



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



***Brassica napus* BİTKİSİNDE TUZ STRESİ
KOŞULLARINDA WARBURG ETKİSİNİN
İNCELENMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

Tülay ALP ÖZTÜRK

Biyoloji Anabilim Dalı

İzmir
2023

T.C.

EGE ÜNİVERSİTESİ

Fen Bilimleri Enstitüsü

***Brassica napus* BİTKİSİNDE TUZ STRESİ
KOŞULLARINDA WARBURG ETKİSİNİN
İNCELENMESİ**

Tülay ALP ÖZTÜRK

Prof. Dr. Melike BOR

Genel Biyoloji A.B.D.

İZMİR 2023

Tülay ALP ÖZTÜRK tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “Brassica napus bitkisinde tuz stresi koşullarında Warburg etkisinin İncelenmesi” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 12/07/ 2023 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı :

.....

Raportör Üye :

.....

Üye :

.....

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*Brassica napus* bitkisinde Tuz stresi Koşullarında Warburg Etkisinin İncelenmesi” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

12 /07 /2023

İmzası

Adı-Soyadı
Tülay ALP ÖZTÜRK

ÖZET***Brassica napus* BİTKİSİNDE TUZ STRESİ KOŞULLARINDA****WARBURG ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

ALP ÖZTÜRK, Tülay

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Melike BOR

Temmuz 2023,49 Sayfa

Canlılar değişen çevre koşullarına adapte olabilmek için çeşitli savunma stratejileri geliştirmiştir. Bu açıdan değerlendirildiğinde hareketsiz yapıları ve yaşam döngüleri nedeniyle bitkiler en ilgi çekici canlı grubudur. Bitkilerde stres yanıtları ve dayanıklılık konuları üzerinde uzun yıllardır çalışılmasına rağmen daha bilinmeyen ve aydınlatılması gereken çok çeşitli mekanizmalar vardır.

Fotosentez, solunum ve fotorespirasyon gibi metabolik yolların stres koşulları altında nasıl çalıştıkları ve düzenlendikleri genel olarak bilinmektedir. Son yıllarda özellikle kanser hücrelerinde belirlenen ve mekanizması araştırılan “Warburg Etkisi” bitki hücrelerinde de tespit edilmiştir. Kısaca tanımlayacak olursak Warburg Etkisi; ortamda oksijenin bol bulunduğu koşullarda hücrelerin enerji verimi açısından daha düşük olan fermentasyonu, solunuma tercih etmeleridir. Bitkilerde Warburg etkisinin, hangi koşullarda aktive olduğu, mekanizması ve farklı metabolik yollarla nasıl etkileştiği bilinmemektedir. Bu nedenle, abiyotik stres koşullarında bitki hücrelerinde Warburg etkisinin gözlenip gözlenmediğini ve gözlenmesi durumunda bunun bitki hücreleri açısından bir avantaj sağlayıp sağlamadığını incelemeyi hedefledik.

Tez projemiz kapsamında *Brassica napus* bitkilerinde tuz stresi uygulaması (100 mM NaCl) sonrasında alınan yaprak ve kök örneklerinde çeşitli fizyolojik parametrelerin yanı sıra laktat, prolin, protein miktarları, laktat dehidrogenaz, alkol dehidrogenaz ve pürivat dekarboksilaz enzim aktiviteleri kontrol grupları ile karşılaştırmalı olarak incelendi. Bununla birlikte, çeşitli canlı gruplarında stres koşullarında oksijen seviyelerindeki değişimle etkileştiği bilinen prolyl 4-hidroksilaz kodlayan iki genin (P4H9 ve 10'nun) anlatım profillerindeki değişim belirlendi.

Elde edilen sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde özellikle yapraklardaki

Anahtar Sözcükler: Kolza, Warburg, fotosentez, prolin metabolizması, tuzluluk.

ABSTRACT**INVESTIGATION OF WARBURG EFFECT ON SALT STRESS
CONDITIONS IN *Brassica napus***

ALP ÖZTÜRK, TÜLAY

MSc. Thesis, Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Melike BOR

July 2023, 49 Page

A variety of defense strategies have been developed in organisms for adaption to the changes in environmental conditions. Within this point of view, plants may be the most interesting group due to their sessile nature and life cycle. In order to cope with environmental stresses plants can organize their primary metabolism very rapidly and effectively for sustaining both growth-development and defense related processes. A vast amount of work has been done on plant stress responses and tolerance mechanisms for many years however, there are still different mechanisms that are needed to be elucidated. The metabolic pathways such as; photosynthesis, respiration and photorespiration have been deciphered under stress conditions.

The Warburg Effect, which has been determined in cancer cells in recent years has been determined in plant cells. In short terms, the definition of Warburg Effect is; the preference of lower energy yielding fermentation to respiration under high oxygenic conditions by cells. In plants in which conditions Warburg effect is activated, its mechanism and its interactions with different metabolic pathways are unknown. We propose that the Warburg effect is important in terms of plant metabolism in order to adapt to changing environmental conditions and to cope with environmental stresses. We think that, under stress conditions photorespiration, Warburg effect might be related to each other which would be important in terms of agricultural practices. in the light of the above-mentioned information, we aimed to investigate the Warburg effect and the possible relationship of this effect with photorespiration in *Brassica napus* which belongs to the same family as the model plant *Arabidopsis thaliana* under salt and high temperature conditions.

Keywords: *Brassica napus*, fotorespirasyon, Warburg effect, salt stress.



ÖNSÖZ

Önerilen proje kapsamında tuz ve yüksek sıcaklık stresi koşullarında **Warburg Etkisinin** bitkilerdeki rolünü incelemeyi hedefledik. Bu mekanizmanın detaylarının iyi anlaşılması özellikle tarımsal bitkilerde abiyotik stres toleransının geliştirilmesi açısından önem taşımaktadır. Stres koşullarına adaptasyonun önemli göstergelerinden biri hücresel enerji üretimi ile ilişkili reaksiyonların yeniden düzenlenerek normal koşullardaki büyüme ve gelişme süreçlerinin sürdürülebilmesidir.

Bu açıdan planlanan ve yöntemler bölümünde detayları verilen analizlerle bitkilerde Warburg Etkisini detaylı olarak araştırmayı amaçlıyoruz.

Projemiz süresince çeşitli fizyolojik, biyokimyasal, transkriptomik ve metabolomik analizler aracılığıyla aşağıdaki sorulara cevaplar bularak bu özel metabolik yolun tüm bileşenleri ile birlikte değerlendirmeyi ön görmekteyiz.

İZMİR
12/07/2023

Tülay ALP ÖZTÜRK



İÇİNDEKİLER

Sayfa

İÇ KAPAK	II
KABUL ONAY SAYFASI.....	III
ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI	V
ÖZET.....	VII
ABSTRACT	IX
ÖNSÖZ	XI
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	XIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XV
TABLolar DİZİNİ	XVI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	XVIII
1.GİRİŞ	
1.1 Warburg Etkisi.....	1
2.GENEL BİLGİLER	
2.1 Glikoliz Süreci	4
2.2 Tuz Stresi ve Bitkiler Üzerindeki Etkileri.....	8
2.3 Kolza (<i>Brassica napus</i> L.)	10
2.4 Araştırma Projesinin Amacı	11

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Bitki Materyali ve Yetiştirme Koşulları.....	13
3.2 Tuz stresi uygulaması ve örnek alınması	13
3.3. Fizyolojik parametreler	14
3.3.1 Yaprak ve Kök ağırlık Değişimlerinin Belirlenmesi	14
3.3.2 Bağlı Su İçeriği (RWC)	14
3.3.4 Ozmotik Potansiyel Ölçümü	14
3.3.5 Total Protein Miktarının Belirlenmesi	15
3.3.6 Prolin Miktarının Belirlenmesi	15
3.3.7 Laktat Miktarının Belirlenmesi	15
3.4 Enzimatik Analizler	16
3.4.1 Laktat Dehidrogenaz (LDH) Aktivitesinin Belirlenmesi	16
3.4.2 Alkol Dehidrogenaz (ADH) Aktivitesinin Belirlenmesi.....	16
3.4.3 Piruvat Dekarboksilaz (PDC) Enziminin Belirlenmesi.....	16
3.5 RNA Ekstraksiyonu	17
3.6 cDNA Sentezi	17
3.7 Kantitatif PCR (qPCR) Analizi.....	18
4. BULGULAR	
4.1 Fizyolojik Parametreleri.....	19

4.2. Ağırlık Sonuçları	21
4.3 Laktat Miktarı	24
4.4 Laktat Dehidrogenaz Aktivitesi.....	25
4.5.Alkol Dehidrogenaz Aktivitesi.....	27
4.6. Pirüvat Dekarboksilaz Aktivitesi.....	28
4.7. Prolin Miktarı	30
4.8. Gen Anlatımı Analizleri	31
5-TARTIŞMA	35
6- SONUÇ VE ÖNERİLER	40
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	41
TEŞEKKÜR	48
ÖZGEÇMİŞ.....	49



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Warburg ve yeşil algler	2
2.1 Glikoz metabolizması.....	4
2.2 Warburg etkisi	6
4.1 Fotosentez etkinliği	20
4.2 Osmotik potansiyel.....	21
4.3 Yaprak yaş kuru ağırlık	22
4.4 Kök yaş kuru ağırlık.....	23
4.5 Laktat miktarı tayini	24
4.6 LDH aktivitesi	25
4.7 ADH aktivitesi	28
4.8 Pirüvat dekarboksilaz aktivitesi	30
4.9 Prolin miktarı	31
4.10Yaprak qPCR sonuçları.....	32
4.11 Kök qPCR sonuçları.....	34



TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
3.1 Primerlerin listesi	18
4.1 Fotosentez etkinliği	19
4.2 Osmotik potansiyel.....	21
4.3 Yaprak yaş kuru ağırlık.....	21
4.4 Kök yaş kuru ağırlık.....	22
4.5 Laktat miktarı tayini	24
4.6 LDH aktivitesi	26
4.7 ADH aktivitesi	27
4.8 Pirüvat dekarboksilaz aktivitesi	30
4.9 Prolin miktarı	30
4.10 Yaprak qPCR sonuçları.....	32
4.11 Kök qPCR sonuçları.....	33



SİMGELER VE KISALTMALAR

Kısaltmalar

Açıklama

PK

Pirüvat Kinaz

LDH

Laktat Dehidrogenaz

ADH

Alkol Dehidrogenaz

PDC

Pirüvat Dekarboksilaz

NAD

Nikotinamid adenin dinükleotit

NADH

Nikotinamid adenin dinükleotit

TCA

Trikarboksilik asit döngüsü

cDNA

Komplementer DNA

P4H

Prolyl 4-hidroksilaz

Simgeler

Açıklamalar

 μ

Mikro

 β

Beta

 γ

Gamma



1. GİRİŞ

1.1 Warburg Etkisi

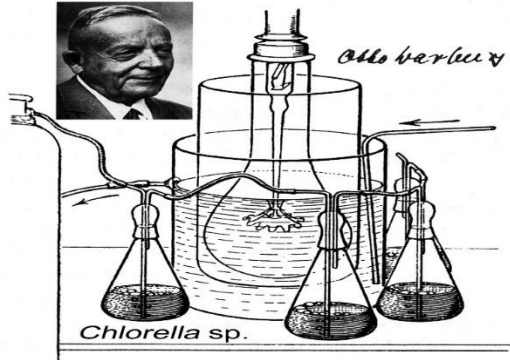
Canlılar değişen çevre koşullarına uyum sağlayabilmek için çeşitli savunma stratejileri geliştirmiştir. Bu açıdan değerlendirildiğinde hareketsiz yapıları ve yaşam döngüleri nedeniyle bitkiler en ilgi çekici canlı grubudur. Metabolizma ise yaşam için bir ön koşuldur. Enzimler tarafından katalize edilen yüzlerce kimyasal reaksiyon, tüm biyolojik aktiviteyi destekleyen bir metabolik ağı tanımlar. Özellikle, enerji veren süreçlerin enerji tüketen anabolik reaksiyonlarla birleştirilmesi, hücrenin dokusunu oluşturan polimerlerin ve metabolitlerin biyosentezini yönlendirir. İyonların ve metabolitlerin zarlar boyunca yer değiştirmesi de dahil olmak üzere birçok enzimatik reaksiyonun hızı, enzim aktivitelerinin düzenlenmesi yoluyla kontrol edilir ve metabolik çıktılar değişen çevresel koşullarına ve büyüme modellerine göre şekillenir (Sweetlove ve ark.).

Ortam koşullarına adaptasyon prokaryotlardan ökaryotlara kadar tüm canlılarda evrimsel süreçte kazanılmış bir yetenektir. Değişen çevre koşullarına adaptasyonda ilk basamak, primer metabolizmada enerji üretiminin aktif ve verimli bir şekilde sürdürülebilmesidir. Bitkilerde büyüme ve gelişme süreçlerinin normal ve çevresel stres koşulları altında belirgin farklılık gösterdiği uzun süreden beri bilinmektedir. Savunma süreçlerinin başlatılması ve sürdürülebilmesi primer metabolizmanın özellikle de enerji sağlayan süreçlerin yerinde ve denetimli çalışması ile mümkün olabilir. Enerji kaynaklarının hem normal hem de stres koşulları altında verimli ve etkili kullanılması bitkiler için büyük önem taşımaktadır. Bitki ve hayvan hücreleri çok farklı niteliklere sahip olmalarına karşın özellikle çevresel stres faktörleri ile mücadele süreçleri çeşitli benzerliklere sahiptir.

Bununla birlikte, üzerinde uzun yıllardır çalışılmasına rağmen hala fotosentez, solunum, fotorespirasyon gibi önemli metabolik yolların ve bileşenlerinin birbirleriyle ve farklı metabolik yollarla nasıl etkileştikleri çok iyi bilinmemektedir. Örneğin, yeni yapılan bir çalışmada normal koşullarda geceleri yapraklarda gerçekleşen solunum hızındaki farklılıkların protein sentezi ve amino asit metabolizması ile ilişkili olmaktan çok gündüz yapılan metabolik faaliyetlerle

ilişkili olduğu belirlenmiştir (O'lerary, 2017). Ayrıca, ortam koşullarında besin maddelerinin azalması veya bu besin maddelerinin alınımını engelleyecek kuraklık ve tuz stresi gibi çeşitli stres koşullarının ortaya çıkması hücrelerin alternatif metabolik süreçler geliştirmelerine veya kullanmalarına neden olabilir. Çeşitli stres koşullarında bitkilerde ve tüm canlılardaki genel strateji, metabolizmanın biyo-kütle üretiminden çok, o koşullar altında maksimum enerjiyi sağlayacak alternatif metabolik yollara yönelik olarak düzenlenmesidir.

Yaklaşık bir asır önce 1920'de, Otto Warburg tek hücreli yeşil alglerin (*Chlorella* sp.) sıvı kültürlerinde moleküler oksijenin (O_2) fotosentez üzerinde inhibe edici bir etki gösterdiğini keşfetti (Kutschera, U. Et al. 2020). Başlangıçta "Warburg etkisi" olarak bilinen bu fenomen, daha sonra fotosentetik organizmalar veya foto solunum tarafından CO_2 'nin ışığa bağımlı salınımı olarak kabul edildi ve onlarca yıl boyunca yoğun araştırma ve tartışma konusu oldu (Ogren, 1984).



Şekil 1.1. Otto Warburg tarafından yaklaşık bir asır önce yeşil algler (*Chlorella* sp.) ile gerçekleştirdiği deney düzeneği. Maksimum asimilasyon oranlarına ulaşmak için maksimum ışık ve havalandırma koşulları sağlanmıştır (oklar; O_2 giriş, CO_2 , çıkış). Otto Warburg'un portresi. (Bachmann. (1921)

Warburg ve arkadaşları, norm oksik koşullar altında bile tümör hücrelerinde glikoz moleküllerinin hızlı hücre bölünmesini desteklemek için ağırlıklı olarak aerobik glikolize uğradığını gözlemlediler. Bunun aksine, normal hücrelerde, oksijen varlığında adenosin trifosfat (ATP) üretmek için öncelikle tercih edilen yol

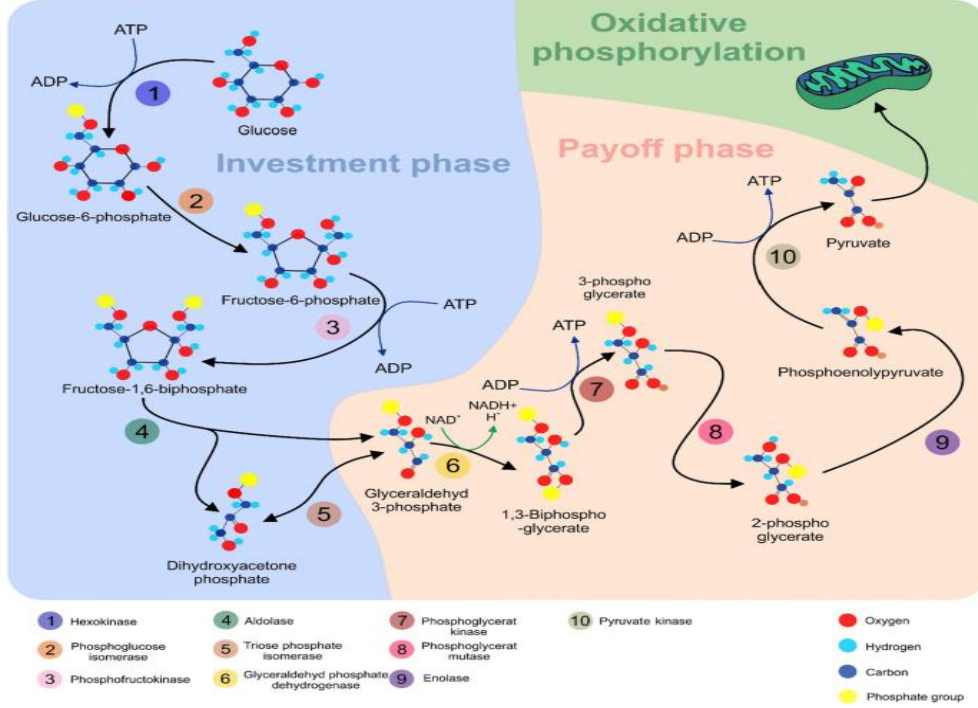
oksidatif fosforilasyondur (Samec, M. et al. 2020). Enerji üretimi açısından çeşitli stres koşullarında tüm canlılardaki genel strateji, metabolizmanın biyo-kütle üretiminden çok, o koşullar altında maksimum enerjiyi sağlayacak alternatif metabolik yollara yönelik olarak düzenlenmesidir. Bu tip alternatif yollardan biri ve belki de en az bilineni aerobik koşullarda hücrelerin fermentasyona yönelmesidir (Vander Heiden, 2009). Otto Warburg tarafından memeli kanser hücrelerinde gösterilen ve “Warburg Etkisi” 1930 yılında Herbert Crabtree tarafından *Saccharomyces cerevisiae*’de de tanımlanmış ve bitkilerin de dahil olduğu çeşitli canlı gruplarında saptanarak bilimsel literatürde “Crabtree veya Warburg Etkisi” olarak yerini almıştır (Alteriis vd. 2018). Buna göre Warburg Etkisi, ortamda oksijenin bulunduğu koşullarda enerji üretimi açısından verimi düşük fermentasyonun, solunuma tercih edildiği özel bir metabolik düzenlenmedir. Warburg etkisi bitkilerde ilk tanımlandığında fotorespirasyona eş değer bir süreç olduğu ön görülmüş ve yüksek oksijen varlığında fotosentezin inhibe olması Warburg etkisine bağlanmıştır (Robinson ve Gibbs, 1974; Eckardt, 2005)

Kanser hücrelerinde belirlenen ve mekanizması araştırılan “Warburg Etkisi” bitki hücrelerinde de tespit edilmiştir (Robinson ve Gibbs, 1974; Eckardt, 2005). Warburg Etkisinin tüm canlılarda bulunan ortak yollardan biri olduğu düşünülmekle birlikte bitkilerde nasıl çalıştığı henüz kesinlik kazanmamıştır. Bitki hücrelerinde oksijen yükünün hem kloroplast hem de mitokondri kökenli olduğu dikkate alındığında bu mekanizmanın anlaşılmasının büyük bir önem taşıdığı söylenebilir. Warburg etkisinin, bitki hücrelerinde nasıl çalıştığı, hangi koşullarda aktive olduğu ve farklı metabolik yollarla nasıl etkileştiği bilinmemektedir. Değişen çevre koşullarına adaptasyon ve çevresel streslerle mücadelede Warburg etkisinin bitki metabolizması açısından da önemli olduğunu ve detaylı olarak çalışılması gerektiğini ön görmekteyiz.

