Çizelge 4.4. (Devam)

İnorganik azot ortam aktive olan genler (1.5 saat)				
Fonksiyonel Kategori	Gözlenen Frekans	Beklenen Frekans	P-değeri	Genler
Trehaloz biosentetik pros.	8 out of 239 genes, 3.3%	20 out of 28924 genes, 0.1%	2,74E-10	A4g22590 A15g51460 A2g18700 A4g12430 A11g70290 A15g65140 A11g23870 A11g78090
Disakkarit biosentetik pros.	9 out of 239 genes, 3.8%	33 out of 28924 genes, 0.1%	6,16E-10	A4g12430 A11g70290 A15g65140 A15g51460 A4g22590 A2g18700 A11g23870 A11g78090 A15g20830
Trehaloz metabolik pros.	8 out of 239 genes, 3.3%	22 out of 28924 genes, 0.1%	6,87E-10	A4g22590 A15g51460 A2g18700 A4g12430 A11g70290 A15g65140 A11g23870 A11g78090
Disakkarit metabolik pros.	9 out of 239 genes, 3.8%	41 out of 28924 genes, 0.1%	5,28E-09	A4g12430 A11g70290 A15g65140 A15g51460 A4g22590 A2g18700 A11g23870 A11g78090 A15g20830
Uyarıcıya cevap	49 out of 239 genes, 20.5%	2823 out of 28924 genes, 9.8%	5,33E-05	A13g17510 A13g16350 A2g32660 A15g10030 A11g19050 A15g62920 A2g34390 A11g03850 A15g05410 A11g13260 A13g23030 A15g66890 A13g50970 A2g41310 A12g24710 A11g12110 A15g24270 A11g77120 A11g69040 A4g37580 A4g02380 A2g16060 A2g41100 A15g20830 A13g48100 A11g63940 A14g33930 A14g10270 A15g49480 A15g47220 A13g47340 A15g20500 A15g54960 A12g35980 A13g50660 A2g17660 A12g37970 A15g52310 A11g20450 A13g11930 A11g66780 A2g26820 A11g59500 A11g69530 A15g53770 A11g75030 A15g65210 A11g72360
Hipoksiya cevap	4 out of 239 genes, 1.7%	13 out of 28924 genes, 0.0%	0,00037	A11g77120 A12g34390 A15g54960 A2g16060
Hüc. karbohidrat met. Pros.	13 out of 239 genes, 5.4%	325 out of 28924 genes, 1.1%	0,00043	A11g24280 A14g12430 A15g41670 A11g70290 A15g65140 A4g22590 A15g51460 A15g13110 A12g18700 A11g64190 A11g23870 A11g78090 A15g20830
Hormon uyarımına cevap	19 out of 239 genes, 7.9%	702 out of 28924 genes, 2.4%	0,00084	A13g48100 A13g17510 A13g16350 A15g47220 A11g19050 A15g62920 A11g03850 A11g13260 A13g23030 A15g50660 A2g17660 A13g50970 A12g41310 A12g24710 A11g20450 A11g69530 A14g37580 A11g69040 A4g02380 A11g72360
Kimyasal uyarıma cevap	26 out of 239 genes, 10.9%	1271 out of 28924 genes, 4.4%	0,0026	A15g48100 A13g17510 A13g16350 A15g47220 A15g52050 A11g19050 A15g62920 A11g03850 A15g05410 A11g13260 A13g23030 A13g50660 A2g17660 A13g50970 A12g41310 A12g24710 A11g20450 A11g66780 A11g12110 A15g24270 A11g59500 A11g69530 A4g37580 A11g69040 A4g02380 A11g72360
Sitokinin salınımına cevap	6 out of 239 genes, 2.5%	74 out of 28924 genes, 0.3%	0,00426	A15g62920 A11g69040 A13g48100 A2g41310 A11g03850 A11g19050
İç uyarıcılara cevap	19 out of 239 genes, 7.9%	801 out of 28924 genes, 2.8%	0,00518	A13g48100 A13g17510 A13g16350 A15g47220 A11g19050 A15g62920 A11g03850 A11g13260 A13g23030 A15g50660 A2g17660 A13g50970 A12g41310 A12g24710 A11g20450 A11g69530 A14g37580 A11g69040 A4g02380 A11g72360
Abiotik uyarıcılara cevap	20 out of 239 genes, 8.4%	883 out of 28924 genes, 3.1%	0,00617	A11g63940 A13g17510 A13g16350 A15g47220 A11g19050 A15g62920 A11g03850 A15g05410 A13g52310 A11g20450 A12g24710 A11g12110 A15g24270 A11g69530 A4g37580 A11g77120 A4g02380 A12g41100 A15g20830
Hücre sel iletişim	23 out of 239 genes, 9.6%	1109 out of 28924 genes, 3.8%	0,00648	A13g48100 A15g58700 A2g32660 A2g31085 A15g47220 A2g37800 A13g47340 A15g57630 A11g19050 A15g62920 A15g42840 A12g34180 A2g37970 A12g41310 A12g38490 A11g06225 A12g02710 A12g25090 A4g37580 A15g25110 A4g18510 A4g02380 A11g72360
Pentoz-fosfat yolu	4 out of 239 genes, 1.7%	26 out of 28924 genes, 0.1%	0,00724	A11g24280 A15g13110 A11g64190 A15g41670
Sinyal iletimi	21 out of 239 genes, 8.8%	974 out of 28924 genes, 3.4%	0,00805	A13g48100 A15g58700 A2g32660 A2g31085 A15g47220 A2g37800 A15g57630 A11g19050 A15g62920 A15g42840 A12g34180 A2g37970 A12g41310 A12g38490 A11g06225 A12g02710 A12g25090 A4g37580 A15g25110 A4g18510 A11g72360
NADPH üretimi	4 out of 239 genes, 1.7%	27 out of 28924 genes, 0.1%	0,00845	A11g24280 A15g13110 A11g64190 A15g41670
Karbohid. biosentetik pros.	9 out of 239 genes, 3.8%	215 out of 28924 genes, 0.7%	0,00993	A14g12430 A11g70290 A15g65140 A15g51460 A4g22590 A2g18700 A11g23870 A11g78090 A15g20830

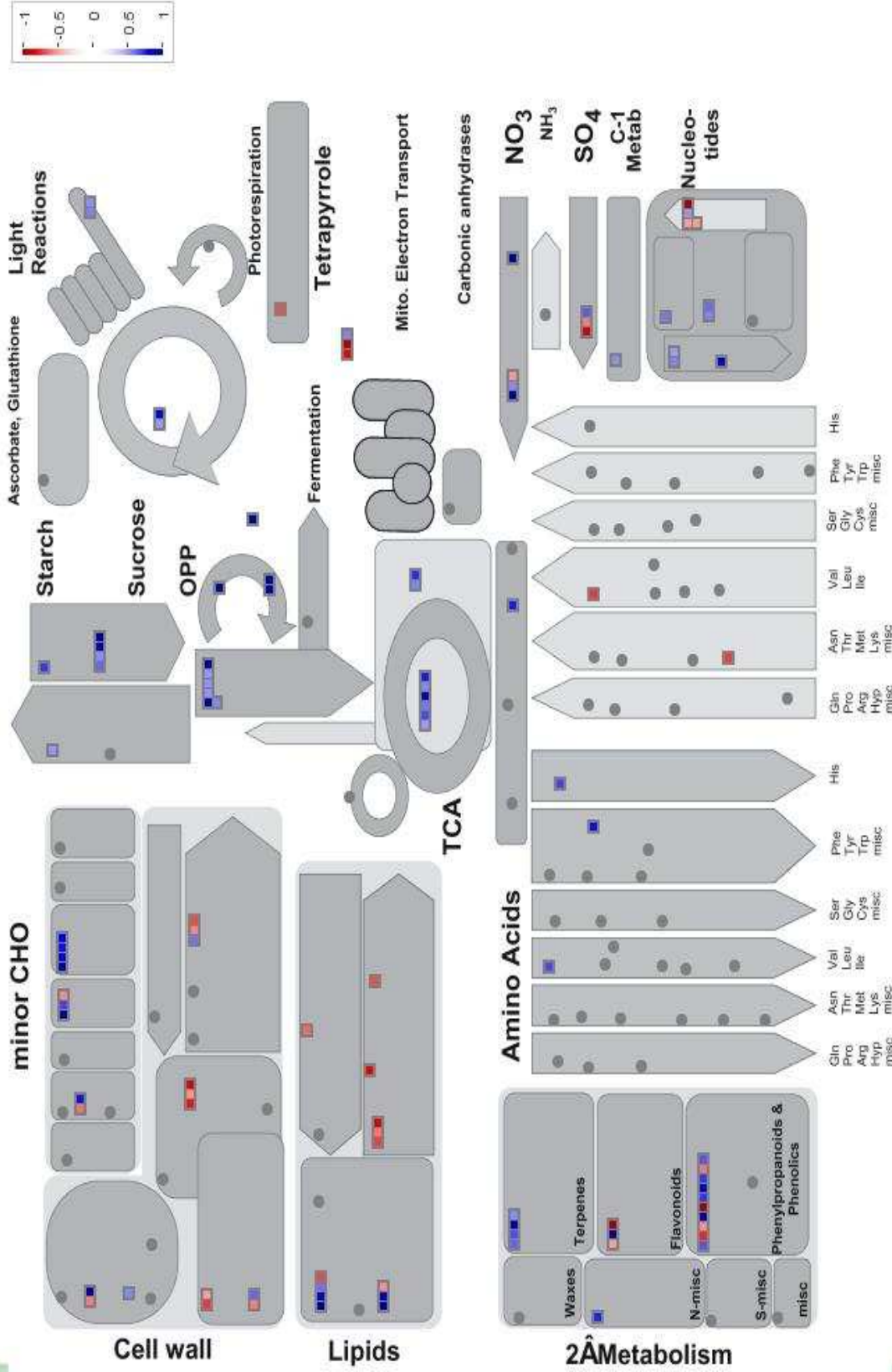
Çizelge 4.4. (Devam)

İnorganik azot ortak aktive olan genler (8 saat)				
<i>Fonksiyonel Kategori</i>	<i>Gözlenen Frekans</i>	<i>Beklenen Frekans</i>	<i>P-değeri</i>	<i>Genler</i>
Uyartıcıya cevap	56 out of 266 genes, 21.1%	2823 out of 28924 genes, 9.8%	3,71E-06	At1g49720/At3g17510/At2g32660/At1g33830/At5g10030/At2g43535/At1g19050/At3g60160/At1g03850/At5g05410/At1g13260/At3g17600/At3g07650/At2g38870/At2g40080/At5g66890/At2g02120/At2g24710/At1g12110/At3g26830/At5g24270/At3g29320/At5g50200/At4g37580/At4g02380/At2g16060/At5g19700/At3g48920/At1g63940/At5g05400/At1g33930/At4g21410/At3g47340/At5g49480/At5g54960/At4g24180/At5g45090/At3g50660/At4g36010/At5g27100/At2g19450/At1g66780/At3g11930/At5g24470/At3g46970/At1g08090/At1g59500/At2g26820/At4g29140/At4g34760/At2g41560/At1g75030/At5g62530/At2g17060/At5g65210/At3g49120
Nitrat transportu	4 out of 266 genes, 1.5%	6 out of 28924 genes, 0.0%	1,47E-05	At5g50200/At1g08100/At1g12110/At1g08090
Trehaloz biyosentetik prosesi	5 out of 266 genes, 1.9%	20 out of 28924 genes, 0.1%	0,00012	At5g51460/At4g12430/At5g65140/At1g23870/At1g78090
İnorganik anyon transportu	6 out of 266 genes, 2.3%	39 out of 28924 genes, 0.1%	0,0002	At5g50200/At5g19600/At1g08100/At1g12110/At1g78000/At1g08090
Trehaloz metabolik prosesi	5 out of 266 genes, 1.9%	22 out of 28924 genes, 0.1%	0,0002	At5g51460/At4g12430/At5g65140/At1g23870/At1g78090
Disakkarit biyosentetik pros.	5 out of 266 genes, 1.9%	33 out of 28924 genes, 0.1%	0,00174	At5g51460/At4g12430/At5g65140/At1g23870/At1g78090
Anyon transportu	6 out of 266 genes, 2.3%	57 out of 28924 genes, 0.2%	0,002	At5g50200/At5g19600/At1g08100/At1g12110/At1g78000/At1g08090
Disakkarit metabolik prosesi	5 out of 266 genes, 1.9%	41 out of 28924 genes, 0.1%	0,00517	At5g51460/At4g12430/At5g65140/At1g23870/At1g78090
Sirkadiyen ritim	5 out of 266 genes, 1.9%	43 out of 28924 genes, 0.1%	0,00655	At5g60100/At5g61380/At3g46640/At5g24470/At2g40080
Ritmik proses	5 out of 266 genes, 1.9%	43 out of 28924 genes, 0.1%	0,00655	At5g60100/At5g61380/At3g46640/At5g24470/At2g40080

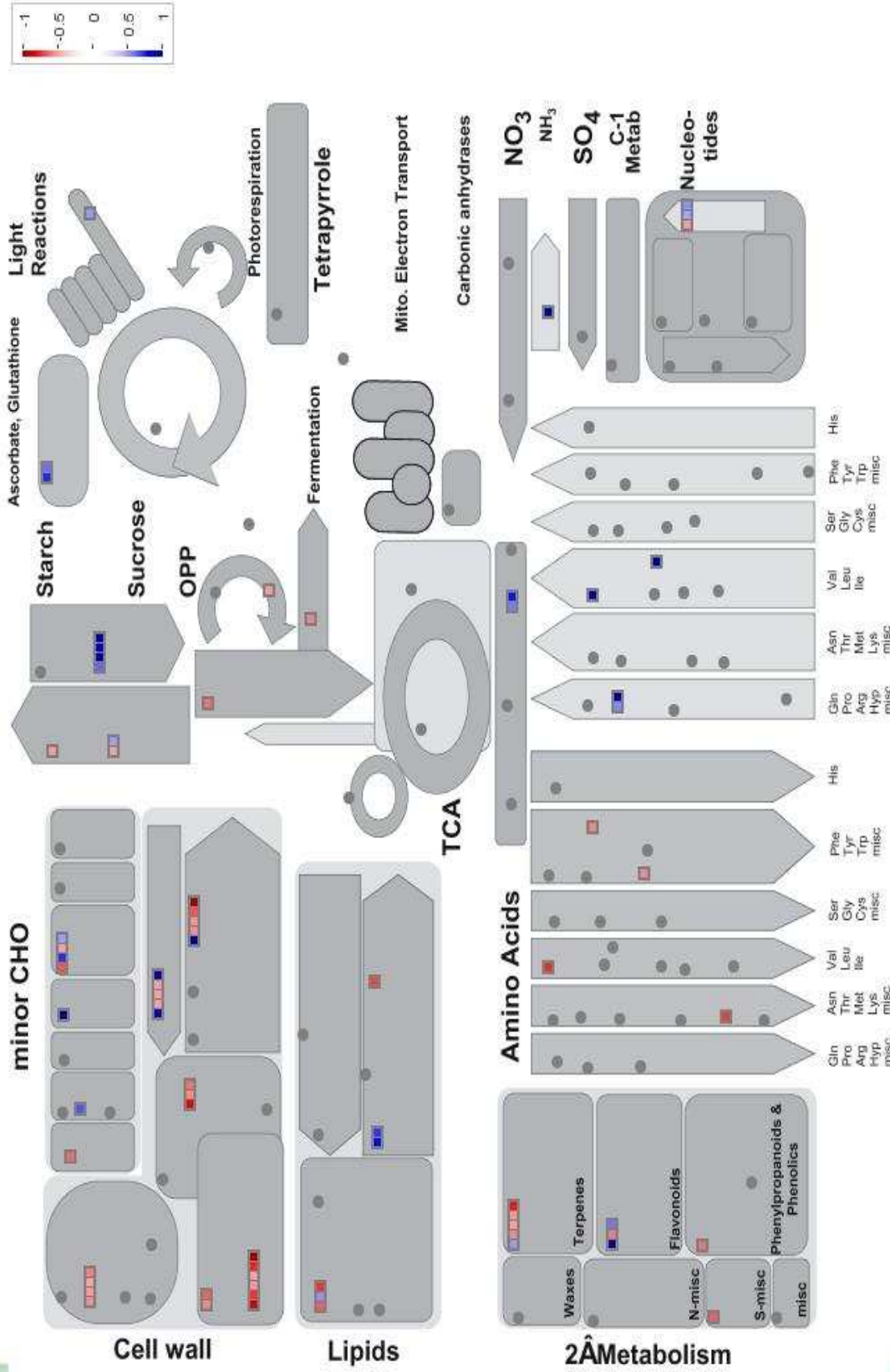
BioMaps analizleri ile nitrat ve amonyum sağlanmış *Arabidopsis* köklerindeki metabolik farklılıklar hakkında genel bir bakış açısı elde edildi. BioMaps verilerinden elde edilen sonuçlar ışığında nitrat-spesifik ve amonyum-spesifik gen setlerinin fonksiyonel analizleri daha da derinleştirilerek, mikrodizi verilerini kullanarak ifade olunan veya baskılanan genlerin hangi biyokimyasal yollarda rol aldıklarıyla ilgili görsel veri sunan MapMan programı kullanıldı (Thimm *et al.* 2004; Usadel *et al.* 2005). Şekil 4.7 ve Şekil 4.8 karşılaştırmalı olarak incelendiğinde azot kaynağı olarak amonyum ve nitrata cevapla ilgili pek çok metabolik yolda fonksiyonel farklılıklar belirgindir. Şekil 4.5 ve özellikle Şekil 4.6 karşılaştırıldığında göze çarpan çok önemli olaylardan; oksidatif pentoz fosfat yolunun NADPH üretimini sağlayan iki önemli enzimi, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (At5g13110) ve 6-fosfoglukonat dehidrogenaz (At5g41670, At1g64190) çok hızlı bir şekilde nitrat tarafından ifade oldukları görülüyor. Diğer taraftan ferrodoksin NADP⁺ redüktazı kodlayan iki gen (At4g05390, At1g30510) ve ferrodoksini kodlayan bir gen (At2g27510) yine nitratla hızlı bir biçimde ifade olmuştur. Bununla birlikte sitokinin sinyalinde rol oynayan altı adet Tip-A transkripsiyonel cevaptan sorumlu gen (ARR3, ARR4, ARR5, ARR6, ARR8, ARR9) azot açlığının ardından nitrat ilavesinden 8 saat sonra çok güçlü bir şekilde ifade olmuşlardır (Şekil 4.7) Nitrat ile ilgili elde ettiğimiz sitokinin biyosentezi ve/veya transportu arasındaki ilişki ile ilgili olarak daha önce yapılmış çalışmalarla uyum göstermektedir. (Walch-Liu *et al.* 2000; Rahayu *et al.* 2005).

Bu çalışmada elde edilen nitrat-spesifik metabolik regülasyon cevaplarının daha önce yapılan çok sayıda çalışmayla desteklenmesine rağmen (Wang *et al.* 2000, 2003, 2004; Scheible *et al.* 2004; Gifford *et al.* 2008) amonyum-spesifik metabolik cevaplar hakkında yeterli düzeyde bilgi rapor edilmemiştir. Amonyum-spesifik gen seti kullanılarak elde edilen MapMan analiz sonuçlarına (Şekil 4.6 ve 4.8) göre azot açlığından sonra amonyum sağlanan bitki köklerinde 1,5 ve özellikle 8 saat sonra hücre duvarının modifiye edilmesiyle ilgili bir çok enzimi kodlayan genin ifadeleri baskılanmıştır. Örneğin, azot kaynağı olarak amonyum sağlanmasından 1,5 saat sonra kontrole (0. saat) kıyasla poligalakturonaz enzimini kodlayan gen ifadeleri (At2g43890) >4 kat oranında baskılanırken poligalakturonaz inhibe edici protein PGIP1

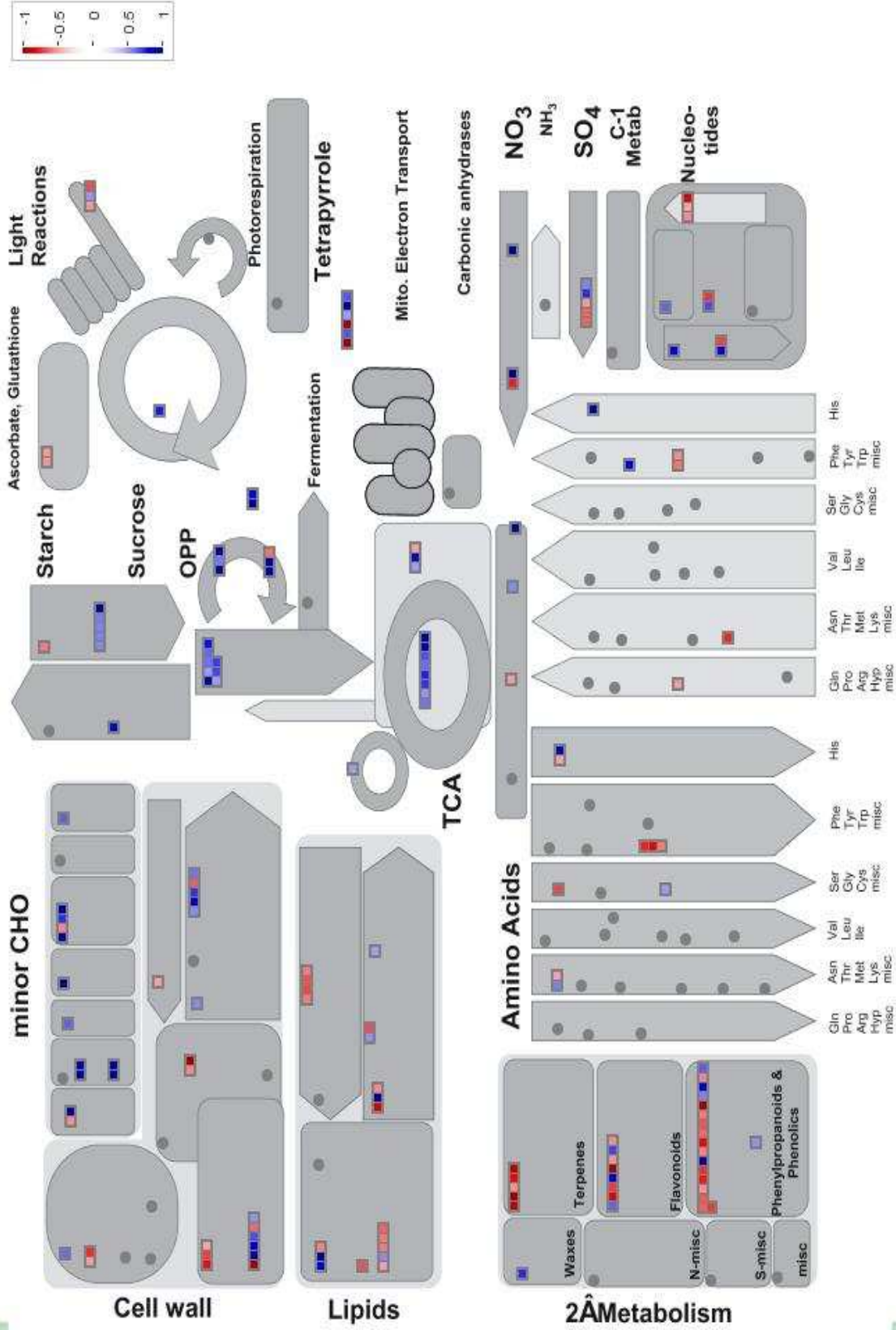
(At5g06860) >3 kat daha fazla ifade olmuştur. NH_4^+ ilavesinden 1.5 ve/veya 8 saat sonra dört adet ekspansin, dört adet endo-transglikozilaz, bir pektat liyaz ve bir ilave poligalakturonaz da ayrıca en az ≥ 1.7 kat baskılanmıştır. BioMaps analizi ile daha önce belirlenen transkripsiyonel regülasyonla fonksiyonel kategorilerin amonyum-sağlanan bitkilerde özellikle değişkenlik göstermesi durumu MapMan analizleri ile de desteklendi. Özellikle WRKY-tip transkripsiyon faktör genlerinden (bu transkripsiyon faktörlerinin çoğunlukla biyotik ve abiyotik strese cevapta rol oynadıkları bilinmektedir) 7 tanesinin (WRKY 31, 33, 40, 46, 53, 70, ve 75) transkript miktarında 8 saatin sonunda kontrole (0. saat) kıyasla en az 2 kat artış gözlenmiştir.



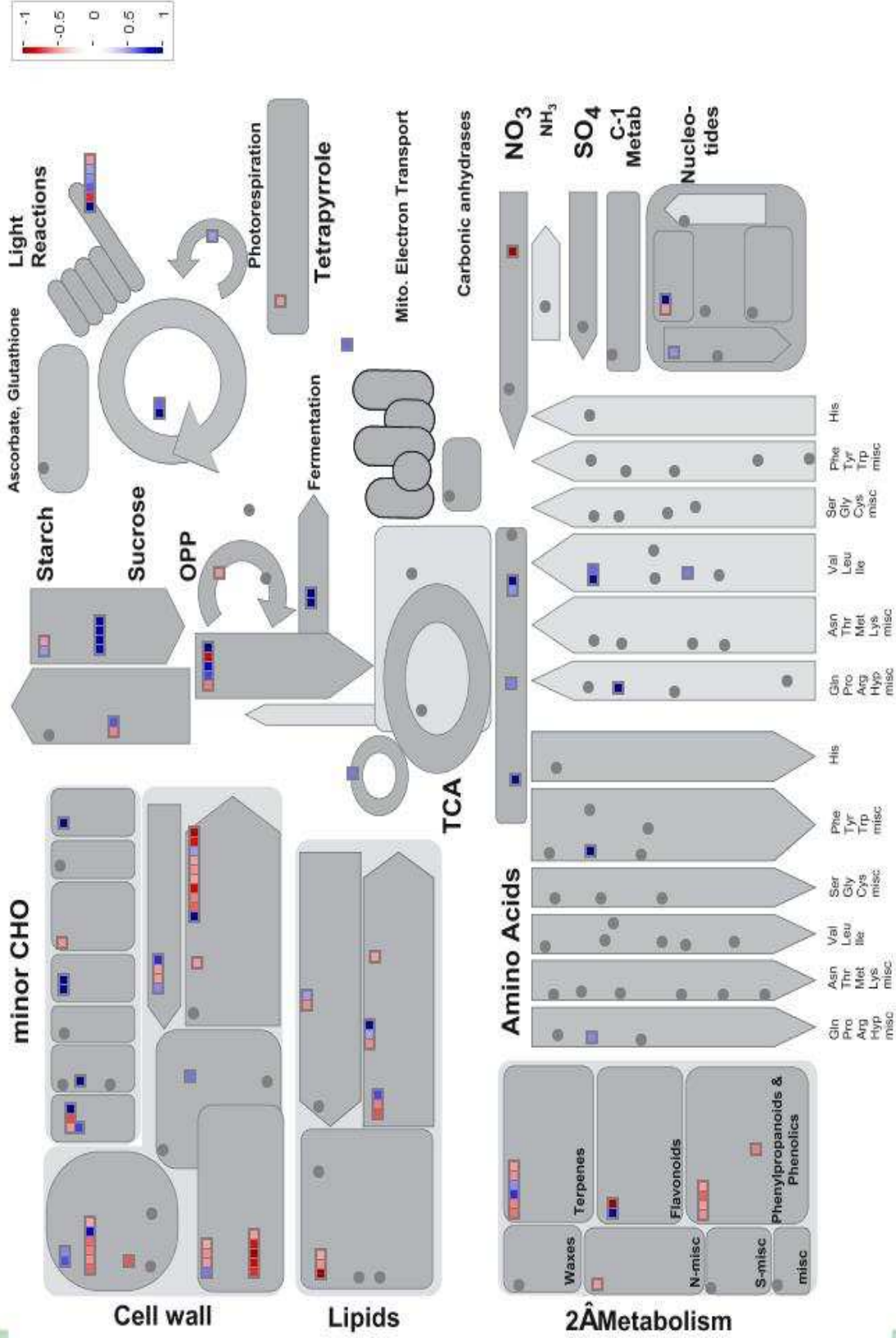
Şekil 4.5. MapMan programı kullanılarak elde edilen nitrat-spesifik gen setinden (1,5 saat) sağlanan ekspresyon verilerinin metabolik harita üzerindeki kroki görüntüsü. Ölçek üzerindeki değerler log2 dönüştürülmüş verilerdir. Mavi renkler sorumlu genlerin ifade olma durumlarını, kırmızı renkler de baskılanma durumlarını gösterir.



