

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**TOHUM ÇİMLENMESİNİN İYİLEŞTİRİLMESİNDE
REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİNİN ROLÜNÜN
ARAŞTIRILMASI**

Tolga YALÇINKAYA

Tez Danışmanı : Prof. Dr. İsmail TÜRKAN

Biyoloji Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 401.01.00

Sunuş Tarihi : 11.01.2013

Bornova-İZMİR

2013

Tolga YALÇINKAYA tarafından YÜKSEK LİSANS tezi olarak sunulan “Tohum Çimlenmesinin İyileştirilmesinde Reaktif Oksijen Türlerinin Rolünün Araştırılması” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 11.01.2013 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Prof. Dr. İsmail TÜRKAN

.....

Raportör Üye: Yrd. Doç. Dr. Hediye SEKMEN

.....

Üye : Yrd. Doç. Dr. Çağlar KARAKAYA

.....

ÖZET**TOHUM ÇİMLENMESİNİN İYİLEŞTİRİLMESİNDE REAKTİF
OKSİJEN TÜRLERİNİN ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

YALÇINKAYA, Tolga

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Yöneticisi: Prof. Dr. İsmail TÜRKAN

Ocak 2013, 67 sayfa

Reaktif oksijen türlerinin (ROS) bitki gelişiminde çok önemli rolleri olduğu bilinse de tohum çimlenmesinde aldıkları görevler henüz tam olarak aydınlatılmamıştır. Özellikle, ROS oluşumunun çimlenme üzerindeki iyileştirici etkileri üzerine yapılan çalışmalar sınırlıdır. Hücre içinde ROS' lar çeşitli fizyolojik olayların sonucunda üretilirler ve antioksidanlar tarafından süpürülmezlerse doğrudan proteinlere, nükleik asitlere ve lipitlerin zarar verirler. Fakat ROS' ların zararlı etkilerinin yanısıra, bitki büyüme ve gelişiminin kontrolünde, strese karşı yanıtta ikincil mesajcılar olarak da iş gördükleri bilinmektedir. Tohumun su alarak şişmeye başladığı ilk andan itibaren solunum başlamakta ve tohum içerisinde hızlı bir redoks aktivitesi ortaya çıkmaktadır. Bu süreçte tohumda ROS üretimi' de artmaktadır.

Çalışmamızda, tohum çimlenmesi sırasında embriyoda oluşan ROS' ların değişimi ile teşvik edilen antioksidan sistemin işleyişinden çimlenmenin nasıl etkilendiği araştırılmıştır. Artan ROS miktarına bağlı olarak tohum çimlenme verimliliği belirlenmiştir. Diğer yandan stres altında tohum çimlenmesinin iyileşmesinde rolü bilinen BRs uygulaması ile stres altındaki ROS miktarları ilişkilendirilerek antioksidan savunma sistemindeki değişiklikler belirlenmiştir. ROS üretimi teşvik edilerek çimlenmede antioksidan sistemin rolü aydınlatılmıştır.

Anahtar Sözcükler: Nohut, *Cicer arietinum*, BRs, Antioksidan Enzimler, H₂O₂, Tuz Stresi.

ABSTRACT**EFFECTS OF REACTIVE OXYGEN SPECIES ON SEED
GERMINATION**

YALÇINKAYA, Tolga

MSc in Biology

Supervisor: Prof. Dr. İsmail TÜRKAN

January 2013, 67 pages

Reactive oxygen species (ROS) are key components of plant development. However their role in seed germination is still not well understood. Especially, researches on the positive effects of ROS production to seed germination are rather limited.

ROS are produced due to physiological processes in cells and but they are highly reactive and can easily damage the proteins, nucleic acids and lipids. Beside the their harmful effects, they are also involving in signalling cascades to control growth and development, response to environmental stresses and programmed cell death. After the imbibition, respiration begins and cell redox state is changed which causes extremely high production of ROS.

In this respect, how ROS production effects seed germination and ROS induced antioxidant system in this period were investigated in this research. Seed germination efficiency effected by induced ROS content was also enlightened. Activities of antioxidant defence enzymes were also reported during seed germination. On the other hand, BRs which take roles in seed germination applied to seeds with stress factor (200 mM NaCl) to understand the differences in antioxidant defence system. The role of antioxidant system during seed germination by induced ROS production was also established.

Keywords: Chickpea, *Cicer arietinum*, BRs, Antioksidan Enzymes, H₂O₂, Salt Stress.

TEŞEKKÜR

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

Laboratuvar çalışmalarım ve ders dönemimde engin bilgilerinden yararlandığım hocalarım Sayın Prof. Dr. Filiz ÖZDEMİR, Sayın Doç. Dr. Melike BOR' a, Sayın Yrd. Doç. Dr. H. Çağlar KARAKAYA' ya teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmam süresince desteklerini esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Uzm. Rengin ÖZGÜR'e, Uzm. Barış UZİLDAY' a, Uzm. Özgecan TANYOLAÇ' a Uzm. Ahmet DİNÇ' e, Burcu ÇEBİ' ye, Esra ÇANCIOĞLU' na, Emel ÖZSOY' a, Pelin YILDIZOĞLU' na ve değerli ağabeyim Mesut ESEN' e teşekkür ederim.

Tezim süresince moral desteğini esirgemeyen Ayşe KARA' ya, teşekkür ederim.

Öğrenim yaşamım boyunca beni her yönden destekleyen, eğitimimi herşeyden önde tutan, ve bu konuda verdiğim kararlarda arkamda duran, babam Tahsin, annem Serpil, ve kardeşim Tuna YALÇINKAYA' ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vii
TEŞEKKÜR.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xvii
KISALTMALAR DİZİNİ.....	xviii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Çimlenme Nedir ve Çimlenme Sırasında Neler Meydana Gelmektedir ?.....	2
1.1.1. Çimlenmede rehidrasyonun önemi.....	4
1.1.2. Tohum çimlenmesi sırasında embriyoda meydana gelen değişimler.....	4
1.1.3. Çimlenme sırasında oluşan ROS'lar.....	5
1.2. Tuz Stresi.....	7
1.3. Reaktif Oksijen Türleri (ROS).....	8
1.3.1. Stres altındaki tohumlarda ROS düzenlenmesi.....	11
1.4. Hormon Metabolizması.....	12
1.4.1. BRs'nin yapısı ve biyosentezi.....	13
1.4.2. Brassinosteroidlerin tohum çimlenmesindeki rolleri.....	15

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
1.4.3. Brassinosteroidlerin fizyolojik etkileri.....	15
1.4.4. Brassinosteroidlerin diğer hormonlarla ilişkisi	16
1.4.5. BRs ve ROS süpürücü sistemler arasındaki ilişki.....	16
1.4.6. Tuz stresinde BRs'nin rolü	17
2. MATERYAL VE METOD	20
2.1. Deneme Deseni	20
2.1.1. Tohumların temini.....	20
2.1.2. Tohum sterilizasyonu	20
2.1.3. Tohumların ekimi.....	20
2.1.4. Bitkilerin yetiştirilmesi ve deneme deseni	20
2.2. Fizyolojik Parametreler.....	21
2.2.1. Çimlenme Yüzdesi.....	21
2.2.2. Büyüme parametreleri.....	22
2.3. Biyokimyasal Parametreler	22
2.3.1. Lipit peroksidasyonu.....	22
2.3.2. H ₂ O ₂ miktarı.....	22
2.3.3. Antioksidan enzim ekstraksiyonu ve aktivite analizleri	23
2.3.4. Antioksidan enzimlerin izoenzim tayini	24
3. BULGULAR	26

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.1. Fizyolojik Parametreler	26
3.1.1. Çimlenme yüzdesi	26
3.1.2. Radikal uzunluğu.....	27
3.2. Biyokimyasal Parametreler.....	28
3.2.1. Enzim ve izoenzim aktiviteleri	28
3.2.2. H ₂ O ₂ miktarı	46
3.2.3. Lipit peroksidasyonu (TBARS miktarı)	48
4. TARTIŞMA.....	51
5. SONUÇ.....	56
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	59
ÖZGEÇMİŞ.....	77

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Çimlenen tohumda su alımının zamansal olarak incelenmesi (Nonogaki 2010'dan)	3
1.2 Çimlenmekte olan bir tohumda reaktif oksijen türlerinin dağılımı (Kraner et al., 2010'dan)	6
1.3 Kastasteron ve brassinolid kimyasal yapısı (Srivastava 2002'den)	14
1.4 Abiyotik ve biyotik stres koşullarında Brassinosteroid'in etkileri (Bajguz 2009'dan).....	18
2.1 Çimlenmekte olan nohut tohumları.....	21
3.1 12, 24 ve 48. Saatlerdeki uygulama gruplarının çimlenme yüzdeleri.....	27
3.2 Uygulamaların 12,24,48. Saatlerinde ölçülen radikül uzunlukları. Uygulama grupları: Kontrol (C), 6 µM BRs (6B), 10 µM BRs (10B), 200 mM NaCl (N), 200 mM NaCl+6 µM BRs (6BN), 200 mM NaCl+10 µM BRs (10BN).	28
3.3 24 saat sıvı içerisinde şişen tohumların SOD izozim aktiviteleri, Native- PAGE. Uygulama grupları: Kontrol (C), 6 µM BRs (6B), 10 µM BRs (10B), 200 mM NaCl (N), 200 mM NaCl+6 µM BRs (6BN), 200 mM NaCl+10 µM BRs (10BN). Her kuyucuk 60µg protein içermektedir. Std: 1 U bovine karaciğeri SOD standartı.....	29
3.4 6 saat uygulama sonrasında hasat edilen embriyoların SOD izozim aktiviteleri, Native-PAGE. Uygulama grupları: Kontrol (C), 6 µM BRs (6B), 10 µM BRs (10B), 200 mM NaCl (N), 200 mM NaCl+6 µM BRs (6BN), 200 mM NaCl+10 µM BRs (10BN). Her kuyucuk 60µg protein içermektedir. Std: 1 U bovine karaciğeri SOD standartı	30
3.5 8 saat uygulama sonrasında hasat edilen embriyoların SOD izozim aktiviteleri, Native-PAGE. Uygulama grupları: Kontrol (C), 6 µM BRs (6B), 10 µM BRs (10B), 200 mM NaCl (N), 200 mM NaCl+6 µM BRs (6BN), 200 mM NaCl+10 µM BRs (10BN). Her kuyucuk 40µg protein içermektedir. Std: 1 U bovine karaciğeri SOD standartı.	32

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.6 12 saat uygulama sonrasında hasat edilen embriyolar ve radikulların SOD izozim aktiviteleri, Native-PAGE. Uygulama grupları: Kontrol (C), 6 µM BRs (6B), 10 µM BRs (10B), 200 mM NaCl (N), 200 mM NaCl+6 µM BRs (6BN), 200 mM NaCl+10 µM BRs (10BN). Her kuyucuk 40µg protein içermektedir. Std: 1 U bovine karaciğeri SOD standartı	33
3.7 24 saat uygulama sonrasında hasat edilen radikulların, SOD izozim aktiviteleri, Native-PAGE. Uygulama grupları: Kontrol (C), 6 µM BRs (6B), 10 µM BRs (10B), 200 mM NaCl (N), 200 mM NaCl+6 µM BRs (6BN), 200 mM NaCl+10 µM BRs (10BN). Kuyucuklar, C, 6B, 10B grupları için 20µg protein, N, 6BN, 10BN grupları için 40 µg protein içermektedir. Std: 1 U bovine karaciğeri SOD standartı	34
3.8 48 saat uygulama sonrasında hasat edilen radikulların SOD izozim aktiviteleri, Native-PAGE. Uygulama grupları: Kontrol (C), 6 µM BRs (6B), 10 µM BRs (10B), 200 mM NaCl (N), 200 mM NaCl+6 µM BRs (6BN), 200 mM NaCl+10 µM BRs (10BN). Kuyucuklar, C, 6B, 10B grupları için 20µg protein, N, 6BN, 10BN grupları için 40 µg protein içermektedir. Std: 1 U bovine karaciğeri SOD standartı	35
3.9 C, 6B, 10B gruplarının zamana bağlı SOD aktivitesi.....	36
3.10 N, 6BN, 10BN gruplarının zamana bağlı SOD aktivitesi.....	36
3.11 12 saat uygulama sonrasında hasat edilen embriyolar ve radikulların SOD izozim aktiviteleri, Native-PAGE. Uygulama grupları: Kontrol (C), 6 µM BRs (6B), 10 µM BRs (10B), 200 mM NaCl (N), 200 mM NaCl+6 µM BRs (6BN), 200 mM NaCl+10 µM BRs (10BN). Her kuyucuk 240µg protein içermektedir.....	37
3.12 12 saat uygulama sonrasında hasat edilen embriyolar ve radikulların SOD izozim aktiviteleri, Native-PAGE. Uygulama grupları: Kontrol (C), 6 µM BRs (6B), 10 µM BRs (10B), 200 mM NaCl (N), 200 mM NaCl+6 µM BRs (6BN), 200 mM NaCl+10 µM BRs (10BN). C, 6B, 10B grupları 100 µg; N, 6BN, 10BN 240µg protein içermektedir.	38
3.13 48 saat uygulama sonrasında hasat edilen embriyolar ve radikulların SOD izozim aktiviteleri, Native-PAGE. Uygulama grupları: Kontrol (C), 6 µM BRs (6B), 10 µM BRs (10B), 200 mM NaCl (N), 200 mM NaCl+6 µM BRs (6BN), 200 mM NaCl+10 µM BRs (10BN). Her kuyucuk 100µg protein içermektedir.....	38

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.14 C, 6B, 10B gruplarının zamana bağlı POX aktivitesi.	39
3.15 N,6BN, 10BN gruplarının zamana bağlı POX aktivitesi.	39
3.16 C, 6B, 10B gruplarının hücre duvarındaki zamana bağlı POX aktivitesi. ...	41
3.17 N, 6BN, 10BN gruplarının hücre duvarındaki zamana bağlı POX aktivitesi	41
3.18 C, 6B, 10B gruplarının zamana bağlı CAT aktivitesi.	43
3.19 N, 6BN,10BN gruplarının zamana bağlı CAT aktivitesi.	44
3.20 C, 6B, 10B gruplarının zamana bağlı NOX aktivitesi.	45
3.21 N, 6BN, 10BN gruplarının zamana bağlı NOX aktivitesi.	46
3.22 C, 6B, 10B gruplarının zamana bağlı H ₂ O ₂ içerikleri.	47
3.23 N, 6BN, 10BN gruplarının zamana bağlı H ₂ O ₂ içerikleri.	48
3.24 C, 6B, 10B gruplarının zamana bağlı TBARS içerikleri.	49
3.25 N, 6BN, 10BN gruplarının zamana bağlı TBARS içerikleri. Değişik harfler istatistiksel olarak farklıdır (p<0.05).	50
3.26 12, 24, 48. saatlerdeki radikül uzunluğuna bağlı olarak C, 6B, 10B, N, 6BN, 10BN gruplarının TBARS içerikleri (p<0,05).....	51

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Reaktif oksijen türlerinin (ROS) tipik reaksiyon mekanizmaları, potansiyel zararları ve tohumlarda sinyalizasyondaki rolleri (Kraner 2010'dan değiştirilerek).....	7
2.1 Denemede kullanılan grupların kısaltmaları, stres ve hormon uygulamaları.....	21

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

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

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
BRs	Brassinosteroid
GA	Giberelik asit
ABA	Absisik asit
JA	Jasmonik asit
TBARS	Thiobarbiturik asit

1. GİRİŞ

Tüm biyotik ve abiyotik stres faktörleri, bitkilerin fotosentez ve solunum metabolizmasında yer alan elektron taşıma sisteminin işleyişini bozarak ROS üretiminde artışa neden olur (Halliwell, 2006). Tohumlarda ise fotosentetik ROS oluşumu yoktur ve tohum su almasından çimlenmenin tamamlanmasına kadar solunum metabolizması hücre içerisinde ROS oluşumunun ana kaynağını oluşturur (Bailly, 2004). Aşırı ROS üretimi yükseltgenmeyi arttırarak nükleik asitlerin parçalanmasına, peptid bağlarının kırılmasına ve karbonil-thiol gruplarının oksidasyonuna neden olup hücre içinde geri dönülemez hasarlar oluşturabilir (Apel and Hirt, 2004).

Çimlenen tohumlarda, ROS' lar apoplastta üretilir ve hücre duvarının zayıflamasını sağlayıp çimlenmeyi başlatırlar. Örneğin apoplast kaynaklı hidroksil radikalleri (OH[·]), ABA ve protein karbonilasyonu yoluyla hücre duvarı polisakkaritlerinin ayrılmasına neden olur. Aşırı ROS üretimi ölümcül olsa da hücre içi konsantrasyon düzeyleri çok önemli olmak üzere çimlenme için ROS üretiminin gerekli olduğu bilinmektedir (Bailly, 2008). Aynı zamanda ROS' lar hücre içi sinyal mekanizmasının anahtar bileşenidir ve gelişimsel süreçlerin düzenlenmesinde görev alırlar (Schopfer et al. 2001; Kranner, 2010) (

Çizelge 1.1).

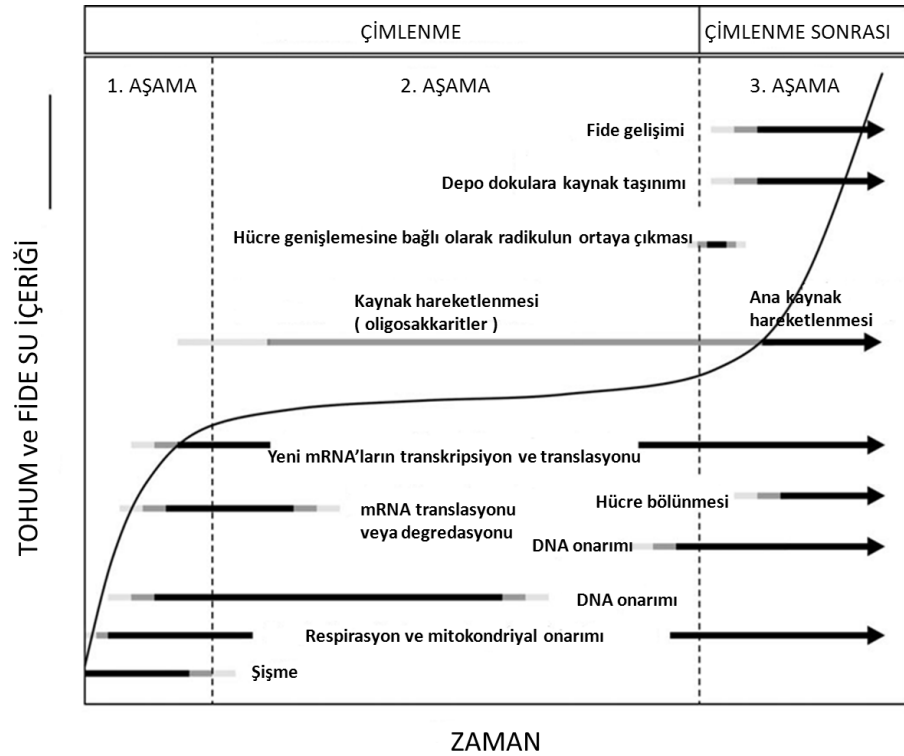
Son yıllarda yapılan çalışmalarda tohum çimlenmesinin kontrolünde, daha yeni tanımlanan brassinosteroidlerin de (BRs) GA gibi ABA-teşvikli dormansinin kırılmasında ve çimlenmenin başlamasında görev aldıkları rapor edilmiştir (Nonogaki et al, 2010). BRs' ler hücre uzaması, polen tübünün oluşması, kök uzamasının azalması, termotolerans, ve etilen biyosentezinin teşviki gibi fizyolojik olayların düzenlenmesinde de rol alırlar. Ayrıca, etiole fidelerin uzun hipokotil oluşturması, apikal kanca oluşumu ve karanlıkta kotiledon oluşumunun bozulması gibi fizyolojik olaylara da katılmaktadırlar (Bajguz and Hayat, 2009).

Son yıllarda tohum çimlenmesi ve ROS üretimi arasındaki ilişki yada bitki büyüme hormonlarının çimlenme üzerine etkilerine ait birçok araştırma yapılmıştır (Bailly, 2008; Kranner, 2010). Ancak stres altında tohum embriyosundaki ROS düzenlenmesinin nasıl olduğu yada tohum çimlenmesinin iyileşmesinden sorumlu olan BRs lerin ROS düzenlenmesi üzerinde ne kadar etkili oldukları bilinmemektedir. Bu amaçla çalışmamızda (i) tuz stresinin nohut tohumlarının çimlenmesi üzerine etkisi (ii) stres altındaki tohum embriyolarındaki ROS düzenlenmesini ve bu ROS ların süpürülmesinden sorumlu bazı antioksidan enzimlerin aktivitelerini nasıl etkilediği (iii) tuz stresine maruz bırakılan tohum embriyolarına dışarıdan BRs uygulamasıyla ROS düzenlenmesinin ve antioksidan savunma sisteminin nasıl değiştiği (iv) radikul uzama sürecinde BRs ve ROS düzenlenmesi arasındaki ilişkinin nasıl olduğu araştırılmıştır.

1.1. Çimlenme Nedir ve Çimlenme Sırasında Neler Meydana Gelmektedir ?

Çimlenme; tohumun kuru halden fiziksel olarak bir an önce kurtulması, metabolizmanın devam ettirilmesi, embriyonun ortaya çıkması ve daha sonrasında bitkinin büyümesine hazırlık için önemli hücresel olayların tamamlanmasını içeren karmaşık bir süreçtir. Kuru haldeki tohumun su almasının erken evrelerinde hücrenin ihtiyacı olan kimyasal ve yapısal bütünlüğün geri kazanılması ile metabolizmada yeni düzenlemeler gerçekleşmektedir. Kuru haldeki tohumun su alarak şişmesi hücrelerde protein sentezi ve solunum aktivitelerini başlatmaktadır. Tohuma su alımının ilk evrelerinde transkripsiyon ve translasyonun başladığı transkriptom çalışmalarında gösterilmiştir (Nonogaki et al. 2010). GA ve ABA gibi hormonların artışı veya değişimi ve birbirleriyle etkileşimleri çimlenmenin tamamlanmasında önem taşıyan noktalardır. Bazı tohumlarda çimlenme embriyonun etrafının endosperm gibi başka hücresel yapılarla çevrili olmasından dolayı baskılanmaktadır. Bu gibi durumlarda enzimlerin yardımıyla radikulun ortaya çıkması sağlanabilir (Nonogaki et al., 2008). Çimlenme sırasındaki gen ifadelerindeki değişiklikler hakkında birçok bilgi olmasına karşın çimlenmenin tamamlanması sırasındaki olaylar hakkında henüz yeterli bilgi bulunmamaktadır.

Çimlenme tohumun su alımı ile başlamakta, embriyonun ve radikulun ortaya çıkması ile tamamlanmaktadır. Çimlenme, çimlenen tohumun su alımının zamansal olarak incelenmesi ile daha iyi anlaşılabilir (Şekil 1.1) (Nonogaki et al. 2010). Öncelikle kuru tohumda su alımı çok hızlı şekilde meydana gelir, böylece hücreler arası matriksin ve hücre bileşenlerinin tamamen şişmesi sağlanmaktadır (1. aşama bkz. Şekil 1.1). Bu aşamadan sonra su alımı azalmaktadır (2. aşama). Son olarak, 3. aşamanın başlaması ile birlikte tohuma su alımı tekrar artmaktadır ve dolayısıyla çimlenme tamamlanmaktadır.



Şekil 1.1 Çimlenen tohumda su alımının zamansal olarak incelenmesi (Nonogaki 2010'dan)

Çimlenme sırasında radikulun ortaya çıkması, radikul etrafındaki hücrelerin metabolizması ile doğrudan ilişkilidir ve bu hücrelerdeki sinyal iletimi radikul oluşumu için önemli olan anahtar proteinlerin sentezi için gereklidir. Arabidopsis' de radikulun altında yaklaşık 10 veya daha az hücreden oluşan geçiş bölgesindeki hücrelerin uzayıp radikulu dışarı ittiği görülmektedir (Nonogaki et al., 2010). Tohumun çimlenmeyi tamamlaması için üstesinden gelmesi gereken başka bir engel de embriyonun etrafını çevreleyen yapılardır. Bazı durumlarda, endosperm çimlenmeyi kabuktan daha fazla engellemektedir.

1.1.1. Çimlenmede rehidrasyonun önemi

Tohumlar kuru haldeyken metabolik olarak inaktiftir. Fakat tohumda çok az miktarda nem olması halinde bile çeşitli fizyolojik ve kimyasal değişiklikler meydana gelebilmektedir. Kuru haldeki tohumlarda bu işlemlerin gerçekleşmesi, çimlenme kapasitesinin değişmesi ve dormansinin kırılması ile sonuçlanmakta veya tam tersi olarak bozulma ve canlılığın kaybı ile sonuçlanabilmektedir (Bewley, 1997). Bununla birlikte rehidrasyon çimlenmenin başlaması için gereken metabolik olaylara hız kazandıran önemli bir olaydır.

Şişme, başlangıçta hücre duvarları ve hücre içindeki depo polimerlerde gerçekleşmektedir (Bewley, 1994). Tohumun hızlı bir şekilde su alması sırasında kararlı haldeki metabolizma daha değişken bir hal almaktadır. 1. aşamanın (bkz. Şekil 1.1) ilk evrelerinde, tohum su alarak şişerek enerji metabolizmasının geri kazanılması sağlanır. Solunum için önemli olan krebs döngüsü ve terminal oksidazlar gibi enzimler, tohumun su alarak şişmesinden birkaç saat sonra oksidatif fosforilasyon yolu ile ATP üretimine başlamaktadırlar (Hourmant and Pradet, 1981).