2.GENEL BİLGİLER

2.1 Glikoliz Süreci

Glikoz metabolizması, iki aşamadan oluşan enzimatik bir süreci temsil eder: birincisi enerjinin harcadığı ikincisi enerjinin geri kazanıldığı aşamalardır.

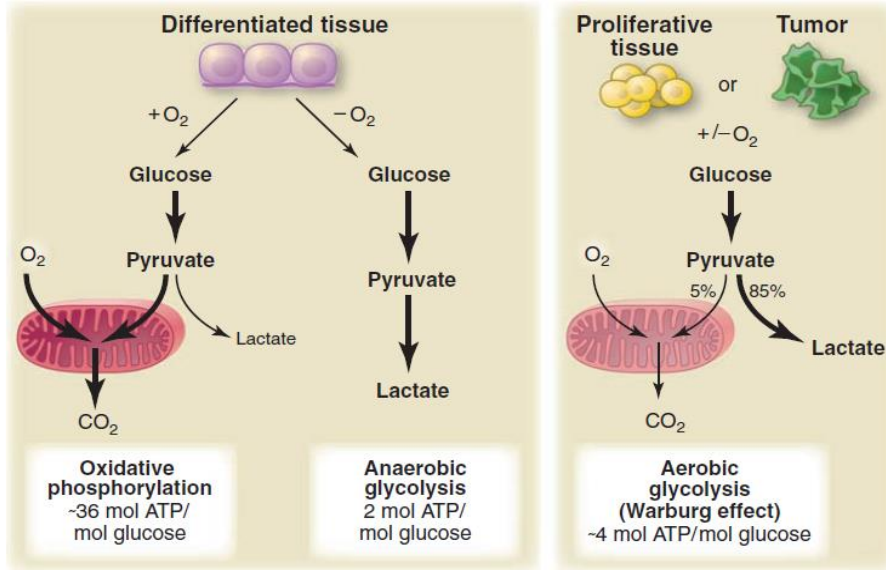


Şekil 2.1. Glikoz metabolizması. Yatırım aşaması, glikoz-6-fosfat (G6P) oluşumuna yol açan glikoza bir fosfat grubu ekleyen ilk enzim olan hoksokinaz (HK) ile başlar. Bir sonraki adımda, fosfoglukoz izomeraz (PGI), G6P'yi fruktoz-6-fosfata (F6P) dönüştürür. Fosfofruktokinaz (PFK1) enzimi, F6P'yi fruktoz-1,6-bifosfata (FBP) dönüştürür. FBP ayrıca fruktoz-bifosfat aldolaz (aldolaz) tarafından dihidroksiaseton(DHAP) ve gliseraldehit-3-fosfata(G[^]P) parçalanır.triosefosfat izomeraz (TPI)enzimi DHAP'ıG3P'ye dönüştürür. Ödeme aşaması, G3P'nin gliseraldehit-3fosfat dehidrogenaz (GAPDH) tarafından 1,3- bifosfogliserata (1,3BGP) metabolize edilmesiyle başlar.Daha sonra, fosfogliserat kinaz (PGK), 1,3BGP'yi 3-fosfogliserata (3PG) dönüştürür. Pirüvat kinaz (PK), PEP'in pirüvata dönüştürüldüğü son adımı katalize eder. Daha sonra , pirüvat mitokondride oksidatif fosforilasyona uğrar ve trikarboksilik asit döngüsünden (TCA) 36 ATP molekülünün üretilmesiyle sonuçlanır. ATP, adenosin trifosfat; ADP, adenosin difosfat, NAD⁺ , nikotinamid adenin dinükleotit (oksitkenmiş form); NADH, nikotinamid adein dinükleotit (indirgenmiş form) (Samec, M.et al.2020).

Şekil 2.1'de gösterilen reaksiyonlar dizisi normal hücrelerde aerobik koşullar altında glikoz metabolizmasını göstermektedir. Kanser hücrelerinde piruvat, laktat dehidrojenaz A (LDHA) tarafından laktata dönüştürülür ve glikoliz yoluyla glikoz molekülü başına yalnızca iki ATP molekülünün elde edildiği çok düşük ATP verimine sahip bir reaksiyondur. Bununla birlikte, kanser hücrelerinde glikoz alım

hızının önemli ölçüde artış göstermesi sonucunda mitokondriyel solunum varlığında bile laktat oluşumu gözlenmektedir (Liberti, MV ve Locasale, JW (2016)). Tümör hücreleri genel olarak bütünlüğü bozulmamış mitokondrilere sahiptir ve oksidatif fosforilasyon yeteneğini sürdürür. Ayrıca bu hücreler hızlı çoğalma özellikleri nedeniyle yüksek ATP/ADP, NAD⁺/NADH ve NADP⁺/NADPH oranlarına sahiptir. Bu moleküller arasındaki herhangi bir dengesizlik, proliferasyonun baskılanmasına yol açar. Bu nedenle, oksidatif fosforilasyon yukarıda belirtilen oranların korunması için uygun değildir (Ngo, H., Tortorella, SM, Ververis, K. ve Karagiannis, TC 2015). Kanseri hücrelerinde aerobik glikolizin oksidatif fosforilasyona tercih edilmesi, hücre dışındaki pH azalması ve hipoksi gibi koşullarla bağlantılıdır. Ayrıca, belirli genetik anormalliklerin sonucu olarak sinyal yollarındaki anormallikler, kanserle ilişkili glikolizi teşvik eder. Bu nedenle, artan glikolitik aktivite ile karakterize edilen kanser metabolizması fenotipinin belirlenmesi, hücrenin tümör mikroçevresine verdiği dış tepkilerin yanı sıra içsel değişiklikler tarafından kontrol edilir. Buna göre Warburg Etkisi ortamda oksijenin bulunduğu koşullarda enerji üretimi açısından düşük verimli fermentasyonun, enerjilik olarak daha verimli solunuma tercih edildiği özel bir metabolik düzenlenmedir (Şekil 2.2).

Normal hücrelerde glikoz, iki ATP tüketen ve dört ATP üreten glikoliz yolu ile piruvata dönüştürülür. Piruvat mitokondride TCA döngüsüne girerek 36 ATP üretir. Yani bir glikoz molekülü, tam oksidasyon sırasında 38 ATP üretir. Tümör hücrelerinde, piruvat oksidasyonunun yerini laktat dehidrogenaz (LDH) ile katalizlenen laktat oksidasyonu alır ve ATP üretimi olmaz. Bir glikoz molekülü, tümör hücrelerinde sadece iki ATP üretir, bu hücreler daha fazla enerjiye ihtiyaç duyduklarından, kültür ortamlarında yetiştirilmeleri için de genellikle yüksek glikozlu ortamlar kullanılır. (X, Li. Et al. 2015).



Şekil 2.2: Warburg Etkisinin şematik gösterimi (Vander Heiden 2009'dan alınmıştır). Oksidatif fosforilasyon, anaerobik glikoliz ve aerobik glikoliz arasındaki farklar belirtilmiştir.

Bitki hücreleri, özellikle oksijenin kısıtlı olduğu koşullarda (örneğin köklerde su baskını koşullarında) glikolizi yürütebilmek için direkt NAD rejenerasyonu yoluyla metabolizmalarını fermentasyona yönlendirebilirler (Tadegee vd. 1999). Ancak bitkilerde farklı dokularda aynı anda hem fotosentez hem solunum hem de fermentasyon birlikte yürütülebilmektedir. Bu süreçlerin aynı anda tam olarak nasıl yürütüldüğü bilinmemekle birlikte, şeker sinyalini de içine alan çok karmaşık düzenleyici sinyal yollarının ve farklı metabolik aktivitelerin yer aldığı öngörülmektedir (Wingler vd., 1998; Quirino vd., 2001).

Bitkilerde “Warburg Etkisi” ile ilgili ilk çalışmalardan biri 1974’te izole edilmiş ıspanak kloroplastlarında yapılmıştır (Robinson ve Gibbs, 1974). Bu çalışmada Warburg etkisinin fotosentez üzerinde olumsuz etkisi olduğu ve bu sürecin fotorespirasyon ile ilişkili glikolat sentezi üzerinden yürütüldüğü öngörülmüştür. Ancak fotorespirasyon ve Warburg etkisi farklı kavramlardır. Fotorespirasyon, ribuloz bifosfat karboksilaz oksijenaz (Rubisco) enziminin oksijene olan yüksek afinitesi nedeniyle ortaya çıkan ve fotosentez verimini azaltan kloroplast, mitokondri ve peroksizom organellerinin yer aldığı bir süreçtir (Andrews vd. 1971; Eckardt, 2005; Bauwe vd. 2010). Fotorespirasyonun, fotosentez verimini yaklaşık %25 seviyesinde azalttığı ancak, bitkilerin normal gelişim süreçleri ve stres koşulları altında yaşamlarını sürdürebilmeleri açısından önemli olduğu çeşitli çalışmalarla ortaya konulmuştur (Somerville, 2001; Eckardt,

2005; Bauwe vd. 2010). Yeni yapılan bir çalışmada siyanobakteriden aktarılan fotorespirasyon katabolizması ile ilişkili glikolat dehidrogenaz I' i ifade eden patates bitkilerinin gerek normal gerekse yüksek ışık ve yüksek sıcaklık gibi stres koşullarında daha iyi gelişim gösterdiği bildirilmiştir (Ahmad vd. 2016).

Bitkilerde Warburg etkisi ile ilişkili çalışmalar oldukça kısıtlıdır. Vigani (2012) tarafından yapılan bir çalışmada demir eksikliği koşullarında oksidatif fosforilasyon süreçlerinde gözlenen azalmanın aerobik koşullarda glikolizin ve fermentasyonun teşvik edilmesi ile sonuçlandığı gözlenmiştir. *Arabidopsis thaliana*'da *Agrobacterium tumefaciens* enfeksiyonu sonucu oluşan taç yumru yapısındaki hücrelerde de tıpkı kanser hücrelerindeki gibi yüksek metabolik aktivite belirlenmiş ancak bu durumun yüksek oksijen varlığında aktive olduğu bildirilen “Warburg etkisi” den farklı yürütülen daha çok hipoksiya yanıt genleri ile yürütülen bir süreç olduğu vurgulanmıştır (Kerpen vd 2019). Bir başka çalışmada parazitik yaşama adaptasyonda Warburg etkisinin önemli rol oynayabileceği ön görülmektedir. Hemiparasit *Viscum album*'da mitokondriyel elektron taşıma zincirinde kompleks I bulunmaz. Bu bitkide enerji üretimindeki kısıtlanma glikolitik karbon akışı ile telafi edilir (Mac Lean vd. 2018). *Arabidopsis* ve *Viscum* mitokondriyel proteom profilleri karşılaştırıldığında glikolitik süreç, TCA döngüsü ve fotorespirasyon ile ilişkili proteinlerin miktarı açısından belirgin bir farklılıklar görülmüştür. Ayrıca glikozdan CO₂ salınım değerlerinin *Viscum*'da daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Mac Lean vd. 2018). Enerjinin glikoliz üzerinden laktat üretimiyle (Warburg etkisi) sağlandığı bu durumu, fotosentetik olarak çok aktif olmayan *Viscum*'un konakçı bitkiden temin ettiği metabolitler aracılığıyla gerçekleştirebildiği düşünülmektedir (Tesitel vd. 2010; Mac Lean vd. 2018). Su baskını nedeniyle ortaya çıkan düşük oksijen koşullarına adaptasyonda rol oynayan süreçlerin büyük bir bölümü özellikle tahıl bitkilerinden pirinçte detaylı olarak tanımlanmıştır (Banti vd. 2013). Düşük oksijen koşullarında çimlenme, büyüme ve gelişmenin sürdürülebilmesi için gerekli olan genlerin ifade profilleri ve nasıl düzenlendikleri üzerinde çeşitli çalışmalar mevcuttur. Örneğin pirinçte α -amilaz kodlayan *Ramy3D* geninin prolin ve etilen ile ilişkili genler tarafından düzenlendiği bilinmektedir (Banti vd. 2013). Bu bağlamda ilgi çekici bir konu bu genlerin yüksek oksijen koşullarında aktif olup olmadığı ve nasıl düzenlendikleridir. Düşük oksijen koşullarına adaptasyonda tanımlanan bu çeşit mekanizmaların yüksek oksijen

koşullarına adaptasyonda görev alıp almadığının belirlenmesi her iki koşulda da aktive olup tarımsal verimi olumlu etkileyecek biyoteknolojik yaklaşımların geliştirilmesi açısından gereklidir.

2.2 Tuz Stresi ve Bitkiler Üzerindeki Etkileri

Tuz stresi bitkilerde büyüme gelişme süreçlerini olumsuz etkileyen hem ozmotik hem de iyonik etkisi nedeniyle diğer abiyotik streslerden farklılık gösteren önemli bir çevresel stres faktörüdür. Genel olarak, bitkilerde toprak çözeltisinin ozmotik potansiyelini düşürerek fizyolojik kuraklığa, mineral madde beslenmesi konusunda dengesizliğe ve tuz iyonlarının spesifik toksik etkisine neden olmaktadır (Marschner 1995). Birçok bitki türü tuz stresine oldukça duyarlıdır ve bu grupta yer alan bitkilere genel olarak “glikofit” adı verilir. Glikofit bitkiler genellikle 100- 200 mM’ lık tuz konsantrasyonlarında bile canlılıklarını sürdürülemez. Ancak “halofitler” 300-400 mM gibi oldukça yüksek tuz konsantrasyonuna sahip olan topraklarda büyüeyebilen ve yaşam döngülerini tamamlayabilen bitki türlerini içermektedir (Doğru ve Canavar 2020). Halofit bitkiler filogenetik adaptasyon süreçleri boyunca tuz toleransı geliştirdikleri için aşırı tuzlu topraklarda büyüeyebilmektedir (Munns ve ark. 1995). Parida ve Das (2005) tuz toleransını, bir bitkinin yüksek tuz konsantrasyonları altında büyüeyebilme ve yaşam döngüsünü tamamlayabilme yeteneği olarak tanımlamıştır.

Kıyıların etrafındaki tuzlu yağmur suları, ana kayalardan ve okyanus tuzlarından kaynaklanan kirlilik gibi doğal nedenlerin yanı sıra, yetiştirme uygulamaları da rizosferde artan tuz konsantrasyonunu arttırmaktadır (Mahajan ve Tuteja 2005). Bu nedenle, ekilebilir arazilerin sürdürülebilir şekilde tuzlanması dünya genelinde giderek yaygınlaşmakta ve dolayısıyla eskiden verimli olan toprakların verimini düşürmektedir. Tuzluluk terimi, toprakta yüksek konsantrasyonda tuzları ifade etse de toprak tuzluluğunun büyük bölümünü NaCl oluşturur ve bu, tüm bitkilerin neden NaCl birikimini veya atılmasını düzenlemek için bazı mekanizmalar geliştirdiğini açıklar (Türkan ve ark. 2009).