Şekil 4.6. MapMan programı kullanılarak elde edilen amonyum-spesifik gen setinden (1,5 saat) sağlanan ekspresyon verilerinin metabolik harita üzerindeki kroki görüntüsü. Ölçek üzerindeki değerler log₂ dönüştürülmüş verilerdir. Mavi renkler sorumlu genlerin ifade olma durumlarını, kırmızı renkler de baskılanma durumlarını gösterir.

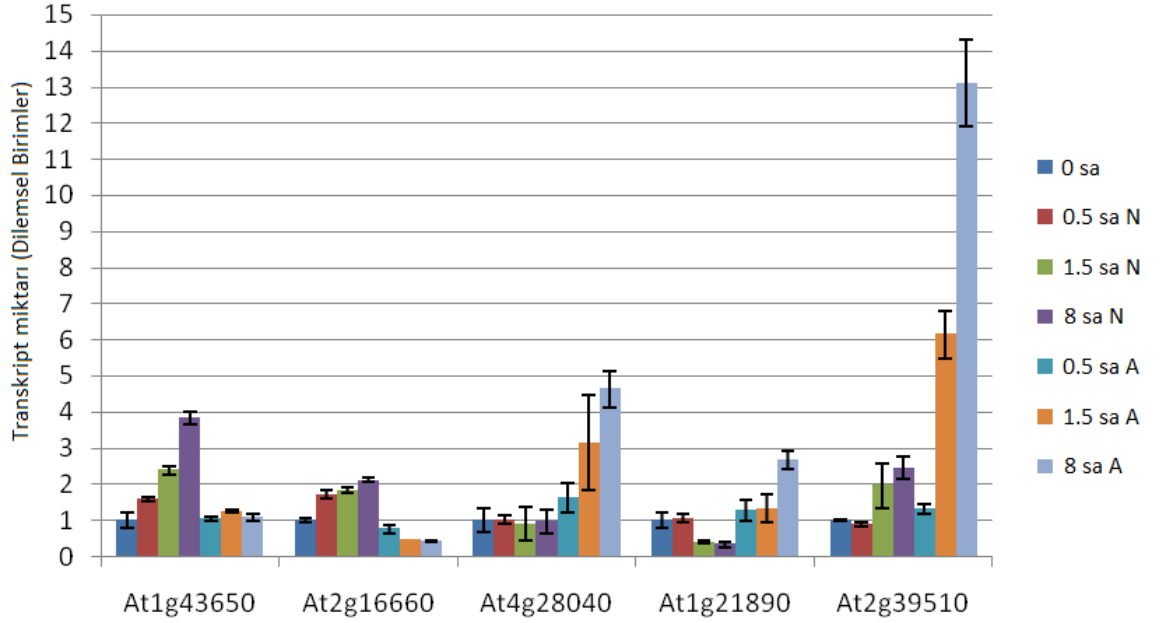


Şekil 4.7. MapMan programı kullanılarak elde edilen nitrat-spesifik gen setinden (8 saat) sağlanan ekspresyon verilerinin metabolik harita üzerindeki kroki görüntüsü. Ölçek üzerindeki değerler log2 dönüştürülmüş verilerdir. Mavi renkler sorumlu genlerin ifade olma durumlarını, kırmızı renkler de baskılanma durumlarını gösterir.



Şekil 4.8. MapMan programı kullanılarak elde edilen amonyum-spesifik gen setinden (8 saat) sağlanan ekspresyon verilerinin metabolik harita üzerindeki kroki görüntüsü. Ölçek üzerindeki değerler log₂ dönüştürülmüş verilerdir. Mavi renkler sorumlu genlerin ifade olma durumlarını, kırmızı renkler de baskılanma durumlarını gösterir

WRKY transkripsiyon faktörlerinin yanı sıra amonyum ve nitrata çok önemli düzeyde farklı cevaplar sergileyen başka bir büyük gen familyası tanımlandı. Şekil 4.9 da gösterildiği gibi “nodulin gen familyası” inorganik azot kaynağına karşı farklı ve karmaşık düzenleme örnekleri sergiledi. Bazı genlerin ifadesi sadece nitrat veya amonyuma cevapta hızlı bir şekilde artarken diğer bazılarının ifadesi yine sadece bir azot kaynağına cevapta baskılanırken diğer azot kaynağına cevapta artmıştır. Amonyum tarafından indüklenen üç nodulin (At4g28040, At1g21890, At2g39510) ve nitrat tarafından indüklenen iki nodulinden birinin (At1g43650) membran taşıyıcı proteinleri olarak işlev gördükleri önceki bir çalışmada da gösterilmiştir (Ren *et al.* 2007).



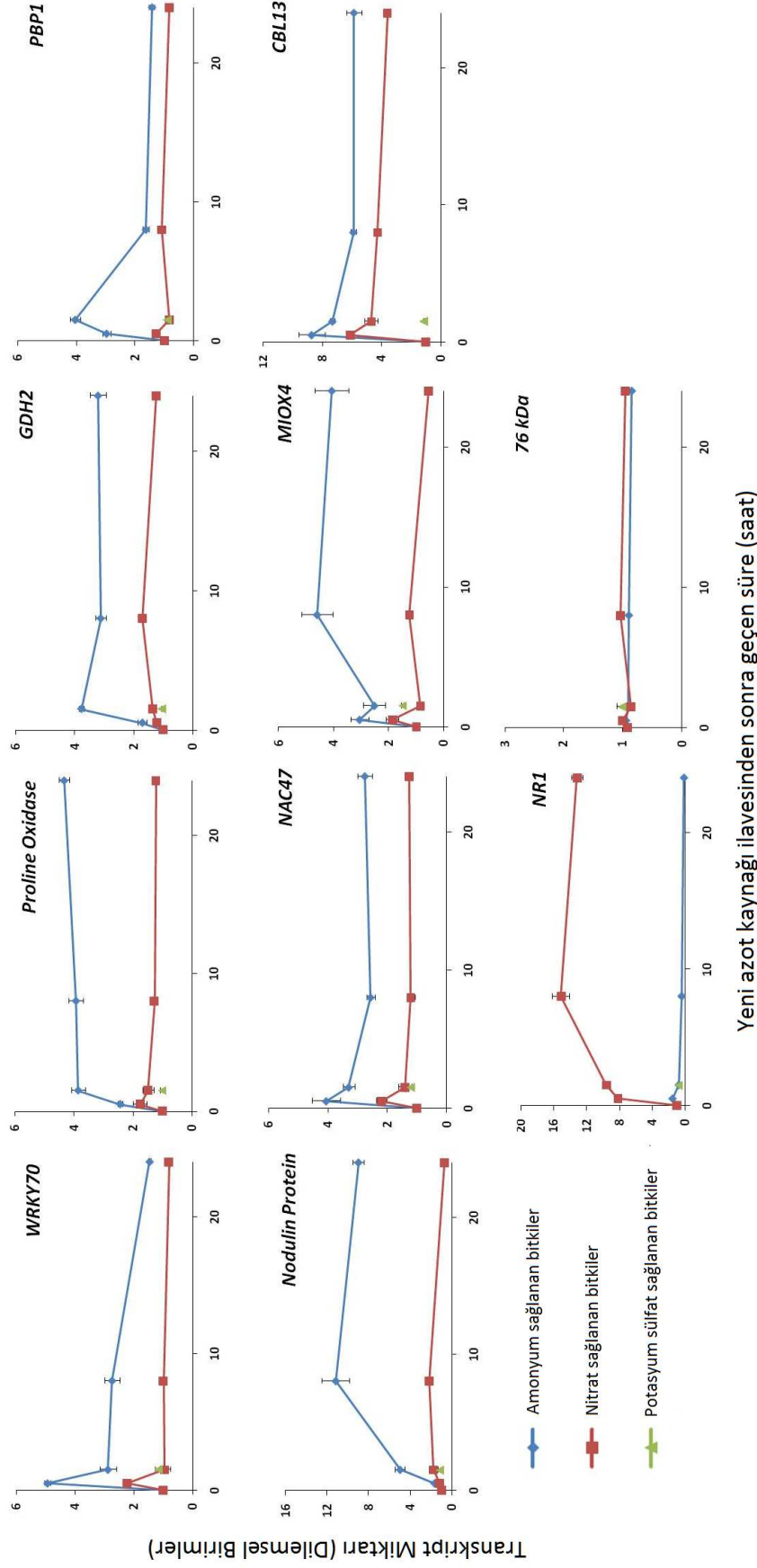
Şekil 4.9. Nitrat ve amonyuma cevapta nodulin genlerinin ifadelerindeki farklılıklar.

*Her çubuk mikrodizi analizi ile özellikleri belirlenen genlerin ortalama nisbi transkript miktarlarını temsil eder ($\pm$ Standart Sapma). 0, 1.5 ve 8 saatlik ölçümler için n=3, ve 0.5 saatlik ölçümler için n=2. 0. saatte gözlenen transkript miktarı 1 olarak alınmış ve buna göre elde edilen nispi verilerle bu şekil tasarlanmıştır. Bu yüzden bu şekilde farklı genler arasındaki transkript miktarlarının karşılaştırılması sağlıklı olmayabilir. N= nitrat, A= amonyum

Mikrodizi analizi ile tanımlanan ve farklı şekilde ifade olma örnekleri sergileyen bir grup genin ifade düzeylerindeki değişim bağımsız olarak real time PCR analizleri ile doğrulandı. Bu bağlamda; yalnızca amonyum ile aktivasyon gösteren yedi gen: Glutamat dehidrogenaz 2 (GDH2; At5g07440), PINOID-bağlayıcı protein 1 (PBP1;

At5g54490), WRKY70 transkripsiyon faktörü (At3g56400), bir nodulin-familyası proteini (At2g39510), mio-inositol oksijenaz 4 (MIOX4; At4g26260), bir prolin oksidaz (At5g38710), ve NAC-içeren transkripsiyon faktörü 47 (NAC47 At3g04070), bununla birlikte sadece nitrata cevapta güçlü bir şekilde aktivasyon gösteren bir gen (nitrat redüktaz 1 [NR; At1g77760], hem nitrat ve hemde amonyum tarafından ifade olan (CBL ile etkileşen protein kinaz 13 [CBL13; At2g34180]), ve birde nitrat veya amonyuma karşı aktivasyon veya baskılanma gibi herhangi bir cevap sergilemeyen sabit kontrol (Mitokondriyal ETS'de Kompleks I' in 76 kDa alt ünitesi [At5g37510]) genlerinin real time PCR analizleri gerçekleştirildi. Şekil 4.10 da gösterildiği gibi real time PCR verileri mikroyarray verileri ile önemli düzeyde uyumluluk göstermektedir. Bu da mikrodizi analizleriyle elde edilen verilerin doğruluğunu onaylamaktadır.

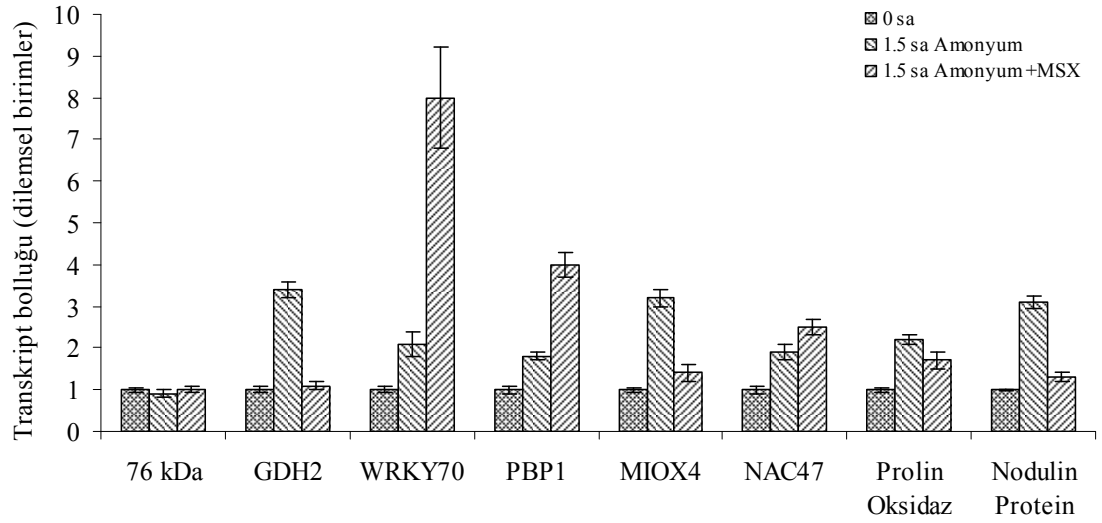
Tüm deneylerde nitrat bitkilere KNO_3 , amonyum ise $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ formunda sağlandı. Bitki büyüme ortamında K^+ ve SO_4^- zaten var olduğu için teorik olarak bu iyonların konsantrasyonlarındaki artış bu çalışmada gözlenen sonuçları doğrulabilir. Bu muhtemel etkinin varlığını test etmek için bitkiler KNO_3 veya $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ yanında üçüncü bir uygulamalı grup olarak 0.5 mM K_2SO_4 sağlanmış ortama alındıktan 1.5 saat sonra yukarıda sayılmış 10 genin ekspresyon düzeyleri real time PCR ile belirlenmiştir. Şekil 4.10 da gösterildiği gibi K_2SO_4 sağlanmış bitki köklerinde bu genlerin hiçbirisi önemli ekspresyon örnekleri sergilememiştir. Bu durum, gözlenen tüm etkilerin nitrat ve/veya amonyum tarafından teşvik edildiğini doğrulamaktadır.



Şekil 4.10. Nitrat ve amonyum tarafından farklı şekilde regüle edilen genlerin real time PCR analiz sonuçları. 26 saat azot açlığına bırakılan bitki büyüme ortamlarına 1 mM amonyum ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ formunda), nitrat (KNO_3 formunda), veya potasyum sülfat (KH_2SO_4) ilave edildi ve 0, 0.5, 1.5 ve 8 saat sonra hasat edildi.

*Şekilde sunulan veriler en az elde edilen üç bağımsız deneysel verinin ortalamasıdır. Her veri için kendi içindeki farklılaşmalar $\pm$ Standard Hata şeklinde sunulmuştur. 0. saatteki transkript miktarı 1 olarak alınıp karşılaştırmalar bu değere göre yapılmıştır. Potasyum sülfat uygulaması yapılmış bitkilerde yalnızca 1.5 saatlik uygulama analiz edilmiştir.

Nitrat iyonunun *Arabidopsis* ve diğer bitkilerde gen ekspresyon örneklerini değiştirebilen önemli bir molekül olduğu gösterilmiştir (Wang *et al.* 2004). Böylece azotla düzenlenen genlerin yalnızca nitrata cevapta yüksek düzeyde spesifik cevap vermeleri şaşırtıcı değildir (Şekil 4.4). Amonyum ve nitrat asimilasyonu birbiriyle örtüştüğü için bir kez nitrat plastidte amonyuma asimile olunca amonyumla beslenmeyle amonyum spesifik azot cevabının ürettiği evrensel bir sinyali nasıl verdiği hakkında bilinen azdır. Nitratin olmadığı durumlarda amonyum asimilasyonu ile elde edilen metabolitlerin (glutamin, glutamat gibi) gen ekspresyonunda değişimleri tetikleyebilir. Bu hipotezi test etmek için glutamin sentetaz (GS) enziminin inhibitörü olan methionine sulfoximine (MSX) in amonyum-spesifik genlerin düzenlenmesi üzerine etkilerini araştırdık. MSX amonyum asimilasyonunu engeller, ancak *Arabidopsis* köklerinde amonyum alımı ve birikimini engellemez (Rawat *et al.* 1999). MSX'in real time PCR analizi yapılan amonyum tarafından spesifik olarak düzenlenen yedi genden üçünün (GDH2, MIOX4, nodulin At2g39510) ifade düzeyinin önemli ölçüde baskılandığı ve diğer üç genin de ya etkilenmediği (NAC47) veya ifadesinin arttığı (WRKY70, PBP1) gözlemlendi (Şekil 4.11). Burada elde edilen bulgulardan belki de en ilginç olanı glutamat dehidrogenaz (GDH) enzimini kodlayan genin neden amonyum spesifik aktivasyon örneği sergilediği, ve GS enziminin inhibitörü olan MSX'in, ayrıca GDH enzimini kodlayan genin (GDH2) ifadesini de engellemesidir. Bu iki bulgunun sebebinin detaylı araştırılması azot asimilasyon mekanizmasında önemli verilerin elde edilmesinde öncü olacaktır ancak bu doktora tezinin temel amacını oluşturmamaktadır. Böylece amonyum asimilasyonu ile elde edilen metabolitlerin amonyum tarafından spesifik olarak düzenlenen bazı genlerin aktivasyonunda kritik sinyal molekülleri olduğu söylenebilir.

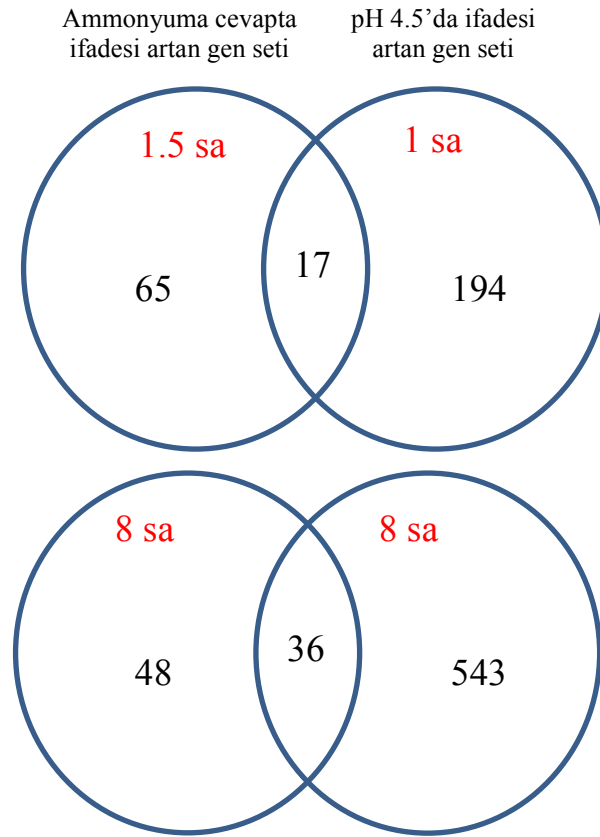


Şekil 4.11. Glutamin sentetaz'ın inhibitörü olan MSX'in amonyumla aktive olan genlerin ekspresyonları üzerine etkileri.

*Azot açlığına bırakılmış bitkilerin büyüme ortamlarına 1 mM konsantrasyonda amonyum veya amonyumla birlikte 1 mM konsantrasyonda MSX ilave edilmiş ve 1.5 saat sonra amonyumla aktive olan genlerin aktivasyon düzeylerine bakılmıştır. En az üç deneysel ve biyolojik tekrardan elde edilmiş veriler arasındaki farklılıklar $\pm$ SH şeklinde gösterilmiştir. Her bir gen için 0. saatte görülen transkript bolluğu 1 olarak alınmış ve uygulamalara cevapta ekspresyon düzeylerindeki değişim 0. saate göre “-katı” şeklinde ifade edilmiştir. Her bir gen için transkript bolluğunda gözlenen değişiklikler kendi içinde değerlendirilmelidir.

Amonyum alımıyla birlikte plazma membran proton ATPaz ları tarafından protonların ekstrasellular alana pompalanması ile ekstrasellular alanın asidifikasyonu gerçekleşir (Bloom et al. 2003). Böylece amonyum-spesifik sinyallerin amonyum alımıyla ilgili ekstrasellular pH da meydana gelen değişikliklere sebep olabileceği de mümkündür. Bu yüzden biz elde ettiğimiz amonyum-spesifik gen setlerini Lager *et al.* (2010) tarafından tanımlanan asit-responsif *Arabidopsis* kök transkriptomu ile karşılaştırdık. Amonyum alımından 1.5 saat sonra amonyuma spesifik olarak ekspresyonu artan gen setinin, Lager *et al.* (2010) tarafından tanımlanan ve asidik büyüme ortamına transferden 1 saat sonra ekspresyonu artan gen setinin önemli düzeyde örtüştüğü ($P < 6.4 \times 10^{-80}$), amonyumla aktive olan genlerin %21'inin asidik pH ile de aktive oldukları belirlendi. 8 saat gen setlerinin karşılaştırılması (amonyum ve asidik ortam) daha dramatik sonuçlar gösterdi. Amonyum alımından 8 saat sonra amonyuma spesifik olarak ekspresyonu artan gen setinin, Lager *et al.* (2010) tarafından tanımlanan ve asidik büyüme ortamına transferden 8 saat sonra ekspresyonu artan gen setinin önemli düzeyde örtüştüğü

($P < 1.7 \times 10^{-130}$), amonyumla aktive olan genlerin %43'ünün asidik pH ile de aktive oldukları belirlendi (Şekil 4.12). Düşük pH ve amonyuma cevapta birbiriyle örtüşen gen setlerinin BioMaps analizi ile bitki savunma/bağışıklık cevabında rol oynayan genlerin önemli bir düzeyde ifade oldukları (1.5 saat gen seti için $P = 4.3 \times 10^{-4}$ ve 8 saat gen seti için $P = 4.6 \times 10^{-6}$) belirlendi. Özellikle amonyuma spesifik cevap veren üç gen NAC47, WRKY70, ve PBP1 asitli ortamda da aynı ekspresyon düzeyleri sergilediler. Böylece, amonyum tarafından ekspresyon düzeyleri değişen çok sayıda genin amonyum alımından kaynaklanan pH değişimleri tarafından düzenlendiği söylenebilir.

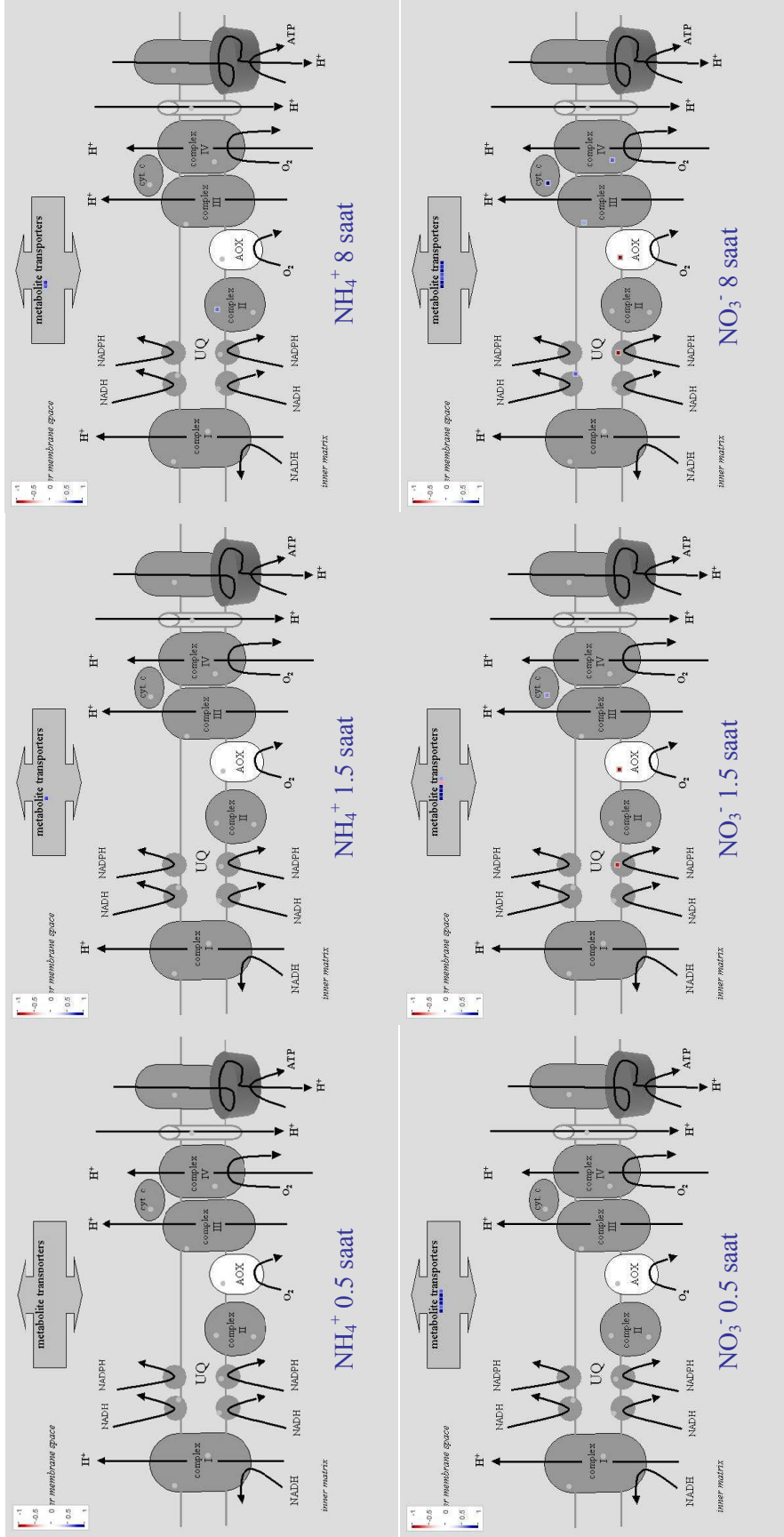


Şekil 4.12. *Arabidopsis* köklerinde amonyum ve asidik ekstrasellular pH tarafından düzenlenen genlerin karşılaştırılması.

*Amonyum-spesifik gen seti 0. saatte hasat edilen örneklerle nazaran ≥ 2 kat-artış gösteren, ancak nitrat uygulamasında ≤ 1.4 kat-değişim gösteren genleri içerir. pH 4.5 ile ifadesi artan genler, pH 6.0 da ifade olunan genlere kıyasla ≥ 2 kat-artış gösteren genleri içerir. Tüm karşılaştırmalar için ayarlanmış P-değeri ≤ 0.05 dir.