Şişmiş tohumlar su alımı sırasında reaktif oksijen türleri (ROS) üretmektedir (Wojtyla et al., 2006) ve bu ROS' un tohumlarda dormansinin kırılmasında da pozitif etkisi olduğu bilinmektedir (Oracz et al., 2007). Dormant olmayan tohumlarda ROS' lar protein ve diğer hücre bileşenleri için zararlı olabilmektedir. Kuru bezelye tohumları şişme sırasında serbest radikallerin süpürülmesinde rol oynayan enzimler süperoksid dismutaz (SOD), katalaz (CAT), askorbat peroksidaz (APX), dehidroaskorbat redüktaz (DHAR) ve glutatyon redüktaz (GR) içermektedir (Wojtyla et al., 2006). Tüm bunlar şişme sırasında proteinlerin korunmasında ve onarımında antioksidan olarak görev almaktadırlar.

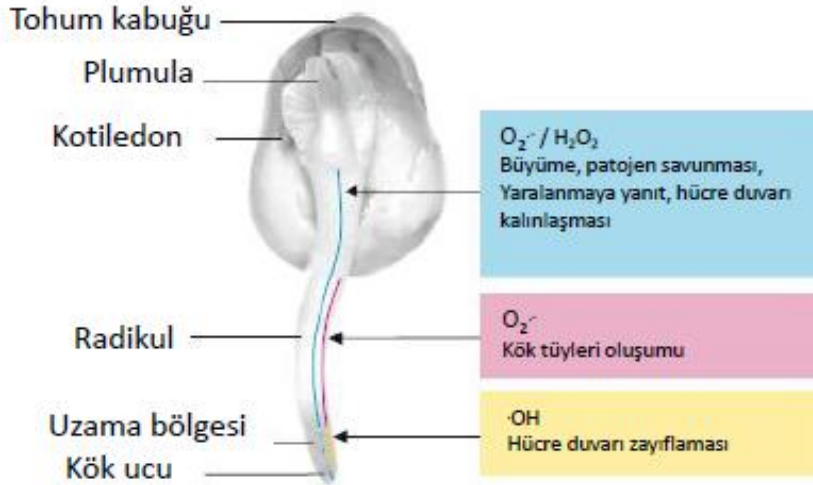
1.1.2. Tohum çimlenmesi sırasında embriyoda meydana gelen değişimler

2. aşama (bkz. Şekil 1.1) sırasında tohumun son aşamaya girmesini sağlayan ya da inhibe eden başlıca genetik düzenleyiciler karakterize edilmiştir. Fakat 2. ve 3. aşama arasındaki geçişin düzenlenmesi tam olarak bilinmemektedir. Bununla birlikte bu aşamalarda GA'nın önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Bu görüşün nedeni GA üretmeyen mutant tohumlarda çimlenmenin kesinlikle gerçekleşmemesidir (Lee et al., 2002). Bozulmamış tohumda embriyo çimlenmek için GA'ya ihtiyaç duyarken, etrafındaki yapılardan arındırıldığında çimlenmek için GA'ya ihtiyaç duymamaktadır. GA-eksik (*gib-1*) *Arabidopsis* ve domates mutantlarından izole edilmiş embriyolar su içinde çimlenmelerini tamamlamaktadır. Fakat bozulmamış bir tohumda ise hormon desteği gerekmektedir. Bozulmamış tohumların çimlenmek için GA'ya olan gereksinimi, embriyonun çevresel yapılar tarafından mekanik olarak baskılanmasına veya kimyasal/hormonal inhibisyona uğramasına işaret etmektedir. Tohum çimlenmesinin tamamlanmasına neden olan embriyo (radikul) hücre genişlemesi, hücre duvarlarını baskılayan kuvvetlerin azalması ile su alımıyla hücre hacminin genişlemesini sağlayan turgor basıncı ile meydana gelmektedir.

3. aşama sırasında embriyoya su alımın mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Plazma zarı ve tonoplasttaki proteinler suyun zarlar arasında geçişini düzenlerler. Bir su kanalı (akuaporin) inhibitörü olan civa ($HgCl_2$) ile muamele edilmiş *Arabidopsis*'de tohum kabuğunun yırtılmasında 8-9 saatlik, radikulun ortaya çıkmasında ise 25-30 saatlik gecikmeler meydana geldiği rapor edilmiştir (Willigen et al., 2006), bu sonuçlar 3. aşamada akuaporinlerin önemli rolünü işaret etmektedir.

1.1.3. Çimlenme sırasında oluşan ROS'lar

Tohumun su alarak şişmesinden hemen sonraki süreçte metabolizmanın aktifleşmesiyle ROS üretimi artmaktadır. Örneğin, soya fasulyesi (Gidrol et al., 1994), mısır (Hite et al., 1999), ayçiçeği (Bailly et al., 2002) tohumlarının su alarak şişme süreçlerinin başlangıcında H_2O_2 ürettikleri belirlenmiştir. Tohumda oluşan radikallerin tam lokalizasyonları aşağıdaki şekilde belirtilmiştir.



Şekil 1.2 Çimlenmekte olan bir tohumda reaktif oksijen türlerinin dağılımı (Kranner et al., 2010'dan)

Çimlenme sürecinde ROS üretimi strese yol açabilmekte ancak antioksidan bileşenler ve enzimlerin varlığı ile çimlenme sorunsuz şekilde tamamlanabilmektedir. Antioksidan bileşenlerden α -tokoferol (Smiontchchi et al., 2003), flavonoid ve fenolik bileşikler (Yang et al., 2001)' in konsantrasyonlarının çimlenme süresince arttığı bilinmektedir. Tohumların ilk su alarak şişmesi sırasında askorbat ve indirgenmiş glutatyon seviyeleri de yükselmektedir (De Tullio and Arrigoni, 2003).

ROS süpürücü enzimlerin aktiviteleri de tohum şişmesi ve çimlenmesi sürecinde değişiklikler göstermektedir. Örneğin, çimlenen ay çiçeği tohumlarında, GR ve CAT aktiviteleri artmakta, H_2O_2 azalmaktadır (Bailly et al., 2002).

Reaktif türler	Tipik reaksiyon mekanizması	Potansiyel zararları	Tohumlarda sinyalizasyondaki rolleri
Süperoksit anyonu	${}^3\text{O}_2 + e^- \rightarrow \text{O}_2^-$	Fe-S merkezindeki proteinin, SH protein gruplarının oksidasyonu Kinonların ve Fe^{3+} ve Cu^{2+} geçiş metalleri komplekslerinin indirgenmesi Doymamış lipitlerle reaksiyonlar	Tohumun olgunlaşma sonrasında dormansi kırılmaları, yaralanma yanıtı ve çimlenme
Hidroksil radikali $\cdot\text{OH}$	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2^- \rightarrow {}^3\text{O}_2 + \cdot\text{OH} + \text{OH}^-$ $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \cdot\text{OH} + \text{OH}^-$ (Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonu)	Proteinlerin, DNA'nın, lipitlerin ve karbonhidratların oksidasyonu	Tohum çimlenmesi sırasında endosperm kaybı
Hidrojen peroksit H_2O_2	$\text{O}_2 + \text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + {}^3\text{O}_2$	SH protein gruplarının oksidasyonu	Büyüme, başkalaşma, patojen cevabı, yaralanma yanıtı
Tekli oksijen ${}^1\text{O}_2$	Aşırı yüklenmiş pigment + ${}^3\text{O}_2 \rightarrow {}^1\text{O}_2 + \text{pigment}$ $\cdot\text{OH} + \text{O}_2^- \rightarrow {}^1\text{O}_2 + \text{OH}^-$	Proteinlerin, DNA'nın ve lipitlerin oksidasyonu	Erken şişme, yaralanma yanıtı

Çizelge 1.1 Reaktif oksijen türlerinin (ROS) tipik reaksiyon mekanizmaları, potansiyel zararları ve tohumlarda sinyalizasyondaki rolleri (Kranner 2010'dan değiştirilerek).

1.2. Tuz Stresi

Topraktaki yüksek tuz bitkilerde temel olarak iki yönde strese neden olmaktadır. Yüksek tuz oranı kökler için topraktan su alımını zorlaştırmakta ve bitkide fazla tuz birikimi toksik olabilmektedir. Dünya üzerinde 800 milyon hektardan fazla toprak tuzdan etkilenmektedir (FAO, 2008). Bu oran dünyanın tüm kara yüzölçümünün %6'sı kadardır. Genel olarak tuzluluk, kurak ve yarı kurak arazilerde uzun zaman süreçlerinde tuzun birikimi ile meydana gelmektedir (Rengasamy, 2002).

Yüksek tuzluluk hiperiyonik ve hiperosmotik stres meydana getirip bitkinin ölmesine neden olabilmektedir (Glenn et al., 1999). Genel olarak toprakta bulunan yüksek konsantrasyondaki Na^+ ve Cl^- iyonları strese neden olmaktadır. Bu

koşullarda, değişken su durumu büyümenin azalmasına neden olmaktadır. Bitki, büyümeyi sürdürebilmesi ve hücrelerin metabolizmalarına devam edebilmesi için dokularındaki iyon hareketlerini düzenlemektedir (Flowers and Yeo 1992). Na^+ iyonunun simplastik olarak epidermal ve kortikal hücrelerinde nasıl taşındığı ve ksileme iletildiği hala tartışmaya açıktır. Endodermiste çözgenlerin radyal hareketleri simplastik yolla olmaktadır. Kaspari şeridi apoplastik taşınım için fiziksel bir bariyer oluşturmaktadır (Flowers and Yeo, 1992). Bitkinin olgun yapraklarında özellikle tuz stresi altındayken yüksek oranda iyon birikimi görülmektedir. Bu yapraklar iyonları meristematik ve fotosentez yapan hücrelerde ve vakuollerinde biriktiriler. Bitkiler düşük su potansiyeli olan ortamlardan su alabilmek için hücre içindeki su potansiyellerini düşürürler. Bunun için hücre içinde birikimi zararlı olmayacak glisin betain, prolin, sorbitol, mannitol gibi uyumlu bileşikler kullanılır. Bitkiler kuraklık stresine maruz kaldıklarında gösterdikleri yaprak alanının azalması ya da absisyon durumunu tuz stresi sırasında da gösterebilirler.

1.3. Reaktif Oksijen Türleri (ROS)

Tohumlarda stres altında gerçekleşen metabolik olaylar, vejetatif dokulara göre farklılık göstermektedir. Bu durumlardan birisi de ROS üretimindeki farklılıklardır. Vejetatif dokularda, tuzluluk özellikle yüksek ışık yoğunluğu altında veya diğer streslerle birarada olduğunda fotosentezi engellerken fotorespirasyonu arttırmaktadır. Hücre dengesini bozan bu olay reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikimine neden olmaktadır. ROS birikimi abiyotik stres sırasında bitkiye zarar verebileceği gibi aynı zamanda önemli sinyal molekülleri olarak da görev almaktadırlar. Hücre içindeki bu uyumun bozulması halinde yüksek enerji düzeyindeki elektronlar moleküler oksijene (O_2) iletilirler (Takahashi and Asada, 1988; Mittler, 2002). Bunun sonucunda üretilen tekli oksijen ($^1\text{O}_2$), süperoksit iyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil (OH^\cdot) radikalleri DNA ve lipitlere zarar veren reaktif oksijen türlerini oluşturular (Apel ve Hirt 2004). Normal büyüme koşulları altında ROS kloroplast, mitokondri ve peroksisom gibi organallerde düşük seviyede üretilmektedir. Stres koşulları altında ise ROS seviyesi önemli oranda artış göstermektedir. Stres sırasında ROS

birikimi, ROS üretimi ve ROS süpürülmesi arasında denge olmalıdır (Mittler et al., 2004). Bu denge, mevcut stresin şiddeti ve süresine, enerji dengesizliğine ve büyüme koşullarındaki ışık şiddeti, sıcaklık gibi abiyotik koşullarla ilişkilidir. Kloroplastlarda elektron taşınım zincirinin aşırı indirgenmesi ROS oluşumunun ana sebebidir. Stres sırasında mitokondride de elektron taşınım zincirinin aşırı indirgenmesi yine ROS oluşumuna neden olmaktadır (Davidson and Schiestl, 2001). Peroksizomlarda glikolat, fotorespiyasyon sırasında glioksilata okside olmaktadır ve bunun sonucunda H₂O₂ üretimi meydana gelmektedir (Mittler et al., 2004). Normal metabolizma ve stres sırasında ROS'un detoksifikasyonu için askorbik asit (Asa), glutatyon (GSH) gibi antioksidanlar ve süperoksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APX), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPX) ve peroksiredoksin (Prxr) gibi ROS süpürücü enzimlere ihtiyaç vardır (Takahashi and Asada 1988; Apel and Hirt 2004; Mittler et al., 2004; Dietz et al. 2006; Turkan and Demiral, 2009). Bu mekanizmalar nerdeyse tüm hücre bölmelerinde bulunmaktadır ve bu durum ROS detoksifikasyonunun hücrenin hayatta kalması için ne kadar önemli olduğunu göstermektedir (Mittler et al., 2004). Bu bağlamda su, yüksek ışık, tuz, sıcaklık ve bu streslerin kombinasyonlarında ROS süpürücü mekanizmaların bitkinin hayatta kalabilmesi adına neden önemli olduğu görülmektedir (Rizhsky et al., 2004; Wang et al., 2005). ROS, çevresel stres koşulları altında hücrelere oksidatif zarar vermesinin yanında; patojen enfeksiyonları, çevresel stresler ve programlanmış hücre ölümleri gibi hayati olaylarda önemli bir sinyal iletim molekülü olarak çalışmaktadır (Mittler et al., 2004; Torres and Dangl, 2005). ROS seviyesindeki ani artış "oksidatif patlama" olarak adlandırılır ve bu duruma plazma zarı ilişkili NADPH oksidazı kodlayan genlerin ifade olmasının temel oluşturduğu genetik çalışmalarda gösterilmiştir (Mittler et al., 2004; Torres and Dangl, 2005). ROS sinyallerinin bitki tarafından aktif halde üretilmesi (NADPH oksidazlar gibi) stres sırasında bitkinin alışması ve savunma mekanizmalarını uyarmak bir cevaptır (Mittler et al., 2004). ROS' un bu şekilde sinyal molekülü olarak kullanılmasının pek çok avantajı vardır. Bunlardan biri ROS'un hücresel düzeyde çok çabuk şekilde üretilmesi ve aynı zamanda süpürülmesidir. ROS' un hücresel düzeyde üretimi hassas bir şekilde kontrol altında tutulabilmektedir. Böylece hücresel düzeyde ROS seviyeleri dinamik şekilde değişebilmektedir. ROS' u sinyal molekülü olarak kullanmanın başka bir avantajı ise hızlı bir şekilde uzak mesafelere ulaşabilmesidir. Yapılan çalışmalarda

ROS' un *Arabidopsis* bitkisinde dakikada 8.4 cm hızına ulaşabildiği gösterilmiştir (Miller et al., 2009). ROS sinyalizasyonunun diğer avantajlarından biri de farklı ROS türlerinin farklı moleküler özellikler göstermesidir. Süperoksit membranlar arasında pasif olarak taşınamayan bir ROS molekülüdür. Fakat süperoksit kolayca hidrojen peroksit (H_2O_2) dönüşebilmektedir. Bu sayede H_2O_2 membranlar arasında veya su kanallarından pasif bir şekilde geçebilmektedir (Miller et al., 2010). ROS hücrel sinyalizasyon ağı dışında pek çok farklı sinyalizasyon yolağına entegre olabilmektedir. Kalsiyum ve protein fosforilasyon ağları örnek verilebilecek sinyalizasyon yollarından bazılarıdır (Kobayashi et al., 2007). ROS' un başka bir önemli avantajı ise hücrel denge ve metabolizma ile sıkıca bağlı olmasıdır. Hücrel dengede olan herhangi bir değişiklik ROS seviyesindeki değişiklik olarak da görülebilmektedir. Fotorespirasyona olanak sağlayan koşullarda peroksizomlardaki ROS üretimi artış göstermektedir (Mittler, 2006). ROS seviyesi ve metabolizma arasındaki sıkı ilişki ROS' u iyi bir gözleme aracı yapmaktadır. Bitkilerde lusiferaz enzimi ve zebra balığında GFP ile yapılan çalışmalarda ROS' un çeşitli organel ve dokular arasında uzak mesafelerde sinyal iletebildiği gösterilmiştir. ROS' un uzak mesafelere sinyal iletiminde bulunabilmesi için sürekli bir ROS üretimi gerekmektedir. ROS sinyalizasyonunun yolu üzerindeki çeşitli bölgeler sinyalin iletilmesi için üretime devam etmektedirler (Miller et al., 2009).

Son zamanlarda ROS sinyalizasyonundaki olası seçicilik konusu ilgi çekmektedir (Møller and Sweetlove, 2010). Bu konunun ana fikri ROS sinyalinin nasıl özel bir bölümde ya da hücrede özel bir uyarıya göre üretildiğidir. Kloroplast, mitokondri ve peroksizomlarda yüksek ışık, sıcaklık veya soğuktan dolayı ROS seviyesinde artış görülmektedir. Bitkinin alışma yanıtlarında nasıl bir sinyalin bu artışı sağladığı bilinmemektedir. ROS sinyali bitkinin yaralanma, patojen saldırıları veya abiyotik strese durumlarında bir grup hücre içinde oluşmakta ve tüm bitkiye yayılmaktadır. Fakat nasıl özelleşmektedir? Bu sorunun olası yanıtlarından birisi ROS sinyallerinin tüm bitkide genel sinyalizasyon olarak kullanılması ve hücrelerin kendi sinyalizasyon ağlarını aktif hale getirmesidir. Hücre içindeki diğer sinyaller ufac peptidler, hormonlar ve lipidler olabilmektedir. Bir diğer olasılık ise her hücre bölümünün veya hücrenin kendine ait ROS reseptörlerinin bulunmasıdır. Bu reseptörler ROS sinyalini algılar ve kendi

içlerinde üretmeye devam ederler, aynı zamanda kalsiyum veya protein fosforilasyonu gibi ağlara ileterek çoğalmasını sağlarlar. Farklı biyolojik sistemler yukarıda anlatılan yollardan biri ya da birkaçının kombinasyonu ile spesifik bir ROS sinyalizasyonu üretebilmektedir. ROS sinyalizasyonunun spesifik olması ile ilgili *APX1* ve *CAT2* eksik çiftli mutant olan *Arabidopsis* ve tütün bitkisinde çalışılmıştır. Bu çiftli mutantlar yaban tipleriyle veya tek *apx*, *cat* mutantları ile karşılaştırıldıklarında çeşitli çevresel şartlara daha dayanıklı oldukları görülmüştür (Rizhsky et al., 2002). *Arabidopsis*'te *APX1* ve *CAT2*'nin ifade edilmemesi, DNA tamirinin aktivasyonu, hücre döngüsünün kontrolü ve anti-programlanmış hücre ölümünü tetiklemektedir. Tekli mutant olan *apx1* ve *cat2* de ise bu yanıtlar görülememektedir.

1.3.1. Stres altındaki tohumlarda ROS düzenlenmesi

ROS lar tohum fizyolojisinde birçok metabolik olaya katılmaktadır. Tohum kuruması ve çimlenme süreçlerinde üretilmekte ve oksidatif stres sonucunda hücrede hasara yol açmaktadır. Bununda beraber hücreler enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanların iş görmesiyle bu hasardan kaçınabilmektedirler.

ROS' lar tohum gelişimi süresince, erken embriyogenesis' de büyümeye etki ederler ve tohum çimlenmesinde radikulun tohum dışına çıkışını sağlamaktadırlar.

Bitkilerde bir çok ROS üretici mekanizma tanımlanmıştır. Erken gelişim fazı hariç, tohumlarda fotosentetik elektron taşınımı kaynaklı süperoksit ve tekli oksijen üretimi olmamaktadır. Bunun yanında, gelişimin başlangıcından, çimlenmenin sonuna dek tohum su içeriğindeki değişimler ve metabolik aktivite çok değişkendir ve bu olaylara bağlı olarak tohumlarda ROS üretim kaynakları da farklılık göstermektedir. Mitokondriyal solunum zinciri ana ROS üretim merkezidir. Bu bölmede, elektron taşıma zincirinden elektronların sızması süperoksit radikalinin oluşumuna neden olmaktadır (Moller, 2001).

Hücre içi ROS üretim merkezlerinden birisi de peroksizomlardır (Mittler, 2002). Glioksizomlarda, yağlı tohumların lipidlerin hareketliliğinde anahtar rol oynamaktadır. Çünkü β -oksidasyon enzimleri ve glioksilat döngüsü enzimlerini içermektedir. Bu enzimler, fide oluşum sürecinin erken safhalarında lipidleri şekerlere dönüştürmektedir (Huang et al., 1983). Yağ asitlerinin β -oksidasyonu sonucu, glikolat oksidaz gibi enzimlerin kataliz reaksiyonlarınca H_2O_2 üretilmektedir. Peroksizomlar ayrıca katalaz enziminin lokalize olduğu ve hücre sel sinyallemede çok önemli rolleri olan NO üretiminin gerçekleştiği organellerdir (Neill et al., 2003).

1.4. Hormon Metabolizması

Hormonların dormansi üzerindeki etkileri pek çok yönden araştırılmış olsa da çimlenme üzerindeki etkileri hala yaygın bir araştırma konusudur. Bu sinyal moleküllerini düzenleyen proteinleri kodlayan genler (özellikle GA ve ABA'nın biyosentezini yapan ve etkisiz hale getirenler), dormansi ve çimlenme olaylarının başlıca düzenleyicileridir. Çimlenme sırasında hormon metabolik yolları ve çevresel sinyaller arasındaki etkileşim, çimlenmenin başarılı olmasında etkili ve önemli olmaktadır. Giberellik asit biyosentezini katalizleyen enzim GA 3-oksidadır (Koornneef and van der Veen, 1980). Bu enzimler GANOXn genlerinden ifade edilir. *ga3ox1* *ga3ox2* genleri eksik mutanlar, GA uygulaması olmadan çimlenememektedir. Mitchum *et al.*, (2006)' in bu çalışması GA'nın doğrudan çimlenme üzerine etkisini belirtmiştir.

Eğer tohum optimal sıcaklık koşullarından daha sıcak bir ortamda su almışsa muhtemelen 1. aşamadaki (bkz. Şekil 1.1) olaylar ve 2. aşamadaki olayların da bir kısmı yine gerçekleşecektir. Fakat tohum 3. aşamaya geçemeyecek, böylece radikulun ortaya çıkması gerçekleşmeyecektir. Bu durum aynı zamanda "termoinhibisyon" olarak adlandırılmaktadır. Yüksek sıcaklıkta çimlendirilmiş *Arabidopsis* tohumlarında, yüksek sıcaklığın ABA biyosentezini başlattığını, aynı zamanda GA biyosentezini de baskıladığı gösterilmiştir (Toh et al., 2008). Marulda (*Lactuca sativa* 'Salinas') yapılan bir başka çimlenme çalışmasında tohumların 25 °C üstündeki sıcaklıklarda şişmeye uğradıklarında

çimlenmenin gerçekleşmediği görülmüştür. Bununla beraber *Lactuca serriola* (UC96US23) 37°C' ye kadar olan sıcaklıklarda termoinhibisyona uğramamaktadır. ABA ve GA metabolizmasının önemli özelliği de antagonistik çalışmalarıdır. ABA, GA biyosentezinin ifadesini azaltır (Seo *et al.*, 2006). Tohumların, soğuk (Yamauchi *et al.*, 2004), ışık (Oh *et al.*, 2006), besin (Matakiadis *et al.*, 2009) gibi çevresel faktörlerle olan cevapları hormon metabolizmasındaki değişikliklerle anlaşılabilir.

Gelişmiş bitkilerde tohum çimlenmesi ve dormansi genetik ve çevresel faktörlerin etkilediği kompleks fizyolojik işlemlerdir. Dormant olmayan tohumlar uygun ışık, sıcaklık ve besin koşulları altında çimlenmeye başlamaktadırlar. Çevresel sinyallerin hormonlarla birlikte çalışması sonucunda çimlenmenin düzenlenmesi sağlanmaktadır. GA düzenlenmeyi sağlayan hormonların başında gelmektedir. GA'nın çimlenen tohumlardaki düzenlenmesi ışık ve sıcaklık yoluyla gerçekleşmektedir.

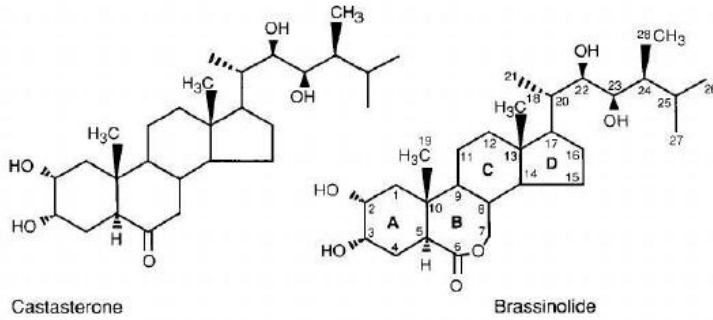
Yapılan çalışmalarda karanlıkta şişirilmiş marul tohumlarına kırmızı ışık uygulaması yapıldığında içsel GA₁ miktarında önemli oranda artış görülmüştür. Kızıl-ötesi ışık uygulaması ise GA₁ oranındaki artışı durdurmaktadır. GA₁ öncülü olan GA₂₀' nin karanlıkta şişirilen tohumlarda yüksek oranlarda birikmesi GA₁'in üretimini sınırlandırmaktadır. GA₂₀'nin GA₁'e dönüşümünü katalizleyen GA 3-oksidadaz kodlayan *Ls3h* transkript seviyeleri kırmızı ışıkta artış göstermektedir (Toyomasu *et al.*, 1993).