Tuz stresinin gözlemlenen ilk etkilerinden biri bitkilerde büyüme hızının azalmasıdır. Munns (2002), tuz uygulamasından çok kısa bir süre sonra bitki hücrelerinin su kaybederek hacimlerinin azaldığını bildirmiştir. Sınırlayıcı etkilerin

ortaya çıkış mekanizması türden türe ve aynı tür içindeki kültivarlar arasında farklılık göstermektedir. Bitkilerde tuzun neden olduğu olumsuz etkiler erken ve geç evrede ortaya çıkabilmektedir. Tuz stresinin erken evresinde görülen etkiler kök bölgesi etrafında görülen tuzluluktan kaynaklanırken; geç evrede görülen etkiler ise bitki dokularında biriken tuz iyonlarının toksik etkisinden dolayı ortaya çıkmaktadır (Muchate ve ark., 2016). Bitkilerde tuz stresinin erken evresi osmotik stres olarak görülmektedir. Osmotik stres; su ve besin alımını, tohum çimlenmesini, yaprak ve tomurcuk gelişimini, dallanmayı, fotosentez hızını, hücre büyümesini ve meristem bölgelerine karbonhidrat ulaşımını olumsuz yönde etkileyerek bitki gelişimine büyük ölçüde zarar vermektedir (Sheldon ve ark., 2017; Mishra ve ark., 2021). Tuz iyonlarının birikimi, yaşlı yaprakların dökülmesine, genç yapraklarda toksinlerin birikimine ve erken yaşlanmaya neden olmaktadır. Aynı zamanda, yaprak alanının küçülmesine neden olarak fotosentez reaksiyonlarının azalmasına da neden olmaktadır (Munns, 2002). Uzun süre yüksek konsantrasyonlu tuza maruz kalan bitkilerin yaprak ve köklerinde yaş ve kuru ağırlığın azaldığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Liu ve ark., 2019; Zhang ve ark., 2020)

Tuz stresinin geç evre etkileri, oksidatif stres ve iyon toksisitesi şeklinde ortaya çıkmaktadır. Yüksek tuz konsantrasyonu, aktif oksijen türlerinin (AOT) miktarının artmasına, lipid peroksidasyonunun uyarılmasında ve membrandan elektrolit sızıntısının artmasına neden olarak oksidatif stresi meydana getirmiştir (Ahmad ve ark., 2018). Artan AOT'nin neden olduğu hasarlar hücrelerin erken ölümüne, yaprakların ve köklerin büyümesinin olumsuz yönde etkilemesine bağlı olmaktadır.

Topraktaki tuz konsantrasyonu 40 mM olduğunda osmotik stres yaklaşık 0.2 MPa civarında olmaktadır. Bu durum bitkinin su alım kapasitesini doğrudan etkilemektedir. Bu osmotik etki yapraklardaki stoma açıklıklarının derecesini ve bitkideki içsel sinyaller aracılığıyla meristematik dokulardaki hücre uzamasının hızını azaltmaktadır. Stomatal açıklığın CO₂ kısıtlaması fotosentezin hızını da düşürmekte ve devamında fotosentetik yaprak alanın oluşumu yavaşlatarak, meristematik ve büyüyen dokulardaki asimilatların akışı azalmaktadır (Munns and Sharp, 1993). Toprak tuzluluğunun artması ile yaprak büyümesinin hızının düşmesi kök çevresindeki tuzun osmotik etki oluşturmaya neden olmaktadır. Tuzluluğun

aniden artması yaprak hücrelerinde suyun kaybına neden olmaktadır ancak hücre hacmindeki ve turgorundaki bu kayıp geçici olmaktadır (Passioura and Munns, 2000).

Stres şartları altında hücresel yapıların korunması ve ozmotik dengenin sağlanması ozmolitlerin fonksiyonları ile başarılmaktadır.). Ozmolitlerin birincil fonksiyonu, turgorun devamını sağlayarak dehidrasyona uğramış hücrelerde bulunan makromolekülleri korumaktır (Smirnoff, N. (1998). Bitkilerde bulunan düşük molekül ağırlıklı şekerler, organik asitler, polioller, çözünebilir proteinler (LEA proteinleri, dehidrin) ve azot içeren bileşikler başlıca ozmolitlerdir (Ashraf, 2004). Ozmolitler, iki mekanizma ile fonksiyonlarını sergilerler. Birincisi hücrelerin ozmotik potansiyelini arttırmak böylece içsel olarak artmış ozmotik basıncın ozmotik potansiyelini dengelemek ve membranların ve makromoleküllerin yapılarını stabilize etmektir(Holmberg et al. 1998).

Orta şiddette tuz stresi koşulları altında bitkide lateral gövde gelişimi inhibe olmaktadır. Stres süresinin uzaması erken çiçeklenme veya küçük çiçeklerin sayısında azalma gibi üreme gelişimini de etkilemekte ve yaşlı yapraklarda ölüm oluşmaktadır. Bitkideki tüm bu değişimler tuz ve kuraklık gibi stres koşulları altında bitki büyümesindeki değişim yanıtlarını göstermektedir. Toprak suyundaki tuz bitki büyümesini iki nedenle inhibe etmektedir; 1. Toprak solüsyonundaki tuzun varlığı bitkinin su alma kapasitesini düşürmekte ve büyüme hızının düşmesine neden olmaktadır. 2. Fazla miktarlarda tuzun terleme yolu ile bitkiye girmesi sonucu yaprak hücrelerinde meydana gelen yaralanma ve büyümenin engellenmesi durumuna tuzluluk kaynaklı spesifik ve ya iyon fazlalığı etkisi denilmektedir Bitkilerde tuz stresine karşı verilen büyüme yanıtları iki aşamadan oluşmaktadır. Birinci aşamada bitki büyümesi ani bir şekilde yavaşlamaya başlarken, ikinci aşamada tuz iyonlarının birikimine bağlı olarak hücre düzeyinde hasar meydana gelir.

2.3 Kolza (*Brassica napus* L.)

Kolza (*B. napus* L.) bitkisi *Cruciferea* (Brassicaceae) familyasına ait *B. allopoliploid* bir dikotildir. Avrupa ve Asya'nın birçok bölgesinde yayılış göstermektedir. Asya ülkelerinden özellikle Hindistan ve Çin ana yetiştirme bölgesi

kabul edilmiştir. Yazlık ve kışlık çeşitleri bulunan kolza bitkisinin önemli yayılış bölgeleri Güney İsveç, Danimarka, Almanya, Hollanda, Belçika, Kuzey Fransa ve Kanada gibi yüksek hava nemine sahip bölgelerdir (H, Karalı 2003)

B. napus, dünya çapında ilgi gören, yağ kalitesi açısından yemeklik ve biyoyakıt üretimi potansiyeli olan bir bitkidir. Ayrıca birçok bölgede rotasyona uygun tarımı nedeniyle yetiştirilmesi tercih edilmektedir. Tohumlar, yüksek yağ ve protein içeriğine sahip olmaları nedeniyle hayvan yemlerinde kullanılmaktadır. Tohum ağırlığının %30-60'ı triaçilgliserol (TAG) içermektedir. Diğer yağ asitlerini de yüksek oranda (%40-45) bulundurmaktadır. Düşük seviyelerde doymuş yağ asidi, yüksek seviyelerde tekli doymamış yağ asitleri ve iyi düzeyde omega-3 içermektedir. (Sevilmiş D. ve ark. 2022). Yemeklik yağ için, yağın besin değeri ve stabilitesi, doymuş veya doymamış bağların dağılımı önemliyken, endüstriyel yağ hammaddesi için yağ asitinin karbon zincir uzunluğu ön plana çıkmaktadır (Secchii et al.2023). Kolza yağı, çok farklı yağ asidi profillerine sahiptir bu nedenle hem yem, hem de biyodizel hammaddesi olabilmesi için üretilmektedir (Delaume et al., 2006).

2.3 Araştırma Projesinin Amacı

Yaptığımız bu çalışmada tuz stresi altında Warburg Etkisinin bitkilerdeki rolünü incelemeyi hedefledik. Bu mekanizmanın detaylarının iyi anlaşılması özellikle tarımsal bitkilerde abiyotik stres toleransının geliştirilmesi açısından önem taşımaktadır. Stres koşullarına adaptasyonun önemli göstergelerinden biri hücresel enerji üretimi ile ilişkili reaksiyonların yeniden düzenlenerek normal koşullardaki büyüme ve gelişme süreçlerinin sürdürülebilmesidir. Bu yol çok farklı canlı gruplarında evrimsel süreçte korunduğu halde kesin mekanizması, neden ortak bir yol olduğu ve tercih edildiği bilinmemektedir. Konu üzerinde çeşitli görüşler öne sürülmekle birlikte kesin cevap henüz bulunamamıştır. Özellikle hızlı çoğalan hücrelerde gözlenen bu metabolik tercihin neden mi yoksa sonuç mu olduğu üzerinde de farklı görüşler öne sürülmektedir. Yine kanser hücrelerinde yapılan çalışmalarda yüksek besin içeriği (özellikle glikoz) koşullarında Warburg etkisinin gözlemlendiği belirtilmektedir.

Tez projemiz kapsamında yöntemler bölümünde detayları verilen fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler biyolojik analizlerle kolza bitkisinde Warburg Etkisini tuz stresi koşullarında çeşitli yönlerden inceledik. Warburg etkisinin bitkilerde nasıl bir görev üstlendiğine yönelik bu çalışmadan elde edilen sonuçların konu hakkında daha sonradan yapılacak çeşitli çalışma ve projelere ön bir bilgi oluşturacağını ön görmekteyiz. Tuz stresi ile Warburg Etkisi arasındaki etkileşim kapsamında elde ettiğimiz sonuçlar bu yolun tuz stresi koşullarında aktive olduğunu göstermektedir. Warburg etkisinin aktivasyonu benzer çevresel stresler altında da tarım bitkilerinin büyüme ve verimliliklerinin artırılmasına yönelik katkı sağlayacaktır. Bu bağlamda, değişen iklim koşullarına tarımsal bitkilerin adaptasyonu açısından Warburg etkisinin detaylı olarak anlaşılması ve tuz stresi dışında başka çevresel streslerle olan ilişkisinin de belirlenmesi önemlidir. Tez çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçları temel alarak konunun daha detaylı ve farklı yönlerden incelenmesi gerekmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Bitki Materyali ve Yetiştirme Koşulları

Çalışma materyali olarak kolza (*Brassica napus L.*) bitkisi kullanılmıştır. Kolza tohumları yüzey sterilizasyonu için %10'luk hipoklorit çözeltisinde 10 dakika bekletildi. Sonrasında süzülen tohumlar üç defa deiyonize su (dI-H₂O) ile yıkanarak sterilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Yıkamayı takiben 2 gün steril deiyonize su içerisinde ve karanlık ortam koşullarında tohumlar şişirilmiştir. Hidrofonik ortam için şişirilmiş tohumlar bir gece deiyonize su içerisinde bekletilmiş süngerlere ekildi ve deiyonize su ile süngerler ıslatıldı. İki gün karanlıkta bırakıldı sonrasında fotoperiyota alınıp çimlenme gözlemlendiğinde ¼ oranında seyreltilmiş Hoagland içeren hidrofonik kültür kutularına aktarıldı. Hoagland her iki haftada bir değiştirildi. Perlit ekimi için şişirilmiş tohumlar iki kez deiyonize su ile yıkanmış perlite ekildi. Bitkiler ½ oranında seyreltilmiş Hoagland ile 2-3 gün aralıklarla sulandı. Yetiştirme süresince hidrofonik ekim ve perlit ekimi için uygulanan kontrollü koşullar 350 µmol m⁻² s⁻¹ ışık yoğunluğunda, 16 saat aydınlık/8 saat karanlık fotoperiyotta, 25 °C sıcaklık ve %75- 80 nem oranına olacak şekilde ayarlanmıştır. Bitkiler dört hafta büyüklüğe ulaştığında kök ve yaprak örnekleri alınıp sıvı azotta donduruldu ve -20°C de saklandı.

3.2 Tuz stresi uygulaması ve örnek alınması

Bitkiler yaklaşık dört haftalık büyüklüğe ulaştıklarında tuz stres uygulaması yapıldı. Denemeler farklı zamanlarda birbirinden bağımsız olarak kurulan 3 seri şeklinde tekrarlandı. Bitkiler kontrol ve tuz grubu olmak üzere ikiye ayrıldı. Tuz stresi uygulanacak gruba 100 mM NaCl ¼ oranında seyreltilmiş Hoagland ile karıştırılarak verildi. Tuz uygulamasının 1., 3., 6., ve 12. saatlerinde (gen anlatımı analizleri için) ve 3., 5. ve 7. günlerde ise (diğer analizler için) kök ve yaprak örnekleri alındı yapıldı. Örnekler sıvı azotta dondurularak -20°C'de analizlere kadar saklandı. Fizyolojik parametrelerle ilgili analizler örnekleme günlerinde yapıldı.

3.3. Fizyolojik parametreler

3.3.1 Yaprak ve Kök ağırlık Değişimlerinin Belirlenmesi

B. napus bitkisinin büyüme parametrelerine yönelik ölçümler dört haftalık bitkilerde gerçekleştirilmiştir. Ardışık üç gün boyunca kök ve yapraklardan alınan örneklerin yaş ve kuru ağırlıkları belirlendi. Yaş ağırlıkları tartılan yaprak ve kökler kuru ağırlık için dört gün 80 °C’de etüvde kurutulduktan sonra ağırlıkları tartılarak kaydedildi.

3.3.2 Bağlı Su İçeriği (RWC)

Bitkinin yapraklarının bağlı su içeriğinin incelenebilmesi için yaprak örneklerinin önce yaş ağırlıkları (YA) tartıldı. Sonrasında örnekler beş saat boyunca deiyonize su içerisinde bekletildi. Beş saatlik süre sonunda turgorlu ağırlıkları (TA) belirlenen örnekler kuru ağırlıklarının elde edilmesi için dört gün 80 °C’de etüvde kurutulduktan sonra ağırlıkları tartılarak kaydedildi. Bağlı su içeriği değerleri Smart ve Bingham’a (1972) göre hesaplandı. Bağlı su içeriği formülü aşağıda verildi.

$$RWC \% = [(YA-KA) / (TA-KA)] \times 100$$

3.3.3 Klorofil Floresan Ölçümleri

Bitkilere fotosentetik verim ile ilişkili olarak klorofil floresan ölçümleri uygulamanın 3., 5. ve 7. gününde yapılmıştır. Klorofil floresan ölçümleri, farklı bitkilerin yapraklarından rastgele örnekleme yapılarak gerçekleştirildi. Ölçüm için yapraklar 1 cm⁻² lik bir alana sahip yaprak klipsi ile 30 dk karanlıkta tutulduktan sonra Plant Efficiency Analyser (Hansatech) cihazı kullanılarak, yaprakların bazal klorofil floresan (F0), maksimum floresan uyarım (Fm), değişken floresan (Fv) ve fotosentez etkinliği değerleri ölçülmüş ve Fv/Fm oranları belirlenmiştir.

3.3.4 Ozmotik Potansiyel Ölçümü

Ozmotik potansiyelin belirlenmesi için 0,5 g yaprak örneği ependorf içerisinde homojenizasyon yapıldıktan sonra 10.000g 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatantlar alındı. WESCOR Vapro Vapor Pressure Osmometer 5520 cihazı kullanılarak ölçüldü. Ozmotik potansiyel değişim mmol kg⁻¹ olarak belirlendi.

3.3.5 Total Protein Miktarının Belirlenmesi

Yaprak (0,5 g) ve kök örnekleri (0,2 g) sıvı azot ile havanda toz haline getirildikten sonra 50mM Sodyum-fosfat tamponu (Na-P) (pH:7.8), %1 (w/v) polivinilpolipirrolidon (PVPP) ve 1mM ethylenediaminetetracetic acid disodium (EDTA Na₂) içeren ekstraksiyon tamponu (1mL) ile homojeniz edildi. Örnekler 4 °C’de 40 dakika 13.000g’de santrifüj edildikten sonra süpernatantlar alındı.

Toplam protein miktarı, Bradford (1976)’ya göre bovin serum albümin (BSA) standartları kullanılarak belirlendi. Yaprak ve kök örneklerinden gerekli seyreltmeler yapıldıktan sonra 50 µL ependorf tüplerine pipetlendi ve üzerine 950 µL Bradford reaktifi eklenerek oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi. Süre sonrasında örneklerdeki absorbans değişimi Shimadzu UV-1600 (Shimadzu, Japonya) spektrofotometre cihazı ile 595 nm de ölçüldü. Protein miktarları, BSA standartlarıyla hazırlanan standart eğri kullanılarak hesaplanmıştır.

3.3.6 Prolin Miktarının Belirlenmesi

Prolin miktarının belirlenmesi Quamar ve Kumar (2019)’a göre yapıldı. Örnekler %1’lik sülfosalisilik asit(SSA) ile homojenize edildi. 0,1 gr örnek 2ml SSA ile homojenize edildi. Ekstrakt 12.000 rpm’de 10 dk +4 °C santrifüj edildi. Alınan süpernatantlara her 200 µL için 400 µL %1,25’ lik ninhidrin eklendi. Hazırlanan standartlar ve örnekler 95 °C’de 30 dakika inkübe edildi. Reaksiyonun durması için hemen buza alınan örnekler plate kuyucuklarına pipetlendi (150 µL) ve absorbans değişimi plate reader cihazı (Thermofisher Multiscan Go) yardımıyla 510 nm’de ölçülerek belirlendi.

3.3.7 Laktat Miktarının Belirlenmesi

Yaprak ve kök örnekleri (0,5 g) sıvı azot yardımıyla havanda dövülerek toz haline getirildi. Üzerine %7,5 ‘lik Periklorik asit (PCA) (1mL) eklendi. Örnekler 4°C’de 12.000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatantlar alındı. Her 1mL süpernatant için 20µL Tris (pH:7.0) (pH’sı K₂CO₃ ile ayarlandı) eklendi. Laktat miktarının belirlenmesi için ekstraksiyon SIGMA-ALDRICH/ L- Lactate Assay Kit

(USA) kullanıldı. Üretici firma protokolüne göre 20µL süpernatant örneğine 80µL reaksiyon karışımı eklenmiştir. Örneklerdeki absorbans değişimi plate reader cihazı (Thermofisher Multiscan Go) yardımıyla 565nm’de ölçüldü. Örneklerin ilk absorbans değerleri ölçülerek kaydedildi ve 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra tekrar absorbans değerleri ölçüldü. Örneklerdeki laktat miktarları, aynı koşullarda absorbans değerleri ölçülen laktat standartlarıyla hazırlanan standart eğri kullanılarak hesaplandı.