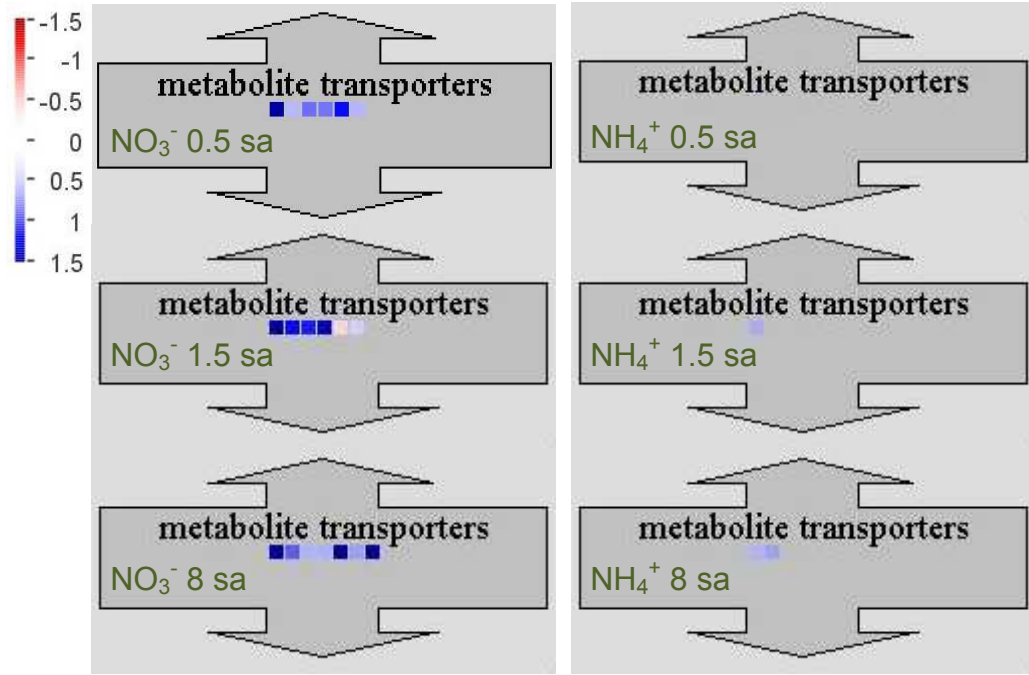
4.2. Azot Kaynaklarına Cevapta Hücrel Redoksun Düzenlenmesi ve Reaktif Oksijen Türleri

Azot açlığından sonra farklı azot kaynaklarına cevapta mikrodizi analizinden elde edilen verilerden metabolit taşıyıcılarını kodlayan genler MapMan programı kullanılarak detaylı analiz edildiğinde nitrata cevapta bu genlerin çok önemli düzeyde ifade oldukları belirlendi (Şekil 4.13, 4.14). Beş mitokondriyal taşıyıcı protein (At5g01340, At5g26200, At5g48970, At5g12860 ve At5g01340) nitrat ilavesini takiben 8 saat içinde en az 2 kat daha fazla ifade olmuşlardır. Bunlardan en çarpıcı olanı; At5g12860 (OMT1) tarafından kodlanan, mitokondri ve kloroplastlarda bulunan ve malat-okzaloasetat mekiğinde rol oynayan muhtemel taşıyıcı proteindir (Catoni et al., 2003; Igamberdiev and Gardeström, 2003). Bununla birlikte yine nitrat sağlanan bitkilerde alternatif oksidaz AOX 1a (At3g22370), ve tip II NAD(P)H dehidrogenaz NDA2 (At2g29990) genlerinin ifadeleri de >2 kat düzeyinde baskılanmışlardır (Şekil 4.13). Bu durum kök hücrelerinde mitokondriyal matrikste üretilen NAD(P)H ların (nitratın nitrite indirgenmesi için) sitoplâzmaya taşındığı ve burada kullandığına işaret etmektedir.



Şekil 4.13. MapMan programı ile mitokondriyal taşıyıcı proteinlerin ve elektron transport sistemi componentlerinin regülasyon analizi. Ölçek üzerindeki değerler log2 dönüştürülmüş verilerdir.

*Mavi renkler sorumlu genlerin ifade olma oranlarındaki artışı, kırmızı renk de baskılanma durumlarını gösterir.



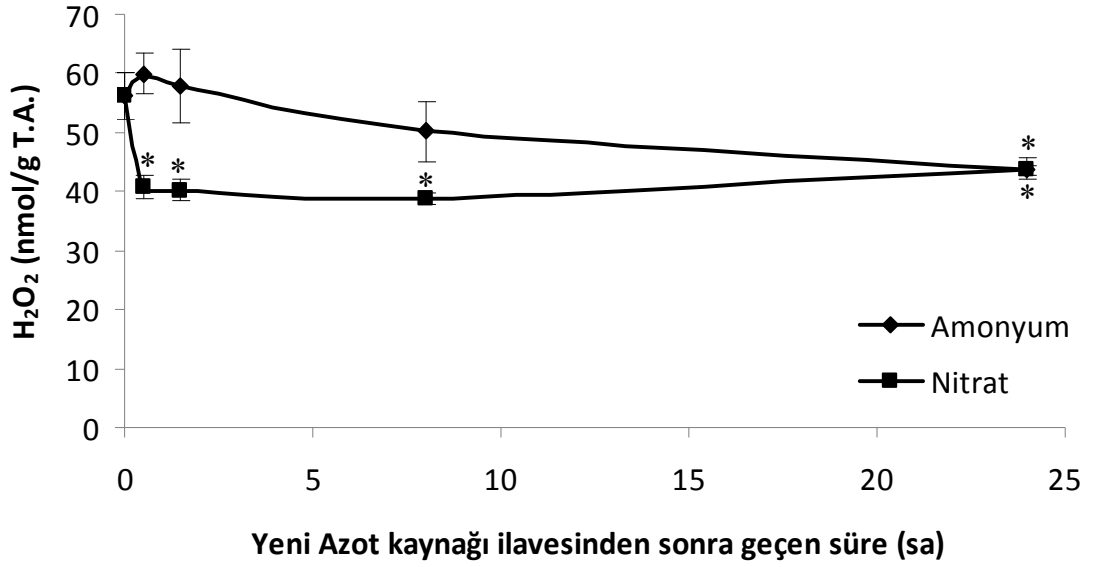
Şekil 4.14. MapMan programı ile mitokondriyal taşıyıcı proteinlerin regülasyon analizi.

*Ölçek üzerindeki değerler log2 dönüştürülmüş verilerdir. Mavi renk tonları sorumlu genlerin ifade olma oranlarındaki artışı, kırmızı renk tonları da baskılanma durumlarını gösterir.

Nitrat indirgenmesi bitki kök hücrelerinde en büyük indirgeyici havuzlarından birisi olarak kabul edilmektedir. Bu doktora tezi kapsamında yapılan diğer çalışmalarda azot kaynağı olarak amonyum içeren besin çözeltisinde kültüre alınan Tobacco BY-2 hücrelerinin nitrat kontrollerine kıyasla hücresel solunum oranı ve alternatif oksidaz aktivitesinde ve alternatif oksidaz proteininin miktarında artışlar olduğu belirlendi. Bu bulgular, çalışmaların bu bölümünde elde edilen verilerle birleştirildiğinde, mitokondri matriksinde üretilen indirgeyicilerin (NAD[P]H) büyük oranda azot kaynağı olarak nitrat sağlandığında nitrat asimilasyonu için kullanıldığı, ancak amonyum sağlandığında bu indirgeyicilerin solunum zincirinde okside oldukları hipotezi ileri sürülebilir. Bu durumun daha iyi anlaşılabilmesi için bir seri fizyolojik ölçümler gerçekleştirildi.

Yeşil olmayan dokularda, mitokondriyal solunum zinciri genel olarak reaktif oksijen türleri üretiminin temel merkezidir (Moller, 2001). Eğer nitrat-sağlanan bitkiler matriksde bulunan indirgeyicilerin önemli bir kısmını solunum zincirinde okside etmeden sitosole aktarıyor ise nitrat-sağlanan bitkilerin amonyum sağlanan bitkilere

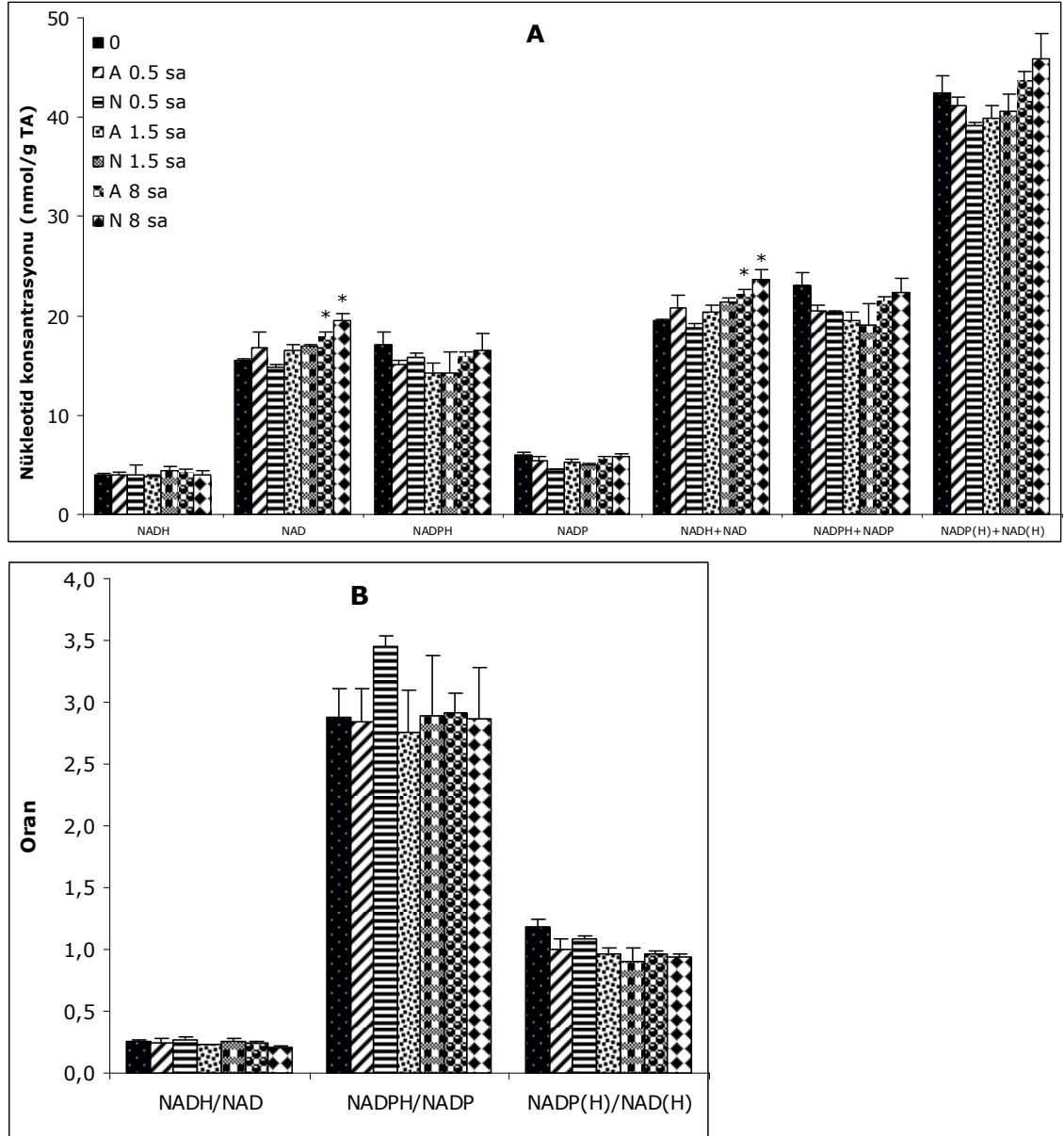
nazaran daha az ROT üretimi sergilemesi beklenir. Bu durumu test etmek için nitrat ve amonyum sağlanmış bitki köklerindeki H_2O_2 düzeyleri belirlendi. Azot açlığının *Arabidopsis* köklerinde ROT düzeylerini artırdığı daha önce gösterilmiştir (Shin *et al.* 2005). Şekil 4.15’de gösterildiği gibi azot kaynağı olarak nitrat sağlanmış bitkilerde H_2O_2 düzeylerinde önemli düşüşler gözlenmiş, ancak amonyum ilave edilen bitkilerde yüksek düzeyde kalmış, ancak 1.5 saatten sonra azalmaya başlamıştır.



Şekil 4.15. *Arabidopsis* köklerinde farklı azot kaynaklarına cevapta zamana bağlı olarak H_2O_2 düzeyinde meydana gelen değişiklikler.

*İki farklı zamanda elde edilen veriler birleştirilmiştir (n=6). Her veri için kendi içindeki farklılaşmalar $\pm$ Standard Hata şeklinde sunulmuştur. * ile işaretlenmiş değerler $P<0.05$ düzeyinde kontrol grubuna (0. saat) göre önemli farklılıkları gösterir.

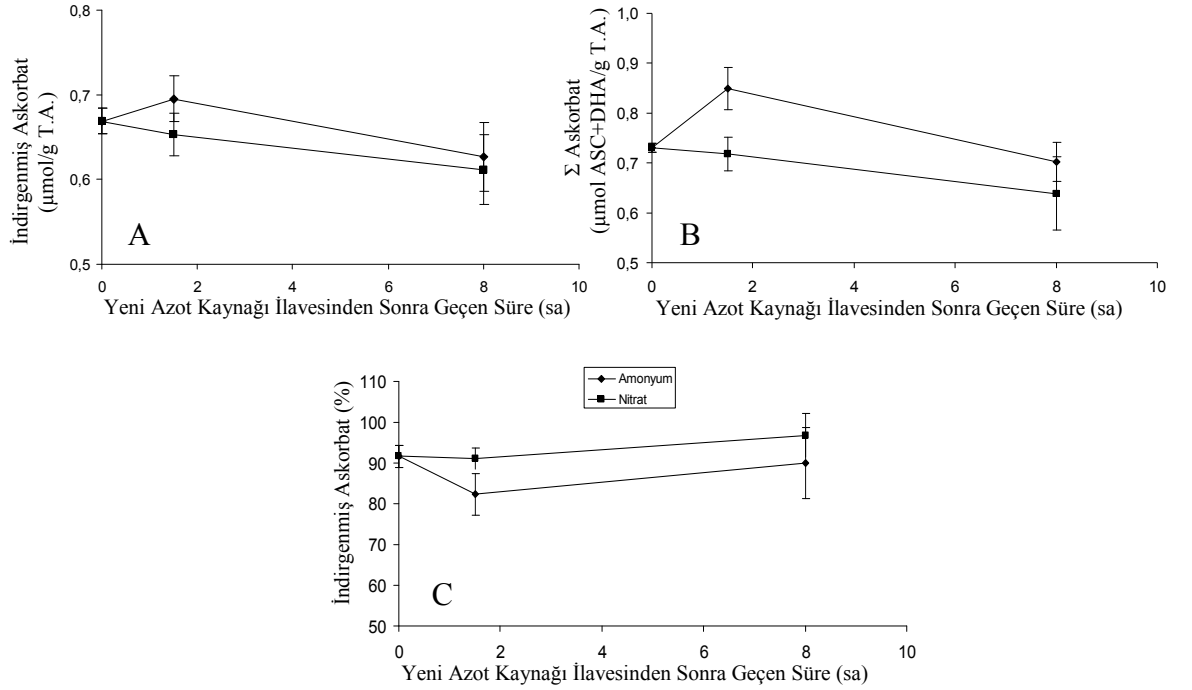
Azot kaynağı olarak amonyum ve nitrat sağlanan bitki köklerinde indirgeyici mekiğinde ve ROT üretimindeki farklılıkları belirledikten sonra köklerdeki dört büyük redoks metabolit havuzlarının: NADH, NADPH, glutatyon ve askorbat oksidasyon durumlarındaki fizyolojik değişimler araştırıldı. Şekil 4.16’da gösterildiği gibi NAD(H) ve NADP(H) miktarlarında ve oksidasyon durumlarında amonyum veya nitrata cevapta önemli bir değişim gözlenmemiştir. Ancak amonyum ve nitrat uygulamasından 8 saat sonra NAD^+ konsantrasyonlarında $P<0.5$ düzeyinde istatistiksel olarak bir artış gözlenirse de NADH konsantrasyonunda herhangi bir değişiklik gözlenmemesi bu değişikliğe bir anlam yüklemeyiz.



Şekil 4.16. *Arabidopsis* köklerinde farklı azot kaynaklarına cevapta hücrel indirgeyici metabolitler NAD(H) ve NADP(H) oksidasyon durumları.

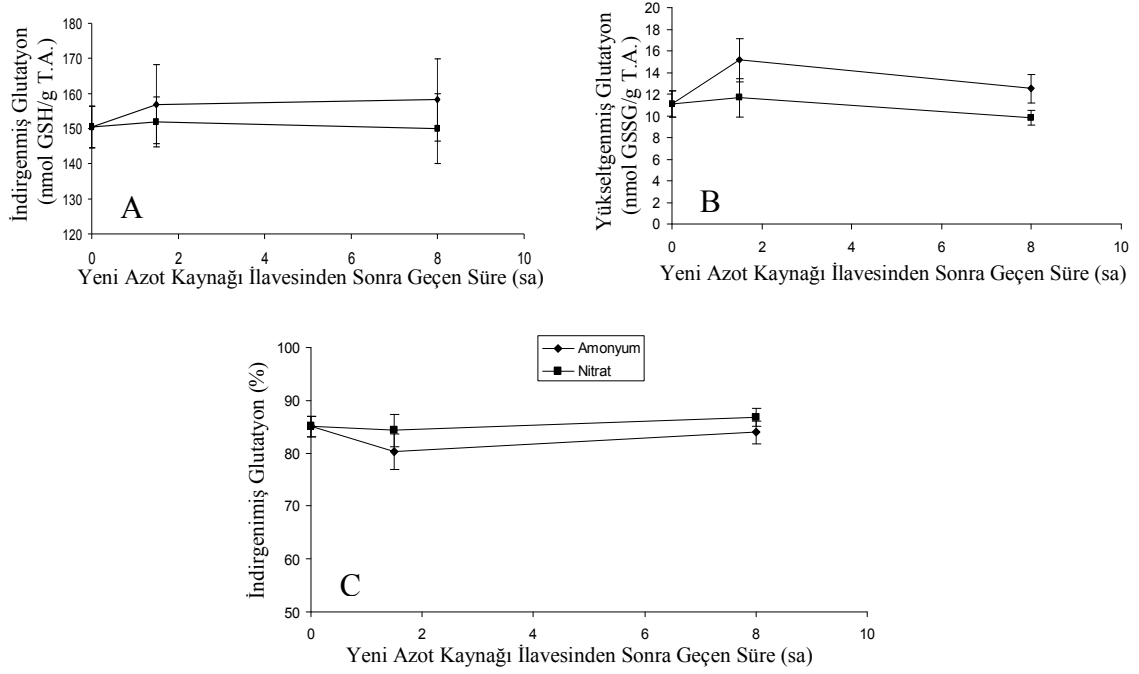
*Panel A, zamana bağlı olarak NAD(H) ve NADP(H) konsantrasyonlarını, panel B ise bu metabolitlerin oranlarını göstermektedir. Her veri için kendi içindeki farklılaşmalar $\pm$ Standard Hata şeklinde sunulmuştur. * ile işaretlenmiş değerler $P < 0.05$ düzeyinde kontrol grubuna (0. saat) göre önemli farklılıkları gösterir.

Azot açlığından sonra farklı azot kaynaklarına cevapta *Arabidopsis* köklerinde askorbat (Şekil 4.17) ve glutatyon (Şekil 4.18) miktarında ve oksidasyon durumlarında önemli değişiklikler gözlenmemiştir. Ancak şekiller incelendiğinde rahatça gözlenebileceği gibi azot kaynağı olarak amonyum sağlanan bitki köklerinde okside olmuş askorbat (dehidroaskorbat) ve okside olmuş glutatyon (GSSG) miktarları istatistiksel olarak önemsiz bulunsa da nitrat grubuna nazaran genel anlamda yüksek olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.17. *Arabidopsis* köklerinde farklı azot kaynaklarına cevapta askorbat oksidasyon durumu ve konsantrasyonları.

*Panel A indirgenmiş askorbat (ASC) konsantrasyonunu, panel B toplam askorbat (ASC+dehidroaskorbat [DHA]) konsantrasyonunu ve panel C indirgenmiş askorbat formunun askorbat havuzunda bulunma yüzdesini göstermektedir. Şekilde sunulan veriler farklı zamanlarda yapılmış üç deneyin ortalaması olarak değerlendirilmiştir. Her veri için kendi içindeki farklılaşmalar $\pm$ Standard Hata şeklinde sunulmuştur.



Şekil 4.18. *Arabidopsis* köklerinde farklı azot kaynaklarına cevapta glutasyon oksidasyon durumu ve konsantrasyonları.

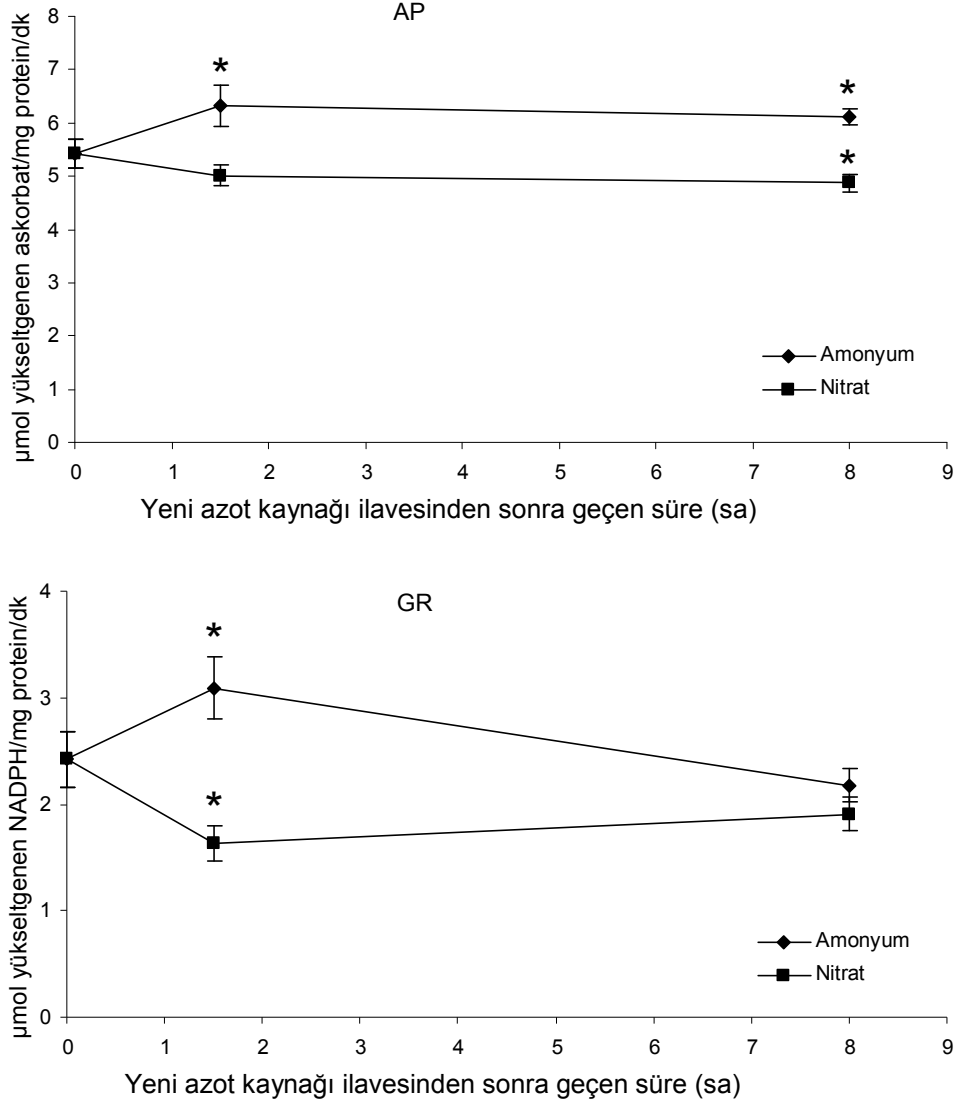
*Panel A indirgenmiş glutasyon (GSH) konsantrasyonunu, panel yükseltgenmiş glutasyon (GSSG) konsantrasyonunu, ve panel C indirgenmiş glutasyon formunun askorbat havuzunda bulunma yüzdesini göstermektedir. Şekilde sunulan veriler farklı zamanlarda yapılmış üç deneyin ortalaması olarak değerlendirilmiştir. Her veri için kendi içindeki farklılaşmalar $\pm$ Standard Hata şeklinde sunulmuştur.

Amonyum ve nitrat sağlanan bitki köklerinde üç önemli redoks metaboliti olan NAD(P)H, askorbat ve glutasyon oksidasyon durumlarında önemli değişikliklerin olmaması net olarak redoks durumunda bir değişiklik olmadığını tek başına gösteremez. Amonyumla beslenme durumunda hücrel ve alternatif solunum hızının arttığı (sonuçlar bu bölümün sonunda verilmiştir) göz önüne alınınca üretilen indirgeyicilerin mitokondriyal ETS de yükseltgendiği, ve solunum hızındaki artışla birlikte ROT üretiminin arttığı düşüncesi durumu daha açık hale getiriyor. Bitkilerin sadece kendi dokularında bulunan azot kaynaklarını tüketecek kadar azot açlığına bıraktıktan ve sonraki azot kaynakları eklenmesi ile birlikte belirlenen zamanlarda ölçümleri yapılan bu üç büyük ve önemli metabolit havuzların nitrat ve amonyum uygulamasında çok önemli değişiklikler göstermemesi mevcut kapasitenin bitkinin maruz kaldığı kısa süreli

ve aşırı olmayan stres durumunu yükseltgenen ve indirgenen molekül miktarlarında kendi içinde değişimle bertaraf edebileceğini gösterebilir. Hücrede üretilen ROT'ların bertaraf edilmesinde her ne kadar da enzimatik yapıda olmayan antioksidanların (askorbat-glutasyon) oksidasyon düzeylerinde görülen farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmasa da ROT detoksifikasyonunda görevli antioksidan enzimlerin aktivitelerinin tayini ile birlikte mevcut sonuçlar daha iyi harmanlanabilir.