1.4.1. BRs'nin yapısı ve biyosentezi

1970' lerin başında *Brassica napus* poleninden elde edilen ekstraktın barbunya internodlarının aşırı düzeyde uzamasına yol açtığı belirlenmiştir (Mitchell *et al.*, 1970). Yapılan ilk çalışmalarda toplanan ekstraktlardaki büyümeyi teşvik edici maddenin tam olarak ne olduğu bilinmemekteydi ve GA ile benzer özellikleri olmakla beraber etki şekli GA-teşvikli büyüme ile aynı olmadığı rapor edilmiştir. Bu maddenin tam olarak belirlenmesi için yüksek oranda kolza tohumu ile yapılan analizlerde 4 mg kristal madde elde edilip yapısı tanımlanmıştır. Elde edilen bu maddeye 'brassinolide' adı verilmiştir (ilk

saflaştırmanın *Brassica napus*' dan olmasından dolayı) (Grove et al., 1979). Brassinolide hormonal aktivite özelliği gösteren ilk bitki steroidtir. Daha sonra yapılan çalışmalarda 40'a yakın farklı bitki steroid hormonu daha tanımlanmıştır.

Brassinosteroidler' in A, B, C, D halkaları ve ve 17. Karbonunda alkil zinciri bulunmaktadır. BRs C-24 yapıları incelendiğinde C₂₇, C₂₈ and C₂₉ fitosterol öncüleri tarafından sentezlediği anlaşılmıştır. Bir C₂₈ sterolu olan kampesterol BR sentezinin öncüsüdür. *Catharanthus roseus* hücre kültüründe yapılan çalışmalar brassinolid sentezinde erken ve geç C-6 oksidasyon yolağı adında iki temel yol olduğunu göstermektedir (Choi et al., 1997). BR biyosentezi için tanımlanan bu yol daha sonra *Catharanthus* (Fujioka et al., 2000) ve *Arabidopsis* (Noguchi et al., 2000) ile de desteklenmiştir. BR-eksik mutantların moleküler genetik karakterizasyonu BR biyosentezine katılan genlerin ve bu genlerin enzimatik rollerinin aydınlatılmasında önemli yol katedilmesini sağlamıştır. Bu genler ve fonksiyonları genel olarak *Arabidopsis*'de yapılan çalışmalar ile tanımlanmıştır. Bitkilerde en çok bulunan 2 brassinosteroid; brassinolide (BL) ve kastasterondur (CS). Her ikisinde de A halkasında 2. ve 3. karbonlarında hidroksil grubu, A ve B halkasının ortasında α oryantasyonu, B halkasının 6. karbonunda keton grubu, 18. ve 19. karbonunda metil grupları, 22 ve 23. karbonlarında hidroksil grupları ve 24. karbondan α -metil bulunmaktadır.



Şekil 1.3 Kastasteron ve brassinolid kimyasal yapısı (Srivastava 2002'den)

Brassinosteroid dikotil, monokotil, gimnosperm, eğrelti otu ve alglerde tanımlanmıştır. Bitkide en çok polende (taze ağırlığının 1 gramında 100 nanogram kadar) ve genç tohumlarda bulunurken, yaşlı yapraklarda, gövdede de az miktarda bulunmaktadır.

1.4.2. Brassinosteroidlerin tohum çimlenmesindeki rolleri

Bir bitki hormonu olan BRs' nin çimlenme üzerine olumlu etkileri bir çok çalışmada gösterilmiştir (Anuradha and Rao, 2003; Zhang, et al., 2007). Anuradha and Rao (2003) çeltik tohumlarında tuz uygulanan grupta hiç çimlenme gözlemezken tuz+ BRs uygulanan grupta %40 oranında çimlenme gözlediklerini rapor etmişlerdir. Diğer bir çalışmada ise , *Medicago sativa* tohumlarına uygulanan 5 µM BRs' nin tuz stresinin çimlenme üzerindeki etkisini hafiflettiği ortaya konmuştur (Zhang et al., 2007). Ozmotik stres ve BRs uygulamasının sorghum (CSH-14) tohumlarının çimlenmesi üzerine yapılan başka bir çalışmada ise BRs uygulamasının ozmotik stresin çimlenme üzerindeki negatif etkisini azalttığı rapor edilmiştir (Vardhini and Rao 2003).

1.4.3. Brassinosteroidlerin fizyolojik etkileri

Brassinosteroidlerin en iyi bilinen özellikleri gövde uzamasını teşvik etmeleridir. BRs eksik mutantlar 1996 yılında *Arabidopsis*, domates ve bezelyede karakterize edilmiş ve yaban tip bitkilerle karşılaştırıldıklarında cüce olarak nitelendirilmiştir. Mutantlara uygulanan dışsal BL veya CS, bitkilerin boylarının uzamasını sağlamıştır. BRs' de giberellin ve sitokinin diğer bitki gelişimi sırasında ışıkla düzenlenebilmektedir. BR-eksik mutantlarla yapılan çalışmalarda, bitkilerin karanlıkta normalden farklı olarak gelişim gösterdikleri saptanmıştır. Bu bitkilerde apikal kanca bulunmamakta, kotiledonları açık şekilde bulunmakta ve fotosentezle ilgili genler ifade olmaktadır. Fakat bu durum hücre bölünmesinden değil hücrelerin uzamasından kaynaklanmaktadır. BRs' nin kök uzamasını inhibe ettiği bilinmektedir. Dışsal uygulanan BRs ksilem farklılaşması, polen tübünün büyümesi, erkek verimliliği ve çiçek gelişiminde rol almaktadır. Aynı zamanda BRs' nin bitki organlarının absisyonu, senesensin oluşmasında rolü olan etilenin üretimini teşvik ettiği ve gravitropizmayı arttırdığı görülmüştür. BRs aynı zamanda bitkinin abiyotik strese karşı verdiği yanıtlarda görev almaktadır.

1.4.4. Brassinosteroidlerin diğer hormonlarla ilişkisi

Bitkilerin strese karşı verdikleri yanıtlar çeşitli hormonlar ve bu hormonların sinyalizasyon yollarının iyi bir şekilde düzenlenmesi sayesinde oluşmaktadır. Bitkilerde mitojen ilişkili MAPK kaskadları ROS stresini de içeren çeşitli abiyotik ve biyotik strese karşı yanıtta yer almaktadır (Fujita et al., 2006). Moleküler çalışmalar, BRs ve diğer fitohormonlar arasında bir iletişimin var olduğunu göstermektedir. Dışsal BRs uygulaması bitkinin hormon seviyelerinde değişime neden olmaktadır. BRs'nin fasülye epikotillerinde etilen üretimini arttırdığı görülmüştür (Arteca et al., 1983). Bunun yanında BRs' nin GA' nın etkisine katkıda bulunduğu (Mayumi et al., 1995), gövde uzamasında da oksinle sinerjistik etkili olduğu bulunmuştur (Katsumi et al., 1991). *Arabidopsis* tohumlarına BRs ve GA veya BRs ve oksin aynı anda uygulandığında hipokotil uzaması meydana gelmektedir (Tanaka et al., 2003). ABA ile BR antogonistik olarak iş görmektedir. BEE1 (BR enhanced expression) , BEE2, BEE3 proteinleri dışarıdan ABA uygulaması ile baskılanırken BEE1 proteinini aşırı ifadesi bitkilerde ABA yanıtını azaltmıştır. Bu durum, BEE proteinlerinin birçok yolda sinyalizasyon görevi görebileceğini göstermektedir. BRs'nin bazı ABA yanıtlarını azaltabileceği öngörülmektedir. Başka bir çalışmada hem ABA hemde BRs'nin *Sorghum vulgare*' de kuraklık stresine toleransı arttırdığı görülmüştür (Xu et al., 1994). Bitki gelişimi ve strese karşı direncin kazanılmasında etkili olan bir diğer sinyal molekülü jasmonik asittir (JA). Yapılan çalışmalarda BRs uygulaması ile JA biyosentezi arasında bir bağ olduğu da bulunmuştur. Bu nedenle bitkilerde BRs'nin JA biyosentezinin başlaması ile de ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Mazorra et al., 2002).

1.4.5. BRs ve ROS süpürücü sistemler arasındaki ilişki

BRs'nin bitki büyümesi ve gelişimi üzerinde etkili olduğu bilinmektedir (Sasse et al., 1995). Fakat BRs'nin oksidatif stres altındaki bitkideki rolü henüz tam olarak bilinmemektedir. Farklı stres koşulları altında dışsal uygulanan BRs

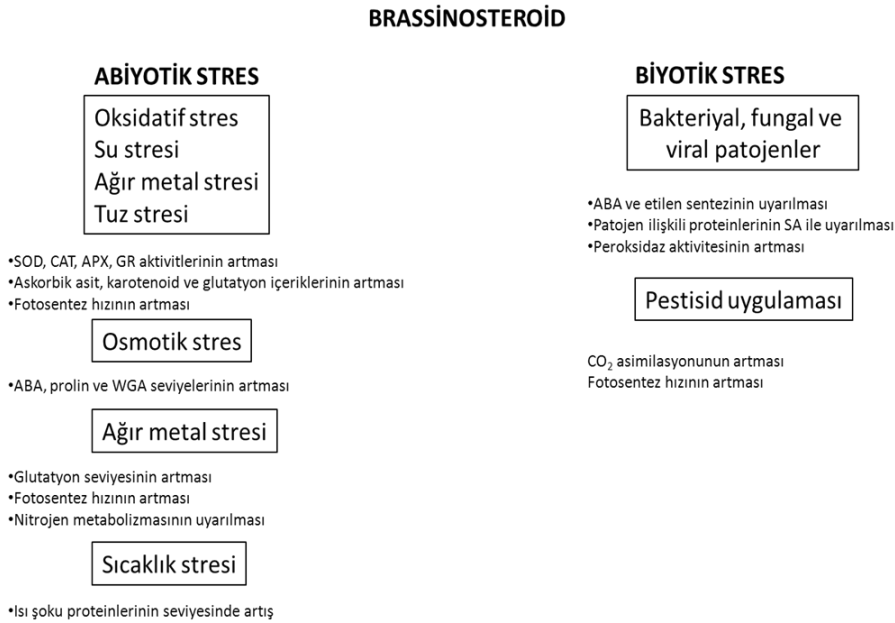
bitkideki SOD, CAT, GPX, APOX gibi enzimatik ve askorbik asit, tokoferol, karotenoid, glutatyon gibi enzimatik olmayan antioksidanların miktarlarında değişime neden olmaktadır. C ve E vitaminleri ve glutatyon doğrudan veya enzim katalizi ile OH[•], H₂O₂ veya O₂⁻ ile reaksiyona girmektedir (Ozdemir et al., 2004; Vardhini et al., 2003). Kuraklık stresine maruz bırakılmış mısırdaki (*Zea mays*) BL uygulaması SOD, CAT, APX'un yanısıra askorbik asit ve karotenoid içeriklerinde artışa neden olmuştur. Başka bir çalışmada osmotik stres koşulları altında *Sorghum vulgare*' de BRs' nin CAT aktivitesini arttırmakta ancak peroksidaz ve askorbik asit oksidaz aktivitelerini azaltmaktadır. Tuz stresine maruz kalan çeltikte BR muamelesi CAT, SOD ve GR aktivitelerinde önemli ölçüde artışa neden olmaktadır. Tuza duyarlı ve duyarlı olmayan türlerde yapılan 24-epiBL uygulamaları, tuza duyarlı bitkilerde kısa süreli tuz stresine karşı olan toleransı arttırmıştır. 24-epiBL uygulamasının tuza duyarlı olan bitkilerde antioksidan sistemi farklılaştırarak tuz stresine karşı direnci arttırmakta olabileceği düşünülmektedir. Ağır metal stresine maruz kalan *Chlorella vulgaris*'te ise BL uygulamaları CAT, GR, APX ve askorbik asit, karotenoid miktarında artışla sonuçlanmıştır. BRs yüksek sıcaklığa maruz bırakılmış domates yapraklarında CAT, peroksidaz ve SOD aktivitelerini arttırmaktadır (Mazorra et al., 2003).

1.4.6. Tuz stresinde BRs'nin rolü

Tuz stresi altındaki *Eucalyptus camaldulensis*' e 24-epiBL uygulaması sonucunda tohum çimlenmesi ve fide gelişiminde gelişim görülmüştür 150 mM NaCl varlığında *Eucalyptus camaldulensis* tohum çimlenmesi 24-epiBL ile artış göstermekte, fakat fideler hidrofobik olarak tuz stresine maruz bırakıldıklarında 24-epiBL' nin kökler vasıtasıyla alınması daha fazla zarara neden olmuştur (Sasse et al., 1995). BRs çeltikte (*Oryza sativa*) tuz stresinin neden olduğu çimlenme inhibisyonu etkisini ortadan kaldırmaktadır. Aynı zamanda BRs'nin klorofil içeriğini yenilediği ve nitrat redüktaz aktivitesini arttırdığı görülmektedir. Önceden NaCl ile muamele edilmiş nohut tohumları 28-homoBL ile ıslatıldıklarında nitrojen fikse edebilme kapasiteleri artmaktadır. NaCl ile ıslatılmış *Brassica juncea* tohumları, sprey ile yapraklara veya köklerden 28-homoBL muamelesi ile büyütüldüğünde, nükleik asit ve etilen içeriklerinde artış

sağlanmıştır (Hayat et al., 2007). Buğday germ aglutinini (WGA) fungal enfeksiyon, kuraklık stresi, tuzluluk, yüksek sıcaklık gibi uygun olmayan koşullarda artış gösteren bir lektindir. ABA WGA'nın sentezine ve birikimine neden olmaktadır. BRs'nin ABA içeriği üzerinde herhangi bir etkisi olmadığı halde tuz stresi sırasında buğday (*Triticum aestivum*) köklerinde lektin birikimine neden olmaktadır. Bu sonuçlar lektinin ABA-bağımsız kontrolünün BRs tarafından yapılabileceğini göstermektedir.

BRs bitkilere doğru miktar ve doğru zamanlarda uygulandıkları zaman bitkinin dayanıklılığını arttırabilmektedir. BRs bitkilerin abiyotik streslere ve bakteriyel, fungal ve viral patojenlere karşı olan yanıtlarında yer almaktadırlar. BRs ile düzenlenmiş stres yanıtları; önemli enzimatik reaksiyonların aktivasyonları veya baskılanması, protein sentezinin başlaması ve çeşitli kimyasal savunma bileşenlerinin üretimi sonucunda oluşan karmaşık bir süreçtir. Tüm bu sonuçlar BRs'nin zararlı çevresel koşullara karşı bitki direncinin arttırılması için yeni yaklaşımların önünü açmaktadır.



Şekil 1.4 Abiyotik ve biyotik stres koşullarında Brassinosteroid'in etkileri (Bajguz 2009'dan)

Yukarıda belirtildiği gibi son yıllarda tohum çimlenmesi ve ROS üretimi arasındaki ilişki yada BRs'lerin çimlenme üzerine etkilerine ait birçok araştırma yapılmıştır (Bailly, 2008; Kranner, 2010). Ancak stres altında tohum

embriyosundaki ROS düzenlenmesinin nasıl olduğu yada tohum çimlenmesinin iyileşmesinden sorumlu olan BRs' lerin ROS düzenlenmesi üzerinde ne kadar etkili oldukları bilinmemektedir. Bunun için bu çalışmada (i) tuz stresinin nohut tohumlarının çimlenmesi üzerine etkisi (ii) stres altında tohum embriyolarındaki ROS düzenlenmesini ve bu ROS ların süpürülmesinden sorumlu bazı antioksidan enzimlerin aktivitelerini nasıl etkilediği (iii) tuz stresine maruz bırakılan tohum embriyolarına dışarıdan BRs uygulamasıyla ROS düzenlenmesinin ve antioksidan savunma sisteminin nasıl değiştiği (iv) radikul uzama sürecinde BRs ve ROS düzenlenmesi arasındaki ilişkinin nasıl olduğu araştırılmıştır. Bu amaçla çalışmamızda,

- 1- Tuz stresi altında (200 mM NaCl) nohut tohumlarının çimlenme yüzdeleri
- 2- Dışarıdan BRs (6 -10 μ M) uygulanan ve tuz stresine maruz bırakılan nohut tohumlarının çimlenme yüzdeleri
- 3- Yukarıda verilen koşullar altında zamana bağlı olarak (şişirme, 6, 8, 12, 24, ve 48 saat) H_2O_2 miktarı ve NOX aktivitesi ölçülerek ROS düzenlenmesi
- 4- ROS süpürülmesinden sorumlu olan SOD, CAT, POX (çözünebilir- hücre duvarına bağlı) gibi antioksidan enzimlerin ve izozimlerin aktiviteleri
- 5- Hücre zarlarındaki lipid peroksidasyon seviyeleri

zamana bağlı olarak hem tohum embriyosunda ve hem de erken fide radikulunda belirlenmiştir.

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Deneme Deseni

2.1.1. Tohumların temini

Çalışmamızda Kahramanmaraş Tarım Araştırma Enstitüsü'nden temin edilen Aksu çeşidi nohut tohumları kullanılmıştır.

2.1.2. Tohum sterilizasyonu

Tohumlar 5 dk. boyunca %1 sodyum hipoklorit çözeltisinde sterilize edilmiştir.

2.1.3. Tohumların ekimi

Nohut tohumları ekimden önce farklı konsantrasyonlarda NaCl, BRs, NaCl + BRs solusyonlarında 24 saat şişirilmiştir. 24 saat sonunda şişen tohumlar steril ortamda filtre kağıtları üzerinde 24 saat boyunca kurutulmuştur. Bu işlemin ardından tohumlar, çimlendirilmek üzere çapı 20 cm olan ve içinde 15 ml uygulama solusyonu (NaCl, BRs, NaCl + BRs) ile ıslatılmış 2 adet filtre kağıdı bulunan cam petrilere ekilmiştir. Ekim işleminin sonunda tüm petriler 25°C sabit sıcaklık ve karanlıkta bekletilmek üzere inkübatöre konulmuştur.

2.1.4. Bitkilerin yetiştirilmesi ve deneme deseni

Tuz stresi için 200 mM NaCl, BRs için 6 ve 10µM 24-epiBL uygulanmıştır. Uygulamanın 6, 8, 12, 24, 48. saatlerinde embriyo ve radikul örnekleri alınmıştır. Alınan örnekler analizler için -80°C de saklanmıştır.

C	Kontrol
6B	6 μ M 24-epiBrassinolid
10B	10 μ M 24-epiBrassinolid
N	200 mM NaCl
6BN	6 μ M 24-epiBrassinolid + 200 mM NaCl
10BN	10 μ M 24-epiBrassinolid + 200 mM NaCl

Çizelge 2.1 Denemedeki uygulama grupları



Şekil 2.1 Çimlenmekte olan nohut tohumları

2.2. Fizyolojik Parameterler

2.2.1. Çimlenme Yüzdesi

Tuz stresi ve BRs uygulamasının 6, 8, 12, 24 ve 48. saatlerinde tohumların çimlenme yüzdeleri belirlenmiştir. Radikul uzunluğu 2 mm'ye ulaşan tohumlar çimlenmiş olarak kabul edilmiştir.

2.2.2. Büyüme parametreleri

Çimlenmiş tohumların radikul uzunlukları uygulamaların 12, 24 ve 48. saatlerinde kaydedilmiştir.

2.3. Biyokimyasal Parametreler

2.3.1. Lipit peroksidasyonu

Yapraklardaki lipit peroksidasyonu Madhava Rao ve Sresty (2000)' e göre tiobarbitürik asit reaktif maddeleri (TBARS) içeriği belirlenerek ölçülmüştür. TBARS konsantrasyonu 532 nm ve 600 nm' de ölçülen absorbans değerlerine göre hesaplanmıştır. 600 nm' de ölçülen absorbans spesifik olmayan turbiditedir ve 532 nm' de ölçülen absorbanstan çıkartılarak gerçek TBARS miktarı belirlenir. TBARS miktarı hesaplanırken ekstinksiyon katsayısı $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ kullanılmıştır.

2.3.2. H₂O₂ miktarı

H₂O₂ miktarı, Cheeseman (2006)' a göre bazı değişikliklerle belirlenmiştir. Standart H₂O₂ analizinde 100 µM sorbitol, 250 µM ferrous amonyum sülfat ve 100 µM xilenol orange 25 mM H₂SO₄ içinde çözülmemektedir. Bu yöntemde ferrous amonyum sulphate/xilenol orange (FOX) tamponuna %1 etilen (EtOH) eklenerek hazırlanmıştır (eFOX). Analizde kullanılacak örnekler analize kadar sıvı azot içinde muhafaza edilmiştir. Eğer örnekler, -80 °C veya -20 °C derecede saklanırsa H₂O₂ miktarında 1 haftada %60' a varan kayıplar gözlenebilmektedir (Cheeseman, 2006). 0,1 g tohum/radikul örneği sıvı azotta toz haline getirildikten sonra soğuk aseton (-20 °C) ile hazırlanmış 25 mM H₂SO₄ ile homojenize

edilmiştir. Homojenatlar 16000 g' de 4 °C' de 30 dk. santrifüj yapılmıştır. Elde edilen süpernatanttan 50 µl alınmış ve üstüne 1 ml eFOX tamponu ilave edilmiştir. Elde edilen karışım en az 15 dakika bekletildikten sonra 550 ve 800 nm dalga boyunda ölçülen absorbanların farkı alınır.

2.3.3. Antioksidan enzim ekstraksiyonu ve aktivite analizleri

Bu aşamadaki bütün işlemler proteaz aktivitesini minimum seviyede tutmak için 4 °C' de gerçekleştirilmiştir. Protein ve enzim ekstraktlarının hazırlanması için 0,1 gr embriyo örneği ilk olarak sıvı azotta ezilerek toz haline getirilmiştir. Bunun ardından 0,5 ml ekstraksiyon tamponunda (50 mM Tris-HCl pH 7.8, 0,1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 0,2% (v/v) Triton-X100, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), and 2 mM dithiothreitol (DTT)) homojenize edilmiştir. Askorbat peroksidaz aktivitesi analizi için homojenizasyon tamponuna 5 mM askorbik asit eklenmiş ve DTT yerine %2 (w/v) PVPP kullanılmıştır. Homojenizasyonun ardından örnekler 16000 g' de 30 dk. santrifüj edilmiştir. Bu aşamadan sonra elde edilen süpernatantlar protein miktarı ve enzim aktivitesi belirlenmesinde kullanılmıştır. Analizler sırasında örneklerin tekrar tekrar donup çözülmesini engellemek için elde edilen süpernatant ayrı ependorflara pay edilerek saklanmıştır.

2.3.3.1 Protein miktarının belirlenmesi

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

2.3.3.2 Katalaz (CAT) enzim aktivitesinin belirlenmesi

Katalaz (CAT (EC 1.11.1.6)) aktivitesi, Bergmeyer (1970)' e göre H_2O_2 ' nin süpürülmesinin 240 nm' de absorbansda yol açtığı azalmanın izlenmesi ile tespit edilmiştir. Reaksiyon karışımı 0.1 mM EDTA ve %3 H_2O_2 içeren 50 mM sodyum fosfat (pH 7,0) tamponudur. Enzimin, 1 mg total protein başına dakikada süpürdüğü $\mu\text{mol } H_2O_2$ miktarı, 1 U ($\mu\text{mol } H_2O_2 \text{ mg protein}^{-1} \text{ min}^{-1}$) olarak hesaplanmıştır.

2.3.3.3 Peroksidaz (POX) enzim aktivitesinin belirlenmesi

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

2.3.3.4 NADPH oksidaz (NOX) aktivitesinin belirlenmesi

NADPH oksidaz aktivitesi Jiang and Zhang (2002)' ye göre belirlenmiştir. Reaksiyon karışımı 50 mM Tris-HCl tamponu (pH 7.5), 0.5 mM XTT, ve 100 μM NADPH içermektedir. 470 nm' de XTT' nin redüksyonu izlenmiştir. Reaksiyon dışı oluşabilecek renk değişiminin belirlenmesi için 50 U SOD kullanılmıştır. O_2 .- üretimi $2.16 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ekstinksiyon kat sayısı kullanılarak hesaplanmıştır.

2.3.4. Antioksidan enzimlerin izoenzim tayini

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

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

2.3.4.1 Süperoksit dismutaz (SOD) izoenzim tayini

Örnekler %12.5' lik ayırma (separating) ve %4' lük hizalama (stacking) jelinde elektroforetik ayırma maruz bırakılmıştır. Her kuyucuğa çimlenen embriyolar için 20 µg ve çimlenmeyen embriyolar için 40 µg protein yüklenmiştir. SOD boyaması, Beauchamp ve Fridovich'e (1971) göre riboflavin ve nitrobluetetrazolium (NBT) boyası ile belirlenmiştir. Riboflavin ışıkla birlikte süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$) üretme özelliğine sahiptir, üretilen $O_2^{\cdot-}$ NBT' yi oksitleyerek mavi-mor renkte formazan oluşumuna sebep olur. Boyamanın prensibi jel üzerinde SOD lokalize olmuş bölgelerde NBT oksitlenmesinin inhibisyonu ile beyaz bantlar oluşmasının sağlanmasıdır. Jeller 60 dk karanlıkta boya solüsyonunda bekletildikten sonra ışık altında çalkalanarak bantların oluşması beklenmiştir.

SOD' un izoenzim tipleri Vitória *et al.* (2001)' e göre boya solüsyonuna inhibitörler eklenerek belirlenmiştir. Cu/ZnSOD inhibisyonu için 2 mM KCN, Cu/ZnSOD ve FeSOD inhibisyonu içinde 3 mM H_2O_2 kullanılmıştır. MnSOD aktivitesi her iki inhibitörden de etkilenmemektedir.

2.3.4.2 Peroksidaz (POX) izoenzim tayini

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

3. BULGULAR

3.1. Fizyolojik Parametreler

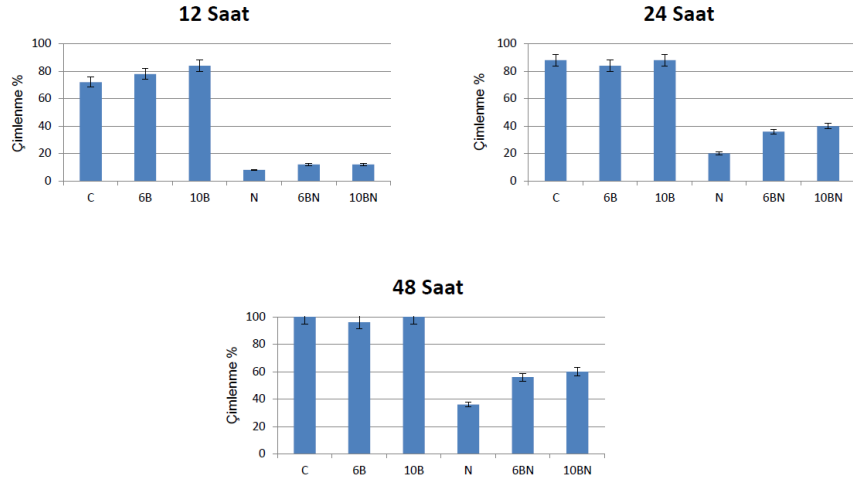
3.1.1. Çimlenme Yüzdesi

Kontrol şartlarında (C, 6B, 10B) nohut tohumlarında çimlenme belirgin olarak 12. saatte başlarken tuz stresi uygulanan gruplarda 24. saatte başlamıştır.

Uygulamanın 12. saatinde 6B grubundaki tohumların çimlenme yüzdesi kontrole göre %6, 10B grubundaki tohumların ise %12 daha fazladır. Tuz uygulanan gruplardan N grubu kontrole göre %64 daha az çimlenirken 6BN ve 10BN grupları N grubuna göre %4 daha fazla çimlenmiştir

24. saatte ise kontrol grubunun çimlenme yüzdesi 10B grubu ile aynı seviyeye gelirken 6B grubu kontrol ve 10B'ye göre %4 daha az çimlenmiştir. N grubunun çimlenmesi 6BN'den %16, 10BN'den %20 daha az olmuştur.

Denemenin son saat sayımı olan 48. saatte kontrol ve 10B gruplarının tamamı çimlenirken 6B grubunda bu oran %96 olmuştur. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında sadece tuz stresinin çimlenmeyi %64 azalttığı belirlenmiştir. 6BN ve 10BN grupları N grubundan sırasıyla %20 ve %24 daha fazla çimlenmiştir (Şekil 3.1).



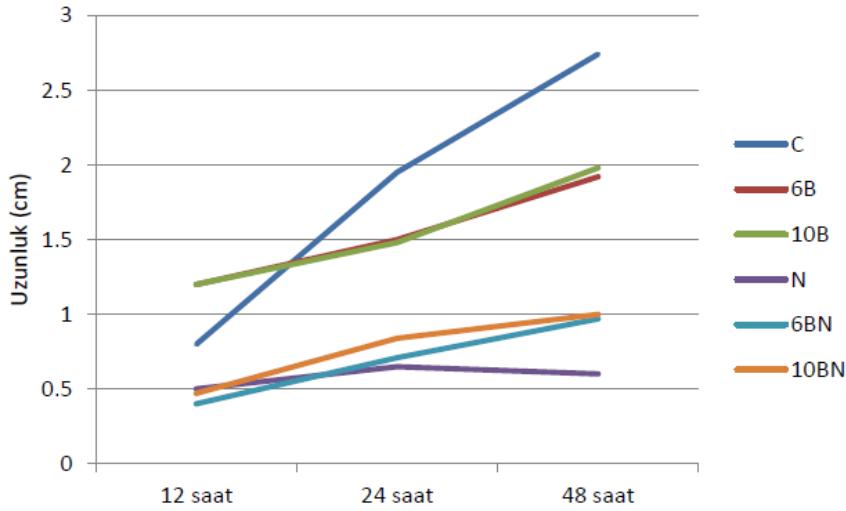
Şekil 3.1 12, 24 ve 48. Saatlerdeki uygulama gruplarının çimlenme yüzdeleri

3.1.2. Radikal Uzunluğu

12. saat: 6B ve 10B uygulamaları kontrole göre radikül uzunluğunu %50 oranında artırmıştır. Tuz uygulaması ise radikül uzunluğunu kontrole göre % 37.5 oranında azaltmıştır. 6BN ve 10BN uygulamaları %50 ve %41.25 kontrole göre radikül uzunluğunu azaltmıştır.

24. saat: Radikül uzunluğu 6B ve 10B uygulamaları ile %23.08 ve %24.02 oranında azalmıştır. Tuz uygulaması ise radikül uzunluğunu %66.6 oranında azaltmıştır. 6BN ve 10 BN uygulamaları ise tuz grubuna göre radikül uzunluğunda sırasıyla % 9.2 ve %29.2 iyileşme sağlamıştır.

48. saat: 6B ve 10B uygulamaları sonucunda radikül uzunluğu %30 azalmıştır. Tuz uygulaması radikül uzunluğunu kontrole göre 4.5 kat azaltırken, 6B ve 10B uygulamaları tuz stresi altında %61.1 ve %66.6 iyileşmeye neden olmuştur.



Şekil 3.2 Uygulamaların 12,24,48. Saatlerinde ölçülen radikül uzunlukları. Uygulama grupları: Kontrol (C), 6 µM BRs (6B), 10 µM BRs (10B), 200 mM NaCl (N), 200 mM NaCl+6 µM BRs (6BN), 200 mM NaCl+10 µM BRs (10BN).

3.2. Biyokimyasal Parametreler

3.2.1. Enzim ve izoenzim aktiviteleeri

3.2.1.1 Süperoksit dismutaz (SOD) Aktivitesi

Şişirme: Kontrol grubuyla karşılaştırdığımızda 6B ve 6BN gruplarının SOD aktiviteleerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlenmemiştir. 10B uygulaması ise SOD aktivitesini %4.6 arttırmıştır.

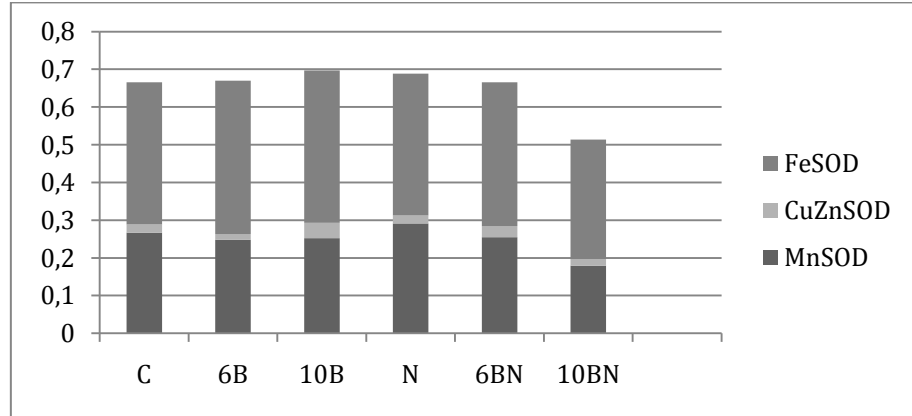
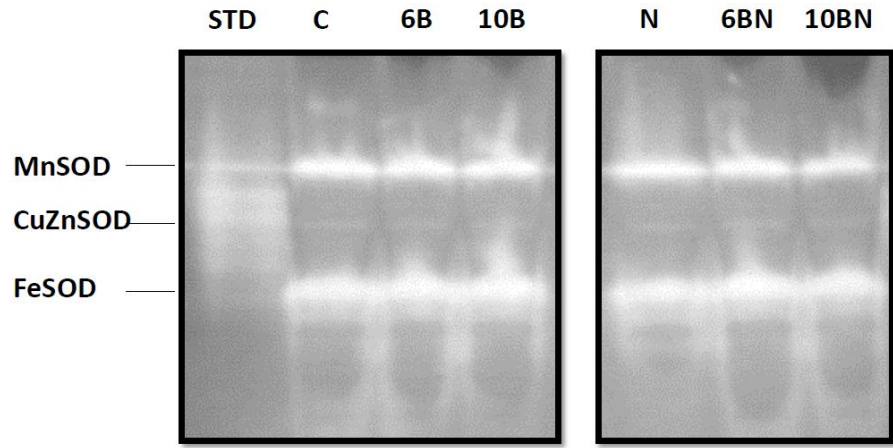
Tuz uygulaması, SOD aktivitesini kontrole göre %3.4 oranında arttırmasına rağmen 10BN uygulaması SOD aktivitesini %22.9 azaltmıştır (Şekil 3.3).

Şişirilen tohum embriyolarında 1 MnSOD, 1 CuZn SOD ve 1 FeSOD olarak toplam 3 adet SOD izozimi tanımlanmıştır. 6 µM ve 10 µM BRs uygulanan gruplarda MnSOD izoziminin aktivitesi sırasıyla kontrole göre azalmıştır. Sadece tuz stresi MnSOD aktivitesini kontrole göre arttırırken 6BN ve 10BN gruplarının MnSOD aktivitesi azalmıştır.

CuZnSOD aktivitesi 6B grubunda azalırken 10B uygulama grubunda artış göstermiştir. Tuz uygulanan gruplarda ise N ve 10BN gruplarının CuZnSOD

izozim aktivitesi düşüş gösterirken 6BN grubunun CuZnSOD izozim aktivitesinde artış gözlenmiştir.

FeSOD izozimi sadece 6 μ M ve 10 μ M BRs uygulaması ile artış göstermiştir. Tuz uygulaması bu izozimin aktivitesini değiştirmezen, 6BN ve 10BN uygulamaları FeSOD aktivitesini arttırmıştır.

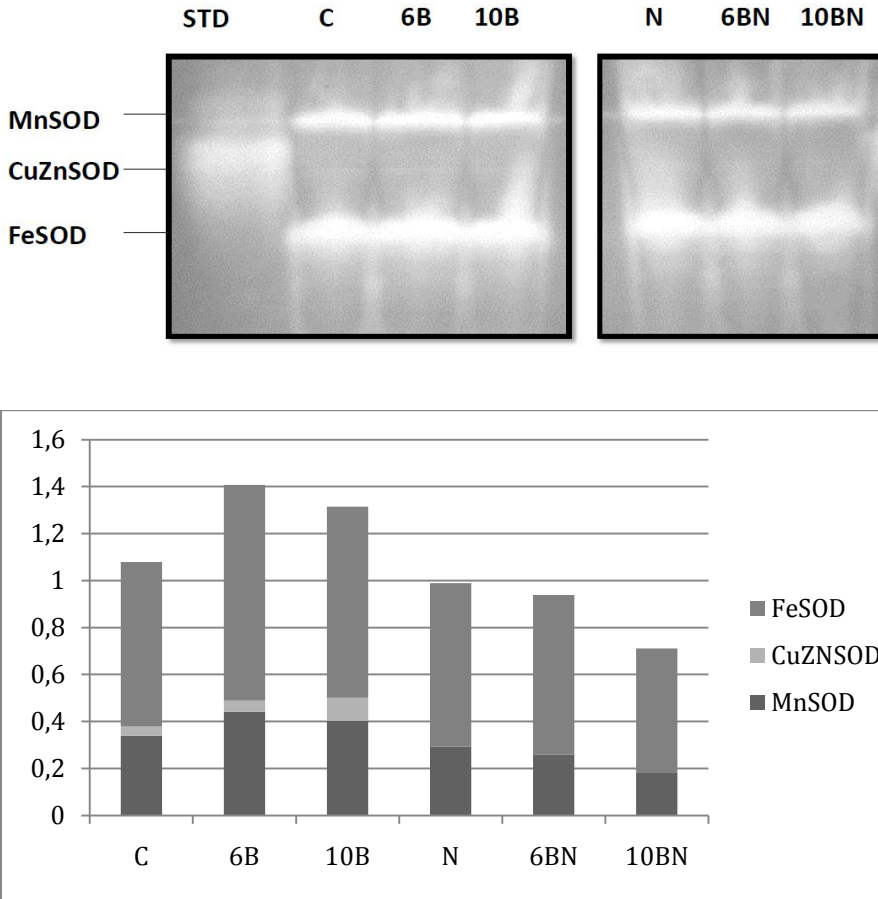


Şekil 3.3 24 saat sıvı içerisinde şişen tohumların SOD izozim aktiviteyi, Native-PAGE. Uygulama grupları: Kontrol (C), 6 μ M BRs (6B), 10 μ M BRs (10B), 200 mM NaCl (N), 200 mM NaCl+6 μ M BRs (6BN), 200 mM NaCl+10 μ M BRs (10BN). Her kuyucuk 60 μ g protein içermektedir. Std: 1 U bovine karaciğeri SOD standartı

6. saat: Kontrol gruplarına göre 6. saatte SOD aktivitesi 6 μ M BRs (6B) uygulaması ile % 30,8 oranında, 10 μ M BRs (10B) uygulaması ise %22,4

arttırmıştır. 200 mM NaCl (N) uygulaması ise SOD aktivitesini kontrole (C) göre 8.5% oranında düşürmüştür. 6 μ M BRs uygulanan tuz gruplarının (6BN) SOD aktivitesi kontrol koşullarına göre %13.1 oranında azalırken, 10 μ M BRs uygulanan tuz gruplarının SOD aktivitesi ise %33.65 oranında azalmıştır.

Uygulamanın 6. saatinde kontrol (C), 6B ve 10B gruplarında 3 tane SOD izozimi (MnSOD, CuZnSOD, FeSOD) tanımlanmıştır. 6 μ M ve 10 μ M BRs uygulamaları MnSOD, CuZnSOD ve FeSOD izozim aktivitelerini arttırmıştır. Tuz uygulanan gruplarda ise sadece MnSOD ve FeSOD izozimleri tanımlanmıştır. MnSOD izozim aktivitesi 6BN ve 10 BN gruplarında kontrole göre azalmıştır. FeSOD aktivitesi ise 6BN grubunda kontrole göre istatistiksel olarak değişmezken 10BN grubunun FeSOD aktivitesi azalmıştır. (Şekil 3.4)

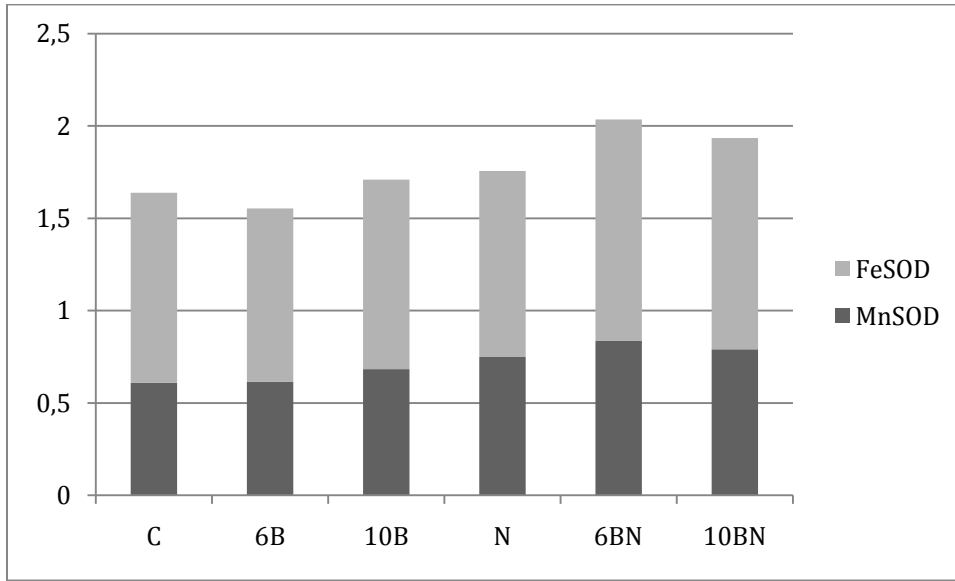
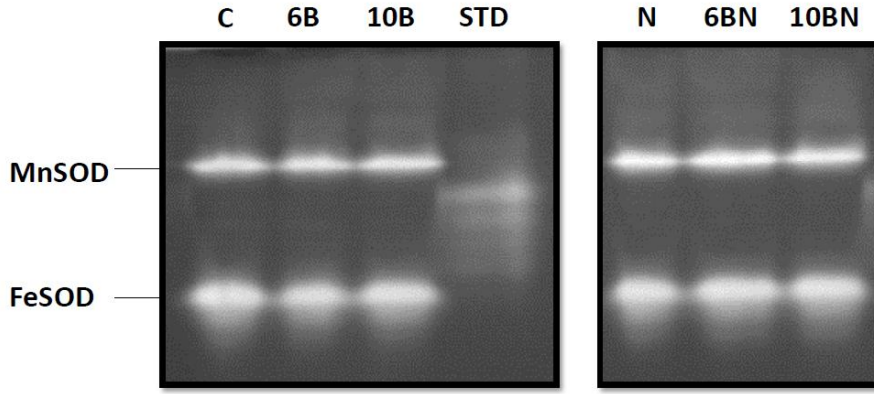


Şekil 3.4 6 saat uygulama sonrasında hasat edilen embriyoların SOD izozim aktiviteleri, Native-PAGE. Uygulama grupları: Kontrol (C), 6 μ M BRs (6B), 10 μ M BRs (10B), 200 mM NaCl (N), 200 mM NaCl+6 μ M BRs (6BN), 200 mM NaCl+10 μ M BRs (10BN). Her kuyucuk 60 μ g protein içermektedir. Std: 1 U bovine karaciğeri SOD standartı

8. saat: 8. saatte 6B grubunun SOD aktiviteleri kontrol grubuna göre %5 oranında azalırken 10 B grubunda %4.3 oranında artmıştır. Tuz uygulaması (N) ile SOD aktivitesi 7.3% oranında artmıştır. Diğer uygulama saatlerinden farklı olarak (şişirme ve 6 saat) 8. saatte BRs uygulaması ile tuz stresi altındaki SOD aktivitesi ilk defa artış göstermiştir. 6BN grubunda kontrole göre %24.5, 10BN uygulama grubunda ise SOD aktivitesi %18.4 oranında artmıştır.

Uygulamanın 8. saatinde bir adet MnSOD bir adette FeSOD olmak üzere toplam 2 tane izozim tanımlanmıştır. 10B uygulaması kontrole göre MnSOD izozim aktivitesini arttırmıştır. Benzer olarak tuz uygulaması da tüm grupların (N, 6BN, 10BN) MnSOD aktivitesini arttırmıştır.

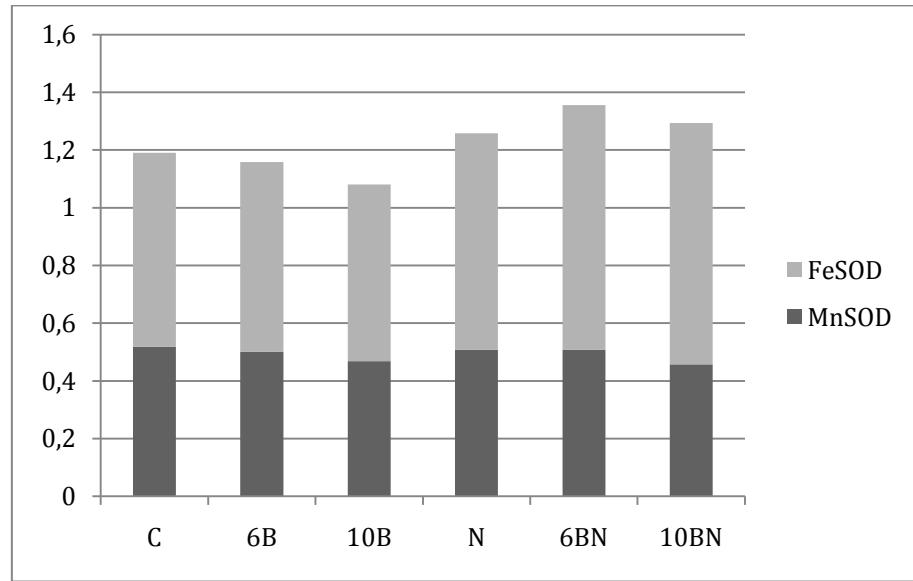
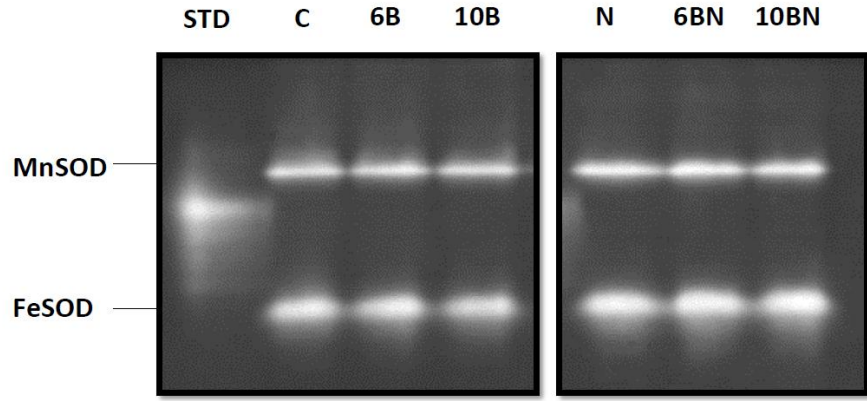
FeSOD aktivitesi 6B ve sadece tuz uygulanan grupta azalmıştır. 10 B grubunda ise kontrol grubuna göre herhangi bir değişim olmamıştır. Tuz ile BRs uygulamalarının beraber yapıldığı (6BN, 10BN) gruplarda FeSOD aktivitesinin artış gösterdiği bulunmuştur. (Şekil 3.5)



Şekil 3.5 8 saat uygulama sonrasında hasat edilen embriyoların SOD izozim aktiviteleri, Native-PAGE. Uygulama grupları: Kontrol (C), 6 μ M BRs (6B), 10 μ M BRs (10B), 200 mM NaCl (N), 200 mM NaCl+6 μ M BRs (6BN), 200 mM NaCl+10 μ M BRs (10BN). Her kuyucuk 40 μ g protein içermektedir. Std: 1 U bovine karaciğeri SOD standartı.

12. saat: 12.saatte, 6B grubunun SOD aktivitesi kontrol gruplarına göre 3.4% oranında, 10B grubunun SOD aktivitesi %9.25 oranında azalmıştır. Tuz stresiyle SOD aktivitesi artmıştır. Tuz stresi altındaki en yüksek artış 10 μ M BRs uygulanmış gruplarda elde edilmiştir. N grubunun SOD aktivitesi kontrole göre %5 oranında, 6BN grubunun ise %13.4 oranında arttırmıştır.

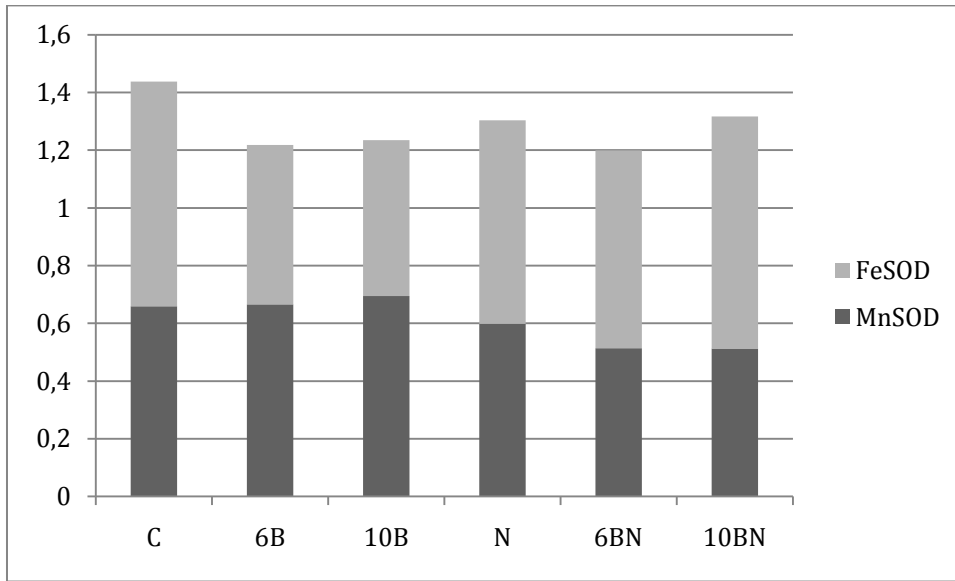
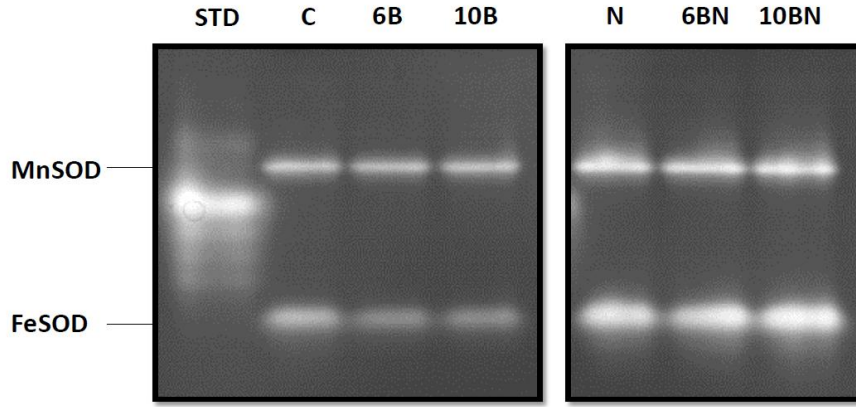
Uygulamanın 12. saatinde toplam iki adet (MnSOD ve FeSOD) SOD izozimi tanımlanmıştır. MnSOD aktivitesi tüm gruplarda kontrole göre düşüş gösterirken FeSOD aktivitesi sadece tuz uygulanan gruplarda (N, 6BN, 10BN) artmıştır. (Şekil 3.6)



Şekil 3.6 12 saat uygulama sonrasında hasat edilen embriyolar ve radikulların SOD izozim aktiviteleri, Native-PAGE. Uygulama grupları: Kontrol (C), 6 μ M BRs (6B), 10 μ M BRs (10B), 200 mM NaCl (N), 200 mM NaCl+6 μ M BRs (6BN), 200 mM NaCl+10 μ M BRs (10BN). Her kuyucuk 40 μ g protein içermektedir. Std: 1 U bovine karaciğeri SOD standartı

24. saat: 24.saatte, 6B grubunun SOD aktivitesi kontrole göre %15.4, 10B grubunun ise %14 azalmıştır. N grubunun SOD aktivitesi kontrole göre 9.1% oranında azalırken, 6BN'nin SOD aktivitesi %16.8 ve 10BN grubunun ise %8.4 azalmıştır.

Uygulamanın 24. saatinde diğer uygulama saatlerine benzer olarak 2 farklı SOD izozimi tanımlanmıştır. Tanımlanan MnSOD izoziminin aktivitesi sadece BRs uygulanan gruplarda artış gösterirken tuz uygulanan tüm gruplarda bu izozimin aktivitesi azalmıştır (N, 6BN, 10BN). FeSOD izoziminin aktivitesi ise sadece 10BN uygulama grubunda kontrole göre artış göstermiştir. Diğer uygulama gruplarının tamamında azalmıştır.(Şekil 3.7)

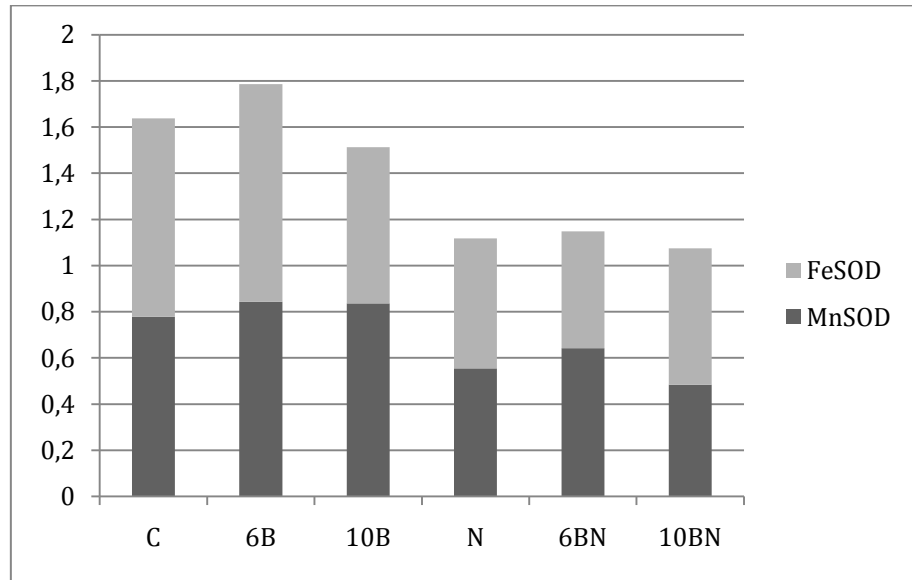
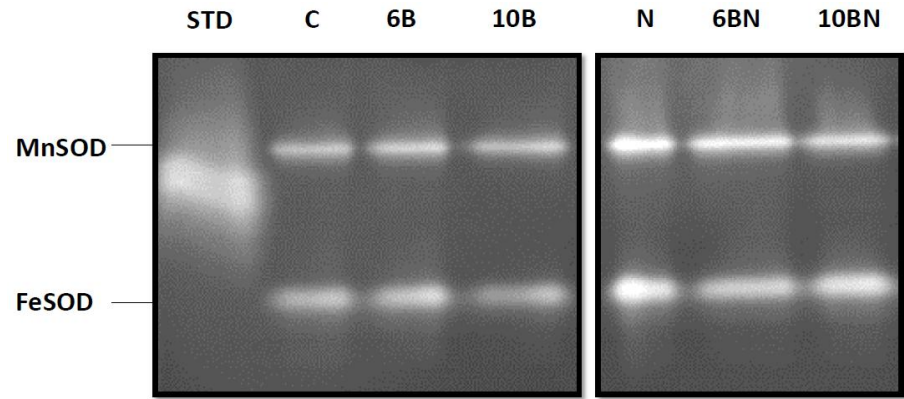


Şekil 3.7 24 saat uygulama sonrasında hasat edilen radikulların, SOD izozim aktiviteleri, Native-PAGE. Uygulama grupları: Kontrol (C), 6 μ M BRs (6B), 10 μ M BRs (10B), 200 mM NaCl (N), 200 mM NaCl+6 μ M BRs (6BN), 200 mM NaCl+10 μ M BRs (10BN). Kuyucuklar, C, 6B, 10B grupları için 20 μ g protein, N, 6BN, 10BN grupları için 40 μ g protein içermektedir. Std: 1 U bovine karaciğeri SOD standartı

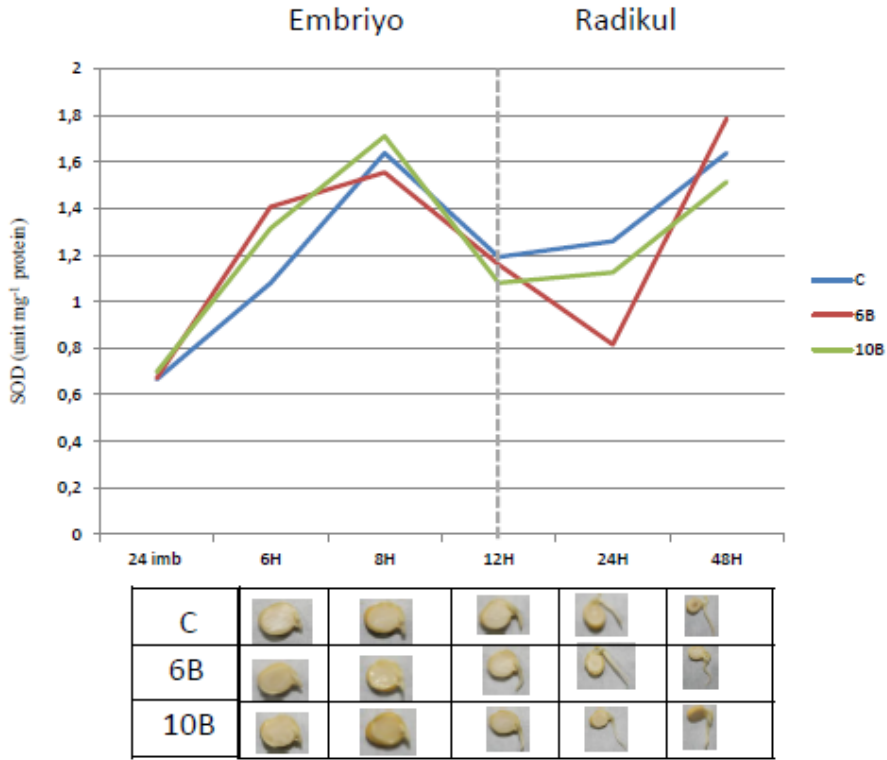
48. saat: Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında 6B'nin SOD aktivitesi %9.2 oranında artmasına rağmen 10B'nin SOD aktivitesi %7.4 oranında düşmüştür. Tuz uygulaması ise kontrole göre SOD aktivitesini %32 azaltmıştır. 6BN grubunun SOD aktivitesi kontrole göre %29.9 azalırken, 10BN grubunun SOD aktivitesi %34.33 azalmıştır (Şekil 3.9, Şekil 3.10)

Uygulamanın 48. saatinde toplam 2 adet SOD izozimi belirlenmiştir. MnSOD izoziminin aktivitesi sadece BRs (6B, 10B) uygulamaları ile artmış, tuz uygulamaları (N, 6BN, 10BN) ile beraber azalmıştır. FeSOD aktivitesi ise 6B

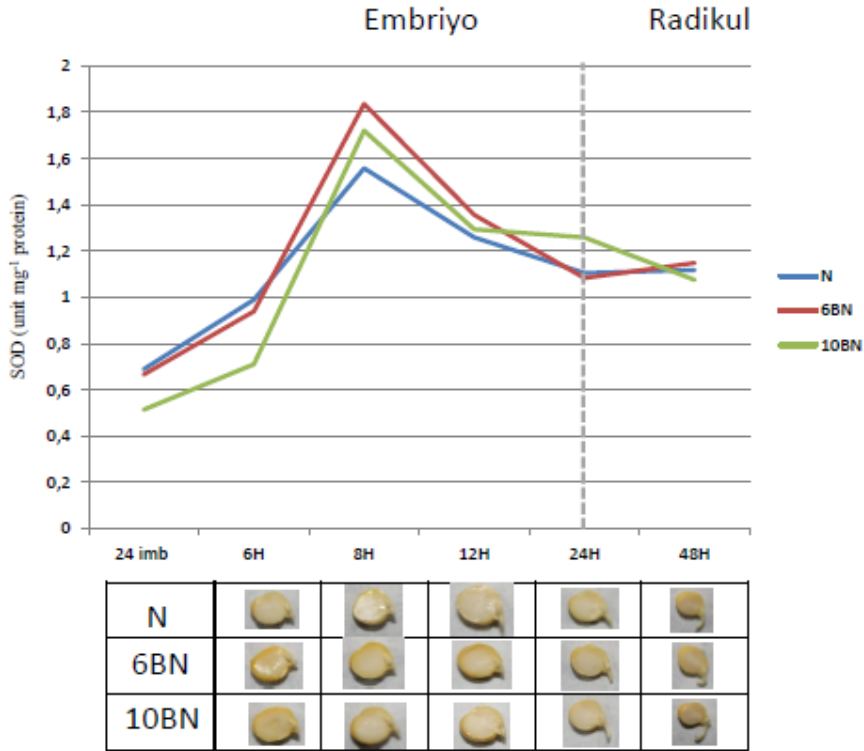
grubunda artarken, diğer tüm uygulama gruplarında (10B, N, 6BN, 10BN) azalmıştır. (Şekil 3.8)



Şekil 3.8 48 saat uygulama sonrasında hasat edilen radikulların SOD izozim aktiviteleri, Native-PAGE. Uygulama grupları: Kontrol (C), 6 μ M BRs (6B), 10 μ M BRs (10B), 200 mM NaCl (N), 200 mM NaCl+6 μ M BRs (6BN), 200 mM NaCl+10 μ M BRs (10BN). Kuyucuklar, C, 6B, 10B grupları için 20 μ g protein, N, 6BN, 10BN grupları için 40 μ g protein içermektedir. Std: 1 U bovine karaciğeri SOD standardı.



Şekil 3.9 C, 6B, 10B gruplarının zamana bağlı SOD aktivitesi.

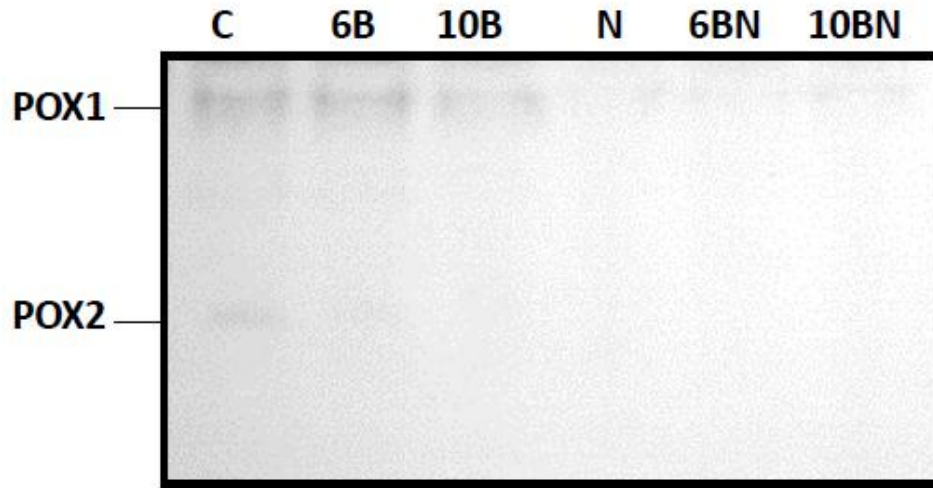


Şekil 3.10 N, 6BN, 10BN gruplarının zamana bağlı SOD aktivitesi.

3.1.1.2. POX aktivitesi ve izoenzimleri

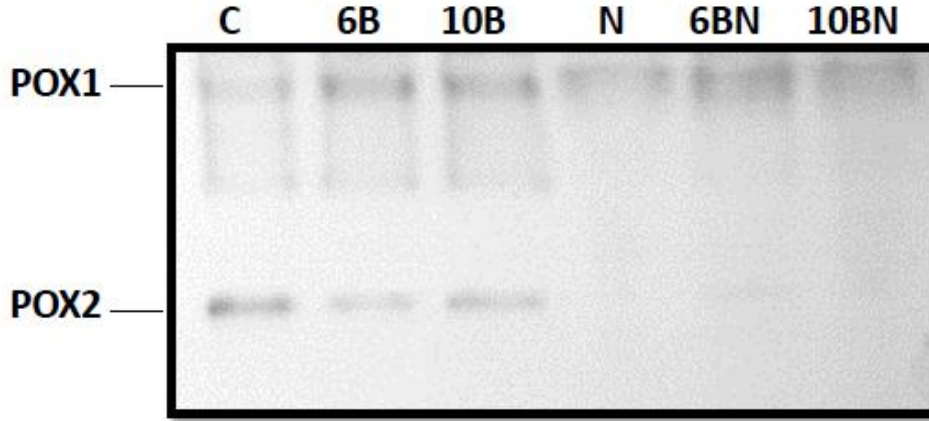
6. saat: 6. saat POX aktiviteleri karşılaştırıldığında 6B grubunun POX aktivitesi kontrole göre %16.33 azalmıştır. 10B deki bu azalma, %42.79'tır. Sadece tuz stresi POX aktivitesinde kontrole göre %61.7 azalmaya neden olurken, 6 μ M BRs (6BN) uygulaması POX aktivitesinde %23.19 iyileşmeye neden olmuştur. 10BN uygulaması ise POX aktivitesindeki azalmaya (%63.9) engel olamamıştır.

12. saat: 12. saatte, 6B ve 10B gruplarının POX aktiviteleri sırasıyla %53.4 ve %46.5 oranlarında artmıştır. N, 6BN ve 10BN gruplarının POX aktivitelerindeki azalmalar kontrole göre %39.7, %38.3 ve %39.9 olarak ölçülmüştür.



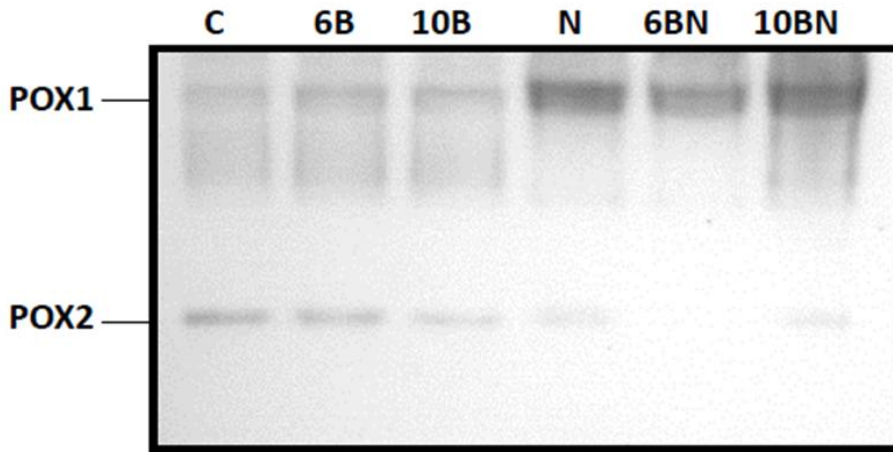
Şekil 3.11 12 saat uygulama sonrasında hasat edilen embriyolar ve radikulların SOD izozim aktiviteleri, Native-PAGE. Uygulama grupları: Kontrol (C), 6 μ M BRs (6B), 10 μ M BRs (10B), 200 mM NaCl (N), 200 mM NaCl+6 μ M BRs (6BN), 200 mM NaCl+10 μ M BRs (10BN). Her kuyucuk 240 μ g protein içermektedir.

24. saat: 6B grubunun kontrol grubuna göre POX aktivitesi %23.1 azalmıştır. 10B de bu azalma %14.4 oranındadır. Tuz uygulaması yapılan tüm grupların POX aktiviteleri azalmıştır. N grubundaki azalma kontrole göre %86.63 iken, 6BN de %77.2, 10BN de ise %81.61 olarak kaydedilmiştir. Bu durum NaCl uygulamasının 24. saatinde 6 ve 10 μ M BRs' nin POX aktivitesini sırasıyla 70% ve 36.9% iyileştirdiğini göstermektedir.

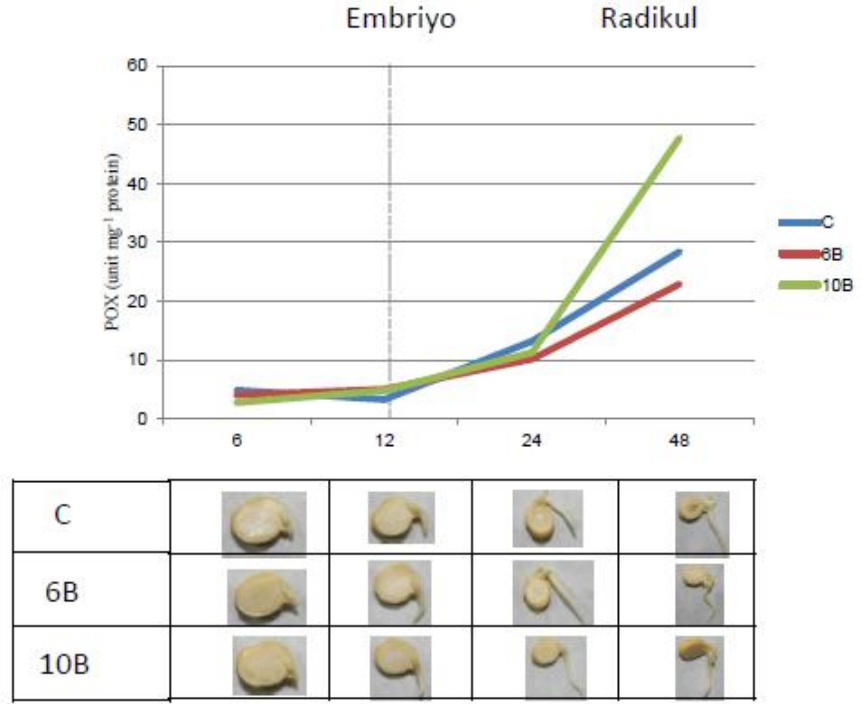


Şekil 3.12 12 saat uygulama sonrasında hasat edilen embriyolar ve radikulların SOD izozim aktivitelem, Native-PAGE. Uygulama grupları: Kontrol (C), 6 μ M BRs (6B), 10 μ M BRs (10B), 200 mM NaCl (N), 200 mM NaCl+6 μ M BRs (6BN), 200 mM NaCl+10 μ M BRs (10BN). C, 6B, 10B grupları 100 μ g; N, 6BN, 10BN 240 μ g protein içermektedir.

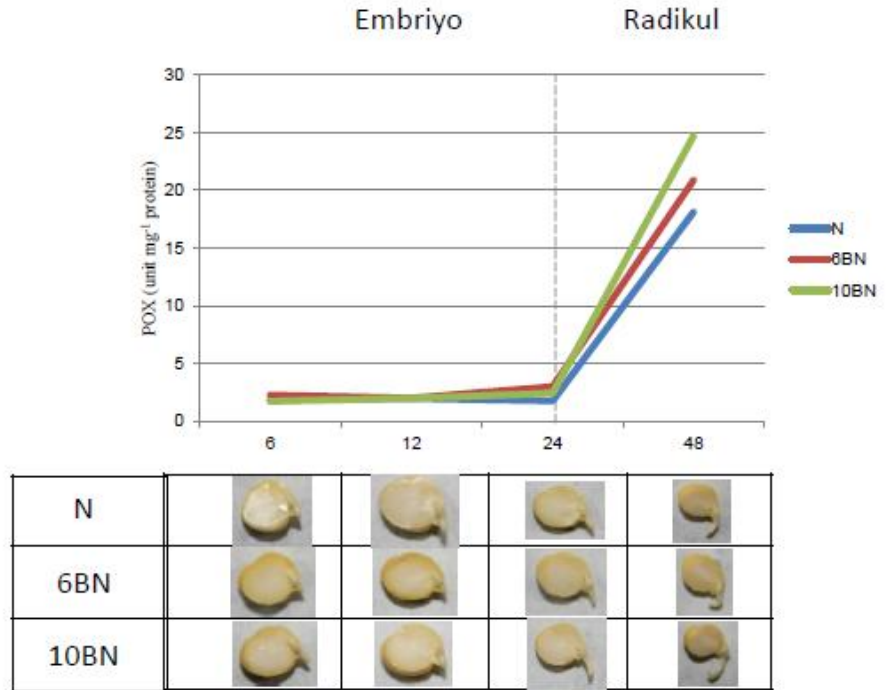
48. saat: 48. saat POX aktivitelem karşılaştırıldığında 6B grubunun POX aktivitelem kontrole göre %19.33 azalma olurken, 10B grubunun POX aktivitelem %68.9 oranında artış kaydedilmiştir. Sadece NaCl uygulaması ise POX aktivitelem %36 azaltmıştır. 6BN ve 10BN uygulaması tuz stresi altında sırasıyla POX aktivitelem %15.1 ve %36.3 iyileşmeye neden olmuştur (Şekil 3.14, Şekil 3.15)



Şekil 3.13 48 saat uygulama sonrasında hasat edilen embriyolar ve radikulların SOD izozim aktivitelem, Native-PAGE. Uygulama grupları: Kontrol (C), 6 μ M BRs (6B), 10 μ M BRs (10B), 200 mM NaCl (N), 200 mM NaCl+6 μ M BRs (6BN), 200 mM NaCl+10 μ M BRs (10BN). Her kuyucuk 100 μ g protein içermektedir.



Şekil 3.14 C, 6B, 10B gruplarının zamana bağlı POX aktivitesi.



Şekil 3.15 N,6BN, 10BN gruplarının zamana bağlı POX aktivitesi.

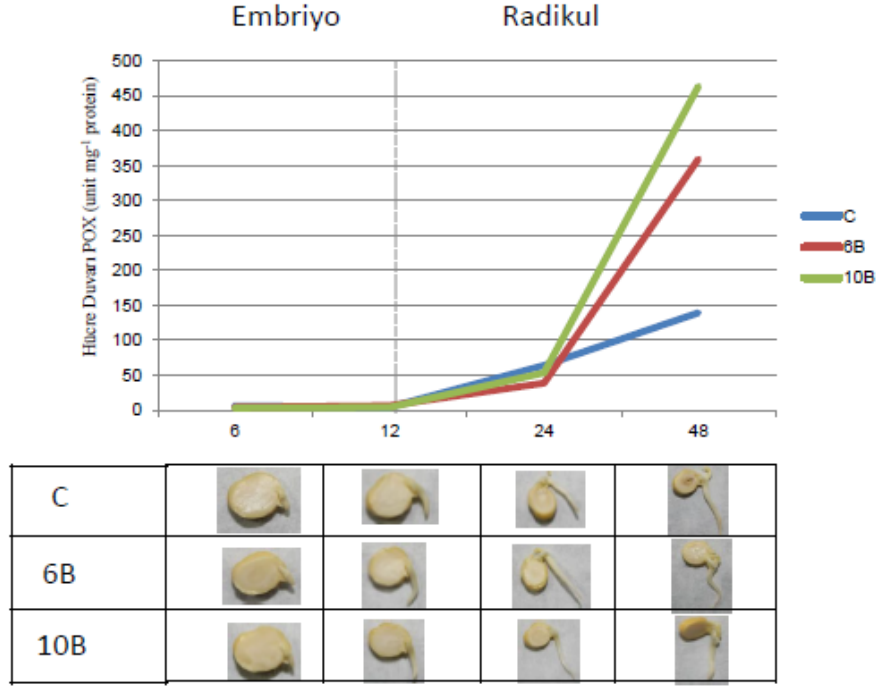
3.2.1.2 Hücre Duvarına Bağlı POX Aktivitesi

6.saate: 6. saatte hücre duvarına bağlı POX aktivitesine bakıldığında, 6B grubunun POX aktivitesinin kontrol grubuna göre %29.78, 10B grubunda ise %49.22 oranında azaldığı belirlenmiştir. Tuz uygulanan gruplardan N grubunun POX aktivitesi %80.8, 6BN ve 10BN gruplarının hücre duvarına bağlı POX aktiviteleri ise %81.5 oranında azalmıştır.