3.4 Enzimatik Analizler

3.4.1 Laktat Dehidrogenaz (LDH) Aktivitesinin Belirlenmesi

LDH enzim aktivitesinin belirlenmesi Sweetlove ve ark. (2000)’a göre bazı modifikasyonlar yapılarak gerçekleştirilmiştir. LDH enzim aktivitesinin belirlenmesi için 1g örnek (yaprak ve kök) 100mM Tris-HCL (pH:8.0), 50mM Bovine Serum Albumin (BSA), 10mM Dtt, %15 (v/v) gliserin ve 10mM Askorbat içeren 4mL homojenizasyon tamponu ile homojenize edilmiştir. 16.000 rpm’de 40dk +4°C’de santrifüjlendi ve süpernatantlar alındı. Homojenatlar laktat dehidrogenaz ve alkol dehidrogenaz (ADH) aktivitelerinin belirlenmesi için kullanılmıştır. LDH enzim aktivitesinin belirlenmesi için 100mM Tris-HCL (pH:7.1) tamponu 0,2mM NADH, 10mM pirüvat ve hazırladığımız homojenatlar kuvartz küvetlerde 340 nm’de 3 dakika boyunca Shimadzu UV-1600(Shimadzu, Japonya) spektrofotometrede okunmuş ve değerler kaydedilmiştir.

3.4.2 Alkol Dehidrogenaz (ADH) Aktivitesinin Belirlenmesi

ADH enzim aktivitesi Sweetlove et al. (2000)’a göre belirlendi. 100mM Tris (ph:8.9) tamponu, 0,2mM NAD, 100mM etanol ve hazırladığımız homojenatlar kuvartz küvetlerde 340 nm’de 3 dakika boyunca Shimadzu UV-1600(Shimadzu, Japonya) spektrofotometrede okunmuştur ve değerler kaydedilmiştir.

3.4.3 Piruvat Dekarboksilaz (PDC) Enziminin Belirlenmesi

PDC enzim aktivitesinin belirlenmesi Sweetlove et al. (2000)’na göre bazı modifikasyonlar yapılarak gerçekleştirilmiştir. PDC enzim aktivitesinin belirlenmesi için 1g örnek (yaprak ve kök) 100mM HEPES (pH:7,5) tamponu,

10mM EDTA, 5mM DTT, %0,5 BSA ve %0,1 PVP içeren 4mL homojenizasyon tamponu ile homojenize edildi.

Örnekler 10.000g'de 5dk +4°C'de santrifüjlendi. Süpernatantlar temiz tüplere aktarıldı. Aktivitenin ölçülmesi için 100mM Tris (pH:8,5), 30mM pirüvik asit, 0,2mM NADH, 1 ünite alkol dehidrogenaz ve homojenatlar kuvartz küvetlerde 340nm'de 3 dakika süresince Shimadzu UV-1600 (Shimadzu, Japonya) spektrofotometrede okumuştur ve değerler kaydedildi.

3.5 RNA Ekstraksiyonu

RNA ekstraksiyonu Norgen Plant/Fungi RNA Purification Kit, (Canada) ile yapılmıştır. 100mg örnek (yaprak ve kök) sıvı azot ile toz haline getirildikten sonra üzerine 600µL Lysis Buffer ve β -merkaptaetanol eklendi. Örnekler 1,5mL'lik tüplere geçirildikten sonra 55°C'de 5 dakika inkübe edildi. Sonrasında örnekler clear O-ring filtre içeren tüplere aktarılaraq 14.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Süpernatant temiz tüpe aktarıldıktan sonra üzerine %96 etanol eklendi. Örnekler Spin colon-grey- O-ring içeren filtre tüplerine aktarıldı ve 6.000 rpm'de santrifüj edildikten sonra tüpte kalan kısım atıldı. Yıkama işlemi için wash solution A (400µL) eklenen kolonlar 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi bu işlem 3 kere tekrarlandı, son olarak 2 dakika santrifüj edilerek membran kurutuldu. Elution solution A (50µL) örnekler 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Örneklerin RNA miktarlarının belirlenmesi için Bio photometre cihazı (Eppendorf) kullanıldı. Ekstrakte edilen RNA'ların bütünlüğünü ve kalitesini kontrol etmek için jel elektroforezi yapıldı.

3.6 cDNA Sentezi

cDNA sentezi Grisp Research Solutions Xpert cDNA Synthesis Kit ile yapıldı. Üretici firma protokolüne göre 2µL RNA örneğine; 4µL Buffer, 1µL dNTP, 1µL oligo primer, 1µL enzim ve 11µL dH₂O karışımı eklendi. Örnekler 55°C'de 50 dakika, 85°C'de 5 dakika inkübe edilerek cDNA sentezi gerçekleştirildi. PCR sonrası örnekler 1:10 seyreltilerek qPCR analizlerinde kullanılabilecek kadar -20°C'de saklandı.

3.7 Kantitatif PCR (qPCR) Analizi

Warburg etkisiyle ilişkili olarak seçilen *P4H-9* ve *P4H-10* genlerine ve referans gen Aktin e ait primerlerin tasarımı Primer-Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) üzerinden yapıldı. Primerlere ait dizi ve aksesyon numarası Çizelge 2.1’de verildi. Örneklerle ait cDNA’lar kullanılarak hedef genlerin transkript değişimleri real-time PCR (qPCR) kullanılarak belirlendi. Applied Biosystems (ABI) Step One Plus Real time PCR sistemi ve Roche FastStart Essential DNA Green Master kiti kullanıldı. Reaksiyon toplam hacim 10 µL (2 µL of cDNA, 8 µL PCR master mix) ve PCR koşulları: 95 °C’de 10dk sonrasında, 40 döngü 95 °C’de 15s, 60 °C’de 1dk ve 72 °C’de 1dk olacak şekilde yürütüldü. Reaksiyon tamamlandıktan sonra elde edilen Ct verileri kullanılarak transkript miktarındaki değişiklik standart eğri metodu kullanılarak hesaplandı.

Çizelge 3.1: qPCR analizlerinde kullanılan primerlerin listesi

Gen	Aksesyon No	Primer Dizisi
<i>ACTIN</i>	XM_013867490.2	F: GTTGGGATGGGTCAGAAAGAT R: TCCCAGTTGCTCACAATACC
<i>P4H9</i>	XM_013800784.2	F: GAGTTAGACCCAGGTTGAGAATG R: CCAACGGATTTCATCTCCAGTAA
<i>P4H10</i>	XM_013833049.2	F: GGGAACCCAGAGCTTCTATTT R: CTGTGCTCTTTCCAGTCTTCT

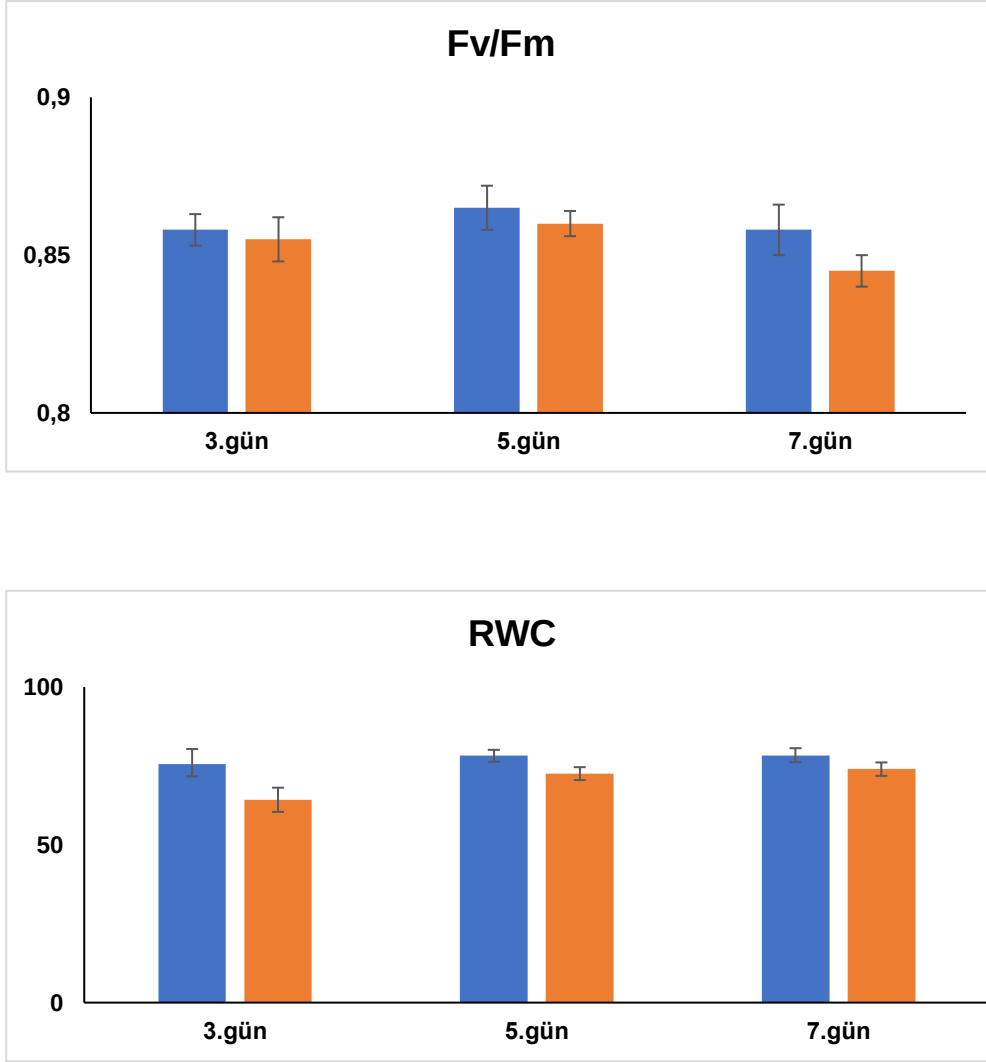
4. BULGULAR

4.1 Fizyolojik Parametreler

B. napus L. bitkilerine tuz stresi (100 mM NaCl) uygulamasının 3., 5. ve 7. günlerinde alınan yaprak örneklerinde Fv/Fm, RWC; yaprak ve kök örneklerinde ise yaş-kuru ağırlık değişimi gibi çeşitli fizyolojik parametreler ölçüldü. Uygulama yaptığımız bitkilerde tuz stresine bağlı olarak değişen fotosistem II'nin maksimum kuantum verimliliğini ifade eden Fv/Fm oranları ve bağıl su içeriğine (RWC) ait veriler kontrol grupları ile karşılaştırmalı olarak Çizelge 4.1 ve Şekil 4.1 de verilmiştir. Fv/Fm değerleri kontrol gruplarında tuz gruplarına oranla daha yüksek gözlemlendi. Ancak bu yüksek değerler sadece 7. günde istatistiksel olarak anlamlı kaydedildi. 3. ve 5. günde çok belirgin bir farklılık gözlenmezken 7. günde kontrol grubundan tuz stresi grubuna göre % 1,5 daha yüksek ölçüldü. Tuz uygulanan bitkilerin RWC değerinde tuz uygulamasını takip eden günlerde genel olarak azalma görüldü. Bu oranlar 3., 5. ve 7. günlerde sırasıyla %10, %7 ve %5 olarak kaydedildi.

Çizelge 4.1 *B.napus* L. bitkilerinde örnekleme günlerine ait fotosentez etkinliği (Fv/Fm), bağıl su içeriği (RWC) sonuçları.

	Fv/Fm		RWC (%)	
	Kontrol	Tuz	Kontrol	Tuz
3. Gün	0,858 ± 0,005	0,855±0,007	75,565 ± 4,8	64,277± 3,84
5. Gün	0,865 ± 0,007	0,860±0,004	78,350 ± 1,76	72,575± 2,04
7. Gün	0,858 ± 0,008	0,845±0,005	78,329 ±2,3	73,989± 2,13

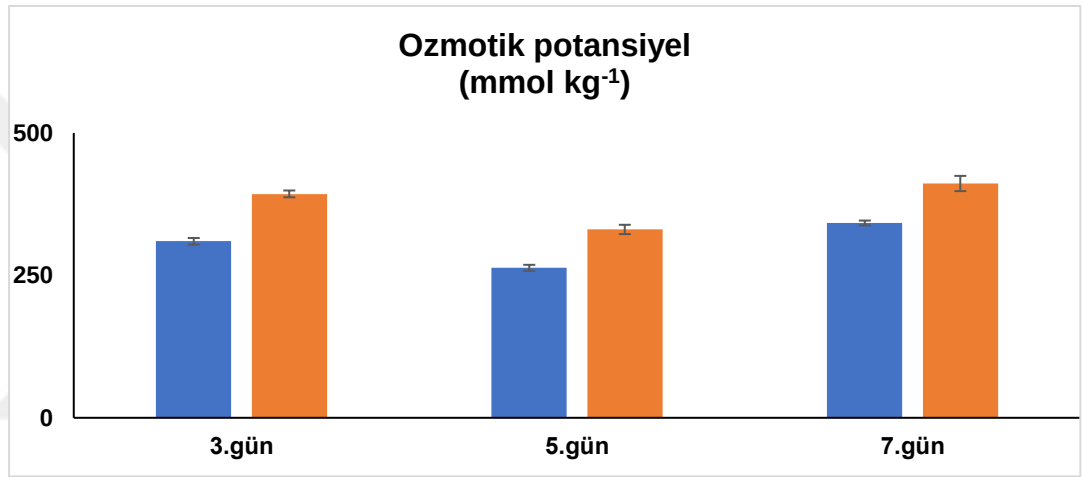


Şekil 4.1 *B.napus L.* bitkilerinde örnekleme günlerine ait fotosentez etkinliği (Fv/Fm), bağıl su içeriği (RWC) grafiği

Kontrol ve tuz gruplarından alınan yaprak örneklerinde ozmotik potansiyel değişimi de incelendi. Ozmotik potansiyel sonuçları çizelge 4.2 ve şekil 4.2’da verildi. Tuz stresi uygulanan gruplarda özellikle tüm günlerde daha yüksek ozmotik potansiyel değerleri kaydedildi. Tuz stresi gruplarındaki ozmotik potansiyel değerleri kontrol grupları ile karşılaştırıldığında yaklaşık olarak 3. gün %27; 5. gün %25 ve 7.gün %20 oranlarında artış gösterdi.

Çizelge 4.2 *B.napus l.* bitkisine ait örnekleme günlerine göre osmotik potansiyel ölçümü.

	Osmotik Potansiyel Kontrol	Osmotik Potansiyel Tuz
3.gün	309,8 ± 5,75	393 ± 5,96
5.gün	263 ± 5,26	330 ± 8,17
7.gün	342 ± 4,22	411 ± 13,37



Şekil 4.2. *B.napus L.* bitkilerinde örnekleme günlerine ait osmotik potansiyeli.

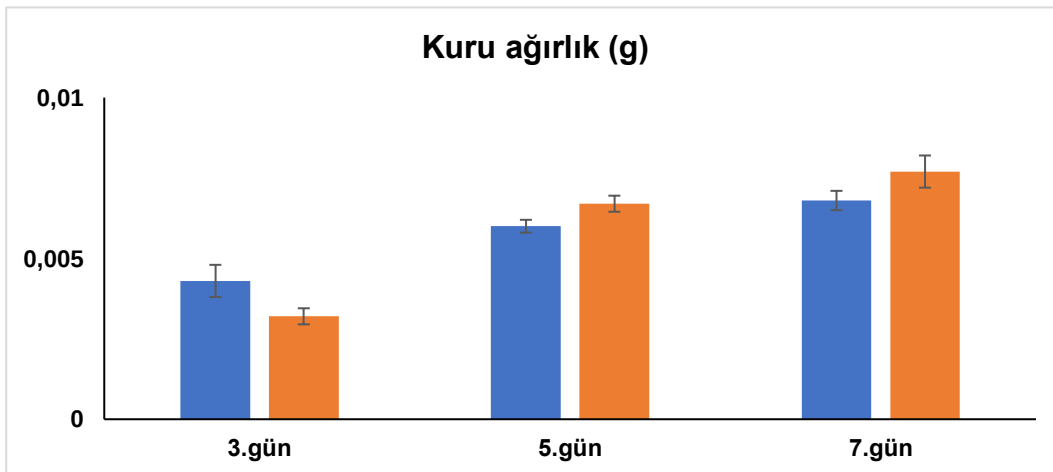
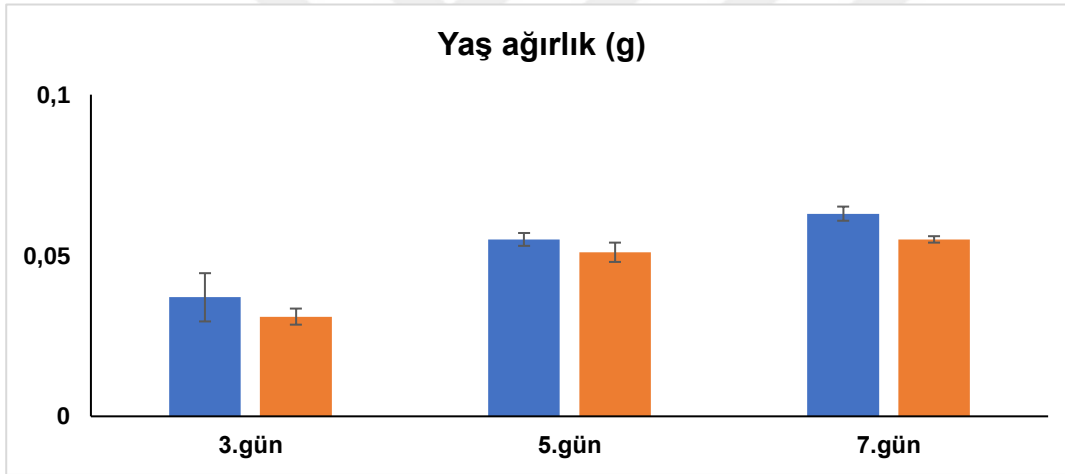
4.2. Ağırlık Sonuçları

Tuz uygulaması yapılan *B. napus* bitkilerinden 3., 5. ve 7. günlerde alınan yaprak ve kök örneklerinde büyüme süreci hakkında bilgi sahibi olmak ve karşılaştırma yapmak amacı ile yaş ve kuru ağırlıklar tartıldı ve kaydedildi. (Çizelge 4.3 ve şekil 4.3).