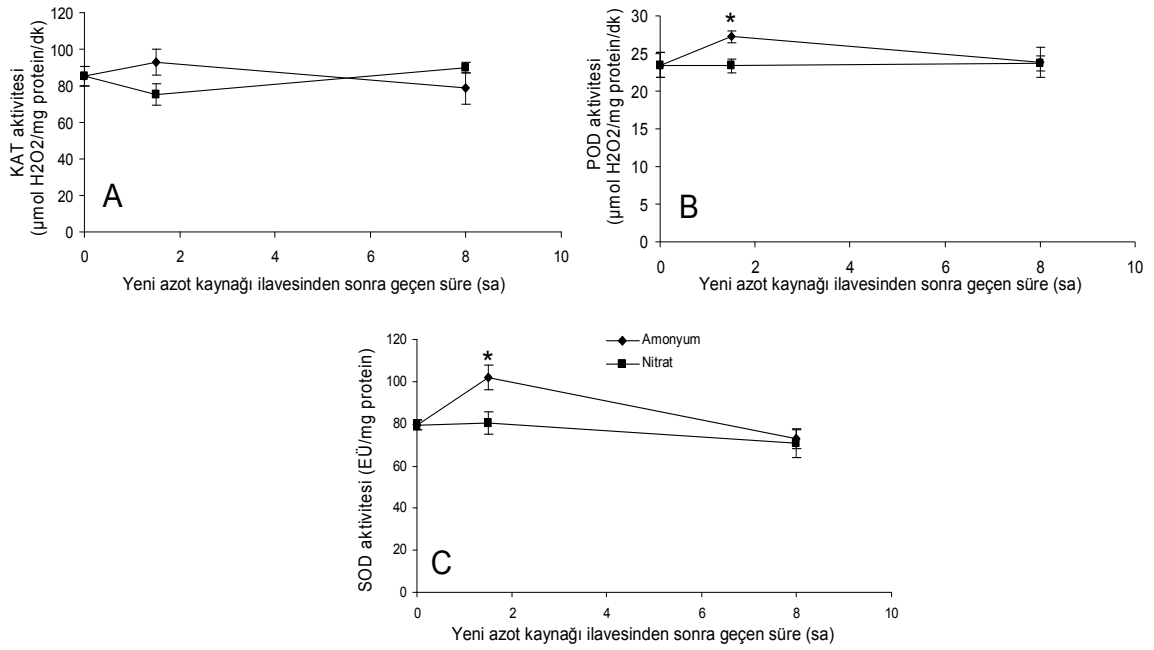
Antioksidan enzimlerden askorbat peroksidaz (AP) ve glutasyon redüktaz (GR) enzim aktivitelerindeki değişimlere (Şekil 4.19) bakıldığında, AP enzim aktivitesinin kontrole (0. saat) nazaran yeni azot kaynağı olarak amonyum uygulanmasından 1.5 ve 8 saat sonra da istatistiksel olarak önemli düzeyde yüksek aktivasyon durumu sergilediği belirlendi. Yine GR enzim aktivitesi 1.5 saat içerisinde istatistiksel olarak önemli artış göstermiş, ancak 8 saat sonra enzim aktivitesinde azalma ve kontrole kıyasla önemli bir değişiklik gözlenmemiştir.

Azot kaynağı olarak nitrat sağlanan bitki köklerinde AP enzim aktivitesinin kontrole (0. saat) kıyasla düştüğü, 8. saatte enzim aktivitesindeki düşüşün istatistiksel olarak önemli düzeyde olduğu belirlendi. Yine GR aktivitesi kontrole kıyasla azalma göstermiş, bu azalma ilk 1.5 saatlik zaman diliminde istatistiksel olarak önemli bulunmuş, ancak 8. saatin sonunda meydana gelen azalma istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır (Şekil 4.19).



Şekil 4.19. *Arabidopsis* köklerinde farklı azot kaynaklarına cevapta Askorbat Peroksidaz (AP) ve Glutatyon redüktaz (GR) aktivitelerinin zamana bağlı değişimi. *Şekilde sunulan veriler farklı zamanlarda yapılmış üç deneyin ortalaması olarak değerlendirilmiştir. Her veri için kendi içindeki farklılaşmalar $\pm$ Standard Hata şeklinde sunulmuştur. * ile işaretlenmiş değerler $P < 0.05$ düzeyinde kontrol grubuna (0. saat) göre önemli farklılıkları gösterir.

Antioksidan enzimlerden KAT, POD ve SOD enzim aktiviteleri; azot kaynağı olarak amonyum sağlanan bitki köklerinde 1.5 saatlik zaman içerisinde artış göstermiş, ancak 8 saatin sonunda genel olarak bu üç enzimin aktivitesindeki düşüşle birlikte meydana gelen değişiklikler kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur (Şekil 4.20). Elde edilen fizyolojik bulgulara bakıldığında genel olarak redoks homeostazisi amonyum ve nitrat sağlanmış bitkilerde etkili bir şekilde sürdürüldüğü sonucuna varılmıştır.

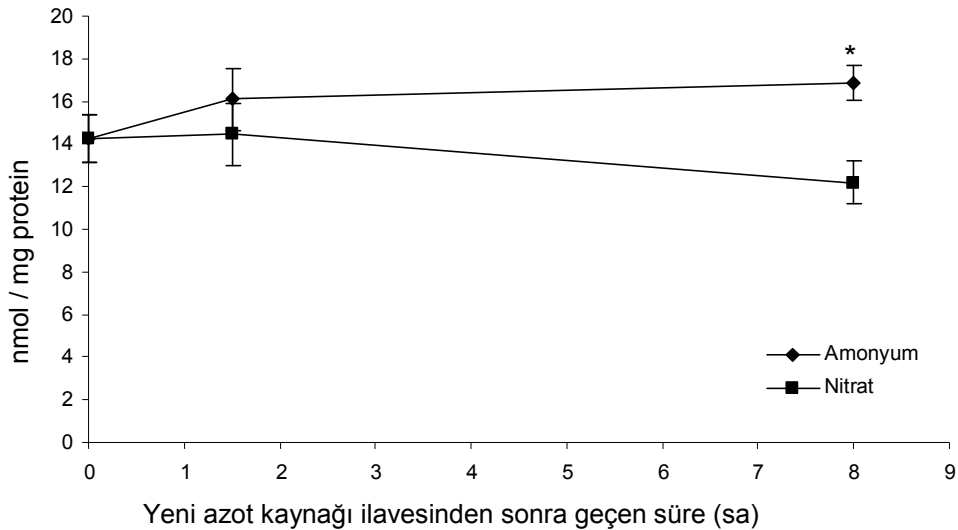


Şekil 4.20. *Arabidopsis* köklerinde farklı azot kaynaklarına cevapta [A] Katalaz (KAT), [B] Süperoksit dismutaz (SOD), ve [C] Guaiakol peroksidaz (POD) aktivitelerinin zamana (saat) bağlı değişimi.

*Şekilde sunulan veriler farklı zamanlarda yapılmış üç deneyin ortalaması olarak değerlendirilmiştir. Her veri için kendi içindeki farklılaşmalar $\pm$ Standard Hata şeklinde sunulmuştur. * ile işaretlenmiş değerler $P < 0.05$ düzeyinde kontrol grubuna (0. saat) göre önemli farklılıkları gösterir.

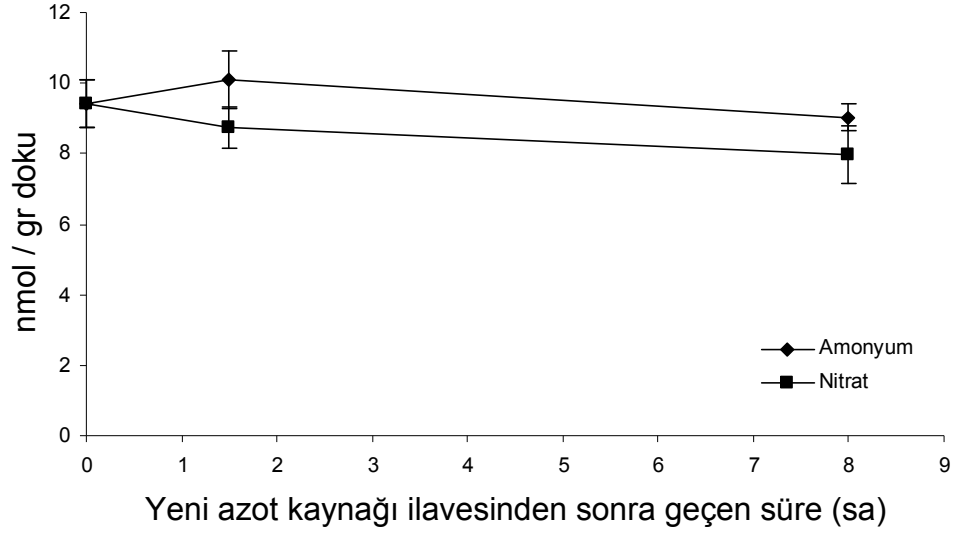
Yeni azot kaynağına cevapta 1,5 saatlik süre içerisinde kontrole nazaran antioksidan enzim aktivitelerinde artış olmuş ve 8 saat içerisinde antioksidan enzim aktivitelerindeki düşüş redoks homeostazisinin sağlandığının kanıtı olarak algılanmalıdır. Her ne kadar da ROT oluşumu ilk 1,5 saatlik süre içerisinde özellikle amonyum uygulanan grupta nitratin tersine artış gerçekleşmesi ile birlikte antioksidan enzim aktivitelerinde artış görülse de antioksidan enzim aktivitelerinde artış olmasına rağmen ROT üretimindeki bu artış proteinlerin oksidasyonu veya lipidlerin peroksidasyonu gibi ileri fizyolojik etkiler sağlayabilir. Bu durumu anlamak *Arabidopsis* köklerinde farklı azot kaynaklarına cevapta protein karbonilizasyonu ve lipid peroksidasyonu düzeylerine de bakıldı.

Protein karbonilasyonunda azot kaynaklarına cevapta amonyum ilavesinden sonra kademeli bir artış gözlemlendi ve bu artış 8 saatin sonunda istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Ortama nitrat ilave edildiğinde karbonil gruplarının miktarı azalmış ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4.21).



Şekil 4.21. *Arabidopsis* köklerinde azot açlığı ve sonrasında farklı azot kaynaklarına verilen cevapta zamana bağlı olarak protein karbonilasyonunun durumundaki değişim. *, $P < 0.05$ düzeyinde önemli değişimleri ifade eder.

Azot açlığına bırakılan *Arabidopsis* köklerinde MDA konsantrasyonunda her ne kadar amonyuma cevapta nitrata nazaran artış belirlense de grupların birbirleri ve kontrolle aralarındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır (Şekil 4.22).



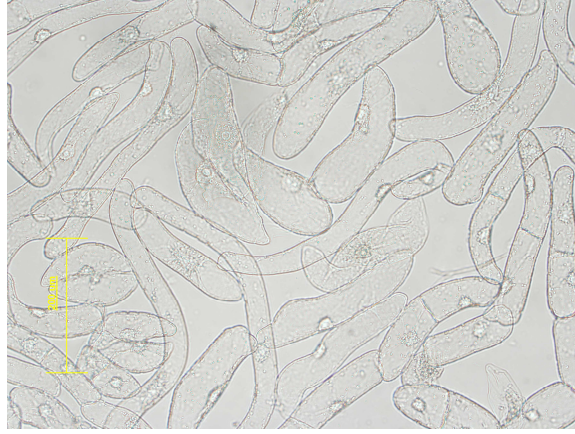
Şekil 4.22. *Arabidopsis* köklerinde azot açlığı ve sonrasında farklı azot kaynaklarına verilen cevapta zamana bağlı olarak malondialdehit bileşiklerinin miktarındaki değişim.

4.3. Azot Kaynaklarına Cevapta Alternatif Oksidazın Redoks Yanıtları

Azot kaynağı olarak nitrat ve amonyum her ikisini de içeren MS besi yeri çözeltisinde normal olarak yetiştirilen stok Tobacco BY-2 hücre çözeltisinden eşit miktarda (yaklaşık 5 ml) hücreler alınarak, azot kaynağı olarak 1 mM konsantrasyonda yalnızca amonyum veya yalnızca nitrat içeren besin çözeltilerinde (50 ml) dört gün boyunca inkübe edilmiştir. 4 gün inkübasyondan sonra, azot kaynağı olarak amonyum bulunan kültürde yetiştirilen hücrelerin miktarı ortalama 170 (± 16) mg/ml iken azot kaynağı olarak nitrat içeren besin çözeltisinde yetiştirilen hücrelerin miktarları ortalama 230 (± 12) mg/ml idi.

Azot kaynağı olarak amonyum veya nitrat içeren besi yerinde kültüre alınan hücrelerin formasyonlarında bir değişiklik olup olmadığını gözlemlemek amacıyla bu hücre kültürlerinden alınan hücreler mikroskop altında incelendi. Hücre formasyonları birbirleriyle karşılaştırıldığında önemli anatomik değişiklikler olduğu gözlemlendi. Örneğin MS ortamında kültüre alınan hücreler azot kaynağı olarak amonyum ve nitrat içeren gruplara kıyasla genel manada daha büyük (yaklaşık olarak 150-400 μm), boyuna büyüme gösteren ve daha geniş hücreler iken, amonyum içeren ortamda kültüre alınan hücrelerin daha çok eni boyuna yakın (yaklaşık olarak 100-150 μm), ve nitrat içeren ortamda kültüre alınan hücrelerin genel anlamda boyuna büyüme göstermiş (150-250 μm) hücreler şeklinde farklılaştığı gözlemlendi. Genel mikroskopik inceleme ile dikkate çarpan önemli bir farklılık da MS ortamında kültüre alınan hücrelerin çoğunlukla bağımsız, ancak amonyum ve özellikle nitrat içeren ortamlarda kültüre alınan hücrelerin birbirleriyle bağlantılı bir görünüm sergilemeleri durumu idi. MS ortamı (ticari olarak sağlanan bu besi yerinin tam içeriği patentli olduğu için mineral oranları hakkında, bizim bilgimize göre, ulaşılacak veriler eksik olacaktır) ile bizim azot uygulamaları için kullandığımız ve Somerville ve Ogren (1982) tarafından önerilen besi yerinin mineral içerikleri genel manada birbirlerinden farklılık göstermektedir. Dolayısıyla MS ortamında hücrelerin gösterdiği formasyonel değişikliklerin diğerleri ile karşılaştırılması çok sağlıklı olmasa da nitrat ve amonyumun hücresel formasyon üzerine etkileri, birbirleriyle kıyaslandığında, göze çarpmaktadır.

Farklı azot kaynaklarının hücre formasyonu (ve dolayısıyla buna sebep olan fizyolojik, biyokimyasal ve genetik faktörler) üzerine etkileri bu tezin kapsamı dışındadır. Milyarlarca hücrenin bulunduğu bir hücre kültüründen alınmış mikroskopik örneklemelerle genelleme yapılması elbette doğru değildir. Ancak farklı zamanlarda kültüre alınmış hücrelerin mikroskopik incelemesi ile genel kanıya vardığımız ve aşağıda gösterilen (Şekil 4.23) bu model görüntüler, *Arabidopsis* köklerinin farklı azot kaynaklarına cevapta elde edilen mikrodizi analiz sonuçlarıyla ilgili olarak, amonyumun hücre duvarının modifiye edilmesinde rol oynayan çok sayıda enzimi kodlayan genlerin ifadelerinin baskılanması (Şekil 4.6 ve 4.8) bulgularını destekler niteliktedir.



MS ortamında kültüre alınan hücrelerin genel mikroskopik görüntüsü.



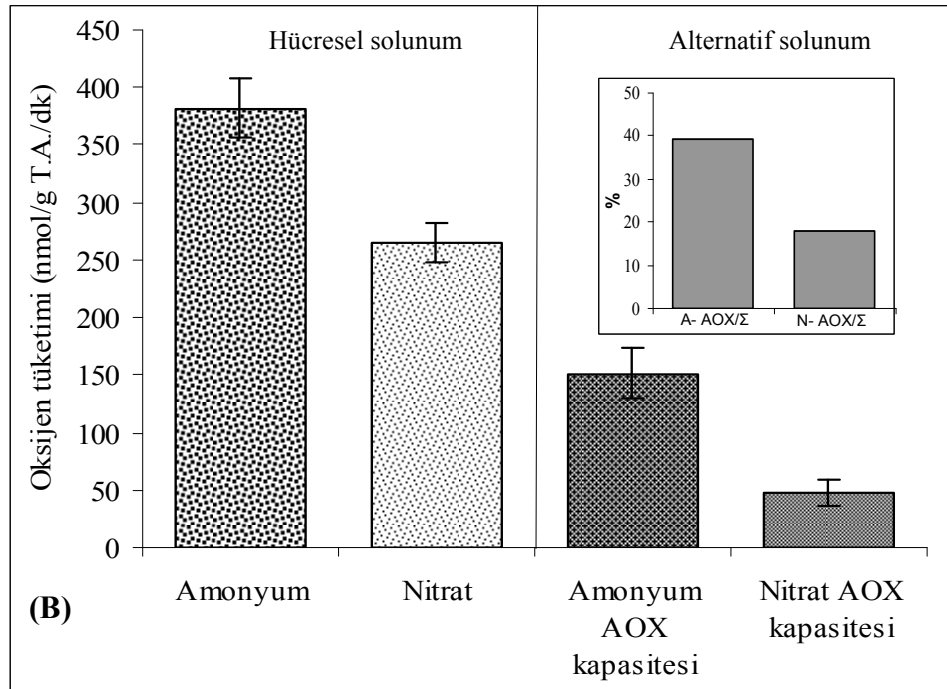
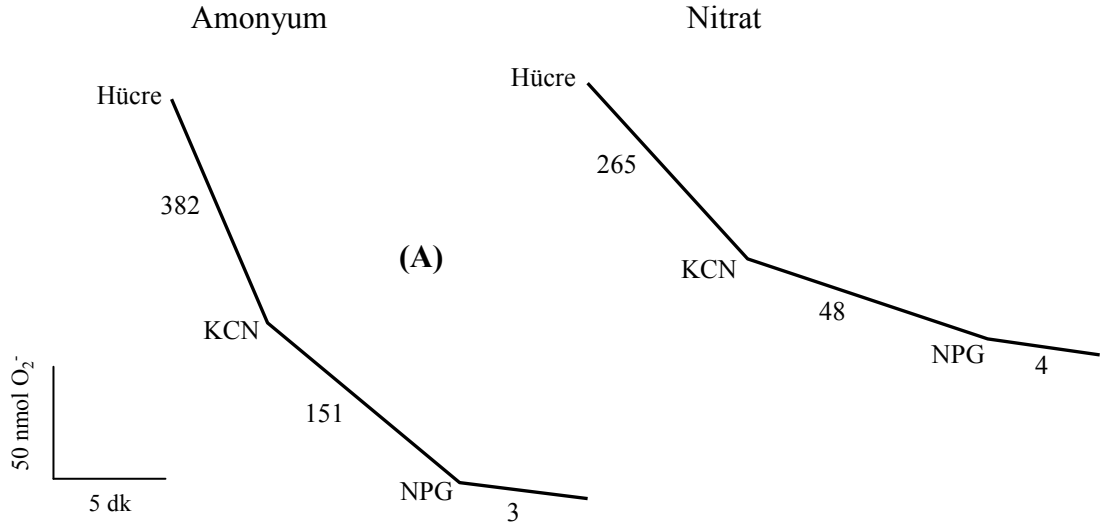
NH₄ ortamında kültüre alınan hücrelerin genel mikroskopik görüntüsü.



NO₃ ortamında kültüre alınan hücrelerin genel mikroskopik görüntüsü.

Şekil 4.23. MS ortamında ve azot kaynağı olarak nitrat veya amonyum içeren Somerville ve Ogren besi yerinde 4 gün inkübasyondan sonra *Nicotiana tabacum* cv. BY-2 hücrelerin genel görüntüleri.

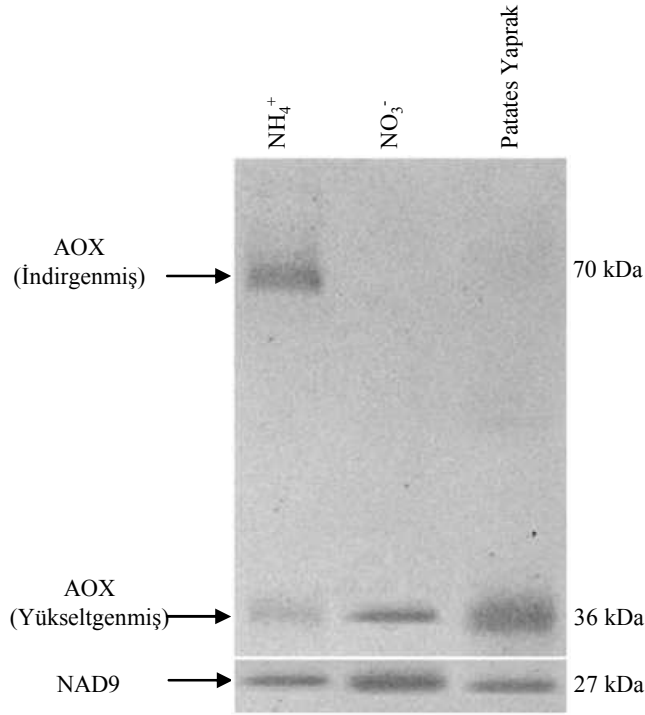
Azot kaynağı olarak amonyum veya nitrat içeren besi yeri çözeltilerinde kültüre alınmış olan Tobacco BY-2 hücrelerinin 4 günlük bir inkübasyondan sonra hücresel ve alternatif yolla O_2 tüketim hızları ölçüldü. Çok sayıda tekrarlı ölçümler ve farklı biyolojik replikatlar kullanarak elde edilmiş verilere göre azot kaynağı olarak amonyum uygulanmış olan hücrelerin hücresel solunum hızlarının (Şekil 4.24.a) nitrat kontrollerine kıyasla çok önemli düzeyde yüksek olduğu belirlendi. Buna ilaveten hücrelerin bulunduğu oksijen elektrotuna KCN ilave edildiğinde yine alternatif yollarla oksijen tüketim hızının nitrat kontrollerine göre oldukça yüksek düzeyde olduğu belirlendi (Şekil 4.24.b). Şekil 4.24.b’de karşılaştırmalı sonuçlarla elde edilen verilere göre alternatif yolla oksijen tüketiminin amonyumla beslenmede toplam hücresel solunumla tüketilenin yaklaşık olarak %39’u iken nitratla beslenmede alternatif yolla oksijen tüketiminin toplam hücresel solunumla tüketilenin yaklaşık %17’si olduğu belirlendi (Şekil 4.24.b alternatif solunum paneli). Amonyum içeren besi yerinde kültüre alınan hücrelerin sayısının az olması temelde artan solunum hızı ve bununla birlikte alternatif oksidazın aktivasyonu ile alakalı olabilir.



Şekil 4.24. Amonyuma cevapta *Nicotiana tabacum* cv. BY-2 hücrelerinin hücresel ve alternatif solunum yollarında meydana gelen değişimler.

* (A) Tobacco BY-2 hücrelerinin solunum hızında meydana gelen değişiklikler. Solunum hızlarında meydana gelen değişiklikler gr hücre başına dakikada tüketilen nmol O₂ şeklinde sunulmuştur. Alternatif yolla oksijen tüketim hızını belirlemek için hücrelerin bulunduğu oksijen elektrotuna solunum inhibitörlerinden önce sitokrom oksidazın inhibitörü olan [1mM] potasyum siyanid (KCN) ve daha sonra alternatif oksidazın inhibitörü olan [0.1 mM] *n*-propyl gallate (NPG) ilave edilmiştir. (B) hücrelerin total solunum ve alternatif solunum kapasiteleri. Alternatif yolla oksijen tüketiminin toplam hücresel oksijen tüketimine oranı da ayrıca mini grafikte verilmiştir.

Amonyum ve nitrata verilen cevapta hücresel ve alternatif yolla oksijen tüketim hızlarındaki farklılıklar belirlendikten sonra, artan alternatif respirasyon hızının alternatif oksidaz (AOX) proteininin miktarındaki bir artışla paralel olup olmadığını belirlemek amacıyla alternatif oksidaz proteininin immüno blot analizi yapıldı. Elde edilen blotlama görüntülerine bakıldığında, azot kaynağı olarak amonyum içeren besi yerinde kültüre alınmış olan hücrelerin özellikle indirgenmiş AOX (aktif formu), ve görünen o ki toplam AOX miktarlarında artış olduğu belirlendi (Şekil 4.25).



Şekil 4.25. *Nicotiana tabacum* cv. BY-2 hücrelerinde Alternatif oksidaz proteininin western analizi.

* 4 gün boyunca inkübe edilmiş hücrelerden saflaştırılan 20ug hücresel protein önce jelde yürütülmüş, nitrosellüloz membrana aktarılmış ve son olarak ta röntgen film kağıdında görüntülenmiştir. Kontrol olarak 20ug patates yaprak mitokondriyal protein kullanılmıştır. Yine kontrol olarak mitokondriyal ETS de rol oynayan Kompleks 1 in alt ünitesi olan NADH dehidrogenaz-9 proteinide blotlandı.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada temel hedef bitkiler tarafından kullanılan en yaygın iki azot formu olan nitrat ve amonyumun fizyolojik ve moleküler etkilerini ayırt etmektir. Bu amaçla bitki moleküler biyoloji ve fizyolojisi çalışmalarında model organizma olarak kullanılmakta olan *Arabidopsis thaliana* ve *Nicotiana tabacum* cv. Bright-Yellow 2 türleri tercih edilmiştir.

Azot kaynaklarındaki değişime cevapta *Arabidopsis thaliana* köklerinde bu bitkiye ait genom DNA baz dizilerini içeren genlerin ekspresyon zamanları, miktarları ve profillerini belirlemek için mikrodizi analizleri yapılmış, elde edilen veriler farklı analiz programları kullanılarak değerlendirilmiş, ve farklı azot kaynaklarına önemli derecede farklı ekspresyon örnekleri sergileyen birkaç genin real time PCR analizleri yapılarak mikrodizi verilerinin güvenilirliği test edilmiştir. Elde edilen moleküler veriler ışığında bitki köklerinde meydana gelecek muhtemel redoks değişimlerini belirlemek amacıyla bazı metabolitlerin tayini ve muhtemel redoks dengesizliğinden kaynaklanacak reaktif oksijen türlerinin aşırı salınımından doğacak oksidatif stres ve muhtemel sonuçlarını gösteren bazı biyokimyasal testler gerçekleştirilmiştir.

Farklı azot kaynaklarına cevapta bir bitkide hormon salınımından iyon dengesine ve birçok metabolik yol dâhil organlar arasında interaksiyon olduğu göz önünde bulundurulunca, organ veya doku etkilerinden bağımsız olarak tek bir hücrenin hücresel ve alternatif solunum yollarında amonyum veya nitrat ile meydana gelecek değişimleri belirlemek amacıyla *Nicotiana tabacum* cv. Bright-Yellow 2 kùltivarından elde edilen hücre kùltürleri kullanılmıştır. Mitokondriyal sitokrom yolu ve alternatif yollarla oksijen tüketiminde meydana gelen değişimler araştırılmış ve bu iki farklı deneysel düzenekten elde edilen verilerin birbirlerini destekleyici nitelikte oldukları belirlenmiştir. Aşağıda bu araştırmalardan elde edilen sonuçların yorumlanması ve diğer araştırmacıların sonuçları ile karşılaştırılmalı değerlendirmeleri yapılmıştır.