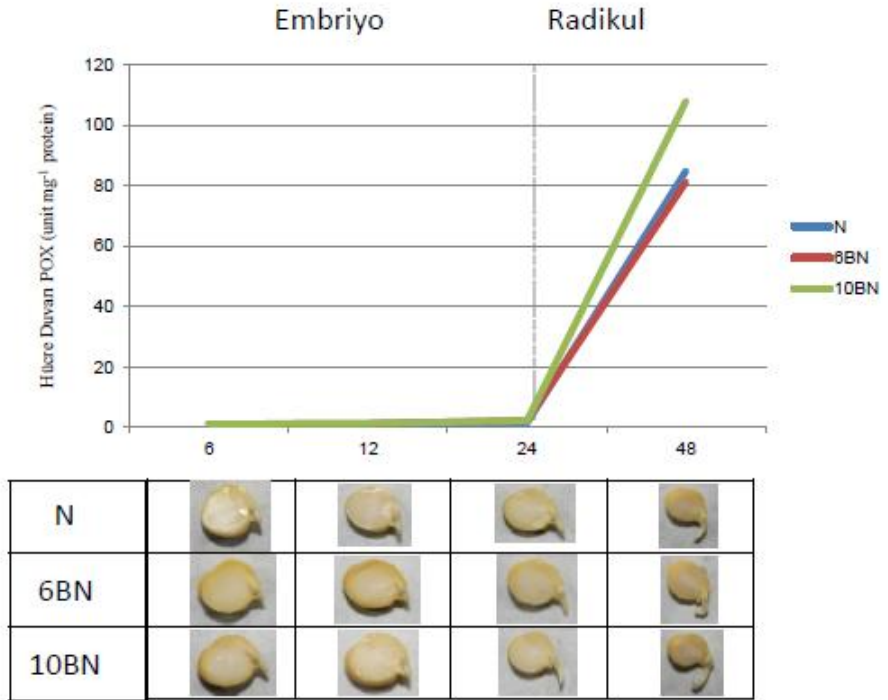
12. saat: 6B grubu kontrolle karşılaştırıldığında hücre duvarına bağlı POX aktivitelerinde %51.11 artış meydana gelirken 10B grubunda %4.9 oranında azalma görülmüştür. Tuz uygulaması yapılan gruplardan N grubundaki POX aktivitesi, kontrol grubuna göre %72.9, 6BN grubu %71.1, 10BN grubu ise %68.55 oranında azalmıştır.

24. saat: 24. saatte, hücre duvarına bağlı POX aktiviteleri karşılaştırıldığında POX aktivitesinde 6B de %39.66, 10B de ise %16.44 oranında düşüşler meydana gelmiştir. Tuz uygulaması gruplarında N grubunun POX aktivitesi kontrol grubuna göre %97.6 azalmasına rağmen 6BN ve 10 BN uygulaması bu azalmayı sırasıyla %55 ve %40.7 oranında iyileştirmiştir.

48. saat: Kontrol grubuyla karşılaştırıldıklarında 6B grubunun POX aktivitesi kontrole göre 2.58 kat, 10B grubunun ise kontrole göre 3.32 kat arttığı belirlenmiştir. Tuz uygulaması ile birlikte N grubunun hücre duvarına bağlı POX aktivitesinde kontrole göre %39.1 oranında azalma meydana gelmiştir. 6BN grubunun POX aktivitesi kontrole göre %41.71 ve 10BN grubunun ise %22.5 azalmıştır. Bu sonuçlar 10BN uygulamasının hücre duvarına bağlı POX aktivitesinde %27.25 iyileşme sağladığını göstermektedir (Şekil 3.16, Şekil 3.17)



Şekil 3.16 C, 6B, 10B gruplarının hücre duvarındaki zamana bağlı POX aktivitesi.



Şekil 3.17 N, 6BN, 10BN gruplarının hücre duvarındaki zamana bağlı POX aktivitesi

3.1.1.4 CAT aktivitesi

Şişirme: 24H şişme sonrasında hasat edilen bitkilerde, 6 µM BRs uygulaması CAT aktivitesi kontrole göre %19.03 oranında azalırken, 10 µM BRs uygulaması ile CAT aktivitesi %5.3 oranında artmıştır. Tek başına tuz uygulaması CAT aktivitesini %13.7 oranında arttırırken, beraber uygulanan tuz ve BRs, CAT aktivitesini düşürmüştür. Bu düşüş 6BN grubunda kontrole göre %33.4, 10BN grubunda ise %41 oranındadır.

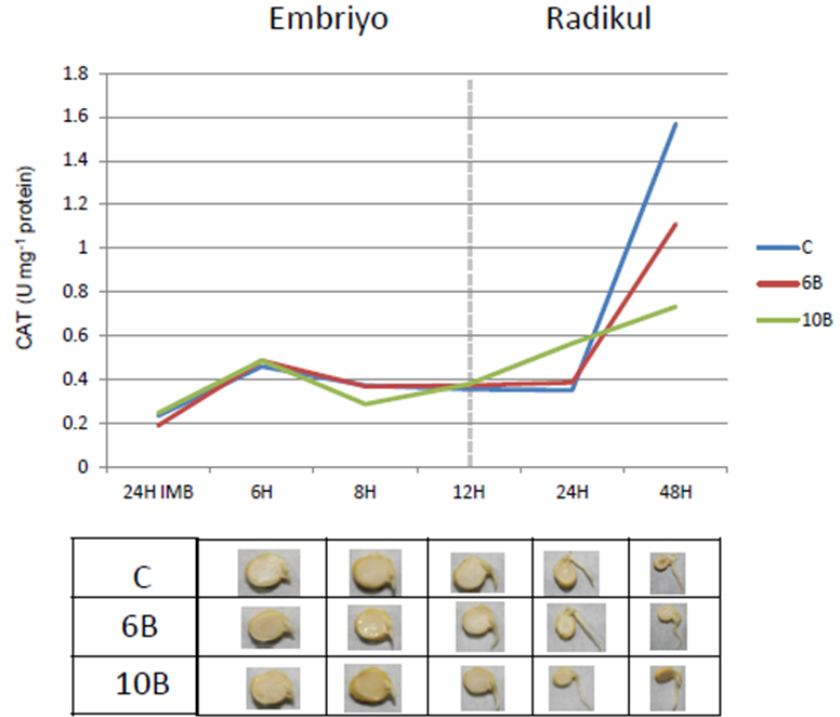
6. saat: 6 µM BRs ve 10 µM BRs uygulamaları kontrole göre CAT aktivitesini sırasıyla %5.6 ve %5.8 oranlarında azaltmıştır. Tuz uygulaması ile tüm gruplarda CAT aktivitesinde düşüş belirlenmiştir. N grubunun CAT aktivitesi kontrole göre %35.35, 6BN grubunun CAT aktivitesi %6.79, 10 BN grubunun CAT aktivitesi ise %25.13 oranlarında azalmıştır. 6BN uygulaması CAT aktivitesinde N grubuna göre %43.3 iyileşme sağlamıştır. Aynı saatte 10 BN uygulaması ise sadece %13.3 oranında iyileşme sağlamıştır.

8. saat: 6 µM BRs uygulaması kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak CAT aktivitesinde anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır. 10 µM BRs uygulaması ise CAT aktivitesini kontrole göre %23.1 oranında azaltmıştır. Tuz uygulaması tüm grupların CAT aktivitesinde azalmaya neden olmuştur. Bu düşüşler kontrole göre, N grubunda %29.43, 6BN grubunda %36, 10BN grubunda ise %44 oranlarındadır.

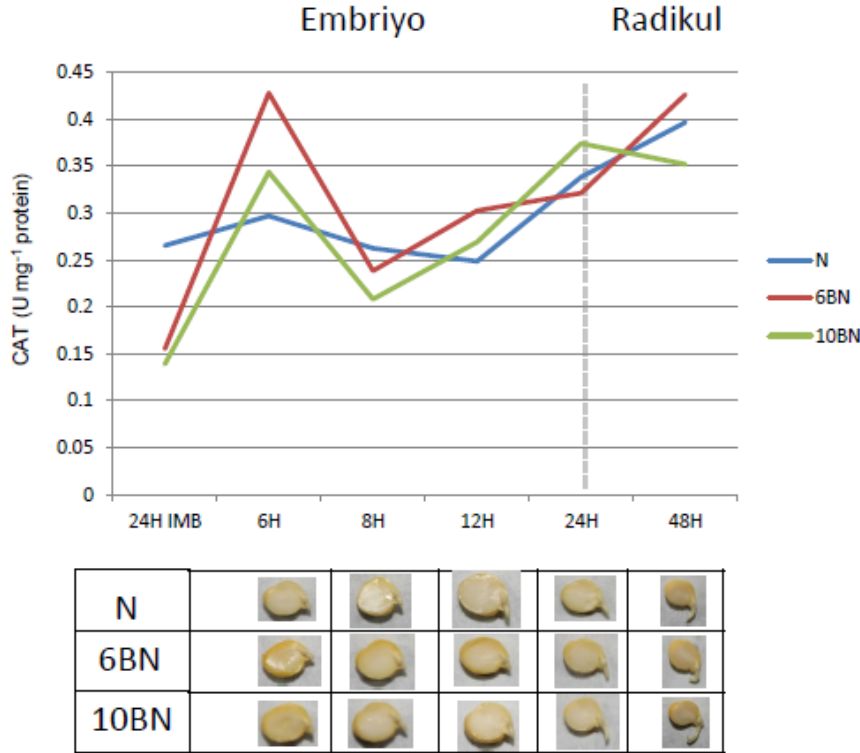
12. saat: 6B ve 10B uygulamaları kontrole göre CAT aktivitesini sırasıyla %4.9 ve %6.5 arttırmıştır. Tuz uygulamaları ise bitkilerin CAT aktivitelerinde azalmaya neden olmuştur. En yüksek azalma (%29.9) sadece NaCl uygulanan grupta gözlenmiştir. 6BN ve 10BN uygulamaları, CAT aktivitesini N grubuna göre %20 ve %8 oranlarında arttırmıştır.

24. saat: 6B ve 10B gruplarında kontrole göre CAT aktiviteleri sırasıyla %9.9 ve %60.8 oranlarında artmıştır. Tuz uygulaması ise aktiviteyi kontrole göre %3.6 oranında düşürmüştür. 6BN grubunun CAT aktivitesini kontrole göre %8.5 oranında azaltırken, 10 BN grubunun aktivitesi bu saatte %6.6 oranında artmıştır.

48. saat: Uygulamanın 48. saatinde tüm gruplarda CAT aktiviteleri kontrole göre azalmıştır. CAT aktiviteleri kontrole göre 6B de %29.2 ve 10B grubunda ise %53.3 azalmıştır. Benzer olarak, kontrole göre NaCl uygulanmış gruplarda da CAT aktivitesi azalmıştır. Ancak diğer tuz gruplarıyla karşılaştırıldığında 6BN uygulamasının CAT aktivitesini %7.5 iyileştirdiği belirlenmiştir (Şekil 3.18, Şekil 3.19)



Şekil 3.18 C, 6B, 10B gruplarının zamana bağlı CAT aktivitesi.



Şekil 3.19 N, 6BN,10BN gruplarının zamana bağlı CAT aktivitesi.

3.1.1.5 NOX aktivitesi ve izoenzimleri

Şişirme: NOX aktivitesi kontrole göre BRs uygulamaları sonrasında (6B ve 10B) sırasıyla %33 ve %17.8 oranında azalmıştır. Benzer olarak tuz uygulanan tüm grupların NOX aktiviteyi kontrol grubuna göre sırasıyla %15.5, %28.3, %33.2 azalmıştır.

6. Saat: Tek başına BRs (6B, 10B) uygulamaları NOX aktiviteyi istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde değiştirmemiştir. Tuz uygulanan grupların (N, 6BN, 10BN) NOX aktiviteyi ise sırasıyla %27, %35.6, %12 oranlarında azalmıştır.

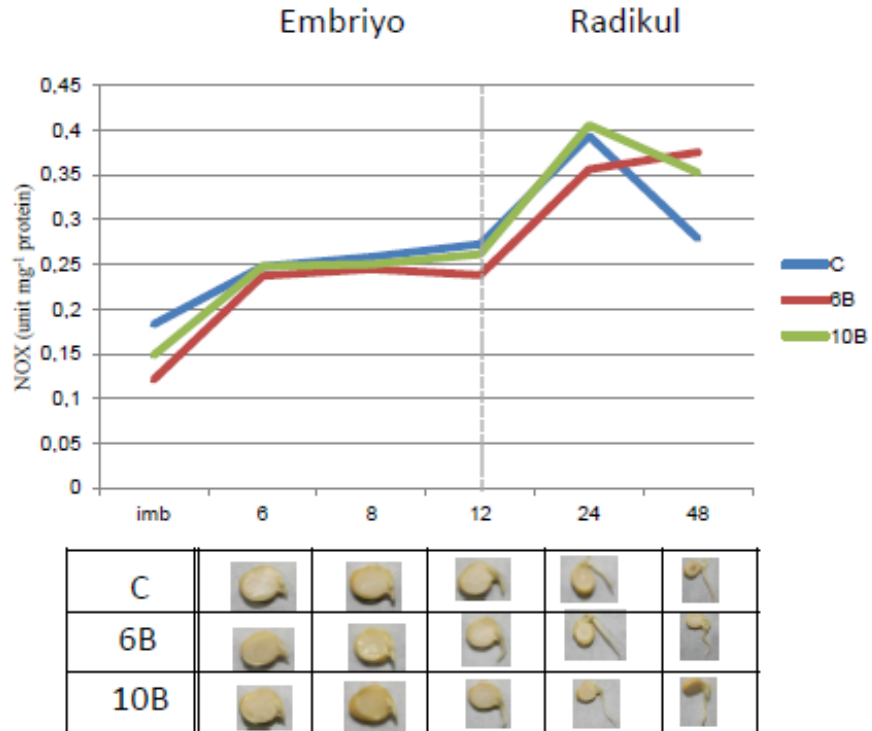
8. Saat: 6 µM BRs uygulaması NOX aktivitesini kontrole göre %2.12 oranında azaltmıştır. Tuz uygulanan grupların NOX aktiviteyi ise kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında azalmıştır. Bu azalma N grubunda %31.32 iken, 6BN grubunda %39.68 ve 10BN grubunda %39.4 oranlarındadır.

12. saat: 6B uygulama grubunun NOX aktivitesi kontrole göre % 11.82 ve 10B uygulama grubunun ise % 3.3 oranında azalmıştır. Tuz uygulanan tüm gruplarda

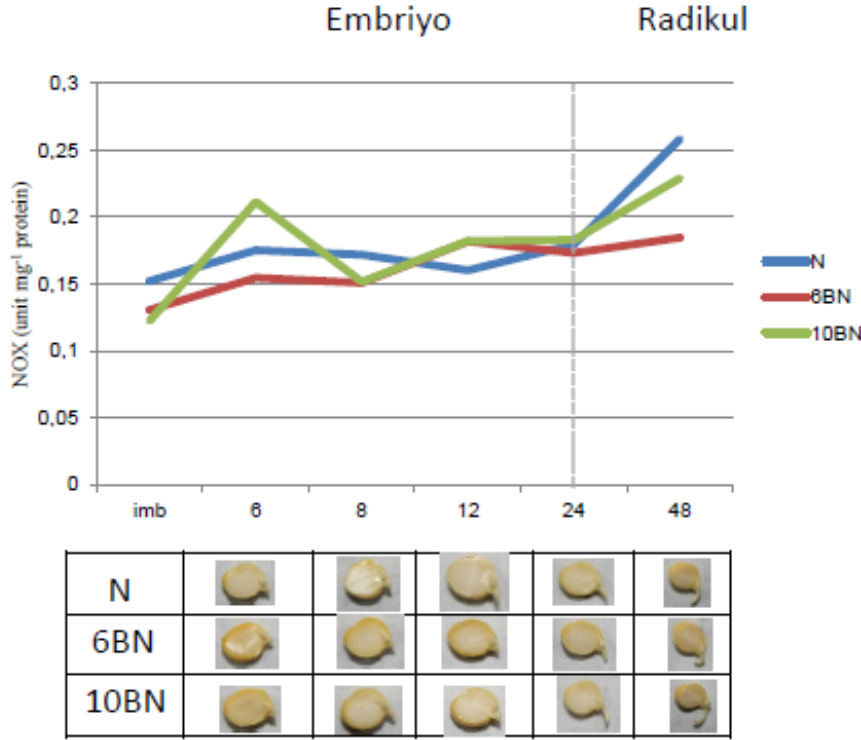
ise NOX aktivitesinde dramatik düşüşler gözlenmiştir. N grubunun NOX aktivitesi kontrole göre %40.7, 6BN grubunun NOX aktivitesi %32.71, 10BN grubunun NOX aktivitesi ise %32.56 oranlarında azalmıştır.

24.saat: 6B grubunun NOX aktivitesi kontrole göre %8.7 oranında azalırken 10B grubununki kontrole göre değişmemiştir. Bu sonuçlara benzer olarak N grubunun NOX aktivitesi kontrole göre %54, 6BN grubunun %55.65, 10BN grubunun ise %53.2 oranlarında azalmıştır.

48. saat: 6B ve 10B uygulama gruplarının NOX aktiviteleri kontrole göre artmıştır. 6B grubunun NOX aktivitesi % 35 oranında artarken, 10B grubunun NOX aktivitesi %26.8 artmıştır. N grubunun NOX aktivitesi %7.1, 6BN grubunun NOX aktivitesi %34, 10BN grubunun NOX aktivitesi ise %18.4 oranında azalmıştır. (Şekil 3.20, Şekil 3.21)



Şekil 3.20 C, 6B, 10B gruplarının zamana bağlı NOX aktivitesi.



Şekil 3.21 N, 6BN, 10BN gruplarının zamana bağlı NOX aktivitesi.

3.2.2. H₂O₂ miktarı

Şişirme: 24 saat boyunca şişirme sonrasında grupların H₂O₂ analizi yapıldığında 6B grubunun H₂O₂ miktarının kontrole göre %4.25 oranında arttığı belirlenmiştir. 10B grubunun H₂O₂ miktarında ise istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir değişiklik belirlenmemiştir. Tuz uygulanan gruplardan N grubunda H₂O₂ miktarı %3.25, 6BN grubunda %3.63, 10BN grubunda ise kontrole göre %12 oranında düşüşler saptanmıştır.

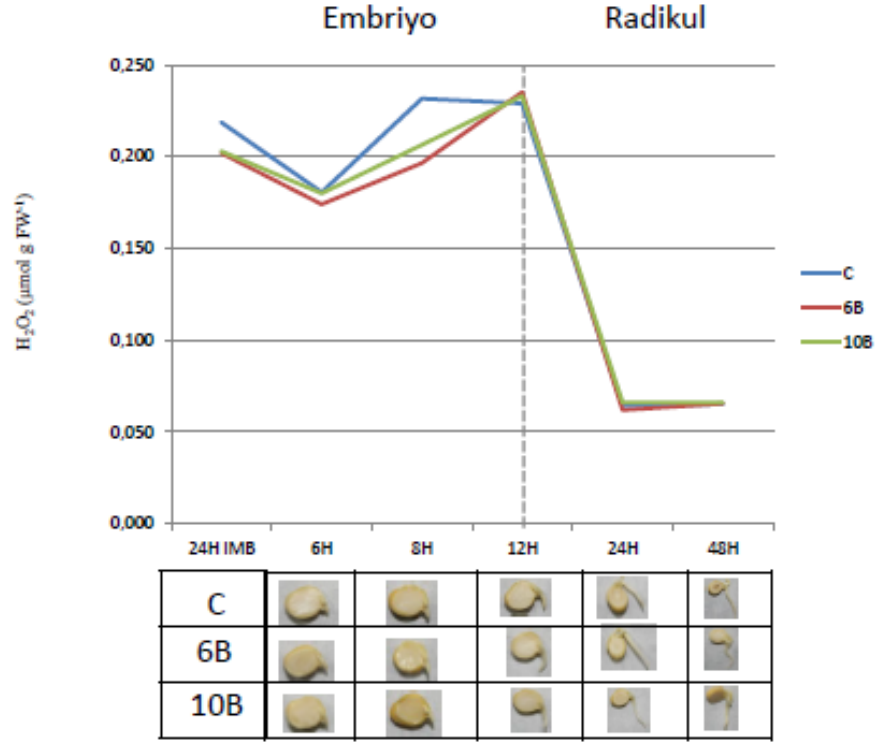
6. saat: 6B grubunun H₂O₂ içeriği kontrole göre %25.7 artarken 10B grubunun H₂O₂ miktarı %16.6 artmıştır. Tuz uygulaması yapılan gruplardan N grubunda H₂O₂ içeriği %2.48, 6BN ve 10BN gruplarında sırasıyla %21.2 ve %14.48 azalmıştır.

12. saat: 12. saatte, 6B ve 10B gruplarının H₂O₂ içerikleri kontrole göre sırasıyla %18.65 ve %2.93 artmıştır. N grubunun H₂O₂ içeriği ise kontrol grubuna

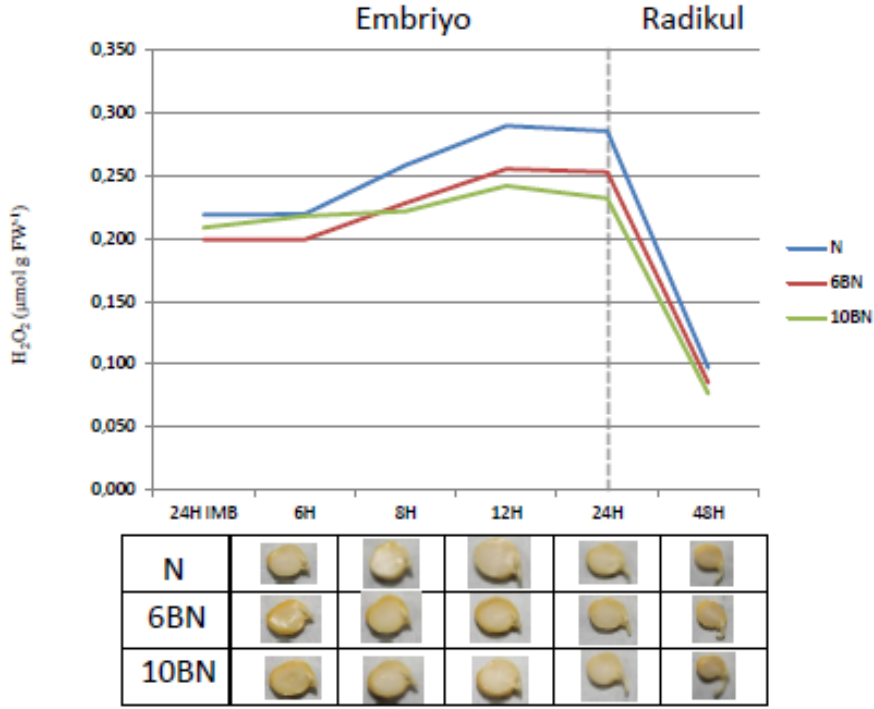
göre %1.1 daha fazladır. 6BN ve 10BN gruplarının H_2O_2 içeriklerinin ise %31.7 ve %12.4 daha düşük olduğu bulunmuştur.

24. saat: H_2O_2 miktarı 6B grubunda kontrol grubuna göre %6.25 azalmaktayken 10B grubunda bu oran %27.3 olarak saptanmıştır. Tuz uygulanan gruplardan N grubunda H_2O_2 içeriği kontrol ile karşılaştırıldığında %44.26 azalmıştır. Bu azalma 6BN de %46.1, 10BN de ise %40.2 olarak tespit edilmiştir.

48. saat: 48. saatte, 6B grubunun H_2O_2 içerikleri kontrole göre %33.5, 10B grubunun %51.6 oranında arttığı bulunmuştur. Benzer olarak kontrole göre N grubunun H_2O_2 içeriği de %24.5 artmıştır. Ancak 6BN ve 10BN gruplarının H_2O_2 içerikleri kontrole göre sırasıyla %56.3 ve %36.3 oranlarında azalmıştır. (Şekil 3.22, Şekil 3.23)



Şekil 3.22 C, 6B, 10B gruplarının zamana bağlı H_2O_2 içerikleri.



Şekil 3.23 N, 6BN, 10BN gruplarının zamana bağlı H₂O₂ içerikleri.

3.2.3. Lipit Peroksidasyonu (TBARS miktarı)

Şişirme: 10 µM BRs (10B), 200 mM NaCl (N) ve 6 µM BRs uygulanan tuz gruplarının (6BN) TBARS içerikleri kontrol grubuna göre değişmemiştir. 6B uygulamasında TBARS miktarı kontrole göre %4.2 oranında artmıştır. 10BN uygulamasında ise kontrole göre TBARS içeriğinde %12 azalma belirlenmiştir.

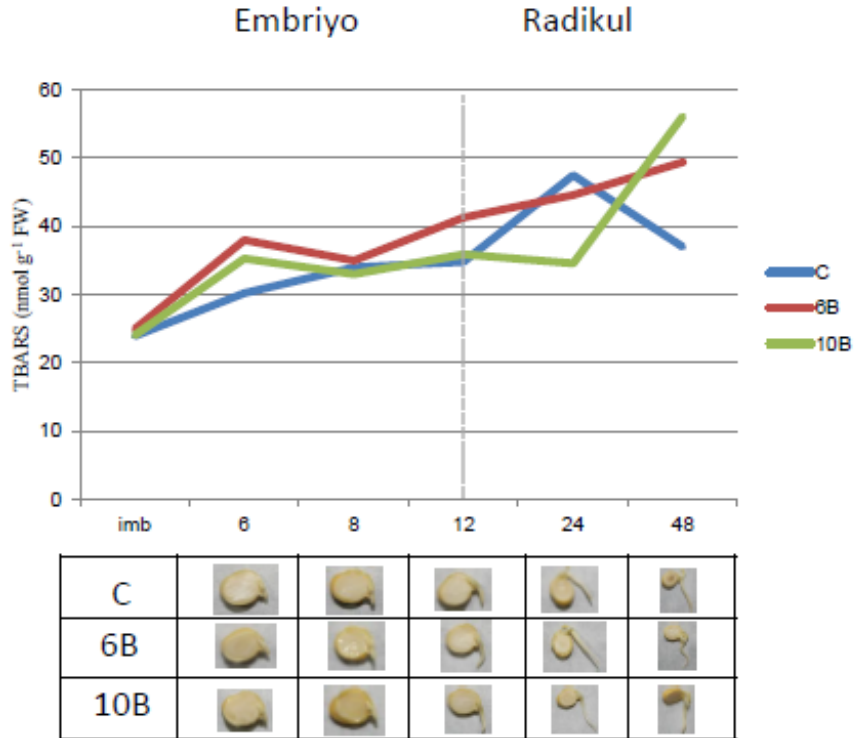
6. saat: Uygulamanın 6. saatinde 6B ve 10B grubunun TBARS içeriği kontrole göre sırasıyla %25 ve %16.7 artmıştır. Sadece tuz stresi uygulaması TBARS miktarında herhangi bir değişime neden olmamıştır. Ancak aynı koşullar altında 6B ve 10B uygulaması TBARS içeriğinde %21.7 ve %14.6 azalmaya neden olmuştur.

8. saat: 8. saatte 6B grubunun TBARS içeriği kontrole göre %2.9 artmasına rağmen, 10B grubunda %2.94 azalmıştır. NaCl uygulaması (N) TBARS miktarını kontrol grubuna göre %30.29 azaltmıştır. 6BN ve 10BN gruplarının TBARS içerikleri ise kontrole göre sırasıyla %35.29 oranında ve %30.8 oranında azalmıştır.

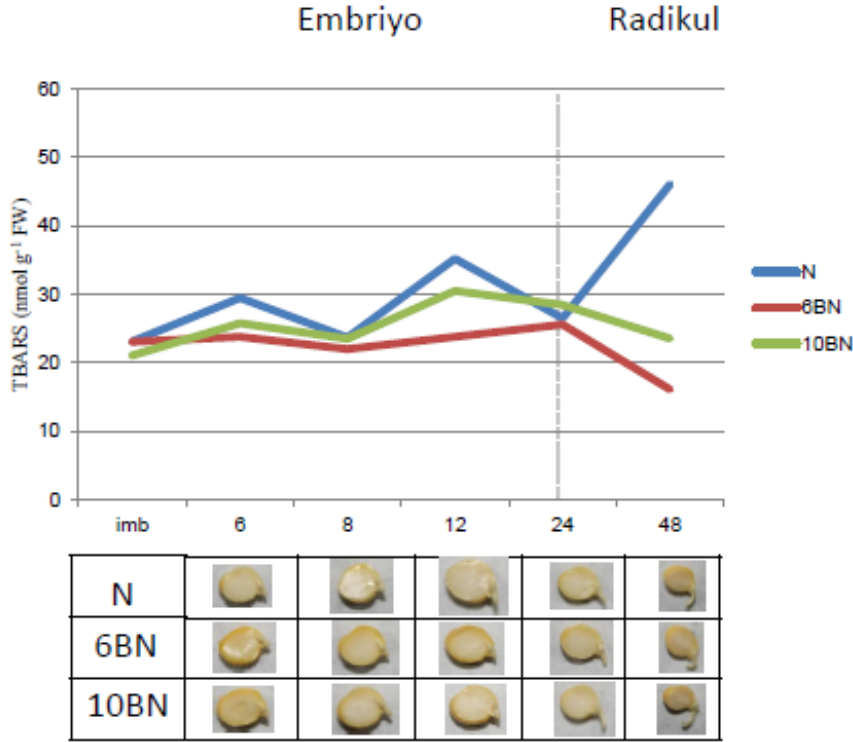
12. saat: Uygulamanın 12. saatinde, 6B (%18.6) ve 10 B (%3.16) gruplarının TBARS içeriklerinin kontrole göre arttığı belirlenmiştir. N uygulaması ile embriyoların TBARS içeriği kontrole göre %1.14 artarken, 6BN grubunda %31.6 oranında azalmıştır. 10BN grubunda ise TBARS miktarı kontrollere göre %12.36 azalmıştır.

24. saat: 6B ve 10B grubunda TBARS miktarı kontrol göre %6.11 ve %27.16 azalmıştır. Aynı şekilde tuz uygulanan tüm gruplarda TBARS içeriği uygulamanın 24. saatinde azalmıştır. N grubunda TBARS içeriği kontrole göre %44.22, 6BN grubunda %46.11, ve 10BN grubunda %40.11 oranlarında azalmıştır.

48. saat: 48. saatte TBARS miktarları karşılaştırıldığında 6B grubunun kontrole göre TBARS içeriğinin %33.57, 10B grubunun TBARS miktarının ise %51.63 arttığı belirlenmiştir. N grubunun TBARS içeriği ise kontrole göre %24.54 artmıştır. 6BN ve 10BN grubunun TBARS içeriği kontrole göre %56.3 ve %36.36 azalmıştır. (Şekil 3.24, Şekil 3.25)



Şekil 3.24 C, 6B, 10B gruplarının zamana bağlı TBARS içerikleri.



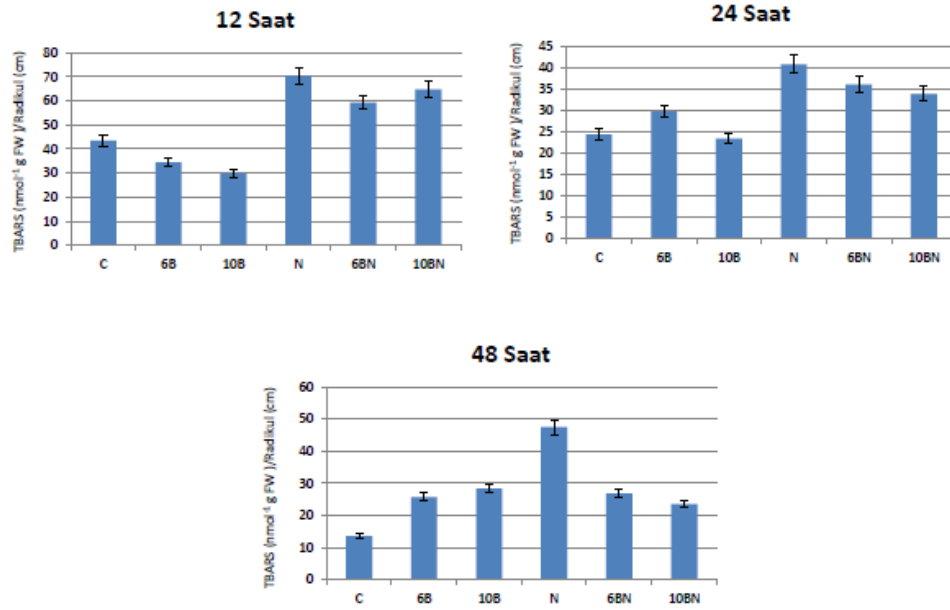
Şekil 3.25 N, 6BN, 10BN gruplarının zamana bağlı TBARS içerikleri.

3.2.3.1 Radikul uzunluklarına bağlı TBARS içerikleri

12. Saat: Kontrol şartları altında 6B ve 10B uygulaması, TBARS miktarının %21 ve %32 azalmasına neden olmuştur. Tuz stresi uygulamasıyla TBARS içeriği tüm gruplarda artmıştır. Sadece tuz stresi uygulanmış gruplarda TBARS içeriği kontrole göre %61 artmıştır. Stres altında 6 μ M ve 10 μ M BRs uygulaması TBARS içeriğindeki bu artışı sırasıyla %15.23 ve %7.82 oranında engellemiştir.

24. Saat: Uygulamanın 24. saatinde kontrole göre 6B grubunun TBARS içeriği %21 artarken 10B grubunun %5 azalmıştır. Tuz stresi TBARS miktarında %67 artışa sebep olurken 6BN ve 10BN uygulaması sırasıyla sadece %47 ve %38 oranında artışa neden olmuştur.

48. Saat: Uygulamanın 48. saatinde tüm grupların TBARS içeriği kontrol grubuna göre artmıştır. Sadece tuz stresi TBARS içeriğinde %251 oranında artışa neden olmuştur. 6B ve 10B uygulaması bu artışı sırasıyla %43.37 ve %50.45 oranında engellemiştir.



Şekil 3.26 12, 24, 48. saatlerdeki radikal uzunluğuna bağlı olarak C, 6B, 10B, N, 6BN, 10BN gruplarının TBARS içerikleri (p<0,05)

4. TARTIŞMA

Tohum çimlenmesi, su alınımlı sonucu artan hücre bölünmelerinin ardından radikülün ortaya çıkmasıyla başlar (Bewley, 1997). Ancak bu süreçte tohumun su alarak hızlıca şişmesi, zar yapısında belirgin bir değişime neden olurken, bu değişim şişmeye bağlı bazı hasarlara da neden olmaktadır (Neya et al., 2004). Tohumlarda ROS üretiminin ana kaynağı, fotosentetik aktivite henüz gerçekleşmediğinden, solunumdur. Aşırı ROS üretimi, nükleik asitlerin oksidasyonuna ve depolimerizasyonuna, peptit bağlarının kırılmasına ve membran lipidlerinin polisakaritlerinin ve doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna neden olduğundan dolayı hücre fonksiyon kaybına, hücre ölümüne ve tohum ölümüne neden olmaktadır (Bewley, 1997). Tüm bunların aksine, ROS' ların düşük miktarları hücre uzaması için gerekli olan hücre duvar gevşemesini kolaylaştırması nedeniyle büyüme için hayati bir rol oynar (Passardi et al., 2004).

Tohumda aşırı ROS üretimine neden olup tohum çimlenmesini ve verimini azaltan bir diğer faktör tuz, kuraklık gibi çevresel streslerdir (Kranter et al., 2010). Son yıllarda tohum çimlenmesi boyunca hücrelerarası ROS üretimi birçok çalışmanın (Schopfer et al., 2001) konusunu oluşturmuştur. Ancak ROS üretiminin kontrollü ya da stres koşulları altındaki tohum çimlenmesi ve erken fide gelişimini nasıl etkilediği konusunda hala çok az şey bilinmektedir (Kranter et al., 2010). Oysa ki tuz stresi altındaki tohum çimlenmesinin iyi anlaşılması, tuzlu alanlarda tarımsal üretimin gerçekleştirilebilmesi için çok önemlidir. Son yıllarda, çeşitli araştırmalarda, çimlenme sırasında hormon metabolik yolları ve çevresel sinyaller arasındaki etkileşimin belirlenmesinin de çimlenmenin başarılı olmasında oldukça etkili ve önemli olacağı rapor edilmiştir (Yamauchi et al., 2004; Oh et al., 2006; Matakıadis et al., 2009). Bu nedenle çalışmamızda (i) tuz stresinin nohut tohumlarının çimlenmesini nasıl etkilediği (ii) stresin tohum embriyolarındaki ROS düzenlenmesini ve bu ROS ların süpürülmesinden sorumlu bazı antioksidan enzimlerin aktivitelerini nasıl etkilediği (iii) tuz stresine maruz bırakılan tohum embriyolarına dışarıdan BRs uygulamasıyla ROS düzenlenmesinin ve antioksidan savunma sisteminin nasıl değiştiği (iv) radikül uzama sürecinde BRs ve ROS düzenlenmesi arasındaki ilişkinin nasıl olduğu araştırılmıştır.

Çalışmamızda tuz stresi, nohut tohumlarının çimlenmesinde inhibisyona neden olmuştur. Kontrol gruplarında ilk çimlenme uygulamanın 12. saatinde gözlenirken, tuz stresi altında ise tohumların çimlenmesi 24. saatte gerçekleşmiştir. Bir başka deyişle, 200 mM NaCl çimlenmeyi 12 saat geciktirmiştir. Bir bitki hormonu olan BRs' nin çimlenme üzerine olumlu etkileri bir çok çalışmada gösterilmiştir (Anuradha and Rao, 2001; Zhang et al. 2007). Çalışmamızda da, literatürle benzer olarak BRs uygulamasının tuz stresi altındaki tohumlarda çimlenmeyi iyileştirici yöndeki etkisi bulunmuştur. Uygulamanın 48. saatinde sadece tuz uygulanan tohumların çimlenmesi %40' ın altındayken, BRs uygulaması ile bu oran %50' nin üzerine çıkmıştır. Çalışmamızdaki bulgularla paralel olarak; Anuradha and Rao (2001) da çeltik tohumlarında 150 mM NaCl ve 3 µM BRs uygulamasının 24. saatinde sadece tuz uygulanan grupta hiç çimlenme gözlemezken tuz+ BRs uygulanan grupta %40 oranında çimlenme gözlediklerini rapor etmişlerdir. Aynı çalışmada, uygulamanın 36. saatinde ise sadece tuz

uygulanan grupta çimlenme % 41.6 oranındayken tuz+ BRs uygulanan grupta çimlenmenin %78.3 olduğu belirlenmiştir. Diğer bir çalışmada ise , *Medicago sativa* tohumlarına uygulanan 5 µM BRs' nin tuz stresinin çimlenme üzerindeki etkisini hafiflettiği ortaya konmuştur (Zhang et al., 2007). Ozmotik stres ve BRs uygulamasının sorgum (CSH-14) tohumlarının çimlenmesi üzerine yapılan başka bir çalışmada ise BRs uygulamasının ozmotik stresin çimlenme üzerindeki negatif etkisini azalttığı rapor edilmiştir (Vardhini and Rao 2003).

Bitki hücrelerinde H₂O₂ birikiminin iki türlü etkisi vardır; birincisi hücreye zarar veren oksitleyici olarak davranması ve Fenton reaksiyonuna yol açarak OH⁻ radikali üretmesidir, ikincisi ise ikincil mesajcı olarak gen ifadesini uyarmasıdır (Miller et al., 2010). Kranner et al.' un (2010) bezelye tohumlarının çimlenmesi üzerine yaptıkları araştırmada tohumların su almaya başladığı ilk 30 dak. içinde hücre içindeki H₂O₂ miktarında belirgin bir artış meydana gelmiştir. Bu artış, solunum süresince elektron taşıma zincirinden moleküler oksijene elektron kaçıışı ile ilişkilidir. Çalışmamızda tohumların ilk defa su aldıkları 24 saatlik şişirme döneminde farklı uygulamalara maruz bırakıldıklarında H₂O₂ miktarlarının yaklaşık aynı olduğu bulunmuştur. Bu durum, tuz stresi ya da BRs uygulamasının tohum içindeki ilk oksidatif patlamada rol oynamadığını göstermektedir.

Şişirme dönemi sonrasında, kontrol ve sadece BRs uygulanan grupların H₂O₂ konsantrasyonu, çimlenme gerçekleşinceye kadar (12 saat) sürekli artış göstermiştir. Çimlenmeden gerçekleştikten sonra ise 24. saatte bu gruplarda H₂O₂ konsantrasyonunda artış durmuştur. Bu durum H₂O₂ ve O₂⁻ radikalinin hücre içindeki düşük miktarının hücre uzaması için gerekli olan hücre duvar gevşemesini kolaylaştırarak hücre büyümesindeki artışı sağlamasıyla ilişkilendirilebilir. Kontrol gruplarıyla karşılaştırıldıklarında tuz stresi uygulanan diğer gruplarda çimlenmenin gecikmesinin, bu radikallerin miktarındaki aşırı artış nedeniyle olabileceği düşünülmektedir. Sadece tuz stresi uygulanan gruba göre 6BN ve 10BN gruplarında gözlenen çimlenme yüzdesindeki iyileşme özellikle 6 ve 12. saatlerde artan H₂O₂ süpürücüleri olan CAT ve POX enzim aktivitesi ile ilgili olabilir.

NADPH oksidazlar (NOX) hücre zarında bulunan bitki büyümesi, gelişimi ve biyotik ve abiyotik streslere karşı bitki cevaplarının oluşmasında görev

almaktadır. NOX' lar NADPH' ı kullanarak O_2^- radikalini üreten enzimlerdir. Radikül uzaması ve hücre büyümesi sırasında ilk olarak hücre duvarının gevşetilmesi gerekmektedir. Bu işlem ekspanzinler ve endoglikanazlar gibi enzimler tarafından yapılabilir de, H_2O_2 , O_2^- , OH^- gibi ROS' larda hücre duvarının gevşetilmesi görevini üstlenebilmektedir (Müller et al., 2009). Çalışmamızda, çimlenmenin tamamlanmasından itibaren (kontrol koşulları için 12 saat, tuz koşulları için 24 saat) NOX aktivitesinde önemli bir artış gözlenmiştir. Bu artışın radikülün uzaması sırasında gerçekleşmesi, nohut tohumlarında NOX aktivitesi sonucu üretilen ROS' un hücre duvarının gevşemesinde oynadığı rol ile ilişkilendirilebilir. Çalışmamızda, kontrol koşullarında ve 6B- 10B uygulama gruplarında NOX aktivitesi, ölçülen H_2O_2 konsantrasyonları ile paralellik göstermektedir. NOX' un radikül uzamasındaki önemini vurgulayacak nitelikte bir başka çalışmada ise, *Lepidium sativum* tohumlarında radikül uzaması sırasında bir NOX inhibitörü olan DPI uygulaması sonrası, ROS üretiminin %38.9 oranında azaldığı bulunmuştur (Müller et al., 2009).

SOD, oksidatif strese karşı bitkilerin oluşturduğu savunma sisteminde önemli bir yere sahiptir (Giannopolities and Ries, 1977). Strese karşı bu enzimin aktivitesinin artış göstermesi bitki savunmasındaki önemini göstermektedir (Ashraf and Ali, 2008). Ancak, Cavalcanti et al., (2004) börülce (cowpea)' de SOD aktivitesindeki artışın tuz toleransının sağlanması için gerekli olmadığını kanıtlamıştır. *Medicago sativa* tohumlarına uygulanan 5 μ M BRs' nin 150 mM NaCl stresi altında SOD aktivitesini arttırdığı gözlenmiştir (Zhang et al., 2007). Bizim çalışmamızda ise, 6B ve 10B uygulanan tohumlar ile kontrol grubu tohumlarının su alıp şişmelerinden hemen sonra 8. saate kadar SOD aktivitesinde çok yüksek bir artış gözlenmiştir. Çimlenmenin tamamlandığı 12. saatte ise SOD aktivitesinde azalma gözlenirken, 24. saat ile 48. saat arasında radiküllerin SOD aktivitesinde ise yükselme gözlenmiştir. Bu sonuçlar, SOD' un substratını üreten NOX aktivitesi ile karşılaştırıldığında, çimlenme gerçekleşinceye kadar NOX aktivitesinin de SOD aktivitesi gibi arttığı anlaşılmaktadır. Çimlenmenin tamamlanmasının hemen ardından radiküllerde solunum nedeniyle ROS üretiminin arttığı bilinmektedir (Bailly, 2004). 24-48. saatte NOX aktivitesi azalsa da, radiküllerde solunum faaliyetindeki artış ROS' ların üretimini tetiklemiş ve buna bağlı olarak SOD aktivitesinde artış gözlemlendiği düşünülmektedir. Otegui et

al., (2002)'da Arabidopsis'de çimlenmenin ilk evrelerinde mitokondriyal MnSOD aktivitesinin arttığı görülmektedir. MnSOD aktivitesinin çimlenmenin ilk evrelerinde artması mitokondrideki solunum reaksiyonları ile ilgili olabilmektedir. Çalışmamızda materyal olarak kullandığımız dokularda fotosentez aktivitesi gözlenmemesine rağmen, tüm uygulama gruplarında kloroplastlarda lokalize olan FeSOD izozimi tanımlanmıştır. Benzer şekilde Libik et al. (2005) ve Bagnoli et al. 'da (1998) iceplant ve at kestanesi embriyolarında FeSOD izozimini tanımlamıştır.

Uygulanan BRs konsantrasyonlarının tohum çimlenmesi ve radikul büyümesi sırasındaki toplam SOD ve MnSOD ve FeSOD izozim aktiviteleri üzerine etkisi incelendiğinde belirgin bir farklılığa rastlanmamıştır. Total SOD ve izozim aktivitelerindeki artış ya da azalışların uygulanan BRs konsantrasyonundan ziyade daha çok embriyo ve radikulun fizyolojik gelişimiyle ilgili olduğu düşünülmektedir.

POX, kloroplastlar ve sitozolde H_2O_2 'nin önemli bir kısmının süpürülmesinden sorumludur. Bu görevleri dışında, bitkilerin büyüme, gelişme, lignifikasyon ve süberizasyon gibi süreçlerinde de önemli rollere sahiptirler (Asada and Takahasi, 1987). POX enzimi, CAT enzimi gibi SOD tarafından üretilen H_2O_2 'nin süpürülmesinden sorumludur. Çalışmamızda POX enzim aktivitesinin çimlenme sonrası ortaya çıktığı gözlenmiştir. Tohumda önemli bir görevi olan hücre duvarına bağlı POX enzimi ile beraber hem kontrol koşullarında (12. saat) hem de tuz uygulanan gruplarda (24. saat) POX aktivitesi çimlenmeden sonra gözle görülür seviyede artmıştır. Diğer ROS süpürücü enzimlerin aktivitelerinde artış gözlenmemesine rağmen sadece POX aktivitesininin artması radikulda H_2O_2 süpürülmesinden sorumlu enzimin POX olduğunu işaret etmektedir. *Medicago sativa* tohumlarına uygulanan 5 μ M BRs' nin 150 mM NaCl stresi altında POX aktivitesini arttırdığı gözlenmiştir (Zhang et al., 2007).

Uygulamanın 6. saatinde kontrol gruplarının (C, 6B, 10B) POX aktivitesinin tuzlu gruplara göre daha fazla olması, şişirme dönemi sonrasındaki ilk oksidatif patlamanın sonucu olarak ortaya çıkan H_2O_2 miktarındaki artışı daha çok engellediğini göstermektedir. H_2O_2 in hücre içinde sınırlı miktarda tutulmasını sağlayan bu durum kontrol gruplarındaki erken çimlenmeyi de açıklayabilir.

CAT enzimi stresin yol açtığı oksidatif stres ile mücadelede önemli bir yere sahiptir. CAT enzimi peroksizomlarda lokalize olur. H_2O_2 'nin H_2O 'ya dönüşümünden sorumludur. Kontrol koşullarında CAT aktivitesi POX gibi çimlenmeden sonra radikulda artış göstermiştir. Tuz uygulanan gruplarda ise tohumun su alıp şişmeye başlamasından hemen sonra CAT aktivitesinde artışlar gözlenmiştir. CAT ve SOD aktiviteleri Bagnoli et al. 'un (1998) kestane embriyoları üzerinde yaptıkları çalışmada tohum çimlenmesi ve gelişiminin ilk evrelerinde artış göstermiştir ve çalışmamızla uyumlu bir sonuç göstermektedir.

Şişirme döneminde ve stres-hormon uygulamasının 6. ve 8. saatlerinde NaCl uygulanmış tüm tohumların embriyolarında ölçülen TBARS miktarı, kontrol gruplarına göre daha düşük seviyededir. Bu durum stres altındaki tohumlarda gerçekleşen metabolik faaliyetlerin daha az olması buna bağlı olarakta şekil 3.22 ve 3.23 de da görüldüğü gibi oluşan H_2O_2 ve ya diğer ROS'ların azlığı ile açıklanabilir. Denemenin 12., 24. ve 48. saatlerinde radikulların zarlarında meydana gelen peroksidasyon oranları karşılaştırıldığında tuz gruplarının TBARS içeriklerinin BRs uygulaması yapılan gruplardan daha fazla olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlar McCord (2000) ve Jain et al. (2001) çalışmasında da belirtildiği gibi brassinosteroidin tohumun tuzlu koşullarda aktif oksijen türleri ile başa çıkmasında önemli rol oynadığını göstermektedir.

5. SONUÇ

Çalışmamızda;

(i) tuz stresinin nohut tohumlarının çimlenmesi üzerine etkisi,

(ii) stres altında tohum embriyolarındaki ROS düzenlenmesini ve bu ROS ların süpürülmesinden sorumlu bazı antioksidan enzimlerin aktivitelerini nasıl etkilediği,

(iii) tuz stresine maruz bırakılan tohum embriyolarına dışarıdan BRs uygulamasıyla ROS düzenlenmesinin ve antioksidan savunma sisteminin nasıl değiştiği,

(iv) radikul uzama sürecinde BRs ve ROS düzenlenmesi arasındaki ilişkinin nasıl olduğu belirlenmiştir.

Buna göre;

1. Tuz stresinin (200 mM NaCl) tohum çimlenmesinde inhibisyona (%64) neden olduğu, dışarıdan BRs (6 -10 μ M) uygulamasıyla tuz stresine maruz bırakılan nohut tohumlarının çimlenmesinde %20-24 iyileşme sağladığı gözlenmiştir.
2. Şişirme sonrasındaki ilk oksidatif patlamada ortaya çıkan H_2O_2 miktarı üzerinde tuz stresi ya da BRs uygulamasının etkili olmadığı belirlenmiştir.
3. Kontrol koşulları altındaki tüm uygulama gruplarında çimlenme gerçekleşinceye kadar H_2O_2 ' in sınırlı artışı tuz gruplarına göre çimlenmenin 12 saat daha erken olmasını sağlamıştır .
4. Tuz stresi altında BRs uygulamasının tohum çimlenme zamanı üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı bulunmuştur.
5. Tüm gruplarda çimlenmenin tamamlanmasından sonra gözlenen NOX aktivitesi sonucu $O_2^{\cdot -}$ radikal miktarındaki artış radikul uzamasıyla paralellik göstermektedir. Tuz stresi koşullarında NOX aracılı-radikul uzaması üzerine BRs' nin etkisi ilk 12 saatte gözlenmiştir.
6. Tüm uygulama gruplarının total SOD ve izozim aktivitelerindeki artış ya da azalışların uygulanan BRs konsantasyonundan ziyade daha çok embriyo ve radikulun fizyolojik gelişimiyle ilgili olduğu düşünülmektedir.
7. Kontrol gruplarında H_2O_2 ' in hücre içinde sınırlı miktarda tutulmasına bağlı olarak gözlenen erken çimlenme POX (çözünebilir ve hücre duvarına bağlı) aktivitesindeki artışla açıklanabilir. Ayrıca dışarıdan BRs uygulaması, tuz stresi altında çimlenme verimini arttırmıştır. Bu durum POX aktivitesindeki artışla açıklanabilir.
8. Şişirme döneminde ve stres-hormon uygulamasının 6. ve 8. saatlerinde NaCl uygulanmış tüm tohumların embriyolarındaki TBARS miktarı, kontrol gruplarına göre daha düşük seviyededir. Bu durum stres altındaki tohumlarda gerçekleşen metabolik faaliyetlerin daha az olması ile açıklanabilir.

9. Denemenin 12., 24. ve 48. saatlerinde tuz gruplarındaki membran hasarının BRs uygulaması yapılan gruplardan daha fazla olduğu bulunmuştur.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Anuradha, S. and Rao, S.S.R.**, 2003, Application of brassinosteroids to rice seeds (*Oryza sativa* L .) reduced the impact of salt stress on growth , prevented photosynthetic pigment loss and increased nitrate reductase activity, *Plant growth regulation*, 40:29–32p.
- Apel, K., and Heribert, H.**, 2004, Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction, *Annual review of plant biology*, 55:373-99p.
- Arteca, R.N., Tsai, D.-S., Schlagnhauser, C. and Mandava, N.B.**, 1983, The effect of brassinosteroid on auxin-induced ethylene production by etiolated mung bean segments, *Physiol. Plant.*, 59:539–544p.
- Asada, K. and Takahashi, M.**, 1987, Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. In: Kyle, D.J. (Ed.), PHOTOINHIBITION, Elsevier, Amsterdam/North Holland , 227–287p.
- Asada, K.**, 2006, Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions, *Plant physiology*, 141:391-6p.
- Ashraf, M. and Ali, Q.**, 2008, Relative membrane permeability and activities of some antioxidant enzymes as the key determinants of salt tolerance in canola (*Brassica napus* L.), *Environ. Exp. Bot.*, 63:266-273p.
- Bagnoli, F., Capuana, M. and Racchi, M.L.**, 1998, Developmental changes of catalase and superoxide dismutase isoenzymes in zygotic and somatic embryos of horse chestnut. *Australian Journal of Plant Physiology* 25, 909–913p.
- Bailly, C.**, 2004, Active oxygen species and antioxidants in seed biology, *Seed Science Research*, 14(2):93–107p.
- Bailly, C., Bogatek-Leszczynska, R., Côme, D. and Corbineau, F.**, 2002, Changes in activities of antioxidant enzymes and lipoxygenase during growth of sunflower seedlings from seeds of different vigour. *Seed Science Research* 12, 47–55p.
- Bailly, C., El-Maarouf-Bouteau, H. and Corbineau, F.**, 2008, From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology, *Comptes rendus biologies*, 331(10):806–14p.
- Bailly, C., El-Maarouf-Bouteau, H., Corbineau, F.** ,2008, From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. *Comptes Rendus Biologies*, 331: 806–814p.
- Bailly, C., Leymarie, J., Lehner, A., Rousseau, S., Côme, D. and Corbineau, F.**, 2004, Catalase activity and expression in developing sunflower seeds as related to drying. *Journal of Experimental Botany* 55, 475–483p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bajguz, A. and Hayat, S.**, 2009, Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses, *Plant physiology and biochemistry : PPB / Société française de physiologie végétale*, 47(1):1–8p.
- Bewley J.D.**, 1997, Breaking down the walls – a role for endo-mannanase in release from seed dormancy?, *Trends in Plant Science*, 2:464–469p.
- Bewley, J.D. and Black, M.**, 1994, Seeds. PHYSIOLOGY OF DEVELOPMENT AND GERMINATION (2nd edition). New York, Plenum Press.
- Cavalcanti, F.R., Oliveira, J.T.A., Martins-Miranda, A.S., Viegas, R.A. and Silveria, J.A.G.**, 2004, Superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities do not confer protection against oxidative damage in salt stressed cowpea leaves, *New Phytol.*, 163:563-571p.
- Cheeseman, J.M.**, 2006, Hydrogen peroxide concentrations in leaves under natural conditions, *Journal of experimental botany*, 57(10): 2435–44p.
- Choi, Y.H., Fujioka, S., Nomura, T., Harada, A., Yokota, T., Takatsuto, S., Sakurai, A.**, 1997, An alternative brassinolide biosynthetic pathway via late C6-oxidation. *Phytochemistry*, 44: 609-61 3p.
- Davidson, J.F. and Schiestl R.H.**, 2001, Mitochondrial Respiratory Electron Carriers Are Involved in Oxidative Stress during Heat Stress in *Saccharomyces cerevisiae*, *Society 21*, 8483-8489p.
- De Tullio, M.C., Arrigoni, O.**, 2003, The ascorbic acid system in seeds: to protect and to serve. *Seed Science Research*, 13:249–260p.
- Dietz, K., Simone, J., Oelze, M., Laxa, M., Tognetti, V., de Miranda, S.M.N., Baier, M. and Finkemeier, I.**, 2006, The function of peroxiredoxins in plant organelle redox metabolism, *Journal of experimental botany*, 57:1697-709p.
- Flowers, T.J., Yeo, A.R.**, 1992, SOLUTE TRANSPORT IN PLANTS. Blackie Academic & Professional, Glasgow, Birleşik Krallık.
- Fujioka, S., Noguchi, T., Watanabe, T., Takatsuto, S., Yoshida, S.**, 2000, Biosynthesis of brassinosteroids in cultured cells of *Catharanthus roseus*. *Phytochemistry*, 53 (5): 549-553p.
- Fujita, M., Fujita, Y., Noutoshi, Y., Takahashi, F., Narusaka, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K.**, 2006, Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks, *Curr. Opin. Plant Biol.*, 9:436–442p.
- Giannopolities, C.N. and Ries, S.K.**, 1977, Superoxide dismutase. Part I: occurrence in higher plants, *Plant Physiol.*, 59:309–314p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gidrol, X., Lin, W.S., Degousee, N., Yip, S.F. and Kush, A.,** 1994, Accumulation of reactive oxygen species and oxidation of cytokinin in germinating soybean seeds. *European Journal of Biochemistry* 224, 21–28p.
- Glenn, E.P., Brown, J.J., Blumwald, E.,** 1999, Salt tolerance and crop potential of halophytes. *Critical Reviews in Plant Science*, 18:227–255p.
- Grove, M.D., Spencer, G.F., Rohwedder, W.K., Mandava, N., Worley, J.F., Jr., J.D.W., Steffens, G.L., Flippen-Anderson, J.L., and Carter Cook, J.,** 1979, Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen, *Nature*, 281:216– 217p.
- Halliwell, B., Gutteridge JMC.,** 2006, FREE RADICALS IN BIOLOGY AND MEDICINE, 4th ed. Oxford: Clarendon Press;.
- Hayat, S., Ali, B., Hasan, S.A. and Ahmad, A.,** 2007, Brassinosteroid enhanced the level of antioxidants under cadmium stress in *Brassica juncea*, *Environ. Exp. Bot.*, 60:33–41p.
- Hite, D.R.C., Auh, C. and Scandalios, J.G.,** 1999, Catalase activity and hydrogen peroxide levels are inversely correlated in maize scutella during seed germination. *Redox Reports* 4, 29–34p.
- Hourmant, A. and Pradet, A.,** 1981, Oxidative phosphorylation in germinating lettuce seeds (*Lactuca sativa*) during the first hours of imbibition, *Plant Physiol.*, 68:631–635.
- Huang, A.H.C., Trelease, R.N. and Moore, T.S.,** 1983, PLANT PEROXISOMES. London, Academic Press.
- Jain, M., Mathur, G., Koul, S., Sarin, N.B.,** 2001, Ameliorative effects of proline on salt stress-induced lipid peroxidation in cell lines of groundnut (*Arachis hypogea* L.). *Plant Cell Reporter*, 20: 463–468.
- Jiang, M. and Zhang, J.,** 2002, Involvement of plasma membrane NADPH oxidase in abscisic acid-and water stress-induced antioxidant defense in leaves of maize seedlings, *Planta*, 215:1022-1030p.
- Katsumi M.,** 1991, **Physiological modes of brassinolide action in cucumber hypocotyls growth. In: Cutler H.G., Yokota T. And Adam G. (eds), BRASSINOSTEROIDS – CHEMISTRY, BIOACTIVITY AND APPLICATION. ACS Symp. Ser. 474, American Chemical Society, Washington, Amerika Birleşik Devletleri.**
- Kobayashi, M., Ohura, I., Kawakita, K., Yokota, N., Fujiwara, M., Shimamoto, K., Doke, N., Yoshioka, H.,** 2007, Calcium-dependent protein kinases regulate the production of reactive oxygen species by potato NADPH oxidase. *Plant Cell*, 19: 1065–1080p.
- Koornneef, M., van der Veen, J.H.,** 1980, Induction and analysis of gibberellin sensitive mutants in *Arabidopsis thaliana* (L.), *Heynh, Theor. Appl. Genet.*, 58:257–263p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kranner, I., Roach, T., Beckett, R.P., Whitaker, C. and Minibayeva, F.V.**, 2010, Extracellular production of reactive oxygen species during seed germination and early seedling growth in *Pisum sativum*. *Journal of plant physiology*, 167(10):805–11p.
- Kwak, J.M., Mori, I.C., Pei, Z.M., Leonhardt, N., Torres, M.A., Dangel, J.L., Bloom, R.E., Bodde, S., Jones, J.D.G. and Schroeder, J.I.**, 2003, NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF genes function in ROS-dependent ABA signalling in *Arabidopsis*, *EMBO J.*, 22:2623-2633p.
- Lee, S., Cheng, H., King, K.E., Wang, W., He, Y., Hussain, A., Lo, J., Harberd, N.P. and Peng, J.**, 2002, Gibberellin regulates *Arabidopsis* seed germination via RGL2, a GAI/RGA-like gene whose expression is up-regulated following imbibition, *Genes Dev.*, 16:646–658p.
- Leone, A., Melillo, M.T., Bleve-Zacheo, T.**, 2001, Lipoxygenase in pea roots subjected to biotic stress. *Plant Science*;161:703–17p.
- Li, L., van Staden, J. and Jager, A.K.**, 1998, Effects of plant growth regulators on the antioxidant system in seedlings of two maize cultivars subjected to water stress, *Plant Growth Regul.*, 25:81–87p.
- Libik, M., Konieczny, R., Pater, B., Ślesak, I., Miszalski, Z.**, 2005, Differences in the activities of some antioxidant enzymes and in H₂O₂ content during rhizogenesis and somatic embryogenesis in callus cultures of the ice plant. *Plant Cell Reports*
- Lopez-Huertas, E., Corpas, F.J., Sandalio, L.M., del Rio, L.A.**, 1999, Characterization of membrane polypeptides from pea leaf peroxisomes involved in superoxide radical generation. *Biochemistry Journal*;337:531–6p.
- Manchenko, G.P.**, 2002, HANDBOOK OF DETECTION OF ENZYMES ON ELECTROPHORETIC GELS, 2nd ed. Boca Raton: CRC Press;.
- Matakiadis, T., Alboresi, A., Jikumaru, Y., Tatematsu, K., Pichon, O., Renou, J.-P., Kamiya, Y., Nambara, E. and Truong, H.-N.**, 2009, The *Arabidopsis* abscisic acid catabolic gene CYP707A2 plays a key role in nitrate control of seed dormancy, *Plant Physiol.*, 149:949–960p.
- Mayumi, K., Shibaoka, H.**, 1995, A possible double role for brassinolide in the reorientation of cortical microtubules in the epidermal cells of azuki bean epicotyls. *Plant Cell Physiology*, 36: 173–181p.
- Mazorra, L.M., Nunez, M., Hechavarria, M., Coll, F. and Sanchez-Blanco, M.J.**, 2002, Influence of brassinosteroids on antioxidant enzymes activity in tomato under different temperatures, *Biol. Plant.*, 45:593–596p.
- McCord, J.M.**, 2000, The evolution of free radicals and oxidative stress. *American Journal Medicine*, 108: 652–659p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Miller, G., Nobuhiro, S., Ciftci-Yilmaz, S. and Mittler R.**, 2009, Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses, *Plant, Cell and Environment*, 1-15p.
- Miller, G., Shulaev, V. and Mittler, R.**, 2008, Reactive oxygen signaling and abiotic stress, *Physiologia plantarum*, 133(3), 481–9p.
- Miller, G., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S. and Mittler, R.**, 2010, Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant, cell & environment*, 33(4):453–67p.
- Minibayeva, FV., Kolesnikov, O., Chasov, A., Beckett, RP., L , Buck., F, BMuthje., S, Vylegzhantina ., N, Mottger.,** 2009, Wound induced apoplastic peroxidase activities: their roles in the production and detoxification of reactive oxygen species. *Plant Cell and Enviroment*;32:497–508p.
- Mitchell, J.W., Mandava, N., Worley, J.F., Plimmer, J.R., and Smith, M.V.**, 1970, Brassins: A new family of plant hormones from rape pollen, *Nature*, 225:1065–1066p.
- Mitchum, M.G., Yamaguchi, S., Hanada, A., Kuwahara, A., Yoshioka, Y., Kato, T., Tabata, S., Kamiya, Y., Sun, T.P.**, 2006, Distinct and overlapping roles of two gibberellin 3-oxidases in Arabidopsis development, *Plant J.*, 45:804–818p.
- Mittler, R.**, 2002, Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance, *Trends in plant science*, 7:405-10p.
- Mittler, R.**, 2006, Abiotic stress, the field environment and stress combination, *Trends in plant science*, 11(1):15–9p.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M. and Van Breusegem, F.**, 2004, Reactive oxygen gene network of plants, *Trends in plant science*, 9(10):490–8p.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G., Tognetti, V. B., Vandepoele, K., Gollery, M., Shulaev, V. and Van Breusegem, F.**, 2011, ROS signaling: the new wave? *Trends in plant science*, 16(6):300–9p.
- Moller, I.M.**, 2001, Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species, *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52:561–591p.
- Moller, I.M., Jensen, P.E. and Hansson, A.**, 2007, Oxidative modifications to cellular components in plants, *Annual Review of Plant Biology*, 58:459–481p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Muller, K., Linkies, A., Vreeburg, RA., Fry, SC., Krieger-Liszkay, A., Leubner-Metzger, G.,** 2009, In vivo cell wall loosening by hydroxyl radicals during cress seed germination and elongation growth. *Plant Physiology*;150:1855–65p.
- Neill, S.J., Desikan, R. and Hancock, J.T.** ,2003, Nitric oxide signalling in plants. *New Phytologist* 159, 11–35p.
- Neya, O., Golovina, E.A., Nijse, J., Hoekstra, F.A.,** 2004, Ageing increases the sensitivity of neem (*Azadirachta indica*) seeds to imbibitional stress. *Seed Science Research*, 14: 205-217p.
- Noguchi, T., Fujioka, S., Choe, S., Takatsuto, S., Tax, F.E., Yoshida, S., Feldmann, K.A.,** 2000, Biosynthetic pathways of brassinolide in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 124(1):201-209p.
- Nonogaki, H.,** 2008, Seed germination and reserve mobilization, *ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES*, John Wiley & Sons, Ltd., Chichester.
- Nonogaki, H., Bassel, G.W. and Bewley, J.D.,** 2010, Germination—Still a mystery, *Plant Science*, 179(6), 574–581p.
- Oh, E., Yamaguchi, S., Kamiya, Y., Bae, G. and Chung, W.,** 2006, Light activates the degradation of PIL5 protein to promote seed germination through gibberellin in *Arabidopsis*, *Plant J.*, 47 124–139p.
- Oracz, K., El-Maarouf-Bouteau, H., Farrant, J.M., Cooper, K., Belghazi, M., Job, C., Job, D. Corbineau and F., Bailly, C.,** 2007, ROS production and protein oxidation as a novel mechanism for seed dormancy alleviation, *Plant J.*, 50:452–465p.
- Otegui, M.S., Capp, R. and Staehelin, L.A.,** 2002, Developing seeds of *Arabidopsis* store different minerals in two types of vacuoles and in the endoplasmic reticulum. *Plant Cell* 14, 1311–1327p.
- Özdemir, Bor, M., Demiral, T. and Türkan, İ.,** 2004, Effects of 24-epibrassinolide on seed germination , seedling growth , lipid peroxidation , proline content and antioxidative system of rice (*Oryza sativa* L .) under salinity stress, *Plant Growth Regulation*, 42:203–211.
- Passardi, F., Penel, C., Dunand, C.,** 2004, Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends in Plant Science*;9:534–40p.
- Passardi, F., Penel, C., Dunand, C.,** 2004, Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends in Plant Science*, 9 (11):534-540p.
- Passardi, F., Tognolli, M., De Meyer, M., Penel, C., Dunand, C.,** 2006, Two cell wall associated peroxidases from *Arabidopsis* influence root elongation. *Planta*;223: 965–74p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Rengasamy, P.**, 2002, Transient salinity and subsoil constraints to dryland farming in Australian sodic soils: an overview, *Aust. J. Exp. Agric.*, 42:351–6p.
- Rizhsky L., Davletova S., Liang H. and Mittler R.**, 2004, The zinc finger protein Zat12 is required for cytosolic ascorbate peroxidase 1 expression during oxidative stress in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry* 279, 11736–11743p.
- Rizhsky L., Hallak-Herr E., Van Breusegem F., Rachmilevitch S., Barr J.E., Rodermel S., Inze D. & Mittler R.**, 2002, Double antisense plants lacking ascorbate peroxidase and catalase are less sensitive to oxidative stress than single antisense plants lacking ascorbate peroxidase or catalase. *The Plant Journal* 32, 329–342p.
- Sasse, J.M., Smith, R. and Hudson, I.**, 1995, Effect of 24-epibrassinolide on germination of seed of Eucalyptus camaldulensis in saline conditions, *Proc. Plant Growth Regul. Soc. Am.*, 22:136–141p.
- Schopfer, P., Plachy, C. and Frahry, G.**, 2001, Release of reactive oxygen intermediates (superoxide radicals, hydrogen peroxide, and hydroxyl radicals) and peroxidase in germinating radish seeds controlled by light, gibberellin, and abscisic acid. *Plant Physiology* 125, 1591–1602p.
- Seo, M., Hanada, A., Kuwahara, A., Endo, A., Okamoto, M., Yamauchi, Y., North, H., Marion-Poll, A., Sun, T.-P., Koshiba, T., Kamiya, Y., Yamaguchi, S., Nambara, E.**, 2006, Regulation of hormone metabolism in Arabidopsis seeds: phytochrome regulation of abscisic acid metabolism and abscisic acid regulation of gibberellin metabolism. *Plant Journal*, 48: 354–366p.
- Takahashi, M. and Asada, K.**, 1988. Superoxide production in aprotic interior of chloroplast thylakoids, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 267:714-722p.
- Tanaka, K., Nakamura, Y., Asami, T., Yoshida, S., Matsuo, T. and Okamoto, S.**, 2003, Physiological roles of brassinosteroids in early growth of Arabidopsis: brassinosteroids have a synergistic relationship with gibberellin as well as auxin in light-grown hypocotyl elongation, *Journal of Plant Growth Regul.*, 22:259–271p.
- Toh, S., Imamura, A., Watanabe, A., Nakabayashi, K., Okamoto, M., Jikumar, Y., Hanada, A., Aso, Y., Ishiyama, K., Tamura, N., Iuchi, S., Kobayashi, M., Yamaguchi, S., Kamiya, Y., Nambara, E. and Kawakami, N.**, 2008, High temperature- induced abscisic acid biosynthesis and its role in the inhibition of gibberellin action in Arabidopsis seeds, *Plant Physiology.*, 146:1368–1385p.
- Torres, M.A. and Dangel, J.L.**, 2005, Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development, *Current Opinion in Plant Biology*, 8:397– 403p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Toyomasu, T., Tsuji, H., Yamane, H., Nakayama, M., Yamaguchi, I., Murofushi, N., Takahashi, N. and Inoue, Y.**, 1993, Light effects on endogenous levels of gibberellins in photoblastic lettuce seeds, *Journal of Plant Growth Regulation.*, 12:85–90p.
- Turkan, I. and Demiral, T.**, 2009, Recent developments in understanding salinity tolerance, *Environmental and Experimental Botany*, 67:2-9p.
- Vardhini, B.V., Rao, S.S.R.**, 2003, Amelioration of osmotic stress by brassinosteroids on seed germination and seedling growth of three varieties of sorghum. *Plant Growth Regulation*, 41 (1): 25-31p.
- Wang, F.Z., Wang, Q.B., Kwon, S.Y., Kwak, S.S. and Su, W.A.**, 2005, Enhanced drought tolerance of transgenic rice plants expressing a pea manganese superoxide dismutase, *Journal of Plant Physiology*, 162, 465–472p.
- Willigen, C.V., Postaire, O., Tournaire-Roux, C., Boursiac, Y., Maurel, C.**, 2006, Expression and inhibition of aquaporins in germinating Arabidopsis seeds. *Plant Cell Physiology*, 47: 1241–1250p.
- Wojtyla, L., Garneczarska, M., Zalewski, T., Bednarski, W., Ratajczak, L. and Jurga, S.**, 2006, A comparative study of water distribution, free radical production and activation of antioxidative metabolism in germinating pea seeds, *Journal of Plant Physiology* 163 1207–1220p..
- Xu, H.-L., Shida, A., Futatsuya, F. and Kumura, A.**, 1994, Effects of epibrassinolide and abscisic acid on sorghum plants growing under soil water deficit. I. Effects on growth and survival, *Japanese journal of Crop Science.*, 4:671–675p.
- Yamauchi, Y., Ogawa, M., Kuwahara, A., Hanada, A., Kamiya, Y. and Yamaguchi, S.**, 2004, Activation of gibberellin biosynthesis and response pathways by low temperature during imbibition of Arabidopsis seeds, *Plant Cell*, 16:367–378p.
- Yang, J.C., Zhang, J.H., Wang Z.Q., Zhu, Q.S. and Wang W.**, 2001, Remobilization of carbon reserves in responses to water deficit during grain filling of rice, *Field Crops Research*, 71:47-55p.
- Zhang, S., Hu, J., Zhang, Y., Xie, X.J., Knapp, A.**, 2007, Seed priming with brassinolide improves lucerne (*Medicago sativa* L.) seed germination and seedling growth in relation to physiological changes under salinity stress. *Australian Journal of Agricultural Research*, 58:811–815p.

ÖZGEÇMİŞ

Tolga Yalçinkaya, 27.06.1987'da İzmir' de doğmuştur. 2005' te Büyük Çiğli Lisesi' nde orta öğrenim hayatını bitirmiştir. Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Çevre Biyolojisi Opsiyonundan 2010 yılında mezun olmuştur. 2010 yılında lisansüstü eğitimine, Prof. Dr. İsmail Türkan danışmanlığında, Ege Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Genel Biyoloji A.B.D.'de başlamıştır.