	Yaprak Y.A. Kontrol	Yaprak Y.A. Tuz	Yaprak K.A. Kontrol	Yaprak K.A. Tuz
3. Gün	0.037± 0,0075	0.031± 0,0025	0.0043±0,0005	0.0032±0,00025
5. Gün	0.055± 0,002	0.051± 0,003	0.006 ± 0,0002	0.0067±0,00025
7. Gün	0.063± 0,0022	0.055± 0,001	0.0068 ± 0,0003	0.0077±0,0005

Çizelge 4.3 *Brassica napus l.* bitkisine ait örnekleme günlerine göre yaprak yaş ve kuru ağırlıkları.

Yaprak yaş ağırlığı kontrol ve tuz gruplarından alınan örneklerde 3., 5. ve 7.günlerde kontrol gruplarında tuz stresi uygulanan gruba göre artış gösterdi. Yaprak yaş ağırlığı sırasıyla %16, %7 ve %12 oranında artış gösterdi.



Şekil 4.3. *Brassica napus l.* bitkisine ait örnekleme günlerine göre yaprak yaş ve kuru ağırlıkları

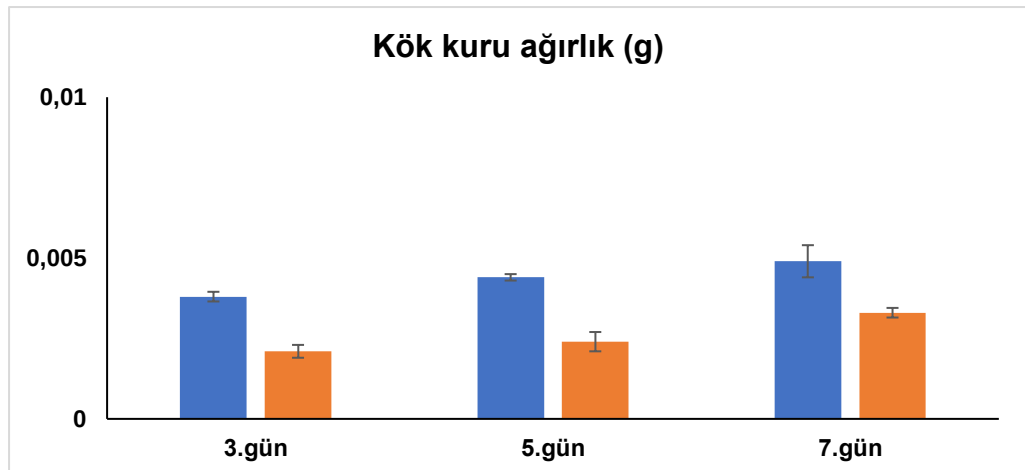
Aynı yaprak örneklerinin kuru ağırlıkları ise 3.gün kontrol örneğinin ağırlığı tuz örneğinin ağırlığına göre %25 daha fazla kaydedilirken diğer günlerde tuz stresi uygulanan gruplarda artış gösterdi. Bu değerler incelendiğinde 5. gün kontrole göre tuz grubunda %11; 7.günde ise %13 oranında artış gösterdi. Tuz uygulaması yaptığımız *B.napus* bitkisine ait kök yaş ve kuru ağırlığına ait kontrol ve tuz gruplarının sonuçları şekil 4.4 ve çizelge 4.4’de verilmiştir. Tuz uygulamasını takiben 3., 5. ve 7.günlerde kök yaş ağırlığı genel olarak kontrol gruplarında daha yüksek oranda gözlendi. Bununla birlikte 3. günde tuz grubunda yaprak yaş ağırlığı %10 daha fazla kaydedildi. Diğer günlerde ise kontrol grubu yaprak yaş ağırlığı daha yüksek seviyede gözlendi (5. günde %15; 7.günde ise %16).

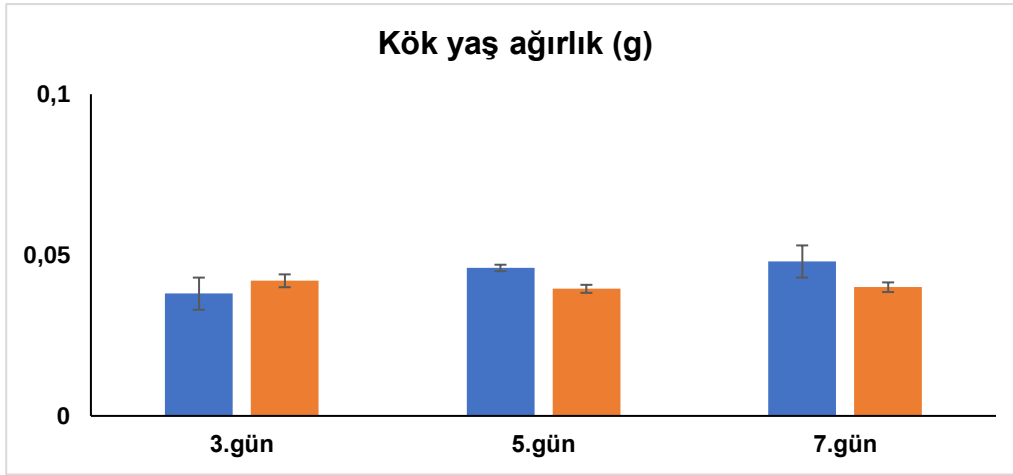
Çizelge 4.4 *Brassica napus l.* bitkisine ait örnekleme günlerine göre kök yaş ve kuru ağırlık tayini

	Kök Y.A Kontrol	Kök Y.A. Tuz	Kök K.A Kontrol	Kök K.A. Tuz
3. Gün	0.038±0,005	0.042± 0,002	0.0038±0,00015	0.0021± 0,0002
5. Gün	0.046±0,001	0.0395±0,00125	0.0044±0,0001	0.0024±0,0003
7. Gün	0.048±0,005	0.040± 0,0015	0.0049±0,0005	0.0033± 0,00015

Aynı örneklerin kuru ağırlıklarında yapılan örneklerde kök kontrol gruplarının kuru ağırlıklarında tuz gruplarına göre sırasıyla 3,5,7.günlerde %28, %45, %32 oranlarında daha yüksek sonuçlar alındı.

Şekil 4.4 *Brassica napus l.* bitkisine ait örnekleme günlerine göre kök yaş ve kuru ağırlıklartayini



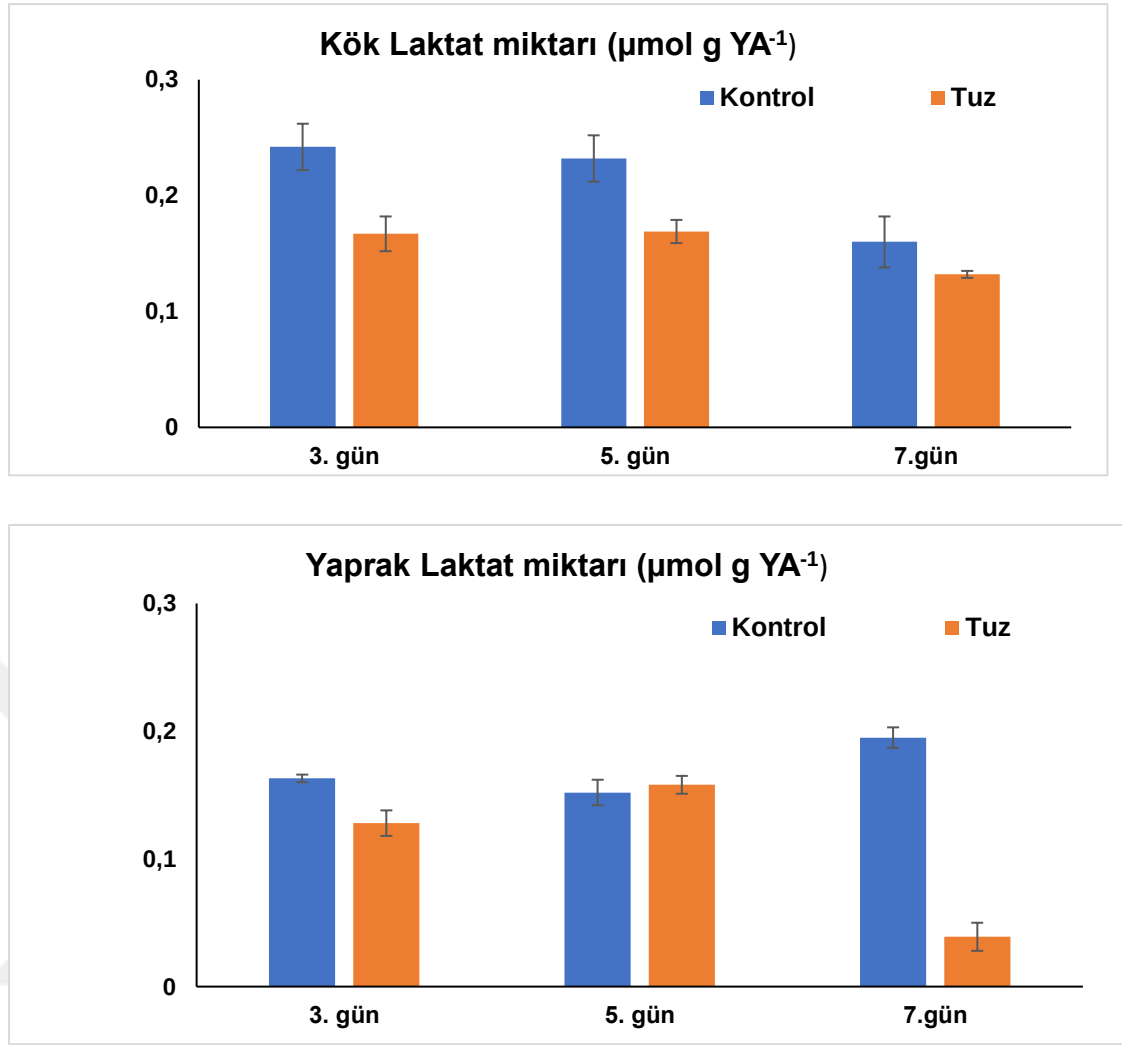


4.3. Laktat Miktarı

B. napus bitkisine tuz stresi uygulamasının kök ve yaprak örneklerinde Laktat miktarındaki değişim çizelge 4.5 ve şekil 4.5 de verilmiştir. 3. gün kontrol grubunun köklerinde Laktat miktarı diğer günlere göre daha yüksek çıktı. 3. gün tuz uygulanan köklerde ise laktat miktarı kontrol grubuna göre %30 daha düşük çıktı. Köklerin 5. gününde tuz grubunun laktat miktarında kontrol grubuna göre %27, 7. günde ise %17 oranında bir düşüş görüldü.

	Kök		Yaprak	
	Kontrol	Tuz	Kontrol	Tuz
3. Gün	0,242 ± 0,02	0,167 ± 0,015	0,163 ± 0,003	0,128 ± 0,01
5. Gün	0,232 ± 0,02	0,169 ± 0,01	0,152 ± 0,01	0,158 ± 0,007
7. Gün	0,160 ± 0,02	0,132 ± 0,003	0,195 ± 0,008	0,039 ± 0,011

Çizelge 4.5 *Brassica napus* l. bitkisine ait örnekleme günlerine göre Laktat miktarı tayini.



Şekil 4.5 *B.napus L.* bitkilerinde örnekleme günlerine ait Laktat miktarı tayini

Yaprak örneklerinde ise tuz uygulamasının 3. gününde kontrol grubuna göre Laktat miktarında %21 düşüş görüldü, 5. günün kontrol ve tuz grubu arasında rakamsal olarak çok bir fark görülmedi ancak Yapraklardan alınan örneklerde 7. gün kontrol grubunun laktat miktarı diğer günlere göre daha yüksek çıkarken aynı günün tuz grubundaki laktat miktarında %80 oranında düşüş görüldü.

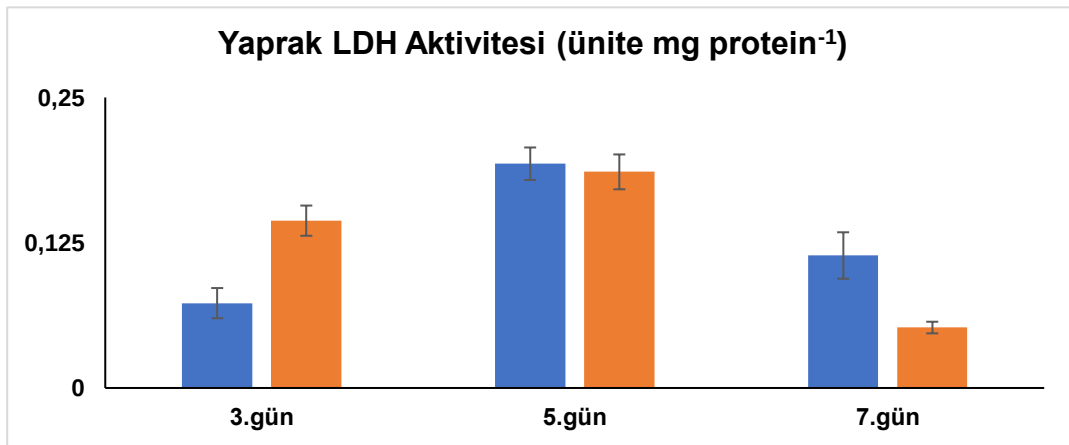
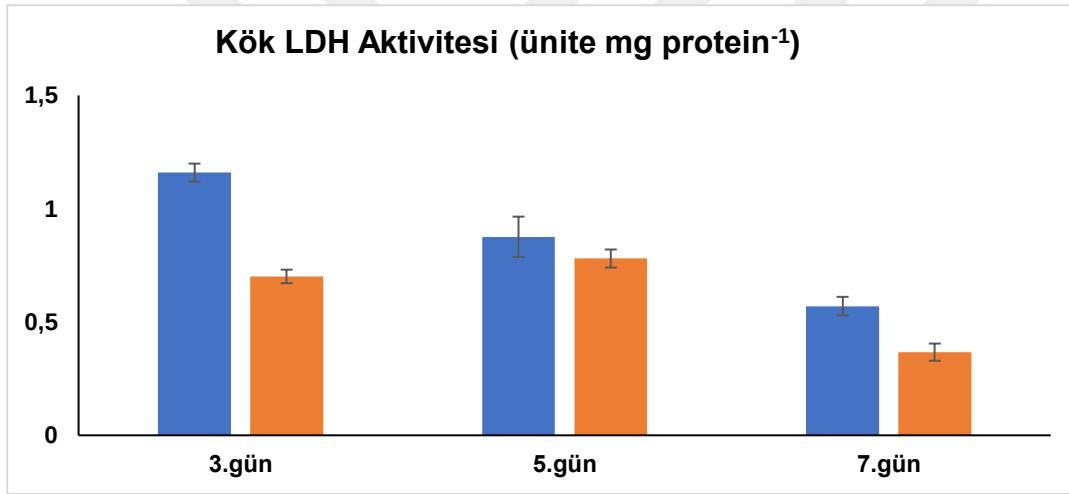
4.4 Laktat Dehidrogenaz Aktivitesi

Ardışık günlerde alınan kök ve yaprak kontrol ve tuz gruplarında laktat dehidrogenaz enzim aktivitesi oranları Çizelge 4.6 ve Şekil 4.6 da verildi. Kontrol grubu 3.gün LDH aktivitesi oranı diğer günlere göre yüksek çıktı. Aynı günün tuz uygulanan grubunda ise kontrole göre %40 oranında bir düşüş görüldü. 5. Günde

kontrol grubuna göre tuz grubunda %11 oranında bir düşüş görüldü. 7. Gün kök LDH aktivitesi diğer günlere göre daha düşük çıkarken aynı günün tuz grubunda %55 oranında bir düşüş görüldü.

	Kök		Yaprak	
	Kontrol	Tuz	Kontrol	Tuz
3. Gün	01,159 ± 0,04	0,701 ± 0,03	0,073 ± 0,013	0,144 ± 0,013
5. Gün	0,876 ± 0,089	0,78 ± 0,04	0,193 ± 0,014	0,186 ± 0,015
7. Gün	0,570 ± 0,041	0,367 ± 0,038	0,114 ± 0,02	0,052 ± 0,005

Çizelge 4.6 *Brassica napus l.* bitkisine ait örnekleme günlerine göre LDH aktivitesi tayini



Şekil 4.6 *B.napus L.* bitkilerinde örnekleme günlerine ait kök ve yaprak LDH aktivitesi sonuçları

Yapraklarda ise kök grubuna göre LDH aktivite oranları daha düşük görüldü. Tuz uygulamasının 3. günde kontrol grubuna göre tuz grubunda LDH aktivitesinde %97 oranında artış görüldü. 5. Gün Yaprak grubunda ise kontrol grubuna göre LDH aktivitesinde %3'lük bir düşüş görüldü. 7. gün LDH aktivitesinde kontrol grubuna göre tuz grubunda %54 oranında düşüş görüldü.