Farklı inorganik azot formlarına verilen bitkisel cevabın diseksiyonu

Mikrodizi analizleri ile elde edilen bulgulardan *Arabidopsis* köklerinde nitrat ve amonyumla beslenmenin çok sayıda benzer cevabı doğurduğu ortaya çıkmaktadır. Örneğin nitrat ile aktive olan trehaloz biyosentezi, glikoliz ve sukroz parçalanması gibi çok sayıda metabolik prosesin amonyum ile de aktive olduğu önceki çalışmalarla da gösterilmiştir (Wang *et al.* 2003; Scheible *et al.* 2004). Böylece bu proseslerin başlı başına nitratla değil, azotla aktive oldukları sonucu ortaya çıkar. Ancak bu çalışmada çok sayıda gen ve biyokimyasal yollarında yalnızca nitrat veya amonyumla düzenlendiği de gösterilmiştir. Uzun dönemli amonyum veya nitratla beslenmenin bitki büyümesi üzerine etkileri ile ilgili yapılmış çok sayıda çalışma vardır. Bu çalışmalarla sonuçlarımızı kıyaslamak bilgi verici olacaktır.

Zhu *et al.* (2006) pirinç bitkilerine azot kaynağı olarak 3 mM nitrat veya 3 mM amonyum verip 24, 48, ve 72 saat sonra yaprak transkriptomlarını çalışmak amacıyla cDNA mikrodizi analizi yaptılar. Amonyum ve/veya nitrat ilavesi üzerine kontrole kıyasla (T_0) 198 genin >2-kat değişim gösterdiğini belirlediler. Tüm gen listesi makalelerinde verilmemiş olsa da Zhu *et al.* (2006) spesifik olarak amonyumla beslenme ile sülfür metabolizmasının aktivasyonu arasında doğru orantı olduğunu işaret ettiler. Bizim data setlerimizde üç sülfat taşıyıcısı farklı regülasyon örnekleri sergilese de bu taşıyıcıların ya nitrat-spesifik cevap ya da genel inorganik azot cevabı verdikleri gözlemlendi. Lopes and Araus (2008) 11 mM konsantrasyonda nitrat, amonyum, veya amonyum nitrat sağlanmış arpa fidelerinde 48 saat sonra transkript düzeylerini karşılaştırmak için Affymetrix gen çipleri kullandı. Çok az sayıda genin farklı regülasyon örnekleri sergilediğini rapor ettiler ki bu çok şaşırtıcıdır. Aynı araştırmacılar $P < 0.01$ önem düzeyinde 2-kat değişim eşiğini kullanarak bir genin (bir glukosiltransferaz) spesifik olarak amonyum ile aktive olduğunu (veya nitratla baskılandığı) ve iki genin (bir reseptör kinaz ve bir triptofan dekarboksilaz) spesifik olarak nitratla aktive olduğunu (veya amonyumla baskılandığını) rapor ettiler. Bu genlerle ilgili *Arabidopsis* homologlarının hiç birisi bizim verilerimizde benzer regülasyon örnekleri sergilemedi. Hoffmann *et al.* (2007) *Arabidopsis* fidelerini 15 gün

boyunca sürekli olarak 4 mM amonyum veya 4 mM nitrat içeren hidroponik ortamda yetiştirdiler ve bir seri mikrodizi analizi gerçekleştirdiler. Crawford and Forde (2002) ve Hoffman *et al.* (2007) azot kaynağı olarak amonyum bulunan ortamda yetiştirilen *Arabidopsis* bitkilerinde nitratla beslenenlere nazaran büyüme durumlarında oldukça farklı gelişimsel durumlar gözlediklerini rapor ettiler ki bu beklenen bir durumdur. Buna karşın bu araştırmacılar, yalnızca amonyum ve nitratla beslenen *Arabidopsis* bitkileri arasında yalnızca iki genin (bir PEP karboksikinaz [At4g37870] ve bir karbonik anhidraz [At3g01500]) farklı şekilde ifade örnekleri sergilediğini (>2-kat değişim, $P<0.05$) bildirdiler. Aynı araştırmacılar northern blotlama ile amonyum sağlanmış bitkilerde β -oksidasyon ile ilgili çok sayıda enzimi kodlayan genlerin ifadesinin arttığını rapor ettiler. İncelenen genlerin hiçbirisi bizim veri setlerimizde farklı bir şekilde regüle edilmedi. Özetle, bizim çalışmalarımızla bu çalışmaların sonuçları arasında geniş düzeyde fonksiyonel örtüşme olduğu söylenemez. Bunun sebebi deneylerde kullanılan bitki türlerinin, analiz edilen organların ve deneysel uygulama zamanları (örneğin, primer ve sekonder etkileri karşılaştırmak gibi) gibi farklı parametrelerden dolayı sonuçlar arasında çok fazla benzerliğin bulunmaması olabilir.

Köklerde nitrat ve amonyumun etkileri üzerine odaklı son zamanlarda yürütülmüş iki önemli çalışma bizim elde ettiğimiz sonuçlarla bazı benzerlikler göstermektedir. Fizames *et al.* (2004) azot kaynağı olarak sürekli 1mM nitrat veya 1mM amonyum kullanılmış ortamlarda *Arabidopsis* bitkilerini büyütüp kök transkriptomundaki değişimleri izlemek için seri gen ekspresyon analizleri (SAGE) kullandı. Analiz edilen 4000 genden (*Arabidopsis*'de toplam genlerin yaklaşık %15'ini temsil eder) 270'inin nitrat ve amonyum nitrat gruplarında farklı transkriptom bolluğu sergilediği rapor edildi. Bu 270 gen bizim nitrat ve amonyum spesifik gen setimizle kapsamlı düzeyde bir örtüşme göstermemesine rağmen çok sayıda bireysel genin aktivasyon düzeylerinin örtüştüğü gözlemlendi. Özellikle, her iki data setinde de GDH2 spesifik olarak amonyumla aktive olurken NR1 ve bir glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (At1g24280) spesifik olarak nitratla aktive oldu. Ruffel *et al.* (2008) tarafından *Medicago truncatula* köklerinde farklı azot formlarının sistemik sinyal rolleri üzerine odaklı bir çalışma gerçekleştirildi. Amonyum-sağlanmış köklerin transkriptomu direkt olarak nitrat-sağlanmış kök

transkriptomları ile karşılaştırılmamış olsa da Ruffel *et al.* (2008) tarafından yapılan indirekt karşılaştırmalar oksidatif pentoz fosfat yolunun nitrat-sağlanmış bitkilerde spesifik olarak hızlandığı rapor edildi ki biz de bu sonucu gözlemledik.

Farklı inorganik azot formlarının analizinde durumu karmaşık hale getiren potansiyel bir faktör de *Arabidopsis*'de amonyum asimilasyonu ve nitrat indirgenmesi ve asimilasyonunun aynı organda gerçekleşmeme potansiyeli durumudur. Topraktan alınan amonyumun, kökten gövdeye taşınımı ile ilgili bazı raporlar bulunsada (Schjoerring *et al.* 2002) genellikle direkt olarak köklerde asimile edildiği kabul edilir (Bloom 1997). Nitrat indirgenmesi ve asimilasyonu da bitki türüne ve çevresel şartlara bağlı olarak oldukça değişkenlik gösterir. *Arabidopsis*'de pek çok çevresel şartlar altında nitrat indirgenmesi ve asimilasyonu için esas alanlar yapraklar olsa da bizim çalışmalarımızda önemli düzeyde nitrat indirgenmesi ve asimilasyonunun köklerde gerçekleştiğini gösteren bulgular elde edildi. Nitrat sağlanmış köklerde nitrat redüktaz (At1g77760), nitrit redüktaz (At2g15620), ve NADH-GOGAT (At5g53460) transkript miktarlarında artışlar gözlemlendi. Bu da nitrat indirgenmesinin köklerde gerçekleştiği sonucunu kuvvetle desteklemektedir. Benzer şekilde amonyum ve nitratla düzenlenen gen setlerinin (her bir azot kaynağı ilavesinden 0,5 saat sonra bile) geniş bir şekilde örtüşmesi de ortak sinyal yolunun olduğunu göstermektedir. Nitrat ve amonyumla beslenmede ortak herhangi potansiyel bir sinyal, nitrat indirgenmesinin ve asimilasyonunun köklerde gerçekleştiği sonucuna delil olarak gösterilebilir. Son olarak düşük ışık şartları ve dokuda düşük nitrat düzeyleri nitratın köklerde direkt indirgenmesi/asimilasyonunu teşvik eder, ve bizim deneysel düzeneğimiz nispeten düşük ışıktaki ($100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{sn}^{-1}$) gerçekleştirildi ve azot-kısıtlandırılmış bitkiler kullanıldı. Sonuç olarak, bu bulgular nitrat ve amonyum her ikisinin de asimilasyonunun bizim azot-kısıtlı *Arabidopsis* bitkilerimizde köklerde gerçekleştiğini (nitratın bir kısmı yapraklara taşınsa bile) gösterir. Bu bulgu Bloom'un (1997) azotun kısıtlı bulunduğu durumlarda köklerde büyümeyi desteklemek için azot asimilasyonunun köklerde gerçekleşeceği hipotezini desteklemektedir.

Nitrat spesifik cevap indirgeyici muadillerin dağılımı ve üretimiyle yakından alakalıdır.

Arabidopsis köklerine inorganik azot provizyonunu takiben sekiz saatlik sürede 335 genin ekspresyonu spesifik olarak nitrat tarafından değiştirildi. Bu genlerin çoğunun daha önce nitrat-sağlanmış bitkilerle yapılmış mikrodizi analizleri ile tanımlanmış olmasına rağmen (Wang *et al.* 2000; Wang *et al.* 2003; Scheible *et al.* 2004; Wang *et al.* 2004; Gifford *et al.* 2008), bu çalışmayla artık bu genlerin çoğunun nitrat-spesifik mi, amonyum-spesifik mi yoksa ortamda N varlığına bağlı olarak mı değişkenlik gösterdiğini görmek mümkündür.

Nitrat-spesifik gen seti içerisinde nitratın indirgenmesi için gerekli enerjinin yüksek olduğunu da hesaba katarsak indirgeyici üretimi ve dağıtımında rol oynayan genlerin aşırı ifade olmaları şaşırtıcı bir sonuç değildir (Şekil 4.14). Mitokondriyal indirgeyici mekiklerin (örneğin OMT1) yukarı yönde düzenlenmesi (bu proteinleri kodlayan genlerin ifade düzeylerinin artması), alternatif oksidazların ve tip II NAD(P)H dehidrogenazların aşağı yönde düzenlenmesi (gen ifadelerinin baskılanması) durumlarına bakıldığında nitrat indirgenmesi için gerekli NADH'ın kısmen mitokondriyal matriksten indirgeyici transportu için sitoplazmaya taşındığı (Krömer 1995; Escobar *et al.* 2006) anlaşılabilir. İndirgeyiciler mitokondriden sitosolde bulunan bu yeni sitosolik havuza (nitrat redüktaz) taşındığı için meydana gelen H_2O_2 düzeylerinde neredeyse anlık bir düşüşün gerçekleşmesinin (Şekil 4.15) sebebi solunum zincirine H^+ pompalayan NADH ların miktarının azalması olabilir. Bu hipotez, *Nicotiana tabacum* cv. BY-2 hücreleri kullanarak farklı azot kaynaklarına cevapta elde ettiğimiz ve nitrat sağlanan hücrelerde amonyum sağlananlara nazaran düşük solunum oranının gözlenmesi bulgusuyla desteklenmektedir. Bir kez nitrat sitosolde nitrite indirgenince nitritin plastidlerde amonyuma indirgenmesi için ilave indirgeyicilere ihtiyaç vardır (Şekil 1.3). Nitrit redüktaz aktivitesi için gerekli indirgenmiş ferrodoksinin oksidatif pentoz fosfat yolu ve/veya ferrodoksin:NADPH redüktaz yoluyla sağlandığı düşünülmektedir, ve bu yolların her ikisinin de bu çalışmada

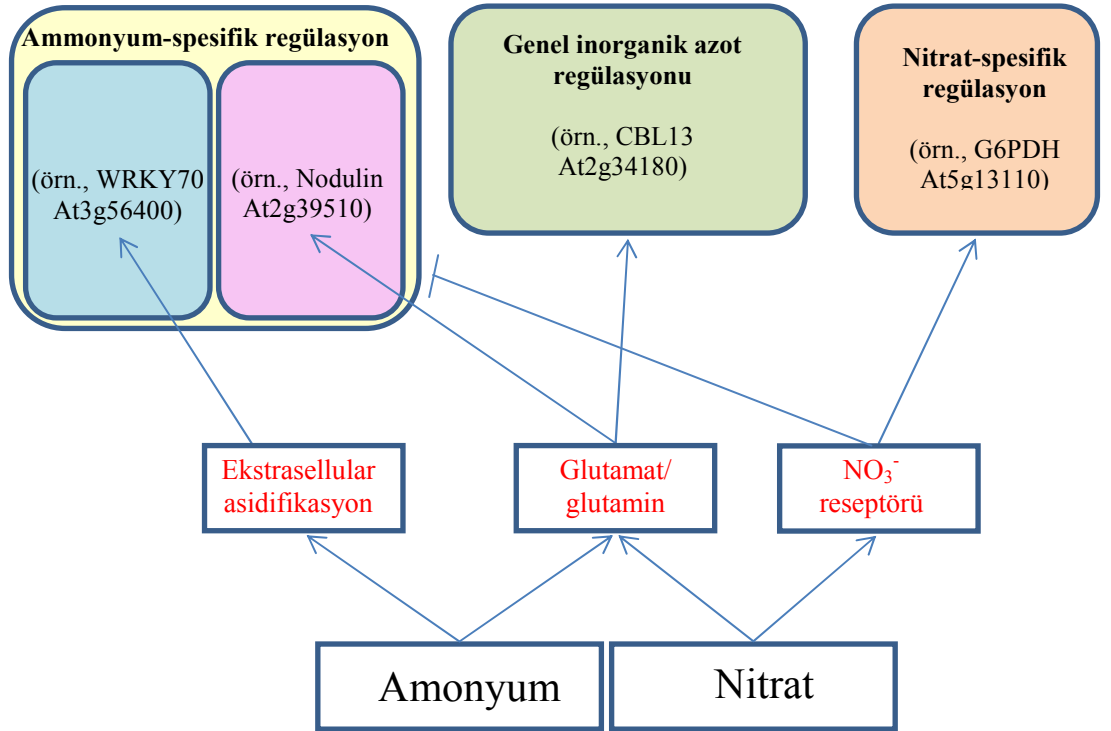
yalnızca nitrat tarafından aktive oldukları belirlenmiştir (ayrıca Ruffel *et al.* (2008) ve Campbell (2008)'i de inceleyebilirsiniz).

Amonyum kaynaklı gen ekspresyonlarındaki değişimler birçok sinyal molekül tarafından kontrol edilir.

Nitrat veya amonyumla beslenme ile ilgili gen ekspresyon örneklerini tanımlamaya ilaveten bu çalışmayla elde edilen veriler ayrıca bu farklılıkların altında yatan farklı sinyal mekanizmalarına da ışık tutmuştur (Şekil 5.1). Aşağıda tartışıldığı gibi, bu çalışmada farklı şekilde ifade olan genler arasında üç genel düzenleyici sınıf tanımlanmıştır: amonyum-spesifik düzenleme, nitrat-spesifik düzenleme, ve genel inorganik azot düzenleme genleri (Şekil 4.4 ve [Tamamlayıcı çizelgeler 1,2,3](#)). Amonyum ve nitrat metabolizmasının bir noktadan sonra örtüşmesinden dolayı nitrat bir kez amonyuma indirgenince, temelde nitrat-spesifik gen setini düzenleyici anahtar sinyali muhtemelen başlı başına nitrat (veya nitrit) iyonudur. Wang *et al.* (2004) nitrat redüktaz enzimini kodlayan geni baskılanmış *Arabidopsis* mutantı kullanarak yakın zamanda tanımlanmış olan (Ho *et al.* 2009) CHL1 reseptörünü de içeren ve ekspresyonunun nitrat iyonu ile spesifik olarak düzenlendiği varsayılan bir gen takımı tanımlandı. Bizim nitrat-spesifik gen setimizde genlerin yarısından fazlası (1.5 saat) Wang *et al.* (2004) tarafından da tanımlandı ki bu da nitrat iyonunun bu grup genleri düzenleyen kritik bir sinyal olduğunu gösterir. Elde ettiğimiz verilerde amonyum ve nitrat her ikisiyle birden koordineli olarak düzenlenen çok sayıda gen takımlarının amonyum asimilasyonu ile oluşan bir metabolite, glutamat ve/veya glutamine cevap verdiği belirlendi. Son zamanlarda yapılmış bir mikrodizi analizi açık bir şekilde glutamat ve glutaminin gen ekspresyonunu düzenleyen önemli düzenleyiciler olduklarını göstermiştir (Gutierrez *et al.* 2008).

Mikrodizi verilerine dayanarak yaptığımız geniş kapsamlı çalışmada, amonyum-spesifik gen setinde her biri bir gen-alt grubunu düzenleyen iki farklı amonyum-ilişkili sinyal yolları tanımladık (Şekil 5.1). Lager *et al.* (2010) tarafından yayınlanan verilerle karşılaştırıldığında amonyumun kök hücrelerine transportu ile meydana gelen

ekstrasellular pH daki bir düşüşün WRKY70, PBP1, ve NAC47 yide içeren çok sayıda amonyum-spesifik genlerin ekspresyonunu aktive ettiği belirlendi. Deney süresince büyüme ortamındaki pH değişimi minimal düzeyde idi, ancak toprak suyu, rizosfer, ve kök korteksinin apoplastı arasında önemli düzeyde pH gradientlerinden kaynaklı yüksek derecede lokalize olmuş pH bölgeleri bitki köklerinde tipiktir (Felle 2001). Ekstrasellular asidifikasyonun amonyumla beslenmenin kaçınılmaz bir sonucu olduğu hem kontrollü kültür şartlarında (Escobar *et al.* 2006), ve hem de tarla şartlarında (Ruan *et al.* 2000) destekleyici delillerle rapor edilmiştir. Amonyum-iliği pH sinyali bu doktora tezinin ana konusu değildir ancak karşılaştırmalı bir yaklaşım sergilendiğinde amonyum spesifik genlerin çoğunun ortamın pH değişimine de cevap verdiği ortaya çıkmaktadır.



Şekil 5.1. *Arabidopsis* köklerinde inorganik azot sinyali üzerine bir model. Amonyum ve nitratla beslenmeden doğan sinyaller kırmızı ile yazılmıştır.

Amonyumla aktive olan bazı genlerin (örneğin GDH2, MIOX4, nodulin At2g39510) glutamat/glutamin tarafından düzenlendiği belirlendi (MSX hassasiyeti ile gösterildiği gibi). Ancak, bu genlerin ifadesinin nitrat ilavesiyle artmaması nitrat iyonunun bu genlerin ekspresyonunu negatif yönde etkileyen bir düzenleyicinin aktivasyonuna liderlik edebildiğini veya nitrat (veya nitrit) iyonunun kendisinin başlı başına bu genlerin ilavesini baskılayan bir faktör olabileceğine işaret eder. Bu düzenleyici özelliğin destekleyici bir örneği [tamamlayıcı çizelge 3](#) de “zıt regülasyon” diye adlandırdığımız nitratla baskılanan ve amonyumla aktive olan küçük bir grupta gösterilmiştir (At1g21890, At2g43500, At3g22930, At5g38910). Amonyumla beslenmeden doğan glutamat/glutamin sinyali ve pH sinyali Goodchild and Givan (1990) tarafından *Acer pseudoplatanus* hücre kültürlerinde çalışıldı. Glutamat dehidrogenaz enzim aktivitesinde amonyum kaynaklı artışların ortamın pH sındaki değişiklikten bağımsız olduğu, ancak aminoasit ve organik asit havuzlarındaki değişmelerin ortamdaki inorganik azot kaynağına değil ortam pH sına bağlı olduğu sonucu rapor edilmiştir. Sonuç olarak, bu bulgular inorganik azotun çok yönlü internal ve eksternal sinyal girdilerinin etkileşimiyle bitki gen ekspresyonunu düzenlediğini göstermektedir (Şekil 5.1).

Amonyum spesifik cevap temelde biyotik stres ve bitki defansı ile ilgilidir.

Nitratla kıyaslandığında bitki gen ekspresyon ve metabolizmasının amonyum-spesifik regülasyonu hakkında bilinen kısmen azdır. Amonyumla beslenmenin iyi karakterize edilen fizyolojik bir özelliği intrasellular amonyum konsantrasyonunun yüksek olduğu durumlarda amonyum asimilasyonu için bir alternatif rota sağlayan glutamat dehidrogenaz aktivitesindeki güçlü artıştır (Goodchild and Givan 1990; Frechilla *et al.* 2002; Skopelitis *et al.* 2006). Buna paralel olarak bizde amonyum-sağlanmış bitki köklerinde GDH2 geninin ifadesinde hızlı ve devamlı bir artış gözlemledik. GDH enzim aktivitesinin yalnızca yüksek amonyum konsantrasyonlarına cevapta değil çeşitli stres şartları altında da arttığı rapor edilmiştir (Moller 2001).

Nodulin gen familyasının bir çok üyesinin yüksek amonyum-spesifik cevaplar verdiği belirlendi. Bunlardan iki genin ifadesi spesifik olarak amonyumla artarken (At4g28040 ve At2g39510) iki gen de amonyum ve nitrat tarafından zıt regülasyon örnekleri sergiledi (At2g16660 and At1g21890) (Şekil 4.9). Nodulinler ilk olarak simbiyotik azot fiksasyonu ile ilgili kök nodüllerinde ilgili genler eksprese oldukları için legümlerde karakterize edildi (Pawlowski 1997). Bu yönüyle çalışmamızda nodulinlerin azotla düzenlenmesi sonucu şaşırtıcı olmamalı. Bu genlerin bazılarının farklı azot kaynaklarına yüksek derecede spesifik ekspresyon örneklerini düşününce, bazı nodulinlerin farklı inorganik azot formlarına köklerin verdiği cevapta tali bir rol oynayabileceği ihtimali göz ardı edilmemelidir. Bu çalışmada elde edilen verilerle ileri sürülen bu hipotez detaylı araştırmaya ihtiyaç duymaktadır.

Gen ekspresyon analizleri ile elde ettiğimiz veriler ilginç bir şekilde *Arabidopsis* köklerinde amonyumla beslenmeye verilen koordineli dominant-spesifik cevabın biyotik stres/bitki savunma cevabı şeklinde olduğuna işaret ediyor. Bu amonyum ilgili savunma cevabı çok kademeli olarak açığa çıkıyor. Öncelikle kitinazlar, PGIP1, ve değişik hastalıklara karşı dayanım proteinleri gibi direkt veya indirekt antimikrobiyal aktivite ile ilgili proteinleri kodlayan genler amonyumla spesifik olarak aktive olmuşlardır. Bununla birlikte daha önce bildirilen raporlarda bitki savunma cevaplarının düzenlenmesiyle ilgili oldukları rapor edilmiş olan (Pandey and Somssich 2009) WRKY transkripsiyon faktörleri WRKY33, WRKY40, WRKY53, ve WRKY70 amonyuma spesifik aktivasyon örnekleri sergilemiştir. Yine amonyuma cevapta hücre duvarı modifikasyonunda rol alan genlerin (poligalakturonazlar, ekspansinler, ve endo-transglikosilazlar) ifadelerinin koordineli bir şekilde baskılandığını gözlemledik. Yakın geçmişte yayınlanmış önemli makaleler ile hücre duvarı modifikasyonunun artan patojen hassasiyeti ile ilgili olduğu rapor edilmiştir (Cantu *et al.* 2008; Ding *et al.* 2008). Bu yönüyle bu düzenleme örneği bir savunma/biyotik stres cevabı ile yüksek derecede ilgilidir. Ancak, *Arabidopsis* köklerinin amonyuma cevapta neden patojen-ile ilgili transkripsiyonel cevapları doğurduğu sorusuna cevap vermek oldukça zordur. Amonyum ile ifadesi artan patojene cevap genlerinin asidik ekstrasellular pH da artışla da ifadelerinin artması ekstrasellular pH da amonyum-kaynaklı değişimlerin savunma-

ilgili genlerin aktivasyonunda önemli bir rol oynadığı sonucunu açıkça ortaya koymaktadır (Lager *et al.* 2010).

Biyotik stres cevapları çoğunlukla ROT düzeylerinde artışla ilişkilendirilir (Torres and Dangl 2005), çünkü bir bölgede redoks dengesinde bozulmayla birlikte oluşumları hızlanan bu reaktif bileşikler, lipidler, proteinler ve nükleik asitler dahil çok sayıda biyomoleküllerin yapısını etkilemek suretiyle redoks dengesizliğinin kapsamının genişlemesine ve böylece metabolizma düzeyinde geri dönüşümsüz negatif etkilere sebep olabilme potansiyeline sahiptirler. Esasen birçok metabolik yolda yan ürün ve hatta programlı hücre ölümü gibi değişik cevaplarda gerekli olan bu reaktif bileşiklerin toksik etkilerinden dolayı bitkiler ROT seviyesindeki değişimleri antioksidan enzimler (özellikle katalaz, peroksidaz, süperoksit dismutaz, askorbat peroksidaz ve glutatyon redüktaz gibi) ve enzimatik yapıda olmayan antioksidanlar (özellikle askorbat/glutatyon havuzu) ile belli bir dengede tutmak şeklinde karmaşık bir düzen geliştirmişlerdir. Amonyuma cevapta azot açlığına bırakılmış kontrollerine kıyasla yukarıda tartıştığımız transkripsiyonel düzeyde gözlenen savunma/biyotik stres cevabın post-translasyonal etkilerinin olup olmadıklarını belirlemek için öncelikle muhtemel biyokimyasal cevapları stimüle edecek olan ROT miktarı hakkında bir fikir elde etmek istedik. Azot açlığına bırakılmış bitki köklerinde artan H_2O_2 miktarında nitrat uygulamasıyla birlikte ilk yarım saatte bile keskin bir düşüş var iken amonyuma cevapta ilk 1.5 saatte artış ancak daha sonra lineer bir azalma gözlemledik (Şekil 4.15). Bu bulgu tek başına gen ekspresyon verileri ile birlikte kullanıldığında verilen stres cevabın yalnızca transkripsiyonel düzeyde olduğu, fizyolojik etkilerinin olmadığı sonucuna varılabilir. Fakat amonyumla nitrat grupları birbirleri ile karşılaştırıldığında ilk sekiz saatte amonyum grubunda H_2O_2 miktarının önemli düzeyde yüksek olduğu açıktır. Amonyuma cevapta H_2O_2 konsantrasyonunda farklı sürelerde farklı oranlarda meydana gelen bu değişimin fizyolojik menşeinin ilk olarak indirgeyici gereksiniminden doğacak olan indirgeyici miktarları veya oranlarından kaynaklanabilir.

