

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**AĞIR METAL STRESİ İLE GAMMA-AMİNO
BÜTİRİK ASİT (GABA) ETKİLEŞİMİNİN
İNCELENMESİ**

Zeycan AKCAN DAŞ

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Melike BOR

Biyoloji Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 401.01.00

Sunuş Tarihi : 11.12.2014

Bornova-İZMİR

2014

Zeycan AKCAN DAŞ tarafından YÜKSEK LİSANS tezi olarak sunulan “Ağır Metal Stresi ile Gamma-Amino Bütirik Asit (GABA) Etkileşiminin İncelenmesi” 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 11.12.2014 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı

: Doç. Dr. Melike BOR

Raportör Üye

: Prof. Dr. Filiz ÖZDEMİR

Üye

: Doç. Dr. Çağlar KARAKAYA


.....
.....
.....

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Ağır Metal Stresi ile Gamma-Amino Bütirik Asit (GABA) Etkileşiminin İncelenmesi” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

11 / 12 / 2014

İmzası

Adı-Soyadı

ZEYCAN AKCAN DAŞ

ÖZET**AĞIR METAL STRESİ İLE GAMMA-AMİNO BÜTİRİK ASİT
(GABA) ETKİLEŞİMİNİN İNCELENMESİ**

AKCAN DAŞ, Zeycan

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Melike BOR

Aralık 2014, 79 sayfa

Ağır metaller, bitkilerde enzimlerin inaktive olmasıyla hücresel/moleküler seviyede pek çok fizyolojik süreci hasara uğratarak fitotoksisiteye neden olmaktadır (Pagliano et al., 2006). γ -Aminobütirik asit (GABA), bakteriler, bitkiler ve omurgalılarda bulunan dört karbonlu proteinik yapıda olmayan bir amino asittir (Steward et al., 1949). Bitkilerde, GABA için sinyalizasyon, böceklerle karşı savunma, hücrelere öncülük etme gibi birden fazla roller önerilmiştir (Kinnersley ve Turano, 2000; Bouche et al., 2003). Çeşitli araştırmalarda, abiyotik stres koşullarında GABA seviyesindeki değişimler incelenmiştir (Kinnersley and Trurano, 2000) fakat ağır metal stresi koşullarındaki GABA düzeyleri ve değişimlerini içeren çalışmalar fazla bulunmamaktadır.

Bu çalışmada Tütün (*Nicotiana tabacum*) bitkisinde ağır metal stresi ile GABA metabolizması ilişkisinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla, tütün bitkileri farklı konsantrasyonlarda çinko sülfat ($ZnSO_4$) ile indüklenen ağır metal stres koşullarında, GABA ve Glutamat miktarındaki değişimler, Glutamat Dekarboksilaz (GAD) ve Glutamat Dehidrogenaz (GDH) enzimlerindeki aktivite değişimleri ve çeşitli fizyolojik parametreler incelendi. GABA, Glutamat miktarları ve enzim aktiviteleri stres gruplarında farklı düzeylerde belirlendi. Tütün bitkisinde, $ZnSO_4$ ile indüklenen abiyotik stresin GABA metabolizmasını ve bitkilerin strese alışma süreçlerini etkilediği saptandı.

Anahtar Sözcükler: GABA, *Nicotiana Tabacum*, Abiyotik Stres, Ağır Metal Stresi.

ABSTRACT**EXAMINATION OF THE INTERACTION BETWEEN HEAVY METAL STRESS AND GAMMA-AMINO BUTYRIC ACID (GABA)**

AKCAN DAŞ, Zeycan

MSc in Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Melike BOR

December 2014, 79 pages

Heavy metals phytotoxicity may effect from interchange of unlimited physiological processes caused at cellular/molecular level by inactivating enzymes, blocking functional groups of metabolically significant molecules (Pagliano et al ., 2006; La Rocca et al., 2009). γ - Aminobutyric acid is a four-carbon non-protein amino acid founded from bacteria to plants and vertebrates (Steward et al., 1949). In plants, multiple roles have been proposed for GABA such as to signalization, defense against insects and lead the cells (Kinnersley ve Turano, 2000; Bouche et al., 2003; Bouche ve Fromm, 2004). In various research, change in the level of GABA is examined by the effect of abiotic stress (Kinnersley and Trurano, 2000) but there is not much research involving GABA levels and changes in heavy metal stress.

The aim of this study was examination of the interaction between heavy metal stress and gamma-amino butyric acid (GABA) in *Nicotiana tabacum* plants. GABA and glutamate contents, activities of Glutamate dehydrogenase (GDH) and Glutamate decarboxylase (GAD) enzymes and physiological parameters were measured in order to evaluate the effect of heavy metal stres induced by different concentration zinc sulphate in tobacco plant. Amount of GABA and Glutamate and enzyme activity was determined at different levels of stress groups. In tobacco plants, the GABA metabolism and acclimatization of the plants to stress were found to be affected of abiotic stress induced by zinc sulphate.

Keywords: GABA, *Nicotiana tabacum*, Abiotic Stress, Heavy Metal Stress.

TEŞEKKÜR

Lisan ve lisansüstü öğrenimimde ve gerek üniversite dönemi gerekse kişisel yaşam boyunca bana yol gösteren, tecrübelerini aktararak beni her konuda cesaretlendiren, sevgisini ve desteğini, engin bilgilerini her zaman paylaşan Değerli Hocam Sayın Doç. Dr. Melike BOR'a, tez çalışmam boyunca bilgi birikimi ve fikirleri ile çalışmalarına yön veren, beni destekleyen ve karşılaşılan tüm aksaklıklarda iyimser olmamı sağlayan, Sayın Hocam Prof. Dr. Filiz ÖZDEMİR'e teşekkür ederim.

Çalışmalarında ve ders dönemimde değerli bilgilerini paylaşan ve beni bilgilendiren hocalarım Prof. Dr. İsmail TÜRKAN ve Doç. Dr. Hediye SEKMEN ESEN'e teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarım ve ders dönemim boyunca, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşarak yanımda olan arkadaşlarım Araş. Gör. Süleyman İLHAN'a, Tuğba KARABUDAK'a ve Alpay PELVAN'a, üniversiteye başladığım ilk günden beri beni hiç yalnız bırakmayan, her türlü problemi birlikte atlattığım, sevgisini her zaman hissettiğim biricik arkadaşım Gizem DİMLİOĞLU'na sonsuz teşekkür ederim.

Bu günlere gelebilmem için çok emek harcayan, yaşamım boyunca her an yanımda olan, doğru yanlış demeden kararlarımın arkasında her zaman duran, beni her yönden destekleyen, bana sonsuz sevgi veren ve varlıkları ile her zaman mutluluk ve güven duyduğum annem Nahide AKCAN'a, babam Nail Murat AKCAN'a ve kız kardeşim Pelin AKCAN'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Üniversiteye başladığım yıllardan beri benim yanımda olan, her sıkıntımı, problemimi kendi sıkıntısı, problemi sayan, desteğini hep hissettiğim, beni her konuda cesaretlendiren varlığı ile bana huzur veren canım eşim Necdet DAŞ'a sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜR	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xxi
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Ağır Metal Stresi	3
1.1.1 Bitkilerde çeşitli ağır metallerin toksik etkileri.....	6
1.1.2 Ağır metal alınımı ve taşınımı	7
1.1.3 Şelatlama	9
1.1.4 Bitkilerde ağır metal toksisitesinden oluşan oksidatif stres	13
1.2 Bitkilerde GABA Metabolizması.....	13
1.2.1 GABA yolu.....	16
1.2.2 GABA yolunun düzenlenmesi.....	20
1.2.3 Bitkilerde GABA için öngörülen roller.....	23
1.2.4 GABA yolunun diğer metabolik yollarla ilişkisi	26

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
1.3 Hipotez	29
2. MATERYAL VE METOD	30
2.1 Bitki Materyali ve Yetiştirilmesi.....	30
2.2 Ağır Metal Stresi (ZnSO ₄) Uygulaması	30
2.3 Büyüme Parametreleri.....	31
2.3.1 Klorofil floresans ölçümü	31
2.4 Total Protein Miktarının Belirlenmesi	31
2.5 Glutamat Dehidrogenaz (GDH) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	32
2.6 Glutamat Dekarboksilaz (GAD) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi.....	32
2.7 GABA Miktarının Belirlenmesi.....	33
2.8 Glutamat Miktarının Belirlenmesi	33
3. BULGULAR	35
3.1 Büyüme Parametreleri ve Fotozentez Verimi	35
3.1.1 Kök ve gövde yaş ağırlıkları	35
3.1.2 Kök ve gövde kuru ağırlıkları	37

İÇİNDEKİLER (devam)Sayfa

3.1.3 Fotosentez Verimi	38
3.2 Enzim Aktivitesi Analizleri.....	39
3.2.1 Glutamat dehidrogenaz (GDH) enzim aktivitesi.....	39
3.2.2 Glutamat dekarboksilaz (GAD) enzim aktivitesi	40
3.3 GABA ve Glutamat Miktarlarının Belirlenmesi	41
3.3.1 GABA miktarının belirlenmesi	41
3.3.2 Glutamat miktarının belirlenmesi.....	42
4. TARTIŞMA.....	44
5. SONUÇLAR	50
KAYNAKLAR DİZİNİ	52
ÖZGEÇMİŞ.....	78

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Ağır metal stresi altında bitkilerde oluşan GSH-bağımlı detoksifikasyon süreci (Yadav, 2010'dan)	5
1.2 Bitkilerde günümüze kadar tanımlanan olası taşıyıcıların şematik gösterimi (Hall and Williams, 2003'den)	9
1.3 Fitoşelatin biyosentez yolağı (Rauser, 1990'dan).....	10
1.4 Bitkilerde ağır metallerin vakuoller ayrılması (Yang and Chu, 2011'den) ..	12
1.5 Çeşitli stresler altında farklı bitki dokularında GABA birikimi (Sulieman et al., 2011'den)	15
1.6 Bitki stres yanıtlarında GABA'nın rolü (Turano and Kinnersly, 200'den)...	16
1.7 GABA yolunun şematik gösterimi (Shelp et al., 1999'dan)	17
1.8 GAD enzim aktivitesi aracılığıyla glutamattan GABA oluşumunun şematik gösterimi	18
1.9 GABA'nın GABA-T tarafından Süksinik semialdehite katalizlenmesinin şematik gösterimi	18
1.10 Süksinik semialdehitin SSADH tarafından Süksinata dönüşümünün şematik gösterimi	19
1.11 2-okzoglutarattan (2-OG) GDH aracılığıyla glutamat oluşumunun şematik gösterimi	20
1.12 Biyotik ve abiyotik streslerde, hücreiçi ve hücre dışı taşınım tarafından GABA seviyesinin düzenlenmesi (Shelp et al., 1999'dan).....	22
1.13 GABA ile TCA döngüsünün bağlantısının gösterim şeması (Bouche et al., 2003'den)	28
3.1 Kontrol, 10 µM ve 100 µM ZnSO ₄ uygulamasının <i>N. tabacum</i> 'da kök yaş ağırlığı üzerine etkisi	36
3.2 Kontrol, 10 µM ve 100 µM ZnSO ₄ uygulamasının <i>N. tabacum</i> 'da gövde yaş ağırlığı üzerine etkisi	36
3.3 <i>N. tabacum</i> bitkisinde kontrol, 10 µM ve 100 µM ZnSO ₄ uygulaması yapılan gruplarda kök kuru ağırlığındaki değişimler	37
3.4 <i>N. tabacum</i> bitkisinde kontrol, 10 µM ve 100 µM ZnSO ₄ uygulaması yapılan gruplarda gövde kuru ağırlığındaki değişimler	38

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.5 <i>N. tabacum</i> bitkisinde kontrol, 10 µM ve 100 µM ZnSO ₄ uygulaması yapılan gruplarda fotosentetik verimdeki değişimler.....	39
3.6 <i>N. tabacum</i> bitkisinde kontrol, 10 µM ve 100 µM ZnSO ₄ uygulamasının GDH enzim aktivitesindeki üzerine etkisi	40
3.7 <i>N. tabacum</i> bitkisinde kontrol, 10 µM ve 100 µM ZnSO ₄ uygulamasının GAD enzim aktivitesi üzerine etkisi	41
3.8 <i>N. tabacum</i> bitkilerinde ağır metal ZnSO ₄ stresinin GABA miktarı üzerine etkisi	42
3.9 <i>N. tabacum</i> bitkilerinde ağır metal ZnSO ₄ stresinin Glutamat miktarı üzerine etkisi	43

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
GABA	Gamma aminobütirik asit
GABA-T	GABA-transaminaz
GAD	Glutamat dekarboksilaz
GDH	Glutamat dehidrogenaz
GSH	Glutatyon
GSH1	γ -glutamilsistein sentaz 1
GSH2	Glutatyon sentetaz
SSADH	Süksinik semialdehit dehidrogenaz
SSA	Süksinik semialdehit
Glu	Glutamat
2OG	2-okzoglutarat
GHB	Gama hidroksibutirat
CaM	Ca ⁺² /kalmodulin
FAD	Flavin adenin dinükleotid
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotid
RubisCO	Ribulaz-1,5 bifosfat karboksilaz/oksigenaz
LOX	Lipogenaz
ROS	Reaktif oksijen türleri

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
MG	Metilglioksal
ZRT	Zn-düzenleyici taşıyıcı
IRT	Fe-düzenleyici taşıyıcı
HMA	Ağır metal ATPaz
Nramp	Naturel resistance associated macrophage proteins
PC	Fitoşelatin
MT	Metalotionin
GS	GSH sentaz
PS II	Fotosistem II
PEPC	Fosfoenol pirüvat karboksilaz
TCA	Trikarboksilik asit
AtProT2	<i>Arabidopsis thaliana</i> prolin taşıyıcı 2
GABP	GABA permeaz
DAO	Diamin oksidaz
ZnSO ₄	Çinko sülfat
TMV	Tütün mozaik virüsü
dIH ₂ O	Deiyonize su
MS	Murashinge-Skoog
<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
Y	Gamma

1. GİRİŞ

Tütün (*Nicotiana tabaccum*), dünyada ticari ve ekonomik anlamda en önemli tarımsal bitkilerden biridir (The Editorial Committee of the Administration Bureau of Flora of China 2005; Hu and Mao, 2006). Özellikle sigara endüstrisinde kullanılan tütün (*N. tabaccum*); seskiterpenler (Feng et al., 2009, 2010), diterpenoidler (Inger et al., 1979; Shinozaki et al., 1996; Petterson et al., 1993), alkaloidler (Wei et al., 2005; Braumann et al., 1990), fenoller (Veneecke et al., 1997) ve benzerleri gibi çok sayıda kullanışlı kimyasal bileşenler içermektedir. Ayrıca, tütünün kök ve gövdeleri organik gübre olarak ta kullanılmaktadır. Tütün, yüksek biokütleyle sahip ve diğer model bitkilere ve ürünlere göre yüksek miktarlarda çözünmüş protein içeriğine sahip yapraklı bir bitkidir (Reynald et al., 2010). Tütün ülkemizde özellikle Ege Bölgesi'nde yaygın olarak üretimi yapılan ve ekonomik anlamda önem teşkil eden bir bitkidir. Tütün yetiştirildiği bölge özellikleri bakımından, iklim koşulları ve küresel ısınmanın yarattığı birçok biyotik ve abiyotik strese maruz kalmaktadır. Tez projemiz kapsamında tütünde (*N. tabaccum*) kontrol grupları ve çeşitli konsantrasyonlarda ağır metal stresi uygulanmış stres grupları arasındaki GABA-stres ilişkisi incelenmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda bitkilerde ağır metal stresine tolerans ile GABA metabolizması arasında bir ilişki olduğu saptanmıştır (Heinz et al., 2009).

Gama-aminobutirik asit (GABA) prokaryotlarda ve ökaryotlarda bulunan, dört karbonlu ve moleküler ağırlığı 103.1 dalton olan (Bown et al., 1997), serbest amino asit havuzunun önemli bileşeni ve protein yapısında bulunmayan bir amino asittir (Akama ve Takaima, 2007). Yapısında α -karbonundan farklı olarak γ -karbonu bulundurmaktadır. GABA, sadece hayvanlarda değil bakterilerde, mantarlarda ve bitkilerde GABA shunt olarak bilinen bir yolağında sentezlenmektedir (Bouche et al., 2004; Shelp et al., 2012a). GABA shunt, glutamat dekarboksilaz (GAD), GABA-transaminaz (GABA-T) ve süksinik-semialdehit dehidrogenaz (SSADH) enzimlerinin katalizlediği üç önemli reaksiyonu içeren bir yolağıdır (Snedden et al., 2001). Bu yolağı, sitozolde glutamatın dekarboksilasyonu sonucu GABA ve karbondioksit (CO₂) üretilmesi ile başlamaktadır. GABA henüz tanımlanmamış bir taşıyıcı tarafından mitokondriye taşınarak süksinik-semialdehite (SSA) dönüştürülmektedir. Çeşitli

alışmalar göstermektedir; sitozolik pH düzenlenmesi (Vance et al., 1991), reaktif oksijen türlerinin (ROS) süpürülmesi (Shi et al., 2010), oksijen eksikliğine karşı koruma (Ott et al., 2009), pestisitlere karşı bitki savunması (Ramputh et al., 1996) gibi süreçlerde GABA'nın metabolik fonksiyonları olduğu saptanmıştır.

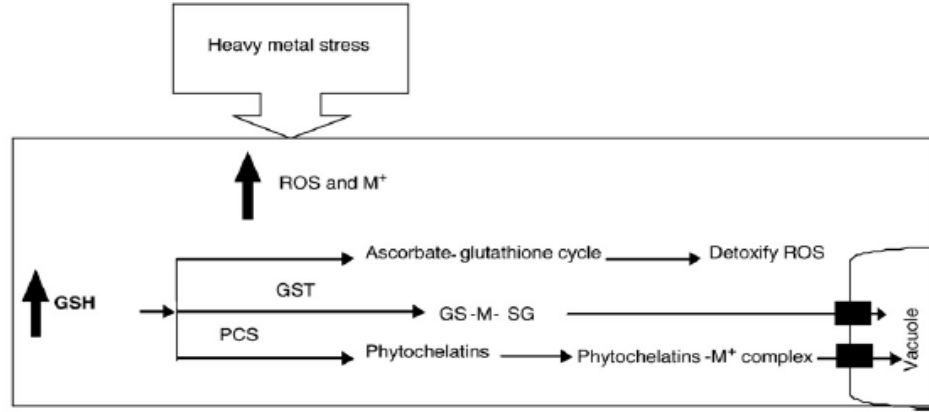
Bitkiler yaşadıkları ortamda abiyotik ve biyotik olarak çeşitli çevresel faktörlere maruz kalmaktadırlar. Biyotik faktörler, bitkilerin çevresindeki diğer canlı organizmalarla etkileşim halinde olması sonucu ortaya çıkar. Abiyotik faktörler ise bitkilerin bulundukları ortamlardaki ışık miktarı ve yoğunluğunun, CO₂, O₂, su, mineral madde miktarı, nem miktarı gibi çeşitli kimyasal ve fiziksel etmeni içermektedir. Bu evresel faktörlerin herhangi birinin azlığı yada fazlalığı bitkilerin stres faktörlerine maruz kalmaları anlamına gelir (Schulze et al., 2005). Abiyotik stresler; tuzluluk, yüksek sıcaklık, UV, soğuk stresi, kuraklık, ışık, besin azlığı yada fazlalığı, kirlilik ve ağır metaller gibi unsurları tek başlarına yada birlikte oluşturdukları etkiler olarak tanımlanmaktadır (Cho et al., 2006). Bu stres faktörlerinin hepsi bitkilerin büyüme ve gelişim süreçlerinde olumsuz etki etmektedir. Bitkiler çeşitli çevresel streslere maruz kaldıklarında oksidatif hasar meydana gelir ve farklı tipte fizyolojik yanıtın oluşumu söz konusudur. Günümüzde, bu çevresel stresler arasından en dikkat çekeni, özellikle toprak kirlenmesine neden olan, hem bitkiler hemde hayvanlar için olumsuz etkilere neden olan ağır metal stresidir. Dünya  zerindeki çok sayıdaki tarımsal topraklar az konsantrasyonlarda da olsa kadmiyum (Cd), bakır (Cu), nikel (Ni), inko (Zn), kobalt (Co), krom (Cr), kurşun (Pb) ve arsenik (As) gibi ağır metal toksisitesine maruz kalmaktadır. Bu toprakların ağır metal toksisitesine maruz kalmasının en önemli nedenleri; uzun süreli fosforik gübreler, lağım sularının kullanılması, endüstriyel atıklar ve uygun olmayan sulama yöntemlerinin kullanılmasıdır (Bell et al., 2001; Schwartz et al., 2001; Passariello et al., 2002).

1.1 Ağır Metal Stresi

Kimyasal açıdan, “Ağır Metal” terimi tam anlamıyla atomik kütlesi 20’nin ve özgül ağırlığı 5’in üzerinde olan metallerin değişimlerini ifade etmektedir. Biyolojide ise, “Ağır” terimi çok düşük konsantrasyonlarda bile hem bitkiler hem de hayvanlar için toksik etki yaratan bir grup metalleri ve ayrıca metalloidleri ifade eder (Nicoletta ve Flavia, 2011). 90 adet ağır metalden 50 tanesi doğada kendiliğinden oluşmaktadır (R.C. Weast, 1984) fakat bunların hepsi biyolojik öneme sahip değildir. Fizyolojik koşullar altında çözünebilen sadece 17 ağır metal, yaşayan hücreler için kullanıma uygundur ve bu ağır metaller organizmalar ve ekosistem için önemlidir (Goldbold ve Huttermann, 1985; Nies, 1999). As, kadmiyum (Cd), civa (Hg), Pb yada selenyum (Se) gibi bir takım ağır metallerin bitkilerde bilinen herhangi bir fizyolojik fonksiyonları yoktur (Nicoletta ve Flavia, 2011). Kobalt (Co), bakır (Cu), demir (Fe), mangan (Mn), molibden (Mo), nikel (Ni) ve çinko (Zn) gibi diğer ağır metaller ise bitkilerin büyüme ve gelişmesini içeren proteinlerin büyük çoğunluğunun fonksiyonel aktivitesinde kritik olan esansiyel mikronütrientlerdir. Ancak, yüksek konsantrasyonlarda, bu metal iyonları bitkiler için zararlı olabilir. Ayrıca esansiyel olmayan diğer metaller, kurşun, kadmiyum ve civa iyonlarına maruz kalmak bitkiler için toksik olabilmektedir. Enzimlerin inaktif edilmesi, önemli metabolik moleküllerin fonksiyonlarının bloke olması, gerekli elementlerin yer değiştirmesi ve membran bütünlüğünün bozulmasından dolayı, ağır metal fitotoksitesitesi hücresel/moleküler seviyede bir çok sürecin değişmesine neden olmaktadır. Ağır metal zehirlenmesinin en yaygın sonucu; özellikle kloroplast membranlarında görülen elektron taşıma aktivitesinin engellenmesinden dolayı oluşan reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretiminin artmasıdır (Pagliano et al., 2006; La Rocca et al., 2009). Haber-weiss reaksiyonu boyunca çeşitli ağır metaller aracılığı ile direkt olarak ROS üretimi gerçekleşmektedir yada ağır metal stresi sonucu oksidatif stresteki bitkilerde ROS oluşumu söz konusudur ve üretim miktarında artış gözlenmektedir (Wojtaszek, 1997; Mithofer et al., 2004). ROS’lardaki bu artış, hücrelerin “lipid peroksidasyonuna, biyolojik makromolekül bozulmasına, membran ayrılmasına, iyon sızıntısına ve DNA-iplik ayrılmasına” neden olan oksidatif strese maruz kalmasını sağlar (Pagliano et al., 2006; La Rocca et al., 2009). Ayrıca bitkiler, ROS’ların antioksidant sistemleri ile etkileşimini

(Srivastava et al., 2004), elektron taşıma zincirinin bozulması (Qadir et al., 2004) ve esansiyel elementlerin metabolizmasının bozulması gibi indirekt mekanizmalar da içermektedir (Dong et al., 2006). Ağır metallerin lipogenaz (LOX) aktivitesini arttırdığı düşünülmektedir. Bu nedenle de ağır metallerin lipid peroksidasyonunun indüklenmesine neden olur. Bir çok enzim doğru biçimde çalışabilmek için ağır metallerin her iki grubundaki iyonlara kofaktör olarak ihtiyaç duymaktadır. (örneğin; hem, biotin, Flavin adenin dinükleotid (FAD), Nikotinamid adenin dinükleotid (NAD), Koenzim A). Ribuloz-1,5bifosfat karboksilaz/oksigenaz (RuBisCO)daki Mg^{+2} katyonunun diğer Co^{+2} , Ni^{+2} ve Zn^{+2} gibi iki değerli katyonlarla yer değiştirmesi RuBisCO enziminin aktivitesinin azalmasına neden olmaktadır (Wildner et al., 1979; Van Assche et al., 1986). Protein tiyol gruplarının çapraz bağlanması ve bu grupların oksidasyonu, H^+ ATPaz gibi anahtar membran proteinlerinin inhibe olması yada membran proteinlerinin akışkanlığının ve kompozisyonunun değişmesi gibi çeşitli mekanizmaların ağır metal toksisitesi ile oluşması sonucu membran hasarı meydana gelmektedir (Hossain et al., 2009). Bitkilerde ağır metal stresine yanıt olarak, metilglioksal (MG)'nin sitotoksik yerleşip biriktiği bulunmuştur. Bu birikim; glioksalaz sistemin bozulmasına neden olmaktadır (Hossain et al., 2009; Hossain et al., 2011).

Bitkiler, çevresel ağır metal toksisitesine karşı mücadele edebilmek için potansiyel mekanizmalar geliştirmektedir. Bitkiler, toksik metaller için yüksek afinite gösteren düşük moleküler ağırlıklı tiyoller üretmektedir (Bricker et al., 2001). Düşük moleküler ağırlığa sahip biyolojik tiyollerin en önemlileri Glutasyon (GSH) ve Sisteindir. GSH; γ -glutamat-sistein-glisin formüle edilen yapısında sülfür içeren tri-peptid tiyollerdendir. GSH sentezi 2 ATP-bağımlı enzim tarafından katalizlenmektedir. Bunlar; γ -glutamilsistein sentaz1 (GSH1) ve glutasyon sentetaz (GSH2)'dir. Ayrıca GSH, fitoşelatin sentezi için bir substrat ve kadmium ve nikel gibi ağır metal detoksifikasyonu için önemlidir (Freeman et al., 2004) (Şekil 1.).



Şekil 1.1 Ağır metal stresi altında bitkilerde oluşan GSH-bağımlı detoksifikasyon süreci. (Yadav, 2010).

Ağır metal homeostazisi ve detoksifikasyon sistemlerinin önemli komponentleri: membranda bulunan ağır metal transporterları, az sayıda bulunan esansiyel metallerin etkin bir şekilde dağıtımını sağlayan hücre içindeki metal şaperonlar ve şelatlama sürecidir.

Bitkilerde ağır metallerin toksik etkileri:

- Demir ve Bakır gibi geçiş metallerine özgü olan Fenton reaksiyonu ve bitki oksidasyon sistemi tarafından reaktif oksijen türlerinin üretimi,
- Redoks- reaktif olmayan Civa ve Kadmiyum gibi ağır metaller için, biyomoleküllerde fonksiyonel grupların bloke edilmesi,
- Biyomoleküllerdeki, esansiyel metal iyonlarının yerinden çıkarılarak, ağır metallerin farklı çeşitlerinin oluşturulmasıdır (Schützendübel and Polle, 2002).

1.1.1 Bitkilerde Çeşitli Ağır Metallerin Toksik Etkileri

Ağır metaller, tarım topraklarının kontaminasyonu ve olumsuz ekolojik etkileri nedeniyle, çevresel bir tehdit haline gelmiştir.

Çinko (Zn): Bitkiler için esansiyel nütriendir. Kontamine olmuş topraklarda bulunan çinko seviyesinin çok yüksek miktarda olması bitkiler için toksik olabilmektedir. Toprakta çinkonun yüksek seviyede bulunması birçok bitkinin metabolik fonksiyonunu engellemektedir. Sonuç olarak büyümenin engellenmesi ve senesens meydana gelmektedir. Çinko toksisitesi bitkilerde, kök ve meristemin büyümesini sınırlar (Choi et al., 1996; Ebbs and Kochian, 1997; Fontes and Cox, 1998). Yüksek konsantrasyonlarda Zn içeren topraklarda yetiştirilen bitkilerin genç yapraklarında klorosis meydana geldiği saptanmıştır (Ebbs and Kochian, 1997). Zn konsantrasyonunun artması bitki sürgünlerinde bakır (Cu) ve mangan (Mn)'ın eksikliğine neden olmaktadır. Bir diğer Zn toksisitesinin etkisi ise fosfor eksikliğinden dolayı oluşan morumsu-kırmızımsı yaprak görüntüsüdür (Lee et al., 1996).

Kadmiyum (Cd): Tarım topraklarında Cd, 100 mg/kg'dan fazla olduğunda toksiktir (Salt et al., 1995). Ancak bu eşik değeri insan aktiviteleri sebebiyle aşılmaktadır. Yüksek seviyelerde Cd'ye maruz kalan bitkilerde, fotosentez, su alınımları ve nütriendir alınımları azalır. Yüksek düzeyde Cd içeren toprakta yetişen bitkilerde, büyümenin inhibisyonu, klorosis in belirtileri ve kök ucunun kararması ve sonuçta ölüm gözlenir (Wójcik and Tukiendorf, 2004; Mohanpuria et al., 2007).

Civa (Hg): Civa farklı formlara (HgS , Hg^{+2} , Hg^0 ve metil-Hg) sahip benzersiz bir metaldir. Bununla birlikte, tarımsal topraklarda civanın Hg^{+2} formu yaygın olarak bulunmaktadır. (Han et al., 2006). Civanın yüksek seviyeleri, bitki hücreleri için güçlü fitotoksiktir. Toksik düzeyde civa bitkilerde görülebilir hasarlara ve fizyolojik dengesizliklere neden olmaktadır. Civanın yüksek seviyeleri, ROS türlerinin üretimi ile oksidatif stresin ortaya çıkması ve mitokondriyal aktivitenin azalmasına neden olur.

Kobalt (Co): Bitkiler, topraktan kobaltı (Co) az miktarda alarak biriktirebilmektedirler. Bitkilerde kobaltın alınımı ve dağıtımı türe bağlı olarak ve farklı mekanizmalar tarafından kontrol edilmektedir (Kukier et al., 2004; Li et al., 2004; Bakkaus et al., 2005). Yüksek konsantrasyonlardaki kobaltın fitotoksik etkisi üzerine yapılan çalışmalar sınırlıdır. Kobaltın fitotoksik etkisi için arpa (*Hordeum vulgare* L.) ve domates (*Lycopersicon esculentum* L.) ile yapılan çalışmalar sonucunda; biyokütle ve sürgün büyümesinde inhibisyon saptanmıştır (Li et al., 2009).

Arsenat (As): Fosforun (P) analogudur ve bitkilerin kök plazma membranında alınımı ve taşınımı benzerdir (Meharg and Macnair, 1992). Arsenata tolerans gösteren çok sayıda bitki türü tanımlanmıştır (Meharg, 1994; Sharples et al., 2000). Bitkilerde arsenata tolerans tek bir gen tarafından P/As transportunun baskılanması ile gerçekleştiği saptanmıştır (Meharg and Macnair, 1992). Bu baskılanma mekanizması sayesinde, bitkiler tarafından hücre içine alınan arsenatın kolayca detoksifiye edildiği belirlenmiştir (Meharg, 1994).

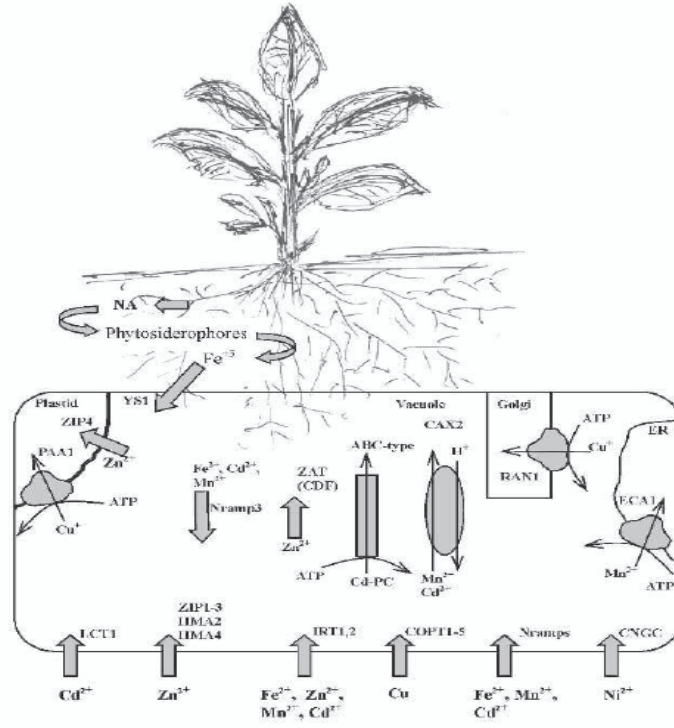
1.1.2 Ağır Metal Alınımı Ve Taşınımı

Son yıllarda yapılan çalışmalar sonucunda, esansiyel ve esansiyel olmayan ağır metal iyonlarının bitki hücresi içerisine alınımlarının süreçlerinin moleküler seviyede anlaşılması söz konusudur. Bitki hücrelerinde, ağır metal iyonlarının alınımı ve metal homeostasisinin devamlılığı özel taşıyıcılar ve metal pompaları aracılığıyla gerçekleşmektedir (Pilon et al., 2009). Bu taşıyıcılar ve pompalar tipik olarak membran proteinleridir, farklı bitki metal taşıyıcı ailelerinin üyeleridir. Metal taşıyıcı ve pompalar, dokusal düzeyde (metal iyonlarının mezofilden epidermal hücrelere taşınımı gibi) ya da organ düzeyinde (metal iyonlarının köklerde sürgünlere taşınımı gibi) rol oynamaktadırlar (Krämer et al., 2007; Maestri et al., 2010). Özellikle yapılan çalışmalar sonucunda; Zn-düzenleyici taşıyıcıların (ZRT), Fe-düzenleyici taşıyıcıların (IRT) yada benzeri proteinlerin (ZIP) ve katyon difüzyonunu kolaylaştıran protein ailesinin (CDF) transkript seviyesindeki artış ile metal iyonlarının yüksek miktarlarda biriktirilmesi (Pence et al., 2000; Lombi et al., 2002) yada metal iyonlarına karşı tolerans oluşturma süreçleri arasında bir ilişki olduğu saptanmıştır (Van der Zaal et al., 1999;

Assunção et al., 2001; Persans et al., 2001). Tüm ağır metal pompalarının, Ağır Metal ATPaz (HMA), bakteriler, bitkiler ve hayvanlarda önemli sekans benzerlikleri taşıdığı saptanmıştır (Palmgren ve Axelsen, 1998).

HMA taşıyıcıları, P1B-ATPaz ilesinin bir üyesidir ve serbest metal iyonlarının sitoplazmadan plazma membranı boyunca, köklerden sürgünlere doğru taşınımını sağlamaktadır (Takahashi et al., 2012). Ayrıca son zamanlarda yapılan çalışmalar sonucunda AtHMA4'ün çinko (Zn^{+2}) ve kadmiyum (Cd^{+2})'a yönelik şelatlama aktivitesi gösterdiği saptanmıştır (Bækgaard et al., 2010).

ZIP gen ailesine ait metal taşıyıcıları, kadmiyum, demir, mangan ve çinko gibi çarşitli katyonların taşınımını ve biriktirilmesini sağlamaktadır (Guerinot, 2000). Ayrıca bu taşıyıcılar kadmiyum yanıtlarını ve nikel toleransını da sağlamaktadır (Nishida et al., 2011). Bu taşıyıcılar arasında ilk izole edilen *Arabidopsis* IRT1 (demir-düzenleyici taşıyıcı)'dır. IRT1, topraktan yüksek afiniteli demir iyonlarının taşınımından sorumlu temel taşıyıcıdır (Eide et al., 1996). Metal taşıyıcıları arasındaki bir diğer taşıyıcı ise, çinkonun (Zn) alınımını ve taşınımını gerçekleştiren Zn-taşıyıcısıdır (ZNT). *A.thaliana* ile yapılan çalışmalarda ZNT genlerinin yüksek oranda ifade edilmesi sonucu köklerde yoğun düzeylerde Zn iyonlarının biriktirdiği saptanmıştır (Milner et al., 2012). Ayrıca bitkilerde, Fe taşınımından sorumlu, *Nramp* (Natural resistance associated macrophage proteins, TC 2.A.55) gen ailesi ile homoloji gösteren bir taşıyıcı tanımlanmıştır (Thomine et al.,2000). *Arabidopsis* Nramp genlerinin bitkilerde multispesifik metal transport sistemini kodladığı ve bu sistemle Fe, Mn ve Cd taşınabildiği bulunmuştur (Şekil 2.).



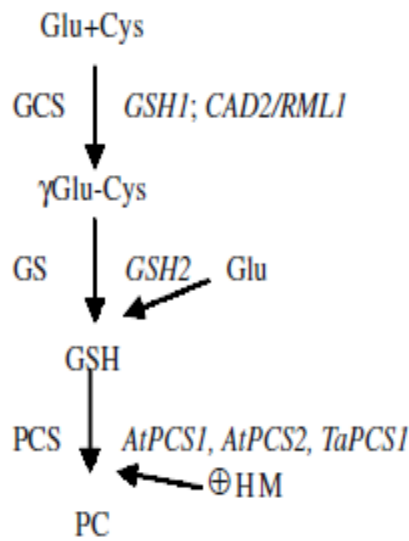
Şekil 1.2 Bitkilerde günümüze kadar tanımlanan olası taşıyıcıların şematik gösterimi (Hall and Williams , 2003).

1.1.3 Şelatlama

Metal iyonları hücreye girdikten sonra, şelatörler ve şaperonlar ile etkileşime girerek taşınmaktadırlar. Şaperonlar, özellikle organellere ve metal-gereksinimli proteinlere metal iyonu iletirler. Şelatörler ise sitosolik metal konsantrasyonlarının korunabilmesi için metal detoksifikasyonuna katkı sağlarlar. Bitkilerde çeşitli metal-şelatörler bulunmaktadır. Metal- şelatörler; fitoşelatinleri, metalotioneinler ve organik asit ve aminoasitleri içermektedir (Clemens, 2001). Bitki hücrelerinde, ağır-metal bağlayıcı ligandlar arasında fitoşelatinler (PC'ler) ve metalotioneinler (MT'ler) en iyi tanımlanmış olanlardır (Cobbett and Goldsbrough, 2002).

1.1.3.1 Fitoşelatinler

Fitoşelatinler, küçük, metal-bağlama özelliğine sahip, sistein-zengin polipeptid içeren yapılardır. Fitoşelatinler sadece bitkilerde değil funguslarda ve diğer organizmalarda da bulunmaktadır (Grill et al., 1985; Gekeler et al., 1988; Piechalak et al., 2002). Bitkiler, sülfür-hidril (-SH) içeren peptidlerin sentezlenmesi aracılığı ile yüksek konsantrasyonlardaki ağır metal iyonlarına yanıt vermektedir. Peptidlerin genel yapısı $[(\gamma\text{-L-glutamin-L-sistein})_n\text{-glisin}]$ şeklindedir (Rauser, 1990). Bu peptidler, yapısı ve metal-bağlayıcı özelliği nedeniyle Sınıf III metalotioneinler olarak sınıflandırılmaktadır fakat bunlar Fitoşelatinler (PC'ler) olarak isimlendirilmektedir (Grill et al., 1985; Kägi, 1993). Fitoşelatinler, PC sentaz enzimi (EC. 2.3.2.15) tarafından glutatyon (GSH)'dan direkt enzimatik olarak sentezlenmektedir (Grill et al., 1989; Cobbett, 2000) (Şekil 1.3). Bitkilerde, glutatyon iki adımda enzimatik olarak sentezlenir. İlk adımda γ -glutaminsistein sentaz (GCS), γ -glutamin-sistein oluşumunu katalizlenir, ikinci adımda ise; GSH sentaz (GS), glisin rezidülerinin eklenmesi ile GSH üretimini katalizler (Cobbett et al., 1998). Fitoşelatinler (PC'ler), toksik metal iyonları ile sitosolde kompleksler oluştururlar ve sonra metal iyonlarını vakuollere taşırlar (Salt and Rauser, 1995). Bu sayede bitkiler, ağır metallerin zararlı etkilerinden korunmuş olurlar.



Şekil 1.3 Fitoşelatin biyosentez yolağı (Rauser, 1990).

1.1.3.2 Metalotioninler

Metalotioneinler (MT'ler), düşük moleküler ağırlıklı, metal detoksifikasyonunda oldukça önemli, sisteince zengin metal-bağlayıcı proteinlerin oluşturduğu bir ailedir (Robinson et al., 1993). Metalotioneinler, reaktif oksijen türlerinin (ROS) seviyelerini kontrol altında tutma yeteneğine sahiptirler. Bu sayede, hem diğer abiyotik streslere karşı toleransı sağlarlar hemde metal iyonlarının biriktirilmesini gerçekleştirirler (Xue et al., 2009; Yang et al., 2009). Metalotioneinlerin genel anlamda fizyolojik görevleri;

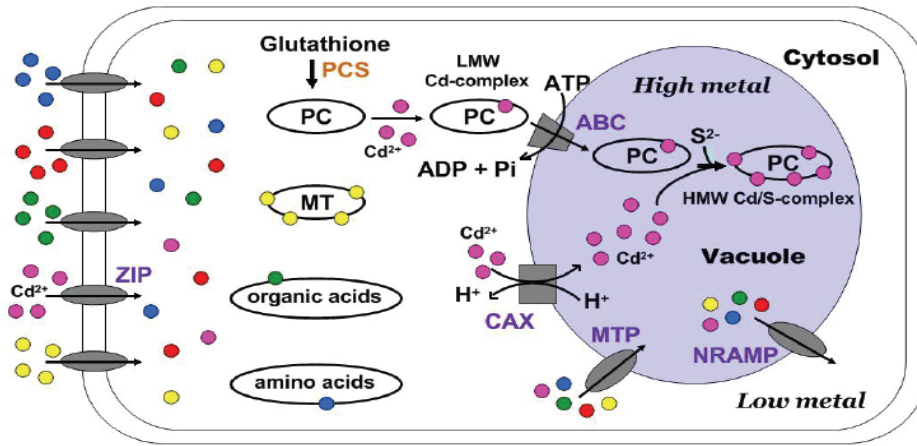
- a) Esansiyel geçiş metallerinin homeostazisinin sürdürülmesine katılmak,
- b) Civa ve kadmiyum gibi toksik metallerini ayrı tutma,
- c) Hücre içi oksidatif hasara karşı korumadır.

Metalotioneinler, memelilerde Cd^{+2} ve Zn^{+2} 'ye toleransta ve ağır metal homeostazisinde (Masters et al., 1994); mayalarda ise Cu ve Cd^{+2} 'ye toleransta görev almaktadır (Hamer et al., 1985; Yu et al., 1994). Metalotioneinler, bitkilerde ilk defa buğdayda Zn^{+2} bağlamada tanımlanmıştır (Lane et al., 1987). Daha sonra 50'den fazla MT-benzeri sekanslar bitkilerde bulunmuştur (Rausser, 1999).

1.1.3.3 Organik Asitler Ve Amino Asitler

Doğal habitatlarında metal-tolerant bitkilerin çeşitli ekotiplerinde organik asitlerin farklı konsantrasyonlarda bulunması bu asitlerin, hücresel şelatörler olabileceğini düşündürmüştür (Rausser, 1999). Düşük moleküler ağırlıklı organik asitler, toprakta bulunan bitki büyümesi için gerekli olan demir (Fe), fosfor (P) ve diğer metallerin kök hücrelerine girmesinde önemli rol oynar (Römheld and Awad, 2000; Yang and Crowley, 2000). Çeşitli bitki türleri, bitki büyümesini sınırlandırıcı etkiye sahip alüminyumun toksik seviyelerini (Al^{+3}) içeren topraklarda büyümeyi sağlamak için çeşitli mekanizmalar geliştirmiştir. Bazı bitkiler ise rizosferde alüminyumu şelatlayıp organik asitleri serbest bırakarak alüminyumu detoksifiye etmektedirler (Ma et al., 2001). Sitrat, oksalat, malat gibi

organik asitler tarafından hücre dışı şelatlama alüminyum toleransında oldukça önemlidir. Malat, buğday bitkisinin Al-tolerant kùltivarlarının köklerinden serbest bırakılır; sitrat, mısır ve soya fasulyesinin Al-tolerant kùltivarlarının köklerinden; okzalot ise karabuğday bitkisinin köklerinden serbest bırakılmaktadır (Delhaize et al., 1993; Pellet et al., 1995; Ma et al., 1997a; Yang et al., 2001; Ma et al., 1997b; Ma ve Miyasaka, 1998). Özellikle histidin ve prolin gibi bazı aminoasitlerin, bitki hücrelerinde ve ksilem özsuyunda metal iyonlarının şelatlanmasında görev aldığı saptanmıştır (Rai, 2002). Ayrıca, araştırmalar sonucunda birçok bitkinin ağır metale maruz kaldığında prolin biriktirdiğı belirlenmiştir (Alia and Saradhi, 1991; Basi ve Sharma 1993a,b; Costa and Morel 1994; Talanova et al., 2000) (Şekil 1.4).



Şekil 1.4 Bitkilerde ağır metallerin vakuoller ayrılması (Yang and Chu, 2011).

1.1.4 Bitkilerde Ağır Metal Toksisitesinden Oluşan Oksitadif Stres

Bitkiler farklı metabolik süreçler boyunca reaktif oksijen türleri (ROS) üretirler. Ağır metaller, bitkilerde O_2^- , OH^- ve H_2O_2 , tekli oksijen (O_2) gibi ROS'ların oluşumunda direkt ve indirekt olarak hasara neden olur (Laspina et al., 2005; Ferreira et al., 2010). Bitki hücrelerinde; klorofil, mitokondri ve peroksizomlar gibi yüksek oksitleyici aktiviteye sahip olan organeller, üretilen ROS'ların en önemli depo yerleridir (Hossain et al., 2011; Apel et al., 2004;

Mittler et al., 2004; Mhamdi et al., 2010). ROS'ların yüksek seviyeleri hücrel yapılar ve lipid, protein ve DNA benzeri makro moleküller için zararlıdır. Ağır metal stresine maruz kalınması sonucu oksidatif hasarın meydana geldiği bir çok araştırmada saptanmıştır (De Vos et al., 1992; Gallego et al., 1999). Fotosistem II (PS II) reaksiyon merkezinde, Ca^{+2} ve Mn^{+2} 'nin ağır metal kadmiyum (Cd) ile yer değiştirmesi PS II'nin su oksitleyici sistemini etkilemektedir. PS II'nin reaksiyonunun bu şekilde engellenmesi, klorofil II'de elektron transportunun bozulmasına neden olmaktadır (Baszynski et al., 1980; Krantev et al., 2008).

Ağır metal etkisi, fotosentezin karboksilasyon fazında görülmektedir. Ağır metaller en çok CO_2 fiksasyonundaki iki enzime etki ederler. Bunlar; Ribuloz-1, 5-bifosfat karboksilaz/oksigenaz (RuBisCO) ve Fosfoenol pirüvat karboksilaz (PEPC) enzimleridir. Bu durum; yapısal hasarlara ve karboksilasyon reaksiyonunun önemli kofaktörü olan Ca^{+2} iyonlarının yerine Mg^{+2} iyonlarının kullanılması sonucu RuBisCO'nun aktivitesini düşürmektedir (Krantev et al., 2008; Siedlecka et al., 1998). Peroksizomlardaki Ksantin oksidaz; O_2^- ve glikolat oksidaz, Flavin oksidaz ve β -oksidasyon ürünü H_2O_2 'yi meydana getirmektedir (Corpas et al., 2001; del Rio et al., 2006). Peroksizomal değişkenlikten dolayı oluşan ROS artışı, ağır metallerin etkisi sonucu meydana gelmektedir (Sharma et al., 2008; Rodriguez-Serrano et al., 2009). Cd stresi, yaprak peroksizomlarında H_2O_2 'nin hızlı bir şekilde indüklenmesini sağlar (Romero-Puertas et al., 2004). Bitki mitokondrileri, ROS üretiminin gerçekleştiği önemli kaynak yerleridir. Ağır metallerin oluşturduğu stres sonucu mitokondriyal fonksiyonların düştüğü saptanmıştır (Tan et al., 2010; Heyno et al., 2008). Buğday, *Vicia faba*, *Arabidopsis* ve bezelyede yapılan sırasıyla Ni, Pb, Cu ve Cd streslerine yanıt olarak NADPH oksidaz nedeniyle oksidatif stresin oluştuğu saptanmıştır (Hao et al., 2006; Remans et al., 2010).

1.2 Bitkilerde GABA Metabolizması

Gama-aminobutirik asit (GABA), protein yapısında olmayan, moleküler ağırlığı 103.1 dalton olan (Bown et al., 1997), dört karbonlu, serbest amino asit havuzunun önemli bileşenlerinden olan bir amino asittir (Akama ve Takaima, 2007). Yapısında α -karbonundan farklı olarak γ -karbonu bulundurmaktadır.

GABA hemen hemen tüm prokaryotik ve ökaryotik organizmalarda bulunmaktadır. GABA ilk olarak, 1949 yılında patates (*Solanum tuberosum*) yumru dokularında saptanmıştır (Steward et al., 1949). Kısa bir süre sonra omurgalılarda da keşfedilmiştir. GABA'nın hayvanlarda keşfedilmesinden sonra ilginç olarak GABA'ya duyulan ilgi hayvanlara doğru kaymıştır (Bouche ve Fromm, 2004). Çünkü GABA, beyinde yüksek seviyelerde saptanmış ve nörotransmisyonunda temel rol alarak merkezi sinir sisteminde nörotransmitterlerin en önemli inhibitörü olarak görev aldığı belirlenmiştir.

Memelilerin merkezi sinir sisteminde, GABA temel nörotransmitter inhibitörüdür. GABA, presinaptik yada postsinaptik membranlarda bulunan spesifik reseptörlere bağlanarak sinaptik transmisyonun inhibe olmasına aracılık etmektedir. Beyin hücrelerinde 2 tip reseptör bulunmaktadır; ilk grup ligand-kapılı reseptörler olan iyonotropik reseptörler (GABA_A ve GABA_C reseptörleri) ve ikinci grup ise G proteinlerine bağlı olan metabotropik reseptörler (GABA_B reseptörleri). Ayrıca GABA reseptörleri kalp, karaciğer, ovaryum, testis gibi uyarılmayan organlarda da eksprese olmaktadır (Calver et al. 2000). Tüm bu bulgular GABA'nın sadece beyinde değil diğer organlarda da sinyal molekülü olarak rol oynadığı saptanmıştır. GABA'nın olgun nöronlardaki nörotransmitter fonksiyonu; sinir sisteminin gelişimini de içermektedir. Örneğin; nöronal göç, proliferasyon, farklılaşma. Tüm bu etkiler GABA reseptörlerinin aktive olması ile gerçekleşmektedir. GABA reseptörleri olgunlaşmamış beyindeki membranların depolarizasyonunu da uyarmaktadır. Sonuç olarak, memeli beyinde GABA nöral transmisyonunda ve gelişiminde temel rol oynar ve bu rolünü de spesifik reseptörlere ve transporterlara bağlanarak gerçekleştirir.

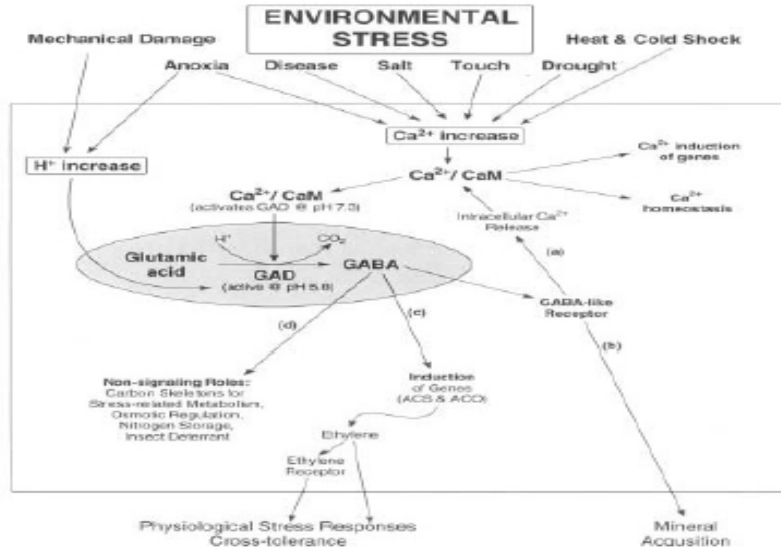
Bitkiler ise hareket edememe özelliklerinden dolayı çevresel stresi azaltmak için kimyasal yanıtlar oluştururlar. GABA'nın da bulunduğu birçok mekanizma bitkilerde bu yanıtların oluşmasını sağlamaktadır (Shelp et al., 1999, Snedden ve Fromm 1999; Kinnersley ve Turano 2000). Omurgalılarla karşılaştırıldığında, bitkilerdeki GABA'nın rolü hala tam olarak belirlenememiştir. Hayvanlardaki temel inhibitör nörotransmitter gibi karakterize edilmesinden farklı olarak, bitkilerde GABA'nın keşfi ağırlıklı olarak metabolik fonksiyon üzerine odaklanmıştır. Buna rağmen, yakın zamanlarda bu aminoasitin stres koşullarına ve

C/N metabolizmasına karşı yanıtta önemli derecede sinyal rolü taşıdığı gösterilmiştir (Bouché ve Fromm, 2004). GABA'nın, özellikle sürgün dokularında dikkate değer biçimde ve hızlıca birikmesi çeşitli streslere karşı yanıtlarda rol oynadığı üzerinde düşünülmesini sağlamıştır. GABA, çeşitli stresler (azot eksikliği, hipoksiya, kuraklık, soğuk, UV stresi, ısı şoku, CO₂ artması) altında; sürgün, kök, nodül, çiçek ve meyve gibi bitkilerin çeşitli kısımlarında birikim gösterdiği saptanılmıştır (Sulieman ve Schulze, 2010; Serraj et al., 1998; Shelp et al., 2009) (Şekil 1.5).

Stress/treatment	Organ/tissue	Reference
Water deficit	Nodules, xylem	Serraj, et al. ¹⁵
Water logging	Xylem, root, nodules	Puiatti and Sodek ⁴¹
Hypoxia (N ₂ exposure)	Leaves, nodules, root	Serraj, et al. ¹⁵
Salt stress	Roots	Xing, et al. ⁴²
Cold stress	Leaves	Wallace, et al. ⁴³
Mechanical damage	Leaves	Wallace, et al. ⁴³
N stress	Xylem, root, nodules	Lima and Sodek ⁴⁴
	Xylem	Antunes, et al. ⁴⁵

Şekil 1.5 Çeşitli stresler altında farklı bitki dokularında GABA birikimi (Sulieman et al., 2011).

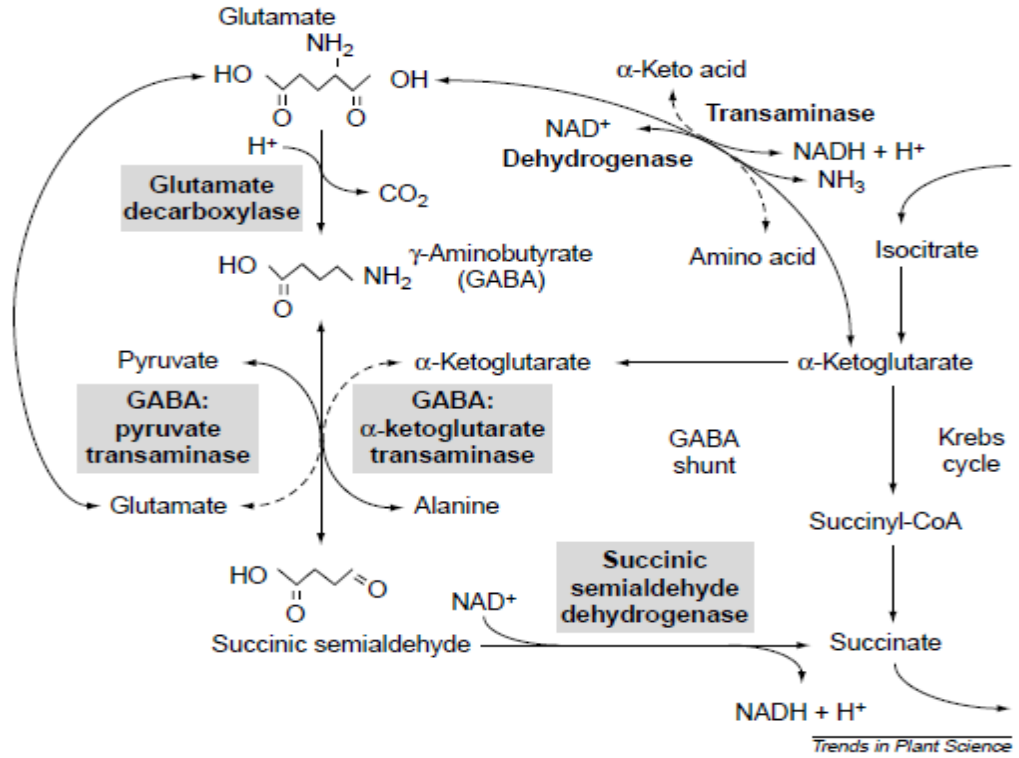
Bitkilerde GABA için sinyalizasyon, hücrelere öncülük etme, böceklerle karşı savunma, pH düzenlenmesi, redoks düzenlenmesi, enerji ayarlanması, stres yanıtları, karbon ve azot metabolizmalarında görev alması gibi birden fazla roller önerilmiştir (Satya Narayan ve Nair, 1990; Kinnersley ve Turano, 2000; Bouche et al., 2003; Bouche ve Fromm, 2004; Fait et al., 2005). Stres yanıtlarında GABA'nın arabulucu rolü olduğu da öne sürülmüştür. Çünkü stres koşullarına (mekanik yaralanma, tuz, sıcak, soğuk, kuraklık...vb.) maruz kalan bitki dokularında GABA'nın biriktiği saptanmıştır (Şekil 1.6), (Kinnersley and Turano, 2000). Fakat, stres yada stres olmayan koşullarda, GABA karbon ve azot metabolizmasında ve TCA döngüsünde ayrılmaz bir parça olarak ta fonksiyon göstermektedir (Fait et al., 2007).



Şekil 1.6 Bitki stres yanıtlarında GABA'nın rolü (Turano and Kinnersly, 2000).

1.2.1 GABA Yolu

Klasik tanımlamalara göre GABA yolu; sırasıyla Glutamat dekarboksilaz (GAD, EC 4.1.1.15), GABA transaminaz (GABA-T; EC 2.6.1.19) ve Süksinik semialdehit dehidrogenaz (SSADH; EC 1.2.1.16) enzimlerinin görev aldığı üç temel reaksiyondan meydana gelen bir yoldur. Bitkilerde, glutamatın GAD tarafından sitozolik dekarboksilasyonu sonucu GABA meydana gelmektedir ve bu reaksiyon Ca^{+2} /kalmodulin tarafından kontrol edilmektedir (Snedden ve Fromm, 2001). GABA-T, pirüvatı yada 2-okzoglutaratı (2OG) amino akseptörü olarak kullanarak GABA'nın Süksinik semialdehite (SSA) dönüşümünü katalizlemektedir. Pirüvatın kullanılması alanin (Ala) oluşumu, 2-okzoglutaratın (2OG) kullanılması ile de Glu oluşumu meydana gelmektedir ve böylece anlamsız bir döngünün oluşması söz konusudur. GABA'nın transaminasyonu ile Glu'nun bir kısmının döngüye yeniden dahil edilmesi sayesinde GABA shunt içine feedback yapılmış olunur (Fernie, 2001; Geigenberger ve Stitt, 2003). SSA oluşumu meydana geldikten sonra SSA, mitokondrial süksinik semi aldehit dehidrogenaz (SSADH, EC 1.2.1.16) ile süksinata okside edilir (Busch ve Fromm, 1999). Alternatif olarak, gama hidroksibütirat (GHB) üreten gama hidroksibütirat dehidrogenazın aktivitesiyle SSA sitosolde indirgenebilir (Breitkreuz et al., 2003) (Şekil 1.7).

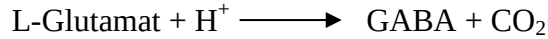


Şekil 1.7 Gama-aminobutirik asit (GABA) yolunun şematik gösterimi (Shelp et al., 1999).

1.2.1.1 Glutamat Dekarboksilaz (GAD; EC 4.1.1.15)

Glutamat dekarboksilaz (GAD) aktivitesi sitozolle sınırlı olan, L-glutamat için spesifik olan, pH ~5.8'de maksimum aktiviteye sahip olan (Barry et al., 1999) ve pH ve Ca^{+2} /kalmodulin (CaM) tarafından düzenlenen bir enzimdir. Çeşitli stres koşulları altında bazı bitki türlerinde GAD'ın proton-tüketici reaksiyonunun sitozolik asidosis tarafından sınırlandırıldığına inanılmaktadır (Shelp et al., 2011). Glu konsantrasyonu, Ca^{+2} /kalmodulin (CaM) ve H^+ tarafından GAD aktivitesinin artması, GABA birikimi için gereklidir (Şekil 1.8), (Shelp et al., 2012a). Protein sentezinin azalması, protein degradasyonunun artması yada glutamin sentezinin sınırlandırılması gibi uzun süreli koşullar altında, sitozolik GAD'ın bulunduğu yerde substrat seviyesinin artması sonucu GABA düzeyinde de bir artma olduğu saptanmıştır (Shelp et al., 1999). Bu sonuçlar göstermektedir ki GAD, GABA birikiminin artması için gerekli olan temel faktördür. GAD genleri bir çok bitki türünde tanımlanmıştır. Tütünde (McLean et al., 2003), çamda (Molina-Rueda et al., 2010), pirinçte (Liu et al., 2004; Akama ve Takaiwa, 2007), domateste (Kisaka et al., 2006), *Panax ginseng* (Lee et al., 2010), petunyada (Yuan ve Vogel,

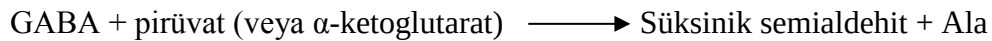
1998) ve *Arabidopsis thaliana* (Shelp et al., 1999). *Arabidopsis*'te 5 tane GAD geni saptanmıştır. GAD izoformlarından ikisi (GAD1 ve GAD2) farklı organlarda tanımlanmıştır: GAD1 kökte bulunurken, GAD2 tüm organlarda saptanmıştır (Zik et al., 1998; Turano ve Fang; 1998). Bu sonuçlar doğrultusunda farklı GAD izoformlarının özel fonksiyonlarda olduğu ve dokuya bağımlı bir yolda ifade olduğu düşünülmektedir.



Şekil 1.8 GAD enzim aktivitesi aracılığı ile glutamattan GABA oluşumunun şematik gösterimi.

1.2.1.2 GABA Transaminaz (GABA-T; EC 2.6.1.19)

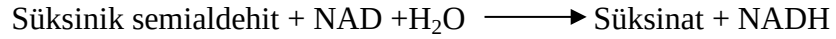
GABA transaminaz (GABA-T; EC 2.6.1.19), amino akseptörü olarak ya α -ketoglutaratı (GABA-TK) yada pirüvatı (GABA-TP) kullanarak, GABA'nın süksinik semialdehite dönüşümünü katalizlemektedir (Şekil 1.9) ve bu reaksiyon sonucunda alanin veya glutamat oluşmaktadır (Bouche and Fromm 2004). GABA-T'nin, soyafasülyesinde yapılan çalışmalar sonucunda mitokondride lokalize olduğu saptanmıştır ayrıca *Arabidopsis* ile yapılan çalışmalar sonucunda ise GABA-T'nin aktivitesinin pH 9.0 ile 9.5 arasında gerçekleştiği ve GABA'ya spesifik olduğu saptanmıştır (Clark et al., 2009). İn vitro çalışmalar sonucunda rekombinant *Arabidopsis* GABA-TP'nin pirüvatı kullanıp, α -ketoglutaratı kullanmadığı saptanmıştır (Cauwenberghe et al., 2002). Bitkilerde, spesifik fonksiyonlara sahip GABA-T'nin farklı türleri aracılığı ile GABA-T'nin transaminasyonu meydana gelmektedir.



Şekil 1.9 GABA'nın GABA-T tarafından Süksinik semialdehite katalizlanmasının şematik gösterimi.

1.2.1.3 Süksinik Semialdehit Dehidrogenaz (SSADH; EC 1.2.1.16)

Süksinik semialdehit dehidrogenaz (SSADH; EC 1.2.1.16) patates yumruları ve *Arabidopsis* hücre kültürleri ile yapılan çalışmalarda mitokondride lokalize olduğu saptanmıştır (Breitkreuz ve Shelp, 1995). SSADH enzimi, Süksinik semialdehitin Süksinata dönüşümünü katalizlamaktadır (Şekil 1.10). *Arabidopsis* SSADH'ın aktivitesinin optimum pH 9.0 ile 10.0 arasında olduğu ve bu enzimin tersinir olmadığı saptanmıştır. Ayrıca SSADH'ın yüksek düzeyde SSA ve NAD'a spesifik olduğu ve bu enzimin NADH'ın NAD'a dönüşüm oranı tarafından regüle edildiği saptanmıştır (Shelp, 2011). SSADH özellikle hem ATP hem de NADH enzim aktivitesini negatif olarak düzenlemektedir.

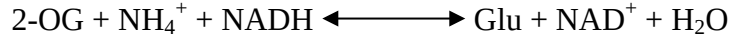


Şekil 1.10 Süksinik semialdehitin SSADH tarafından Süksinata dönüşümünün şematik gösterimi.

1.2.1.4 Glutamat Dehidrogenaz (GDH; EC 1.4.1.2)

Hayvanlarda olduğu gibi bitkilerde de GABA, 2-okzoglutarattan (2-OG) sentezlenmektedir. 2-OG, glutamat dehidrogenaz enzimi (GDH) aracılığı ile glutamata dönüştürülür (Şekil 1.11). Kofaktör NAD(P)H varlığında α -ketoglutaratın indirgeyici aminasyonunu gerçekleştirerek GDH enzimi, glutamat oluşumunu sağlar (Turano et al., 1996). Bu nedenle, GDH enzimi kofaktör tercihin ve hücre içi lokalizasyonuna göre çeşitli izoformlara sahiptir. GDH izoformları gelişimsel ve çevresel koşullar nedeni ile farklı bitki dokularında farklı seviyelerde bulunabilmektedir (Turano et al., 1996). McKeinze ve Lees (1981)'in yaptıkları çalışmada, tohum ve kökten ekstrakte edilen GDH enziminin mitokondride lokalize olduğu belirlenmiştir. Çimlenen soya fasülyesi tohumlarında yapılan çalışmada üç farklı GDH izoformu (GDH1, GDH2, GDH3) tespit edilmiştir (Turano et al., 1996). GDH1 ve GDH2 kotiledonlardan, GDH3 ise hipokotillerden ve köklerden elde edilen protein ekstraktlarında saptanmıştır (Turano et al., 1996). GDH'ın bu farklı izoformları farklı genler tarafından kodlanmaktadır. *Arabidopsis* (Cammaerts ve Jacobs, 1983) ve mısırdaki (Pryor, 1979; Goodman et al., 1980; Sakakibara et al., 1995) yapılan moleküler ve

genetik çalışmaların sonucunda GDH izoformlarının iki farklı polipeptitten oluştuğu ve iki farklı lokus tarafından kodlandığı saptanmıştır.



Şekil 1.11 2-okzoglutarattan (2-OG) GDH aracılığı ile Glutamat oluşumunun şematik gösterimi.

1.2.2 Gaba Yolunun Düzenlenmesi

1.2.2.1 GAD Aktivitesi Yoluyla Düzenlenmesi

GAD, sitosolik bir enzimdir ve sitosolik asidosisin sonucunda stresle uyarılan GABA sentezinde yer alır (Snedden et al., 1992). *E.coli* de hücrel pH'ı kontrol eden GAD'ın aktivitesinin 3.8 gibi düşük pH'larda uyarıldığı saptanmıştır (Shukuya ve Schwert, 1960; Castanie-Cornet et al., 1999). Yapılan çalışmalarda bitki GAD'larının da mikroorganizmalarda olduğu gibi hücrel asiditenin düşmesi ile fonksiyon gösterdiği saptanmıştır (Davies, 1980; Satya Narayan ve Nair, 1990; Snedden et al., 1992; Crawford et al., 1994). GAD aktivitesinin aktivasyonu ve GABA birikimi için birçok model önerilmiştir. Bu modellerin çoğu GAD'ın uyarılması için farklı görüşler belirtilmiştir. Bunlardan bir tanesi; GAD'ın uyarılmasının başlıca Ca^{+2} / CaM yolu ile meydana geldiğini, bir başkası ise; pH değişmesi ile GAD'ın uyarıldığını düşünmektedir (Snedden ve Fromm, 1999; Shelp et al., 1999). Her iki modelde de en az derecede de olsa GAD aktivitesi artmaktadır, buna bağlı olarak da GABA birikimi saptanmıştır. GABA'nın hücrel birikime bağlı düzenlenmesi doğal ve birçok strese karşı oluşabilmektedir. Sitosolik Ca^{+2} seviyesinin artışı birçok stres tarafından gerçekleşmektedir (Sanders et al., 1999). Artan sitosolik Ca^{+2} formları CaM ile kompleks oluşturur. Oluşan bu kompleks (Ca^{+2} / CaM) fizyolojik pH değişikliğinde GAD'ı aktive eder. GAD'ın aktif hale gelmesi sonucunda GABA birikimi sağlanır (Roberts et al., 1984; Aurisano et al., 1995).

Ayrıca erken prekürsör-ürün ilişkisi; süksinatın, α -ketoglutarattan ziyade GABA shunt yoluyla birincil olarak türetildiğini belirtir. Böylece, glutamin sentetaz yoluyla NH_3 (amonyak) fotorespirasyon sisteminin döngüsü, GAD

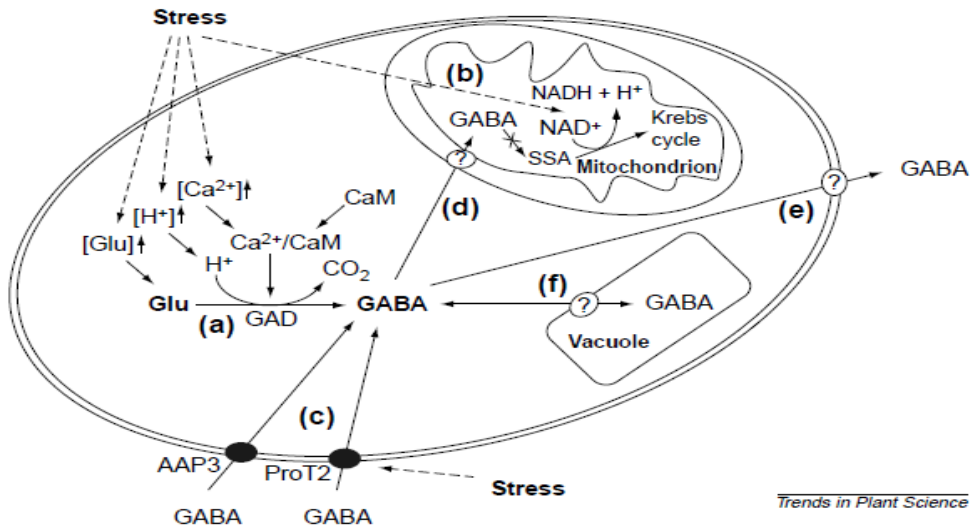
tarafından kullanıldığı için glutamatın kullanılabilirliğini arttırması yoluyla aminoasetonitril tarafından kısıtlanır (Shelp et al., 1992; Cholewa et al., 1997). Benzer şekilde, arttırılmış GABA seviyesi, protein degradasyonunun artması veya protein sentezinin azalması, glutamin sentezinin sınırlanması gibi uzun süreli koşullar altında meydana gelir. Bu GABA seviyesindeki artışlar muhtemelen, sitosolik GAD'ın çevresindeki substratda meydana gelen artışlar tarafından oluşmaktadır. Artan GAD aktivitesi muhtemelen GABA birikiminin teşvik edilmesinde önemli bir faktör olmasına rağmen, GABA-T ve SSADH tarafından azaltılmış katabolizması da ihmal edilemez (Shelp et al., 1995; Cauwenberghe ve Shelp).

1.2.2.2 Hücre içi ve Hücre dışı Taşınım ile Düzenlenmesi

Gelişmiş soya fasulyesi kotiledonlarından hazırlanan preparatlar ile yapılan çalışmalar sonucu GABA yolu enzimlerinin hücreiçi bölümlerde lokalize olduğu saptanmıştır (Shelp et al., 1995). GABA yolunun önemli enzimlerinden ikisi olan GABA-T ve SSADH mitokondride lokalize olmakta iken, GAD sadece sitosolde bulunmaktadır. Böylece, oluşan GABA'nın sitosolden mitokondri membranlarındaki matriks içine doğru taşınımı saptanmıştır.

GABA-taşıyıcısı eksik maya mutantlarının heterolog tamamlanması ile GABA'yı taşıyan AtProT2 (*Arabidopsis thaliana* prolin taşıyıcısı 2) tanımlanmıştır. Bu taşıyıcının; glisin, betain ve prolin gibi diğer stresle ilgili bileşenler için daha az etkili olduğu belirlenmiştir. Özellikle, benzer substrat spesifikliği, AtProT ailesinin diğer 3 plazma membranında lokalize olan üyelerinde gözlenmiştir (Grallath et al., 2005). *Arabidopsis* aminoasit taşıyıcı ailesinin (AtGAT1) üyeleri; mayada (*Saccharomyces cerevisiae*) ve kurbağa (*Xenopus laevis*) oositlerinde fonksiyonel olarak karakterize edilmiştir ve bu taşıyıcıların proton ile çalıştığı bulunmuştur. Ayrıca GABA ($K_m = 47 \mu M$) ve plazma membranı boyunca diğer taşıyıcılar, ilgili bileşenler için yüksek afiniteli taşıyıcı olarak hareket ederler (Meyer et al., 2006). Tütün (*Nicotiana tabacum*) protoplastlarında, GAT1-GFP füzyonunun geçici ifadesi, plazma membranında lokalize olduğunu ortaya koymuştur. Daha yakın zamanlarda, *Arabidopsis* aminoasit/ poliamin/ organocation (APC) taşıyıcı ailesinin (GABP, GABA

permeaz) üyeleri, mikroorganizmalarda sekans homolojisi analizi ile tespit edilmiş ve tanımlanmıştır fakat GABA-taşıyıcı-eksik maya mutantlarında prolin taşıyıcısı tanımlanamamıştır (Michaeli et al., 2011). Daha önemlisi, GABP, izole edilmiş mitokondri tarafından $[^3H]$ GABA'nın alınımına aracılık ettiği gösterilmiştir. Hücre içi fraksiyon ve immunoblotlama ile yapılan tütün yaprak ve protoplast çalışmalarında GABP-GFP'nin geçici ifadesi, GABP'nin mitokondride lokalize olduğunu açıklığa kavuşturmuştur. Ancak protein için hedefleme bilgileri olarak karakterize edilememiştir. İlginç olarak GABA alınımlı, *gabp* mutantlarından izole edilen mitokondrilerde tamamen tespit edilememiştir ve GABA için taşıyıcı etkinliği belirlenememiştir. Bu nedenle, geniş substrat spesifikliğı ile diğer taşıyıcılar mitokondri içine GABA'nın alınımına katkı sağlamaktadır (Şekil 1.12).



Şekil 1.12 Biyotik ve Abiyotik streslerde, hücreiçi ve hücre dışı taşınımı tarafından GABA seviyesinin düzenlenmesi (Shelp et al., 1999).

1.2.3 Bitkilerde GABA İçin Öngörülen Roller

1.2.3.1 Krebs Döngüsünün By-pass Edilmesi

α -ketoglutarat gibi glutamat C'nu krebs döngüsüne girdiği zaman süksinat oluşabilmesi için NAD gereklidir (Bown ve Shelp, 1997). Alternatif olarak, süksinat gibi glutamat C'nu GABA shunt yolağı ile giriş yapabilmektedir ve dehidrogenaz yada transamina reaksiyonları ve Krebs döngüsünün α -ketoglutaratı tarafından by-pass edilmektedir. Bu nedenle, hipoksiya gibi belirli koşullar boyunca respirasyon azalmaktadır ve NAD/NADH oranında da sonuç olarak bir azalma meydana gelmektedir, NAD-bağımlı SSADH reaksiyonu ve Krebs döngüsündeki karbonun girişi sınırlandırılmakta ve böylece GABA birikimi oluşmaktadır. GABA shunt aracılığı ile glutamatın süksinata dönüşüm mekanizması (1 NADH) enerjik olarak Krebs döngüsü aracılığı ile süksinat oluşumuna (1 NADH + 1 ATP) göre daha olumludur. Glutamat dehidrogenaz, Krebs döngüsü içine temel giriş noktası sağlamaktadır ve böylece eklemeli NADH üretimi söz konusudur. Bu nedenle de GABA shunt daha olumlu bir yoldur.

1.2.3.2 Azot Depolamada

Glutamin sentezinin sınırlandırıldığı, protein sentezinin azalması ve protein degradasyonunun artması gibi koşullar altında glutamatın GABA'ya dönüşümü artmaktadır (Satyanarayan ve Nair, 1990; Scott-Taggart et al., 1999). Gelişme sürecinde, soya fasulyelerinde glutamatın GABA'ya metabolize edilmesinde hızlı bir artış saptanmıştır (Micallef ve Shelp, 1989). Ayrıca, glutamatın GABA shunta doğru akış süreci ile glutamatın direkt olarak proteinlerle birleşmesi süreci kıyaslanabilmektedir (Tuin ve Shelp, 1996). Kanıtlar göstermektedir ki glutamat ve GABA, protein depolama ve mobilizasyon süreçleri boyunca üretilmektedir (Micallef ve Shelp, 1989). Bu nedenle, GABA shunt aracılı glutamik asit metabolizmasının bitkilerdeki azot ekonomisinde önemli bir yeri vardır.

İzole edilen vakuollerle yapılan çalışmalar sonucunda, glutamat, GABA ve alaninin %50'sinin vakuol içinde lokalize olduğu belirlenmiştir. (U-14C) ile işaretlenmiş glutamatla yapılan çalışmalarda, yeni sentezlenen 14C-GABA'nın önceden sentezlenen işaretlenmemiş GABA ile dengeli olmadığı saptanmıştır (Chung et al., 1992). Bu sonuçlar göstermektedir ki, GABA'nın üretilmesinin ve birikiminin lokalizasyonun benzer olduğu ve GABA'nın organeller içinde tek başına biriktiği saptanmıştır.

1.2.3.3 Uyumlu Osmolit Olarak GABA

Arabidopsis'teki AtProT2 (Breitkreuz et al., 1999) ve domatesteki LeProT1 (Schwacke et al., 1999) taşıyıcıları su stresi tarafından uyarılırlar ve prolin, glisin betain gibi diğer stres-iliskili bileşenlerin taşınımının dışında bu taşıyıcılar GABA'nın da taşınımını yaparlar (Breitkreuz et al., 1999; Fischer et al., 1998). Bu bulunanlar göstermektedir ki GABA uyumlu bir osmolittir (Yancey, 1994). Bütün üç bileşenler nötral pH'ta çift kutupludur, suda çözünme oranı yüksektir, düşük mM konsantrasyonlarda bile birikme özelliği gösterir ve hücrelerde toksik etki göstermezler. 25-200 mM gibi yüksek konsantrasyonlarda, tuz ve soğuk stresine maruz kalmış tilakoidlerin izole edilemesi ile prolinin aşırı kryoprotektan özelliği sayesinde GABA'nın stabil kaldığı ve korunduğu saptanmıştır (Heber et al, 1971). Ayrıca, aynı konsantrasyonlarda (16 mM) bulunan prolinin ve glisin betainin bulunması, GABA'nın *in vitro* hidroksil-radikal-süpürücü aktiviteye sahip olmasını sağlamaktadır (Smirnoff ve Cumbes, 1989). Belkide GABA; glisin betain sentezinde bulunan aldehit dehidrogenaz tarafından γ -aminobutiraldehit'ten (poliamin katabolik yolağının ürünü) sentezleniyor olabilir (Trossat et al., 1997). Fakat poliamin aracılı akış henüz bilinmemektedir.

1.2.3.4 Bitki Gelişiminde

GAD, Ca^{+2} /kalmodulin bağlama domaini içeren (Baum et al., 1993; Baum et al., 1996), suda çözünebilen, tüm bitki dokularında bulunan ve gelişimsel süreçte transkripsiyon ve posttranskripsiyonel süreçlerle düzenlenen bir proteindir (Schwacke et al., 1999). Kalmodulin bağlama domaini çıkarılmış mutant GAD eksprese eden transgenik tütün bitkilerinde, yüksek GABA seviyeleri, düşük

glutamik asit seviyeleri ve daha az gövde uzaması belirlenmiştir (Baum et al., 1996). Büyüme inhibisyonunun düşük glutamik asit seviyelerinde kaynaklandığı düşünülmese de rağmen, yüksek GABA konsantrasyonları sonucunda *Stellaria* bitkisinde gövde uzamasının inhibe edildiği saptanmıştır (Kathiresan et al., 1998). Mekanik manipülasyonlar sonucunda kısa süreli olarak sitosolik Ca^{+2} 'nin (Knight et al., 1991) ve GABA konsantrasyonunun (Ramputh ve Bown, 1996) arttığı, bunlara bağlı olarak da gövde uzamasının engellendiği saptanmıştır (Jones ve Mitchell, 1989). Gövde uzaması çalışmalarında, manipülasyonlara karşı oluşturulan yanıtın Ca^{+2} şelatörleri ve kalmodulin antagonistleri tarafından bloke edildiği belirlenmiştir.

1.2.3.5 Bitki Savunmasında

Hayvanlarda GABA, inhibitör nörotransmitterdir. Böcekler ve diğer omurgasızlar tarafından uyarılan fagositoz aktivitesi, vakuolar bölümlenmeyi tahrip etmekte, sitosolde H^{+} seviyelerinin artmasını sağlamakta ve GABA sentezini uyarmaktadır. GABA'nın alınımı sonucunda oluşan bu hipoteze göre, normal büyüme ve gelişmenin engellendiği belirlenmiştir (Ramputh ve Bown, 1996). ~2 dakika boyunca mekanik hasara maruz kalma ile oluşan fagositoz aktivitesi sonucunda, soya fasüyesinin yaş ağırlığında $\sim 2 \mu\text{molg}^{-1}$ GABA seviyesinde artış meydana geldiği saptanmıştır. GABA'nın bu seviyeleri, *Choristoneura rosaceana*'nın larvalarının sentetik diyetinde tanımlanmıştır. Ayrıca, GABA'yı yüksek seviyelerde üreten transgenik tütün bitkilerine, nematodların bir türü olan *Meloidogyne hapla*'ya karşı direnç kazandırır (McLean et al., 2003). Böceklerde GABA'nın zararlı etkisi, periferik sinir sisteminde önemli olan GABA-girişli klorür kanallarının inhibisyonundan kaynaklanmaktadır (Hosie et al., 1997). Ca^{+2} ve pH tarafından düzenlenen GABA'nın hızlı birikimi sadece böcek saldırılarına özgü değildir, ayrıca soğuk, kuraklık, ısı, tuz ve mekanik hasar gibi abiyotik streslere yanıtta meydana gelmektedir (Kinnersley and Turano, 2000).

1.2.3.6 Bitkilerde Sinyal Molekülü Olarak GABA

Kuraklık, sıcaklık, tuz, anoksi koşullar, soğuk ve asidozis gibi bir takım stres koşullarına maruz kalan bitki dokularında hızlı şekilde GABA birikimi olduğu saptanmıştır (reviewed by Snedden and Fromm 1999; Kinnersley and Turano 2000). SSADH geni çıkarılmış Arabidopsis mutantları ile yapılan çalışmalarda GABA shunt yolağının bozulduğu, yüksek düzeylerde ROS birikiminin olduğu ve nekrozis, büyümenin inhibisyonu ve çevresel streslere karşı duyarlılığın arttığı saptanmıştır (Bouche et al. 2003; Fait et al. 2005). Omurgalılarla karşılaştırıldığında, bitkilerdeki GABA'nın rolü hala tam olarak belirlenememiştir. Hayvanlardaki temel inhibitör nörotransmitter gibi karakterize edilmesinden farklı olarak, bitkilerde GABA'nın keşfi ağırlıklı olarak metabolik fonksiyon üzerine odaklanmıştır. Buna rağmen, yakın zamanlarda bu aminoasitin stres koşullarına ve C/N metabolizmasına karşı yanıtta önemli derecede sinyal rolü taşıdığı gösterilmiştir (Bouché ve Fromm, 2004).

1.2.4 GABA Yolunun Diğer Metabolik Yollarla İlişkisi

1.2.4.1 Azot Metabolizması ile GABA Yolunun Etkileşimi

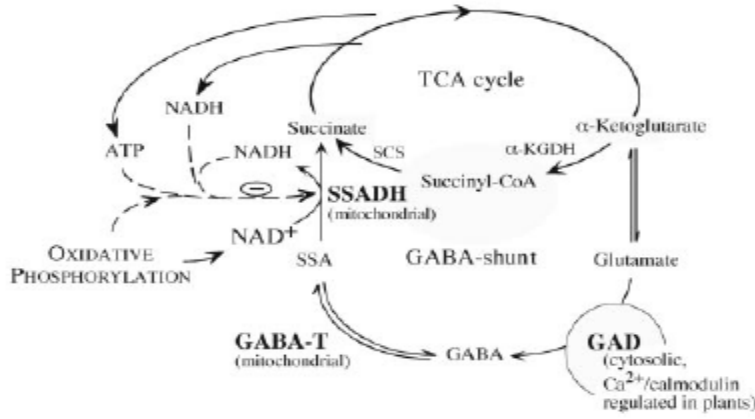
Bitkiler, gen ifadesini düzenleyen yapıların, sensörlerin, taşıyıcıların ve reseptörlerin bulunduğu karmaşık bir sisteme sahiptir (Snead, 2000). Spesifik olarak bu kompleks mekanizmaların koordinasyonu C:N arasındaki dengenin hassasiyetini, şeker seviyesinin düzenlenmesini, azot alınımını ve azot içeriğini içermektedir. GABA shunt, C:N dengesini içeren azot metabolizmasının bir parçası olarak görülmektedir fakat bu görüş hakkında yeteri kadar bilgi bulunmamaktadır. Genellikle inorganik azot glutamin sentetaz/ glutamat sentaz (GS/ GOGAT) yolağı yardımıyla glutamat üreterek asimile edilir, GABA da çoğu aminoasitin sentezindeki başlangıç noktasıdır. GAD seviyelerinde meydana gelen herhangi bir değişim sonucunda eş zamanlı olarak glutamat seviyelerinde de değişiklik olduğu belirlenmiştir (Baum et al., 1996). Ayrıca, GABA sentezinin glutamat düzeyleri ile güçlü şekilde bağımlı olduğu düşünülmüştür ve Masclaux-Daubresse ve ark. (2002) GABA'nın glutamat üretimini tamponlama da baskın bir role sahip olduğu hipotezini ortaya atmıştır. Böylece, GABA'nın geçeci azot depo

metabolitleri olarak görev aldığı düşüncesi doğrulanmıştır (Shelp et al., 1999). Bitkilerde, GABA ve azot metabolizmasının yakın bir ilişki içinde olduğu düşünülmüştür. Bu düşünceye bağlı olarak *Arabidopsiste* yapılan çalışmalar sonucunda, GABA sinyalinin ve spesifik fonksiyonunun azot metabolizması ile bağlantılı olduğu saptanmıştır (Barbosa et al., 2010). *Arabidopsis* fideleri ile yapılan çalışmada ise, dışarıdan uygulanan GABA'nın azot metabolizmasını ve alınımını etkilediği saptanmıştır. Ayrıca buna ek olarak, nitrat redüktaz, glutamat sentaz, fosfoenolpürivat karboksilaz ve azot-karbon metabolizmasına katılan diğer enzimlerin aktivitelerinin de dışarıdan uygulanan GABA ile düzenlendiği bulunmuştur.

1.2.4.2 Solunum ile GABA Yolunun Etkileşimi

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, bitkilerde GABA yolu karbon metabolizmasında temel rol oynadığı (Fait et al., 2008) ve GABA yolu ile Trikarboksilik asit (TCA) döngüsünün fonksiyonunun birbirleri ile bağlantılı olduğu saptanmıştır (Studart-Guimaraes et al., 2007). GABA yolu TCA döngüsünü iki adımda bypass ettiği bilinmektedir (Bouche ve Fromm., 2003) (Şekil 8.). TCA döngüsünde bulunan enzimlerin aktivitelerinin inhibe edilmesi ile oluşturulan antisense bitki ve mutantlar ile yapılan çalışmalar sonucunda süksinat üretiminin arttığı ve buna bağlı olarak ta GABA yolunun aktivitesinin değiştiği saptanmıştır (Lemaitre, 2007). TCA döngüsü-GABA yolu etkileşiminden başka karmaşık bir durum ise; 2-OG-süksinat reaksiyonunun bypass edilmesi için birden fazla olasılığın bulunmasıdır. GABA yolu tarafından gerçekleştirilen 2-OG nin sitosolik dönüşümü ile şekillenen glutamin ve sonraki metabolizmalar, Mitokondride GABA-T'nin etkinliği, SSA ya 2OG'nin direkt dekarboksilasyonudur (Green et al., 2000).

Bu bypassın direk yolu ile ilgili izotop etiketleme çalışmalarında, GABA yolu mitokondrinin süksinat gereksinimini önemli bir oranda sağlayabileceğini düşündürmektedir (Studart-Guimaraes et al., 2007).



Şekil 1.13 GABA ile TCA döngüsünün bağlantısının gösterim şeması. (Bouche et al., 2003)

1.2.4.3 Poliamin Degredasyon Yolağı ile GABA İlişkisi

Son yıllarda yapılan çalışmada, glutamat dekarboksilaz (GAD, EC 4.1.1.15) ve diamin oksidaz (DAO, EC 1.4.3.6) enzimlerinin GABA sentezi için hız-sınırlayıcı enzimler olduğu belirlenmiştir. Bitki hücrelerinde GABA, GAD tarafından katalizlenen Glu'nun dekarboksilasyonu aracılığı ile sentezlenmektedir. Ayrıca, GABA; DAO'nun anahtar enzim olarak görev aldığı poliamin degradasyon reaksiyonundan, γ -aminobütiraldehit aracılığıyla da oluşabilmektedir (Wakte, Kad, Zanan, and Nadaf, 2011). Stress koşulları (hipoksiya, tuz stresi, sıcak ve soğuk şoku, kuraklık, mekanik zedelenme vb.) altında GAD ve DAO aktiviteleri GABA oluşumu için güçlü bir şekilde uyarılmaktadır (Bouche, Lacombe, and Fromm, 2003; Youn, Park, Jang, and Rhee, 2011). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, GABA'nın birikimi için GABA shunt yol ağı üzerinde yoğunlaşılması nedeniyle, poliamin degradasyonu üzerine yapılan çalışmalar kısıtlıdır.

1.3 Hipotez

Yapılan daha önceki çalışmalarımızdan elde ettiğimiz bulgular doğrultusunda ve detaylı literatür araştırması sonucunda çinko sülfat (ZnSO_4) ile indüklenen ağır metal stresi ile gamma-amino bütirik asit (GABA) arasında bir etkileşimin olduğunu belirlemeyi hedefledik. Çalışma projemizin hipotezi; ağır metal stresi ile GABA arasında etkileşimin olduğu ve bu etkileşimin doğrudan yada dolaylı olarak GAD ve GDH enzim aktivitelerinin etkilediği, GABA ve glutamat seviyelerinin değiştiği olmasıdır.

2. MATERYAL VE METOD

2.1 Bitki Materyali ve Yetiştirilmesi

Çalışmalarda *Nicotiana tabacum* bitkisi materyal olarak kullanılmıştır. *Nicotiana tabacum* tohumları 10 dakika % 10'luk hipoklorit çözeltisinde tutularak yüzey sterilizasyonu yapıldı. Daha sonra tohumlar steril deiyonize su (dI-H₂O) ile 5'er kez yıkandı. Tohumların sterilizasyon ve ekim işlemleri Nüve MN 120 marka steril kabinde yapıldı.

Tohumlar Murashinge-Skoog (MS) ortamında çimlendirilmiştir. Besin ortamının pH'ı 5.8 olarak ayarlandıktan sonra süktroz ve agar ilave edildi. Besin ortamı 121 °C'de 1,4 atm basınç koşullarında Nüve marka otoklavda sterilize edildi. Ortam otoklavlanma işleminden sonra oda sıcaklığına ulaşana kadar bekletildi. Besin ortamı otoklavlanmış kültür kaplarına (Magenta, Sigma) her birine yaklaşık 25'er ml gelecek şekilde boşaltıldı. Ortam magentalarda donduktan sonra steril kabinde sterilize edilmiş tohumlar her bir magentaya 9-10'ar tohum olacak şekilde ekildi.

Tohumlar, 16 saat ışık/ 8 saat karanlıkta 25/23 °C'de nem oranı % 70 olan 350 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık yoğunluğunda çimlendirildi. Çimlenme ekim işleminden sonraki 7. ila 10. günler arasında gözlemlendi. Çimlenmeden 1 ay sonra bitkiler içinde perlit bulunan saksılara aktarıldı. Perlite saksılara konulmadan önce saf su ile yıkanarak ıslatıldı. Perlite aktarılan bitkiler ½ oranında seyreltilmiş Hoagland ile sulandı (Hoagland and Arnon, 1950). Perlite büyüme devam eden bitkiler kontrol koşullarında (16 saat ışık/ 8 saat karanlık, 25/23 °C sıcaklık, nem oranı % 70, 350 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık yoğunluğu) büyütülmeye devam edildi.

2.2 Ağır Metal Stresi (ZnSO₄) Uygulanması

Bitkiler yaklaşık 4-5 haftalık büyüklüğe ulaştığında stres uygulaması gerçekleştirildi. Ağır metal stresi uygulaması 3 farklı grup hazırlanarak yapıldı (0, 10 ve 100 μM). Birbirinden bağımsız deneme serileri kuruldu ve bitkiler; kontrol grubu (0 μM ZnSO₄), 10 μM ZnSO₄ grubu ve 100 μM ZnSO₄ ağır metal stresi

uygulanan grup olmak üzere üç gruba ayrıldı.. Bitkiler belirlenen konsantrasyonlarda ZnSO_4 içeren Hoagland solüsyonu ile günlük olarak sulanmıştır ve sulama işlemi örnekler hasat edilinceye kadar devam edildi. Örneklemeler için 3. ve 4. yapraklar kullanıldı Örneklemeler: 0., 7., 14. ve 21. günlerde alındı. Örnekler hasat edildikten hemen sonra sıvı azotta dondurularak analiz edilinceye kadar -80°C 'de saklanmıştır.

2.3 Büyüme Parametreleri

Nicotiana tabacum bitkisine biyotik stresin etkilerinin belirlenmesi için örneklemeler, harpin uygulanan, dH_2O uygulanan ve kontrol grubu olmak üzere 0., 7., 14., ve 21. günlerde seçilen bitkilerden yapılmıştır. Her gruptan deneme serisi başına 5'er bitki kullanıldı. Bitkilerin kök, gövde uzunluğu ve ağırlığı ölçüldü. Örnekler 70°C 'de 72 saat bekletilip kurutulmuştur ve kuru ağırlıklar kaydedildi.

2.3.1 Klorofil Floresans Ölçümü

Klorofil flüoresans ölçümleri, uygulamanın 0., 7., 14., ve 21. gününde yapıldı. Flüoresans ölçümlerinden önce, yaprak üst yüzeyindeki 1cm^2 'lik alan 20 dakika boyunca yaprak klipsleri kullanılarak karanlığa adapte edildi. Bir bitki verim analizi Plant efficient analyser cihazı (Hansatech marka) kullanılarak yaprakların 20 doygun ışık demetine maruz bırakılmasıyla, değişken olmayan bazal klorofil flüoresansı (F_0), maksimum flüoresans uyarılması (F_m), değişken flüoresans (F_v) ve F_v/F_m oranları belirlendi.

2.4 Total Protein Miktarlarının Belirlenmesi

Total protein miktarını belirlemek için -80°C 'de saklanan yapraklar, soğutulmuş havanda sıvı azot yardımıyla, %2 (w/v) polivinilpolipirrolidon (PVPP) ve 1 mM EDTA içeren 0,05 M sodyum fosfat tamponuyla (pH 7.8) homojenize edildi. Homojenat $+4^\circ\text{C}$ 'de 14.000 rpm'de 30 dk santrifüj edilmiş ve oluşan süpernatant enzim aktivitesinin belirlenmesinde kullanıldı. Ekstraksiyon işleminin tamamı $+4^\circ\text{C}$ 'de gerçekleştirildi. Total protein miktarı Bradford

(1976)'a göre bovine serum albumine (BSA) standartları kullanılarak belirlendi. Örneklerin protein miktarları, 50 µl örnek ve 950 µl Bradford boyası içeren 1 ml'lik polistren küvetlerde ölçüldü. Kör ise, 50 µl Na-P tamponu (pH 7.0) ve 950 µl Bradford boyası ile hazırlandı. Örnekler Shimadzu UV-1600 (Shimadzu, Japan) ile 595 nm dalga boyunda ölçüldü.

2.5 Glutamat Dehidrogenaz (GDH) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Örneklerdeki glutamat dehidrogenaz (GDH) enzim aktivitesi ölçümü için önce Akihiro et al. (2008)'a göre ekstraksiyon gerçekleştirildi. Glutamat dehidrogenaz (GDH) enzim aktivitesini belirlemek için 1 g örnek 5 mM EDTA, 0,1 mM Tris-HCl, 10 mM ditiotritol (DTT), 1 mM piridoksal-5-fosfat hidrat ve 1/100 PVPP içeren 3,5 ml homojenizasyon tamponuyla (pH 7.8) homojenize edildi. Homojenatlar +4 °C 10.000 g'de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatantlar, tuzlarından arındırılması için PD-10 Desalting kolonlarından geçirildi. Daha sonra Amicon Ultra marka konsantratörler kullanılarak süpernatantlar konsantre edildi. Enzim aktivitesini belirlemek için 50 mM (NH₄)₂SO₄, 13 mM α-ketoglutarat, 0,25 mM NADPH ve 1 mM CaCl₂, 100 mM Tris-HCl tamponu (pH 8) içinde ayrı ayrı çözüldü. Reaksiyon karışımı için her bir çözeltiden ve örneklerden 200 µl alınarak 340 nm dalga boyunda absorban değerleri saptandı.

2.6 Glutamat Dekarboksilaz (GAD) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Glutamat dekarboksilaz enzim aktivitesi ölçümü için Bartyzel et al. (2003)'un yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde göre dekarboksilasyon, 0,4 ml hacimde 3 mM L-glutamat, 20 µM pridoksal fosfat (PLP), 50 mM K-fosfat tamponu (pH 5,8) ve 100 µl örnek içeren reaksiyon karışımında gerçekleştirildi. Örnek, önce 10 dakika 30°C'de glutamat içermeyen reaksiyon karışımı ile inkübe edildi. Reaksiyon, glutamat eklenmesiyle başlatıldı ve 0,5 M HCl'den 0,1 ml eklenerek 60 dakika sonra durduruldu. Karışımlar 10 dakika 12.500 g'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında örnekler ninhidrin reaktifi ile türevlendirilerek, reaksiyon sonucu oluşan GABA miktarları belirlendi. Ninhidrin çözeltisi 0,35 % (w/v) etanolde çözülerek hazırlandı. Örneklerle 1:5 oranında ninhidrin çözeltisi eklendi ve 10 dakika 80°C'de inkübasyon yapıldı. Oda sıcaklığına getirilen örneklerin, 570

nm'de spektrofotometrede absorbans değerleri belirlendi. Aynı koşullarda absorbans değerleri bilinen GABA standartları ile karşılaştırılarak örneklerdeki GABA miktarı saptandı. GAD aktivitesi enzim birimi olarak dakikada oluşan mmol GABA şeklinde hesaplandı.

2.7 GABA Miktarının Belirlenmesi

Örneklerdeki GABA miktarı HPLC (Shimadzu-VP101, Japan) cihazı ile belirlendi. GABA ekstraksiyonu Baum ve ark.'na (1996) göre, HPLC analizi ise Bor ve ark.'na (2009) göre yapıldı. Bitki örnekleri (0,5 g) sıvı azotta masere edildi ve üzerine 1 mL su: kloroform: metanol (3:5:12 v/v/v) solüsyonu eklendikten sonra örnekler 2 dakika süre ile 10.000 rpm 4⁰C'de santrifüj edildi. Süpernatant üzerine 100 µl dH₂O, 150 µl Borax tamponu (pH 8) ve 250 µl 2-hydroxynaphthaldehyde (HN) (0,3 % w/v) eklendi. Karışım 20 dakika süre ile 80⁰C'lik sıcak su banyosunda bekletildikten sonra hacmi metanol ile 1 mL'ye tamamlandı ve örnek filtresinden geğirildikten sonra HPLC kolonuna uygulandı. HPLC koşulları; enjeksiyon hacmi 20 µl, Kolon Supelco LC18 (250 × 4.6 mm, 5µ), akış hızı 0.5 mL min⁻¹, Mobil faz metanol: su (62:38 v/v) ve dedeksiyon 330 nm UV şeklinde uygulandı. Örneklerdeki GABA miktarı aynı koşullarda yürütölen standartlarla karşılaştırılarak belirlendi.

2.8 Glutamat Miktarının Belirlenmesi

Glutamat miktarının belirlenmesi için ekstraksiyon Akihiro et al. (2008)'a göre geręekleřtirildi. Ekstraksiyon sonrası örnekler 10.000 g de +4 ⁰C 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatantlar alındıktan sonra miktar tayini için küvete; 2 ml dH₂O (25 ⁰C), 100 µl örnek, 500 µl iğerisinde sodyum azide (0.02 % w/v) ilave edilmiş tampon (35 mL, pH 8.6) bulunan solüsyon 1, 200 µl solüsyon 2 (NAD⁺/INT) ve 50 µl süspansiyon 3 (diaphorase) ilave edildi. Yaklaşık 2 dakika, 492 nm'de spektrofotometrede köre karşı okunarak absorbans değeri (A₁) belirlendi. Daha sonra karışıma 50 µl solüsyon 4 (Glutamat dehidrogenaz solüsyonu) ilave edilerek 10 dakika aynı dalga boyundaki absorbans değeri (A₂) kaydedilip, hesaplama ($\Delta A = A_2 - A_1$) yapıldı. Glutamat konsantrasyonu aşağıda verilen formöle göre hesaplanmıştır.

Glutamik Asit içeriği (c) ;

$$\frac{V \text{ (Son hacim)}(\text{ml}) \times MW \text{ (Moleküler Ağırlık)}}{\epsilon(\text{ekstinksiyon katsayısı}) \times \text{ışık yolu}(\text{cm}) \times \text{örnek hacmi (ml)}} \times \Delta AL = \text{glutamik asit (g/L)}$$

L-Glutamik Asit Miktarı ;

$$\frac{\text{cL-glutamik asit (g/L örnek hacmi)}}{\text{Örnek ağırlığı (g/L örnek hacmi)}} \times 100 \text{ (g/100g)}$$

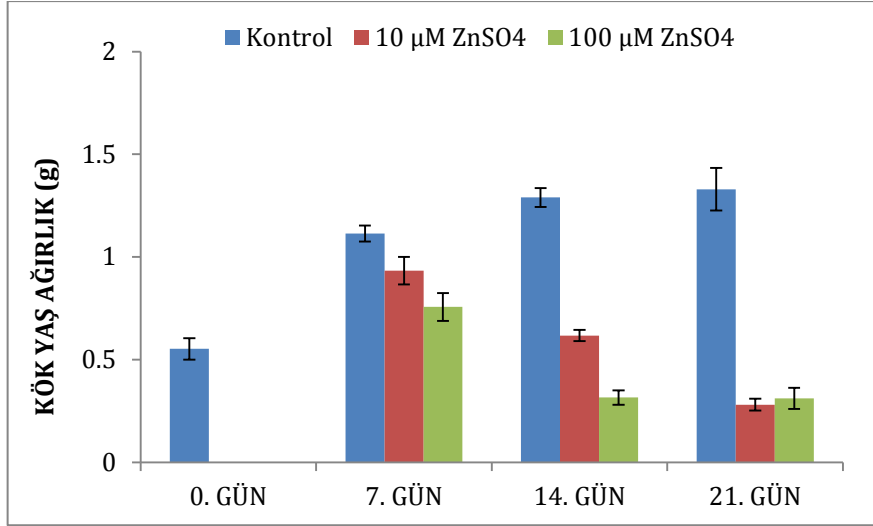
3. BULGULAR

3.1 Büyüme Parametreleri ve Fotosentez Verimi

Ağır metal stresinin tütün (*Nicotiana tabacum*) bitkisi üzerindeki etkilerini belirlemek için 0, 10 ve 100 μM ZnSO_4 uygulanan gruplarda çeşitli büyüme parametreleri ve fotosentez verimindeki değişim 0, 7, 14 ve 21. günlerde belirlendi. Kök, gövde yaş ve kuru ağırlıklarındaki ve fotosentetik verimdeki değişimler tüm gruplarda deneme süresi boyunca kaydedilerek karşılaştırmalı olarak incelendi.

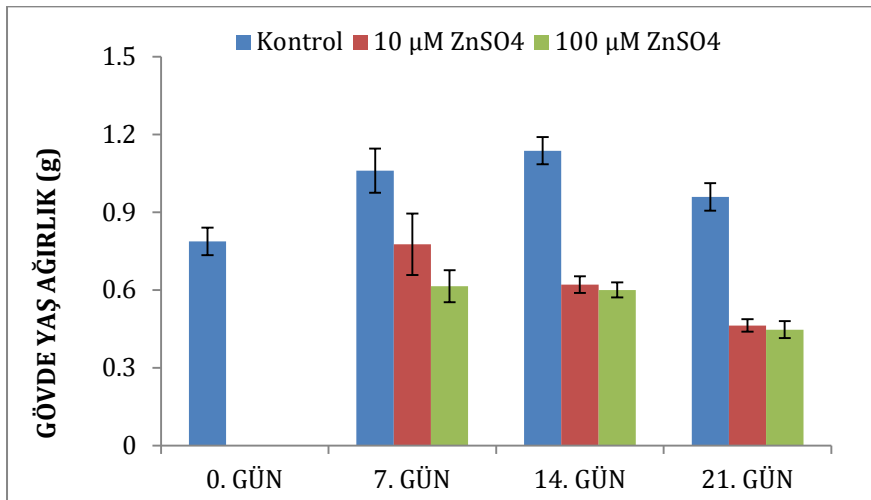
3.1.1 Kök ve Gövde Yaş Ağırlıkları

Kontrol (0 μM), 10 μM ve 100 μM ZnSO_4 uygulanan gruplarda kök ve gövde yaş ağırlıkları tartılarak kaydedildi. Sonuçlara ait veriler şekiller 3.1 ve 3.2 de verildi. Kök yaş ağırlığında stres uygulamasının 7., 14. ve 21. günlerde belirgin değişimler kaydedildi. 7. günde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, 10 μM ZnSO_4 uygulanan grupta % 16, 100 μM ZnSO_4 grubunda ise % 32 oranında bir azalış saptandı. Stres uygulamasının 14. gününde ise kök yaş ağırlıkları kontrol grubuna göre, 10 μM ZnSO_4 uygulanan grupta % 52, 100 μM ZnSO_4 grubunda ise % 76 oranında bir azalış belirlendi. Stres uygulamasının 21. gününde ise kök yaş ağırlıkları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, 10 μM ZnSO_4 uygulanan grupta % 79, 100 μM ZnSO_4 grubunda ise % 76 oranında bir azalış saptandı.



Şekil 3.1 Kontrol, 10 µM ve 100 µM ZnSO₄ uygulamasının *Nicotiana tabacum*'da kök yaş ağırlığı üzerine etkisi.

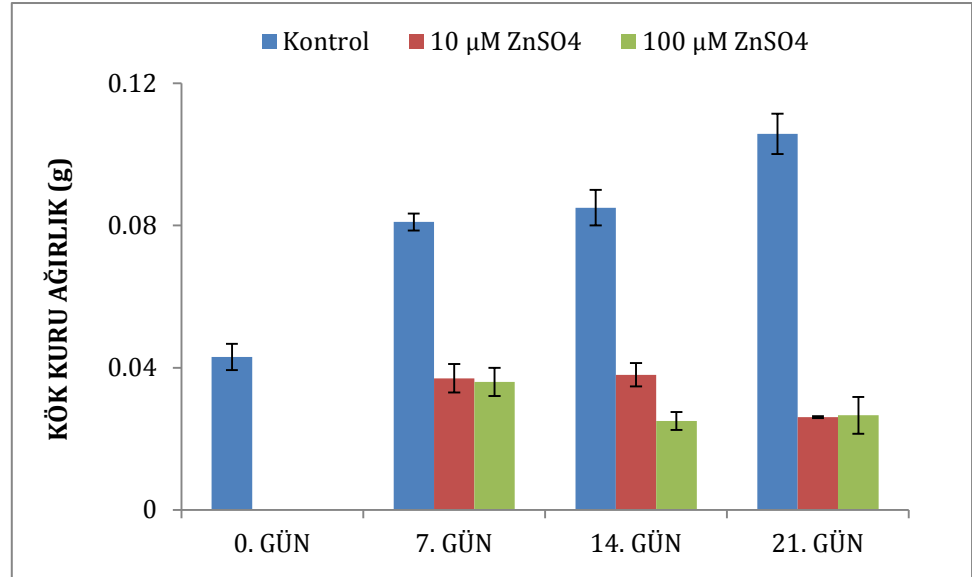
Gövde yaş ağırlığına ait verilere bakıldığında; stres uygulamasının 7. gününde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 10 µM ZnSO₄ uygulanan grupta % 27, 100 µM ZnSO₄ grubunda ise % 42 oranında azalma saptandı. Stres uygulamasının 14. gününde ise kontrol grubuna göre, 10 µM ZnSO₄ uygulanan grupta % 45, 100 µM ZnSO₄ grubunda ise % 47 oranında bir azalış saptandı. Stres uygulamasının 21. gününde ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, 10 µM ZnSO₄ uygulanan grupta % 52, 100 µM ZnSO₄ grubunda ise % 53 oranında bir azalma belirlendi.



Şekil 3.2 Kontrol, 10 µM ve 100 µM ZnSO₄ uygulamasının *Nicotiana tabacum*'da gövde yaş ağırlığı üzerine etkisi.

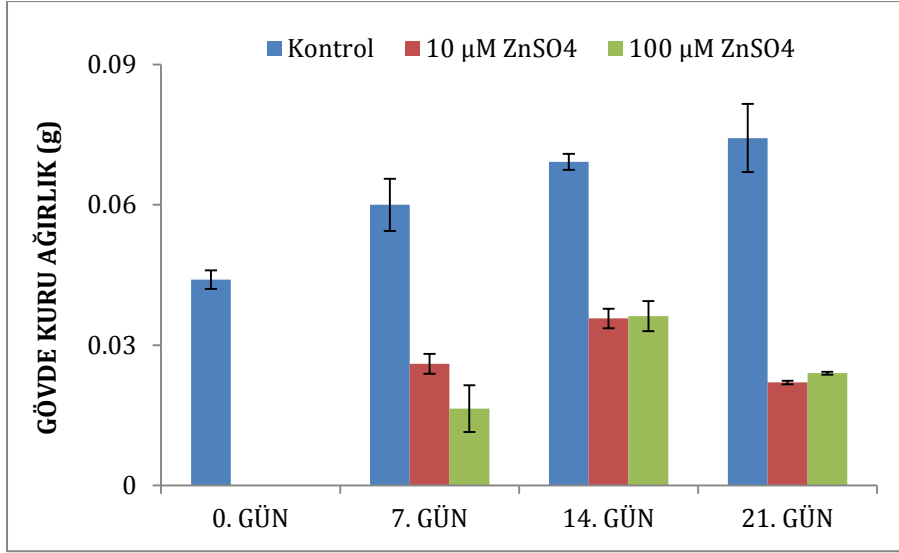
3.1.2 Kök ve Gövde Kuru Ağırlıkları

Kök ve gövde kuru ağırlık değişimlerine ait veriler şekiller 3.3 ve 3.4’de verildi. Denemenin 7. gününde kök kuru ağırlık değerleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, 10 μ M ve 100 μ M ZnSO₄ uygulanan gruplarda sırası ile % 55 ve % 56 oranlarında azalma belirlendi. Denemenin 14. gününde ise kontrol grubuna göre kök kuru ağırlık verilerinde 10 μ M ZnSO₄ uygulanan grupta % 55, 100 μ M ZnSO₄ grubunda ise % 70 oranında bir azalma saptandı. Denemenin 21. gününde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, 10 μ M ve 100 μ M ZnSO₄ uygulanan her iki grupta ise % 75 oranında bir azalma belirlendi.



Şekil 3.3 *Nicotiana tabacum* bitkisinde kontrol, 10 μ M ve 100 μ M ZnSO₄ uygulaması yapılan gruplarda kök kuru ağırlığındaki değişimler.

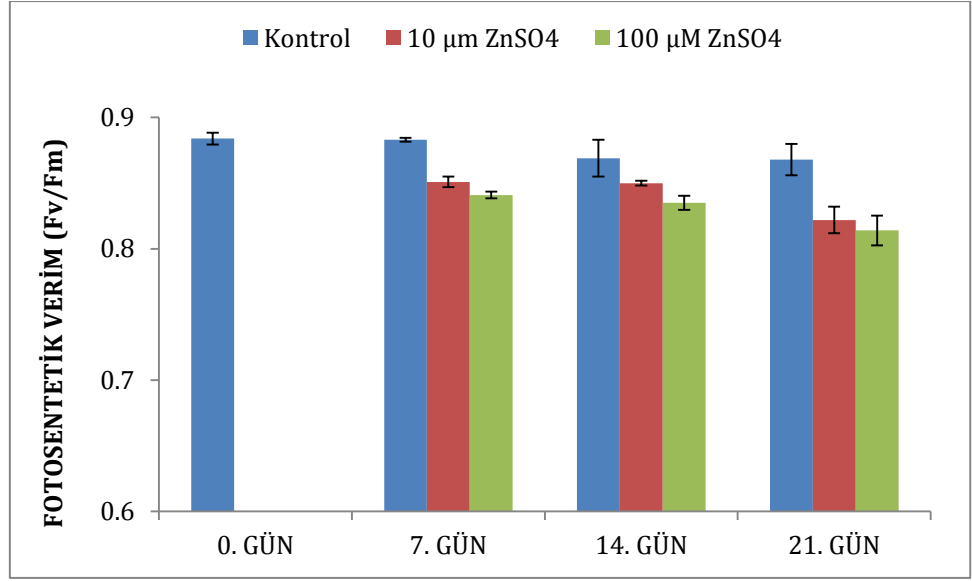
Gövde kuru ağırlık sonuçlarında, stres uygulamasının 7., 14. ve 21. günlerinde belirgin değişimler kaydedildi. 10 μ M ZnSO₄ uygulanan grubun gövde kuru ağırlık değişimi; 7. günde % 57; 14. günde % 48; 21. günde ise % 70 azalış olarak belirlendi. 100 μ M ZnSO₄ uygulanan grupta gövde kuru ağırlık azalış oranları ise, 7. günde % 73; 14. günde % 48; 21. günde ise % 68 olarak kaydedildi.



Şekil 3.4 *Nicotiana tabacum* bitkisinde kontrol, 10 µM ve 100 µM ZnSO₄ uygulaması yapılan gruplarda gövde kuru ağırlığındaki değişimler.

3.1.3 Fotosentez Verimi

Bitkilerin çeşitli streslerden etkilenme derecelerini gösteren en önemli parametre fotosentetik verimdir. Tütün bitkilerine uygulanan ağır metal stresinin fotosentetik verim üzerine etkisini belirleyebilmek için, stres uygulamasının 0., 7., 14. ve 21. günlerinde bitkilerin Fv/Fm oranları ölçülerek, kaydedildi (Şekil 3.5). Kontrol bitkilerine göre 10 µM ZnSO₄ uygulanan bitkilerde fotosentetik verim 7. günde % 4, 14. günde % 3 ve 21. günde ise % 6 oranında azalma belirlendi. 100 µM ZnSO₄ uygulanan grupta ise deneme süresi boyunca kontrol grubu ile karşılaştırıldığında fotosentetik verim 7. günde % 5, 14. günde % 4 ve 21. günde % 7 oranında azalma saptandı.

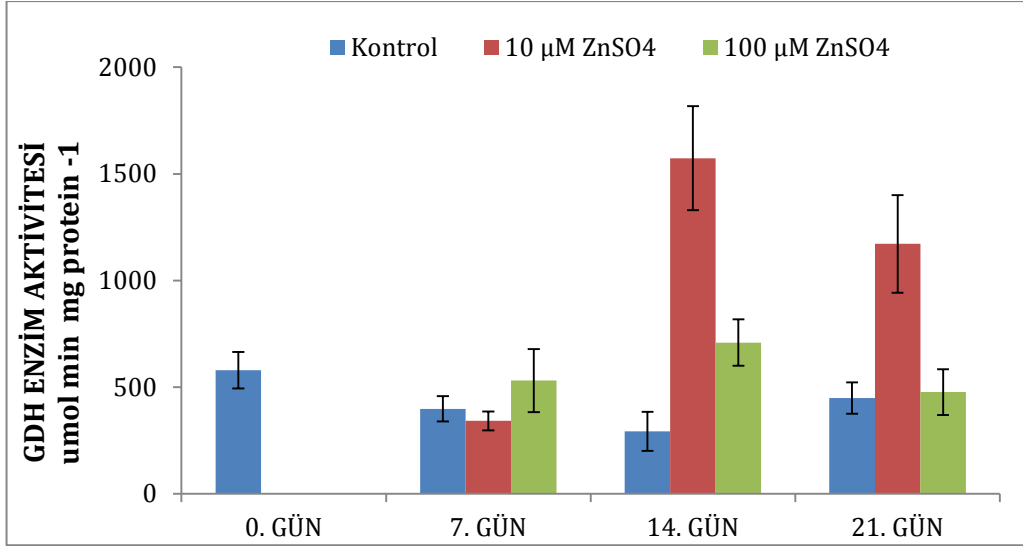


Şekil 3.5 *Nicotiana tabacum* bitkisinde kontrol, 10 µM ve 100 µM ZnSO₄ uygulaması yapılan gruplarda fotosentetik verimdeki değişimler.

3.2. Enzim Aktivitesi Analizleri

3.2.1 Glutamat Dehidrogenaz (GDH) Enzim Aktivitesi

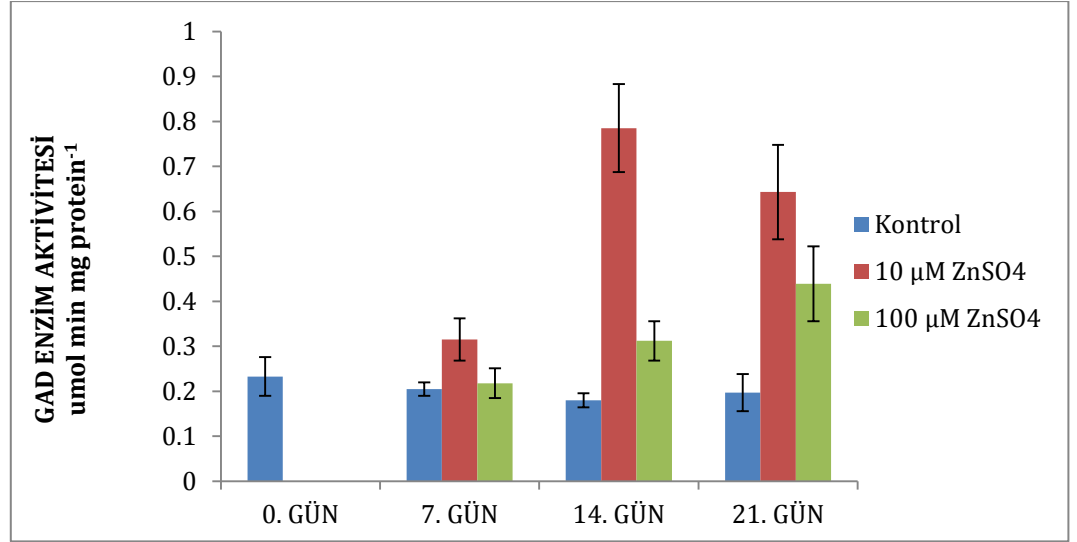
GABA biyosentez yolunda; glutamat oluşumu için α -ketoglutaratı katalizleyen glutamat dehidrogenaz enzim aktivitesindeki değişimler *N.tabacum* (tütün) bitkilerinde kontrol, 10 µM ve 100 µM ZnSO₄ uygulanan gruplarda incelendi (Şekil 3.6). 14. ve 21. günlerde 10 µM ZnSO₄ uygulanan gruplarda en yüksek GDH aktivitesi belirlendi. Kontrol grubu ile kıyaslandığında 10 µM ZnSO₄ uygulanan gruplarda 7. Günde % 15 oranında azalma belirlenirken, 14. günde % 437 ve 21. günde ise % 160 oranlarında artış gözlemlendi. 100 µM ZnSO₄ uygulanan gruplarda ise kontrol grubu ile kıyaslandığında, 7. günde % 33, 14. günde % 142 ve 21. günde ise % 6 oranında artma kaydedildi.



Şekil 3.6 *Nicotiana tabacum* bitkisinde kontrol, 10 µM ve 100 µM ZnSO₄ uygulamalarının GDH enzim aktivitesi üzerine etkisi.

3.2.2 Glutamat Dekarboksilaz (GAD) Enzim Aktivitesi

10 µM ve 100 µM ZnSO₄ uygulanan tütün bitkilerinde, 7., 14. ve 21. günlerde stresin etkilerinin belirlenebilmesi için GAD enzim aktivitesindeki değişimler de incelendi (Şekil 3.7). En yüksek GAD aktivitesi 14. ve 21. günlerde 10 µM ZnSO₄ uygulanan gruplarda saptandı. Ayrıca, 100 µM ZnSO₄ uygulanan gruplarda ise 7. gün, 14. ve 21. günlerde kademeli bir artış saptandı. Kontrol grubu ile kıyaslandığında, 10 µM ZnSO₄ uygulanan grupta 7. günde % 53, 14. ve 21. günde sırasıyla % 336 ve % 226 düzeyinde artma belirlendi. 100 µM ZnSO₄ uygulanan grupta ise, 7., 14. ve 21. günlerde sırasıyla % 6, % 73 ve % 122 oranlarında artış belirlendi.

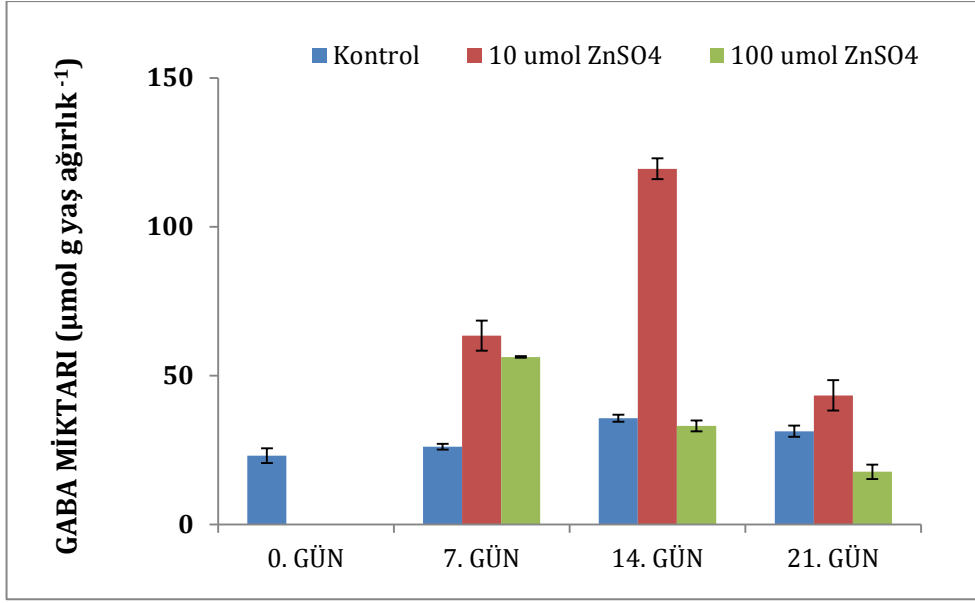


Şekil 3.7 *Nicotiana tabacum* bitkisinde kontrol, 10 µM ve 100 µM ZnSO₄ uygulamalarının GAD enzim aktivitesi üzerine etkisi.

3.3 GABA ve Glutamat Miktarlarının Analizi

3.3.1 GABA Miktarının Belirlenmesi

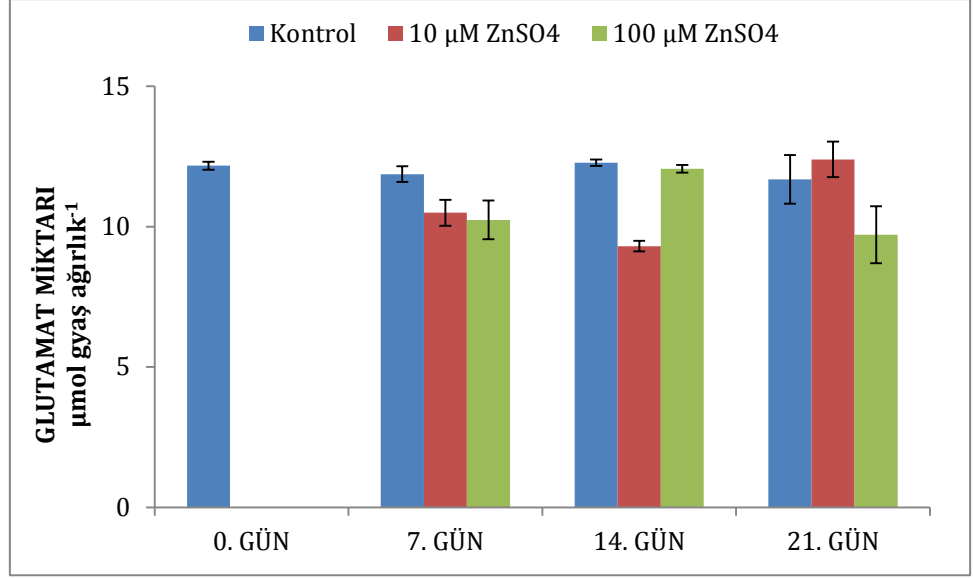
Nicotiana tabacum bitkisinde GABA miktarlarındaki değişimler kontrol, 10 µM ve 100 µM ZnSO₄ uygulanan gruplarda belirlendi (Şekil 3.8). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında en belirgin artışlar 7. ve 14. günlerde 10 µM ZnSO₄ uygulanan gruplarda sırası ile 63,42 ve 119,48 µmol g YA⁻¹ ile en yüksek düzey kaydedildi. Kontrol grubu ile 10 µM ZnSO₄ uygulanan grup karşılaştırıldığında GABA miktarı seviyesi büyük oranda farklılık göstermektedir. 10 µM ZnSO₄ uygulanan grupta GABA miktarı seviyeleri; 7. günde 63,42 µmol g YA⁻¹, 14. günde 119,48 µmol g YA⁻¹ ve 21. günde ise 43,31 µmol g YA⁻¹'e ulaştı. 100 µM ZnSO₄ uygulanan grupta ise GABA seviyeleri; 7. günde 56,22 µmol g YA⁻¹, 14. günde 33,07 µmol g YA⁻¹ ve 21. günde 17,68 µmol g YA⁻¹'e ulaştı (Şekil 3.8).



Şekil 3.8 *N. tabacum* bitkilerinde ağır metal ZnSO₄ stresinin GABA miktarları üzerine etkisi.

3.3.2 Glutamat Miktarının Belirlenmesi

Çalışmamızda, kontrol, 10 µM ve 100 µM ZnSO₄ uygulanan tütün bitkilerinde glutamat miktarındaki değişimler belirlendi (Şekil 3.9). Kontrol şartları altında en yüksek Glutamat miktarı 12,392 µmol g YA⁻¹ ile 21. gün 100 µM ZnSO₄ uygulanan grupta gözlemlendi. 100 µM ZnSO₄ uygulaması ile oluşan stresin etkisi deneme süresince glutamat miktarlarında azalmaya neden oldu. Özellikle 7. ve 21. günlerde kontrol grupları ile karşılaştırıldığında sırasıyla % 14 ve % 17 oranlarında azalma meydana geldi. 10 µM ZnSO₄ uygulanan grupta ise 7. ve 14. günlerde kontrol grupları ile karşılaştırıldığında sırasıyla % 12 ve % 25 azalma; 21. günde ise % 6 düzeyinde artma belirlendi.



Şekil 3.9 *N. tabacum* bitkilerinde ağır metal ZnSO₄ stresinin Glutamat miktarları üzerine etkisi.

4. TARTIŞMA

Bitkiler yaşamlarını sürdürdükleri ortamlarda yüksek ve düşük sıcaklık, kuraklık, tuz, UV ve ağır metal gibi çeşitli abiyotik streslere maruz kalırlar. Bu streslerle mücadele edebilmek ve hayatlarını sürdürebilmek için çok çeşitli ve kompleks yanıt sistemleri geliştirmişlerdir (Cheong et al., 2002; Debnath et al., 2011). Farklı çevresel streslere karşı bitkilerin geliştirdiği yanıtlar oksin, sitokinin, absisik asit, 3-indol asetik asit ve brassinosteroidleri içeren çeşitli hormonlar tarafından düzenlenmektedir (Bajguz and Hayat, 2009). Stres koşulları altında bitkilerde fizyolojik ve biyokimyasal süreçlerde çok çeşitli hasarlar meydana gelmektedir. Bu hasarların giderilmesi için gerekli savunma sistemlerinin aktif hale gelmesi bitkilerin stres koşullarında yaşamsal faaliyetlerini yürütebilmeleri için gereklidir. Günümüze kadar belirlenen çeşitli savunma yollarının arasında sinyal iletim süreçlerinin aktivasyonu, antioksidan enzim veya enzim olmayan moleküllerin sentezlenmesi, çeşitli ozmotik düzenleyici bileşiklerin sentezlenmesi ve protein yapısına katılmayan GABA gibi aminoasit yapısındaki moleküllerin birikimi sayılabilir.

GABA, ilk olarak yarım yüzyıl önce patates (*Solanum tuberosum*) yumrularında keşfedilmiştir (Dent et al., 1947). Yapılan araştırmalar sonucunda, bitkilerde GABA'nın abiyotik ve biyotik streslere yanıt olarak yüksek düzeylerde ve hızlı şekilde üretildiği saptanmıştır (Shelp et al., 1999; Kinnersly and Turano, 2000). GABA'nın bitkilerde stres ile ilişkili olarak önemli bir role sahip olduğu kabul edilmiştir (Xu et al., 2012). GABA, yapısında dört karbon bulunduran, protein yapısında olmayan serbest amino asit havuzunun önemli bir bileşenidir (Shelp et al., 1999). Bitkilerde GABA'nın, sitozolik pH'ın düzenlenmesi, TCA döngüsüne karbon iletilmesi, azot metabolizmasına katılması, böcek saldırılarının engellenmesi, oksidatif strese karşı savunma, sinyalizasyon ve ozmoregülasyon gibi çeşitli fizyolojik yanıtların oluşmasında görev aldığı bilinmektedir. Çeşitli çalışmalarda GABA'nın kuraklık, tuz, sıcaklık vb. gibi birçok abiyotik stres koşullarında GABA düzeylerindeki değişimler belirlenmiştir fakat çinko sülfatın tetiklediği ağır metal stresi altındaki değişimleri belirleyen çalışmalar oldukça az sayıdadır.

Araştırma projemizin hipotezine göre, bitkilerde kuraklık, tuz vb. abiyotik streslerde olduğu gibi ağır metal stresine verilen yanıtlarda da GABA yolunun önemli bir role sahiptir. Bu rolün aydınlatılabilmesi için çalışmamızda *Nicotiana tabacum* (tütün) bitkisine, farklı konsantrasyonlarda (0, 10 ve 100 μM), ZnSO_4 uygulaması yapılarak indüklenen ağır metal stresi sürecinde, GABA ve Glutamat miktarları ile GAD (glutamat dekarboksilaz), GDH (glutamat dehidrogenaz) enzim aktivitelerindeki değişimler incelendi. Stres etkilerinin belirlenmesi için kök-gövde yaş ve kuru ağırlık değerleri ve fotosentetik verimdeki değişimler gibi çeşitli fizyolojik parametrelere de bakılmıştır. Genel olarak farklı konsantrasyonlardaki ZnSO_4 uygulamasına karşı oluşturulan yanıtların GABA metabolizması ile ilişkili olduğu düşünülmektedir, bu projemizde elde ettiğimiz bulgular hipotezimizi destekler niteliktedir.

Yüksek metal konsantrasyonları oksidatif stresi tetiklemektedir (Smeets et al., 2005). Ağır metallerin tetiklediği oksidatif stres sonucu bitkilerde reaktif oksijen türleri (ROS) oluşmaktadır. ROS'ların lipidleri, proteinleri ve pigmentleri etkilediği ve membran hasarları ile enzimlerin inaktivasyonuna neden olduğu tespit edilmiştir (Scandalios, 2005). Artan kobalt konsantrasyonlarda, peroksidaz ve katalaz gibi enzimlerin aktivitelerinin arttığı ve bu nedenle katabolizmada bir artış meydana geldiği saptanmıştır (Nadia and Nagwa, 2013). 1987 yılında domates bitkisinde yapılan bir çalışmada kobalt stresine bağlı olarak bitki ağırlıklarında azalma tespit edilmiştir (Sablina and Yagodin, 1987). Bu çalışmada, ağır metal stresi olarak değişik konsantrasyonlarda (0, 10 μM ve 100 μM) ZnSO_4 uygulanan gruplarda kontrol grupları ile karşılaştırıldığında, stresin devam ettiği tüm günlerde kök kuru ağırlık ve gövde kuru ağırlıklarında azalma saptanmıştır. Stresin uygulandığı grupların kök yaş ağırlık ve gövde yaş ağırlıklarının, tüm stres günlerinde azaldığı tespit edilmiştir. Cherif ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, çinko (Zn) uygulanan domates bitkilerinde ağırlığın azaldığı ve bitkilerde nekroz ile klorozisin meydana geldiği belirlenmiştir (Cherif et al., 2011). Benzer şekilde, kobalt stresi uygulanan tatlı biber (*Capsicum annuum* L.) bitkisi ile yapılan araştırmada, 5ppm kobalt stresinde kök ve gövde gelişiminin arttığı 7,5 ve 10 ppm kobalt stresinde ise büyüme parametrelerinde azalma meydana geldiği saptanmıştır (Nadia and Nagwa, 2013). Nadia ve arkadaşlarının kobalt stresi ile yaptıkları bir başka çalışmada ise, börülce bitkisinde artan kobalt

konsantrasyonları ile bitkilerin kök ve gövdelerinde, yaş ve kuru ağırlıklarının azaldığı tespit edilmiştir (Nadia et al., 2013). Çinko (Zn) ile yapılan bir çalışmada ise, Zn'nin yüksek konsantrasyonlarına (450 ve 900 mgkg⁻¹) maruz kalan fasulye bitkilerinde sürgün ve kök gelişiminin azaldığı tespit edilmiştir (Anrade et al., 2009; Chen et al., 2004).

Bitkilerde ağır metaller, fotosentetik aparat ile etkileşime girerek foto-oksidatif hasarı da içeren çeşitli toksik etkilere sebep olmaktadır. Bakır (Cu), kadmiyum (Cd), kurşun (Pb) ve çinko (Zn) gibi ağır metallerin artan konsantrasyonlarının bitkilerde fotosentetik süreçleri etkilediği bilinmektedir (Ralph and Burchett, 1998). Ayrıca ağır metaller bitkilerde, kloroplast membran fonksiyonlarını ve elektron taşıma zincirinin elemanlarını değiştirmektedir (Mysliwa-Kurdziel and Strzalka, 2002; Malec et al., 2008; Ventrella et al., 2011). Gri hindistan ağacı (*Avicennia marina* (Forsk.)) ile yapılan çalışmada çinko ve bakır stresinde, yaprak dokularında fotosentetik pigmentlerde azalma saptanmıştır. Fotosentetik pigmentlerdeki bu azalışın, artan konsantrasyonlardaki ağır metal stresi aracılığı ile peroksidaz aktivitesinin de artmasına bağlanmaktadır (MacFarlane and Burchett, 2001). Kadmiyum stresine maruz kalan bitkilerle yapılan çalışmalarda, oksidatif stresin tetiklenerek fotosentetik elektron taşınımı ve fotosistem II (PS II)'nin aktivitesinin engellendiği tespit edilmiştir (McCarthy et al., 2001; Romero-Puertas et al., 2004). Tütün bitkisi ile yapılan bir çalışmada, kadmiyum stresi altındaki bitkilerde kök-gövde kuru ağırlıklarında ve fotosentetik pigment içeriklerin de azalma saptanmıştır (Dguimi et al., 2009). Yaptığımız çalışmada da, ZnSO₄ ile indüklenen ağır metal stresi sonucu uygulamanın yapıldığı tüm günlerde, fotosentetik kapasitede azalma gözlenmiştir. Azalmanın en belirgin ölçüldüğü grup, stresin en yoğun olduğu 21. gündeki 100 µM ZnSO₄ uygulamasına maruz kalan bitkilerdir. Benzer şekilde, domates bitkisinde Zn ve kadmiyum uygulaması altında klorofil a, klorofil b ve karotenoid gibi fotosentetik pigmentlerin seviyelerinde azalma meydana geldiği belirlenmiştir. Tüm bu sonuçlar göstermektedir ki ağır metal stresi altında bitkilerde klorofil ve karotenoid pigmentlerinin düzeylerinin azalması sonucu fotosentez verimi de azalmaktadır (Cherif et al., 2011).

Tuz, kuraklık, yüksek ve düşük sıcaklık, mekanik hasar gibi çeşitli streslere maruz kalan bitkilerin dokularında GABA miktarının arttığı tespit edilmiştir (Kinnarsley and Turano, 2000). Ayrıca biyotik stres olarak tütün mozaik virüsü (TMV) ile enfekte edilen domates bitkilerinde GABA'nın yavaş ve düşük miktarlarda biriktiği saptanmıştır (Cooper and Selman, 1974). Hipoksi stresi altında çimlenen kahverengi pirinç (Komatsuzaki et al., 2007), soyafasülyesi (Guo et al., 2011) ve *Setaria italica* (Bai et al., 2009) ile yapılan çalışmada GABA düzeyi ile GAD enzim aktivitesinin önemli miktarlarda arttığı tespit edilmiştir. GABA'nın sinyalizasyonda metabolik bir role sahip olduğunu belirten bir çok çalışma mevcuttur (Fait et al., 2007). Örneğin; sitozolik pH'nın düzenlenmesi (Vance and Heichel, 1991), ROS'ların süpürülmesi (Shi et al., 2010), oksijen eksikliğine karşı korumada (Ott et al., 2009) GABA'nın metabolik fonksiyonunun olduğu saptanmıştır. Ağır metal stresi altında da bitkilerde, GABA düzeylerinin arttığını tespit eden bir çok çalışma bulunmaktadır. Ağır metal stresi olarak selenyum uygulanan susam bitkisinde GABA seviyesinin artış gösterdiği tespit edilmiştir (Bor vd., 2009). Başka bir çalışmada ise, artan bakır konsantrasyonlarına karşı *Elsholtzia splendens* bitkisinde GABA ve histidin seviyelerinde artma, aspartat (Asp) ve glutamat (Glu) seviyelerinde ise kayda değer bir azalma saptanmıştır (Yang et al., 2005). Bu çalışmayı destekler biçimde olan başka bir çalışmada ise, Zn stresine karşı toleransın artmasının GABA ve aspartat arasındaki ilişki olduğu belirtilmiştir (Pavlikova et al., 2014). Kadmiyumun toksik konsantrasyonlarında, aminoasit metabolizmasının etkilendiği, *S. nigrum* bitkisinde aminoasit birikiminin olduğu ve GABA miktarının arttığı tespit edilmiştir (Xu et al., 2012). Benzer olarak yaptığımız çalışmada, 10 μ M $ZnSO_4$ uygulanan grupta GABA miktarında artma belirlenmiştir. Özellikle GABA miktarındaki en yüksek artışın, stresin 14. gününde meydana geldiği gözlenmiştir. 100 μ M $ZnSO_4$ uygulanan grupta ise GABA miktarında, 7. günde artma 14. Ve 21. günlerde ise azalma saptanmıştır. Androde ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, bakır stresi altındaki mikoriza bakla bitkisinde yüksek GABA içeriğinin olduğu tespit edilmiştir (Andrade et al., 2010). Abiyotik streslerden biri olan düşük sıcaklık stresinde buğday ve arpada yapılan çalışmalarda, aminoasit havuzunda artış olduğu ve GABA yolu ile ilişkili genlerinin ifadesinin uyarıldığı saptanmıştır (Mazzucotelli et al., 2006). Abiyotik streslerde GABA seviyelerinin arttığını belirten çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Örneğin; yüksek sıcaklıkta

buğday bitkisinde GABA seviyesinin arttığı (Youn et al., 2011), ışık stresi altındaki *Arabidopsis* bitkilerinde GABA shunt yolağının aktif olduğu (Allan and Shelp, 2006), hipoksi stresi altındaki *Vicia faba* L. bitkisinde uygulamanın 3. ve 5. günlerinde GABA içeriğinde artma meydana geldiği (Yang et al., 2013) saptanmıştır. Bitkilerde, putresinin GABA'ya yıkımı ve bu sürecin düzenlenmesi abiyotik strese karşı yanıtların oluşmasını sağlamaktadır. GABA yolunun görevinin, çevresel streslere karşı bitkilerde ROS birikimine bağlı hücre ölümünün engellenmesi olabileceği düşünülmektedir (Coleman et al., 2001). Tüm bu çalışmalar göstermektedir ki, GABA metabolizması, bitkilerin abiyotik strese karşı uyum sağlayabilmeleri açısından anahtar bir rol oynamaktadır.

GABA'nın hücrel birikime bağlı düzenlenmesi birçok strese karşı oluşabilmektedir (Sanders et al., 1999). Sitozolik pH değişikliği GAD'ın aktif hale gelmesini ve buna bağlı olarak GABA birikimini sağlamaktadır (Roberts et al., 1984; Aurisano et al., 1995). Bouche ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, *Arabidopsis thaliana*'da GAD enzim aktivitesinin GABA biyosentezi arasında bir ilişki olduğu saptanmıştır (Bouche et al., 2004). Hipoksi stresi altında kavun bitkisinde GAD aktivitesinin önemli derecede düştüğü saptanmıştır (Wang et al., 2014). Farklı olarak 5 buğday kültüründe yapılan tuz ve osmotik stres çalışmasında GABA ve GAD-mRNA düzeylerinde artma tespit edilmiştir (AL-Quraan et al., 2013). Çalışmamızda ise, $ZnSO_4$ ile indüklenen ağır metal stresinin etkisiyle GAD aktivitesi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, 10 μM $ZnSO_4$ uygulanan gruplarda stresin uygulandığı tüm günlerde artış meydana gelmiştir. En yüksek GAD aktivitesi, 14. Günde %336 oranında saptanmıştır. 100 μM $ZnSO_4$ uygulanan gruplarda da stresin uygulandığı tüm günlerde artış meydana gelmiştir. Fakat 100 μM $ZnSO_4$ uygulanan gruplarda en yüksek GAD aktivitesi stresin en yoğun olduğu 21. günde %122 oranında tespit edilmiştir. Benzer bir şekilde, Yang ve arkadaşlarının *Vicia faba* L. bitkisinde yaptıkları çalışmada hipoksi stresi altında GAD aktivitesinin arttığı belirlenmiştir (Yang et al., 2013).

Bitkilerde glutamat, amino asit metabolizması içinde merkezi bir yere sahiptir. Glutamat, α -ketoglutarattan glutamat dehidrogenaz enzimi (GDH) aracılığı ile oluşmaktadır. Abiyotik stres koşullarında GABA miktarındaki değişimleri, GAD ve GDH enzim aktivitelerindeki değişimlerini araştırdığımız daha önceki çalışmamızda, tütün bitkisinde tuz stresi altında GDH enzim aktivitesinin azaldığı GABA birikiminin arttığı saptanmıştır (Akçay vd., 2012). Ayrıca, GDH aktivitesinin yaşlanma ve çeşitli stres koşulları altında arttığı uzun yıllardır yapılan çalışmalar sonucu bilinmektedir (Forde and Lea, 2007). Çalışmamızda, GDH enzim aktivitesinde 10 μ M ZnSO₄ uygulanan gruplarda 7. günde azalma, 14. Ve 21. günlerde ise artma belirlenmiştir. 100 μ M ZnSO₄ uygulanan gruplarda ise stresin uygulandığı tüm günlerde GDH enzim aktivitesinde artma saptanmıştır. GABA metabolizmasında glutamat, GDH enziminin katalizi ile meydana gelmektedir. Sonuçlarımızda, glutamat oluşumunda özellikle 10 μ M ZnSO₄ uygulanan gruplarda 7. ve 14. günlerde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sırasıyla %12 ve %25 azalma saptanmıştır. Sonuçlarımızı destekler nitelikte olan Yang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise, *Elsholtzia splendens* bitkisinde artan bakır konsantrasyonlarına bağlı olarak glutamat miktarında azalma tespit edilmiştir. Bu durumun, bakır stresine bağlı olarak artan GABA sentezinin olabileceği düşünülmektedir (Yang et al., 2005).

5. SONUÇLAR

Tez projemizde tütün (*N. tabacum*) bitkisinde $ZnSO_4$ ile indüklenen ağır metal stresi ile GABA metabolizması arasındaki etkileşimi belirleyebilmek için GABA metabolizması bileşenlerinin (GABA ve gultamat miktarı ile GAD ve GDH enzimlerinin aktivitesi) değişimlerini inceledik. $ZnSO_4$ uygulaması ile indüklenen ağır metal stresinin etkisi 14. ve 21. günlerde en belirgin olduğu tespit edildi. Ayrıca gövde-kök yaş ağırlık ile gövde-kök kuru ağırlıklarında kontrol grupları ile karşılaştırıldığında azalma tespit edilmiştir. Yapılan tüm çalışmalarda olduğu gibi tez projemizin sonuçlarında da, Glutamat ve GABA miktarı değişimleri ile GAD ve GDH enzim aktivitelerinin değişimleri birbirleri ile uyumlu olduğunu göstermiştir. Bu bulgular sonucunda, GABA yolu bileşenlerinin $ZnSO_4$ ile indüklenen ağır metal stresine oluşturulan yanıtta etkili olduğunu göstermiştir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Akama, K. and Takaiwa, F.,** 2007, C-terminal extension of rice glutamate decarboxylase (OsGAD2) functions as an autoinhibitory domain and overexpression of a truncated mutant results in the accumulation of extremely high levels of GABA in plant cells, *J. Exp. Bot.*, 58, 2699–2707 pp.
- Akçay, N. Bor, M. , Karabudak, T., Özdemir F. ve Türkan İ.,** 2012, Contribution of Gamma amino butyric acid (GABA) to salt stress response of *Nicotiana sylvestris* CMSII mutant and wild type plants, *Journal of Plant Physiology*, 169(5), 452–458 s.
- Alia. and Saradhi, P.,** 1991, Proline accumulation under heavy metal stress, *J. Plant. Physiol.*, 138, 504-508 pp.
- Allan, W.L. and Shelp, B.J.,** 2006, Fluctuations of γ -aminobutyrate, γ -hydroxybutyrate, and related amino acids in *Arabidopsis* leaves as a function of the light-dark cycle, leaf age, and N stress, *Can. J. Bot.*, 84:1339-1346 pp.
- AL-Quraan, N.A., Sartawe, F.A. and Qaryouti, M.M.,** 2013, Characterization of γ -aminobutyric acid metabolism and oxidative damage in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedling under salt and osmotic stress, *Journal of Plant Physiology*, 1003-1009 pp.
- Andrade, S., Gratao, P., Schiavinato, M., Silveria, A., Azevedo, R. and Mazzafera, P.,** 2009, Zn uptake, physiological response and stress attenuation in mycorrhizal jack bean growing in soil with increasing Zn concentration, *Chemosphere*, 75:1363-70 pp.
- Andrade, S.A.L., Gratao, P.L., Azevedo, R.A., Silveira, A.P.D., Schiavinato, M.A. and Mazzafem, P.,** 2010, Biochemical and physiological changes in jack bean under mycorrhizal symbiosis growing in soil with increasing Cu concentrations, *Environmental and Experimental Botany*, 68:198-207 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Apel, K. and Hirt, H.**, 2004, Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55, 373–399 pp.
- Assunção, A.G.L., Da Costa Martins, P., Folter, S., Vooijs, R., Schat, H. and Aarts, M.G.M.**, 2001, Elevated expression of metal transporter genes in three accessions of the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*, *Plant Cell Env.*, 24, 217-226 pp.
- Bækgaard, L. Mikkelsen, M.D., Sørensen, D.M., Hegelund, J.N., Persson, D.P., Mills, R.F., and et al.**, 2010, A combined zinc/cadmium sensor and zinc/cadmium export regulator in a heavy metal pump, *J. Biol. Chem.*, 285:31243–52 pp.
- Bai, Q.Y., Chai, M.Q., Gu, Z.X., Cao, X.H., Li, Y. and Liu, K.L.**, 2009, Effects of components in culture medium on glutamate decarboxylase activity and gamma-aminobutyric acid in foxtail millet (*Setaria italica* L.) during germination, *Food Chemistry*, 116(1), 152-157 pp.
- Bajguz, A. and Hayat, Sh.**, 2009, Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses, *Plant Physiol Biochem.*, 47:1–8 pp.
- Bakkaus, E., Gouget, B., Gallien, J.P., Khodja, H., Carrot, H., Morel, J.L. and Collins, R.**, 2005, Concentration and distribution of cobalt in higher plants: the use of micro-PIXE spectroscopy, *Nuclear Instruments and Methods B*, 231, 350–356 pp.
- Bassi, R. and Sharma, S.S.**, 1993, Proline accumulation in wheat seedlings exposed to zinc and copper, *Phytochem*, 33, 1339-1342 pp.
- Baszynski, T., Wajda, L., Krol, M., Wolinska, D., Krupa, Z. and Tukendorf, A.**, 1980, Photosynthetic activities of cadmium treated tomato plants, *Plant Physiol.*, 98, 365–370 pp.
- Baum, G. and et al.**, 1993, A plant glutamate decarboxylase containing a calmodulin-binding domain, *J. Biol. Chem.*, 268, 19610–19617 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Baum, G. and et al.,** 1996, Calmodulin binding to glutamate decarboxylase is required for regulation of glutamate and GABA metabolism and normal development of plants, *EMBO J.*, 15, 2988–2996 pp.
- Bettini, P., Michelotti, S., Bindi, D., Giannini, R., Capuana, M. and Buiatti, M.,** 2003, Pleiotropic effect of the insertion of the *Agrobacterium rhizogenes* rolD gene in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.), *Theor Appl Genet.*, 107:831–6 pp.
- Bor, M., Seçkin, B., Ozgur, R., Yılmaz, O., Ozdemir, F. ve Turkan, I.,** 2009, Comparative effects of drought, salt, heavy metal and heat stresses on gamma-aminobutyric acid levels of sesame (*Sesamum indicum* L.), *Acta Physiol Plant*, 31:655-659 s.
- Bouché, N. and Fromm, H.,** 2004, GABA in plants: just a metabolite?, *Trends Plant Sci.*, 9:110-5 pp.
- Bouche, N., Lacombe, B. and Fromm, H.,** 2003, GABA signaling: a conserved and ubiquitous mechanism, *Trends Cell Biol.*, 13, 607–610 pp.
- Bown, A.W. and Shelp, B.J.,** 1997, The metabolism and functions of g-aminobutyric acid, *Plant Physiol.*, 115, 1–5 pp.
- Braumann, T., Nicolaus, G., Hahn, W. and Elmenhorst, H.,** 1990., NO-ethylornicotine from burley tobacco, *Phytochemistry*, 29, 3693–3694 pp.
- Breitkreuz, K.E. and et al.,** 1999, Identification and characterization of GABA, proline and quaternary ammonium compound transporters from *Arabidopsis thaliana*, *FEBS Lett.*, 450, 280–284 pp.
- Breitkreuz, K.E. and et al.,** 2003, A novel g-hydroxybutyrate dehydrogenase; Identification and expression of an *Arabidopsis* cDNA and potential role under oxygen deficiency, *J. Biol. Chem.*, 278, 41552–41556 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Breitkreuz, K.E. and Shelp, B.J.,** 1995, Subcellular compartmentation of the 4-aminobutyrate shunt in protoplasts from developing soybean cotyledons, *Plant Physiol.*, 108, 99–103 pp.
- Bricker, T.J., Pichtel, J., Brown, H.J. and Simmons, M.,** 2001, Phytoextraction of Pb and Cd from superficial soil: effects of amendments and croppings, *Journal of Environmental Science and Health, Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering* 36, 1597–1610 pp.
- Busch, K.B. and Fromm, H.,** 1999, Plant succinic semialdehyde dehydrogenase; Cloning, purification, localization in mitochondria, and regulation by adenine nucleotides, *Plant Physiol.*, 121, 589–597 pp.
- Casano, L.M., Gomez, L.D., Lascano, H.R., Gonzales, C.A. and Trippi, V.S.,** 1997, Inactivation and degradation of Cu Zn-SOD by active oxygen species in wheat chloroplasts exposed to photo-oxidative stress, *Plant Cell Physiol.*, 38, 433–440 pp.
- Chen, B.D., Shen, H., Li, X.L., Feng, G. and Christie, P.,** 2004, Effect of EDTA application and arbuscular mycorrhizal colonization on growth and zinc uptake by maize (*Zea mays* L.) in soil experimentally contaminated with zinc, *Plant Sci.*, 261:219-29 pp.
- Cheong, Y.H., Chang, H.S., Gupta, R., Wang, X., Zhu, T. and Luan, S.,** 2002, Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in *Arabidopsis*, *Plant Physiol.*, 129:661-77 pp.
- Cherif, J., Mediouni, C., Ammar, W.B. and Jemal, F.,** 2011, Interactions of zinc and cadmium toxicity in their effects on growth and in antioxidative systems in tomato plants (*Solanum lycopersicum*), *Journal of Environmental Sciences*, 23(5):837-844 pp.
- Choi, J.M., Pak, C.H. and Lee, C.W.,** 1996, Micronutrient toxicity in French marigold, *Journal of Plant Nutrition*, 19, 901–916 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Chung, I., Bown, A.W. and Shelp, B.J.,** 1992, The production and efflux of 4-aminobutyrate in isolated mesophyll cells, *Plant Physiol.*, 99, 659–664 pp.
- Clark, S.M. and et al.,** 2009, Biochemical characterization, mitochondrial localization, expression, and potential functions for an *Arabidopsis* gamma-aminobutyrate transaminase that utilizes both pyruvate and glyoxylate, *J. Exp. Bot.*, 60, 1743–1757 pp.
- Clemens, S., Bloss, T., Vess, C., Neumann, D., Nies, D.H and zur Nieden, U.,** 2002, A transporter in the endoplasmic reticulum of *Schizosaccharomyces pombe* cells mediated zinc storage and differentially affects transition metal tolerance, *J. Biol. Chem.*, 277, 18215-18221 pp.
- Cobbett, C.S. and Goldsbrough, P.,** 2002, Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 53, 159-182 pp.
- Cobbett, C.S.,** 2000, Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification, *Plant Physiol.*, 123, 825-832 pp.
- Cobbett, C.S., May, M.J., Howden, R. and Rolls, B.,** 1998, The glutathione-deficient, cadmiumsensitive mutant, *cad2-1*, of *Arabidopsis thaliana* is deficient in γ -glutamylcysteine synthetase, *Plant J.*, 16, 73-78 pp.
- Coleman, S.T., Fang, T.K., Rovinsky, S.A., Turano, F.J. and Moye-Rowley, W.S.,** 2001, Expression of a glutamate decarboxylase homologues required for normal oxidative stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of Biological Chemistry*, 276:244-50 pp.
- Cooper, P. And Selman, I.W.,** 1974, An analysis of the effects of tobacco mosaic virus on growth and the changes in the free amino compounds in young tomato plants, *Ann Bot.*, 38:625-638 pp.
- Corpas, F.J., Barroso, J.B. and del Rio, L.A.,** 2001, Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells, *Trends Plant Sci.*, 6, 145–150 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Costa, G. and Morel, J.L.**, 1994, Water, relations, gas exchange and amino acid content in Cd-treated lettuce, *Plant Physiol. Biochem.*, 32, 561-565 pp.
- De Vos, R.C.H., Vonk, M.J., Vooijs, R. and Schat, H.**, 1992, Glutathione depletion due to copper-induced phytochelatin synthesis causes oxidative stress in *Silene cucubalus*, *Plant Physiol.*, 98, 853–858 pp.
- Debnath, M., Pandey, M. and Bisen, P.S.**, 2011, An omics approach to understand the plant abiotic stress, *OMICS: J Integr Biol.*, 15(11):739-62 pp.
- del Rio, L.A., Sandalio, L.M., Corpas, F.J., Palma, J.M. and Barroso, J.B.**, 2006, Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes production, scavenging, and role in cell signalling, *J. Plant Physiol.*, 141, 330–335 pp.
- Delhaize, E., Ryan, P.R. and Randall, P.J.**, 1993, Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum*) II. Aluminum-stimulated excretion of malic acid from root apices, *Plant Physiol.* 103, 695- 702 pp.
- Dent, C.E. and et al.**, 1947, Detection of the free amino acids of plant cells by partition chromatography, *Nature*, 160, 682–683 pp.
- Dguimi, H.M., Debouba, M., Ghorbel, M.H. and Gouia, H.**, 2009, Tissue-specific cadmium accumulation and its effects on nitrogen metabolism in tobacco (*Nicotiana tabacum*, Bureley v. Fb9), *Academie des Science*, 58-68 pp.
- Di Toppi, L.S., Lambardi, M., Pazzagli, L., Cappugi, G., Durante, M. and Gabbrielli, R.**, 1999, Response to cadmium in carrot in vitro plants and cell suspension cultures, *Plant Sci.*, 137, 119–129 pp.
- Dong, J., Wu, F.B. and Zhang, G.P.**, 2006, Influence of cadmium on antioxidant capacity and four microelement concentrations in tomato seedlings (*Lycopersicon esculentum*), *Chemosphere* 64, 1659–1666 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ebbs, S.D. and Kochian, L.V.,** 1997, Toxicity of zinc and copper to Brassica species: implications for phytoremediation, *Journal of Environmental Quality*, 26, 776–781 pp.
- Eide, D., Broderius, M., Fett, J. and Guerinot, M.L.,** 1996, A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 5624-5628 pp.
- Fait, A., Fromm, H., Walter, D., Galili, G. and Fernie, A.R.,** 2007, Highway or byway: the metabolic role of the GABA shunt in plants, *Trends Plant Sci.*, 13, 14–19 pp.
- Fait, A., Yellin, A. and Fromm, H.,** 2005, GABA shunt deficiencies and accumulation of reactive oxygen intermediates: insight from Arabidopsis mutants, *FEBS Lett.*, 579, 415–420 pp.
- Feng, X., Wang, J.S., Luo, J. and Kong, L.Y.,** 2009, Two new sesquiterpene glucosides from the leaves of *Nicotiana tabacum*, *J. Asian Nat. Prod. Res.*, 11, 675–680 pp.
- Feng, X., Wang, J.S., Luo, J. and Kong, L.Y.,** 2010, A pair of sesquiterpene glucosides from the leaves of *Nicotiana tabacum*, *J. Asian Nat. Prod. Res.*, 12, 252–256 pp.
- Fernie, A.R. and et al.,** 2001, The contribution of plastidial phosphoglucomutase to the control of starch synthesis within the potato tuber, *Planta*, 213, 418–426 pp.
- Ferreira, L.C. and Cataneo, A.C., et al.,** 2010, Nitric oxide in plants: a brief discussion on this multifunctional molecule, *Sci. Agric. (Piracicaba Braz.)*, 67, 236–243 pp.
- Fischer, W-N. and et al.,** 1998, Amino acid transport in plants, *Trends Plant Sci.*, 3, 188–195 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Fontes, R.L.S. and Cox, F.R.,** 1998, Zinc toxicity in soybean grown at high iron concentration in nutrient solution, *Journal of Plant Nutrition*, 21, 1723–1730 pp.
- Forde, B.G. and Lea, P.J.,** 2007, Glutamate in plants: metabolism, regulation, and signalling, *Journal of Experimental Botany*, 2339-2358 pp.
- Freeman, J.L., Persans, M.W., Nieman, K., Albrecht, C., Peer, W., Pickering, I.J. and Salt, D.E.,** 2004, Increased glutathione biosynthesis plays a role in nickel tolerance in *Thlaspi* nickel hyperaccumulators, *Plant Cell* 16, 2176–2191 pp.
- Gallego, S.M., Benavides, M.P. and Tomaro, M.L.,** 1999, Effect of cadmium ions on antioxidative defense system in sunflower cotyledons, *Biol. Plantarum*, 42, 49–55 pp.
- Geigenberger, P. and Stitt, M.,** 1993, Sucrose synthase catalyses a readily reversible reaction in vivo in developing potato tubers and other plant tissues, *Planta*, 189, 329–339 pp.
- Gekeler, W., Grill, E., Winnacker, E.L. and Zenk, M.H.,** 1988, Algae sequester heavy metals via synthesis of phytochelatin complexes, *Archives of Microbiology*, 150, 197–202 pp.
- Goldbold, D.L. and Huttermann, A.,** 1985, Effect of zinc, cadmium and mercury on root elongation of *Picea abies* (Karst) seedlings and the significance of these metals to forest die-back, *Environ. Pollut.*, 38 (1985) 375–381 pp.
- Grallath, S. and et al.,** 2005, The AtProT family. Compatible solute transporters with similar substrate specificity but differential expression patterns, *Plant Physiol.*, 137, 117–126 pp.
- Grill, E., Winnacker, E.L. and Zenk, M.H.,** 1987, Phytochelatins, a class of heavy-metalbinding peptides 5 from plants, are functionally analogous to metallothioneins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 439–443 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Grill, E., Winnacker, E.L. and Zenk, M.H.,** 1985, Phytochelations: The principal heavy metal complexing peptides of higher plants, *Science*, 230, 674-676 pp.
- Grill. E., Löffler. S., Winnacker. E-L. and Zenk. M.H.,** 1989, Phytochelatin, the heavy-metalbinding peptides of plants, are synthesized from glutathione by specific γ -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 6838- 6842 pp.
- Guerinot, M.L.,** 2000, The ZIP, family of metaltransporters, *Biochim Biophys Acta*, 1465: 190–8 pp.
- Guo, Y., Chen, H., Sang, Y. and Gu, Z.,** 2011, Effect of soaking and aeration treatment on γ -aminobutyric acid accumulation in germinated soybean (*Glycine max* L.), *European Food Research and Technology*, 232:787-795 pp.
- Hall, J.L. and Williams, L.E.,** 2003, Transition metal transporters in plants, *J. Exp. Bot.*, 54, 2601- 2613 pp.
- Hamer, D.H.,** 1985, Metallothionein, *Annu. Rev. Biochem.*, 55, 913–951 pp.
- Han, F.X., Su, Y., Monts, D.L., Waggoner, A.C. and Plodinec, J.M.,** 2006, Binding, distribution, and plant uptake of mercury in a soil from Oak Ridge, Tennessee, USA, *Science of the Total Environment*, 368, 753–768 pp.
- Hao, F., Wang, X. and Chen, J.,** 2006, Involvement of plasma-membrane NADPH oxidase in nickel-induced oxidative stress in roots of wheat seedlings, *Plant Sci.*, 170, 151–158 pp.
- Heber, U., Tyankova, L. and Santarius, K.K.,** 1971, Stabilization and inactivation of biological membranes during freezing in the presence of amino acids, *Biochim. Biophys. Acta* 241, 578–582 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Heinz, G., Paola, D., Stefania, P., Alessandra, A., Maxim, V. P., Dmitri, I. S., Markus, G.G. and Guido, C.,** 2009, A Common Structural Basis for pH- and Calmodulin-mediated Regulation in Plant Glutamate Decarboxylase, *J. Mol. Biol.*, 392, 334–351 pp.
- Heyno, E., Klose, C. and Krieger-Liszkay, A.,** 2008, Origin of cadmium-induced reactive oxygen species production: mitochondrial electron transfer versus plasma membrane NADPH oxidase, *New Phytol.*, 179, 687–699 pp.
- Hossain, M.A., Hasanuzzaman, M. and Fujita, M.,** 2011, Coordinate induction of antioxidant defense and glyoxalase system by exogenous proline and glycinebetaine is correlated with salt tolerance in mung bean, *Front. Agric. China*, 5, 1–14 pp.
- Hossain, M.A., Hossain, M.Z. and Fujita, M.,** 2009, Stress-induced changes of methylglyoxal level and glyoxalase I activity in pumpkin seedlings and cDNA cloning of glyoxalase I gene, *Aust. J. Crop Sci.*, 3, 53–64 pp.
- Hossain, M.A., Hossain, M.D., Rohman, M.M., Teixeira da Silva, J.A. and Fujita, M.,** 2012, Onion major compounds (flavonoids, organosulfurs) and highly expressed glutathione-related enzymes: possible physiological interaction, gene cloning and abiotic stress response, in: C.B. Aguirre, L.M. Jaramillo, (Eds.), *Onion Consumption and Health*, Nova Science Publishers Inc., New York, United States of America, 49–90 pp.
- Hossain, M.A., Piyatida, P., Teixeira da Silva, J.A. and Fujita, M.,** 2012, Molecular mechanism of heavy metal toxicity and tolerance in plants: central role of glutathione in detoxification of reactive oxygen species and methylglyoxal and in heavy metal chelation, *J. Bot.*, 37 p.
- Hossain, M.A., Teixeira da Silva, J.A. and Fujita, M.,** 2011, Glyoxalase system and reactive oxygen species detoxification system in plant abiotic stress response and tolerance: an intimate relationship, in: A.K. Shanker, B. Venkateswarlu (Eds.), *Abiotic Stress in Plants-Mechanisms and Adaptations*, INTECH-Open Access Publisher, 235–266 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hu, T.W. and Mao, Z.**, 2006, China at the crossroads: the economics of tobacco and health, *Tob. Control* 15, 37–41 pp.
- Inger, W., Ingrid, W., Kerstin, N., Toshiaki, N., Curt, R.E., William, W.R., Noboru, Y. and Chizuko, Y.**, 1979, New labdanic diterpenoids isolated from tobacco, *Tobacco chemistry, Acta Chem. Scand*, 33b, 541–543 pp.
- Jones, R.S. and Mitchell, C.A.**, 1989, Calcium ion movement in growth inhibition of mechanically stressed soybean (*Glycine max*) seedlings, *Physiol. Plant.*, 76, 598–602 pp.
- Kathiresan, A. and et al.**, 1998, γ -Aminobutyric acid promotes stem elongation in *Stellaria longipes*: the role of ethylene, *Plant Growth Regul.*, 26, 131–137 pp.
- Kinnersley, A.M., Turano, F.J.**, 2000, γ -Aminobutyric acid (GABA) and plant responses to stress, *Crit. Rev. Plant Sci*, 19, 479–509 pp.
- Kisaka, H., Kida, T. and Miwa, T.**, 2006, Antisense suppression of glutamate decarboxylase in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) results in accumulation of glutamate in transgenic tomato fruits, *Plant Biotechnol.*, 23, 267–274 pp.
- Knight, M.R. and et al.**, 1991, Transgenic plant aequorin reports the effect of touch and cold shock and elicitors on cytoplasmic calcium, *Nature*, 352, 524–526 pp.
- Komatsuzaki, N., Tsukahara, K., Toyoshima, H., Suzuki, T., Shimizu, N. and Kimura, T.**, 2007, Effect of soaking and gaseous treatment on GABA content in germinated brown rice, *Journal of Food Engineering*, 78(2):556-560 pp.
- Koushesh Saba, M., Arzani, K. and Barzegar, M.**, 2012, Postharvest polyamine application alleviates chilling injury and affects apricot storage ability, *J. Agric. Food Chem.*, 60:8947-8953 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Krämer, U., Talke, I.N. and Hanikenne, M.,** 2007, Transition metal transport, FEBS Lett., 581: 2263–72 pp.
- Krantev, A., Yordanova, R., Janda, T., Szalai, G. and Popova, L.,** 2008, Treatment with salicylic acid decreases the effect of cadmium on photosynthesis in maize plants, J. Plant Physiol., 12, 920–931 pp.
- Kukier, U., Peters, C.A., Chaney, R.L., Angle, J.S. and Roseberg, R.J.,** 2004, The effect of pH on metal accumulation in two Alyssum species, Journal of Environmental Quality, 33, 2090–2102 pp.
- La Rocca, N., Andreoli, C., Giacometti, G.M., Rascio, N. and Moro, I.,** 2009, Responses of the Antarctic microalga Koliella antarctica (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) to cadmium contamination, Photosynthetica, 47, 471–479 pp.
- La Rocca, N., Andreoli, C., Giacometti, G.M., Rascio, N. and Moro, I.,** 2009, Responses of the Antarctic microalga Koltella antarctica (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) to cadmium contamination, Photosynthetica, 47, 471–479 pp.
- Lane, B., Kajioka, R. and Kennedy, T.,** 1987, The wheat-germ Ec protein is a zinc- containing metallothionein, Biochem. Cell Biol., 65, 1001–1005 pp.
- Laspina, N.V., Groppa, M.D., Tomaro, M.L. and Benavides, M.P.,** 2005, Nitric oxide protect sunflower leaves against Cd-induced oxidative stress, Plant Sci., 169, 323–330 pp.
- Lee, C.W., Choi, J.M. and Pak, C.H.,** 1996, Micronutrient toxicity in seed geranium (Pelargonium×hortorum Baley), Journal of the American Society for Horticultural Science, 121, 77–82 pp.
- Lee, J.H., Kim, Y.J., Jeong, D.Y., Sathiyaraj, G., Pulla, R.K., Shim, J.S., In, J.G. and Yang, D.C.,** 2010, Isolation and characterization of a glutamate decarboxylase (GAD) gene and their differential expression in response to abiotic stresses from Panaxginseng C.A. Meyer., Mol. Biol. Rep., 37, 3455–3463 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Li, H.F., Gray, C., Mico, C., Zhao, F.J. and McGrath, S.P.,** 2009, Phytotoxicity and bioavailability of cobalt to plants in a range of soils, *Chemosphere*, 75, 979–986 pp.
- Li, Z., McLaren, R.G. and Metherell, A.K.,** 2004, The availability of native and applied soil cobalt to ryegrass in relation to soil cobalt and manganese status and other soil properties, *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 47, 33–43 pp.
- Liu, L.L., Zhao, L., Li, Q., Jiang, L., Wang, C.M., Zhang, W.W., Liu, S.J., Chen, L.M., Zhai, H.Q. and Wan, J.M.,** 2004, Molecular cloning and expression of a novel glutamatedecarboxylase gene in rice, *Rice Genet. Newsl.*, 21, 39–41 pp.
- Lombi, E.L., Tearall, K.L., Howarth, J.R., Zhao, F.J., Hawkesford, M.J. and McGrath, S.P.,** 2002, Influence of iron status on cadmium and zinc uptake by different ecotypes of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*, *Plant Phys.* 128, 1359-1367 pp.
- Ma, J.F., Ryan, P.R. and Delhaize, E.,** 2001, Aluminum tolerance in plants and the complexing role of organic acids, *Trends Plant Sci.*, 6, 273-278 pp.
- Ma, J.F., Zheng, S.J., Hiradate, S. and Matsumoto, H.,** 1997, Detoxifying aluminum with buckwheat, *Nature*, 390, 569-570 pp.
- Ma, Z. and Miyasaka, S.C.,** 1998, Oxalate exudation by taro in response to Al., *Plant Physiol.*, 118, 861-865 pp.
- MacFarlane, G.R. and Burchett, M.D.,** 2001, Photosynthetic pigments and peroxidase activity as indicators of heavy metal stress in the grey mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh., *Marine Pollution Bulletin*, 233-240 pp.
- Maestri, E., Marmiroli, M., Visioli, G. and Marmiroli, N.,** 2010, Metal tolerance and hyperaccumulation: costs and trade-offs between traits and environment, *Environ Exp. Bot.*, 2010;68:1–13 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Malec, P., Waloszek, K.A., Prasad, M.N.V. and Strzalka, K.,** 2008, Zinc reversal of Cd-induced energy transfer changes in photosystem II of *Ceratophyllum demersum* L. as observed by whole-leaf 77K fluorescence, *Plant Stress*, 2:121–126 pp.
- Martinez-Romero, D., Serrano, M., Carbonell, A., Burgos, L., Riquelme, F. and Valero, D.,** 2002, Effect of postharvest putrescine treatment on extending shelf life and reducing mechanical damage in apricot, *J. Food Sci.*, 67:1706-1712 pp.
- Masters, B. A., Kelly, E. J., Quaife, C. J., Brinster, R. L. and Palmiter, R. D.,** 1994, Targeted disruption of metallothionein I and II genes increases sensitivity to cadmium, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 91, 584-588 pp.
- Mazzucotelli, E., Tartari, A., Cattivelli, L. and Forlani, G.,** 2006, Metabolism of γ -aminobutyric acid during cold acclimation and freezing and its relationship to frost tolerance in barley and wheat, *Journal of Experimental Botany*, 3755-3766 pp.
- McCarthy, I., Romero-Puertas, M.c., Palma, J.M., Sandalio, L.M., Corpas, F.J., Gomez, M. and DelRio, L.A.,** 2001, Cadmium induces senescence symptoms in leaf peroxisomes of pea plants, *Plants Cell & Environment*, 24:1065-1073 pp.
- McLean, M.D., Yevtushenko, D.P., Deschene, A., Van Cauwenberghe, O.R., Makhmoudova, A., Potter, J.W., Bown, A.W. and Shelp, B.J.,** 2003, Overexpression of glutamate decarboxylase in transgenic tobacco plants confers resistance to the northern rootknot nematode, *Mol. Breeding*, 11, 277–285 pp.
- Meharg, A.A. and Macnair, M.R.,** 1992, Suppression of the high affinity phosphate uptake system: a mechanism of arsenate tolerance in *Holcus lanatus* L., *Journal of Experimental Botany*, 43, 519–524 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Meharg, A.A.**, 1994, Integrated tolerance mechanisms—constitutive and adaptive plant—responses to elevated metal concentrations in the environment, *Plant, Cell and Environment*, 17, 989–993 pp.
- Meyer, A. and et al.**, 2006, AtGAT1, a high affinity transporter for gaminobutyric acid in *Arabidopsis thaliana*, *J. Biol. Chem.*, 281, 7197–7204 pp.
- Mhamdi, A., Queval, G., Chaouch, S., Vanderauwera, S., Van Breusegem, F. and Noctor, G.**, 2010, Catalase function in plants: a focus on *Arabidopsis* mutants as stressmimic models, *J. Exp. Bot.*, 61, 4197–4220 pp.
- Micallef, B.J. and Shelp, B.J.**, 1989, Arginine metabolism in developing soybean cotyledons, III. Utilization, *Plant Physiol.* 91, 170–174 pp.
- Michaeli, S. and et al.**, 2011, A mitochondrial GABA permease connects the GABA shunt and the TCA cycle, and is essential for normal carbon metabolism, *Plant J.*, 67, 485–498 pp.
- Milner, M.J., Craft, E., Yamaji, N., Koyama, E., Ma, J.F. and Kochian, L.V.**, 2012, Characterization of the high affinity Zn transporter from *Noccaea caerulescens*, NcZNT1, and dissection of its promoter for its role in Zn uptake and hyperaccumulation, *New Phytol.*, 195: 113–23 pp.
- Mithofer, A., Schulze, B. and Boland, W.**, 2004., Biotic and heavy metal stress response in plants: evidence for common signals, *FEBS Letters*, 566, 1–5 pp.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gallery, M. and Breusegem, F.V.**, 2004, Reactive oxygen gene network of plants, *Trends Plant Sci.*, 9, 490–498 pp.
- Mohanpuria, P., Rana, N.K. and Yadav, S.K.**, 2007, Cadmium induced oxidative stress influence on glutathione metabolic genes of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze, *Environmental Toxicology*, 22, 368–374 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Molina-Rueda, J.J., Pascual, M.B., Canovas, F.M. and Gallardo, F.,** 2010, Characterization and developmental expression of a glutamate decarboxylase from maritime pine, *Planta*, 232, 1471–1483 pp.
- Mysliwa-Kurdziel, B., Strzalka, K.,** 2002, Influence of metals on the biosynthesis of photosynthetic pigments, In: Prasad MNV, Strzalka K (eds) *Physiology and biochemistry of metal toxicity and tolerance in plants*, Springer, Netherlands, 201–228 pp.
- Nadia, G. and Nagwa, M.K.H.,** 2013, Response of growth and yield of sweet pepper (*Capsium annuum* L.) to cobalt nutrition, *World Applied Sciences Journal*, 5:760-765 pp.
- Nadia, G., Aeshah, M.M. and Lyazzat, K.B.,** 2013, Response of Cowpea (*Vigna anguiculata*) to cobalt nutrition, *Middle-East Journal of Scientific Research*, 14(2):177-184 pp.
- Neill, S., Desikan, R. and Hancock, J.,** 2002, Hydrogen peroxide signalling, *Curr. Opin. Plant Biol.*, 5, 388–395 pp.
- Nicoletta, R. and Flavia, N.I.,** 2011., Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting?, *Plant Science* 180 (2011), 169–181 pp.
- Nies, D.H.,** 1999, Microbial heavy-metal resistance, *Appl Microbiol. Biotechnol.*, 51, 730–750 pp.
- Nishida, S., Tsuzuki, C., Kato, A., Aisu, A., Yoshida, J. and Mizuno, T.,** 2011, AtIRT1, the primary iron uptake transporter in the root, mediates excess nickel accumulation in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Cell Physiol.*, 52:1433–42 pp.
- Ott, T., Sullivan, J., James, E.K., Flemetakis, E., Günther, C. and Gibon, Y., et al.,** 2009, Absence of symbiotic leghemoglobins alters bacteroid and plant cell differentiation during development of *Lotus japonicus* root nodules, *Mol Plant Microbe Interact*, 22:800-8 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Pagliano, C. and et al.,** 2006, Evidence for PSII-donor-side damage and photoinhibition induced by cadmium treatment on rice (*Oryza sativa* L.), *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 84 70–78 pp.
- Palmgren, M.G. and Axelsen, K.B.,** 1998, Evolution of P-type ATPases, *Biochim. Biophys. Acta*, 1365, 37–45 pp.
- Pavlikova, D., Zemanova, V., Prochazkova, D., Pavlik, M., Szakova, J. and Wilhelmova, N.,** 2014, The long-term effect of zinc soil contamination on selected free amino acids playing an important role in plant adaptation to stress and senescence, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 166-170 pp.
- Pence, N.S., Larsen, P.B., Ebbs, S.D., Letham, D.L.D., Lasat, M.M., Garvin, D.F., Eide, D. and Kochian, L.V.,** 2000, The molecular physiology of heavy metal transport in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 4956-4960 pp.
- Persans, M.W., Nieman, K. and Salt, D.E.,** 2001, Functional activity and role of cation-efflux family members in Ni hyperaccumulation in *Thlaspi goesingense*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 9995-10000 pp.
- Petterson, T., Eklund, A.M. and Wahlberg, I.,** 1993, New lactones from tobacco, *J. Agric. Food Chem*, 41, 2097–2103 pp.
- Piechalak, A., Tomaszewska, B., Baralkiewicz, D. and Malecka, A.,** 2002, Accumulation and detoxification of lead ions in legumes, *Phytochemistry*, 60, 153-162 pp.
- Pilon, M., Cohu, C.M., Ravet, K., Abdel-Ghany, S.E. and Gaymard, F.,** 2009, Essential transition metal homeostasis in plants, *Curr Opin Plant Biol.*, 12:347–57 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Polle, A. And Rennenberg, H.,** 1993, Significance of antioxidants in plant adaptation to environmental stress, in: T. Mansfield, L. Fowden, F. Stoddard (Eds.), Plant Adaptation to Environmental Stress, Chapman and Hall, London, 263–273 pp.
- Qadir, S., Qureshi, M.I., Javed, S. and Abdin, M.Z.,** 2004, Genotypic variation in phytoremediation potential of Brassica juncea cultivars exposed to Cd stress, Plant Science 167, 1171–1181 pp.
- Rai, V.K.,** 2002, Role of amino acids in plant responses to stresses, Biol. Plant, 45, 481-487 pp.
- Ralph, P.J. and Burchett, M.D.,** 1998, Photosynthetic response of Halophila ovalis to heavy metal stress, Environmental Pollution, 91-101 pp.
- Ramputh, A.L. and Bown, A.W.,** 1996, Rapid and γ -aminobutyric acid synthesis and the inhibition of the growth and development of oblique-banded leaf-roller larvae, Plant Physiol., 111:1349-52 pp.
- Rauser, W.E.,** 1990, Phytochelatins, Annu. Rev. Biochem., 59, 61-86 pp.
- Rauser, W.E.,** 1999, Structure and function of metal chelators produced by plants, Cell Biochem. Biophys., 31, 19-48 pp.
- Remans, T., Opdenakker, K., Smeets, K., Mathysen, D., Vangronsveld, J. and Cuypers, A.,** 2010, Metal-specific and NADPH oxidase dependent changes in lipoxygenase and NADPH oxidase gene expression in Arabidopsis thaliana exposed to cadmium or excess copper, Funct. Plant Biol., 37, 532–544 pp.
- Rizhsky, L., Liang, HJ., Shuman, J., Shulaev, V., Davletova, S. and Mittler, R.,** 2004b, When defense pathways collide, The response of Arabidopsis to a combination of drought and heat stress, Plant Physiology, 134, 1683-1696 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Robinson, N.J., Tommey, A.M., Kuske, C. and Jackson, P.J.,** 1993, Plant metallothioneins, *Biochem. J.*, 295, 1-10.
- Rodriguez-Serrano, M., Romero-Puertas, M.C., Sparkes, I., Hawes, C., del Rio, L.A. and Sandalio, L.M.,** 2009, Peroxisome dynamics in Arabidopsis plants under oxidative stress induced by cadmium, *Free Radic. Bio. Med.*, 47, 1632–1639 pp.
- Romero-Puertas, M.C., Rodriguez-Serrano, M., Corpas, F.J., Gomez, M., del Rio, L.A. and Sandalio, L.M.,** 2004, Cadmium-induced subcellular accumulation of O₂– and H₂O₂ in pea leaves, *Plant Cell Environ.*, 27, 1122–1134 pp.
- Römheld, V. and Awad, F.,** 2000, Significance of root exudates in acquisition of heavy metals from a contaminated calcareous soil by graminaceous species, *J. Plant Nutr.*, 23, 1875-1866 pp.
- Sablina, S.M. and Yagodin, B.A.,** 1987, Effect of cobalt on tomato and minerals composition, *Soils and Fertilizers*, 54:9 pp.
- Salt, D.E. and Rauser, W.E.,** 1995, MgATP-dependent transport of phytochelatins across the tonoplast of oat roots, *Plant Physiology* 107, 1293–1301 pp.
- Satya Narayan, V., Nair, P.M.,** 1990, Metabolism, enzymology and possible role of 4-aminobutyrate in higher plants, *Phytochemistry*, 367–375 pp.
- Satyanarayan, V. and Nair, P.M.,** 1990, Metabolism, enzymology and possible roles of 4-aminobutyrate in higher plants, *Phytochemistry*, 29, 367–375 pp.
- Scandalios, J.G.,** 2005, Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 38: 995–1014 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Schûtzendûbel, A. and Polle, A.,** 2002, Plant responsive to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization, *J. Exp. Bot.* 372, 1351-1365 pp.
- Schwacke, R. and et al.,** 1999, LeProT1, a transporter for proline, glycine betaine, and γ -aminobutyric acid in tomato pollen, *Plant Cell* 11, 377–391 pp.
- Scott-Taggart, C.P., Van Cauwenberghe, O.R., Mclean, M.D. and Shelp, B.J.,** 1999, Regulation of gamma-aminobutyric acid synthesis in situ by glutamate availability, *Physiol. Plant.*, 363-369 pp.
- Serraj, R., Shelp, B.J. and Sinclair, T.R.,** 1998, Accumulation of γ -aminobutyric acid in nodulated soybean in response to drought stress, *Physiol Plant*, 102, 79-86 pp.
- Sharma, S.S. and Dietz, K.J.,** 2008, The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance, *Trends Plant Sci.*, 14, 43–50 pp.
- Sharples, J.M., Meharg, A.A., Chambers, S.M. and Cairney, J.W.G.,** 2000, Evolution: symbiotic solution to arsenic contamination, *Nature*, 404, 951–952 pp.
- Shelp, B.J., Allan, W.L. and Faure, D.,** 2009, Role of γ -aminobutyrate and γ -hydroxybutyrate in plant communication. In: *Plant-Environment Interactions, Signaling and Communication in Plants*, Baluška F, Ed. Springer, 73-84 pp.
- Shelp, B.J., Bown, A.W. and McLean, M.D.,** 1999, Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid, *Trends Plant Sci.*, 4, 446–452 pp.
- Shelp, B.J., Bozzo, G.G., Trobacher, C.P., Chiu, G. and Bajwa, V.S.,** 2012a, Strategies and tools for studying the metabolism and function of γ -aminobutyrate in plants, I.Pathway structure, *Botany* 90, 651–668 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Shelp, B.J., Bozzo, G.G., Trobacher, C.P., Chiu, G. and Bajwa, V.S.,** 2012, Strategies and tools for studying the metabolism and function of γ -aminobutyrate in plants, I.Pathway structure, Botany, 90, 651–668 pp.
- Shelp, B.J., Bozzo, G.G., Trobacher, C.P., Zarei, A., Deyman, K.L. and Brikis, C.J.,** 2012, Hypothesis/review: contribution of putrescine to 4-aminobutyrate (GABA) production in response to abiotic stress, Plant Sci., 193/194,130–135 pp.
- Shi, S.Q., Shi, Z., Jiang, Z.P., Qi, L.W., Sun, X.M. and Li, C.X., et al.,** 2010, Effects of exogenous GABA on gene expression of Caragana intermedia roots under NaCl stress: regulatory roles for H₂O₂ and ethylene production, Plant Cell Environ, 33:149-62 pp.
- Shinozaki, Y., Tobita, T., Mizutani, M. and Matsuzaki, T.,** 1996, Isolation and identification of two new diterpene glycosides from Nicotiana tabacum, Biosci. Biotechnol. Biochem, 60, 903–905 pp.
- Siedlecka, A., Samuelsson, G., Gardenstrom, P., Kleczkowski, L.A. and Krupa, Z.,** 1998, The activatory model of plant response to moderate cadmium stress-relationship between carbonic anhydrase and Rubisco, in: G. Garab (Ed.), Photosynthesis: Mechanisms and Effects, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2677–2680 pp.
- Smeets, K., Cuypers, A., Lambrechts, A., Semane, B., Hoet, P., Van Laere, P. And et al.,** 2005, Induction of oxidative stress and antioxidative mechanism in Phaseolus vulgaris after Cd application, Plant Physiology and Biochemistry, 43:437-444 pp.
- Smirnoff, N. and Cumbes, Q.J.,** 1989, Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes, Phytochemistry 28, 1057–1060 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Snedden, W.A. and Fromm, H.,** 1999, Regulation of the γ -aminobutyrate-synthesizing enzyme, glutamate decarboxylase, by calcium-calmodulin: a mechanism for rapid activation in response to stress, In Plant Responses to Environmental Stresses: From Phytohormones to Genome Reorganization (Lerner, H.R., ed.), 549-574 pp.
- Snedden, W.A. and Fromm, H.,** 2001, Calmodulin as a versatile calcium signal transducer in plants, *New Phytol.*, 151, 35–66 pp.
- Srivastava, S., Tripathi, R.D. and Dwivedi, U.N.,** 2004, Synthesis of phytochelatins and modulation of antioxidants in response to cadmium stress in *Cuscuta reflexa*—an angiospermic parasite, *Journal of Plant Physiology* 161, 665–674 pp.
- Steward, G.R. and et al.,** 1949, γ -Aminobutyric acid: a constituent of the potato tuber?, *Science*, 110, 439-440 pp.
- Studart-Guimaraes, C. and et al.,** 2007, Reduced expression of succinyl-CoA ligase can be compensated for by an upregulation of the γ -aminobutyrate (GABA) shunt in illuminated tomato leaves, *Plant Physiol.*, 145(3), 626-639 pp.
- Sulieman, S. and Schulze, J.,** 2010, Phloem derived γ -aminobutyric acid (GABA) is involved in upregulating nodule N₂ fixation efficiency in the model legume *Medicago truncatula*, *Plant Cell Environ.*, 33, 2162-72 pp.
- Takahashi, R., Bashir, K., Ishimaru, Y., Nishizawa, N.K. and Nakanishi, H.,** 2012, The role of heavy-metal ATPases, HMAs, in zinc and cadmium transport in rice, *Plant Signal Behav.*, 1799–801 pp.
- Talanova, V.V., Titov, A.F. and Boeva, N.P.,** 2000, Effect of increasing concentration of lead and cadmium on cucumber seedlings, *Biol. Plant.*, 43, 441-444 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Tan, Y.F., Toole, N.O., Taylor, N.L. and Millar, A.H.,** 2010, Divalent metal ions in plant mitochondria and their role in interactions with proteins and oxidative stress-induced damage to respiratory function, *Plant Physiol.*, 152, 747–761 pp.
- Thornalley, P.J.,** 1990, The glyoxalase system: new developments towards functional characterization of a metabolic pathway fundamental to biological life, *Biochem. J.*, 269, 1–11 pp.
- Trossat, C., Rathinasabapathi, B. and Hanson, A.D.,** 1997, Transgenically expressed betaine aldehyde dehydrogenase efficiently catalyses oxidation of dimethylsulfonipropionaldehyde and γ -aminoaldehydes, *Plant Physiol.*, 113, 1457–1461 pp.
- Tuin, L.G. and Shelp, B.J.,** 1996, In situ [^{14}C] glutamate metabolism by developing soybean cotyledons. II. The importance of glutamate decarboxylation, *J. Plant Physiol.*, 147, 714–720 pp.
- Turano, F.J. and Fang, T.K.,** 1998, Characterization of two glutamatedecarboxylase cDNA clones from Arabidopsis, *Plant Physiol.*, 117, 1411–1421 pp.
- Van Assche, F. and Clijsters, H.,** 1986, Inhibition of photosynthesis in *Phaseolus vulgaris* by treatment with toxic concentration of zinc: effect on ribulose-1,5- biphosphate carboxylase/oxygenase, *J. Plant Physiol.*, 125, 355–360 pp.
- Van Cauwenberghe, O.R. and et al.,** 2002, Plant pyruvate-dependent gamma-aminobutyrate transaminase: identification of an Arabidopsis cDNA and its expression in *Escherichia coli*, *Can. J. Bot.*, 80, 933–941 pp.
- Van der Zaal, B.J., Neuteboom, L.W., Pinas, J.E., Chardonnens, A.N., Schat, H., Verkleij, J.A. and Hooykaas, P.J.,** 1999, Overexpression of a novel Arabidopsis gene related to putative zinc transporter genes from animals can lead to enhanced zinc resistance and accumulation, *Plant Physiol.*, 119, 1047-1056 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Vance, C.P. and Heichel, G.H.**, 1991, Carbon in N₂ fixation—limitation or exquisite adaptation, *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 42:373-92 pp.
- Ventrella, A., Catucci, L., Piletska, E., Piletsky, S. and Agostiano, A.**, 2011, Interactions between heavy metals and photosynthetic materials studied by optical techniques, *Bioelectrochemistry*, 77:19–25 pp.
- Wang, C., Fan, L., Gao, H., Wu, X., Li, J., Lv, J. and Gong, B.**, 2014, Polyamine biosynthesis and degradation are modulated by exogenous gamma-aminobutyric acid in root-zone hypoxia-stressed melon roots, *Plant Physiology and Biochemistry*, 82:17-26 pp.
- Weast, R.C.**, 1984, CRC handbook of chemistry and physics, 64th ed., Boca Raton, CRC Press 1984.
- Wei, X.C., Sumithran, S.C., Deaciuc, A.G., Burton, H.R., Bush, L.P., Dwoskin, L.P. and Crooks, P.A.**, 2005, Identification and synthesis of novel alkaloids from the root system of *Nicotiana tabacum*: affinity for neuronal nicotinic acetylcholine receptors, *Life Sci*, 78, 495–505 pp.
- Wildner, G.F. and Henkel, J.**, 1979, The effect of divalent metal ion on the activity of Mg²⁺-depleted ribulose-1, 5-bisphosphate oxygenase, *Planta* 146,223–228 pp.
- Wójcik, M. and Tukiendorf, A.**, 2004, Phytochelatin synthesis and cadmium localization in wild type of *Arabidopsis thaliana*, *Plant Growth Regulation*, 44, 71–80 pp.
- Wojtaszek, P.**, 1997, Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochemical Journal* 322, 681–692 pp.
- Xu, J., Zhu, Y., Ge, Q., Sun, J., Zhang, Y. and Liu, X.**, 2012, Comparative physiological responses of *Solanum nigrum* and *Solanum torvum* to cadmium stress, *New Phytologist*, 196:125-138 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Xue, T., Li, X., Zhu, W., Wu, C., Yang, G. and Zheng, C.,** 2009, Cotton metallothionein GhMT3a, a reactive oxygen species scavenger, increased tolerance against abiotic stress in transgenic tobacco and yeast, *J. Exp. Bot.*, 2009;60:339–49 pp.
- Yadav, S.K.,** 2010, Heavy metal toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants, *South African Journal of Botany*, 167-179 pp.
- Yancey, P.H.,** 1994, Compatible and counteracting solutes, in *Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation* (Strange, K., ed.), 81–109 pp.
- Yang, C-H. and Crowley, D.E.,** 2000, Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status, *App. Environ. Microb.*, 66, 345-351 pp.
- Yang, R., Guo, Q. and Gu, Z.,** 2013, GABA shunt and polyamine degradation pathway on γ -aminobutyric acid accumulation in germinating fava bean (*Vicia faba* L.) under hypoxia, *Food Chemistry*, 152-159 pp.
- Yang, X., Peng, H. and Tian, S.,** 2005, Gamma-aminobutyric acid accumulation in *Elsholtzia splendens* in response to copper toxicity, *Journal of Zhejiang University Science*, (2):96-99.
- Yang, Z., Wu, Y., Li, Y., Ling, H-Q. and Chu, C.,** 2009, OsMT1a, a type 1 metallothionein, plays the pivotal role in zinc homeostasis and drought tolerance in rice, *Plant Mol. Biol.*, 70:219–29 pp.
- Yang, Z.M., Sivaguru, M., Horst, W.J. and Matsumoto, H.,** 2001, Aluminum tolerance is achieved by exudation of citric acid from roots of soybean (*Glycine max*), *Physiol. Plant.*, 110, 72-74 pp.
- Youn, Y.S., Park, J.K., Jang, H.D. and Rhee, Y.W.,** 2011, Sequential hydration with anaerobic and heat treatment increases GABA (γ -aminobutyric acid) content in wheat, *Food Chemistry*, 129:1631-1635 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Yu, W., Santhanagopalan, V., Sewell, A.K. Jensen, L.T. and Winge, D.R.,** 1994, Dominance of metallothionein in metal buffering in yeast capable of synthesis of (gamma EC)nG isopeptides, J. Biol. Chem., 269, 21010-21015 pp.
- Yuan, T. and Vogel, H.J.,** 1998, Calcium-calmodulin-induced dimerization of the carboxyl-terminal domain from petunia glutamate decarboxylase, J. Biol. Chem., 273, 30328–30335 pp.
- Zik, M. and et al.,** 1998, Two isoforms of glutamate decarboxylase in Arabidopsis are regulated by calcium/calmodulin and differ in organ distribution, Plant Mol. Biol., 37, 967–975 pp.

ÖZGEÇMİŞ

Zeycan AKCAN DAŞ, 9 Ekim 1987 yılında Mersin’de doğmuştur. 2005 yılında Teyfik Sırrı Gür Yabancı Dil Ağırlıklı Program Uygulayan Lise’sini bitirmiştir. Lisans eğitimini, Ege Üniversitesi Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Opsiyonundan 2011 yılında mezun olarak tamamlamıştır. 2014 yılında Anadolu Üniversitesi, Açıköğretim Fakültesi, Adalet bölümünü bitirdi. Lisansüstü eğitimine 2011 yılında, Ege Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Genel Biyoloji Anabilim Dalı’nda Doç. Dr. Melike BOR danışmanlığında başlamıştır.