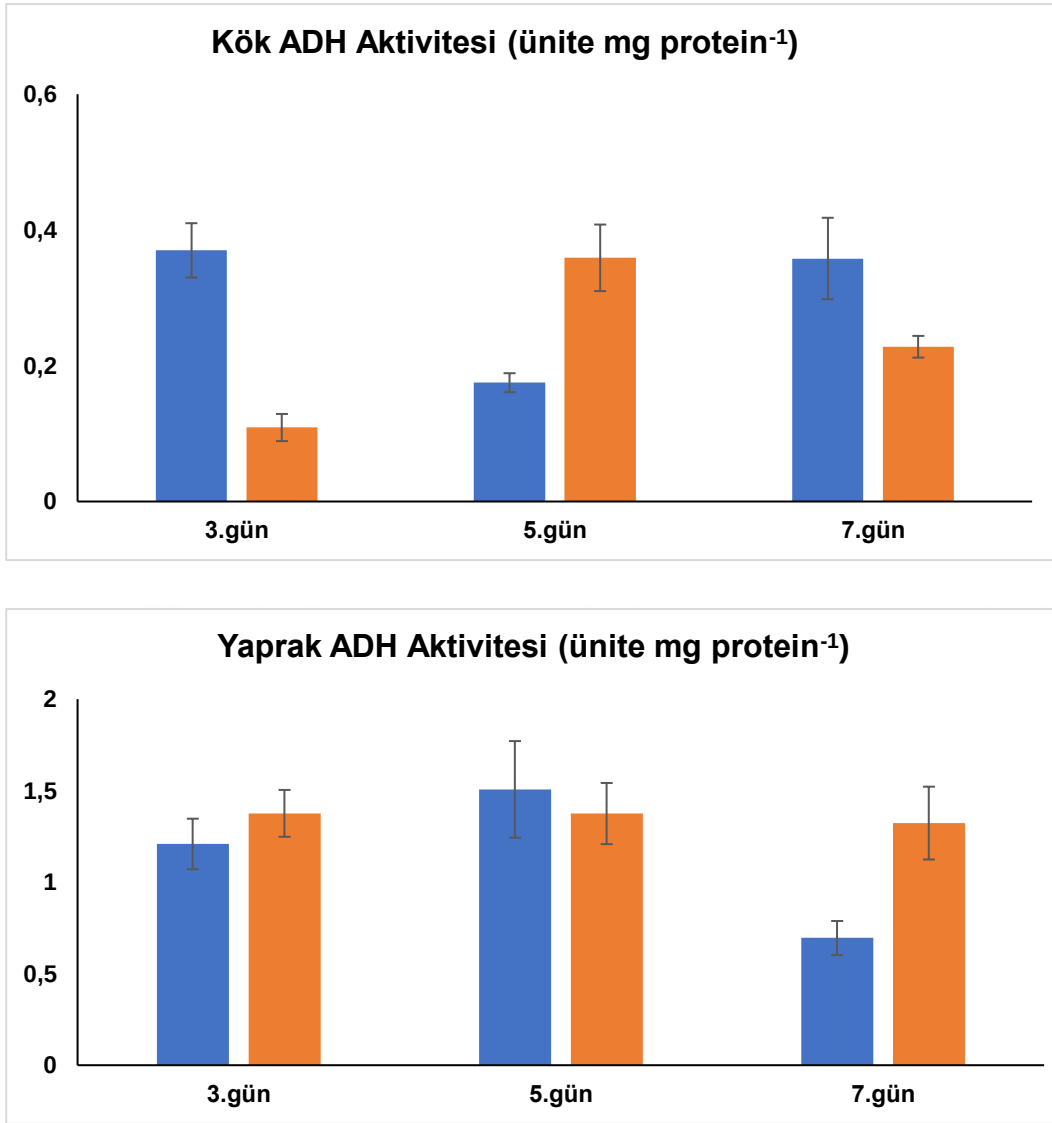
4.5 Alkol Dehidrogenaz Aktivitesi

Brassica napus l. bitkisine ait örnekleme günlerine göre ADH Aktivitesi tayini için yapılan analizlere ait sonuçlar çizelge 4.7 ve şekil 4.7 de verilmiştir. Kontrol grubu kökte 3. günde en yüksek ADH aktivite oranı görüldü. 3. gün kökün kontrol grubundaki ADH aktivitesi oranı tuz uygulanan gruba göre %70 daha yüksek çıktı. Kontrol kök grubunun 5. gününde 3. güne göre %111 oranında ADH aktivitesinde düşüş görüldü. Aynı günün tuz grubuna göre ise %105 daha düşük ADH aktivite oranına sahip olduğu görüldü. 7. gün kök kontrol örneğine göre tuz uygulanan grubun ADH aktivitesi %36 oranında düştü.

Çizelge 4.7 *Brassica napus l.* bitkisine ait örnekleme günlerine göre ADH Aktivitesi tayini.

	Kök		Yaprak	
	Kontrol	Tuz	Kontrol	Tuz
3. Gün	0,370 ± 0,04	0,109 ± 0,02	1,209 ± 0,138	1,376 ± 0,128
5. Gün	0,175 ± 0,014	0,359 ± 0,049	1,507 ± 0,264	1,375 ± 0,167
7. Gün	0,358 ± 0,06	0,228 ± 0,016	0,695 ± 0,093	1,323 ± 0,199

Yapraklarda kontrol ve tuz gruplarının ADH aktivitesindeki değerler kök gruplarına göre çok daha yüksek çıkmıştır. Yaprak 3. gün ADH aktivitesindeki oran tuz grubunda aynı günün kontrol grubuna göre %13 artış gösterirken 5. günün tuz grubunda ise aynı günün kontrol grubuna göre %8 oranında düşüş görüldü. 7.gün Yaprak ADH aktivitesinde ise tuz grubunda kontrole göre %90 artış görüldü.



Şekil 4.7.*B.napus L.* bitkilerinde örnekleme günlerine ait ADH aktivitesi sonuçları

4.6. Pirüvat Dekarboksilaz Aktivitesi

PDC aktivitesindeki değişim kök ve yaprakların kontrol ve tuz gruplarından 3,5 ve 7. günlerde yapılan çalışmalarda belirlendi ve çizelge 4.8 ve şekil 4.8 de gösterildi.

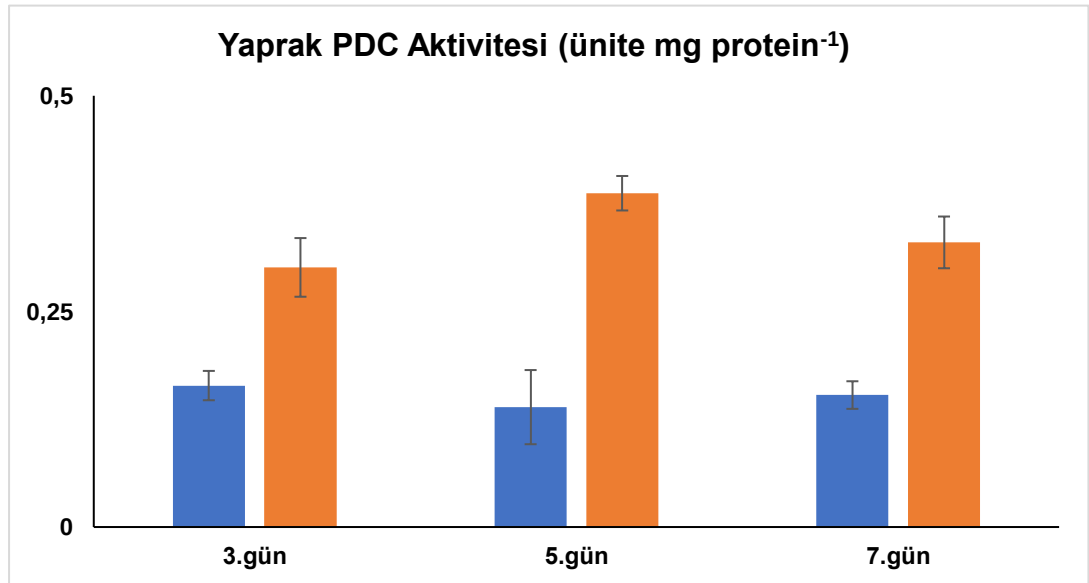
Köklerde ve yapraklarda tuz uygulamasından sonraki 3,5 ve 7. Günlerde PDC aktivitesinde kontrol gruplarına göre belirgin bir artış görüldü. Köklerde 3. gün kontrol grubuna göre tuz uygulanan gruplarda PDC aktivitesi %83 artış gösterdi. Kök 5. gün PDC aktivitesi tuz grubunda kontrol grubuna göre %178 artış gösterdi.

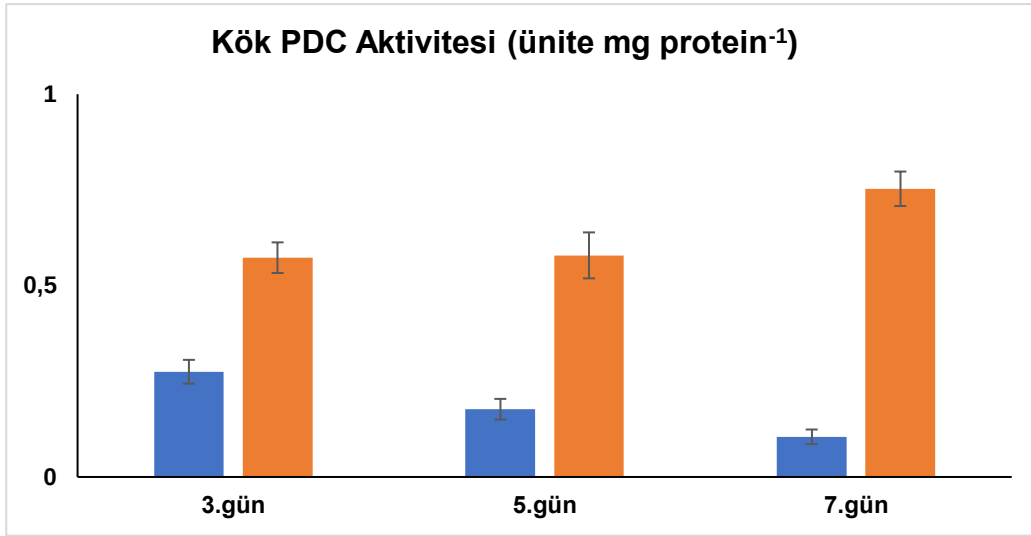
Kök 7.gün PDC aktivitesi tuz grubunda kontrol grubuna göre %115 daha yüksek çıktı.

Çizelge 4.8 *Brassica napus l.* bitkisine ait örnekleme günlerine göre Pirüvat Dekarboksilaz Aktivitesi tayini.

	Kök		Yaprak	
	Kontrol	Tuz	Kontrol	Tuz
3. Gün	0,164 ± 0,017	0,301± 0,034	0,275 ± 0,031	0,573 ± 0,04
5. Gün	0,139 ± 0,043	0,387± 0,02	0,177 ± 0,027	0,579 ± 0,06
7. Gün	0,153 ± 0,016	0,330± 0,03	0,105 ± 0,019	0,753 ± 0,045

Yapraklardan alınan örneklerde 3.gün tuz grubunda PDC aktivitesi kontrol grubuna göre %108 artış gösterdi, 5.günde ise kontrole göre 2 kat tuz grubunda PDC aktivitesi artış gösterdi.7. gün yaprak tuz grubunda ise PDC aktivitesi kontrole göre 6 kat artış gözlemlendi.





Şekil 4.8. *B.napus L.* bitkilerinde örnekleme günlerine ait PDC aktivitesi sonuçları.

4.7. Prolin Miktarı

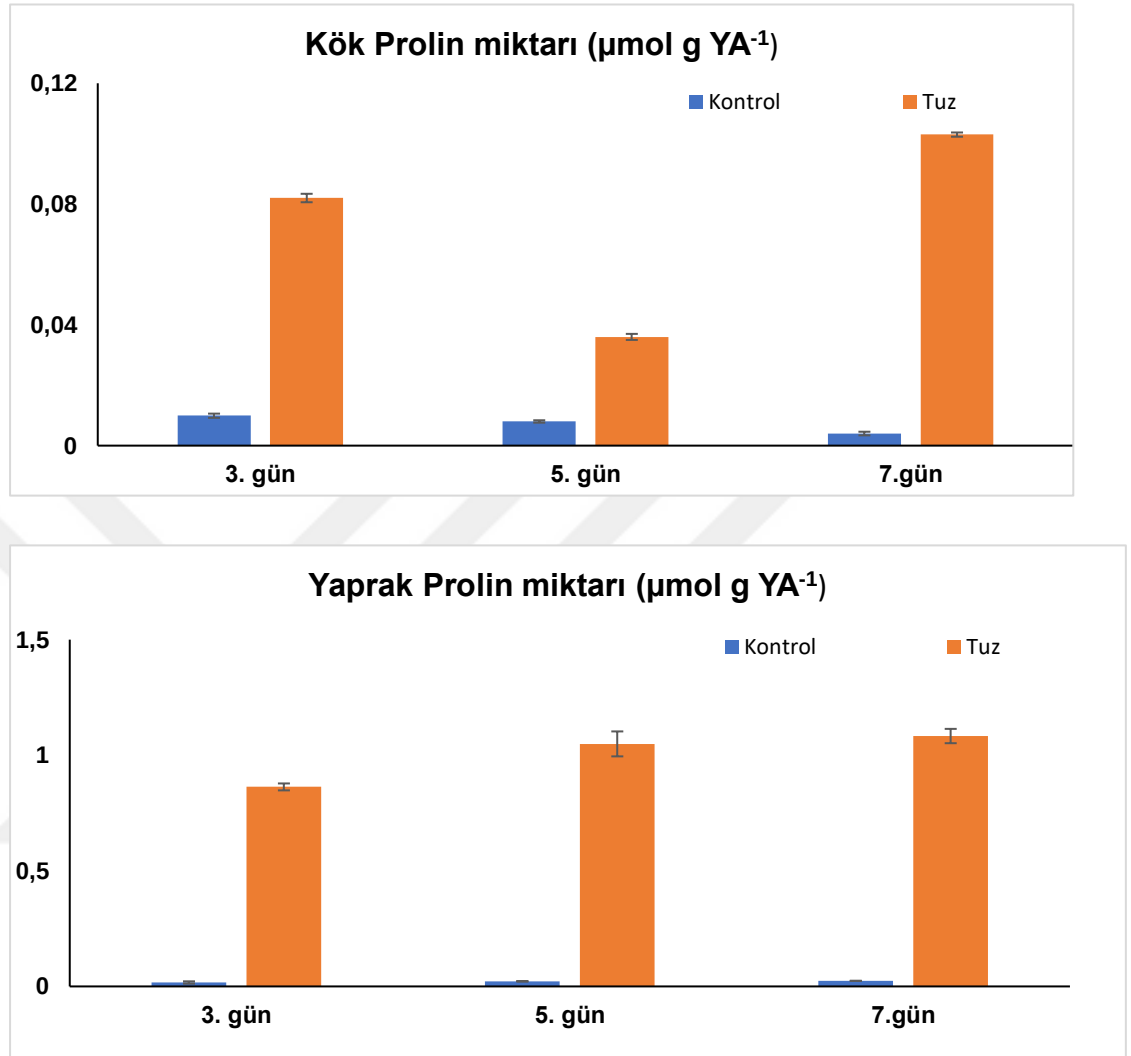
Hızlı serbest prolin birikimi, tuz stresine verilen tipik bir yanıttır. Kuraklığa veya toprakta yüksek tuz içeriğine maruz kaldığında (her ikisi de su stresine yol açar), birçok bitki, bazı durumlarda diğer tüm amino asitlerin toplamının birkaç katı olan yüksek miktarlarda prolin biriktirir (Mansour, 2000)

Ardışık üç günde yapılan tuz uygulaması ile birlikte kök ve yaprakda Prolin miktarı kontrol ve tuz grupları arasında belirgin oranlarda artış göstermiştir. Artış miktarları ve oranları çizelge 4.10 ve şekil 4.10'da gösterilmiştir. Tuz uygulamasını takip eden 3.günde köklerden alınan örneklerde prolin miktarı tuz grubunda kontrol grubuna göre 8 kat, 5.gün 3kat, 7.gün 24 kat oranında artış gösterdi.

Çizelge 4.9.*Brassica napus l.* bitkisine ait örnekleme günlerine göre Prolin Miktarı tayini.

	Kök		Yaprak	
	Kontrol	Tuz	Kontrol	Tuz
3. Gün	0,0099 ± 0,0007	0,082±0,0014	0,017±0,005	0,863±0,015
5. Gün	0,008 ± 0,0004	0,036±0,001	0,022 ±0,001	1,049±0,054
7. Gün	0,004± 0,0006	0,103± 0,0007	0,024±0,0003	1,083±0,031

Yapraklarda ise prolin miktarındaki artış kontrol grubuna göre tuz gruplarında yaklaşık 50 kat oranlarında artış gösterdi.



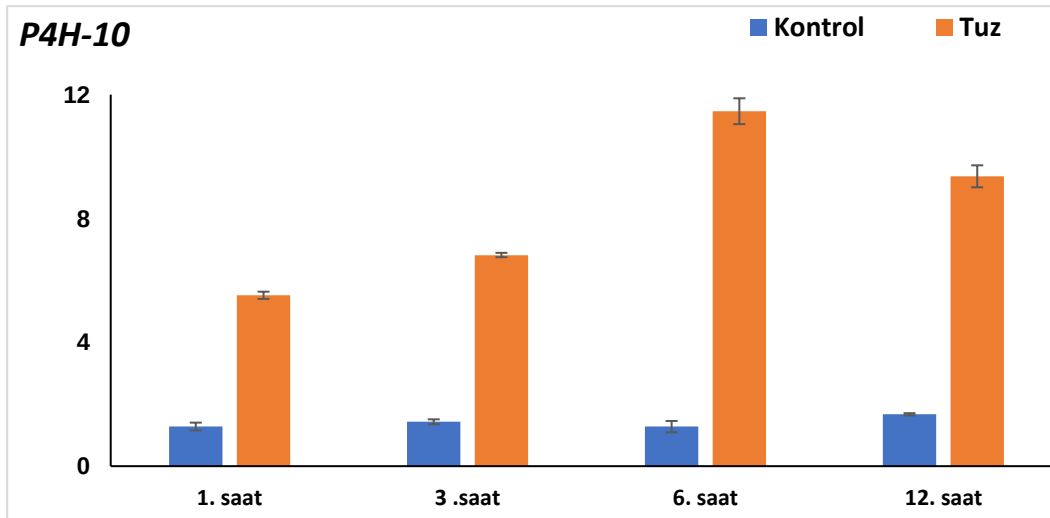
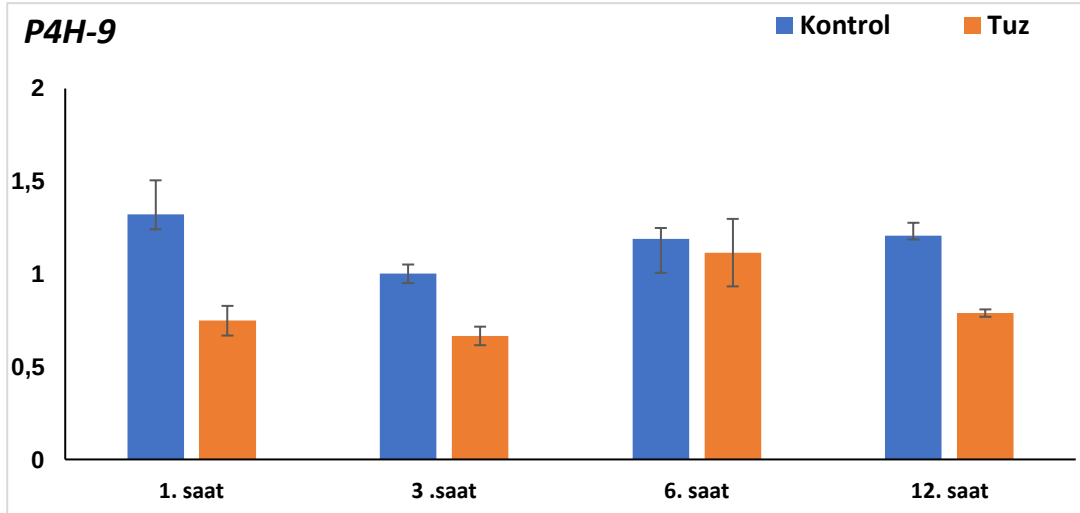
Şekil 4.9. *B.napus L.* bitkilerinde örnekleme günlerine ait Prolin miktarı sonuçları.

4.8. Gen Anlatımı Analizleri

Warburg ile ilişkili olduğu bilinen genlerin transkript profillerindeki değişim Real-Time PCR ile belirlendi. Sonuçlara ait veriler çizelge 4.11 ve şekil 4.11’de verildi. Tuz uygulamasını takiben 1., 3., 6., ve 12. saatte örneklem yapıldı. Tüm transkript profilleri referans gen Actin’e göre normalize edildi. Belirlenen saatlerde *Brassica napus* yapraklarından alınan örneklerde *P4H-9* ve *P4H-10* geninin transkript profillerindeki değişim incelendiğinde belirgin bir farklılık tespit edildi.

Çizelge 4.10 *Brassica napus L.* yaprak örneklerinde tuz stresi uygulamasından sonra 1-12 saatlik dönemde *P4H-9* ve *P4H-10* genlerinin transkript profillerindeki değişim.

	<i>P4H-9</i>		<i>P4H-10</i>	
	Kontrol	Tuz	Kontrol	Tuz
1. Saat	1,321±0,184	0,748 ± 0,08	1,281± 0,126	5,519±0,117
3. Saat	1,001± 0,05	0,666 ±0,05	1,433± 0,08	6,820±0,07
6. Saat	1,188± 0,06	1,115 ±0,182	1,276± 0,183	11,465±0,417
12. Saat	1,206 ± 0,07	0,789 ± 0,02	1,676± 0,036	9,362±0,355



Şekil 4.10 *B.napus L.* bitkilerinde örnekleme günlerine ait yaprak qPcr sonuçları.

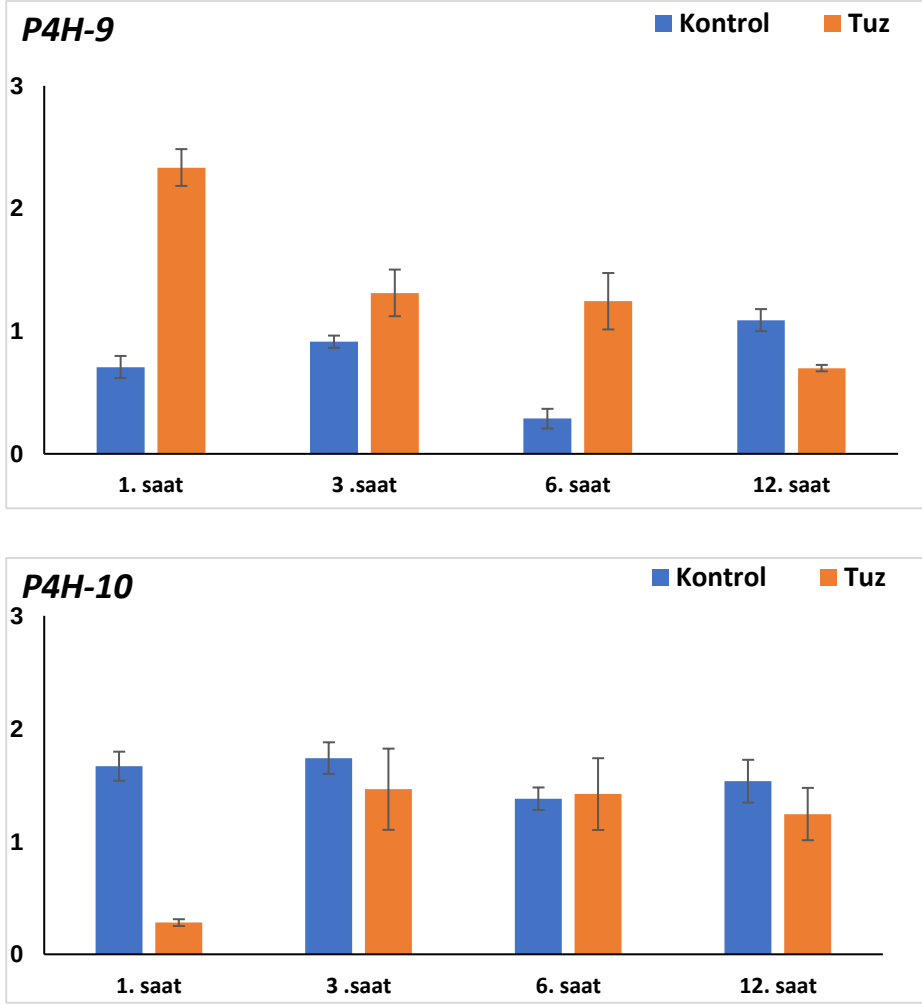
P4H-9 geninin transkript miktarı yaprak kontrol grubundaki miktarı tuz grubuna göre yüksek çıktı. Ardışık saatlerde yapılan çalışmaların sonucuna göre transkript miktarı kontrol grubunda tuz grubuna göre sırasıyla %43, %33, %6, %34 oranlarında yüksek bulundu. P4H-10 geni transkript miktarı sonuçları ise tuz gruplarında kontrol gruplarına göre belirgin farklarla daha yüksek çıktı. Buna göre belirlenen 1.,3.,6.,12. saatlerinde sırasıyla 3,3,7,ve 4 kat transkript miktarı tuz gruplarında daha yüksek olduğu görüldü.

Kök kontrol ve tuz gruplarında yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar çizelge 4.9 ve şekil 4.9 da verildi. Elde ettiğimiz verilere göre P4H-9 geni transkript miktarı tuz uygulamasının 1. saatinde %229, 3.saatinde %43, 6. Saatte %333 artış gösterirken 12.saatte %35 oranında transkript miktarında azalma görüldü.

Çizelge 4.11 *Brassica napus L.* kök örneklerinde tuz stresi uygulamasından sonra 1-12 saatlik dönemde P4H-9 ve P4H-10 genlerinin transkript profillerindeki değişim.

	P4H-9		P4H-10	
	Kontrol	Tuz	Kontrol	Tuz
1. Saat	0.708 ± 0,09	2.334±0,15	1,667± 0,129	0.281±0,03
3. Saat	0.914 ± 0,05	1.312±0,19	1.739 ± 0,14	1.463± 0,36
6. Saat	0.287 ±0,08	1.244±0,23	1,379 ± 0,1	1,420± 0,318
12. Saat	1.09 ±0,09	0.699± 0,026	1,534± 0,19	1,243±0,232

P4H-10 geni için kökten alınan örneklerin sonuçlarında ise tuz grubunda transkript miktarında 1. saatte %83 oranında azalma görüldü., tuz uygulamanın 3. saatinde %15, 6. ve 12. Saatlerde ise alınan örneklerde sırasıyla %2 ve %18 azalma görüldü.



Şekil 4.12. *B.napus L.* bitkilerinde örnekleme günlerine ait kök q Pcr sonuçları

5-TARTIŞMA

Çalışmamızda öncelikli olarak bitkilerde varlığı tartışma konusu olan Warburg Etkisinin belirlenmesini ve tuz stresi gibi hem ozmotik hem iyonik etkiye sahip bir abiyotik stres koşullarında nasıl rol oynadığını belirlemeyi hedefledik. Warburg Etkisi ile ilişkili olarak kontrol ve tuz stresi uygulanan gruplarda karşılaştırmalı olarak laktat miktarı, LDH, ADH ve enzimlerinin aktivitelerindeki değişimi belirledik. Bununla birlikte, tuz stresi uygulaması sonrasında çeşitli fizyolojik parametreler ve oksijen durumuna göre anlatımları değişen, proteinlerde translasyon sonrası modifikasyonlarda görev alan hidrolizaz kodlayan (*P4H9* ve *P4H10*) iki genin anlatım profilleri de incelendi.

Toprak tuzlanmasında görülen artış bitki büyümesini engellemesi, ürün verimini, protein sentezini, enerji transferini ve besin metabolizmasının hızını azaltması nedeniyle tarımsal üretim açısından ciddi bir problemdir (Parida ve Das, 2005). Tuz stresi bitkilerde çeşitli organların taze ve kuru ağırlıkları üzerine de etki etmektedir (Hernandez ve ark., 1995; Dinar ve ark., 1999; Chartzoulakis ve Klapaki, 2000). Yapılan bir çalışmada tuz stresi uygulanan biber genotiplerinde tuzluluğun kuru madde ağırlığında azalmaya neden olduğu, bitki büyüme ve gelişmesinin engellendiği bildirilmiştir (Güneş ve ark., 1996). Çalışmamızda da kök ve yaprak yaş ve kuru ağırlıklar arasında belirgin fark görülürken yaprak tuz uygulanan grubun kuru ağırlığında tuz ve kontrol grubunda kuru ağırlıkları birbirine yakın çıkmıştır.

Çalışmamızda *B.napus L* bitkilerine uygulanan tuz stresi FSII'nin maksimum kuantum etkinliğini (Fv/Fm) kontrole göre belirgin derecede azaltmıştır. Fv/Fm oranı birçok gelişmiş bitkide sayısal değer olarak 0.83 civarındadır ve bu değer azalması bir fotoinhibisyon göstergesi olarak kabul edilmektedir (Brugnoli et al., 1992). Bu sonuç *B.napus L* bitkisinde tuz stresinin etkisiyle FSII birimlerindeki elektron taşınım reaksiyonlarının belli oranda inhibe edildiğini göstermektedir (Doğru ve Çakırlar 2020).

Yapraklardaki bağıl su içeriği (RWC) sonuçları ele alındığında bitkinin su içeriği çevresel etmenlerin değişimi ile ilgili bitkinin su durumu hakkında bilgi veren önemli bir parametredir. Bizim çalışmamızdaki RWC değerleri kontrole

karşılaştırıldığında tuz grubu bitkilerinde azalmanın olduğu fakat bu azalmanın önemli bir ölçüde olmadığıdır. Bu sonuç *B.napus L.* bitkisinin orta derecede bir konsantrasyondaki tuza karşı dayanıklı olması ile ilgili olabilmektedir. Ayrıca bazı koşullarda yüksek Na^+ miktarları yapraklardaki turgorun devamlılığını sağlayabilmektedir (Munns ve ark., 2008).

Prolin, ozmotik potansiyelin düzenlenmesinde rol oynayan aktif bir amino asittir ve bitki hücrelerinde kullanılabilir azot birikiminin düzenlenmesinden sorumludur (Ashraf 1994). Ayrıca tuz stresinin hücre membranları üzerindeki olumsuz etkisini azaltarak membran stabilitesinin sağlanmasında da etkilidir (Gadallah, 1999). Prolinin diğer önemli bir özelliği de yüksek konsantrasyonlarda bile enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisine sahip olmamasıdır (Dubey, 2018). Bazı araştırmacılar da prolinin adaptasyon sürecinin bir bileşeni olduğunu ve çoklu cevapların aktivasyonu için gerekli düzenleyici mekanizmalarda rol oynayabileceğini ileri sürmüştür (Lutts ve ark. 1996). Lutts ve arkadaşları (1996) tuz stresi altındaki pirinç bitkilerinde prolinin ozmotik regülasyonda rol oynamadığı ve prolin birikiminin tuz toleransı için bir indikatör olmaktan çok bir hasar semptomu olduğunu belirlemişlerdir. Yapılan bir çalışmada da prolin birikiminin tuz stresine maruz kalan buğdayda önemli bir fonksiyona sahip olmadığı ortaya çıkarılmıştır (Colmer 1995). Tuzlu koşullarda kültüre alınmış arpa embriyolarında ise dışarıdan yapılan prolin uygulamaları gövdelerdeki Na^+ ve Cl^- birikimini azaltmış ve büyüme üzerinde olumlu etkiler yaratmıştır (Lone ve ark. 1987). Yaptığımız çalışmada prolin miktarı kontrol ve tuz grupları arasında belirgin oranlarda artış göstermiştir.

Fermentatif glikolizin artışına, etanol ve laktat dahil olmak üzere fermentatif son ürünlerin birikmesi eşlik eder. (Kato-Noguchi, H. 2000). Laktat, piruvat'ın laktat dehidrogenaz (LDH) ve NADH tarafından indirgenmesiyle tek bir adımda oluşturulur. Etanol, asetaldehitin alkol dehidrojenaz (ADH) ve NADH tarafından indirgenmesiyle oluşturulur; bundan önce piruvat dekarboksilaz (PDC) ile piruvatın asetaldehite dekarboksilasyonu gelir (Kato-Noguchi, H. 2000). LDH, oksijen olmadığında veya yetersiz olduğunda, nikotinamid adenin dinükleotit (NADH) ve NAD^+ nın birlikte dönüşümü ile piruvat ve laktatın karşılıklı dönüşümünü katalize

eder. Yüksek laktat konsantrasyonlarında, enzim geri besleme inhibisyonu sergiler ve piruvattan laktata dönüşüm hızı azalır (Li ve ark., 2015).

Tuz stresinde en belirgin değişimlerin meydana geldiği organel, kloroplasttır (Koyro, 2002). NaCl'ün kloroplastta tetiklediği en önemli değişim tilakoidlerin ve stromanın şişmesidir. Kloroplast tilakoidleri, hücre içi AOT'ların üretiminde önemli role sahiptir. NaCl'ün bulunduğu koşullarda kloroplastların ürettiği AOT'lar oksidatif stres oluşumunu tetikler ve oluşan OH⁻ (hidroksil radikali) ile H₂O₂ (hidrojen peroksit), tilakoidlerin şişmesine ve dalgalı bir hal almasına sebep olur (Çulha ve Çakırlar, 2011). Tuz stresinde önemli düzeyde etkilenen bir diğer organel ise mitokondridir ve mitokondride tuz stresi sonucu ortaya çıkan değişimler; yapısal olarak parçalanma, şişme, kristalarda azalma, vakuol oluşumunda artış ve elektron transportunun azalmasıdır (Koyro, 2002). Kloroplastlarda olduğu gibi mitokondride de AOT'lar üretilmektedir. Elektron transport zincirlerinden sızan elektronlarla üretilen AOT'lar (Blockhina ve Fagerstedt, 2010) ve antioksidan enzimlerin aktivitesinde meydana gelen azalmalar (Mittova vd., 2004) nedeniyle ortaya çıkan oksidatif stres, mitokondrilerin NaCl'ün toksik düzeyde birikmesinden hem direkt olarak hem de dolaylı olarak etkilendiklerini ortaya koymaktadır. (Çulha ve Çakırlar, 2011).

Sweetlove, L. J. (2000)' ın patates yumrularıyla yaptığı çalışmasında patates yumrularında laktat dehidrogenaz aktivitesinin azalmasının laktat metabolizması üzerindeki etkisini araştırmıştır. Normoksik koşullarda gelişen patates yumruları önemli miktarda laktat içerir. Bu çalışmada, transgenik yumruların kontrol yumrularına göre iki kata kadar daha fazla laktat içerdiğini ve laktat içeriği ile LDH aktivitesi arasında güçlü bir ters korelasyon olduğunu belirlediler. Sonuçlara göre LDH izozim 1 veya 2'nin ayrı ayrı veya birlikte pirüvatın laktata oksidasyonundan sorumlu olduğu ön görülmüştür. Biz de çalışmamızda laktat ve LDH aktivitesi arasındaki ilişkiyi inceledik. Analizlerden elde ettiğimiz sonuçlara göre laktat miktarı ve LDH aktivitesi yaprak ve köklerde farklı seviyelerde gözlemlendi. Genel olarak köklerde laktat miktarı ve LDH arasında paralellik gözlenirken, yapraklarda stres uygulamasının ilk iki örnekleme gününde LDH aktivitesi artarken laktat miktarı kontrol düzeyinin altında kaldı. Gözlenen farklılıkların total LDH aktivitesinden sorumlu farklı lokalizasyona sahip izozimlerin aktivitesi sonucu olabileceğini düşünüyoruz. Ayrıca tuz stresi koşullarında LDH tarafından

sentezlenen laktatın farklı metabolik yollarda kullanımı da artan aktiviteye rağmen sabit kalan ve azalan laktat miktarını açıklamamıza yardımcı olabilir. Bununla birlikte, tuz stresi uygulaması sonucunda PDC aktivitesindeki artış laktattan pirüvata dönüşüm ile bağlantılı olabilir. Bu sonuçlarda literatürdeki kısıtlı sayıdaki çalışma ile benzerlik göstermektedir (Sweetlove, 2000; Jain ve ark. 2020).

Prolil 4 hidroksilazlar (P4H'ler), ekstansinler, arabinogalaktan proteinleri (AGP'ler), prolin yönünden zengin proteinler (PRP'ler) ve solaneous lektinler olarak sınıflandırılan glikosile edilmiş proteinleri içeren bir üst aile olan 2-oksoglutarat bağımlı dioksijenazlar ailesine aittir ve hücre duvarı hidroksiprolin açısından zengin glikoproteinlerin önemli bir post-translasyonel modifikasyonu olan prolin hidroksilasyonunu katalize eder (Fragkostefanakis, S et al. (2014).. Arabidopsis, tütün ve karanfil P4H'leri klonlanmış ve kapsamlı bir şekilde karakterize edilmişken, diğer bitki türlerinde P4H'lerin kısmi karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir (Kivirikko ve Pihlajaniemi 1991). Genel olarak P4H'ler ve 2'-oksoglutarat bağımlı dioksijenazlar, son zamanlarda bitkilerde demir eksikliği tepkisinde ve müteakip metabolik ayarlamalarda ve hatta birkaç abiyotik yanıtta bunların önemini gösteren demir algılamasında yer almıştır (Vigani ve ark. 2013).