Yukarıda da tartışıldığı gibi azot kaynağı olarak nitrat verildiğinde mitokondriyal taşıyıcı proteinleri kodlayan genlerin ifadelerinde kontrole (0. saat) kıyasla artış

belirlendi (Şekil 4.14). Bu durum, mitokondriden Krebs döngüsünde üretilen indirgeyicilerin bir kısmının nitratın indirgenmesi için kullanıldığına işaret eder. Amonyum ve nitrat asimilasyonun indirgeyici gereksinimleri birbirlerinden önemli düzeyde farklı olduğu (Şekil 1.3) için amonyuma cevapta nitratla beslenenlere kıyasla indirgeyici oranında veya elektron transport sisteminde kullanılması ile hücrel ve hatta alternatif yolla oksijen tüketiminde meydana gelecek bir artış (farklı azot kaynaklarına cevapta hücrel ve alternatif solunum yollarının daha hızlı çalıştığı Escobar *et al.* (2006) tarafından rapor edilmiştir.) ile doğacak muhtemel redoks dengesizliğini tetikleyen ana neden olabilir. Bu sebeple amonyum ve nitrata cevapta köklerde redoks metabolitlerinde (NAD, NADH, NADP, NADPH) meydana gelecek oransal değişimler belirlendi (Şekil 4.16). Bu önemli redoks metabolitlerinin oransal değişimlerinde ve miktarlarında farklılıklar gözlenirse de özellikle NADH ve NADPH konsantrasyonlarında farklı azot kaynaklarına cevapta önemli bir değişiklik belirlenemedi. Ancak NAD(P)H oksidasyon durumunda herhangi bir değişikliğin görülmemesi tek başına bir redoks düzensizliği olmadığını göstermez, bu durum krebsle üretilen indirgeyicilerin amonyuma cevapta kuvvetle muhtemel mitokondriyal ETS'de kullanıldığı ve artan solunum hızıyla birlikte (yeşil olmayan dokularda mitokondrilerin ROT üretiminin en yoğun gerçekleştiği organeller olduğu (Moller 2001) düşünülünce) ROT üretiminin artması hipotezini destekler.

Yeni bir azot kaynağına cevapta H_2O_2 düzeylerinde meydana gelen değişim antioksidan sistemi de harekete geçirmeli. Böylece farklı azot kaynaklarına cevapta en önemli redoks indirgeyici havuzlardan birisi ve önemli redoks metabolitleri olan askorbat/glutasyon oksidasyon durumlarını araştırdık (Şekil 4.17 ve 4.18). Genel manada özellikle indirgenmiş askorbat ve indirgenmiş glutasyon yüzdelere bakıldığında askorbat/glutasyon oksidasyon durumunun amonyum sağlananlarda nitrat sağlananlara kıyasla daha yüksek olduğu belirlendi. Her ne kadar bu artışlar istatistiksel olarak önemli bulunmasa da her iki durumda da bu metabolitlerin amonyum sağlanan grupta daha yüksek düzeyde okside oldukları, verilerdeki lineer farklılığa bakılınca, anlaşılıyor. Nitekim Dominguez-Valdivia *et al.* (2008) 1.5 ve 3 mM konsantrasyonlarda amonyum ve nitrata cevapta amonyum toleran olan bezelye, ve hassas olan ıspanak, türlerinin amonyumla beslendiğinde büyümelerindeki dramatik azalmaya (ıspanakta

%77-93; ve bezelyede <%20) rağmen köklerinde ve yapraklarında bu non-enzimatik antioksidanların oksidasyon durumlarında ve toplam miktarlarında önemli bir değişiklik gözlemlenmediğini bildirmiştir.

Amonyuma cevapta H_2O_2 konsantrasyonunda ilk 1.5 saatteki artış ve daha sonra kademeli azalma (ancak ilk 8 saatte nitrat grubundan önemli düzeyde yüksek H_2O_2 içeriğine sahip olduğu not edilmeli) ve istatistiksel olarak önemsiz olsa da grafiklere bakılınca askorbat/glutasyon oksidasyon durumundaki artış enzimatik antioksidanlarla da (özellikle askorbat peroksidaz ve glutasyon redüktaz enzimleri) desteklenmeli. Ayrıca her ne kadar da bu metabolitlerin (indirgenmiş ve yükseltgenmiş) konsantrasyonlarında önemli bir farklılık gözlenemese de askorbat/glutasyon havuzunda rol alan enzim aktivitelerindeki değişiklikler bu ROT detoksifiye edici havuzun farklı azot kaynaklarına nasıl cevap verdiği hakkında bilgilerimizi genişletecektir. Bu niyetle gerçekleştirdiğimiz enzimatik ölçümlere bakıldığında AP aktivitesinin 1.5 ve 8 saatte de, GR enzim aktivitesinin ise ilk 1.5 saatte kontrole (ve nitrat grubuna) kıyasla önemli düzeyde yüksek olduğunu belirledik (Şekil 4.19). Amonyuma cevapta GR ve AP enzim aktivitelerindeki artışlar Guo *et al.* (2006) ve Dominguez-Valdivia *et al.* (2008) tarafından da rapor edilmiştir. Bu durum askorbat/glutasyon havuzunun amonyuma cevapta ROT detoksifikasyonunda aktif rol oynadığını gösterir.

Diğer antioksidan enzimlerden katalaz (CAT), guaiakol peroksidaz (POD) ve süperoksid dismutaz (SOD) aktivitelerinde de amonyuma cevapta ilk 1.5 saatte artış gözlenmiş, fakat 8 saatin sonunda enzimatik aktivitelerde düşüşle birlikte kontrole ve nitrat grubuna kıyasla önemli bir değişiklik olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.20). Wang *et al.* (2010) da amonyuma cevapta *Hydrilla verticillata* köklerinde ROT artışına ilaveten bu enzim aktivitelerinde de artış olduğunu rapor etmiştir. ROT konsantrasyonunda meydana gelen değişimle birlikte antioksidan sistemde meydana gelen bu düzenlemeler genel manada amonyum-sağlanmış bitkilerin hücrel redoks parametrelerinde süresiz değişimlere maruz kaldığını gösterir ki bu da mikrodizi verileriyle elde ettiğimiz savunma-ilişkili sinyal sonuçlarımızla da desteklenmektedir.

Azot kaynaklarına cevapta indirgeyici konsantrasyonları ve oranlarında herhangi bir değişiklik olmaması (solunum hızındaki değişikliklerle bu durum bertaraf edilebilir), amonyuma cevapta gözlenen yüksek ROT üretimi ve ROT konsantrasyonunun (muhtemel solunum hızı artışından kaynaklanabilir) zamanla düşmesine paralel olarak antioksidan sistemde aktivasyon ve yavaşlama verileri amonyum-sağlanmış bitkilerin hücresel redoks parametrelerinde süreksiz değişimlere maruz kaldığını ve amonyum toksisitesinin temelini oluşturacak olan bu değişimlerin artan amonyum konsantrasyonları ile birlikte hücrelerin kontrol edemeyeceği bir düzeye ulaşması ile birlikte ölümle sonuçlanabilecek geniş kapsamlı metabolik bozukluklara sebep olabileceğini gösterir.

Her ne kadar da aşırı ROT üretimi antioksidan mekanizmalarla kontrol altına alınabilmiş olsa da bu esnada ROT üretimi ile birlikte hücreler için çok önemli olan ancak çok kararlı bir yapıya sahip olmayan lipid ve proteinlerin oksidasyon durumlarının zamana göre değişimi, bitkinin amonyuma cevapta maruz kaldığı görülen redoks parametrelerindeki süreksiz değişimlerden etkilenip etkilenmediği hakkında önemli veriler sunabilir. Bu nedenle, azot kaynağına cevapta lipidlerin oksidasyonu ile oluşan yan ürünler olan malondialdehid miktarları ve proteinlerin oksidasyon durumlarındaki değişimlere bakıldı. Azot kaynaklarına cevapta lipidlerin oksidasyon ürünü olan MDA bileşiklerinin miktarlarında önemli bir farklılık gözlemlendi (Şekil 4.22). Ancak, amonyumla beslenen *Arabidopsis* köklerinde protein karbonilasyon durumunun kademeli olarak arttığı, bu artışın 8. saatte hem kontrol ve hem de nitrat grubuna kıyasla istatistiksel manada daha yüksek olduğu belirlendi (Şekil 4.21). Her ne kadar genel manada antioksidan enzim aktiviteleri ile ilgili olarak biyokimyasal verilerimiz birbirleriyle örtüşmüyor olsa da (bu durum farklı bitki türleri ve farklı konsantrasyonlar ve büyüme ortamları kullanılmasından kaynaklanabilir) Dominguez-Valdivia *et al.* (2008) amonyumun antioksidan metabolizmada önemli değişimlere sebep olmadığını ancak protein karbonilasyonundaki artışın amonyum toksisitesinin ana kaynağı olduğunu ileri sürmüştür. Ancak bizim verilerimize bakıldığında görünen o ki amonyuma cevapta artan ROT üretiminin detoksifiye edilmesi esnasında bazı proteinler

okside olmuştur. Ancak çok küçük de olsa protein karbonilasyonundaki kademeli artışın sebebi *Arabidopsis*'te gerçekleştirilecek daha detaylı çalışmalarla açıklanabilir.

Amonyum toksisitesinin ana sebebini doğuran temel sonuç solunum hızında ve alternatif yolların aktivasyonunda meydana getirebileceği kapsamlı değişikliklerdir.

Aerobik organizmalarda glikoliz, trikarboksilik asit döngüsü ve mitokondriyal elektron transport sistemi biyoenerjetik ve karbon metabolizmasının temelini oluşturur. Solunum bütün bitkilerde büyüme, hayatın devamı ve karbon dengesi için en temel öğedir. Solunum enzimlerinin büyük çoğunluğu tüm organizmalarda aynı olsa da bitki solunum sistemi, diğer çoğu organizmalarda bulunmayan metabolik bir ağ ile kuşatılmıştır. Bitkilerde solunum metabolizmasının değişken doğası ATP üretiminin yanı sıra çok değişik ve önemli biyosentetik role de sahip olduğunu gösterir. Sessil yaşamlarından dolayı bitkiler değişen ortam şartlarına adaptasyon sağlamak, çeşitli biyotik ve abiyotik streslere karşı dayanmak durumlarıyla sürekli karşı karşıyadırlar. Solunum metabolizması bitkilerin yaralanma, düşük sıcaklık, düşük oksijen, UV ışınları, ağır metal, tuzluluk ve su stresi, besin açlığı, oksidatif stres ve patojen enfeksiyonu gibi değişik stres tiplerine karşı biyokimyasal düzeyde aklimasyon kazanmasında hayati öneme sahiptir (Plaxton 1996; Givan 1999; Siedow and Umbach 2000; Møller 2001; Tiwari *et al.* 2002; Millenaar and Lambers 2003; Vance *et al.* 2003; Ribas-Carbo *et al.* 2005; McDonald and Vanlerberghe 2006).

Bu doktora tezi kapsamında yapılan çalışmalarda amonyum ve nitrata cevapta organizma düzeyinde gözlenen moleküler ve fizyolojik farklılıklar *Arabidopsis thaliana* köklerinde detaylı analiz edildi. Mikrodizi verilerinden elde edilen sonuçlara bakıldığında, nitratla beslenmede *Arabidopsis* köklerinde alternatif oksidazlar ve tip II NAD(P)H dehidrogenazları kodlayan genlerin ifadelerinin baskılandığı görülüyor. Nitekim bu veriler artılarıyla beraber Krömer (1995) ve Escobar *et al.* (2006) tarafından da desteklenmiştir. Yine mitokondriyal indirgeyici mekikleri kodlayan genlerin ifadelerinde nitrata cevapta önemli artışlar belirlidik. Bu durum krebsle sentezlenen

indirgeyicilerin nitrat indirgenmesi için kısmen sitosole taşındığını gösteriyor. Dolayısıyla azot kaynağı olarak amonyum alındığında bu indirgeyiciler mitokondriyal elektron transport sisteminde yükseltgenmelidirler. Bu durumu, organ ve/veya dokulara ait etkileşimden bağımsız olarak belirlemek için biz *Nicotiana tabacum* Cv. *Bright-Yellow 2* hücre kültürlerini kullandık. Amonyuma cevapta bu hücrelerin nitratla beslenenlere kıyasla hem sitokrom yoluyla ve hem de alternatif yolla oksijen tüketimlerinin yüksek olduğunu gözlemledik (Şekil 4.24a,b). Yine bu hücreler kullanılarak yapılan immunoblot analizleri ile alternatif oksidaz proteininin hem miktarında ve hem de indirgenmiş (aktif olan formu) formunda belirgin artışlar kaydedilmiştir (Şekil 4.25). Amonyumla beslenmede artan solunum hızı ve alternatif yolların aktivasyonu birçok çalışmayla da rapor edilmiştir (Britto and Kronzucker 2002; Escobar *et al.* 2006; Hoffman *et al.* 2007; Rasmusson *et al.* 2009).

Bu doktora tezi ile elde edilen sonuçları birkaç madde ile şu şekilde özetleyebiliriz:

1. Ortamda nispeten düşük konsantrasyonlarda bulunduğunda amonyum ve nitrat her ikisi de çok büyük bir ihtimalle köklerde asimile edilirler.
2. Amonyum toksisitesinin asıl sebebi indirgeyici gereksiniminden doğan farklılıktan kaynaklanan hücresel ve alternatif solunum yollarının aşırı aktivasyonudur. Mitokondrilerin bitkinin yeşil olmayan kısımlarında ROT üretiminin en çok ve hızlı gerçekleştiği bölgeler olduğu düşünülünce solunum hızındaki artışla birlikte yükselen ROT konsantrasyonları organizmayı ölüme sürükleyebilecek çok yönlü metabolik bozukluklara sebep olabilir.
3. İnorganik azot çok yönlü internal ve eksternal sinyal girdilerinin etkileşimiyle bitki gen ekspresyonunu düzenler.
4. Nitrata özgü gen ifadelerindeki değişim öncelikli olarak nitrat iyonu tarafından kontrol edilir.
5. Amonyum spesifik gen ifadelerindeki değişim üç farklı sinyal tarafından düzenlenir:
 - a) amonyumun alımıyla alakalı olan ekstrasellular pH değişimleri;
 - b) amonyumun asimilasyonu ile elde edilen metabolitler;
 - c) nitrat iyonunun yokluğu.

KAYNAKLAR

- Aharoni, A., Vorst, O., 2001. DNA microarrays for functional plant genomics. *Plant Molecular Biology*, 48: 99-118.
- Alboresi, A., Gestin, C., Leydecker, M.T., Bedu, M., Meyer, C., Truong, H.N., 2005. Nitrate, a signal relieving seed dormancy in *Arabidopsis*. *Plant Cell and Environment*, 28: 500-512.
- Ameziane, R., Bernhard, K., Lightfoot, D., 2000. Expression of bacterial gdh A gene encoding a NADPH glutamate dehydrogenase in tobacco affects plant growth and development. *Plant and Soil*, 221: 47-57.
- Andrews, M., 1986. The partitioning of nitrate assimilation between root and shoot of higher plants. *Plant Cell and Environment*, 9: 511-519.
- Apel, K., Hirt, H., 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55: 373-399.
- Asada, K., 1994. Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissue. In: Foyer, C.H., Mullineaux, P.M. (Eds.), *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 77-104.
- Atkin, O.K., 1996. Reassessing the nitrogen relations of Arctic plants. A mini-review. *Plant Cell and Environment*, 19: 695-704.
- Babourina, O., Voltchanskii, K., McGann, B., Newman, I., Rengel, Z., 2007. Nitrate supply affects ammonium transport in canola roots. *J.Exp.Bot.*, 58: 651-8
- Barber, S.A., 1984. Soil nutrient bioavailability. A mechanistic approach. John Wiley and Sons, New York, NY. pp. 398.
- Bari, R., Pant, B.D., Stitt, M., Scheible, W-R., 2006. PHO2, micro RNA399 and PHR1 define a phosphate signaling pathway in plants. *Plant Physiology*, 141:988-999.
- Barker, A.V., Maynard, D.N., Mioduchowska, B., Buch, A., 1970. Ammonium and salt inhibition of some physiological processes associated with seed germination. *Physiologia Plantarum*, 23: 898-907.
- Barker, A.V., Volk, R.J., Jackson, W.A., 1996. Growth and nitrogen distribution patterns in bean plants *Phaseolus vulgaris* L. subjected to ammonium nutrition: I Effects of carbonates and acidity control. *Soil Science Society of America Proceedings*, 30: 228-232.
- Barneix, A.J., Breteler, H., Siebe, C., Van de Geijn, S.C., 1984. Gas and ion exchanges in wheat roots after nitrogen supply. *Physiologia Plantarum*, 61: 357-362.
- Bartoli, C.G., Gómez, F., Martínez, D.E., and Guiamet, 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.
- Becana, M., Dalton, D.A., Moran, J.F., Iturbe- Ormaetxe, I., Matamoros, M.A., Rubio, M.C., 2000. Reactive oxygen species and antioxidants in legume nodules. *Physiologia Plantarum*, 109: 372-81.
- Beers, R.F., Sizer, I.W., 1952. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase, *Journal of Biological Chemistry*, 195: 133-140.

- Benjamini, Y., Hochberg, Y., 1995. Controlling the False Discovery Rate - a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B-Methodological* 57: 289-300.
- Bennett, M. D., Leitch, I. J., Price, H. J., & Johnston, J. S., 2003. "Comparisons with *Caenorhabditis* (100 Mb) and *Drosophila* (175 Mb) Using Flow Cytometry Show Genome Size in *Arabidopsis* to be 157 Mb and thus 25% Larger than the *Arabidopsis* Genome Initiative Estimate of 125 Mb". *Annals of Botany* 91 (5): 547-557
- Bhalerao, R.P., Eklof, J., Ljung, K., Marchant, A., Bennett, M., Sandberg, G., 2002. Shoot-derived auxin is essential for early lateral root emergence in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Journal*, 29: 325-332.
- Bi, Y.M., Wang, R.L., Zhu, T., Rothstein, S.J., 2007. Global transcription profiling reveals differential responses to chronic nitrogen stress and putative nitrogen regulatory components in *Arabidopsis*. *BMC Genomics*, 8: 281-288.
- Blacqui re, T., 1987. Ammonium and nitrate nutrition in *Plantago lanceolata* and *P. major* ssp. *major*. II: Efficiency of root respiration and growth. Comparison of measured and theoretical values of growth respiration. *Plant Physiology and Biochemistry*, 25: 775-785.
- Blacqui re, T., Hofstra, R., Stulen, I., 1988. Ammonium and nitrate nutrition in *Plantago lanceolata* L. and *Plantago major* L. ssp. *major*. III. Nitrogen metabolism. *Plant and Soil*, 104: 129-141.
- Blamey, M. & Grey-Wilson, C., 1989. *Flora of Britain and Northern Europe*. ISBN 0-340-40170-2
- Bloom, A.J., 1988. Ammonium and nitrate as nitrogen sources for plant growth. *Atlas of Science: Animal Plant Science*, 1: 55-59.
- Bloom, A.J., Sukrapanna, S.S., and Warner, R.L., 1992. Root respiration associated with ammonium and nitrate absorption and assimilation by barley. *Plant Physiology*, 99: 1294-1301.
- Bloom, A.J., Jackson, L.E. and Smart, D.R., 1993. Root growth as a function of ammonium and nitrate in the root zone, *Plant Cell Environment*, 16: 199-206
- Bloom, A.J., 1997. Interactions between inorganic nitrogen nutrition and root development. *Zeitschrift Pflanzenern hrung Bodenkunde*, 160: 253-259.
- Bloom, A.J., Meyerhoff, P.A., Taylor, A.R., Rost, T.L., 2003. Root Development and Absorption of Ammonium and Nitrate from the Rhizosphere. *Journal of Plant Growth Regulation*, 21: 416-431.
- Bolstad, B.M., Irizarry, R.A., Astrand, M., Speed, T.P., 2003. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics*, 19: 185-193.
- Boukcim, H., Pages, L., Plassard, C., Mousain, D., 2001. Root system architecture and receptivity to mycorrhizal infection in seedlings of *Cedrus atlantica* as affected by nitrogen source and concentration. *Tree Physiology*, 21: 109-115.
- Boyes, D.C., Zayed, A.M., Ascenzi, R., McCaskill, A.J., Hoffman, N.E., Davis, K.R., G rlach, J., 2001. Growth stage-based phenotypic analysis of *Arabidopsis*: a model for high throughput functional genomics in plants. *Plant Cell*, 13 (7), 1499-1510.

- Braidot, E., Petrucci, E., Vianello, A., Macri, F., 1999. Hydrogen peroxide generation by higher plant mitochondria oxidizing complex I or complex II substrates. *FEBS Letters*, 451: 347–50.
- Bräutigam, A., Gagneul, D., Weber, A.P., 2007. High-throughput colorimetric method for the parallel assay of glyoxylic acid and ammonium in a single extract. *Analytic Biochemistry*, 362: 151–153.
- Breteler, H., 1973. A comparison between ammonium and nitrate nutrition of young sugar beet plants grown in nutrient solutions at constant acidity. 2. Effect of light and carbohydrate supply. *Netherlands Journal of Agricultural Sciences*, 21: 297–307.
- Breteler, H. and Luczak, W., 1982. Utilization of nitrite and nitrate by dwarf bean. *Planta*, 156: 226–232.
- Britto, D.T., Siddiqi, M.Y., Glass, A.D.M., Kronzucker, H.J., 2001. Futile transmembrane NH_4^+ cycling: A cellular hypothesis to explain ammonium toxicity in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98: 4255–4258.
- Britto, D.T., Kronzucker, H.J., 2002. NH_4^+ toxicity in higher plants. *Journal of Plant Physiology*, 159: 567–584.
- Britto, D.T., Kronzucker, H.J., 2004. Bioengineering N acquisition in rice: Can novel initiatives in rice genomics and physiology contribute to global food security? *BioEssays*, 26: 683–692.
- Britto, D.T. and Kronzucker, H.J., 2005. Nitrogen acquisition, PEP carboxylase, and cellular pH homeostasis: new views on old paradigms. *Plant Cell and Environment*, 11: 1396–1409.
- Brouwer, R., 1981. Coordination of growth phenomena within a root system of intact maize plants. *Plant and Soil*, 63: 65–72.
- Browse, J.A., Moller, I.M., Rasmussen, A.G., 2006. Respiration and lipid metabolism. In L. Taiz, E. Zeiger, eds, *Plant physiology*, Ed 4. Sinauer Associates Inc., Sunderland pp. 253–288.
- Camargo, J.A., Alonso, A., 2006. Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: a global assessment. *Environment International*, 32: 831–849.
- Cao, T., Ni, L.Y., Xie, P., 2004. Acute biochemical responses of a submersed macrophyte, *Potamogeton crispus* L., to high ammonium in an aquarium experiment. *Journal of Freshwater Ecology*, 19: 279–284.
- Cataldo, D.A., Haroon, M., Schrader, L.E., Youngs, V.L., 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Community Soil and Plant Analytics*, 6, 71–80.
- Catoni, E., Schwab, R., Hilpert, M., Desimone, M., Schwacke, R., Flügge, U.I., Schumacher, K., Frommer, W.B., 2003. Identification of an *Arabidopsis* mitochondrial succinate-fumarate translocator. *FEBS Letter*, 534: 87–92.
- Chaillou, S., Morot-Gaudry, J.F., Lesaint, C., Salsac, L., and Jolivet, E., 1986. Nitrate or ammonium nutrition in French bean. *Plant and Soil*, 91: 363–365.
- Chaillou, S., Vessey, J.K., Morotgaudry, J.F., Raper, C.D., Henry, L.T., Boutin, J.P., 1991. Expression of Characteristics of Ammonium Nutrition as Affected by Ph of the Root Medium. *Journal of Experimental Botany*, 42: 189–196.

- Chaillou, S., Rideout, J.W., Raper, C.D., Morot-Gaudry, J.F., 1994. Responses of soy bean to ammonium and nitrate supplied in combination to the whole root system or separately in a split root system. *Physiologia Plantarum*, 90: 259–268.
- Chaillou, S. and Lamaze, T., 2001. Ammonical nutrition of plants. *In* Nitrogen assimilation by plants. Ed. J-F Morot-Gaudry. pp. 53–69. Science Publishers Inc., New Hampshire, USA.
- Champigny, M.L. and Foyer, C., 1992. Nitrate activation of cytosolic protein kinases diverts photosynthetic carbon from sucrose to amino acid biosynthesis. *Plant Physiology*, 100: 7–12.
- Chance, B., Sies, H., Boveris, A., 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiology Reviews*, 59:527–605.
- Chao Wang, SongHeZhang , PeiFangWang , WeiLi, JieLu., 2010. Effects of ammonium on the antioxidative response in *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73: 189–195.
- Chapin, F.S., Moilanen, L. and Kielland, K., 1993. Preferential use of organic nitrogen for growth by a non-mycorrhizal arctic sedge. *Nature*, 361: 150–153.
- Claussen, W., Lenz, F., 1995. Effect of ammonium and nitrate on photosynthesis, flower formation, growth and yield of eggplants (*Solanum melongena* L.). *Plant and Soil*, 171: 267–274.
- Claussen, W. and Lenz, F., 1999. Effect of ammonium or nitrate nutrition on net photosynthesis, growth, and activity of the enzymes nitrate reductase and glutamine synthetase in blueberry, raspberry and strawberry. *Plant and Soil*, 208: 95–102.
- Clifton, R., Millar, A.H., Whelan, J., 2006. Alternative oxidases in *Arabidopsis*: A comparative analysis of differential expression in the gene family provides new insights into function of non-phosphorylating bypasses. *Biochimica Biophysica Acta*, 1757: 730–741.
- Clough, S.J., Bent, A.F., 1998. "Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*". *Plant J* 16 (6): 735–743.
- Cramer, M.D., Lewis, O.A.M., 1993. The Influence of NO_3^- and NH_4^+ Nutrition on the Gas-Exchange Characteristics of the Roots of Wheat (*Triticum-Aestivum*) and Maize (*Zea-Mays*) Plants. *Annals of Botany*, 72: 37–46.
- Crawford, N.M., 1995. Nitrate: Nutrient and signal for plant growth. *Plant Cell*, 7: 859–868.
- Crawford, N.M. and Forde, B.G., 2002. Molecular and Developmental Biology of Inorganic Nitrogen Nutrition. *The Arabidopsis Book*, American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, pp. 1–25.
- Cruz, C., Castillo, M., Dominguez, C.N., Juanarena, N., Aparicio- Tejo, P., Lamsfus, C., et al. 2003. The importance of nitrate signalling in plant ammonium tolerance: spinach as a case study. *In*: Universitat Illes Balears, editor. Actas XV Reunión de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal y VIII Congreso Hispano-Luso. Palma de Mallorca: Sociedad Española de Fisiología Vegetal, p. 297.
- Dave, G., Nilsson, E., 2005. Increased reproductive toxicity of landfill leachate after degradation was caused by nitrite. *Aquatic Toxicology*, 73: 11–30.

- De Graaf, M.C.C., Bobbink, R., Verbeek, P.J.M., Roelofs, J.G.M., 1998. Differential effects of ammonium and nitrate on three heathland species. *Plant Ecology*, 135: 185–196.
- Dejoux, J.F., Recous, S., Meynard, J.M., Trinsoutrot, I. and Leterme, P., 2000. The fate of nitrogen from winter-frozen rapeseed leaves: mineralisation, fluxes to the environment and uptake by rapeseed crop in spring. *Plant Soil*, 218: 257–272.
- De Smet, I., Signora, L., Beeckman, T., Inze, D., Foyer, C.H., Zhang, H., 2003. An abscisic acid-sensitive checkpoint in lateral root development of *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 33:543-555.
- De Willigen, P., 1986. Supply of soil nitrogen to the plant during the growing season. *In* Fundamental, ecological and agricultural aspects of nitrogen metabolism in higher plants. Eds. H., Lambers, J.J., Neeteson and I., Stulen., pp. 417–432. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, Boston, Lancaster.
- Dhindsa, R.S., Plumb-Dhindsa, P. ve Thorpe, T.A., 1981. Leaf senescence: Correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *Journal of Experimental Botany*, 32: 93-101.
- Djajanegara, I., Finnegan, P.M., Mathieu, C., McCabe, T., Whelan, J., Day, D.A., 2002. Regulation of alternative oxidase gene expression in soybean. *Plant Molecular Biology*, 50: 735–742.
- Donson J., Fangv, Espiritu-Santo G., Xing W., Salazar A., Miyamoto S., Armendarez V., Volkmut W., 2002. Comprehensive gene expression analysis by transcript profiling. *Plant Molecular Biology*, 48: 75-97.
- Drew, M.C., 1975. Comparison of the effects of a localized supply of phosphate, nitrate, ammonium and potassium on the growth of the seminal root system, and the shoot in barley. *New Phytologist*, 75:479-90.
- Dutilleul, C., Garmier, M., Noctor, G., Mathieu, C., Chetrit, O., Foyer, C.H., Depaepe, R., 2003. Leaf mitochondria modulate whole cell redox homeostasis, set antioxidant capacity, and determine stress resistance through altered signaling and diurnal regulation. *Plant Cell*, 15: 1212-1226.
- Escobar, M.A., Geisler, D.A., Rasmusson, A.G., 2006. Reorganization of the alternative pathways of the *Arabidopsis* respiratory chain by nitrogen supply: opposing effects of ammonium and nitrate. *Plant Journal*, 45: 775-788.
- Falkengren-Grerup, U., 1995. Interspecies differences in the preference of ammonium and nitrate in vascular plants, *Oecologia*, 102: 305-311.
- Feil, B., 1994. Growth and ammonium: nitrate uptake ratio of spring wheat cultivars under a homogeneous and a spatially separated supply of ammonium and nitrate. *Journal of Plant Nutrition*, 17: 717–728.
- Feng, J., Volk, R.J., Jackson, W.A., 1998. Source and magnitude of ammonium generation in maize roots. *Plant Physiology*, 118: 835-41.
- Fernie, A.R., Carrari, F., Sweetlove, L.J., 2004. Respiratory metabolism: Glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport. *Current Opinion in Plant Biology*, 7: 254-261.
- Finnegan, P.M., Whelan, J., Millar, A.H., Zhang, Q.S., Smith, M.K., Wiskich, J.T., Day, D.A., 1997. Differential expression of the multigene family encoding the soyabean mitochondrial alternative oxidase. *Plant Physiology*, 114: 455-466.

- Finnemann, J., Schjoerring, J.K., 1999. Translocation of NH_4^+ in oilseed rape plants in relation to glutamine synthetase isogene expression and activity. *Physiologia Plantarum*, 105: 469–477.
- Fiorani, F., Umbach, A.L., Siedow, J.N., 2005. The alternative oxidase of plant mitochondria is involved in the acclimation of shoot growth at low temperature. A study of *Arabidopsis aox1a* transgenic plants. *Plant Physiology*, 139: 1795–1805.
- Fizames, C., Munos, S., Cazettes, C., Nacry, P., Boucherez, J., Gaymard, F., Piquemal, D., Delorme, V., Commes, T.S., Doumas, P., Cooke, R., Marti, J., Sentenac, H., Gojon, A., 2004. The *Arabidopsis* root transcriptome by serial analysis of gene expression. Gene identification using the genome sequence. *Plant Physiology*, 134: 67–80.
- Forde, B.G., 2002. Local and long-range signaling pathways regulating plant responses to nitrate. *Annual Review in Plant Biology*, 53: 203–24.
- Foyer, C.H., Halliwell, B., 1976. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplast: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta*, 133: 21–25.
- Foyer, C.H., Lelandais, M., Kunert, K.J., 1994. Photooxidative stress in plants. *Physiologia Plantarum*, 92: 696–717.
- Foyer, C.H. and Noctor, G., 2003. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria, *Physiologia Plantarum*, 119: 355–364.
- Foyer, C.H., Noctor, G. and Verrier, P., 2006. Photosynthetic carbon-nitrogen interactions: Modelling inter-pathway control and signalling, In: *Control of Primary Metabolism in Plants*. pp. 325–34x. Plaxton, W. C. and McManus, M. T., Eds., Annual Plant Reviews, volume 22, Blackwell Publishing, Oxford.
- Frechilla, S., Lasa, B., Aleu, M., Juanarena, N., Lamsfus, C., Aparicio-Tejo, P.M., 2002. Short-term ammonium supply stimulates glutamate dehydrogenase activity and alternative pathway respiration in roots of pea plants. *Journal of Plant Physiology*, 159: 811–818.
- Fujii, H., Chiou, T.-J., Lin, S.-I., Aung, K., Zhu, J.-K., 2005. A miRNA involved in phosphate-starvation response in *Arabidopsis*. *Current Biology*, 15:2038–2043.
- Gangolli, S.d., Van Den Brandt, P.A., Feron, V.J., Jan-Zowesky, C., Koeman, J.H., Speijers, G.J.A., Spiegelhalter, B., Walker, R., Winshnok, J.S., 1994. Nitrate, nitrite and N-nitroso compounds. *European Journal of Pharmacology: Environmental Toxicology and Pharmacology Section*, 292: 1–38.
- Ganmore-Neumann, R. and Kafafi, U., 1980. Root temperature and percentage $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ effect on tomato plant development. I. Morphology and growth. *Agronomy Journal*, 72: 758–761.
- Ganmore-Neumann, R. and Kafafi, U., 1983. The effect of root temperature and $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ ratio on strawberry plants. I. Growth, flowering, and root development. *Agronomy Journal*, 75: 941–947.
- Gerendás, J., Ratcliffe, R.G., and Sattelmacher, B., 1995. The influence of nitrogen and potassium supply on the ammonium content of maize (*Zea mays* L.) leaves including a comparison of measurements made *in vivo* and *in vitro*. *Plant and Soil*, 173: 11–20.

- Gerendás, J. and Sattelmacher, B., 1997. Significance of N source (urea vs. NH_4NO_3) and Ni supply for growth, urease activity and nitrogen metabolism of zucchini (*Cucurbita pepo* convar. giromontiina). *Plant and Soil*, 196: 217–222.
- Gerendas, J., Zhu, Z., Bendixen, R., Ratcliffe, R.G., Sattelmacher, B., 1997. Physiological and biochemical processes related to ammonium toxicity in higher plants. *Z Pflanzenernaehr Bodenkd*, 160: 239–251.
- Gerendás, J. and Sattelmacher, B., 1999. Influence of Ni supply on growth and nitrogen metabolism of *Brassica napus* L. Grown with NH_4NO_3 or urea as N source. *Annales of Botany*, 83: 65–71.
- Gibon, Y., Blaesing, O.E., Hannemann, J., Carillo, P., Hohne, M., Hendriks, J.H., Palacios, N., Cross, J., Selbig, J., Stitt, M., 2004. A Robot-based platform to measure multiple enzyme activities in *Arabidopsis* using a set of cycling assays: comparison of changes of enzyme activities and transcript levels during diurnal cycles and in prolonged darkness. *Plant Cell* 16: 3304–3325.
- Gifford, M.L., Dean, A., Gutierrez, R.A., Coruzzi, G.M., Birnbaum, K.D., 2008. Cell-specific nitrogen responses mediate developmental plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105: 803–808.
- Gigon, A., Rorison, I.H., 1972. The response of some ecologically distinct plant species to nitrate- and to ammonium-nitrogen. *Journal of Ecology*, 60: 93–102.
- Givan, C.V., 1999. Evolving concepts in plant glycolysis: two centuries of progress. *Biology Reviews*, 74: 277–309.
- Glass, A.D.M. and Siddiqi, M.Y., 1995. Nitrogen absorption by plant roots, in *Nitrogen Nutrition in Higher Plants* (Srivastava, H.S. and Singh, R.P., eds), pp. 21–56.
- Glevarec, G., Bouton, S., Jaspard, E., Riou, M-T, Cliquet, J-B, Suzuki, A., Limami, A.M., 2004. Respective roles of glutamine synthetase/glutamate synthase cycle and glutamate dehydrogenase in ammonium and amino acid metabolism during germination and post-germinative growth in the model legume *Medicago truncatula*. *Planta*, 219: 286–297.
- Goodchild, J.A., Givan, C.V., 1990. Influence of Ammonium and Extracellular Ph on the Amino and Organic-Acid Contents of Suspension-Culture Cells of *Acer-Pseudoplatanus*. *Physiologia Plantarum*, 78: 29–37.
- Gray, G.R., Villarimo, A.R., Whithead, C.L., McIntosh, L., 2004. Transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) plants with increased expression levels of mitochondrial NADP^+ -dependent isocitrate dehydrogenase: Evidence implicating this enzyme in the redox activation of the alternative oxidase. *Plant Cell Physiology*, 45: 1413–1425.
- Greene, R., 2002. Oxidative Stress and Acclimation Mechanisms in Plants. *The Arabidopsis Book*, BioOne Publishers, Washington, pp. 1–20.
- Guo, S., Brueck, H., and Sattelmacher, B. 2002. Effects of supplied nitrogen form on growth and water uptake of French bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants. *Plant and Soil*, 239: 267–275.
- Guo, Y., Chen, F., Zhang, F., Mi, G., 2005. Auxin transport from shoot to root is involved in the response of lateral root growth to localized supply of nitrate in maize. *Plant Science*, 169: 894–900.
- Guo, S., Zhou, Y., Shen, Q., Zhang, F., 2006. Effect of ammonium and Nitrate Nutrition on Some Physiological Processes in Higher Plants – Growth, Photosynthesis, Photorespiration, and Water Relations. *Plant Biology*, 9: 21–29.

- Gupta, K.J., Zabalza, A., van Dongen, J.T., 2009. Regulation of respiration when the oxygen availability changes. *Physiologia Plantarum*, 137: 383–391
- Gutierrez, R.A., Lejay, L., Dean, A., Chiaromonte, F., Shasha, D.E., Coruzzi, G.M., 2007. Qualitative network models and genome-wide expression data define carbon/nitrogen-responsive molecular machines in *Arabidopsis*. *Genome Biology*, 8: 7-18.
- Gutierrez, R.A., Stokes, T.L., Thum, K., Xu, X., Obertello, M., Katari, M.S., Tanurdzic, M., Dean, A., Nero, D.C., McClung, C.R., et al., 2008. Systems approach identifies an organic nitrogen-responsive gene network that is regulated by the master clock control gene CCA1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105:4939-4944.
- Hagedorn, F., Bucher, J.B. and Schleppi, P., 2001. Contrasting Dynamics of dissolved inorganic and organic nitrogen in soil and surface waters of forested catchments with Gleysols. *Geoderma*, 100: 173–192.
- Halliwell, B., 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life, *Plant Physiology*, 141: 312-322.
- Hamid R. Roosta, Abdoreza Sajjadinia, Asghar Rahimi, Jan K. Schjoerring., 2009. Responses of cucumber plant to NH_4^+ and NO_3^- nutrition: The relative addition rate technique vs. cultivation at constant nitrogen concentration. *Scientia Horticulturae*, 121: 397–403.
- Hansen, J.M., Go, Y.M. and Jones, D.P., 2006. Nuclear and mitochondrial compartmentation of oxidative stress and redox signaling, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 46: 215-234.
- Harrison, J., Brugiere, N., Philipson, B., Ferrario-Mery, S., Becker, T., Limami, A., Hirel, B., 2000. Manipulating the pathway of ammonia assimilation through genetic engineering and breeding. Consequences of plant physiology and plant development. In: Martins-Loucao MA, Lips SH (eds) *Nitrogen in a sustainable ecosystem*. Backhuys Publishers, Leiden, pp 89–101
- Harper, J.F., 1984. Uptake of Organic Nitrogen Forms by Roots and Leaves. In *Nitrogen in Crop Production*. Ed. R D Hauck. pp. 165–170. American Society of Agronomy, Madison, WI.
- Hawkins, H.J. and Lewis, O.A.M., 1993. Combination effect of NaCl salinity, nitrogen form and calcium concentration on the growth, ionic content and gaseous exchange properties of *Triticum aestivum* L. cv. *Gamtoos*. *New Phytologist*, 124: 161–170.
- Hawkins, H.J., George, E., 2001. Reduced N-15-nitrogen transport through arbuscular mycorrhizal hyphae to *Triticum aestivum* L. supplied with ammonium vs. nitrate nutrition. *Annales of Botany*, 87: 303–311.
- Haynes, R.J. and Goh, K.M., 1978. Ammonium and nitrate nutrition of plants, *Biology Reviews*, 53: 465–510.
- Heldt, H.W., 1997. *Plant Biochemistry and Molecular Biology*. Oxford: Oxford University Press.
- Herrera-Estrella, L., 1999. Transgenic plants for tropical regions: Some considerations about their development and their transfer to the small farmer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96: 5978-5981.

- Heuer, B., 1991. Growth, photosynthesis and protein content in cucumber plants as affected by supplied nitrogen form. *Journal of Plant Nutrition*, 14: 363–373.
- Hodge, A., 2001. Arbuscular mycorrhizal fungi influence decomposition of, but not plant nutrient capture from, glycine patches in soil. *New Phytologist*, 151: 725–734.
- Hodges, D.M., Delong, J.M., Forney, C.F., Prange, R.K., 1999. Improving the thiobarbituric acid-reactive substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*, 207: 604–611.
- Hoefnagel, M.H.N., Millar, A.H., Wiskich, J.T., Day, D.A., 1995. Cytochrome and alternative respiratory pathways compete for electrons in the presence of pyruvate in soybean mitochondria. *Archive of Biochemistry and Biophysics*, 318:394–400.
- Hoffmann, A., Milde, S., Desel, C., Humpel, A., Kaiser, H., Hammes, E., Piippo, M., Soitamo, A., Aro, E.M., Gerendas, J., Sattelmacher, B. and Hansen, U.P., 2007. N form-dependent growth retardation of *Arabidopsis thaliana* seedlings as revealed from physiological and microarray studies, *Journal of Plant Nutrition and Soil Science-Zeitschrift Fur Pflanzenernahrung Und Bodenkunde*, 170: 87–97.
- Hogh-Jensen, H. and Schjoerring, J.K., 1997. Effects of drought and inorganic N form on nitrogen fixation and carbon isotope discrimination in *Trifolium repens*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 35: 55–62.
- Holldampf, B., Barker, A.V., 1993. Effects of ammonium on elemental nutrition of red spruce and indicator plants grown in acid soil. *Community of Soil Science and Plant Analytics*, 24: 1945–1957.
- Houdusse, F., Zamarren˜o, A.M., Garnica, M., Garcı́a-Mina, J., 2005. The importance of nitrate in ameliorating the effects of ammonium and urea nutrition on plant development: the relationships with freePAs and plant proline contents. *Funct Plant Biology*, 32: 1057–67.
- Huppe, H.C., Turpin, D.H., 1994. Integration of carbon and nitrogen metabolism in plant and algal cells. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 45:577–607.
- Igamberdiev, A.U., Gardeström, P., 2003. Regulation of NAD- and NADP-dependent isocitrate dehydrogenases by reduction levels of pyridine nucleotides in mitochondria and cytosol of pea leaves. *Biochimica Biophysica et Acta*, 1606: 117–125.
- Ito, Y., Saisho, D., Nakazono, M., Tsutsumi, N., Hiari, A., 1997. Transcript levels of tandem-arranged alternative oxidase genes in rice are increased by low temperature. *Gene*, 203: 121–129.
- Jones, D.L., Owen, A.G. and Farrar, J.F., 2002. Simple method to enable the high resolution determination of total free amino acids in soil solutions and soil extracts. *Soil Biology and Biochemistry*, 34: 1893–1902.
- Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P., 2004. Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Molecular Cell*, 14:787–799.
- Joo, J.H., Bae, Y.S. and Lee, J.S., 2001. Role of auxin-induced reactive oxygen species in root gravitropism, *Plant Physiology*, 126: 1055–1060.

- Khamis, S. and Lamaze, T., 1990. Maximal biomass production can occur in corn (*Zea mays*) in the absence of NO_3^- accumulation in either leaves or roots. *Physiologia Plantarum*, 78: 388–394.
- Khan, M.G., Silberbush, M., and Lips, S. H., 1994. Physiological studies on salinity and nitrogen interaction in alfalfa. II. Photosynthesis and transpiration. *Journal of Plant Nutrition*, 17: 669–682.
- Kotsiras, A., Olympios, C.M., Passam, H.C., 2005. Effects of nitrogen form and concentration on yield and quality of cucumbers grown on rockwool during spring and winter in southern Greece. *Journal of Plant Nutrition*, 28: 2027–2035.
- Kronzucker, H.J., Siddiqi, M.Y. and Glass, A.D.M., 1997. Conifer root discrimination against soil nitrate and the ecology of forest succession. *Nature*, 385: 59–61.
- Krupa, S.V., 2003. Effects of atmospheric ammonia (NH_3) on terrestrial vegetation: a review. *Environmental Pollution*, 124: 179–221.
- Lager, I., Andreasson, O., Dunbar, T.L., Andreasson, E., Escobar, M.A., Rasmusson, A.G., 2010. Changes in external pH rapidly alter plant gene expression and modulate auxin and elicitor responses. *Plant, Cell and Environment*, 33: 1513–1528.
- Laloi, C., Rayanpuram, N., Chartier, Y., Grienberger, J.M., Bonnard, G., Meyer, Y., 2001. Identification and characterization of mitochondrial thioredoxin system in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98: 14144–14149.
- Lamb, M.J., Clough, G.H., Hemphill, D.D., 1993. Pretransplant watermelon nutrition with various nitrate:ammonium ratios and supplemental calcium. *Horticultural Science*, 28: 101–103.
- Lambers, H., 1982. Cyanide-resistant respiration: a non-phosphorylating electron transport pathway acting as an energy overflow. *Physiologia Plantarum*, 55: 478–85.
- Lancien, M., Gadal, P. and Hodges, M., 2000. Enzyme redundancy and the importance of 2-oxoglutarate in higher plant ammonium assimilation. *Plant Physiology*, 123: 817–824.
- Larsen, P.O., Cornwell, K.L., Gee, S.L. and Bassham, J.A., 1981. Amino-Acid Synthesis in Photosynthesizing Spinach Cells - Effects of Ammonia on Pool Sizes and Rates of Labeling from $\text{Co-}^{14}(2)$, *Plant Physiology*, 68: 292–299.
- Lasa, B., Frechilla, S., Lamsfus, P.M., Tejo, A., 2001. The sensitivity to ammonium nutrition is related to nitrogen accumulation. *Scientia Horticulturae*, 91: 143–152.
- Lasa, B., Frechilla, S., Aparicio-Tejo, P.M., Lamsfus, C., 2002. Alternative pathway respiration is associated with ammonium ion sensitivity in spinach and pea plants. *Plant Growth Regulation*, 37: 49–55.
- Leacox, J.D. and Syvertsen, J.P., 1995. Nitrogen Uptake By Citrus Leaves. *Journal of American Society of Horticultural Science*, 120: 505–509.
- Leidi, E.O., Silberbush, M., Soares, M. I. M., and Lips, S. H., 1992. Salinity and nitrogen nutrition studies on peanut and cotton plants. *Journal of Plant Nutrition*, 15: 591–604.
- Leport, L., Kandlbinder, A., Bauer, B., Kaiser, W.M., 1996 Diurnal modulation of phosphoenolpyruvate carboxylation in pea leaves and roots as related to tissue malate concentrations and to the nitrogen source. *Planta*, 198: 495–501

- Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., et al., 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*, 186: 464–478.
- Lewis, O.A.M., 1986. *Plants and nitrogen*. Edward Arnold Publishers Ltd., London.
- Lewis, O.A.M., Leidi, E.O., and Lips, S.H., 1989. Effect of nitrogen source on growth response to salinity stress in maize and wheat. *New Phytologist*, 111: 155–160.
- Linkohr, B.I., Williamson, L.C., Fitter, A.H., Leyser, H.M.C., 2002. Nitrate and phosphate availability and distribution have different effects on root system of architecture of *Arabidopsis*. *Plant J*, 29:751–60.
- Lips, S.H., Leidi, E.O., Silberbush, M., Soares, M.I.M., and Lewis, O.E.M., 1990. Physiological aspects of ammonium and nitrate fertilization. *Journal of Plant Nutrition*, 13:1271–1289.
- Liu, Y.J., Norberg, F.E.B., Szilagyi, A., De Paepe, R., Åkerlund, H.E., Rasmusson, A.G., 2008. The mitochondrial external NADPH dehydrogenase modulates the leaf NADPH/NADP⁽⁺⁾ ratio in transgenic *Nicotiana sylvestris*. *Plant and Cell Physiology*, 49: 251–263.
- Lopez-Bucio J, Campos-Cuevas JC, Hernández-Calderón E., 2007. "Bacillus megaterium rhizobacteria promote growth and alter root-system architecture through an auxin- and ethylene-independent signaling mechanism in *Arabidopsis thaliana*". *Mol. Plant Microbe Interact.* 20 (2): 207–217.
- Loque, D. and von Wiren, N., 2004. Regulatory levels for the transport of ammonium in plant roots. *Journal of Experimental Botany*, 55: 1293–1305.
- Loulakakis, K.A., Roubelakis-Angelakis, K.A., Kanellis, A.K., 1994. Regulation of glutamate dehydrogenase and glutamine synthetase in avocado fruit during development and ripening. *Plant Physiology*, 106:217–222
- Luo, J., Tillman, R.W. and Ball, P.R., 2000. Nitrogen loss through denitrification in a soil under pasture in New Zealand. *Soil Biology and Biochemistry*, 32: 497–509.
- Magalhaes, J.R. and Wilcox, G.E., 1983. Tomato growth and mineral composition as influenced by nitrogen form and light intensity. *Journal of Plant Nutrition*, 6: 847–862.
- Magalhaes, J.R. and Wilcox, G.E., 1984. Ammonium toxicity development in tomato plants relative to nitrogen form and light intensity. *Journal of Plant Nutrition*, 7: 1477–1496.
- Magalhaes, J.R., Huber, D.M., 1989. Ammonium assimilation in different plant species as affected by nitrogen form and pH control in solution culture. *Fertiliser Research*, 21: 1–6
- Magalhaes, J.R. and Huber, D.M., 1991. Response of ammonium assimilation enzymes to nitrogen form treatments in different plant species. *Journal of Plant Nutrition* 14: 175–185.
- Majerowicz, N., Kerbaudy, G.B., Nievola, C.C., Suzuki, R.M., 2000. Growth and nitrogen metabolism of *Catasetum fimbriatum* (Orchidaceae) grown with different nitrogen sources. *Environmental and Experimental Botany*, 44: 195–206
- Majerowicz, N. and Kerbaudy, G.B., 2002. Effects of nitrogen forms on dry matter partitioning and nitrogen metabolism in two contrasting genotypes of *Catasetum fimbriatum* (Orchidaceae). *Environmental and Experimental Botany*, 47: 249–258.

- Maria Dolores Dominguez-Valdivia, Pedro Maria Aparicio-Tejo, Carmen Lamsfus, Cristina Cruz, Maria Amelia Martins-Louçao and Jose Fernando Moran. 2008. Nitrogen nutrition and antioxidant metabolism in ammonium-tolerant and -sensitive plants. *Physiologia Plantarum*, 132: 359–369.
- Maria Garnica, Fabrice Houdusse, Jean Claude Yvin, Jose, M., Garcia-Mina. 2009. Nitrate supply induces changes in polyamine content and ethylene production in wheat plants grown with ammonium. *Journal of Plant Physiology*, 166: 363–374.
- Martins-Louçao, M.A., Cruz, C., 1999. Role of nitrogen source in carbon balance. In: Srivastava (ed) *Nitrogen nutrition and plant growth*. New Delhi, pp 231–282
- Matsumoto, H., Tamura, K., 1981. Respiratory stress in cucumber roots treated with ammonium or nitrate nitrogen. *Plant and Soil*, 60: 195–204.
- Maxwell, D.P., Wang, Y., McIntosh, L., 1999, The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 96: 12246–12251
- McCabe, T.C., Finnegan, P.M., Millar, A.H., Day, D.A., Whelan, J., 1998. Differential expression of alternative oxidase genes in soybean cotyledons during postgerminative development. *Plant Physiology*, 118: 675–682
- McDonald, A.E. and Vanlerberghe, G.C. 2006. The organization and control of plant mitochondrial metabolism. In: *Control of Primary Metabolism in Plants*. pp. 290–324. Plaxton, W.C. and McManus, M.T., Eds., *Annual Plant Reviews*, volume 22, Blackwell Publishing, Oxford.
- Medici, L.O., Azevedo, R.A., Smith, R.J., Lea, P.J., 2004. The influence of nitrogen supply on antioxidant enzymes in plant roots. *Function in Plant Biology* 31: 1–9.
- Meeuse, B.J.D., 1975. Thermogenic respiration in aroids. *Annual Reviews in Plant Physiology*, 26: 117–126
- Mifflin, B.J., Lea, P.J., 1980. Ammonium assimilation. In: Mifflin BJ (ed) *The biochemistry of plants*. Academic, New York, pp 169–202.
- Migge, A. and Becker, T.W., 1996. In tobacco leaves, the genes encoding the nitrate-reducing or the ammonium-assimilating enzymes are regulated differently external nitrogen-sources, *Plant Physiology and Biochemistry*, 34: 665–671.
- Millar, A.H., Wiskich, J.T., Whelan, J., Day, D.A., 1993. Organic acid activation of the alternative oxidase of plant mitochondria. *FEBS Letter*, 329: 259–262
- Millenaar, F.F., Lambers, H., 2003. The alternative oxidase: In vivo regulation and function. *Plant Biology*, 5: 2–15
- Miller, A.J., Cramer, M.D., 2004. Root nitrogen acquisition and assimilation. *Plant and Soil*, 274: 1–36.
- Mittler, R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Science*, 7: 405–410.
- Mockler, T.C., Michael, T.P., Priest, H.D., Shen, R., Sullivan, C.M., Givan, S.A., McEntee, C., Kay, S.A., Chory, J., 2007. The Diurnal Project: Diurnal and Circadian Expression Profiling, Model-based Pattern Matching, and Promoter Analysis. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 72: 353–363.
- Moody E.D., 2001. Genomics techniques: An overview of methods for the study of gene expression. *Journal of Animal Science*, 79: 128–135.
- Møller, I.M., 2001. Plant mitochondria and oxidative stress: Electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annual Reviews in Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 52: 561–591.