Bitki P4H'leri, çeşitli tekrarlayan motiflere sahip prolin kalıntıları açısından zengin hidroksilat sekansları ve bakteriler, prolini serbest bir amino asit olarak hidroksilat etmeleri bakımından benzersizdir. Ayrıca, abiyotik ve biyotik strese yanıt olarak ve ayrıca stres sırasında P4H ifadesi hakkında tam bir bilgi eksikliği vardır (Vlad et al. 2000).

Prolin hidroksilasyonu, prolil 4-hidroksilazlar (P4H'ler) tarafından katalize edilen hidroksiprolinden zengin glikoproteinlerin (HRGP'ler) önemli bir posttranslasyonel modifikasyonudur (Kivirikko and Myllyharju 1998).. Arabinogalactan proteinleri (AGP'ler) ve uzantılar gibi HRGP'ler, hücre duvarı yapısında önemli roller oynar (Vlad, F.2000)

Fragkostefanakis ve arkadaşlarının (2014) yaptığı bir çalışmada domates genomunda bulunan on P4H'den üçünün büyüme ve gelişmedeki rolünü araştırmak için tütün çingirak virüsü (TRV) bazlı virüs kaynaklı gen susturmayı kullanılmış. Sekiz günlük domates fideleri uygun TRV vektörleri ile enfekte edilmiş ve bitkilerin 6 hafta boyunca standart koşullar altında büyümesi sağlanmış. Daha

düşük P4H mRNA seviyeleri, kök ve yaprak dokularında daha düşük hidroksiprolin içeriği ile ilişkilendirilmiş ve başarılı gen susturmayı gösterilmiş. P4H ile susturulmuş bitkilerin daha uzun köklere ve yapraklara ve daha büyük yapraklara sahip olduğu görülmüş. Çalışmada gözlenen artan yaprak alanı, daha yüksek yaprak ile gösterildiği gibi artan hücre bölünmesine bağlanmış tır (Fragkostefanakis, 2014).



6- SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızın sonraki çalışmalara yönelik hedeflerinden biri, biyo-kütle üretiminde Warburg etkisinin rolünün anlaşılması ve pratikte uygulama potansiyelinin saptanmasıdır. Yenilenebilir enerji kaynağı olarak biyolojik materyallerin kullanımında bitkilerin hızlı büyüme ve gelişmesi kadar bitkilerin kendi iç enerji metabolizmalarını da düzenleyebilmeleri önemlidir. Projemizde bitkisel materyal olarak seçtiğimiz *Brassica napus* yenilenebilir enerji kaynağı olarak çeşitli ülkelerde yaygın olarak kullanılan önemli ekonomik bir bitkidir. Warburg etkisinin bu bitkide detaylı olarak incelenip tanımlanması yenilenebilir enerji üretimindeki potansiyelinin geliştirilebilmesi açısından değerli bir katkı sağlayacaktır.

Sonraki çalışmalara yönelik hedeflerinden bir diğeri ise, değişen iklim koşullarına tarımsal bitkilerin adaptasyonu açısından Warburg etkisinin detaylı olarak anlaşılmasıdır. Bu nedenle Warburg etkisi tuzluluk faktörünün yanı sıra yüksek sıcaklık gibi önemli abiyotik stres etmeninin etkisine bağlı araştırılacaktır. Tuz ve yüksek sıcaklık stresleri ile Warburg etkisi arasındaki muhtemel etkileşim fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler seviyelerde incelenerek bu yolu aktive veya in-aktive etmenin stres koşulları altında tarım bitkilerinin büyüme ve verimliliklerinin arttırılmasına sağlayabileceği katkı için temel bir bilgi birikimi oluşturulacaktır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Ahmad, P., Alyemeni, M. N., Ahanger, M. A., Egamberdieva, D., Wijaya, L., & Alam, P. (2018).** Salicylic acid (SA) induced alterations in growth, biochemical attributes and antioxidant enzyme activity in faba bean (*Vicia faba* L.) seedlings under NaCl toxicity. *Russian Journal of Plant Physiology*, 65(1), 104-114.
- Alteriis, E., Carteni, F., Parascandola, P., Serpa, J., & Mazzoleni, S. (2018).** Revisiting the Crabtree/Warburg effect in a dynamic perspective: a fitness advantage against sugar-induced cell death. *Cell Cycle*, 17(6), 688-701.
- Ashraf, M. J. B. P. (1994).** Organic substances responsible for salt tolerance in *Eruca sativa*. *Biologia Plantarum*, 36(2), 255-259.
- Bachmann. (1921).** Über die Geschwindigkeit der photochemischen Kohlensäurezersetzung in lebenden Zellen: O. Warburg (Biochem. Ztschr. 100, 1919, S. 230–270, ebda. 103, S.188–217). *Naturwissenschaften*, 9, 397-398.
- Bauwe, H., Hagemann, M., & Fernie, A. R. (2010).** Photorespiration: players, partners and origin. *Trends in plant science*, 15(6), 330-336.
- Blokhina, O. ve Fagerstedt, K.V., (2010).** Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide in Plant Mitochondria: Origin and Redundant Regulatory Systems, *Physiologia Plantarum*, 138, 447-462.
- Bose, J., Munns, R., Shabala, S., Gilliam, M., Pogson, B., & Tyerman, S. D. (2017).** Chloroplast function and ion regulation in plants growing on saline soils: lessons from halophytes. *Journal of Experimental Botany*, 68(12), 3129-3143.
- Brugnoli, E., & Björkman, O. (1992).** Growth of cotton under continuous salinity stress: influence on allocation pattern, stomatal and non-stomatal components of photosynthesis and dissipation of excess light energy. *Planta*, 187, 335-347.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Chartzoulakis, K. Klapaki, G. (2000).** Response of two green house pepper hybrids to NaCl salinity during different growth stages. *Sci. Hortic.*, 86, 247–260.
- Colmer, T. D., Epstein, E., & Dvorak, J. (1995).** Differential solute regulation in leaf blades of various ages in salt-sensitive wheat and a salt-tolerant wheat x *Lophopyrum elongatum* (Host) A. Love amphiploid. *Plant physiology*, 108(4), 1715-1724.
- Çulha, Ş., & Çakırlar, H. (2011).** Tuzluluğun bitkiler üzerine etkileri ve tuz tolerans mekanizmaları. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 11(2), 11-34.
- Demiral, T., & Türkan, I. (2005).** Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. *Environmental and experimental botany*, 53(3), 247-257.
- Dinar, A.H. Ebert, G., Ludders, P. (1999).** Growth, chlorophyll content, photosynthesis and water relations in guava (*Psidium guajava* L.) under salinity and different nitrogen supply. *Gartenbauwissenschaft*, 64, 54–59.
- Doğru, A., & Canavar, S. (2020).** Bitkilerde tuz toleransının fizyolojik ve biyokimyasal bileşenleri. *Academic Platform-Journal of Engineering and Science*, 8(1), 155-174.
- Doğru, A., & Çakırlar, H. (2020).** Is leaf age a predictor for cold tolerance in winter oilseed rape plants?. *Functional Plant Biology*, 47(3), 250-262.
- Dubey, R. S. (2018)** Photosynthesis in plants under stressful conditions. In *Handbook of photosynthesis* (pp. 629-649). CRC Press.
- Eckardt, N. A. (2005).** Photorespiration revisited.
- Fragkostefanakis, S., Sedeek, K. E., Raad, M., Zaki, M. S., & Kalaitzis, P. (2014).** Virus induced gene silencing of three putative prolyl 4-hydroxylases enhances plant growth in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Plant molecular biology*, 85, 459-471.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Fricke, W., Akhiyarova, G., Veselov, D. and Kudoyarova, G., 2004**, Rapid and tissue-specific changes in ABA and in growth rate response to salinity in barley leaves. *Journal of Experimental Botany*, 55, 1115–1123
- Gadallah, M. A. A. (1999)**. Effects of proline and glycinebetaine on *Vicia faba* responses to salt stress. *Biologia plantarum*, 42, 249-257.].
- Güneş, A., Inal, A. ve Alpaslan, M. (1996)**. Effect of salinity on stomatal resistance, proline and mineral composition of pepper. *J. Plant Nutrition* 19(2), 389-396.
- Hasegawa, P. M., Bressan, R. A., Zhu, J. K., and Bohnert, H. J., 2000**, Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 51, 463–499.
- Hernandez, J. A. Olmos, E., Corpas, F.J., Sevilla, F., del Rio, L.A.(1995)**. Salt-induced oxidative stress in chloroplasts of pea plants. *Plant Sci.*, 105, 151–167.
- Horst Marschner. (1995)**. Mineral nutrition of higher plants. Academic press.
- Karalı, H. (2003)**. *Kolza (Brassica Napus Oleifera) Tohumu Yağının Çözücü Ekstraksiyonu Ve Karakterizasyonu* (Doctoral dissertation, Anadolu University (Turkey)).
- Kivirikko, K. I. (1992)**. Hydroxylation of proline and lysine residues in collagens and other animal and plant proteins. *Post-Translational Modifications of Proteins*, 1-51.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Koyro, H-W., (2002).** Ultrastructural Effects of Salinity in Higher Plants, Salinity: Environment-PlantsMolecules, Published by Kluwer Academic Publishers, ISBN 1-4020-0492-3, Dordrecht, The Netherlands, 522p
- Kutschera, U., Pieruschka, R., Farmer, S., & Berry, J. A. (2020).** The Warburg-effects: basic metabolic processes with reference to cancer development and global photosynthesis. *Plant Signaling & Behavior*, 15(7), 1776477.
- Li, X. B., Gu, J. D., & Zhou, Q. H. (2015).** Review of aerobic glycolysis and its key enzymes—new targets for lung cancer therapy. *Thoracic cancer*, 6(1), 17-24.
- Liu, C., Zhao, X., Yan, J., Yuan, Z., & Gu, M. (2019).** Effects of salt stress on growth, photosynthesis, and mineral nutrients of 18 pomegranate (*Punica granatum*) cultivars. *Agronomy*, 10(1), 27.
- Liberti, M. V., & Locasale, J. W. (2016).** The Warburg effect: how does it benefit cancer cells?. *Trends in biochemical sciences*, 41(3), 211-218.
- Lone, M. I., Kueh, J. S. H., Wyn Jones, R. G., & Bright, S. W. J. (1987).** Influence of proline and glycinebetaine on salt tolerance of cultured barley embryos. *Journal of Experimental Botany*, 38(3), 479-490.
- Lutts, S., Kinet, J. M., & Bouharmont, J. (1996).** Effects of salt stress on growth, mineral nutrition and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance. *Plant growth regulation*, 19, 207-218.
- Mansour, M. M. F. (2000).** Nitrogen containing compounds and adaptation of plants to salinity stress. *Biologia plantarum*, 43, 491-500.
- Mittova, V., Guy, M., Tal, M. ve Volokita, M., (2004).** Salinity Up-regulates the Antioxidative System in Root Mitochondria and Peroxisomes of the Wild Salttolerant Tomato Species *Lycopersicon pennellii*, *Journal of Experimental Botany*, 55(399), 1105-1113.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Morgenthaler, J. J., Price, C. A., Robinson, J. M., & Gibbs, M. (1974).** Photosynthetic activity of spinach chloroplasts after isopycnic centrifugation in gradients of silica. *Plant physiology*, 54(4), 532-534.
- Muchate, N. S., Nikalje, G. C., Rajurkar, N. S., Suprasanna, P., & Nikam, T. D. (2016).** Plant salt stress: adaptive responses, tolerance mechanism and bioengineering for salt tolerance. *The Botanical Review*, 82(4), 371-406
- Munns, R. and Sharp, R.E., 1993,** Involvement of abscisic acid in controlling plant growth in soils of low water potential. *Australian Journal of Plant Physiology.*, 20, 425–437.
- Munns, R., Schachtman, D. P., & Condon, A. G. (1995).** The significance of a two-phase growth response to salinity in wheat and barley. *Functional Plant Biology*, 22(4), 561-569.
- Munns, R. (2002).** Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, cell & environment*, 25(2), 239-250.
- Munns, R. ve Tester, M. (2008).** Tuzluluğa tolerans mekanizmaları. *Annu. Rev. Plant Biol.* , 59 , 651-681.
- Negrão, S., Schmöckel, S. M., and Tester, M. 2017,** Evaluating physiological responses of plants to salinity stress. *Annual Botany*, 119, 1–11.
- Ngo, H., Tortorella, S. M., Ververis, K., & Karagiannis, T. C. (2015).** The Warburg effect: molecular aspects and therapeutic possibilities. *Molecular biology reports*, 42, 825-834.
- Ozgur, R., Uzilday, B., Sekmen, A.H. and Turkan, I., 2013,** Reactive oxygen species regulation and antioxidant defence in halophytes. *Functional Plant Biology.*, 40, 832–847
- Öğren, WL (1984).** Fotorespirasyon: yollar, düzenleme ve modifikasyon. *Bitki fizyolojisinin yıllık incelemesi* , 35 (1), 415-442.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Parida, A. K., Das, A. B., & Mohanty, P. (2004).** Defense potentials to NaCl in a mangrove, *Bruguiera parviflora*: differential changes of isoforms of some antioxidative enzymes. *Journal of plant physiology*, 161(5), 531-542.
- Parida, A. K., & Das, A. B. (2005).** Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and environmental safety*, 60(3), 324-349.
- Passioura, J.B. and Munns, R., 2000,** Rapid environmental changes that affect leaf water status induce transient surges or pauses in leaf expansion rate. *Australian Journal of Plant Physiology.*, 27, 941–94.
- Robinson, J. M., & Gibbs, M. (1974).** Photosynthetic intermediates, the Warburg effect, and glycolate synthesis in isolated spinach chloroplasts. *Plant physiology*, 53(6), 790-797.
- Samec, M., Liskova, A., Koklesova, L., Samuel, S. M., Zhai, K., Buhrmann, C., ... & Kubatka, P. (2020).** Flavonoids against the Warburg phenotype—concepts of predictive, preventive and personalised medicine to cut the Gordian knot of cancer cell metabolism. *Epma Journal*, 11, 377-398.
- Secchi, MA, Fernandez, JA, Stamm, MJ, Durrett, T., Prasad, PV, Messina, CD ve Ciampitti, IA (2023).** Isı ve kuraklığın kanola (*Brassica napus* L.) verimi, yağ ve protein üzerindeki etkileri: Bir meta-analiz. *Tarla Bitkileri Araştırması* , 293 , 108848.
- Sevilmiş, D., Ölmez, Y. A., & Özkaya, S.** Kışlık yağlı tohumlu bitki olan Kanolaya (*Brassica napus* L.) genel bir bakış. *Muş Alparslan University Journal of Agriculture and Nature*, 2(2), 13-18
- Sirhindi, G., Mir, M. A., Abd-Allah, E. F., Ahmad, P., & Gucel, S. (2016).** Jasmonic acid modulates the physio-biochemical attributes, antioxidant enzyme activity, and gene expression in *Glycine max* under nickel toxicity. *Frontiers in plant science*, 7, 591.
- Sweetlove, L. J., & Ratcliffe, R. G. (2011).** Flux-balance modeling of plant metabolism. *Frontiers in plant science*, 2, 38

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Tadege, M., Dupuis, I., & Kuhlemeier, C. (1999).** Ethanolic fermentation: new functions for an old pathway. *Trends in plant science*, 4(8), 320-325.
- Türkan, I. ve Demiral, T. (2009).** Tuzluluk toleransını anlamadaki son gelişmeler. *Çevresel ve Deneysel Botanik* , 67 (1), 2-9.
- Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009).** Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *science*, 324(5930), 1029-1033.
- Vlad, F., Spano, T., Vlad, D., Bou Daher, F., Ouelhadj, A., & Kalaitzis, P. (2007).** Arabidopsis prolyl 4-hydroxylases are differentially expressed in response to hypoxia, anoxia and mechanical wounding. *Physiologia Plantarum*, 130(4), 471-483.
- Vigani, G., Morandini, P., & Murgia, I. (2013).** Searching iron sensors in plants by exploring the link among 2'-OG-dependent dioxygenases, the iron deficiency response and metabolic adjustments occurring under iron deficiency. *Frontiers in Plant Science*, 4, 169.
- Wingler, A., von Schaewen, A., Leegood, R. C., Lea, P. J., & Paul Quick, W. (1998).** Regulation of leaf senescence by cytokinin, sugars, and light: effects on NADH-dependent hydroxypyruvate reductase. *Plant Physiology*, 116(1), 329-335

TEŞEKKÜR

Bu çalışma sürecinde birçok kişiye teşekkür etmek istiyorum. Onların destekleri, motivasyonları ve yardımları olmadan bu projeyi sürdürmek mümkün olmazdı.

İlk olarak en derin şükranlarımı, bana fırsat ve imkan sağladığı, bilgisini ve yol göstericiliğini esirgemediği için danışman hocam Prof. Dr. Melike BOR'a sunarım.

Kendilerinden bir şeyler öğrenme fırsatını bana sunan, değerli bilgi birikimlerini benimle paylaşan, benden desteklerini esirgemeyen saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. İsmail TÜRKAN'a, Prof. Dr. Aşkım Hediye ÇETİNEL'e, Doç. Dr. Barış UZİLDAY'a, Doç. Dr. Rengin ÖZGÜR UZİLDAY'a teşekkür ederim.

Tez projemi 23355 numaralı BAP projesi kapsamında destekleyen Ege Üniversitesi Araştırma Fon Saymanlığına teşekkür ederim.

Bu çalışmanın gerçekleşmesinde büyük emeği olan, beni her aşamasında destekleyen sevgili arkadaşım Şerife PALABIYIK'a sonsuz teşekkürler. İhtiyaç duyduğumuz her an yanımızda olan, yardımını esirgemeyen ekip arkadaşımız İrem ÇETİNKAYA'ya teşekkür ederim. Ayrıca bana destek olan, bilgisini ve tecrübesini benimle paylaşan tüm yüksek lisans odası arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Son olarak aileme ve sevdiklerime; bana inandıkları, destekledikleri her zaman yanımda oldukları ve motivasyonumu korumamda yardımcı oldukları için sonsuz teşekkür ederim.