- Nagy, K.A., Seymour, R.A., Odell, D.K., 1972. Temperature regulation by inflorescence of *Philodendron*. *Science*, 178: 1195-1196
- Nakano, Y., Asada, K., 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology*, 22: 867-880.
- Nimptsch, J., Pflugmacher, S., 2007. Ammonia triggers the promotion of oxidative stress in the aquatic macrophyte *Myriophyllum lammattogrossense*. *Chemosphere*, 66: 708-714.
- Noctor, G., Foyer, C.H., 1998. Use of mitochondrial electron transport mutants to evaluate the effects of redox state on photosynthesis, stress tolerance and the integration of carbon/nitrogen metabolism. *Journal of Experimental Botany*, 55: 49-57
- Noctor, G., De Paepe, R., Foyer, C.H., 2007. Mitochondrial redox biology and homeostasis in plants. *Trends Plant Science*, 12: 125-134
- Omata, T., 1995. Structure, function and regulation of the nitrate transport system of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC7942. *Plant Cell Physiology*, 36: 207-213.
- Owen, A.G. and Jones, D.L., 2001. Competition for amino acids between wheat roots and rhizosphere microorganisms and the role of amino acids in plant N acquisition. *Soil Biology and Biochemistry*, 33: 651-657.
- Palenchar, P.M., Kouranov, A., Lejay, L.V., Coruzzi, G.M., 2004. Genome-wide patterns of carbon and nitrogen regulation of gene expression validate the combined carbon and nitrogen (CN)-signaling hypothesis in plants. *Genome Biology*, 5:R91.
- Pasqualini, S., Ederli, L., Piccioni, C., Batini, P., Bellucci, M., Arcioni, S., Antonielli, M., 2001. Metabolic regulation and gene expression of root phosphoenolpyruvate carboxylase by different nitrogen sources. *Plant Cell and Environment*, 24: 439-447
- Patterson, K., Cakmak, T., Cooper, A., Lager, I., Rasmusson, A.G., Escobar, M.A., 2010. Distinct signalling pathways and transcriptome response signatures differentiate ammonium- and nitrate-supplied plants. *Plant, Cell and Environment*, 33 (9): 1486-1501.
- Pate, J.S., Layzell, D.B., 1990. Energetic and biological costs of nitrogen assimilation. In: Miflin, B.J., Lea, P.J. (Eds.), *The Biochemistry of Plants. A Comprehensive Treatise*. Academic Press, San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto, pp. 1-42.
- Pearson, J., Stewart, G.R., 1993. The deposition of atmospheric ammonia and its effects on plants. *New Phytologist*, 125: 283-305
- Peckol, P., Rivers, J.S., 1995. Physiological responses of the opportunistic macroalgae *Cladophora vagabunda* (L.) van den Hoek and *Gracilaria tikvahiae* (MacLachlan) to environmental disturbances associated with eutrophication. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 23: 122-127
- Peng, M., Bi, Y.M., Zhu, T., Rothstein, S.J., 2007. Genome-wide analysis of *Arabidopsis* responsive transcriptome to nitrogen limitation and its regulation by the ubiquitin ligase gene *NLA*. *Plant Molecular Biology*, 65: 775-797.
- Pill, W. G. and Lambeth, V.N., 1977. Effects of NH_4^+ and NO_3^- nutrition with and without pH adjustment on tomato growth, ion composition, and water relations. *Journal of American Society Horticultural Science*, 102: 78-81.

- Plaxton, W.C., 2006. Metabolic flexibility helps plants to survive stress. Web-Essay for Chapter 11 (Respiration) of the 4th Edition of Plant Physiology. Taiz, L. and Zeigler, E., Eds. URL: <http://www.plantphys.net/article.php?ch=e&id=124>.
- Price, J., Laxmi, A., St. Martin, S.K., Jang, J-C., 2004. Global transcription profiling reveals multiple sugar signal transduction mechanisms in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 16:2128-2150.
- Puntarulo, S., Sanchez, R.A., Boveris, A., 1988. Hydrogen peroxide metabolism in soybean embryonic axes at the onset of germination. *Plant Physiology*, 86:626–30.
- Purvis, A.C., Shewfelt, R.L., 1993. Does the alternative pathway ameliorate chilling injury in sensitive plant tissues? *Physiologia Plantarum*, 88: 712–718.
- Purvis, A.C., 1997. Role of the alternative oxidase in limiting superoxide production by plant mitochondria. *Physiologia Plantarum*, 100:165–70
- Qian, X., Shen, Q., Xu, G., Wang, J., and Zhou, M., 2004. Nitrogen form effects on yield and nitrogen uptake of rice crop grown in aerobic soil. *Journal of Plant Nutrition*, 27: 1061–1076.
- Qiuying, T., Fanjun, C., Jinxin, L., Fusuo, Z., Guohua, M., 2008. Inhibition of maize root growth by high nitrate supply is correlated with reduced IAA levels in roots *Journal of Plant Physiology*, 165: 942-951.
- Queval, G., Noctor, G., 2007. A plate reader method for the measurement of NAD, NADP, glutathione, and ascorbate in tissue extracts: Application to redox profiling during *Arabidopsis* rosette development. *Analytic Biochemistry*, 363, 58-69.
- Raab, T.K. and Terry, N., 1994. Nitrogen-source regulation of growth and photosynthesis in *Beta vulgaris* L. *Plant Physiology*, 105: 1159– 1166.
- Rabalais, N.N., 2002. Nitrogen in aquatic ecosystems. *Ambio*, 31: 102–112.
- Rachmilevitch, S., Cousins, A.B., and Bloom, A. J., 2004. Nitrate assimilation in plant shoots depends on photorespiration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 101: 11506–11510.
- Ragab, S.M., 1980. Water uptake and trans-potential in sunflower roots as influenced by ammonium ions. *Journal of Agricultural Science*, 94: 145–150.
- Rahayu, Y.S., Walch-LiuP, Neumann, G., Roßmheld, V., Von Wire'nN, Bangerth, F., 2005. Root-derived cytokinins as long-distance signals for NO₃⁻ induced stimulation of leaf growth. *Journal of Experimental Botany*, 56: 1143–52.
- Rasmusson, A.G., Soole, K.L., Elthon, T.E., 2004. Alternative NAD(P)H dehydrogenases of plant mitochondria. *Annual Review in Plant Biology*, 55: 23-29
- Rasmusson, A.G., Alisdair, R., Fernie and Joost T., van Dongen., 2009. Alternative oxidase: a defence against metabolic fluctuations? *Physiologia Plantarum*, 137: 371-382.
- Raven, J. and Smith, F., 1976. Nitrogen assimilation and transport in vascular land plants in relation to intracellular pH regulation. *New Phytologist*, 76: 415–431.
- Raven, J.A., 1985. Regulation of pH and generation of osmolarity in vascular plants: a cost-benefit analysis in relation to efficiency of use of energy, nitrogen and water. *New Phytologist*, 101: 25–77.
- Raven, J.A. and Farquhar, G.D., 1990. The influence of N metabolism and organic acid synthesis on the natural abundance of isotopes of carbon in plants. *New Phytologist*, 116: 505–529.

- Rawat, S.R., Silim, S.N., Kronzucker, H.J., Siddiqi, M.Y., Glass, A.D.M., 1999. AtAMT1 gene expression and NH_4^+ uptake in roots of *Arabidopsis thaliana*: evidence for regulation by root glutamine levels. *Plant Journal*, 19: 143-152.
- Redinbaugh, M.G., and Campbell, W.H., 1998. Nitrate regulation of the oxidative pentose phosphate pathway in maize (*Zea mays* L.) root plastids: induction of 6-phosphogluconate dehydrogenase activity, protein and transcript levels. *Plant Science*, 134: 129-140.
- Ren, Q.H., Chen, K.X., Paulsen, I.T., 2007. TransportDB: a comprehensive database resource for cytoplasmic membrane transport systems and outer membrane channels. *Nucleic Acids Research*, 35: 274-279.
- Reisenauer, H.M., 1978. Absorption and utilization of ammonium nitrogen by plants. *In* Nitrogen in the environment, Vol II. Eds. Nielsen, D.R. and McDonald, J.G., pp. 157-170. Academic Press, London New York.
- Rhodas, D.M., Umbach, A.L., Sweet, C.R., Lennon, A.M., Rauch, G.S., Siedow, J.N., 1998. Regulation of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria-identification of the cysteine residue involved in alpha-keto acid stimulation and intersubunit disulfide bond formation. *Journal of Biological Chemistry*, 273: 30750-30756
- Rhoadas, D.M., Subbaiah, C.C., 2007. Mitochondrial retrograde regulation in plants. *Mitochondrion*, 7: 177-194
- Ribas-Carbo, M., Taylor, N.L., Giles, L., Busquets, S., Finnegan, P. M., Day, D.A., Lambers, H., Medrano, H., Berry, J.A. and Flexas, J., 2005. Effects of water stress on respiration in soybean (*Glycine max*. L.) leaves. *Plant Physiology*, 139: 466-473.
- Robinson, D., 2001. Root proliferation, nitrate inflow and their carbon costs during nitrogen capture by competing plants. *Plant and Soil*, 232:41-50
- Romano, N., Zeng, C., 2007. Acute toxicity of ammonia and its effects on the haemolymphosmolality, ammonia-N,pHandioniccomposition of early juvenile mudcrabs, *Scyllaserrata* (Forsk ° al). *Complicated Biochemistry: Physiology Section A*, 148: 278-285.
- Roosta, H.R., Schjoerring, J.K., 2007. Effects of ammonium toxicity on nitrogen metabolism and elemental profile of cucumber (*Cucumis sativus* L., cv. Styx) plants. *Journal of Plant Nutrition*, 30: 1933-1951.
- Rosswall, T., 1983. C, N, P, and S Cycles:Major Reservoirs and Fluxes – The Nitrogen Cycle. *In* The Major Biogeochemical Cycles and Their Interactions. Eds. B Bolin and R B Cook. Scientific Committee on Problems of the Environment (SCOPE)
- Rufty Jr., T.W., Huber, S.C. and Volk, R.J., 1988. Alterations in leaf carbohydrate metabolism in response to nitrogen stress. *Plant Physiology*, 88: 725-730.
- Rufty Jr., T.W., MacKown, C.T. and Volk, R.J., 1990. Alterations in nitrogen assimilation and partitioning in nitrogen stressed plants. *Physiologia Plantarum*, 79: 85-95.
- Saisho, D., Nambra, E., Naito, S., Tsutsumi, N., Hirai, A., Nakazono, M., 1997. Characterization of the gene family for alternative oxidase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 35: 585-596
- Sakakibara, H., 2003. Nitrate-specific and cytokinin-mediated nitrogen signaling pathways in plants. *Journal of Plant Research*, 116:253-257.

- Sakakibara, H., Takei, K., Hirose, N., 2006. Interactions between nitrogen and cytokinin in the regulation of metabolism and development. *Trends in Plant Science*, 11:440-448.
- Salsac, L., Chaillou, S., Morot-Gaudry, J.F., Lesaint, C. and Jolivet, E., 1987. Nitrate and Ammonium Nutrition in Plants, *Plant Physiology and Biochemistry*, 25: 805-8
- Scheible, W.R., Gonzalez-Fontes, A., Lauerer, M., MullerRober, B., Caboche, M. and Stitt, M., 1997. Nitrate acts as a signal to induce organic acid metabolism and repress starch metabolism in tobacco, *Plant Cell.*, 9: 783-798.
- Scheible, W.R., Lauerer, M., Schulze, E.D., Caboche, M., Stitt, M., 1997. Accumulation of nitrate in the shoot acts as a signal to regulate shoot-root allocation in tobacco. *Plant Journal*, 11:671-91.
- Scheible, W.R., Gonzales-Fontes, A., Morcuende, R., Lauerer, M., Geiger, M., Glaab, J., Gojon, A., Schultz, E. and Stitt, M., 1997. Tobacco mutants with decreased number of functional *nir* genes compensate by modifying the diurnal regulation of transcription, post-translational modification and turnover of nitrate reductase. *Planta*, 203: 304-319.
- Scheible, W.R., Morcuende, R., Czechowski, T., Fritz, C., Osuna, D., Palacios-Rojas, N., Schindelasch, D., Thimm, O., Udvardi, M.K., Stitt, M., 2004. Genome-wide reprogramming of primary and secondary metabolism, protein synthesis, cellular growth processes, and the regulatory infrastructure of *Arabidopsis* in response to nitrogen. *Plant Physiol*, 136:2483-2499.
- Schenk, M., Wehrmann, J., 1979. The influence of ammonium in nutrient solution on growth and metabolism of cucumber plants. *Plant and Soil*, 52: 403-414
- Schilling, G., Adgo, E., Schulze, J., 2006. Carbon costs of nitrate reduction in broad bean (*Vicia faba* L.) and pea (*Pisum sativum* L.) plants. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 169: 691-698.
- Schortemeyer, M., Feil, B., and Stamp, P., 1993. Root morphology and nitrogen uptake of maize simultaneously supplied with ammonium and nitrate in a split-root system. *Annals of Botany*, 72: 107-115.
- Schumacher, H.J., Sommer, K., 2001. Cultivation of potatoes by the CULTAN cropping system. Poster presented at international congress of International Plant Nutrition Colloquium (IPNC), Hannover, Germany.
- Seymour, R.S., White, C.R., Gibernau, M., 2003. Environmental Biology: Heat reward for insect pollinators. *Nature.*, 426: 243-244.
- Sharma, S.S., Dietz, K.J., 2008. The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. *Trends in Plant Science*, 14:43-50.
- Shin, R., Berg, R.H., Schachtman, D.P., 2005. Reactive oxygen species and root hairs in *Arabidopsis* root response to nitrogen, phosphorus and potassium deficiency. *Plant Cell Physiology*, 46: 1350-1357.
- Siddiqi, M.Y., Malhotra, B., Min, X., Glass, A.D.M., 2002. Effects of ammonium and inorganic carbon enrichment on growth and yield of a hydroponic tomato crop. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 165: 191-197.
- Siedow, J.A., and Umbach, A.L., 2000. The mitochondrial cyanide-resistant oxidase: structural conservation amid regulatory diversity. *Biochimica Biophysica et Acta*, 1459: 432-439.

- Sieger, S.M., Kristensen, B.K., Robson, C.A., Amirsadeghi, S., Eng, E.W., Abdel-Mesih, A., Møller, I.M., Vanlerberghe, G.C., 2005. The role of alternative oxidase in modulating carbon use efficiency and growth during macronutrient stress in tobacco cells. *Journal of Experimental Botany*, 56: 1499–1515
- Signora, L., De Smet, I., Foyer, C.H. and Zhang, H., 2001. ABA plays a central role in mediating the regulatory effects of nitrate on root branching in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 28: 655–662.
- Silveira, J.A.G., Matos, J.C.S., Cecatto, V.M., Viegas, R.A., Oliveira, J.T.A., 2001. Nitrate reductase activity, distribution, and response to nitrate in two contrasting *Phaseolus* species inoculated with *Rhizobium* spp. *Environmental and Experimental Botany*, 46: 37–46.
- Simons, B.H., Millenaar, F.F., Mulder, L., Van Loon, L.C., Lambers, H., 1999. Enhanced expression and activation of the alternative oxidase during infection of *Arabidopsis* with *Pseudomonas syringae* pv tomato. *Plant Physiology*, 120: 529–538
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytic Biochemistry*, 150: 76–85.
- Smyth, G.K., 2004. Limma: Linear models for microarray data. In R Gentleman, V Carey, S Dudoit, R Irizarry, W Huber, eds, *Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor*. Springer, New York, pp 397–420.
- Somerville, C.R., Ogren, W.L., 1982. Isolation of photorespiration mutants in *Arabidopsis thaliana*. In *Methods in Chloroplast Biology* (Eldeman, M., Hallick, R.B. and Chua, N.H., eds). New York: Elsevier Biomedical Press, pp. 129–138.
- Sonoda, Y., Ikeda, A., Saiki, S., von Widen, N., Yamaya, T. and Yamaguchi, J., 2003. Distinct expression and function of three ammonium transporter genes (OsAMT1;1-1;3) in rice, *Plant and Cell Physiology*, 44: 726–734.
- Srivastava, H.S., Singh, R.P., 1987. Role and regulation of L-glutamate dehydrogenase activity in higher plants. *Phytochemistry*, 26: 597–610
- Stitt, M., Krapp, A., 1999. The molecular physiological basis for the interaction between elevated carbon dioxide and nutrients. *Plant Cell Environment*, 22: 583–622.
- Stitt, M., 1999. Nitrate regulation of metabolism and growth. *Current Opinion in Plant Biology*, 2: 178–186.
- Stitt, M., Feil, R., 1999. Lateral root frequency decreases when nitrate accumulates in tobacco transformants with low nitrate reductase activity: consequences for the regulation of biomass partitioning between shoots and root. *Plant and Soil*, 215: 143–53.
- Stitt, M., Muller, C., Matt, P., Gibon, Y., Carillo, P., Morcuende, R., Scheible, W.R. and Krapp, A., 2002. Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism. *Journal of Experimental Botany*, 53: 959–970.
- Strong, D.T. and Fillery, I.R.P., 2002. Denitrification response to nitrate concentrations in sandy soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 34: 945–954.
- Takei, K., Takahashi, T., Sugiyama, T., Yamaya, T., Sakakibara, H., 2002. Multiple routes communicating nitrogen availability from roots to shoots: a signal

- transduction pathway mediated by cytokinin. *Journal of Experimental Botany*, 53:971-977.
- Takei, K., Ueda, N., Aoki, K., Kuromori, T., Hirayama, T., Shinozaki, K., Yamaya, T., Sakakibara, H., 2004, AtIPT3 is a key determinant of nitratedependent cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiology*, 45:1053-1062.
- Tamas, L., Dudikovi, J., Durcekove, K., Huttove, J., Mistrik, I., Zelinova, V., 2008. The impact of heavy metals on the activity of some enzymes along the barley root. *Environmental and Experimental Botany*, 62: 86–91.
- Tan, X.W., Ikeda, H. and Oda, M., 2000. The absorption, translocation, and assimilation of nitrate or assimilation of urea, nitrate or ammonium in tomato plants at different plant growth stages in hydroponic culture. *Scientia Horticulturae*, 84: 275–283.
- Terce-Laforgue, T., Mack, G., and Hirel, B., 2004. New insights towards the function of glutamate dehydrogenase revealed during source-sink transition of tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants grown under different nitrogen regimes. *Physiologia Plantarum*, 120: 220–228.
- Thimm, O., Blasing, O., Gibon, Y., Nagel, A., Meyer, S., Krüger, P., Selbig, J., Müller, L.A., Rhee, S.y, Stitt, M., 2004. MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *The Plant Journal*, 37: 914-939.
- Tian, Q., Chen, F., Zhang, F., Mi, G., 2005. Possible involvement of cytokinin in nitrate-mediated root growth in maize. *Plant and Soil*, 277:185–96.
- Tischner, R., 2000. Nitrate uptake and reduction in higher and lower plants. Invited review. *Plant Cell and Environment*, 23: 1005–1024.
- Tiwari, B.S., Belenghi, B. and Levine, A., 2002. Oxidative stress increased respiration and generation of reactive oxygen species, resulting in ATP depletion, opening of mitochondrial permeability transition, and programmed cell death. *Plant Physiology*, 128: 1271–1281.
- Tranbarger, T.J., Al-Ghazi, Y., Muller, B., Teyssendier De La Serve, B., Doumas, P., Touraine, B., 2003. Transcription factor genes with expression correlated to nitrate-related root plasticity of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environment*, 26: 459–469.
- Umbach, A.L., Siedow, J.N., 1993. Covalent and noncovalent dimers of the cyanide resistant alternative oxidase protein in higher-plant mitochondria and their relationship to enzyme activity. *Plant Physiology*, 103: 845-854.
- Umbach, A.L., Fiorani, F., Siedow, J.N., 2005. Characterization of transformed *Arabidopsis* with altered alternative oxidase levels and analysis of effects on reactive oxygen species in tissue. *Plant Physiology*, 139: 1806-1820.
- Upadhyaya, A., Sankhla, D., Davis, T.D., Sankhla, N., Smith, B.N., 1985. Effect of paclobutrazol on the activities of some enzymes of activated oxygen metabolism and lipid peroxidation in senescing soybean leaves. *Journal of Plant Physiology*, 121: 453-461.
- Usadel, B., Nagel, A., Thimm, O., Redestig, H., Blaesing, O.E., Palacios-Rojas, N., Selbig, J., Hannemann, J., Piques, M.C., Steinhauser, D., Scheible, W.R., Gibon, Y., Morcuende, R., Weicht, D., Meyer, S., Stitt, M., 2005. Extension of the visualization tool MapMan to allow statistical analysis of arrays, display of

- coresponding genes, and comparison with known responses. *Plant Physiology*, 138: 1195-1204.
- Vance, C.P., Uhde-Stone, C. and Allan, D.L., 2003. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytologist*, 157: 423-447.
- Van der, Eerden, L., 1998. Nitrogen on microbial and global scales. *New Phytologist*, 139: 201-204.
- Vanlerberghe, G.C., Day, D.A., Wiskich, J.T., Vanlerberghe, A.E., McIntosh, L., 1995. Alternative oxidase activity in tobacco leaf mitochondria - dependence on tricarboxylic-acid cycle-mediated redox regulation and pyruvate activation. *Plant Physiology*, 109: 353-361.
- Vanlerberghe, G.C., McIntosh, L., 1997. Alternative oxidase: From gene to function. *Annu Rev lant Physiol Plant Mol Biol.*, 48: 703-734.
- Vercesi, A.E., 2001. The discovery of an uncoupling mithochondrial protein in plants. *Bioscience Reports*, 21: 195-200.
- Vessey, J.K. and Layzell, D.B., 1987. Regulation of assimilate partitioning in soybean. Initial effects following change in nitrate supply. *Plant Physiology*, 83: 341-348.
- Von Wiren, N., Gazzarrini, S. and Frommer, W.B., 1997. Regulation of mineral nitrogen uptake in plants. *Plant and Soil*, 196: 191-199 .
- Vuylsteker, C., Leleu, O., Rambour, S., 1997. Influence of BAP and NAA on the expression of nitrate reductase in excised chicory roots. *Journal of Experimental Botany*, 48: 1079-1085.
- Wagner, A.M., Krab, K., 1995. The alternative respiration pathway in plants: Role and regulation. *Physiologia Plantarum*, 95: 318-325.
- Walch-Liu, P., Neumann, G., Bangerth, F. and Engels, C., 2000. Rapid effects of nitrogen form on leaf morphogenesis in tobacco. *Journal of Experimental Botany*, 51: 227-237.
- Walch-Liu, P., Ivanov, I.I., Filleur, S., Gan, Y., Remans, T., Forde, B.G., 2006. Nitrogen regulation of root branching. *Annales of Botany*, 97:875-881.
- Wang, X., Below, F.E., 1996. Cytokinins in enhanced growth and tillering of wheat induced by mixed nitrogen source. *Crop Science* 36: 121-126.
- Wang, R.C., Guegler, K., LaBrie, S.T. and Crawford, N.M., 2000. Genomic analysis of a nutrient response in *Arabidopsis* reveals diverse expression patterns and novel metabolic and potential regulatory genes induced nitrate, *Plant Cell*, 12: 1491-1509.
- Wang, R.C., Okamoto, M., Xing, X.J. and Crawford, N.M., 2003. Microarray analysis of the nitrate response in *Arabidopsis* roots and shoots reveals over 1,000 rapidly responding genes and new linkages to glucose, trehalose-6-phosphate, iron, and sulfate metabolism, *Plant Physiology*, 132: 556-567.
- Wang, R.C., Tischner, R., Gutierrez, R.A., Hoffman, M., Xing, X.J., Chen, M.S., Coruzzi, G. and Crawford, N.M., 2004. Genomic analysis of the nitrate response using a nitrate reductase-null mutant of *Arabidopsis*, *Plant Physiology*, 136: 2512-2522.
- Wang, R.C., Xing, X.J., Crawford, N., 2007. Nitrite acts as a transcriptome signal at micromolar concentrations in *Arabidopsis* roots. *Plant Physiology*, 145: 1735-1745

- Wang, C., Zhang, S.H., Wang, P.F., Hou, J., Li, W., Zhang, W.J., 2008. Metabolic adaptations to ammonia-induced oxidative stress in leaves of the submerged macrophyte *Vallisneria spiralis* (Lour.). *Aquatic Toxicology*, 87: 88–98.
- Watling, J.R., Robinson, S.A., Seymour, R.S., 2006. Contribution of the alternative pathway to respiration during thermogenesis in flowers of the sacred lotus. *Plant Physiology*, 140: 1367–1373.
- Westwood, J.H., Foy, C.L., 1999. Influence of nitrogen on germination and early development of broomrape (*Orobancha* spp.). *Weed Science*, 47: 2–7.
- Whelan, J., Millar, A.H., Day, D.A., 1996. Oligomerization and the affinity of maize phosphoenolpyruvate carboxylase for its substrate. *Plant Physiology*, 104: 613–616.
- Wilcox, G.E., Mitchell, C.A., and Hoff, J.E., 1977. Influence of nitrogen form on exudation rate, and ammonium, amide, and cation composition of xylem exudate in tomato. *Journal of American Society Horticultural Science*, 102: 192–196.
- Witte, C.P., Tiller, S.A., Taylor, M.A. and Davies, H.V., 2002. Leaf urea metabolism in potato. urease activity profile and patterns of recovery and distribution of ^{15}N after foliar urea application in wild-type and urease-antisense transgenics. *Plant Physiology*, 128: 1129–1136.
- Xiaodan, Y., Sujatja, S., Laszlo, M., 1998. Differential Expression of the *Arabidopsis* *Nia1* and *Nia2* Genes. *Plant Physiology*, 116: 1091–1096.
- Xu, G., Wolf, S., and Kafkafi, U., 2001. Effect of varying nitrogen form and concentration during growing season on sweet pepper flowering and fruit yield. *Journal of Plant Nutrition*, 24: 1099–1116.
- Yanofsky, M.F., Ma, H., Bowman, J.L., Drews, G.N., Feldmann, K.A., Meyerowitz E.M., 1990. "The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene *agamous* resembles transcription factors". *Nature* 346 (6279): 35–39. doi:10.1038/346035a0.PMID 1973265.
- Yin, Z.H. and Raven, J.A., 1998. Influences of different nitrogen sources on nitrogen- and water-use efficiency, and carbon isotope discrimination, in C3 *Triticum aestivum* L. and C4 *Zea mays* L. plants. *Planta*, 205: 574–580.
- Zhang, H., Forde, B.G., 1998. An *Arabidopsis* MADS box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. *Science*, 279: 407–409.
- Zhang, H., Jennings A., Barlow, P.W. and Forde, B.G., 1999. Dual pathways for regulation of root branching by nitrate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96: 6529–6534.
- Zhang, H.M. and Forde, B.G., 2000. Regulation of *Arabidopsis* root development by nitrate availability. *J. Exp. Bot.*, 51: 51–59.
- Zhang, H., Rong, H., Pilbeam, D., 2007. Signalling mechanisms underlying the morphological responses of the root system to nitrogen in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 58: 2329–2338.
- Zhang, X., Henriques, R., Lin, S.S., Niu, Q.W., Chua, N.H., 2006. Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. *Nat Protoc* 1 (2): 641–6.
- Zhu, Z., Gerendas, J., Bendixen, R., Schinner, K., Tabrizi, H., Sattelmacher, B., Hansen, U.P., 2000. Different tolerance to light stress in NO_3^- and NH_4^+ -grown *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Biology*, 2:558–570.

ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Gümüşhane'nin Torul ilçesinde doğdu. İlk ve orta öğrenimini Erzurum'da tamamladı. 1999 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden 2003 yılında mezun oldu. Aynı yıl Atatürk Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimine başladı. Aralık 2004'te Atatürk Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü Araştırma Görevlisi kadrosuna atandı. 2003-2006 yılları arasında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Botanik Bilim Dalında Yüksek lisansını tamamladı. 2006 yılında başladığı doktora öğrenimi devam etmektedir. Halen Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesinde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır.