

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**KURAKLIK STRESİNE VERİLEN YANITLARLA
İLGİLİ SİNYAL İLETİM SÜREÇLERİNDE GAMMA
AMİNO BÜTİRİK ASİTİN (GABA) ROLÜ**

Alpay PELVAN

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Melike BOR

Biyoloji Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi : 08.12.2015

Bornova-İZMİR

2015

Alpay PELVAN tarafından YÜKSEK LİSANS tezi olarak sunulan “: Kuraklık Stresine Verilen Yanıtlarla İlgili Sinyal İletim Süreçlerinde Gamma Amino Bütirik Asitin (GABA) Rolü” 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 08.12.2015 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 “Kuraklık Stresine Verilen Yanıtlarla İlgili Sinyal İletim Süreçlerinde Gamma Amino Bütirik Asitin (GABA) Rolü” 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.

08 / 12 / 2015

Alpay PELVAN

ÖZET**KURAKLIK STRESİNE VERİLEN YANITLARLA İLGİLİ
SİNYAL İLETİM SÜREÇLERİNDE GAMMA AMİNO BÜTİRİK
ASİTİN (GABA) ROLÜ**

PELVAN, Alpay

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Melike BOR

Aralık 2015, 62 sayfa

Bitkiler, biyotik ve kuraklık, tuz, yüksek sıcaklık gibi abiyotik streslere sürekli maruz kalmaktadır. Gamma aminobütirik asit (GABA), protein yapısına katılmayan bir amino asittir. Tek ve çok hücreli birçok organizmada bulunmaktadır. Bitkilerde çeşitli görevleri bilinmekle birlikte stres koşullarında sinyal yollarında görevli olduğuna dair çeşitli öngörülerde literatürde mevcuttur. Araştırma projemizde bütün bitkisinde kuraklık stresi koşulları altında GABA yolu ve ilgili bileşenlerinin günlük ritimdeki (aydınlık-karanlık fotoperiyotlarda) seviyelerini incelemeyi ve karşılaştırmayı hedefledik.

Çalışmamızda % 20 lik PEG ile oluşturulan kuraklık stresi koşullarında GABA, glutamat ve prolin miktarındaki ve glutamat dehidrogeneaz (GDH) ve glutamat dekarboksilaz (GAD) enzim aktivitelerindeki değişimleri inceledik. Elde ettiğimiz sonuçlar, aydınlık-karanlık geçişlerinde bütün bitkisinin GABA, glutamat ve prolin üçlüsünü stres yanıtlarını oluşturmak açısından etkin biçimde kullandığını göstermektedir.

Anahtar Sözcükler: GABA, *Nicotiana tabacum*, Kuraklık Stresi.

ABSTRACT**THE ROLE OF GAMMA AMINO BUTYRIC ACID (GABA) IN
SIGNAL TRANSDUCTION PROCESSES IN RELATION TO
DROUGHT RESPONSES**

PELVAN, Alpay

MSc in Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Melike BOR

December 2015, 62 pages

Plants encounter different environmental stresses such as; biotic stress, drought, salt and high temperature during their lifespan. Gamma aminobutyric acid (GABA), is a non-protein amino acid. It is found in several unicellular and multicellular organisms. Up to date its role on several processes in plants have been elucidated and in literature there are hypothesis about its role as a signalling molecule. In our research we aimed to analyse GABA and GABA shunt components in diurnal rhythm (day-night cycles) of tobacco plants under the effect of drought stress.

Drought stress was induced by 20 % PEG in tobacco plants and the differences in GABA, glutamate and proline contents, and glutamate dehydrogenase (GDH) and glutamate decarboxylase (GAD) enzyme activities were analyzed in plant leaf samples taken during diurnal rhythm. According to our findings, GABA, glutamate and proline act in collaboration for addressing stress induced responses in tobacco plants during the shifts from day to night cycles.

Keywords: GABA, *Nicotiana tabacum*, drought stress.

TEŞEKKÜR

Lisans hayatımda aldığım dersler boyunca bilgi ve birikimini paylaşmaktan çekinmeyen, lisanüstü hayatıma başlamama vesile olan, bu dönemde her zaman desteğini bana hissettiren ve laboratuvar çalışmalarında öğrettikleriyle üzerimde çok emeği olan Sayın Hocam Doç. Dr. Melike BOR 'a, yüksek lisansım boyunca her türlü desteğini eksik etmeyen, bilgi ve birikimini paylaşmaktan çekinmeyen Sayın Hocam Filiz ÖZDEMİR 'e teşekkür ederim.

Lisans ve lisansüstü dönemlerimde değerli bigilerini benimle paylaşan hocalarım Prof. Dr. İsmail Türkan, Doç. Dr. Hediye SEKMEN ESEN 'e ve Araş. Gör. Dr. Ali ÖZCAN 'a teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarımı tamamlamamda bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım arkadaşlarım Uzman Tuğba KARABUDAK ' a , Dr. Seher YOLCU 'ya teşekkür ederim.

Yüksek lisans hayatım boyunca her konuda okulda ve okul dışı her zaman yanımda olduklarını hissettiğim,yardımlarını, bilgi ve birikimlerini benden hiç bir zaman esirgemeyen arkadaşlarım Araş. Gör. M. Süleyman İLHAN 'a, Uzman Azime GÖKÇE 'ye, Uzman Gizem DİMLİOĞLU 'na, ve Yasemin KALAYCI 'ya teşekkür ederim.

Hayatımın her anında benden desteklerini esirgemeyen, her verdiğim kararda yanımda olan ve bana güvenlerini her zaman hissettiğim babam Nuralp PELVAN 'a, annem Aylan PELVAN 'a,ağabeyim Naci Murat PELVAN 'a ve her zaman dualarını benden esirgemediğini bildiğim ananem Meliha ERSÖZ 'e sonsuz teşekkürler.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜR	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xix
1. GİRİŞ	1
1.1 Kuraklık Stresi	2
1.1.1 Kuraklık stresinin tanımı ve bitkilerde meydana getirdiği etkiler	2
1.1.2. Kuraklık toleransı ile ilişkili mekanizmalar	7
1.1.3. ABA-bağımsız yolak	6
1.1.4. ABA-bağımlı yolak	8
1.2 GABA ve GABA Metabolizması	11
1.2.1 GABA metabolizmasında yer alan enzimler	13
1.3 Bitkilerde GABA Fonksiyonları ve Önemi	14
1.3.1 GABA'nın pH düzenlenmesindeki rolü	14
1.3.2 GABA metabolizma yolağının solunumdaki rolü	15

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

1.3.3 GABA'nın meyve gelişimindeki rolü	15
1.3.4 GABA'nın geçici azot depolanmasındaki rolü	16
1.3.5 Bitki gelişiminde GABA'nın rolü	16
1.3.6 Bitki Savunmasında GABA'nın Rolü	17
1.4 Tütün (Nicotiana tabaccum L.) Bitkisi	17
1.5 Araştırma Projesinin Amacı	17
1.5.Hipotez	18
2. MATERYAL VE METOD	19
2.1 Bitki Materyali ve Yetiştirilmesi	19
2.2 Kuraklık Stresi Uygulanması	19
2.3 Büyüme Parametrelerinin Ölçülmesi	19
2.4. Klorofil Floresans Ölçümü	20
2.5 Bağlı Su Miktarı (RWC)	20
2.6 Yaprak Ozmotik Potansiyeli	20
2.7 Yaprak Elektrolit İletkenlik Değişiminin Belirlenmesimesi	20

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

2.8 Total Protein Miktarlarının Belirlenmesi	21
2.9 Glutamat Dehidrogenaz (GDH) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	21
2.10 Glutamat Dekarboksilaz (GAD) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	22
2.11 GABA Miktarının Belirlenmesi	22
2.12 Glutamat Miktarının Belirlenmesi	23
2.13 Prolin Analizi	24
3. BULGULAR	25
3.1 Kök Yaş ve Kuru Ağırlıkları	25
3.2 Fotosentetik Verim	26
3.3 Yaprak Elektriksel Sızıntı Ölçümleri	27
3.4 Bağlı Su İçeriği (RWC)	27
3.5 Yaprak Osmotik Potansiyeli	28
3.6 Enzim Aktivite Değişimleri	29
3.6.1 Glutamat dehidrogenaz (GDH) enzim aktivitesi	29
3.6.2 Glutamat dekarboksilaz (GAD) enzim aktivitesi	30
3.7 GABA Miktarının Belirlenmesi	31

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.8 Glutamat Miktarının Belirlenmesi	32
3.9 Prolin Miktarı	33
4. TARTIŞMA	35
5.SONUÇLAR	41
KAYNAKLAR DİZİNİ	43
ÖZGEÇMİŞ.....	62

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Abiyotik stres ile ilgili sinyallerin ve gen ifadesinin düzenlenmesi (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki 2006).	1
1.2 Kuraklık stresinin tolerans mekanizmaları.m(Young-Cheol et al., 2012).....	4
1.3 Kuraklık stresi altında fotosentez.. (Farooq et al., 2009).	5
1.4 Cis-acting elementlerin transkripsiyonel düzenlenme ağı ve soğuk, kuraklık ve tuzluluk stresinden kaynaklı gen ekspresiyonu ve ABA-bağımlı ve ABA-bağımsız transkripsiyonel faktörleri (Guo-Tao et al. 2012).....	11
1.5 GABA shunt ve GABA'nın diğer metabolik yollarla ilişkisi (Shelp et al., 1999).....	12
3.1 <i>Nicotiana tabacum</i> bitkisinde kontrol ve kuraklık stresi koşullarında 0., 1. ve 2. günlerde kök yaş ağırlık (g) değerlerindeki değişimin belirlenmesi.	25
3.2 <i>Nicotiana tabacum</i> bitkisinde kontrol ve kuraklık stresi koşullarında 0., 1. ve 2. günlerde kök kuru ağırlık (g) değerlerindeki değişimin belirlenmesi.	26
3.3 <i>Nicotiana tabacum</i> bitkisinde kontrol ve kuraklık stresi koşullarında 0., 1. ve 2. günlerde fotosentetik verim (Fv/Fm) değerlerindeki değişimin belirlenmesi.	26
3.4 <i>Nicotiana tabacum</i> bitkisinde kontrol ve kuraklık stresi koşullarında 0., 1. ve 2. günlerde yapraklardaki iyon sızıntısı (%) değerlerindeki değişimin belirlenmesi.	27
3.5 <i>Nicotiana tabacum</i> bitkisinde kontrol ve kuraklık stresi koşullarında 0., 1. ve 2. günlerde bağıl su içeriği (%) değerlerindeki değişimin belirlenmesi.....	28
3.6 <i>Nicotiana tabacum</i> bitkisinde kontrol ve kuraklık stresi koşullarında 0., 1. ve 2. günlerde yaprak osmotik potansiyel (mmol kg ⁻¹) değerlerindeki değişimin belirlenmesi.	28
3.7 <i>Nicotiana tabacum</i> bitkisinde kontrol ve kuraklık stresi koşullarında GDH enzim aktivitesindeki (µmol dk mg protein ⁻¹) değişimlerin 24 saatlik aydınlık-karanlık döngüsünde ve 48. saatte belirlenmesi	29
3.8 <i>Nicotiana tabacum</i> bitkisinde kontrol ve kuraklık stresi koşullarında GAD enzim aktivitesindeki (µmol dk mg protein ⁻¹) değişimlerin 24 saatlik aydınlık-karanlık döngüsünde ve 48. saatte belirlenmesi	30
3.9 <i>Nicotiana tabacum</i> bitkisinde kontrol ve kuraklık stresi koşullarında GABA miktarındaki (µmol g yaş ağırlık ⁻¹) değişimlerin 24 saatlik aydınlık-karanlık döngüsünde ve 48. saatte belirlenmesi	31

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)ŞekilSayfa

- 3.10 *Nicotiana tabacum* bitkisinde kontrol ve kuraklık stresi koşullarında glutamat miktarındaki ($\mu\text{mol g yaş ağırlık}^{-1}$) değişimlerin 24 saatlik aydınlık-karanlık döngüsünde ve 48. saatte belirlenmesi 33
- 3.11 *Nicotiana tabacum* bitkisinde kontrol ve kuraklık stresi koşullarında prolin miktarındaki ($\mu\text{mol g yaş ağırlık}^{-1}$) değişimlerin 24 saatlik aydınlık-karanlık döngüsünde ve 48. saatte belirlenmesi34

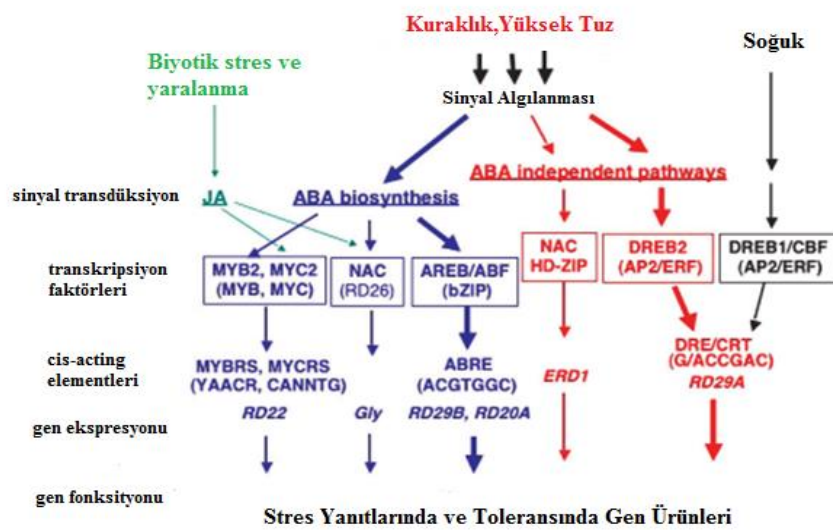
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
GABA	Gamma aminobütirik asit
GABA-T	GABA-transaminaz
GABA-TP	GABA-transaminaz pirüvat
GABA-TK	GABA-transaminaz α -ketoglutarat
GAD	Glutamat dekarboksilaz
GDH	Glutamat dehidrogenaz
ABA	Absisik asit
NO	Nitrik oksit
SSA	Süksinik semialdehit
SSDH	Süksinik semialdehit dehidrogenaz
MeJa	Metal jasmonik asit
SA	Salisilik asit
ABRE	ABA 'ya duyarlı element
ABF	ABRE bağlanma faktörü
HHP1	Heptahelikal protein 1
CNS	Merkezi sinir sistemi
NMR	Nükleer manyetik rezonans
PEG	Poli etilen glikol
<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
γ	Gamma

1. GİRİŞ

Bitkiler yaşadıkları ortamda yer değiştirmedikleri için çevresel streslere tüm canlılardan daha fazla maruz kalırlar. Tarımsal üretimi olumsuz etkileyen başta abiyotik stres faktörleri olmak üzere çevresel stresler ve bitkiler tarafından bu streslere verilen yanıtlar bilim insanlarının üzerinde yoğun olarak çalıştığı konulardır. (Cavanagh et al., 2008; Munns and Tester, 2008; Chinnusamy and Zhu, 2009; Mittler and Blumwald, 2010). Abiyotik stresler, kuraklık stresinin de dahil olduğu, tuz stresi, yüksek sıcaklık, düşük sıcaklık, donma, besin azlığı veya fazlalığı ve yüksek ışık yoğunluğu gibi farklı şekillerde gruplanmaktadır. (Wang et al., 2003; Chaves and Oliveira, 2004; Agarwal and Grover, 2006; Nakashima and Yamaguchi-Shinozaki, 2006; Hirel et al., 2007; Bailey-Serres and Voesenek, 2008).

Ekonomik değeri olan bitkilerin, yetiştirilme koşullarındaki değişiklikler ve bazı gereksinimlerinin eksikliği nedeniyle verimlerinde azalma görülmektedir. Bununla birlikte dünya genelinde insanlar su kıtlığı ile karşı karşıyadır ve kuraklık besin güvenliğini tehdit eden en kritik problemdir. Dünya'daki temiz ve kullanılabilir su kaynakları giderek azalmaktadır. Gelecekte de insan popülasyonu, dolayısıyla gıda talebi de artacaktır. Kuraklık; gıda ya da ekonomik değeri olan bir bitkinin yetersizliğine ve verim azalışına neden olan en önemli etkidir. (Somerville and Briscoe 2001).



Şekil 1.1 Abiyotik stres ile ilgili sinyallerin ve gen ifadesinin düzenlenmesi (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki 2006).

1.1 Kuraklık Stresi

1.1.1 Kuraklık stresinin tanımı ve bitkilerde meydana getirdiği etkiler

Su tüm canlılar için olduğu gibi bitkiler için de hayati öneme sahiptir. Bitkiler yaşam döngüleri boyunca gelişim ve büyüme süreçlerini sürdürebilmek için topraktaki suyu etkin bir biçimde almak ve kullanmak zorundadır. Topraktaki su içeriği veya alınabilirliği düşük olduğunda bitkiler ihtiyaç duydukları suyu temin edemezler. Sonuç olarak bitkiler kuraklık stresi adını verdiğimiz tüm fizyolojik ve biyokimyasal süreçleri olumsuz etkileyen önemli bir abiyotik stres çeşidine maruz kalırlar. Kuraklık stresinin bitkiler üzerindeki etkilerinin günümüzde iklim değişikliği, yağış miktarındaki azalma, temiz ve kullanılabilir su kaynaklarının kısıtlanması gibi etkenler nedeniyle daha da artış göstermesi beklenmektedir (Rosegrant and Cline, 2003). Kuraklık stresinin bitkiler üzerindeki etkilerinin anlaşılması ve savunma süreçlerinin tanımlanması dünya genelinde sürdürülebilir tarım için büyük önem teşkil etmektedir. Bitkiler sesil yaşam biçimleri nedeniyle kuraklığında içinde bulunduğu çeşitli çevresel streslere karşı özel savunma mekanizmaları geliştirmişlerdir.

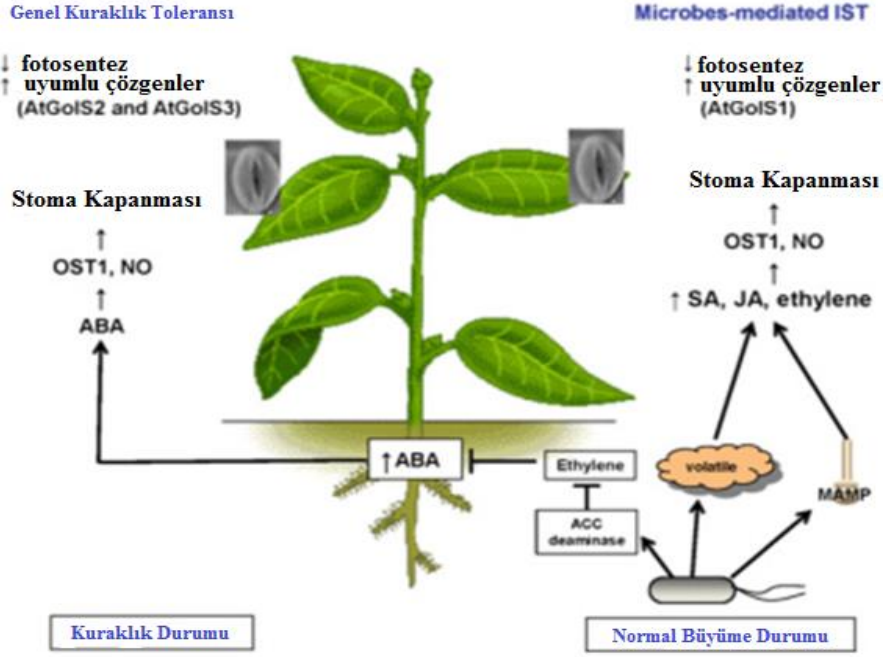
Kuraklığın şiddeti su miktarının düşük olduğu veya yağışın hava koşullarına bağlı olarak değiştiği bölgelerde önceden belirlenemez. Su kaynakları günden güne azalmaktadır. Hızlı nüfus artışı ve sosyal gereksinimler sürdürülebilir su kullanımının önemini daha da arttırmaktadır (Rosegrant and Cline, 2003). Toprak suyu eksikliği kuraklığına yanıt veren bitkiler, kuraklık toleransı ve kuraklıktan kaçınma için daha ileri direnç (dokuda su potansiyelinin korunumu) ile ya kuraklık direnç mekanizmaları ya da kuraklık kaçıışı sergilemektedirler (Levitt, 1980; Price et al., 2002). Kuraklıktan kaçış, bitkilerin şiddetli stres yer almadan önce hayat döngüsünü tamamlama yeteneği olarak tanımlanır. Kuraklığı uzaklaştırma, toprakta su eksikliği olduğu halde yüksek doku su potansiyelinin sürdürülmesidir. Stres altında geliştirilmiş su alınımlı, zamanla kazanılan suyu tutmak için bitki hücrelerinin kapasitesi ve daha ileri su kaybını azaltmak gibi mekanizmalar kuraklıktan kaçınmayı sağlarlar. Bitkiler gelişmiş kök özellikleri sayesinde (Price et al., 2002) ve indirgenmiş epidermal (stomatal ve kutikular) geçirgenlik, indirgenmiş radyasyon absorpsiyonu ve buharlaşma yüzey(yaprak alanı) ile kaçınma mekanizmalarını kullanarak su eksikliğine yanıt verir. Kuraklık toleransı dokudaki düşük su potansiyeli ile su azlığına karşı koyma yeteneğidir (Ingram and Bartels, 1996). Kuraklık stresi altındaki bitkiler, uyumlu eriyiklerin

birikimi sayesinde buharlaşarak oluşan su kaybını azaltma ve hücredeki turgoru sürdürme gibi diğer mekanizmalar ile hayatta kalabilir.

Bir bitkinin kuraklık stresine verdiği yanıtlar ve yaşam döngüsünü sürdürebilmesi hücre düzeyinde gerçekleşen savunma süreçlerine bağlıdır. Bitkilerde su eksikliği stresi bir sinyal iletim yolağı ile algılar. Bitki hormonu ABA, kuraklık stresini tanıyan başlıca sinyallerden biridir. ABA üretimini tetikleyen kuraklık stresi algısı, bitkilerdeki kuraklık stresi toleransını ilgilendiren sinyal transdüksiyon yolağının akışını düzenler (Shinozaki and Yamaguchi-Schinozaki 1997).

Kuraklık stresinde fizyolojik değişimlerdeki akış stoma kapanması, fotosentezin azalması ve çeşitli uyumlu çözünmüş maddelerin birikiminden meydana gelir. Çünkü birçok inceleme ABA' nın rolünün detaylarını ve ABA nedenli stoma kapanışını vurgulayan moleküler ve hücresel olayların sonuçlarını göstermektedir (Shinozaki and Yamaguchi-Schinozaki 1997; Lee and Luan 2012). Arabidopsis' te transkriptom analizleri kuraklık stresi ile ifadeleri değişen çok sayıda geni tanımlamıştır, bu genler; dehidrasyonla ilişkili ve dehidrasyona erken yanıt genleri olarak gruplandırılmıştır (Shinozaki and Yamaguchi-Schinozaki 1996). Kuraklık stresine maruz kalan bir bitkide ABA köklerde sentezlenerek ve stomaların kapanmasını uyarmak için yapraklara taşınır. Stoma açılıp-kapanmasının düzenlenmesinde ile ilgili ABA biyosentez mutantları (ABA mutantları) ve ABA yanıt mutantlarının bir kısmı (abi mutantları) su stresine karşı çok duyarlıdır (Leung and Giraudat 1998; Schroeder et al. 2001).

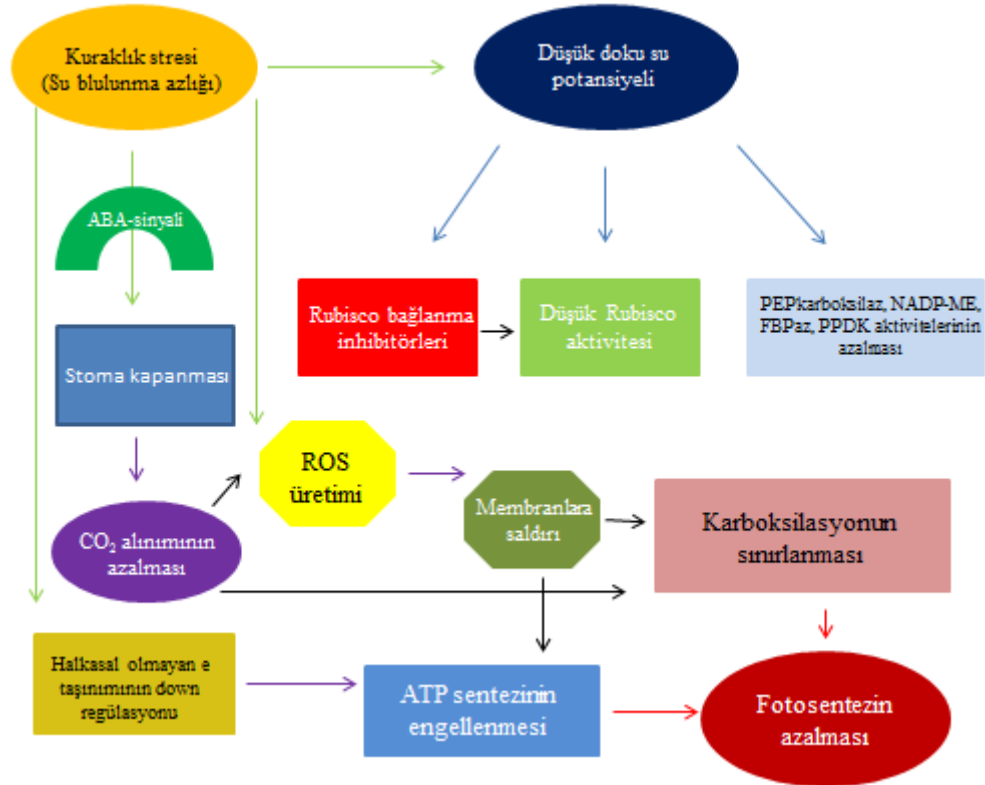
ABA sinyal iletim süreci, nitrik oksit (NO), etilen, salisilik asit, jasmonik asit'i de içine alan antagonistik ve/veya sinerjistik olarak hareket eden başka yollarla da bağlantılıdır (Manthe et al. 1992; Leung and Giraudat 1998; Evans 2003; Anderson et al. 2004; Suhita et al. 2004; Desikan et al. 2006; Mosher et al. 2010). ABA tarafından NO üretiminin tetiklenmesi önemli bir adımdır çünkü NO' nun süpürülmesi stoma kapanmasını inhibe eder (Neill et al. 2008). ABA, etilen, metal jasmonik asit (MeJA) ya da NO' nun tek olarak dıştan uygulanması stomaların kapanmasına neden olur. Tersine, stoma kapanması, ABA ve NO' nun etilen ile karışımının uygulandığı bitkilerde önemli derecede azalmaktadır (Desikan et al. 2006; Munemasa et al. 2007). Genel olarak ABA; SA, JA ve etilen bağımlı patojen dayanıklılığını negatif olarak düzenler (Anderson et al. 2004; Mosher et al. 2010).



Şekil1.2.Kuraklık stresinin tolerans mekanizmaları. Kuraklık stresi altındaki kuraklık toleransı (solda) ve bir mikrop aracılığıyla çalışmayla ilgili olan kuraklık stresine toleransın uyarılmasını vurgulayan rizosfer bağımlı mekanizmalara ilişkin önerilen mekanizmalar normal büyüme koşulu altında etki eder. Kuraklık stresi, ABA' nın üretimini tetikler ve ABA sırasıyla bir sinyalizasyon basamağına ilişkin çeşitli genlerin ekspresyonunu, stomaların kapanması ve uyumlu eryiklerin birikimi ve biyokimyasal koruma mekanizmalarının akış düzeni için NO ve Ost1 aktivasyonunun üretimini indükler. Bu fizyolojik ve biyokimyasal değişimler su kaybını önlemek için yaprak transpirasyonunu azaltır ve dehidrasyona karşı bitkinin yanıtını başlıca savunandır. Ayrıca bu değişimler yapraklardaki fotosentezi azaltır. (Kim et al., 2012)

Kuraklığın bitkiler üzerinde oluşturduğu önemli etkilerden biri de fotosentez verimindeki azalmadır. Fotosentez verimindeki azalma, yaprak yüzeyinin azalması, fotosentez mekanizmasında bozulma, yaprak senesensinin erken aşamada meydana gelmesi sonucunda ortaya çıkar (Wahid and Rasul 2005). Kuraklık nedeniyle stoma açıklığında meydana gelen azalma yapraklar tarafından CO₂ alınımını kısıtlamaktadır. Ortamdaki CO₂ miktarındaki düşüş bulunması fotosentetik verimin azalmasına ve ışık hasarının ortaya çıkmasına yol açar (Cornic and Massacci 1996). Fotosentetik aktivitenin indirgenmesi, stoma kapanması ve fotosentetik enzim etkisinin indirgenmesi gibi birkaç faktör nedeniyle kuraklık stresine karşı verilen biyokimyasal ve fizyolojik yanıtlardan biridir (Tataeizadeh 1998; Giardi et al.1996). Özellikle fotosistem II ve reaksiyon merkezi, kuraklık stresine eşlik eden oksidatif hasara karşı çok hassastır (Toivonen and Vidaver 1988). Bununla birlikte kuraklık fotosentetik pigmentler ve ilgili diğer bileşiklerin yapısını ve miktarını değişime uğratarak fotosentetik aparatlara zarar verir (Fu J. and Huang 2001; Monakhova and Chernyadëv 2002;

Anjum et al. 2003). Fotosentez ile ilgili enzim ve diğer moleküllerin yapılarının ve biyosentez süreçlerinin etkilenmesindeki en önemli etken kuraklık nedeniyle reaktif oksijen türlerinin üretimindeki artıştır. Bu durum proteinlerdeki, membran lipidlerindeki ve diğer hücresel bileşenlerindeki oksidatif stresi indükleyen reaktif oksijen türlerinin birikimine yol açar (Fu J. and Huang 2001; Reddy et al. 2004).



Şekil1.3. Kuraklık stresi altında fotosentez. Stres altında fotosentezdeki olası mekanizmalar indirgenir. Kuraklık stresi, reaktif oksijen türlerinin üretimi ve antioksidant savunma arasındaki dengeyi bozar, bu da oksidatif stresi indükleyen reaktif oksijen türlerinin birikimine sebep olur. Uygun su miktarındaki azalmada bitkiler stomalarını kapatırlar (ABA sinyalizasyonu yolu ile), bu yüzden CO₂ girişinde azalma meydana gelir. CO₂'deki azalma sadece karboksilasyonu direkt olarak indirmekle kalmaz ayrıca reaktif oksijen türlerini oluşturmak için daha çok elektron yönlendirir. Şiddetli kuraklık koşulları altında ribuloz-1,5-bifosfat karboksilaz/oksijenaz (Rubisco), fosfoenolpiruvat karboksilaz (PEPCase), NADP-malik enzim (NADP-ME), fruktoz-1,6-bifosfataz (FBPase) ve piruvat ortofosfat dikinaz (PPDK)'nın aktivitelerindeki düşüş sebebiyle fotosentez kısıtlanır. Dokudaki azalmış su içeriği, Rubisco' nun bağlanma inhibitörlerinin aktivitelerini artırır. Dahası, non-siklik elektron taşınımı, üretim gereksinimi azalmış olan NADPH ile eşleşmek için down-regüle edilir ve böylece ATP sentezini indirger.. (Farooq et al., 2009)

1.1.2 Kuraklık toleransı ile ilişkili mekanizmalar

Bitkiler su ile olan ilişkileri açısından başlıca üç grup altında toplanırlar; hidrofitler, mesofitler ve kserofitler. Hidrofitler suda yaşayan, mesofitler yüksek toprak nemine ihtiyaç duyan bitkilerdir. Kserofitler ise genellikle kuraklık

koşullarına iyi adapte olmuş, çok düşük toprak nemi koşullarında bile yaşamlarını sürdürebilen bitkilerdir (Yokota et al. 2006). Kuraklık stresine verilen yanıtlar ve tolerans mekanizmalarının tanımlanması açısından kserofit bitkiler önemli bir grubu oluşturmaktadır. Kuraklık stresine tolerans ile ilişkili mekanizmalardan şimdiye kadar tanımlananlar şunlardır;

- Sinyal iletim yollarının düzenlenmesi,
- Koruyucu protein ve enzimlerin biyosentezinin teşvik edilmesi,
- Ozmotik düzenleyici ozmolit bileşiklerin sentezlenmesi,
- Stoma hareketlerinin düzenlenmesi,
- Derin kök sistemlerinin oluşturulması vb.

Ozmolitler; sükroz, trehaloz ve rafinoz gibi şekerler; prolin gibi amino asitler ve glisin betain ve poliaminler gibi aminleri içerir (Hoekstra et al. 2001). Sentezlenen uyumlu ozmotik düzenleyiciler denatürasyonu kısıtlayan membranlar veya proteinlerin yüzeyindeki suyun yerine geçer (Shinozaki and Yamaguchi-Schinozaki 1999). Ozmotik düzenleyicilerin biyosentezi ile ilgili genleri aşırı ifade eden transgenik bitkilerde ozmotik düzenleyicilerin miktarının artması nedeniyle kuraklık toleransı artar (Chen and Murata 2002). Galaktinol, kuraklık stresine gelişmiş toleransı olan bitkilerde üretilen kuraklık–uyarılabilir galaktinol sentaz genlerinin (AtGolS2 or AtGolS3) *A.thaliana*’ da aşırı ifade edilmesi anahtar bir rol oynar (Taji et al. 2002).

Absisik asit (ABA), su eksikliği koşulları altında üretilir ve bitkilerin kuraklık ve yüksek tuzluluğa tolerans yanıt vermelerinde önemli rol oynar. ABA’ nın seviyesi, kuraklık stresi altındaki bitkinin hayatta kalması için önemi olan uyarlanabilir yanıtların tetiklenmesinde başrol oynar (Zhu 2001). ABA transpirasyon yoluyla su kaybını minimuma indirmek için stomaların kapanmasını indükler (Leung and Giraudat 1998). ABA’ nın dıştan uygulanması yine dehidrasyon ve soğuk stresine yanıt veren sayısız geni indükler. Birkaç rapor dehidrasyon ve soğuk stresinde indüklenen fakat ABA’ nın dıştan uygulanımında yanıt vermeyen genleri tanımlamıştır (Zhu 2002; López-Pérez et al., 2009; Qiu et al., 2004). Bu durum ABA bağımsız ve ABA bağımlı, ilk stres sinyali ve spesifik genlerin ekspresyonu arasındaki sinyal basamaklarının varoluşunu meydana getirmektedir. Soğuk stresi ve dehidrasyona karşı oluşan yanıtta gen ekspresyonunu düzenleyen moleküler mekanizmalar, *Arabidopsis*’ te stresler boyunca ABA bağımsız ve ABA duyarlı gen ekspresyonlarında işlev gören cis-ve trans-acting elementlerin analizleri yapılarak çalışılmıştır (Shinozaki et al., 2003;

Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki 2005). cDNA ya da oligo mikroarray teknoloji kullanılarak profili çıkarılan gen ekspresyonu, bitkilerin maruz kaldıkları çeşitli stresler karşısında aktive olan gen düzenleme ağlarını temel olarak anlamamızı sağlar(Shinozaki et al., 2003; Bray 2004; Denby and Gehring 2005). Arabidopsis' te, dehidrasyon stresine yanıt veren sayısız gen, dehidrasyona duyarlı ve dehidrasyona erken duyarlı genler olmak üzere tanımlanmış ve kategorilendirilmiştir. Su stresine yanıtta gen ekspresyonları için en az dört bağımsız regülatör sistem bulunmaktadır. Bunlardan ikisi ABA- bağımlı, diğerleri ise ABA-bağımsızdır(Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki 2000; Valliyodan and Nguyen 2006).

1.1.3 ABA-bağımsız yolak

Arabidopsis RD29A/COR78/LTI78 genleri, kuraklık, soğuk ve ABA tarafından indüklenir. Bunun yanı sıra, bu gen hem kuraklık hem de soğuk stresleri tarafından aba ya da abi mutantlarında indüklenir. Bu girişimin analizleri, DRE olarak isimlendirilen 9-bp korunmuş sekans (TACCGACAT)' ın dehidrasyon ve soğuğa ABA-bağımsız yanıtı tetikleyici RD29A' ı düzenleyen önemli bir cis- element olduğunu göstermiştir(Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki 1994). DRE ayrıca kuraklık ve soğukla uyarılabilir birçok genin korunmuş bölgelerinde de yer alır (Huang et al. 2012). DRE/CRT elementlerine bağlı (bind) ERF/AP2 ailesine ait olan transkripsiyon faktörleri izole edildi ve CBF/DREB1 ve DREB2 olarak isimlendirildi. Bu korunmuş DNA-bağlanma motifi A/GCCGAC' dır. Her iki DREB1/CBF ve DREB2 proteinleri DRE/CRT' ye bağlanır, fakat DREB1/CBF soğuğa duyarlı gen ekspresyonunda işlev görüyor olarak düşünülür, oysaki DREB2 proteinleri kuraklığa duyarlı gen ekspresyonuyla ilişkilidir.

Arabidopsis' e ait bir araştırmada, tüm genom sekansı Arabidopsis genomunda kodlanmış DREB2A ve DREB2B de dahil olmak üzere en az altı DREB2 homologu bulunmuştur. DREB2A ve DREB2B kuraklık ve yüksek tuzluluk tarafından kuvvetlice indüklenmektedir, fakat diğerleri indüklenmemektedir. Ayrıca diğer altı DREB2 homologunun ekspresyon seviyeleri stres koşulları altında oldukça düşüktür. Bu yüzden, sekiz DREB-2 tip protein boyunca, DREB2A ve DREB2B' nin kuraklık ve yüksek tuzluluk stres koşulları altında işlev gören ana transkripsiyon faktörleri oldukları düşünülmektedir(Nakashima et al., 2000; Sakuma et al., 2002). Bunun yanı sıra, transgenik bitkilerde DREB2A' nın overekspresyonu ne büyüme gecikmesine

neden olur ne de stres toleransını geliştirir, DREB2A proteini aktive olmak için fosforilasyon gibi posttraslasyonel modifikasyona gereksinim duyar (Sakuma et al., 2006). Arabidopsis protoplastı kullanılarak yapılan DREB2A domain analizleri, 254 ve 335 kısımları arasında ve DREB2A' yı esas aktif bir forma dönüştüren 136 ve 165 kısımları arasında bir bölgenin delesyonunu tanımlamıştır. Microarray ve RNA jel blot analizleri DREB2A' nın birçok su stresine duyarlı genlerin ekspresyonunu düzenlediğini ortaya koymuştur. Buna rağmen, DREB2A' nın downstreamindeki genler DRE/CRT' yi tanıyan fakat soğuk stresine duyarlı gen ekspresyonunda işlev gören DREB1A' nın downstreaminde değildir. DREB2A ve DREB1A' nın ikisi de DRE sekansına bağlanabilir, fakat DRE core motiflerinin komşu sekanslarının her birinin DNA bağlanma özgünlüğü biraz farklıdır; bu yüzden her birinin downstream genleri kısmen farklıdır. sGFP' in DREB2A CA ile kaynaşmış yeşil floresans sinyalleri, stresli olmayan koşullar altındaki transgenik bitkilerin nukleusundaki DREB2A ile kaynaşmış sGFP' ten kayda değer biçimde daha yüksektir. Fakat, bu sonuçlar DREB2A proteinin kararlılığı, aktivasyonu için önemlidir ve aktive olan DREB2A kuraklık stresine duyarlı gen ekspresyonunu düzenler, bu gen ekspresyonu da bitkilerdeki kuraklık stresi toleransını geliştirir(Sakuma et al., 2006).

1.1.4 ABA-bağımlı yolak

ABA bitki gelişimini birkaç açıdan düzenlemektedir, bunlara tohum gelişimi, tohumun kuruma toleransı ve tohum dormansisi dahildir ve bitkilerin abiyotik (kuraklık, tuzluluk, soğuk ve hypoxia) ve biyotik streslere yanıtlarında önemli bir rol oynar. Arabidopsis' teki ABA eksikliği olan los5/aba3 ve los6/aba1 mutantlarının genetik analizleri, ozmotik stres altında düzenlenen gen ekspresyonunda ABA' nın önemli bir rol oynadığını göstermiştir. RD29A, RD22, COR15A, COR47, ve P5CS gibi strese duyarlı genlerin ekspresyonu los5 mutantında şiddetli bir biçimde indirgenir ya da tamamen bloke edilir(Xiong and Zhu 2001), los6 mutantında ise RD29A, RD19 COR15A, COR47, KIN1, ve ADH' nın ekspresyonu yabancı tip bitkidekinden daha azdır(Xiong et al., 2002). Dolayısıyla, ABA bağımsız yolağın varlığına rağmen , bir ABA bağımlı sinyal yolağı osmotik stres süresince strese duyarlı gen ekspresyonunda önemli bir rol oynar(Chinnusamy et al., 2003; Xiong et al., 2001).

Birçok stresle uyarılabilir gen, kuraklık ve yüksek tuzluluk stresi süresince biriktirilen ABA tarafından düzenlenir. ABA esas olarak kuraklık ve yüksek tuzluluk stresine yanıtta sentezlenir, soğuk stresine yanıtta

sentezlenmez(Shinozaki et al., 2003). Arabidopsis’ te, zeaksantin epoksidaz geni (ZEP; LOS6 olarak da bilinir/ABA1), bir 9-cis-epoksikarotenoid dioksijenaz geni (NCED3), aldehit oksidaz geni (AAo3) ve molibdenum kofaktör sülfür azotaz geni (MCSU; LOS5/ABA3 olarak bilinir) de dahil olmak üzere birkaç ABA sentez geninin ekspresyon seviyeleri kuraklık ve tuzluluk stresleri tarafından upregule olur, fakat soğuk tarafından tam olarak indüklenmez. (Zhu 2002; Valliyodan and Nguyen 2006; Cheng et al., 2002).

ABA- duyarlı gen ekspresyonunda ABRE bir major cis-acting elementtir. İki ABRE motifi Arabidopsis RD29B geninin ABA duyarlı ekspresyonunda önemlidir (Sakuma et al., 2002). bZIP transkripsiyon faktörleri ABRE-bağlanma proteini (AREB)/ABRE-bağlanma faktörü (ABF), ABRE’ ye bağlanabilir ve ABA- bağımlı gen ekspresyonunu aktif leştirebilir.(Uno et al., 2000; Choi et al., 2000). AREB/ABF proteinleri, ABA’ nın eksik olduğu aba2 mutantlarında ve ABA-duyarsız abi1 mutantlarında aktivasyonu indirgemektedir ve ABA-hipersensitif era1 mutantında aktivasyonu güçlendirmektedir. Bunun sonucu olarak, AREB/ABF proteinlerinin aktivasyonun, muhtemelen ABA-bağımlı fosforilasyon olan bir ABA-aracılı sinyaline gereksinim duyduğu düşünülmektedir (Huang et al., 2012). AREB1/ABF2, ABA’nın indüklediği genlerinin promotor bölgesinde ABA’ya duyarlı element (ABRE) motifine bağlanan bir basit domain/lösün zipper transkripsiyon faktörüdür. AREB1’ in gizli transkripsiyon aktivitesini ortadan kaldırmak için AREB1 (AREB1 Δ QT)’ nin aktive edilmiş formu meydana getirilmiştir. AREB1 Δ QT- overekpres yapan bitkiler ABA hipersensitif ve güçlenmiş kuraklık toleransı göstermişlerdir ve iki grubun promotor bölgelerindeki iki veya daha fazla ABRE motifleri ile birlikte sekiz gen fazlasıyla upregule olmuştur: geç embriyogenesis çoklu sınıf genleri ve ABA ve kuraklık stresi ile indüklenebilir regülatör genlerdir.

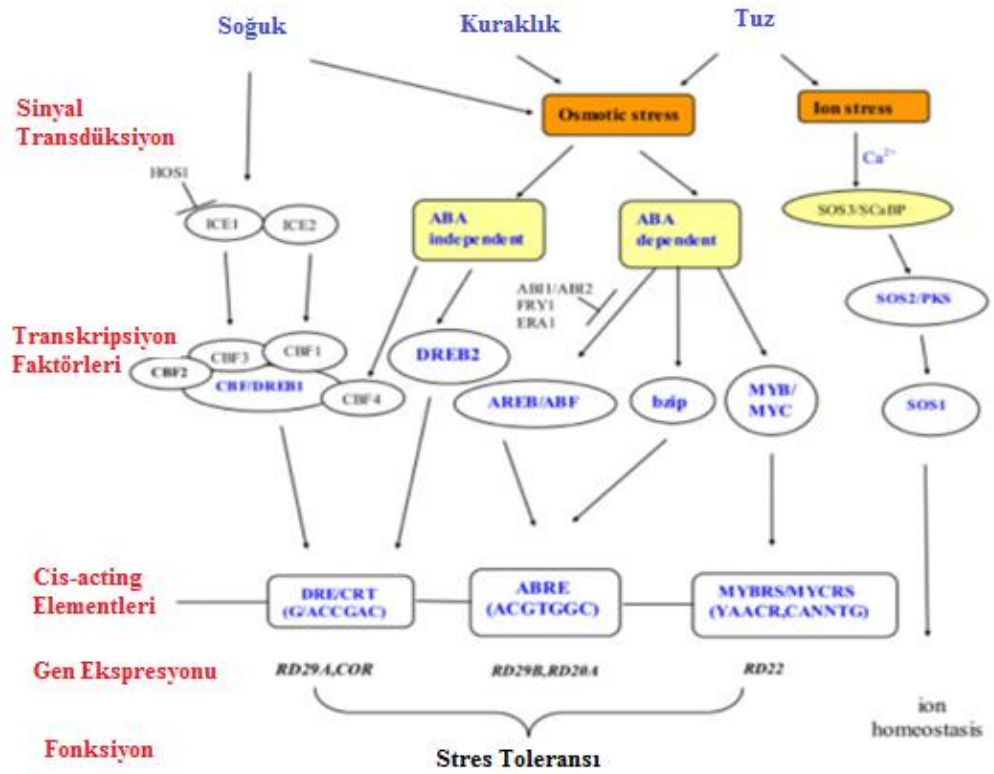
Buna karşın, bir areb null mutantı ve bir represyon domain ile birlikte AREB(AREB:RD)’ nin bir baskın fonksiyonu kaybı mutantı, ABA duyarsızlık sergilemiştir. Üstelik, AREB:RD bitkileri dehidrasyon altında indirgenmiş hayatta kalma göstermiştir, ve fazlasıyla upregule olan sekiz genden üçü) downregule olmuştur. Böylece, bu bilgi AREB1’ in vegetatif dokularda kuraklık toleransını güçlendiren özgün ABRE-bağımlı ABA sinyalizasyonunu düzenlediğini önermektedir (Fujita et al., 2005).

Transkripsiyon faktörü ile ilişkili bir DREB1’ in klonlama ve transgenik analizleri, Arabidopsis’ teki CBF4 göstermiştir ki, DRE elementlerinin

regülasyonu bir ABA-bağımlı yolak tarafından da aracılık ediliyor olabilir. CBF4 en çok, Arabidopsis CBF/DREB1 proteinlerinde (CBF1/DREB1b, CBF2/DREB1c, ve CBF3/DREB1a (Haake et al., 2002), CBF/DREB1 proteinlerinin en yakın homologudur) tanımlanan üç grup ile ilişkilidir. CBF/DREB1 ailesinin genleri esas olarak soğuk stresi tarafından indüklenir, fakat kuraklıkla indüklenebilir CBF4 geni, DREB2 ve CBF/DREB1 regülatör sistemleri arasında crosstalk sağlamakta işlev görür. CBF4 gen ekspresyonu kuraklık ve ABA tarafında upregule edilir, ama soğuk tarafından edilmez. Arabidopsis' teki CBF4' ün overekspresyonu, strese duyarlı genleri içeren CRT/DRE' in ekspresyonuyla sonuçlanmıştır ve kuraklık ve dondurucu streslerine karşı toleransı güçlendirmiştir (Chinnusamy et al., 2003; Haake et al., 2002).

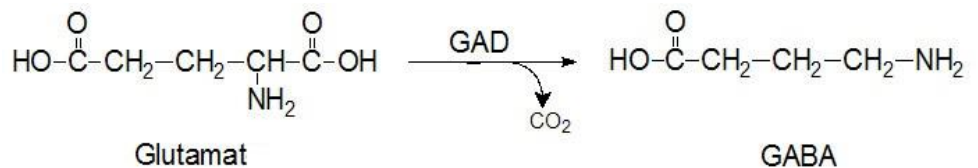
MYC ve MYB proteinleri gibi diğer önemli transkripsiyonel regülatörlerin, ABA- bağımlı regülatör sistemlerinin birinde aktivatör olarak işlev gördüğü bilinmektedir (Valliyodan and Nguyen, 2006; Abe et al., 2003). Bu MYC ve MYB proteinleri, stres yanıtlarının geç basamaklarında proteinlerin rollerini tanımlayan ABA'nın birikimini takiben sentezlenmektedir. Microarray analizleri, overeksprese olan transgenik bitkilerde, MYC/MYB' nin alkol dehidrogenaz ve ABA ya da jasmonik asit (JA) ile indüklenebilir genler gibi hedef genlerini açıklığa kavuşturmuştur (Huang et al., 2012). AtMYC2 ve AtMYB2' nin ikisinde overekspresyonu, sadece bir ABA-hipersensitif fenotipte ortaya çıkmakla kalmaz ayrıca transgenik bitkilerin osmotik stres toleransını geliştirir (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki 2007; Gao et al., 2011). Çünkü bitkiler komplike çevreye maruz kalırlar, keşfedilmek için artakalmış abiyotik streslere karşı maruz kalan bitkilerin yanıtlarına ilişkin daha fazla sinyalizasyon bileşenleri vardır. Bununla birlikte, bir aday vardır; heptahelikal protein 1 (HHP1), streslerde negatif bir regülatördür ve soğuk ve osmotik sinyalizasyon arasında cross-talkta görevi olabilir (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki 2007). HHP1, adinonektin reseptörlerine (AdipoRs) ve membran progesterin reseptörlerine (mPRs) homolog olan ve yedi transmembran domain yapısına sahip olduğu tahmin edilen bir protein olarak sınıflandırılmıştır. HHP1' deki transpirasyon oranı ve stoma kapanması ölçülerek: GUS transgenik mutantları, hhp-1-1 mutantlarındaki yardımcı hücrelerin yabancı tip ya da c-hhp1-1 mutanlığı (HHP1 geninin eksprese eden HHP1' in tamamlayıcı bir mutanlığı) ile kıyaslandığında, kuraklığa ve ABA stresine karşı azalmış bir hassaslık gösterdiği ortaya çıkmıştır. HHP1' in N-terminal fragmentinin, biyomoleküler floresans tamamlama (BİFC) çalışmalarında ve iki hibrit mayada CBF ekspresyon-1 (ICE1)' in indükleyicisi olan transkripsiyon faktörüyle etkileştiği bulunmuştur. Toprakta büyüyen hhp1-1

mutantı, kısıtlı sulama ile soğuk stresine hipersensitivite göstermiştir. İki ICE1-regulated geni (CBF3 ve MYB15) ve birkaç soğuk stresine duyarlı genin (RD29A, KIN1, COR15A, ve COR47) ekspresyonu yabancı tipten hhp1-1 mutantında soğuk stresine karşı daha az hassaslık göstermiştir. Bu bilgiler, HHP1' in ABA ve ozmotik sinyalizasyonda yalnızca negatif bir regülatör olmadığını ayrıca Arabidopsis' te soğuk ve ozmotik sinyalizasyon yolağı arasında cross-talkta özgün bir sinyalizasyon bileşeni olabileceğini göstermektedir (Chen et al., 2010; Chen et al., 2009). Bakteriyal ve viral patojenlerin yanı sıra biyotrofik ve nekrotrofik fungusları da içeren biyotik stres faktörleri tarımsal üretimi kısıtlayan önemli etkenler arasındadır.



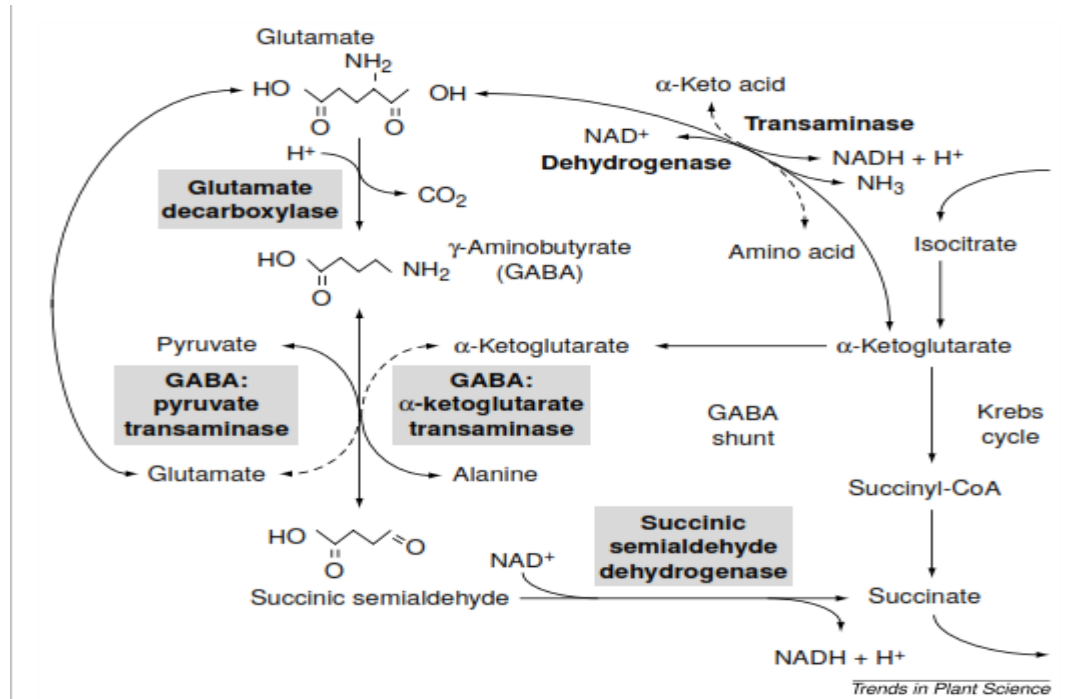
Şekil1.4.Cis-acting elementlerin transkripsiyonel düzenlenme ağı ve soğuk, kuraklık ve tuzluluk stresinden kaynaklı gen ekspresyonu ve ABA-bağımlı ve ABA-bağımsız transkripsiyonel faktörleri (Huang et al. 2012)

1.2 GABA ve GABA Metabolizması



Prokaryotlarda ve ökaryotlarda bulunmuş olan ve proteinik olmayan amino asit yapısındaki gama-aminobütirik asit (GABA), serbest amino asit havuzundaki önemli bir bileşendir (Akama and Takaiwa, 2007). GABA ilk olarak yarım asır önce patates yumrularında keşfedilmiştir (Roberts, 2007), fakat bilim insanların dikkatı hızlı bir şekilde hayvanların merkezi sinir sistemindeki (CNS) fonksiyonuna kaymıştır (Bormann, 2000). Merkezi sinir sistemi yüksek konsantrasyonda GABA içerir ve GABA başka bir monokarboksilik asitle birlikte sinir iletimini engelleyici (nörotransmitter inhibitörü) olarak önemli bir rol oynar (Al-Wadei et al., 2011).

Bitkilerde GABA miktarı biyotik stres, sıcaklık şoku, tuz stresi, kuraklık stresi gibi abiyotik stres koşullarında, mekanik uyarılma, fitohormonlar ve hipoksi gibi farklı uyarılara tepki olarak hızlı bir şekilde bir kaç kat artar (Bouche and Fromm, 2004; Molina-Rueda et al., 2010; Renault et al., 2010; Shelp et al., 2012a,b; Yang et al., 2013). Buna ek olarak, yaşlanma sırasında ve meyva olgunlaşması sırasında farklı düzeylerde GABA seviyeleri tespit edilmiştir (Oms-Oliu et al., 2011).



Şekil 1.5 GABA shunt ve GABA'nın diğer metabolik yollarla ilişkisi (Shelp et al., 1999)

GABA'nın biyosentezi ve trikarboksilik asit çevrimine girişi -GABA yolu- olarak bilinmektedir. Bu yolda glutamattan sentezlenen GABA daha sonra süksinata dönüştürülmektedir. GABA shunt hayvanlarda, bakterilerde, funguslarda ve

bitkilerde aynı şekilde gerçekleşmektedir (Bouche et al., 2004; Shelp et al., 2012a).GABA sitosolde GAD enzim aktivesiyle glutamattan sentezlenir.Daha sonra mitokondriye taşınır ve burada GABA transaminaz (GABA-T) enzimi sayesinde katabolizması gerçekleştirilir.Burada GABA süksinat semialdehit (SSA)'e dönüştürülür.SSA burada süksinat semi aldehit dehidrogenaz enzimi aktivitesiyle süksinata dönüştürülür.

1.2.1 GABA metabolizmasında yer alan enzimler

Glutamat Dekarboksilaz (GAD; EC 4.1.1.15)

Yüksek bitkilerde,glutamat dekarboksilaz(GAD) 'ın GABA sentezinde kilit enzim olduğu bilinmektedir. GABA hayvanlarda önemli bir besin bileşeni olmasının yanı sıra bitkilerde de sinyal molekülü olarak görev almaktadır.

Glutamat dekarboksilaz(GAD) glutamatın dekarboksilasyonu sonucu CO₂ ve GABA oluşumunu katalizler. GAD bakterilerde,hayvanlarda ve bitkilerde bulunmuştur.GAD ile yapılan bazı çalışmalar bitki ve E.coli'deki GAD enziminin yapısının benzerlik gösterdiğini, fakat yapılan yapısal analizler sonucunda bazı bitkilerin GAD yapılarının C-terminal bölgesine ekstra segmentlerin bağlı olduğunu ortaya koymuştur (Ueno H, 2000). Hayvan ve bitkilerden farklı olarak, bitkideki benzersiz GAD yapısında C-terminalinin yakınında kalmodulin (CaM) bağlanma bölgesi bulunmaktadır (Baum G et al., 1993). Bazı çevresel faktörler sonucunda bitkilerdeki hücre içi Ca²⁺ ve H⁺ konsantrasyonu artış gösterir. Bunun sonucunda Ca²⁺ CaM ile birleşerek GAD enzimini aktifleştirir ve hücre içi GABA konsantrasyonunu artırır.(Snedden W A et al. 1995 ; Baum G et al., 1996).

Bitkilerde GAD genleri petunya, Arabidopsis thaliana, domates, pirinç, tütün ve baklada çalışılmıştır. GAD enziminin fonksiyonu ve aktivesiyle ilgili çalışmalar, petunya bitkisinden, GAD geninin tütün bitkisine klonlanması ile yapılmıştır. Burada iki farklı mutant bitki kullanılmıştır. Birinci mutant bitkide GAD geni tamdır ve CaM bağlanma bölgesi içermektedir. İkinci mutant bitkide ise CaM bağlanma bölgesi eksiktir. Bu çalışmada GAD genlerinin indüklenmesi sonucunda her iki mutantta da GABA seviyesinin artış, glutamat seviyesinin azalış gösterdiği, fakat bu seviyelerin iki mutant tipinde farklılık gösterdiği gösterilmiştir (Baum et al., 1996).

GABA Transaminaz (GABA-T; EC 2.6.1.19)

GABA shunt yolağının içerdiği ikinci enzim GABA transaminaz (GABA-T)dir. GABA-T pirüvatı(GABA-TP) ya da α -ketoglutaratı(GABA-TK) amino asit alıcısı olarak kullanarak GABA'yı tersinir olarak süksinik semialdehite dönüştürür. Ham ekstratlarla yapılan in vitro çalışmalarda GABA-T aktivitesinde amino asit alıcısı olarak pirüvat α -ketoglutarata göre daha çok tercih edildiği gösterilmiştir. GABA-TP aktivite gösterdiğinde GABA yerine süksinik semialdehit oluşumu sırasında aynı anda pirüvattan da glutamat oluşmaktadır. GABA-TK enzim aktivitesi sırasında ise α -ketoglutarattan alanine dönüşüm gerçekleşmektedir.

Süksinik Semialdehit Dehidrogenaz (SSADH; EC 1.2.1.16)

Süksinik semialdehit dehidrogenaz süksinik semialdehiti süksinata okside eder ve NADH üretimini sağlar. Dolayısıyla GABA, glutamattan başlayıp TCA döngüsüne giden yolda görev alan bir metabolittir ve SSADH ta bu yolda görev alan bir enzimdir. GABA shuntta iki tane düzenleyici nokta vardır. Bu düzenleyicilerden biri GAD'ın sitosolde Ca ve CaM ile birlikte pozitif düzenlenmesi iken diğeri mitokondiride ATP ve NADH tarafından SSADH'ın negatif düzenlenmesidir. (Busch et al., 2000)

Glutamat Dehidrogenaz (GDH; EC 1.4.1.2)

Glutamat Glutamat dehidrogenaz (GDH) enzimi, α -ketoglutarattan glutamat dönüşümünde görev alır. Bu dönüşüm bitkilerde ve omurgalılarda görülmektedir. Burada meydana gelen glutamat GABA metabolizma yolağına katılır ve GAD enzimi sayesinde GABA oluşumu meydana gelmektedir. (Kathiresan et al., 1997).

1.3 Bitkilerde GABA Fonksiyonları Ve Önemi

1.3.1 GABA'nın pH düzenlenmesindeki rolü

GAD aktivitesi ortamdaki H^+ iyonlarını ve tüketir stresin indüklediği GABA sentezi pH düzenlenmesine katkı sağlar. (Bown and Shelp, 1997). Bununla birlikte GABA birikiminin en yüksek olduğu durumların, baskın asit üreten reaksiyonların durduktan sonra olduğu gösterilmiştir. İki bağımsız araştırma sitosolik asitleşmenin olduğu durumlarda GABA birikiminin olduğunu

kanıtlamıştır. Geçirgen zayıf asitlere maruz kalmış fotosentetik kuşkonmaz hücrelerinde sitosolik pH değişimlerini ve GABA birikimini ölçmek amacıyla GABA için flüoresan pH probu ve enzimatik bir deney yapılmıştır. 45 saniye zayıf asit uygulaması yapıldığında; sitosolik pH 0,6 düşerken, 15 saniye içinde GABA seviyesinin % 200-300 arttığı gösterilmiştir. (Crawford et al., 1994).

1.3.2 GABA metabolizma yolağının solunumdaki rolü

Son yıllarda, TCA döngüsündeki enzimleri hedefleyen mutant ve antisens bitkilerle yapılan çalışmalar GABA metabolizma yolağının TCA döngüsündeki rolü ile ilgili verilerin elde edilmesine olanak sağlamıştır. Bu sonuçlar, TCA döngüsü için gerekli olan süksinat üretiminin GABA shunt aktivitesiyle hızlandığını (Lemaitre et al., 2007), fakat bu adımın GABA metabolizması üzerinde bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir. (Nunes-Nesi et al. 2007; Nunes-Nesi et al., 2005).

Ayrıca, süksinil-CoA ligaz ifadesinin bozulduğu mutant bitkilerle yapılan çalışmalar GABA metabolizma yolağının bu eksikliği tamamladığı gösterilmiştir. (Studart-Guimaraes et al, 2007).

TCA döngüsü ve GABA shunt etkileşimi sonucu α -ketoglutarat-süksinat reaksiyonuna birden fazla olası bypass bulunmaktadır. Birincisi α -ketoglutaratın glutamata dönüşümü ve glutamatın GABA shunt yolağına katılması. İkincisi ise GABA'nın SSA'ya dönüşümü sırasında GABA-TK enzim aktivitesiyle α -ketoglutarat'ın glutamata dönüşümüdür (Green et al., 2000).

1.3.3 GABA'nın meyve gelişimindeki rolü

GABA'nın domatesle yapılan çalışmalarda meyve gelişiminde rol alan önemli bir amino asit olduğu, meyve olgunlaşması sırasında yeşil renkten olgunlaşma evresine geçtiği sırada GABA konsantrasyonun maksimum seviyeye ulaştığı gösterilmiştir (Rolin et al., 2000; Mounet et al., 2007; Akihiro et al., 2008; Saito et al., 2008). GABA, meyve gelişimi sırasında, organik asit birikimi sırasında sitoplazmadaki pH düzenlenmesine katılabilir (Rolin et al., 2000) veya meyve gelişiminin erken evresinde geçici azot depolama sağlayabilir (Satya Narayan and Nair, 1990).

1.3.4 GABA'nın Geçici Azot Depolanmasındaki Rolü

Glutamatın GABA'ya dönüşümü, glutamin sentezini engelleyen şartlar altında, protein sentezi azaldığı veya protein degradasyonu arttığı şartlar altında artar. (Satya Narayan and Nair, 1990; Scott-Taggart et al. 1999). GABA'nın geçici azot deposu olduğu öne sürülmüştür. Gelişme olan soya fasülyeleriyle yapılan çalışmada kesilen soya fasülye kotiledonlarında glutamattan GABA sentezinin hızlıca metabolize edildiği görülmüştür. Yapılan çalışmalar sonucunda GABA metabolizması yoluyla glutamatın, bitkilerin geçici azot miktarında önemli bir role sahip olduğu gösterilmiştir. (Micallef and Shelp 1989)

1.3.5 Bitki gelişiminde GABA'nın rolü

GAD, Ca/kalmodulin bağlanma domaini içeren en bol çözülebilir proteinlerden biridir; bütün bitki dokularında bulunur ve seviyesi transkripsiyon ya da post-transkripsiyonel süreci boyunca düzenlenir. Transgenik bütün bitkileri kalmodulin-bağlanma domaininin oto-baskılayıcı eksik GAD mutantını eksprese eder, daha yüksek GABA seviyesi, daha düşük glutamik asit seviyeleri ve daha az gövde uzaması sergiler. Buna rağmen büyüme yavaşlaması daha düşük glutamik asit seviyelerine dayandırılıyor olabilir, yüksek GABA konsantrasyonları *Stellaria*'da gövde uzamasını engelleyebilir. Her bir tartışma şunu gösteriyor ki; mekanik manipülasyon kısa bir süreliğine sitosolik Ca^{2+} u azalmakta (Knight et al., 1991), GABA'yı da yükseltmektedir (Ramputh and Bown, 1996) ve gövde uzunluğuna engel olmaktadır. Gövde uzunluğu çalışmasında, manipülasyona yanıt olan büyüme inhibasyonu, Ca^{2+} şelatörleri ve kalmodulin antagonistleri tarafından bloke edilir. Karanlık ya da aydınlıkta büyümüş soya fasülyesi hipokotil dokusunun mekanik uyarılması, 1 dakika içerisinde %65 büyüme inhibasyonu ile sonuçlanmıştır; GABA seviyelerinde sırasıyla 4 ve 10 kat hızlı artış ile inhibasyon gerçekleşmiştir.

α - naphthaleneacetic asit ve kinetin hormonları kök dokusunu aynılaştırır (Ford et al., 1996). N-NMR çalışmaları, bu değişimlerin zenginleştirilmiş GABA ve azalmış glutamat seviyeleri tarafından gerçekleştirildiğini ortaya koymaktadır. GABA birikimi, hücreden dışarı sızma ile olmaktadır ve bu bağlamda intersellüler sinyalizasyon molekülü olarak fonksiyonu olduğu düşünülmektedir (Chung et al., 1992). Kesilip çıkartılan ay çiçeği kotiledonlarına GABA uygulanması, çoğunlukla 1-aminosiklopropan 1-karboksilik asit sentaz' ın transkript miktarını desteklemesi ile, etilen üretimini uyarır. Böylece, yeni çıkan

literatürde çevresel streslerin, GAD ve GABA sentezini aktive eden ve sırasıyla reseptörlere bağlanan ve dolayısıyla büyüme ve gelişmeyi düzenleyen sitosolik Ca^{2+} ’ı yükselttiği belirtilmiştir.

1.3.6 Bitki Savunmasında GABA’nın Rolü

Hayvanlarda GABA, engelleyici bir nörotransmitterdir; nöral membranı, Cl akışını uyararak, GABA ve Cl kanalları vasıtasıyla hiperpolarize eder. Böcekler ve diğer omurgasızlar tarafından yapılan fitofagus aktivite, vakuolar bölünmeyi yok eder, sitosoldeki H seviyelerini yükseltir ve GABA sentezini uyarır. GABA’nın alınımı normal büyüme ve gelişmeyi inhibe edmektedir.

1.4 Tütün (*Nicotiana tabacum* L.) Bitkisi

Tütün (*Nicotiana tabacum*) bitkisi de Amerika’nın keşfi sonrasında yenedünyadan getirilen tarım ürünleri patates, vanilya, domates, mısır, ananas, yerfıstığı gibi dünya çapında yayılmıştır. Türkiye’ye tütünün ilk olarak ne zaman getirildiği konusunda farklı görüşler vardır. Bir tanesi tütünün 1580 tarihlerinde Venedikliler tarafından getirildiğidir ve 1630’lu yıllarda Osmanlı İmparatorluğu’nun farklı sancaklarında üretilmeye başlandığıdır. (Borio 2001). *Nicotiana tabacum* L. *Solanaceae* familyasına ait bir bitki türüdür. Tütün bitkisi çok yıllık bitki otsu bitki olup Güney Amerika kaynaklıdır ve dünyadaki ticari olarak en değerli zirai üründür. Tütün, sigara endüstrisinde kullanılmasının yanı sıra insektisit, anestetik, diyaforetik, yatıştırıcı ve kusturucu ajan olarak kullanılan kullanışlı kimyasal bir bileşiktir. (Chen et al., 2012) Önceki çalışmalarda tütün bitkisinden sesquiterpen(Feng et al., 2010), diterpenoidler(Shinozaki et al, 1996; Petterson et al., 1993, alkaloidler(Wei et al., 2005), fenoller(Vereecke et al., 1997) ve onların homologue olan birkaç biyoaktif bileşik izole edilmiştir.

1.5 Araştırma Projesinin Amacı

Daha öncede vurguladığımız gibi GABA tüm canlılarda sentezlenen ve protein yapısına katılmayan bir aminoasittir. Önce bitkilerde bulunup tanımlanmasına rağmen GABA’nın bitkilerdeki rolü tam anlamı ile aydınlatılamamıştır. Abiyotik ve biyotik stres koşulları altında bitkilerde GABA miktarının arttığı literatürde ve laboratuvarımızda yapılan çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Akçay et al., 2012; Dimlioğlu et al., 2015; Akcan-Daş et al., 2016). Stres yanıtları açısından değerlendirildiğinde GABA’nın sinyal molekülü

olduğuna dair çeşitli ler olsa da günümüze değin konu ile ilgili net bir kanıt elde edilememiştir. Planlanan araştırma projesinde kuraklık stresi koşulları altında GABA yolu ve ilgili bileşenlerinin günlük ritimdeki (aydınlık-karanlık fotoperiyotlarda) seviyelerini incelemeyi ve karşılaştırmayı hedefledik.

2. MATERİYAL VE METOD

2.1 Bitki Materyali ve Yetiştirilmesi

Çalışma materyali olarak tütün bitkisi (*Nicotiana tabaccum* L.) kullanıldı. Bitkinin tohumları yüzey sterilizasyonu için %10'luk hipoklorit çözeltisinde 10 dakika bekletildikten sonra tohumlar steril deiyonize su ile 5 kez yıkandı. Tohumlar çimlenme süreci için Murashige-Skoog (MS) ortamına steril kabinde aktarıldı. Ekim sonrası karanlıkta bekletilen tohumlarda yaklaşık bir hafta içinde çimlenme gözlemlendi ve tohumları içeren kaplar fotoperiyoda alındı. Yetiştirme sürecinde uygulanan kontrollü koşullar; 350 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ yoğunluğunda 16 saat ışık /8 saat karanlık fotoperiyot, 25/23 °C aydınlık/karanlık sıcaklık ve % 70 nem oranı olarak gerçekleştirildi. Bitkiler çimlenme işlemi gerçekleştikten 3-4 hafta içerisinde perlit bulunan saksılara alınmıştır. Perlite alınmış bitkiler ½ oranında seyreltilmiş Hoagland ile iki günde bir olacak şekilde sulanmıştır (Hoagland and Arnon, 1950).

2.2 Kuraklık Stresi Uygulanması

Perlite aktarılan fideler 45 günlük büyüklüğe ulaştığında kuraklık stresi uygulaması başlatıldı. Bitkiler kontrol ve PEG uygulanacak gruplar olarak iki gruba ayrıldı. Stres uygulaması için ½ oranında seyreltilmiş Hoagland çözeltisine % 20 oranında Polietilen glikol (PEG) 6000 eklenerek çözöldü. Kontrol grupları sadece ½ oranında seyreltilmiş Hoagland çözeltisi ile sulanırken, kuraklık stresi uygulanan gruplar % 20 oranında PEG 6000 içeren Hoagland çözeltisiyle sulandı. Örnek alma işlemi stres uygulaması sonrasında 48 saat boyunca yapıldı. Kontrol ve stres uygulanan gruplardan yaprak örneği olarak 3. ve 4. yapraklar alındı. Örneklemeler 0., 1., 3., 6., 12., 16., 17., 19., 22., 24. ve 48. saatlerde yapıldı. Yaprak örnekleri hasat edilip sıvı azotta dondurulduktan sonra -80°C'de saklandı. Deneme farklı zamanlarda birbirinden bağımsız olarak kurulan 2 seri şeklinde yapıldı.

2.3 Büyüme Parametrelerinin Ölçülmesi

Büyüme parametrelerine yönelik analizler kontrol ve PEG uygulanan gruplarda 0., 1., ve 2. günlerde yapıldı. Örneklemeler günleride her iki deneme serisinde de kontrol ve PEG uygulanan gruplardan rastgele seçilen 5'er bitki

kullanılarak yapıldı. Önce bitkilerin kök ve yaprak yaş ağırlıkları ölçüldü. Kuru ağırlıklar örnekler 70°C’de 72 saat bekledikten sonra tartıldı.

2.4. Klorofil Floresans Ölçümü

Klorofil flüoresans ölçümleri, stres uygulamasının 0., 1. ve 2. günlerinde yapıldı. Klorofil flüoreans ölçümleri; her deneme serisinde 3 farklı bitkinin yapraklarından rastgele örnekleme alınarak yapıldı. Ölçüm için yaprak üst yüzeyinden 1cm²’lik alan yaprak klipsi kullanılarak 20 dakika süre ile karanlıkta bekletildi. Bu süre sonunda Plant efficiency analyser (Hansatech) cihazı kullanılarak yaprakların bazal klorofil flüoresansı (*F0*), maksimum flüoresans uyarılması (*Fm*), değişken flüoresans (*Fv*) ve *Fv/Fm* oranları belirlendi.

2.5 Bağlı Su Miktarı (RWC)

Yapraklardaki bağlı su miktarının hesaplanması için stres uygulamasının 0., 1. ve 2. günlerinde her deneme serisinden 3’er bitkinin yaprak yaş ağırlıkları (YA) tartıldı. Daha sonra yaprakların turgorlu ağırlıklarının belirlenmesi için yapraklar 5 saat boyunca deiyonize suda bekletildi. Süre sonunda yüzeyleri kurulan yaprakların turgorlu ağırlıkları (TA) tartıldı. En son aşamada, yapraklar 72 saat boyunca 70 °C’lik etüvde kurutularak kuru ağırlıkları (KA) belirlendi. Kaydedilen ağırlık değerleri kullanılarak örneklerin RWC değerleri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı (Smart ve Bingham, 1974).

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

2.6.Yaprak Ozmotik Potansiyeli

Yapraklardaki ozmotik potansiyel değişiminin belirlenmesi için stres uygulamaların 0., 1. ve 2. günlerinde her deneme serisinden 3’er bitkiden yaprak örneği alındı. Ozmotik potansiyel ölçümleri Wescor 5500 marka ozmotik potansiyel cihazıyla yapıldı. Ozmotik potansiyel değerleri mmol kg⁻¹ olarak hesaplandı.

2.7.Yaprak Elektrolit İletkenlik Değişiminin Belirlenmesi

Yapraklarda elektrik iletkenlik belirlenmesi amacıyla yapraklardan 0,6mm çapında diskler kesilmiştir. Disklerin yaprağın orta kısmına yakın ve damarsız

bölgeden alınmasına dikkat edilmiştir. Örneklerin iletkenliği WTW Inolab Cond. 720 iletkenlik ölçer cihazı ile ölçülmüş (X_0), diskler 20 ml dH_2O içinde 2 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir ve suyun iletkenliği tekrar ölçülmüştür (X_i). Örnekler aynı suyun içerisinde $+80^{\circ}C$ 'de 2 saat tutulmuştur. Suyun sıcaklığı oda sıcaklığına geldikten sonra iletkenlik yeniden ölçülmüştür (X_t). Hesaplama ise aşağıda verilen formüle göre gerçekleştirilmiştir (Scotti and Thu 1997).

$$\text{Elektrolit leakage} = [(X_i - X_0) / (X_t - X_0)] \times 100$$

2.8.Total Protein Miktarlarının Belirlenmesi

Yapraklardaki total protein miktarının belirlenmesi için Bradford (1976) yöntemi kullanıldı. Yapraklar önce sıvı azot ile ezilerek toz haline getirildi. Daha sonra üzerlerine 3 mL 1 mM EDTA ve % 2 (w/v) polivinilpolipirrolidon (PVPP) içeren sodyum fosfat tamponu (pH 7.8) eklenerek homojenizasyonları yapıldı. Homojenatlar ependorfa aktarıldıktan sonra $+4^{\circ}C$ 'de 14.000 rpm'de 30 dk santrifüj edildi. Santrifüjden sonra temiz tüplere transfer edilen süpernatantlar total protein miktarının belirlenmesinde ve enzim aktivitesinin belirlenmesinde kullanıldı. Örneklerden 50µl alınarak üzerine 950µl Bradford çözeltisi pipetlendi. Karışım vortekslendikten sonra 30 dk oda sıcaklığında bekletildi ve 595nm de absorbans değerleri okundu. Aynı işlemler bovine serum albümin (BSA) ile hazırlanan protein standartlarına da uygulandı. Örneklerin içindeki protein miktarı standart protein değerleri ile oluşturulan grafik kullanılarak hesaplandı. Absorbans ölçümleri Shimadzu UV-1600 (Shimadzu, Japan) spektrofotometre cihazı ile yapıldı.

2.9.Glutamat Dehidrogenaz (GDH) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Glutamat dehidrogenaz(GDH) enzim aktivitesinin belirlenmesi Akhiro et al. (2008)'a göre yapıldı. Yaprak örnekleri (1 g) 5 mM EDTA, 0,1 mM Tris-HCl, 10 mM ditiotreitol (DTT), 1 mM piridoksal-5-fosfat hidrat ve 1% PVPP içeren (pH 7.8) homojenizasyon tamponu ile homojenize edildi. Homojenatlar ependorf tüplerine aktararak ve $+4^{\circ}C$ 'de 10000 g'de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj yapıldıktan sonra süpernatantlar alındı ve kısmi saflaştırma için PD-10 Desalting

(Amersham) kolonundan geçirildi. Enzim aktivitesinin belirlenmesi için 50 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 13 mM α -ketoglutarat, 0,25 mM NADPH ve 1 mM CaCl_2 içeren reaksiyon karışımı 100 mM Tris-HCl tamponu (pH 8.0) ile hazırlandı. Kuvart küvetlere tamponda çözdürülen kimyasallardan ve örnekten 200 μl pipetlenerek reaksiyon karışımı elde edilmiş ve 340 nm dalga boyunda 1 dakika köre karşı okuma yapılmıştır.

2.10. Glutamat Dekarboksilaz (GAD) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Bartyzel et al. (2003) yöntemi kullanılarak glutamat dekarboksilaz(GAD) enzim aktivite ölçümü yapıldı. Dekarboksilasyon işlemi , 0,4 ml hacimde 20 μM pridoksal fosfat (PLP), pH 5.8'lik 50 mM K-fosfat tamponu ve 3 mM L-glutamat ve 100 μl örneğin bulunduğu reaksiyon karışımı kullanılarak gerçekleştirildi. Örnekler önce 30°C'de ya da oda sıcaklığında 10 dakika boyunca glutamat içermeyen reaksiyon karışımında bekletildi. Glutamat eklenerek reaksiyon başlatıldı ve 60 dakika sonra 0,1 ml 0,5M HCl eklenerek reaksiyon durduruldu ve ardından 12.500 g'de 10 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüj bittikten sonra karışıma 1:5 oranında ninhidrin eklendi ve daha sonra 80°C'de 10 dakika inkübasyon yapılarak türevlendirme işlemi gerçekleştirildi ve reaksiyon sonucu oluşan GABA miktarı belirlendi. Oda sıcaklığına geldikten sonra 570 nm'de spektrofotometrede absorbans değerleri ölçüldü. Aynı koşullardaki GABA'nın absorbans değerleri bilindiği için, bu GABA standartları ile örnekler karşılaştırılarak GABA miktarı saptandı.

2.11. GABA Miktarının Belirlenmesi

GABA miktarının belirlenmesi için HPLC (Shimadzu-VP101, Japan) cihazı kullanılmıştır. Baum ve ark.'na (1996) göre GABA ekstraksiyonu ve Bor ve ark.'na (2009) göre de HPLC analizi yapılmıştır. 0,5 g. bitki örneği sıvı azotta masere edildikten sonra 3:5:12 hacim oranında hazırlanmış su: kloroform: metanol solüsyonundan 1 mL ilave edilmiştir ve 10.000 rpm'de +40°C'de 2 dakika boyunca santrifüj yapılmıştır. Santrifüjden sonra örneklerden su,kloroform, metanol solüsyonun uzaklaşması için +50-60 0C'de bekletilmiştir. Solüsyon uçurulduktan sonra örneklerin üzerine 100 μl dH₂O, 150 μl Borax tamponu (pH 8) ve 250 μl 2-hydroxynaphthaldehyde (HN) (0,3 % w/v) eklenmiştir. Bu karışım

ardından 20 dakika boyunca +80°C’de bekletilmiştir. 20 dakika sonra hacmi 1mL’ye gelinceye kadar metanol eklenmiştir ve örnek fitreden geçirildikten sonra HPLC kolonuna uygulanmıştır. 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 olacak şekilde hazırlanmıştır. Aynı koşullarda aha önceden yürütülen GABA standartlarıyla karşılaştırılarak örneklerdeki GABA miktarı belirlenmiştir.

2.12. Glutamat Miktarının Belirlenmesi

Glutamat miktarının belirlenmesi amacıyla Akihiro et al. (2008)’a göre ekstraksiyon işlemleri yapılmıştır. Örnekler ekstraksiyon işleminden sonra ependorflara aktarılmıştır ve 15 dakika boyunca 10.000 g de +4 °C’de santrifüj yapılmıştır. Süpernatantlar alındıktan sonra glutamat miktarının belirlenmesi için glutamat kiti(Megazyme L-Glutamic Acid Assay Kit) kullanılmıştır. Bu kitten glutamat miktarının belirlenmesi için 4 farklı solüsyon kullanılmıştır. Öncelikle küvete 2 ml dH₂O (25 °C), 100 µl örnek, 500 µl içerisinde 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 edilmiştir. 2 dakika 492 nm’de spektrofotometrede köre karşı okuma yapıldıktan sonra absorbans değeri elde edilmiştir (A₁) ve daha sonra üzerine solüsyon 4 (Glutamat dehidrogenaz solüsyonu) eklendikten sonra aynı dalga boyunda 10 dakika boyunca absorbans değeri ölçülmüştür(A₂). Aşağıda verilen formüle göre glutamat konsantrasyonu hesaplanmıştır.

Glutamik Asit içeriği (c) ;

$$\frac{V \text{ (Son hacim)}(\text{ml}) \times \text{MW (Moleküler Ağırlık)}}{\varepsilon(\text{ekstinksiyon katsayısı}) \times \text{ışık yolu}(\text{cm}) \times \text{örnek hacmi (ml)}} \times \Delta A L$$

– glutamik asit (g/L)

L-Glutamik Asit Miktarı ;

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

2.13. Prolin Analizi

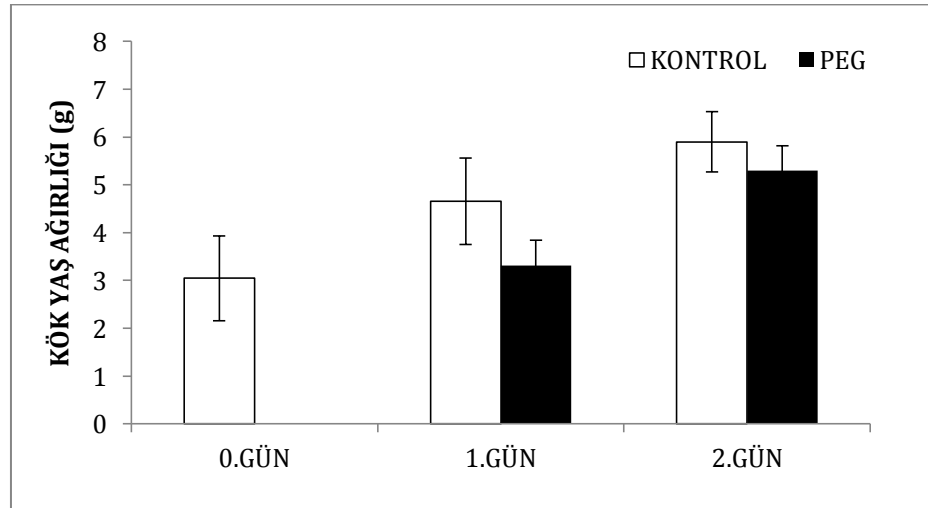
Prolin analizi için bitki yaprak örneğinden 0,1 gram tartılmıştır. Tartılan örnekler 3 ml. sülfosalisilik eklenerek homojenizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Homojenizasyon işleminden sonra homojenatlar filtre kağıdından geçirilerek falkonlara süzülmesi beklenmiştir. Süzülen örneklerden 1 ml. çekilerek cam tüplere aktarılmıştır. Cam tüpteki örneğin üzerine glacial asetik asit ve ninhidrin eklendikten sonra yaklaşık 1 saat sıcak su banyosunda 95⁰C de bekletilmiştir. Sıcak su banyosundan alınan örneklerin sıcaklığının oda sıcaklığına düşmesi beklenmiştir. Oda sıcaklığına gelen örnekler toluen eklendikten sonra vorteks yapılmıştır. Oluşan fazın üst fazından 3 ml. çekilerek kuvartz küvetlerde 520 nm’de köre karşı okuma yapılmıştır.

3. BULGULAR

Araştırma projesi kapsamında *Nicotiana tabaccum* bitkisine PEG (% 20) ile kuraklık stresi uygulandı. Stres uygulaması öncesinde (0. saat), ve stres uygulamasının 1., 3., 6., 12., 16., 17., 19., 22., 24. ve 48. saatlerinde kontrol ve PEG uygulanan gruplardan yaprak örnekleri alındı. Yaprak örneklerinde GABA, glutamat, prolin miktarları, GDH, GAD aktiviteleri belirlendi. Bununla birlikte stres uygulamasının 0., 1. ve 2. günlerinde kök yaş ve kuru ağırlığı, yaprak bağıl su içeriği, fotosentetik verim, osmotik potansiyel ve membran sızıntısı gibi parametrelerde belirlenerek karşılaştırmalı olarak incelendi.

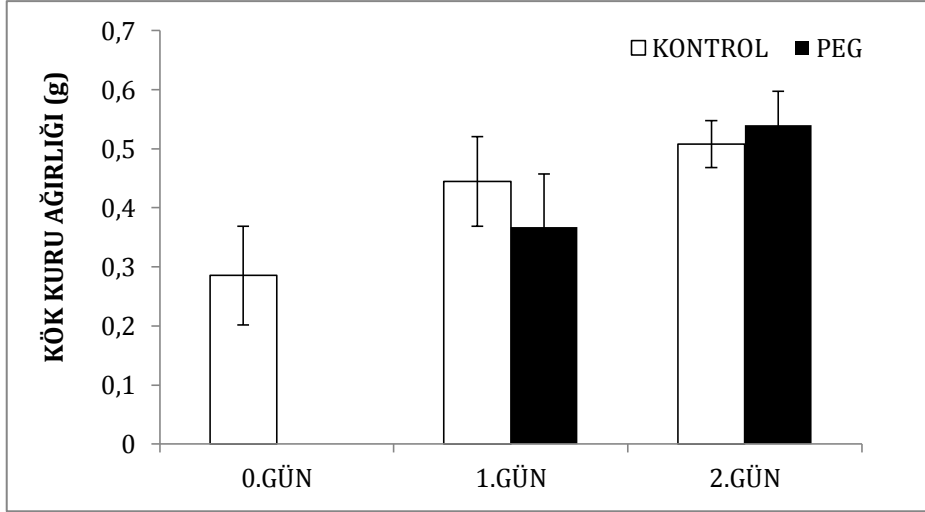
3.1 Kök Yaş ve Kuru Ağırlıkları

Kontrol ve PEG gruplarında kök yaş ve kuru ağırlıkları tartılarak kaydedildi. Sonuçlar şekil 3.1 ve 3.2 de verildi. Kök yaş ağırlıklarında, kuraklık stresi uygulamasının 1. gününde 0. gün değerleri ile karşılaştırıldığında PEG grubunda % 8,7 artış gözlenirken, kontrol grubunda ise % 52,84 lük artış gözlemlendi. 2. günde kontrol grubunda % 93,4 lük ve PEG grubunda % 52,84 lük artış saptandı.



Şekil 3.1 *Nicotiana tabacum* bitkisinde kontrol ve kuraklık stresi koşullarında 0., 1. ve 2. günlerde kök yaş ağırlık (g) değerlerindeki değişimin belirlenmesi.

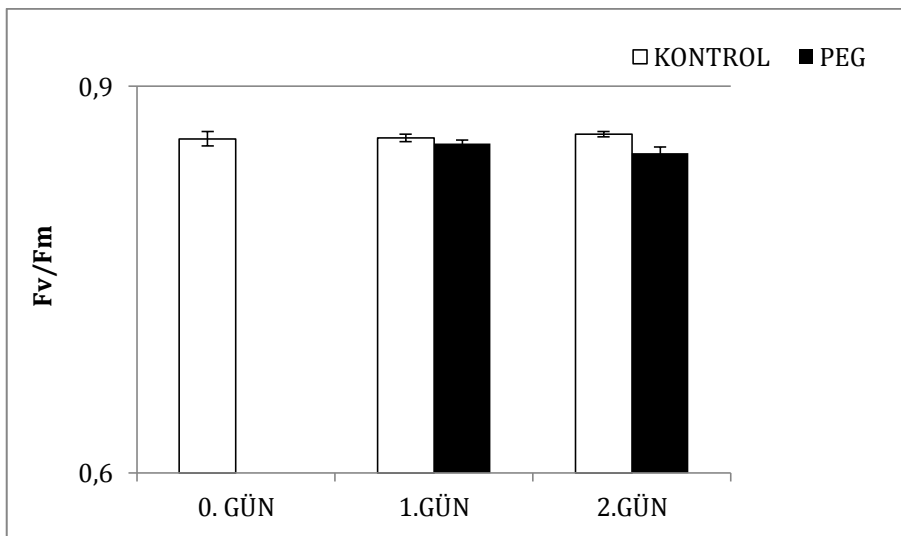
Kök kuru ağırlığında, stres uygulamasının 1. gününde PEG uygulanan grupta % 28,8 artış gözlenirken, kontrol grubunda ise % 55,64 lük artış gözlemlendi. 2. günde kontrol grubunda % 77,82 lik ve PEG grubunda % 89,1 lik artış saptandı.



Şekil 3.2 *Nicotiana tabacum* bitkisinde kontrol ve kuraklık stresi koşullarında 0., 1. ve 2. günlerde kök kuru ağırlık (g) değerlerindeki değişimin belirlenmesi.

3.2 Fotosentetik Verim

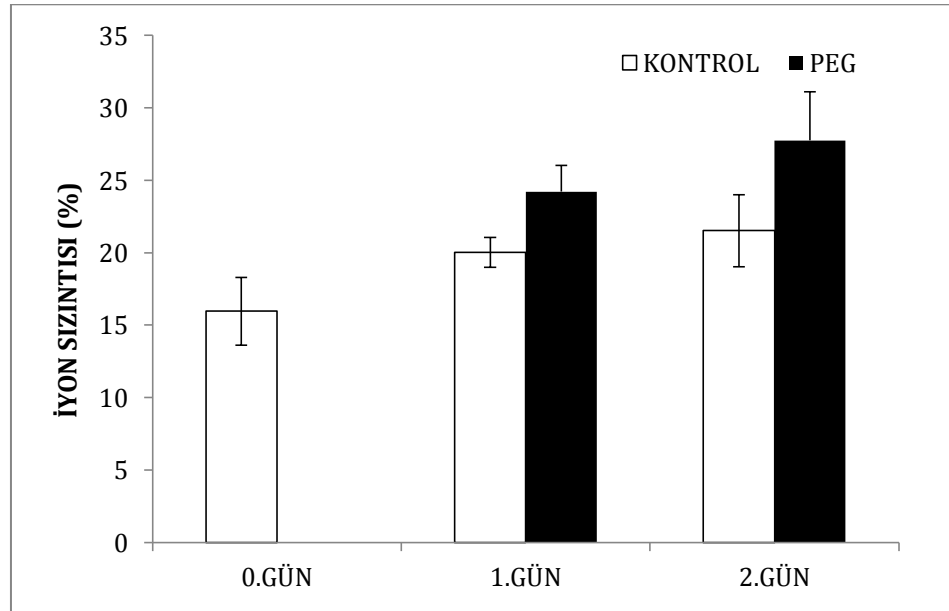
Bitkilerin kuraklık stresinden etkilenme derecelerini gösteren parametrelerden biri de fotosentetik verimdir. Tütün bitkisine uygulanan kuraklık stresinin fotosentetik verim üzerindeki etkisinin saptanması için 0., 1. ve 2. günlerde F_v/F_m oranları ölçüldü. Bu sonuçlar şekil 3.3'te verildi. Genel olarak, kuraklık stresi uygulanan gruplarda fotosentetik verim 1. ve 2. günlerde kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak belirgin bir değişiklik göstermedi. PEG uygulanan gruplarda F_v/F_m değerlerinde 1. günde % 0,4 lük; 2. günde ise % 1,3 lük bir azalma saptandı. Kontrol grubunda ise 1. günde %0,06 lık, 2. günde de % 0,4 lük artış belirlendi.



Şekil 3.3 *Nicotiana tabacum* bitkisinde kontrol ve kuraklık stresi koşullarında 0., 1. ve 2. günlerde fotosentetik verim (F_v/F_m) değerlerindeki değişimin belirlenmesi.

3.3 Yaprak Elektriksel Sızıntı Ölçümleri

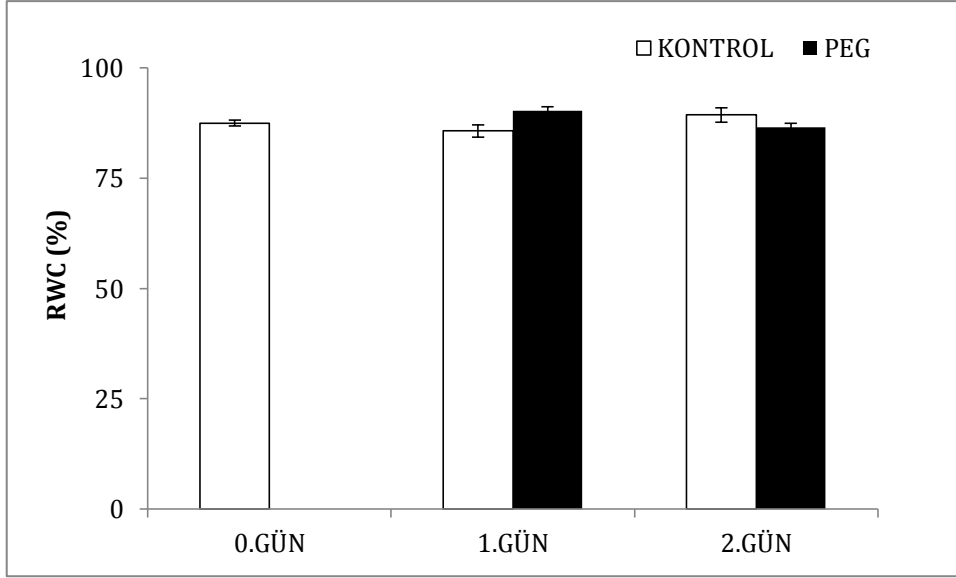
Kuraklık stresinin hücre düzeyinde oluşturduğu önemli hasarlardan biri de hücre zarının bütünlüğünün bozulmasıdır. Hücre zarındaki bozulma elektrolit sızıntısına sebep olduğu için yapraklardaki elektrik iletkenlik değerleri değişir. Yaprak elektriksel iletkenliğindeki değişimler *Nicotiana tabacum* bitkisinde kuraklık stresinin 0., 1. ve 2. günlerinde ölçülerek kaydedildi (şekil 3.4). PEG ile kuraklık stresi uygulanan gruplarda elektriksel iletkenlik değerleri 0. gün kontrol değerine göre 1. günde % 51,7; 2. günde ise % 73,9 oranlarında artış gösterdi. Elektriksel iletkenlik değerleri kontrol gruplarında 0. gün değerlerine göre 1. gün % 25,4; 2. günde ise % 34,8 artış gösterdi.



Şekil 3.4 *Nicotiana tabacum* bitkisinde kontrol ve kuraklık stresi koşullarında 0., 1. ve 2. günlerde yapraklardaki iyon sızıntısı (%) değerlerindeki değişimin belirlenmesi.

3.4 Bağlı Su İçeriği (RWC)

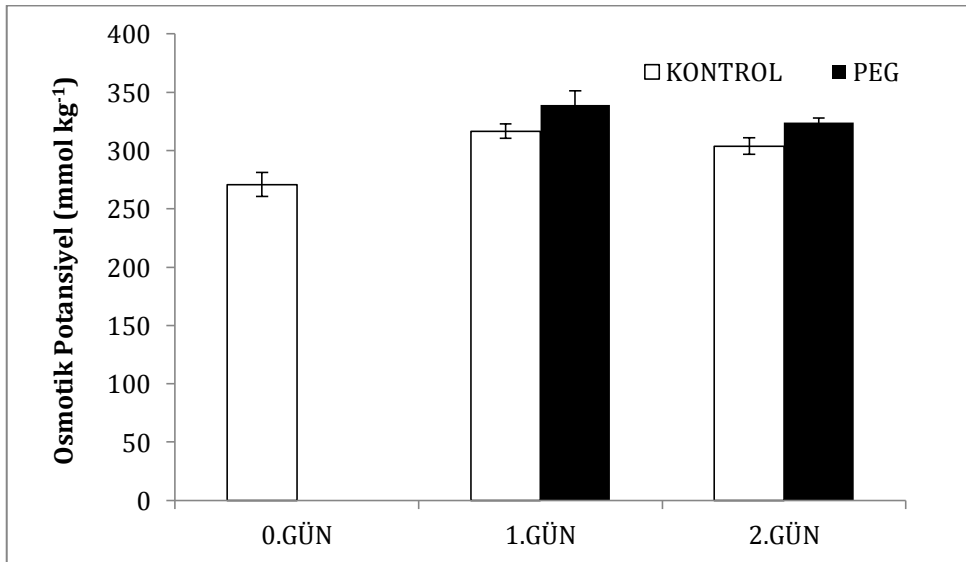
Tütün bitkisinde kuraklık stresi uygulaması yapıldıktan sonra bağlı su içeriği değişimleri hesaplandı (şekil 3.5). 1. ve 2. gündeki değişimler incelendiğinde bu iki günde de belirgin bir değişim saptanmadı. 1. günde PEG grubunda % 3,2 lik artış gözlenirken, 2. günde % 1 lik azalma gözlemlendi. Kontrol grubunda ise 1. günde % 2 lik azalma saptanırken, 2. günde % 2,1 lik artma saptandı.



Şekil 3.5 *Nicotiana tabacum* bitkisinde kontrol ve kuraklık stresi koşullarında 0., 1. ve 2. günlerde bağıl su içeriği (%) değerlerindeki değişimin belirlenmesi.

3.5 Yaprak Osmotik Potansiyeli

Nicotiana tabacum bitkisinde kontrol ve PEG gruplarında yaprak osmotik potansiyel değerlerindeki değişimler şekil 3.6' da verildi. 1. gününde kontrol gruplarında yaprak osmotik potansiyeli % 16,9; 2. günde ise %12,1 luk artış gösterdi. Kuraklık stresi uygulanan gruplarda ise yaprak osmotik potansiyelinde 0.gün değerine göre 1. günde % 25,2; 2. günde ise %19,6 oranında artış belirlendi.

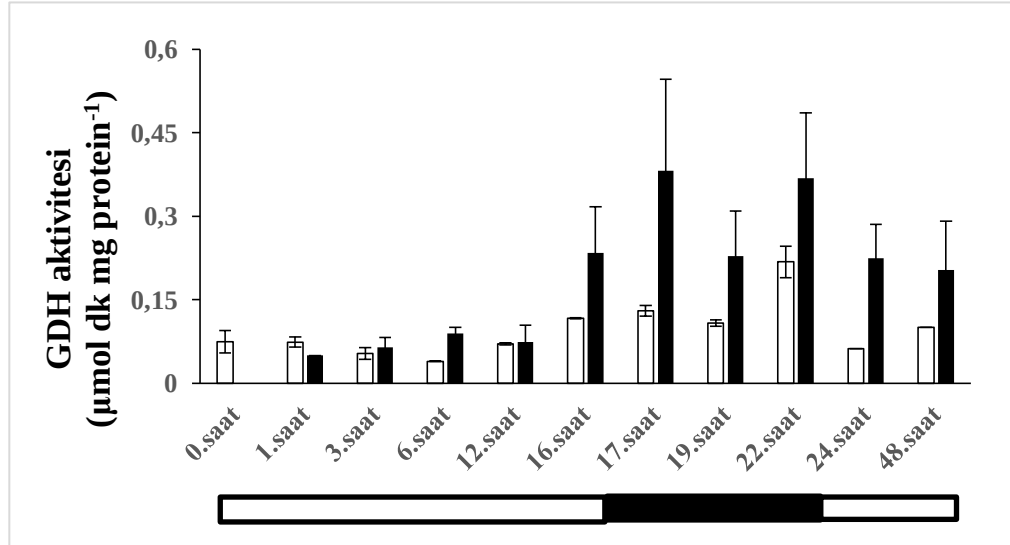


Şekil 3.6 *Nicotiana tabacum* bitkisinde kontrol ve kuraklık stresi koşullarında 0., 1. ve 2. günlerde yaprak osmotik potansiyel (mmol kg⁻¹) değerlerindeki değişimin belirlenmesi.

3.6 Enzim Aktivite Değişimleri

3.6.1 Glutamat Dehidrogenaz (GDH) Enzim Aktivitesi

Glutamat dehidrogenaz (GDH) enzimi, GABA biyosentez yolağında α -ketoglutarattan glutamat sentezini katalizleyen enzimdir. Tütün bitkisinde GDH enzim aktivitesindeki değişimler şekil 3.7.'de verildi. Kuraklık stresi uygulamasının ve aydınlık periyotun 1. saatinde GDH enzim aktivitesinde % 32,8 oranında azalış, kontrol grubunda önemli bir değişiklik gözlenmedi. 3. saatte kontrol grubunda GDH enzim aktivitesinde % 27,8 lik , PEG grubunda % 14 lük bir azalış saptandı. 6. saatte GDH enzim aktivitesinde kontrol grubunda yaklaşık olarak % 47 oranında azalırken, PEG grubunda enzim aktivitesi % 20,3 oranında arttı. 12. saatte PEG uygulanan grupta GDH enzim aktivitesinde belirgin bir değişim gözlenmezken, kontrol grubunda % 5 oranında bir azalma kaydedildi. 16. saatte GDH aktivitesi kontrol grubunda %57,3 oranında artarken, PEG uygulanan grupta enzim aktivitesi yaklaşık olarak 2,14 kat arttı. Kuraklık stresi uygulamasının 17. saatinde (karanlık periyotun 1. saatinde) PEG grubunda GDH enzim aktivitesinde 4,13 kat artış gösterirken, kontrol grubunda % 74,7 oranında bir artış gözlemlendi. Karanlık periyotun 3. saatinde (19. saat) GDH aktivitesinde kontrol grubunda % 45,2 lik artış saptanırken, PEG grubunda % 206,5 lik artış saptandı.

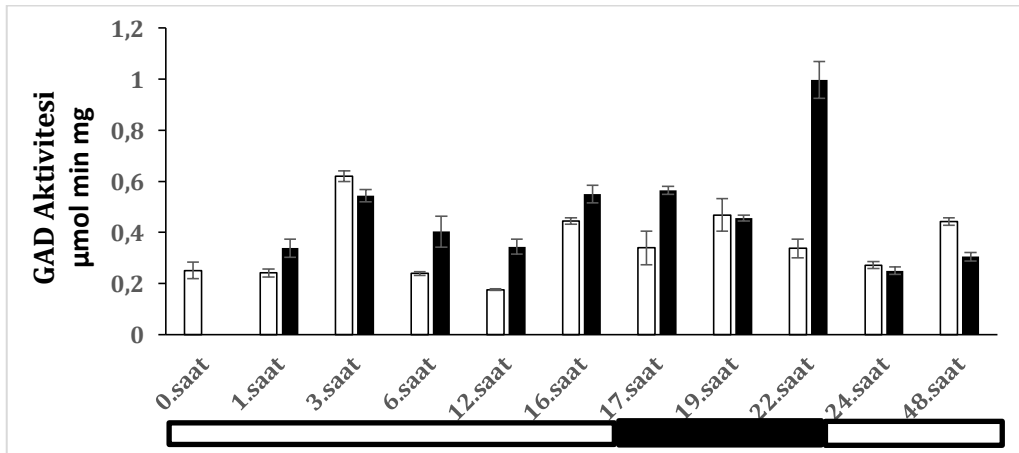


Şekil 3.7 *Nicotiana tabacum* bitkisinde kontrol ve kuraklık stresi koşullarında GDH enzim aktivitesindeki ($\mu\text{mol dk mg protein}^{-1}$) değişimlerin 24 saatlik aydınlık-karanlık döngüsünde ve 48. saatte belirlenmesi

Karanlık periyotun 6. saatinde (22. saat) GDH enzim aktivitesinde PEG grubunda 3,95 kat artış hesaplanırken, bu artış kontrol grubunda 1,93 kat olarak belirlendi. 24. saatte GDH aktivitesi kontrol grubunda % 16,6 azalırken, PEG grubunda % 202,4 oranında arttı. 48. saatte GDH enzim aktivitesi PEG uygulanan grupta % 172,8 lik artış gösterirken, kontrol grubunda % 34,4 lük artış gösterdi.

3.6.2 Glutamat Dekarboksilaz (GAD) Enzim Aktivitesi

Nicotiana tabaccum bitkisinde, kuraklık stresi altında ilk 24 saat boyunca ve 48. saatte GAD enzim aktivitesindeki değişimler incelendi (şekil 3.8). Genel olarak PEG uygulanan gruplarda GAD enzim aktivitesi kontrol grubuna göre daha yüksek düzeyde gözlemlendi. Kuraklık stresi uygulamasının ve aydınlık periyodun 1. saatinde PEG grubundaki GAD enzim aktivitesi % 34,7 oranında artış gösterirken, kontrol grubunda % 4 azalış belirlendi. 3. saatte GAD enzim aktivitesi kontrol gruplarında % 147; PEG uygulanan gruplarda ise % 116,3 oranlarında arttı. Stres uygulamasının 6. saatinde kontrol grubundaki GAD enzim aktivitesi % 4,8 seviyelerinde azalma gösterirken, PEG uygulanan grupta % 60 oranında artış gözlemlendi. 12. Saatte GAD aktivitesi PEG grubunda % 37,1 lik artış gösterirken, kontrol grubunda % 29,9 luk azalış kaydedildi. 16. saatte ise GAD enzim aktivitesi hem kontrol grubunda (% 77,3) hem de kuraklık stresi uygulanan grupta (% 119,1) artış gösterdi. Stres uygulamasının 17. saatinde (karanlık periyotun 1. saati) kontrol grubunda GAD enzim aktivitesi % 35,1 oranında artarken, PEG grubunda bu oran % 125,1 düzeylerine ulaştı. Karanlık periyotun 3. saatinde (19.saat) GAD enzim aktivitesinde PEG grubunda % 81,7 lik artış gözlenirken, kontrol grubunda % 86,5 lik artış gözlemlendi.

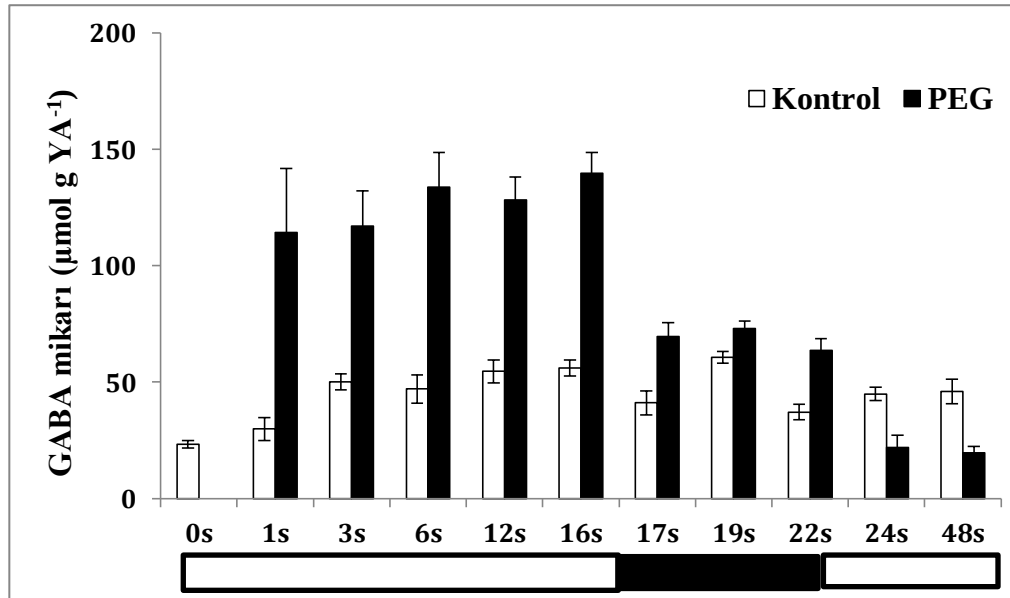


Şekil 3.8 *Nicotiana tabaccum* bitkisinde kontrol ve kuraklık stresi koşullarında GAD enzim aktivitesindeki ($\mu\text{mol dk mg protein}^{-1}$) değişimlerin 24 saatlik aydınlık-karanlık döngüsünde ve 48. saatte belirlenmesi

Karanlık periyotun 6. saatinde (22.saat) kontrol grubundaki GAD enzim aktivitesi % 34,3 artış gösterirken, PEG grubunda yaklaşık 3 kat artış gösterdi. 24. saatte hem kontrol hem de PEG uygulanan gruplarda GAD enzim aktivitesi 0. saat seviyelerine yakın değerlerde kaydedildi. GAD enzim aktivitesi uygulamanın 48. saatinde kontrol grubunda % 76,5 lik, PEG grubunda ise % 21,5 lik artış gösterdi

3.7 GABA Miktarının Belirlenmesi

Çalışmamızda kontrol ve kuraklık stresi uygulanan gruplarda GABA miktarındaki değişimler aydınlık ve karanlık periyotlarda belirlendi (Şekil 3.9). Bu gruplardaki GABA miktarı karşılaştırıldığında özellikle aydınlık ve karanlık periyotlarda önemli farklılıklar saptandı. Aydınlık periyotda PEG grubunda kontrol grubuna göre GABA seviyesi yüksek düzeyde artış gösterdi. Stres uygulamasının 1. saatinde PEG grubundaki GABA miktarı % 391 artış gösterirken bu artış kontrol grubunda % 28,3 olarak saptandı. 3. saatte GABA miktarı kontrol grubunda %115,5 artış gözlenirken PEG grubunda ise bu artış % 403 olarak görüldü. 6. saatte GABA miktarı PEG grubunda 4,7 kat artarken, kontrol grubunda yaklaşık 2 katına çıktı.



Şekil 3.9 *Nicotiana tabacum* bitkisinde kontrol ve kuraklık stresi koşullarında GABA miktarındaki ($\mu\text{mol g yaş ağırlık}^{-1}$) değişimlerin 24 saatlik aydınlık-karanlık döngüsünde ve 48. saatte belirlenmesi

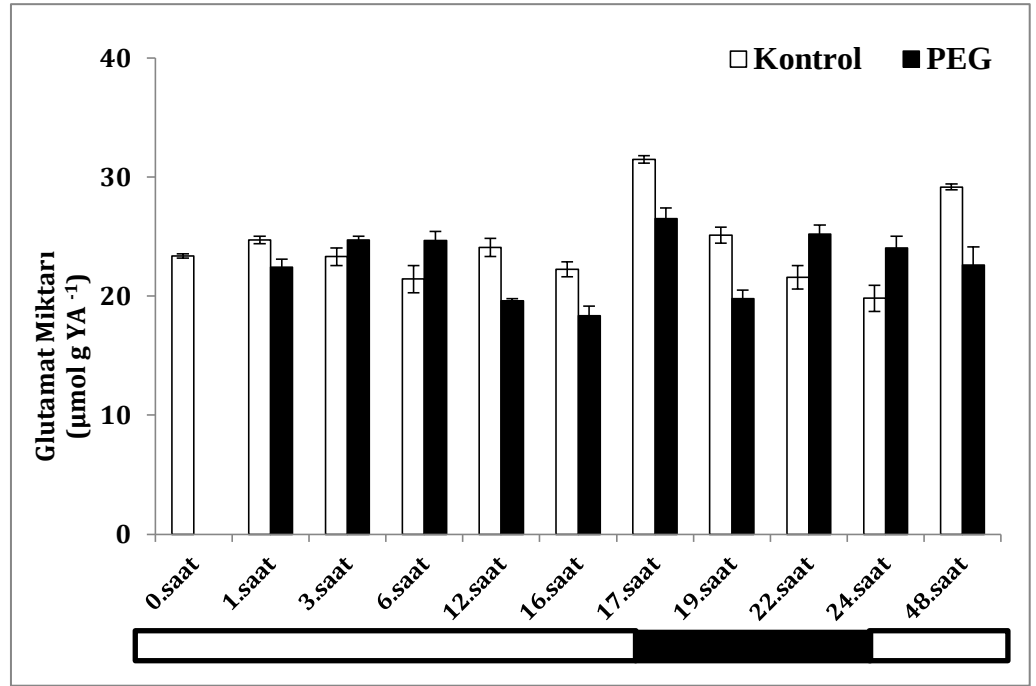
GABA miktarı 12. saatte kontrol grubunda yaklaşık 2,34 kat, PEG grubunda ise yaklaşık 4,5 kat artış gösterdi. Aydınlık periyotun son saati olan 16. saatte

PEG grubundaki GABA miktarı yaklaşık 5 kat artarak $139,558 \mu\text{mol g YA}^{-1}$ ile en yüksek değerine ulaştı. Kontrol grubundaki GABA miktarı ise 16. saatte 2,41 kat artarak ($56.09 \mu\text{mol g YA}^{-1}$) kaydedildi. Karanlık periyotun 1. saatinde yani 17. saatte PEG uygulanan grupta GABA miktarı aydınlık periyotun son saatine (16. saate) göre % 50 oranında azalma gösterdi. 19. saatte yani karanlık periyotunun 3. saatinde ise PEG ve kontrol gruplarının GABA miktarlarının yakın seviyelerde olduğu saptandı. 19. saatte PEG grubundaki GABA miktarında % 213'lük artış gözlenirken, kontrol grubunda ise GABA miktarı % 161 artarak $60,736 \mu\text{mol g YA}^{-1}$ ile kontrol grubundaki en yüksek seviyesine ulaşmıştır. Karanlık periyotun 6. saatinde yani 22. saatte GABA kontrol grubunda % 59,5 artış gösterirken, bu artış PEG grubunda %173 olarak hesaplandı. 24. ve 48. saatlerde ise diğer saatlerden farklı olarak PEG gruplarında azalış saptanırken, kontrol gruplarında yine artış saptandı. 24. saatte GABA miktarında PEG grubunda % 5,4 azalma gözlenirken, kontrol grubunda ise % 93,1 artış gözlemlendi. 48. saatte ise PEG grubunda GABA miktarı %15,9 azalış göstererek $19,58 \mu\text{mol g YA}^{-1}$ ile en düşük seviye olarak kaydedildi.

3.8 Glutamat Miktarının Belirlenmesi

Çalışmamızda *Nicotiana tabacum* bitkisinde kontrol ve PEG gruplarında glutamat miktarındaki değişimler saptandı (şekil 3.10). PEG gruplarındaki glutamat miktarları kontrol grubuna göre örneklem saatlerinin bir bölümünde artış gösterirken diğerlerinde azalış gösterdi. 1. saatte glutamat miktarında PEG grubunda % 4 oranında azalırken, kontrol grubunda % 5,8 artış gösterdi. 3. saatte PEG grubundaki glutamat miktarı % 5,7'lik oranında artarken kontrol grubunda bir değişim saptanmadı. 6. saatte glutamat miktarı kontrol grubunda % 8,3 oranında azaldı, PEG grubunda ise % 5,6 artış gösterdi. 12. saatte glutamat miktarı PEG grubunda % 16,1 azalırken, kontrol grubunda belirgin bir değişim gözlenmedi. 16. saatte her iki grupta da glutamat miktarında azalma saptanırken bu oran PEG grubunda % 21,5, kontrol grubunda ise % 4,9'dur. 17. saatte glutamat miktarı her iki grupta da en yüksek değerlerine ulaştı. Bu değerler PEG grubunda % 13,4 artış ile $26,5 \mu\text{mol g YA}^{-1}$ iken, kontrol grubunda ise % 34,7 artış ile $31,47 \mu\text{mol g YA}^{-1}$ olarak hesaplandı. 19. saatte glutamat miktarı PEG grubunda % 15,4 oranında azaldı ancak kontrol grubunda % 7,4 artış gösterdi. Bunun tam tersi 22. saat glutamat miktarlarında gözlemlendi. Kontrol grubunda glutamat düzeyleri % 7,7 azalırken, PEG grubunda % 7,8 artış belirlendi. 24. saatte ise glutamat miktarı kontrol grubunda % 15,2 oranında azalırken PEG grubunda belirgin bir değişim saptanmadı. 48. Saatte glutamat miktarında da

benzer bir ilişki bulundu. Kontrol grubunda glutamat seviyeleri % 24,8 oranında artış gösterirken, PEG grubunda belirgin bir farklılık elde edilmedi.

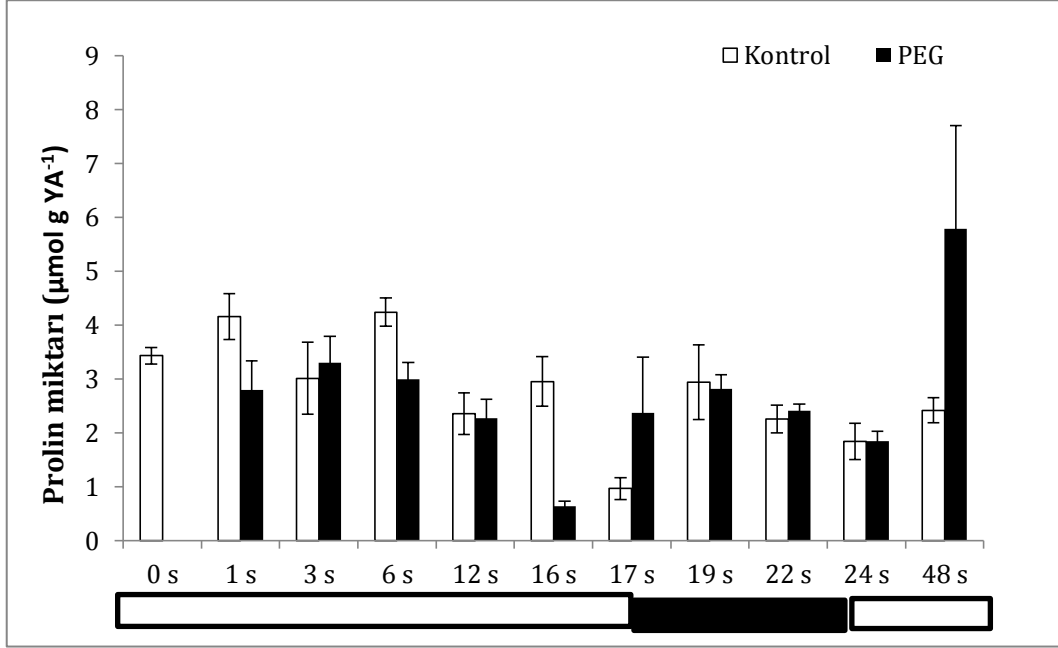


Şekil 3.10 *Nicotiana tabacum* bitkisinde kontrol ve kuraklık stresi koşullarında glutamat miktarındaki ($\mu\text{mol g yaş ağırlık}^{-1}$) değişimlerin 24 saatlik aydınlık-karanlık döngüsünde ve 48. saatte belirlenmesi

3.9 Prolin Miktarı

Tütün bitkisinde, kuraklık stresi koşullarında prolin miktarındaki değişimler belirlendi (şekil 3.11). Genel olarak PEG uygulanan gruplarda prolin miktarlarının azaldığı görüldü. Stres uygulamasının 1. saatinde PEG grubundaki prolin miktarında %18,5 oranında azalırken kontrol grubunda prolin seviyesi % 21,1 oranında arttı. 3. saatte prolin miktarı kontrol grubunda % 12,2; PEG grubunda ise % 4 oranında azaldı. 6. saatte kontrol grubundaki prolin miktarı % 23,5 oranında artış gösterirken PEG uygulanan grupta % 12,7 lik azalış görüldü. 12. saatte PEG grubundaki prolin miktarı % 34; kontrol grubunda ise % 31,4 düzeyinde azaldı. 16. saatte PEG grubundaki prolin miktarı % 81,6; kontrol grubunda ise %14,1 oranında azaldı. Karanlık periyotun 1. saatinde (17.saat) prolin miktarında kontrol grubunda % 72, PEG grubunda % 31 azalış saptandı. Karanlık periyotun 3. Saatinde (19.saat) kontrol grubudaki prolin miktarında % 14,5 azalış belirlenirken, PEG grubunda % 18,1 azalış belirlendi. Karanlık periyotun 6. saatinde (22. Saat) prolin miktarı PEG grubunda % 29,7, kontrol

grubunda ise % 34,2 oranlarında azaldı. Kuraklık stresi uygulanan bitkilerde prolin miktarı en yüksek değerine 48. saatte ulaştı. 0. saat değeri ile karşılaştırıldığında 48. saatte PEG uygulanan gruplarda prolin miktarı % 68,5 oranında arttı. Kontrol gruplarındaki prolin miktarları genel olarak 24. ve 48. saatlerde benzer düzeylerde kalmakla birlikte, 0. saatteki prolin miktarına göre düşük seviyede gözlemlendi.



Şekil 3.11 *Nicotiana tabacum* bitkisinde kontrol ve kuraklık stresi koşullarında prolin miktarındaki ($\mu\text{mol g yaş ağırlık}^{-1}$) değişimlerin 24 saatlik aydınlık-karanlık döngüsünde ve 48. saatte belirlenmesi

4. TARTIŞMA

GABA protein yapısına katılmayan bir aminoasittir ve GABA yolu tarafından sentezlenir ve metabolize edilir. (Bown and Shelp, 1997; Bouché and Fromm, 2004). Bu yolun biyosentez bölümünde α -ketoglutarattan glutamat sentezi GDH enzimi, glutamattan GABA sentezini de GAD enzimi tarafından katalizlenmektedir. Bitkilerde GABA'nın pH düzenlenmesi, solunum, meyve gelişimi, geçici azot depolanması, bitki gelişimi ve bitki savunma süreçlerinde çeşitli görevleri olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda çeşitli abiyotik streslerde ve biyotik streslerde GABA miktarının çeşitli bitkilerde çok yüksek oranda artış gösterdiği belirlenmiştir. Literatürde GABA'nın sinyal molekülü olduğuna dair çeşitli raporlar bulunmakla birlikte bu konu henüz kesinlik kazanmamıştır. Tez projesi kapsamında PEG ile oluşturulan kuraklık stresi koşullarında GABA, glutamat, prolin miktarlarındaki değişimleri, GAD ve GDH enzim aktivite düzeylerini, büyüme, fotosentetik verim, bağıl su içeriği, iletkenlik ve ozmotik potansiyel değişimi gibi çeşitli parametreleri inceledik. Kuraklık stresi koşullarında GABA yolu ve ilgili bileşenlerinin aydınlık-karanlık fotoperiyotta 24 saatlik bir döngüdeki düzeylerini karşılaştırdık.

Kuraklık stresi uygulanan bitkilerde elektriksel iletkenlik dışında büyüme, fotosentetik verim, bağıl su içeriği ve ozmotik potansiyel gibi parametrelerde ilk 48 saatlik dönemde belirgin bir farklılık gözlenmemesi beklenen bir sonuçtur. Bununla birlikte PEG uygulanan gruplarda elektriksel iletkenlik değerlerinde görülen değişimin stresin erken aşamalarında ortaya çıkan membran hasarı nedeni ile olduğu düşünülmektedir. Kuraklık stresi etkilerinin yukarıda adı geçen çeşitli parametreler üzerinde belirgin hale gelmesi için yaklaşık olarak 7-10 günlük bir örnekleme yapılması uygundur. Ancak çalışmamızın ana hedefi 24 saatlik bir döngüdeki değişimleri ortaya koymak olduğu için bu parametrelerin değişimi yan analizler niteliğinde yapılmıştır. Munns (2002) tarafından da belirtildiği gibi kuraklık stresi sonucunda gözlenen yaprak ve kök büyümesindeki azalma gibi olumsuz etkiler genellikle stresin ilk iki haftalık döneminde gözlenir. Ayrıca kuraklık stresine özellikle erken dönemde verilen yanıtlar açısından kuraklık stresine dayanıklı ve hassas bitkiler arasında çok büyük farklılıklar bulunmaktadır. Tütün bitkisi kuraklık stresine oldukça duyarlı bir bitkidir. Stresin ilk 48 saatlik döneminde membran sızıntısı değerinin % 27.74 seviyesine ulaşması bunun bir göstergesidir. Kuraklık stresi açısından orta duyarlı *Lotus corniculatus* bitkisinde % 10 ve 20 PEG uygulamasının 14. gününde membran sızıntısı değerleri % 12.61 ve 17.01 olarak saptanmıştır (Güler, 2014). Mısırdaki yapılan bir

çalışmada, iki farklı mannitol dozu uygulanarak oluşturulan kuraklık stresi altındaki membran iletkenliği değerleri kontrol grubuna göre daha yüksek ölçülmüştür. (Mozdzeń et al., 2015). Akçay (2010) tarafından tütün bitkisinde yapılan bir çalışma da kuraklık stresi koşullarında ozmotik potansiyel değerlerinin stresin 1. ve 2. günlerinde çalışmamızda bulduğumuz değerlere benzer düzeylerde ($315,37$ ve $262,70$ mmol kg⁻¹) bulunmuştur. Ancak bu çalışmada kuraklık stresi etkisi uzun sürede incelendiğinde (7. ve 14. günlerde) ozmotik potansiyel değerleri $606,00$ ve $854,60$ mmol kg⁻¹ olarak kaydedilmiştir.

GABA biyosentezi ile ilişkili iki enzim; GDH ve GAD aktivitelerine kuraklık stresinin ilk 24 saatlik döneminde ve 48 saat sonrasında bakıldı. Glutamat biyosentezinden sorumlu GDH enziminin aktivite değerleri kuraklık uygulanan gruplarda karanlık periyotta (aydınlık periyodun 6. saati hariç) çok yüksek düzeylere ulaştı. Akçay (2010) kuraklık stresi koşullarında *Nicotiana sylvestris* yaban tipi bitkilerinde, GDH aktivitesini 12. ve 24. saatlerde sırasıyla 0.428 ve 0.135 μmol dakika mg protein⁻¹ olarak belirlenmiştir. Bu değerler bizim çalışmamızda elde ettiğimiz aktivite değerlerine göre daha yüksek düzeydedir. Ancak aynı çalışmada kuraklık stresi uygulanan CMSII mutantından elde edilen GDH enzim aktivite değerlerine bakıldığında stres uygulamasının 12. ve 24. saatlerinde bu değerler 0.026 ve 0.050 μmol dakika mg protein⁻¹ olarak kaydedilmiştir. Enzim değerleri arasındaki farklılıkların kuraklığa verilen yanıtlar açısından genotipsel çeşitlilik sonucu olduğunu düşündürmektedir. Çalışmamızda glutamattan GABA'nın sentezlenmesi reaksiyonunu katalizleyen GAD enziminin aktivitesini de hem kontrol hem de stres grupları içinde inceledik. GAD aktivitesi genel olarak kontrol düzeylerinden daha yüksek düzeyde gözlemlendi. En yüksek seviyesine karanlık periyodun son saatinde ulaştı. Tütün bitkisinde kuraklık stresi ile yapılan benzer bir çalışmada bizim sonuçlarımıza paralel olarak 24. ve 48. saatlerde GAD aktivitesi 0.363 ve 0.234 μmol dakika mg protein⁻¹ olarak belirlenmiştir (Akçay, 2010).

Bitkilerde GABA miktarı çeşitli biyotik ve abiyotik stres koşulları altında, fitohormonlar ve farklı uyaranlara karşı hızlı bir şekilde artış göstermektedir (Akçay et al., 2012; Shelp et al., 2012; Yang et al., 2013; Dimlioğlu et al., 2015). Çalışmamızda da kuraklık stresi etkisi altında tütün bitkisinde aydınlık ve karanlık periyoda ait örnekleme saatlerinde GABA miktarında artış belirlendi. GABA düzeyleri stres uygulamasının ilk 24 saatlik döneminde hızlı bir yükseliş ile kontrol düzeylerinin çok üzerinde seviyelere ulaştı. GABA miktarındaki değişim daha önce yaptığımız abiyotik stresle ve GABA ile ilgili çalışmalarla paralellik

göstermektedir. (Bor et al., 2009; Akçay et al., 2012). Bununla birlikte özellikle ilk 12 saatlik dönemde GABA miktarında gözlenen çarpıcı artış bu molekülün sinyal iletim süreçlerinde görev aldığına veya sinyal molekülü olarak çalıştığına dair önemli bir bilgi olduğunu düşünmekteyiz. Ancak kuraklık yanıtları gibi çok gen tarafından kontrol edilen süreçlerde bu tür öngörülerin daha detaylı düzeyde moleküler seviyede incelenmesi gerekmektedir. Ayrıca GABA'nın stres koşulları altında hücre düzeyinde karbon azot dengesinin ayarlanmasına önemli role sahip olduğu bilinmektedir (Batushansky et al., 2015). Çalışmamızda gözlediğimiz yüksek GABA düzeyleri, GABA'nın karbon veya azot kaynağı olarak kullanılabileceğine dair çeşitli görüşleri de destekler niteliktedir. Akçay (2010)'a göre kuraklık stresi uygulanan *Nicotiana sylvestris* yaban tipi ve CMSII mutant yapraklarında GABA miktarı ilk 24 saatte 21.57 ve 9.41 $\mu\text{mol g yaş ağırlık}^{-1}$ olarak belirlenmiştir.

Çalışmamızda kuraklık stresi koşullarında glutamat düzeylerindeki değişimi de belirledik. Kuraklık stresi etkisi ile glutamat düzeylerinde kontrol gruplarına göre belirgin bir farklılık gözlenmedi. Stres uygulamasının 6., 22. ve 24. saatlerinde kontrol gruplarına göre istatistiksel açıdan farklı değerler gözlemlendi. Glutamat sadece GABA'nın değil prolin ve arginin gibi diğer bazı aminoasitlerinde biyosentezinde öncül molekül olarak görevlidir. (Forte ve Lea 2007). Çalışmamızda glutamat miktarı GABA yoluna geçiş açısından bir bilgi vermekle birlikte glutamat düzeylerinin hücrede temel seviyede tutulmasının önemi de göz ardı edilmemelidir. Glutamat düzeyleri stres tipi, süresi ve dozuna bağlı olarak da değişim gösterebilir. Tütün bitkisinde glutamat düzeyleri çinko stresi koşullarında stresin 7. ve 14. günlerinde azalmıştır (Akcan-Daş et al., 2016). Bir başka çalışmada da harpin ile teşvik edilen biyotik stres koşullarında glutamat düzeyleri stres uygulamasının 5. ve 7. günlerinde azalmıştır (Dimlioğlu et al., 2015).

Çalışmamızda kuraklık stresi uygulaması sonrasında prolin miktarlarındaki değişimi de inceledik. Aydınlik-karanlık periyot geçişi ve 48. saat dışında kontrol grupları ile stres uygulanan gruplar arasında prolin seviyeleri açısından çok belirgin bir farklılık gözlemedik. Prolin genel olarak kuraklık stresine yanıtta veya savunma süreçlerinde ön plana çıkan bir aminoasittir. Kuraklık stresi ile ilgili birçok çalışmada yüksek prolin düzeylerinin bu molekülün osmotik düzenleyici role sahip olmasına dayandığını göstermektedir (Türkan et al., 2005; Szabados and Savoure, 2010; İlhan et al., 2015). Ancak bu çalışmaların hemen hemen hepsinde kuraklık stresi uygulaması sonucunda prolin düzeyleri 1 veya 2 haftalık

dönemlerde belirlenmiştir. Uzun vadede ve bitkilerin kuraklık tolerans stratejilerindeki farklılıklar göz önüne alındığında çalışmamızda 48. saate kadar gözlenen değerlerin prolinin koruyucu rolünden çok GABA yolu ile ilişkisi açısından değerlendirilmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

Genel olarak, GABA, glutamat, prolin düzeyleri ile GDH ve GAD enzim aktivite değerleri arasında bir ilişki gözlemlendi. Örneğin; GABA miktarının çok yüksek seviyelere ulaştığı stresin ilk 16 saatlik döneminde prolin ve glutamat seviyeleri genellikle temel düzeyde saptandı. Bununla birlikte GAD aktivitesi artış gösterirken GDH aktivitesi kontrol düzeylerinde kaldı. Çalışmamızda her ne kadar GABA birikimi yüksek GAD aktivitesi ile ilişkili gibi görünse de stres uygulamasının uzun döneminde farklı biyosentetik yollarında devreye girdiğini düşünmekteyiz. Yeni bir çalışmada bitkilerde stres koşulları altında enzimatik olmayan bir reaksiyon sonucunda prolinden GABA sentezlendiğine dair farklı bir yaklaşım öngörülmüştür (Signorelli et al., 2015). Oksidatif stres koşulları altında GABA'nın biyosentezinde prolin birikiminin önemli bir kaynak oluşturabileceği ve bu tür bir yolun fotosentetik etkinliğin korunması açısından da önemli olduğu vurgulanmıştır (Signorelli et al., 2015).

Çalışmamız kuraklık stresi koşullarında aydınlık ve karanlık fotoperiyotta GABA ve GABA yolu bileşenlerinin incelenmesi açısından ilginç verilere sahip ilk çalışma niteliğindedir. Daha önce de belirtildiği gibi GABA üzerinde çok çalışılmasına rağmen bitkilerdeki rolü çok net olarak ortaya konulmamış bir moleküldür. Stres koşullarından yüksek seviyelerde birikmesi ve memelilerde nörotransmitter inhibitörü olarak görev alması bitkilerde sinyal molekülü olduğuna veya sinyal iletiminde görev yaptığına dair çeşitli hipotezlerin öne sürülmesine neden olmuştur (Shelp et al., 1999; Bor et al., 2009; Akçay et al., 2012). 2015 yılına kadar sinyal rolü ile ilgili net bir bilgi elde edilmemiştir. Bu görüşü destekler şekilde Ramesh et al., (2015) GABA'nın bitkilere özgü alüminyum ile aktive edilen (ALMT) taşıyıcıları üzerinde etkili olarak bitki büyümesini düzenlediğini tespit etmişlerdir.

Araştırmamızda günlük ritim boyunca kuraklık stresi etkisinde GABA'nın sinyal molekülü olarak görev alıp almadığını inceleyi hedefledik. Elde ettiğimiz sonuçlar, aydınlık-karanlık geçişlerinde bütün bitkisinin GABA, glutamat ve prolin üçlüsünü stres yanıtlarını oluşturmak açısından etkin biçimde kullandığını göstermektedir. Kontrol seviyeleri ile karşılaştırıldığında, stresin algılandığı ve ilk yanıtların oluşturulduğu 12 saatlik dönemde ve takip eden karanlık periyotta

GABA miktarının yüksek olması bu molekülün sinyal molekülü olarak görev alabileceğini göstermektedir.

5.SONUÇLAR

Çalışmamızda *Nicotiana tabaccum* bitkisinde PEG ile oluşturulan kuraklık stresi koşullarında GABA, glutamat, prolin miktarlarındaki ve GAD, GDH enzim aktivitelerindeki değişimi inceledik. Kuraklık stresi uygulanan bitkilerde elektriksel iletkenlik hariç büyüme, fotosentetik verim, bağıl su içeriği ve ozmotik potansiyel gibi parametrelerde ilk 48 saatlik dönemde belirgin bir farklılık gözlemedik. GDH enziminin aktivitesi stres gruplarında karanlık periyotta (aydınlık periyodun 6. saati hariç) çok yüksek düzeylere ulaştı. GAD aktivitesi stres uygulanan gruplarda genel olarak kontrol düzeylerinden çok daha yüksek seviyede tespit edildi. Glutamat miktarları kuraklık uygulamasının 6., 22. ve 24. saatlerinde kontrol gruplarına göre istatistiksel açıdan belirgin düzeyde arttı. GABA düzeyleri de stres uygulamasının ilk 24 saatlik döneminde hızlı bir yükseliş göstererek kontrol düzeylerinin çok üzerindeki seviyelere ulaştı. Prolin miktarı açısından aydınlık-karanlık periyot geçişi ve 48. saat dışındaki stres gruplarında belirgin bir fark görülmedi. Elde ettiğimiz sonuçlar genel olarak değerlendirdiğimizde aydınlık-karanlık geçişlerinde tütün bitkisinin GABA, glutamat ve prolin üçlüsünü kuraklık stresi yanıtlarının oluşturulması amacıyla etkin biçimde kullandığını düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abe, H., Urao, T., Ito, T., Seki, M., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K.,** 2003, Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2(MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling, *Plant Cell*, 15, 63–78 pp.
- Agarwal, S. and Grover, A.,** 2006, Molecular biology, biotechnology and genomics of flooding-associated low O₂ stress response in plants, *Critical Reviews in Plant Sciences*, 25, 1–21 pp.
- 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, *Journal of experimental botany*, 58, 2699–2707 pp.
- Akcan-Daş, Z., Dimlioglu, G., Bor, M. and Özdemir, F.,** 2016, Zinc induced activation of GABA-shunt in tobacco (*Nicotiana tabaccum* L.), *Environmental and Experimental Botany*, 122, 78-84 pp (in press).
- Akçay, N.,** 2010, Tütün bitkisinde GABA-stres ilişkisinin belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, 88s (yayımlanmamış)
- Akçay, N. Bor, M. , Karabudak, T., Özdemir F. and 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 pp.
- Akihiro, T., Koike, S., Tani, R., Tominaga, T., Watanabe, S., Iijima, Y., Aoki, K., Shibata, D., Ashihara, H., Matsukura, C., Akama, K., Fujimura, T., Ezura, H.,** 2008, Biochemical mechanism on GABA accumulation during fruit development in tomato, *Plant Cell Physiology*, 49, 1378–1389 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Al-Wadei, H.A., Ullah, M.F. and Al-Wadei, M.,** 2011, GABA (γ -aminobutyric acid), a non-protein amino acid counters the β -adrenergic cascade-activated oncogenic signaling in pancreatic cancer: a review of experimental evidence, *Molecular Nutrition & Food Research*, 55, 1745–1758 pp.
- Anderson, J.P., Badruzsfari, E., Schnek, P.M., Manners, J.M., Desmond, O.J., Ehlert, C., Maclean, D.J., Ebert, P.R. and Kazan, K.,** 2004, Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate/ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in *Arabidopsis*, *Plant Cell*, 16, 3460–3479 pp.
- Anjum, F., Yaseen, M., Rasul, E., Wahid, A. and Anjum, S.,** 2003, Water stress in barley (*Hordeum vulgare* L.). II. Effect on chemical composition and chlorophyll contents, *Pak. J. Agri. Sci.*, 40, 45–49 pp.
- Bailey-Serres, J. and Voesenek, L.A.,** 2008, Flooding stress: acclimations and genetic diversity, *Annual Review of Plant Biology*, 59, 313–339 pp.
- Bartyzel, I., Pelczar, K. and Paszkowski, A.,** 2003, Functioning of the gamma-aminobutyrate pathway in wheat seedlings affected by osmotic stress, *Biologia Plantarum*, 47(2), 221–225 pp.
- Batushansky, A., Kirma, M., Grillich, N., Pham, P.A., Rentsch, D., Galili, G., Fernie, A.R. and Fait, A.,** 2015, The transporter GAT1 plays an important role in GABA-mediated carbon-nitrogen interactions in *Arabidopsis*, *Frontiers in plant science*, 6, 785.
- Baum, G., Chen, Y., Arazi, T., Takatsuji, H. and Fromm, H.,** 1993, A plant glutamate decarboxylase containing a calmodulin binding domain. Cloning, sequence, and functional analysis, *The Journal of Biological Chemistry*, 268, 19610–19617 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Baum, G., Simcha, L.Y., Fridmann, Y., Arazi, T., Katsnelson, H., Zik, M. and Fromm, H., 1996,** Calmodulin binding to glutamate decarboxylase is required for regulation and GABA metabolism and normal development in plants, *The EMBO Journal*, 15, 2988–2996 pp.
- Bor, M., Seckin, B., Ozgur, R., Yilmaz, O., Ozdemir, F. and Turkan, I., 2009,** Comparative effects of drought, salt, heavy metal and heat stresses on gamma-aminobutyric acid levels of sesame (*Sesamum indicum* L.) *Acta Physiologiae Plantarum*, 31, 655–659 pp.
- Borio, G., 2001, The Tobacco Timeline, www.tobacco.org**
- Bormann, J., 2000,** The ‘ABC’ of GABA receptors, *Trends in Pharmacological Sciences*, 21, 16–19 pp.
- Bouche, N. and Fromm, H., 2004,** GABA in plants: just a metabolite? *Trends in Plant Science*, 9, 110–115 pp.
- Bouche, N., Fait, A., Zik, M. and Fromm, H., 2004,** The root-specific glutamate decarboxylase (GAD1) is essential for sustaining GABA levels in *Arabidopsis*, *Plant molecular biology*, 55(3), 315-325 pp.
- Bown, A.W. and Shelp, B.J., 1997,** The Metabolism and Functions of γ -Aminobutyric Acid, *Plant Physiology*, 115, 1-5 pp.
- Bradford, M. M., 1976,** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bray, E.A.**, 2004, Genes commonly regulated by water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*, *Journal of Experimental Botany*, 55, 2331–2341 pp.
- Busch, K., Piehler, J. and Fromm, H.**, 2000, Plant succinic semialdehyde dehydrogenase: dissection of nucleotide binding by surface plasmon resonance and fluorescence spectroscopy, *Biochemistry*, 39 (33), 10110–10117 pp.
- Cavanagh, C., Morell, M., Mackay, I. and Powell, W.**, 2008, From mutations to MAGIC: resources for gene discovery, validation and delivery in crop plants, *Current Opinion in Plant Biology*, 11, 215–221 pp.
- Chaves, M.M. and Oliveira, M.M.**, 2004, Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture, *Journal of Experimental Botany*, 55, 2365–2384 pp.
- Chen, T.H. and Murata, N.**, 2002, Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes, *Current Opinion in Plant Biology*, 5, 250–257 pp.
- Chen, C.C., Liang, C.S., Kao, A.L. and Yang, C.C.**, 2009, HHP1 is involved in osmotic stress sensitivity in *Arabidopsis*, *Journal of Experimental Botany*, 60, 1589–1604 pp.
- Chen, C.C., Liang, C.S., Kao, A.L. and Yang, C.C.**, 2010, HHP1, a novel signalling component in the cross-talk between the cold and osmotic signalling pathways in *Arabidopsis*, *Journal of Experimental Botany*, 61(12), 3305–3320 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Chen, Z., Tana, J., Yanga, G., Miaoa, M., Chena, Y. and Lia, T.,** 2012, Isoflavones from the roots and stems of *Nicotiana Tabacum* and their anti-tobacco mosaic virus activities, *Phytochemistry Letters*, 233–235 pp.
- Cheng ,W.H., Endo, A., Zhou, L., Penney, J., Chen, H.C., Arroyo, A., Leon, P., Nambara, E., Asami, T., Seo, M., Koshiba, T. and Sheen, J.,** 2002 A unique short-chain Dehydrogenase/reductase in *Arabidopsis* glucose signaling and abscisic acid biosynthesis and functions, *Plant Cell*, 14, 2723–2743 pp.
- Chinnusamy, V., Schumaker, K. and Zhu, J.K.,** 2003, Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants, *Journal of Experimental Botany*, 55(395), 225–236 pp.
- Chinnusamy, V. and Zhu, JK.,** 2009, Epigenetic regulation of stress responses in plants, *Current Opinion in Plant Biology*, 12, 133–139 pp.
- Choi, H., Hong, J.H., Ha, J., Kang, J.Y. and Kim, S.Y.,** 2000, ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *The Journal of Biological Chemistry*, 275, 1723–1730 pp.
- Chung, I., Bown, A.W. and Shelp, B.J.,** 1992, The production and efflux of 4-aminobutyrate in isolated mesophyll cells, *Plant Physiology*, 99, 659–664 pp.
- Cornic, G. and Massacci, A.,** 1996, Leaf photosynthesis under drought stress, *Photosynthesis and the Environment*, 347-366 pp.
- Crawford, L.A., Bown, A.W., Breitkreuz, K.E. and Guine, F.C.,** 1994, The synthesis of γ -aminobutyric acid in response to treatments reducing cytosolic pH, *Plant Physiology*, 104, 865-871 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Denby, K. and Gehringi, C.,** 2005, Engineering drought and salinity tolerance in plants: lessons from genome-wide expression profiling in Arabidopsis. Trends in Plant Science, 23, 547–552 pp.
- Desikan, R., Last, K., Harret-Williams, R., Tagliavia, C., Harter, K., Hooley, R., Hancock, J.T. and Neil, S.J.,** 2006, Ethylene-induced stomatal closure in Arabidopsis occurs via AtrbohF-mediated hydrogen peroxide synthesis, The Plant Journal, 47, 907–917 pp.
- Dimlioğlu, G., Daş, Z.A., Bor, M., Özdemir, F. and Türkan, İ.,** 2015, The impact of GABA in harpin-elicited biotic stress responses in Nicotiana tabaccum, Journal of plant physiology, 51–57 pp.
- Evans, N.H.,** 2003, Modulation of guard cell plasma membrane potassium currents by methyl jasmonate, Plant Physiology, 131, 8–11 pp.
- Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D. and Basra, S. M. A.,** 2009, Plant drought stress: effects, mechanisms and management, Agronomy for Sustainable Development, 185-212 pp.
- Feng, X., Wang, J.S., Luo, J. and Kong, L.Y.,** 2010, A pair of sesquiterpene glucosides from the leaves of Nicotiana tabacum, Journal of Asian natural products research, 12, 252–256 pp.
- Ford, Y.Y., Ratcliffe, R.G. and Robins, R.J.,** 1996, Phytohormone-induced GABA production in transformed root cultures of Datura stramonium: an in vivo N-NMR study, Journal of Experimental Botany, 47, 811–818 pp.
- Forde, B.G. and Lea, P.J.,** 2007, Glutamate in plants: metabolism, regulation, and signalling, Journal of experimental botany, 58(9), 2339-2358 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Fu, J. and Huang, B.**, 2001, Involvement of antioxidants and lipid peroxidation in the adaptation of two cool-season grasses to localized drought stress, *Environmental and Experimental Botany*, 45, 105–114 pp.
- Fujita, Y., Fujita, M., Satoh, R., Maruyama, K., Parvez, M.M., Seki, M., Hiratsu, K., Ohme-Takagi, M., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K.**, 2005, AREB1 is a transcription activator of novel ABRE-dependent ABA signaling that enhances drought stress tolerance in *Arabidopsis*, *Plant Cell*, 17, 3470–3488 pp.
- Gao, J.J., Zhang, Z., Peng, R.H., Xiong, A.S., Xu, J., Zhu, B. and Yao, Q.H.**, 2011, Forced expression of Mdmyb10, a myb transcription factor gene from apple, enhances tolerance to osmotic stress in transgenic *Arabidopsis*, *Molecular Biology Reports*, 38(1), 205–211 pp.
- Giardi, M.T., Cona, A., Geiken, D., Kucera, T., Masojidek, J. and Mattao, A.K.**, 1996, Long-term drought stress induced structural and functional reorganization of photosystem II, *Planta*, 199, 118–125 pp.
- Green, L.S., Li, Y., Emerich, D.W., Bergersen, F.J. and Day, D.A.**, 2000, Catabolism of α -ketoglutarate by a sucA mutant of *Bradyrhizobium japonicum*: Evidence for an alternative tricarboxylic acid cycle, *Journal of bacteriology*, 182, 2838–2844 pp.
- Güler, A.H.**, 2014, *Lotus corniculatus* L. bitkisinde fotorespirasyon yolunun aktifleşme düzeyine kuraklık stresinin etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, 143s (yayımlanmamış)
- Haake, V., Cook, D., Riechmann, J.L., Pineda, O., Thomashow, M.F. and Zhang, J.Z.**, 2002, Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in *Arabidopsis*, *Plant Physiology*, 130, 639–648 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hirel, B., Le Gouis, J., Ney, B. and Gallais, A.,** 2007, The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches, *Journal of Experimental Botany*, 58, 2369–2387 pp.
- Hoagland, D. R. and Arnon, D. I.,** 1950, The water culture method for growing plants without soil, *California Agricultural Experiment Station Circular*, 347, 1–32 pp.
- Hoekstra, F.A., Golovina, E.A. and Buitink, J.,** 2001, Mechanisms of plant desiccation tolerance, *Trends in Plant Science*, 6, 431–438 pp.
- Huang, G.T., Ma, S.L., Bai, L.P., Zhang, L., Ma H., Jia, P., Liu, J., Zhong, M. and Guo, Z.F.,** 2012, Signal transduction during cold, salt, and drought stresses in plants, *Molecular Biology Reports*, 39, 969–987 pp.
- Ilhan, S., Ozdemir F. and Bor, M.,** 2015, Contribution of trehalose biosynthetic pathway to drought stress tolerance of *Capparis ovata* Desf, *Plant Biology*, 402-407 pp.
- Ingram, J. and Bartels, D.,** 1996, The molecular basis of dehydration tolerance in plants, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47, 377–403 pp.
- Kathiresan A, Tung P, Chinnappa CC, Reid DM.,** 1997, Gamma-Aminobutyric acid stimulates ethylene biosynthesis in sunflower, *Plant Physiology*, 115(1), 129-35 pp.
- Kim, Y.C., Glick, B.R., Bashan, Y. and Ryu, C.M.,** 2012, Enhancement of Plant Drought Tolerance by Microbes, *Plant Responses to Drought Stress*, 383-413 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Knight, M.R., Campbell, A.K., Smith, S.M. and Trewavas, A.J.,** 1991, Transgenic plant aequorin reports the effect of touch and cold shock and elicitors on cytoplasmic calcium, *Nature*, 352, 524–526 pp.
- Lee, S.C. and Luan, S.,** 2012, ABA signal transduction pathway at the crossroad of biotic and abiotic stress response, *Plant Cell Environment*, 35, 53–60 pp.
- Lemaitre, T., Urbanczyk-Wochniak, E., Flesch, V., Bismuth, E., Fernie, A.E. and Hodges, M.,** 2007, NAD-dependent isocitrate dehydrogenase mutants of *Arabidopsis* suggest the enzyme is not limiting for nitrogen assimilation, *Plant Physiology*, 144, 1546–1558 pp.
- Leung, J. and Giraudat, J.,** 1998, Absciscic acid signal transduction, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49, 199–222 pp.
- Levitt, J.,** 1980, Water, radiation, salt and other stresses, *Responses of Plants to Environmental Stresses*, Vol 2., 93–128 pp.
- Lopez-Perez, L., Martinez-Ballesta, M.C., Maurel, C. and Carvajal, M.,** 2009, Changes in plasma membrane lipids, aquaporins and proton pump of broccoli roots, as an adaptation mechanism to salinity, *Phytochemistry*, 70, 492–500 pp.
- Manthe, B., Schulz, M. and Schnabl, H.,** 1992, Effects of salicylic acid on growth and stomatal movement of *Vicia faba* L; evidence for salicylic acid metabolism, *Journal of Chemical Ecology*, 18, 1525–1539 pp.
- Micallef, B.J. and Shelp, B.J.,** 1989, Arginine metabolism in developing soybean cotyledons. III. Utilization, *Plant Physiology*, 91, 170–174 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Mittler, R. and Blumwald, E.,** 2010, Genetic engineering for modern agriculture: challenges and perspectives, *Annual Review of Plant Biology*, 61, 443–462 pp.
- 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.
- Monakhova, O.F. and Chernyadèv, I.I.,** 2002, Protective role of kartolin-4 in wheat plants exposed to soil drought, *Applied Biochemistry and Microbiology*, Vol. 38, 373–380 pp.
- Mosher, S., Moeder, W., Nishimura, N., Jikumaru, Y., Joo, S.H., Urquhart, W., Klessig, D.F., Kim S.K., Nambara, E. and Yoshioka, K.,** 2010, The lesion-mimic mutant cpr22 shows alterations in abscisic acid signaling and abscisic acid insensitivity in a salicylic acid-dependent manner. *Plant Physiology*, 152, 1901–1913 pp.
- Mounet, F., Lemaire-Chamley, M., Maucourt, M., Cabasson, C., Giraudel, J.L., Deborde, C., Lessire, R., Gallusci, P., Bertrand, A., Gaudillere, M., Rothan, C., Rolin, D. and Moing, A.,** 2007, Quantitative metabolic profiles of tomato flesh and seeds during fruit development: complementary analysis with ANN and PCA. *Metabolomics*, 3, 273–288 pp.
- Możdżeń, K., Bojarski, B., Rut, G., Migdalek, G., Repka, P. and Rzepka, A.,** 2015, Effect of drought stress induced by mannitol on physiological parameters of maize (*Zea mays* L.) seedlings and plants, *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences*, 86-91 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Munemasa, S., Oda, K., Watanebe-Sugimoto, M., Nakamura, Y., Shimoishi, Y. and Murata, Y.,** 2007, The coronatine-insensitive 1 mutation reveals the hormone signaling interaction between abscisic acid and methyl jasmonate in Arabidopsis guard cells. Specific impairment of ion channel activation and second messenger production, *Plant Physiology*, 143, 1398–1407 pp.
- Munns, R.,** 2002, Comparative physiology of salt and water stress, *Plant, cell & environment*, 25(2), 239-250 pp.
- Munns, R. and Tester, M.,** 2008, Mechanisms of salinity tolerance, *Annual Review of Plant Biology*, 59, 651–681 pp.
- Nakashima K, Shinwari ZK, Sakuma, Y., Seki, M., Miura, S., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K.,** 2000, Organization and expression of two Arabidopsis DREB2 genes encoding DRE-binding proteins involved in dehydration- and highsalinity-responsive gene expression, *Plant Molecular Biology*, 42, 657–665 pp.
- Nakashima, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K.,** 2006, Regulons involved in osmotic stress-responsive and cold stress-responsive gene expression in plants, *Physiologia Plantarum*, 126, 62–71 pp.
- Neill, S., Barros, R., Bright, J., Desikan, R., Hancock, J., Harrision, J., Morris, P., Ribeiro, D. and Wilson, I.,** 2008, Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress, *Journal of Experimental Botany*, 59, 165–176 pp.
- Nunes-Nesi, A., Carrari, F., Lytovchenko, A., Smith, A.M., Loureiro, M.E., Ratcliffe, R.G., Sweetlove, L.J. and Fernie, A.R.,** 2005, Enhanced photosynthetic performance and growth as a consequence of decreasing mitochondrial malate dehydrogenase activity in transgenic tomato plants. *Plant Physiology*, 137, 611–622 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Nunes-Nesi, A., Sweetlove, L. and Fernie, A.R.,** 2007, Operation and function of the tricarboxylic acid cycle in the illuminated leaf. *Physiologia Plantarum*, 129, 45–56 pp.
- Oms-Oliu, G., Hertog, M.L.A.T., de Poel, B., Mpofp-Asiama, J., Geeraerd, A.H. and Nicolai, B.M.,** 2011, Metabolic characterization of tomato fruit during preharvest development, ripening, and postharvest shelf-life, *Postharvest Biology and Technology*, 62, 7–16 pp.
- Petterson, T., Eklund, A.M. and Wahlberg, I.,** 1993, New lactones from tobacco, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 2097–2103 pp.
- Price, A.H., Cairns, J.E., Horton, P., Jones, H.G. and Griffiths, H.,** 2002, Linking drought-resistance mechanisms to drought avoidance in upland rice using a QTL approach: progress and new opportunities to integrate stomatal and mesophyll responses, *Journal of Experimental Botany*, 53, 989–1004 pp.
- Qiu, Q.S., Guo, Y., Quintero, F.J., Pardo, J.M., Schumaker, K.S. and Zhu, J.K.,** 2004, Regulation of vacuolar Na⁺/H⁺ exchange in *Arabidopsis thaliana* by the salt-overly-sensitive (SOS) pathway, *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 207–215 pp.
- Ramesh, S.A., Tyerman, S.D., Xu, B., Bose, J., Kaur, S., Conn, V., Domingos, P., Ullah, S., Wege, S., Shabala, S., Feijó, J.A., Ryan, P.R. and Gillham, M.,** 2015, GABA signalling modulates plant growth by directly regulating the activity of plant-specific anion transporters, *Nature communications*, 6, 7879.
- Ramputh, A.L. and Bown, A.W.,** 1996, Rapid gamma-aminobutyric acid synthesis and the inhibition of the growth and development of oblique-banded leaf-roller larvae, *Plant Physiology*, 111, 1349–1352 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Reddy, A.R., Chaitanya, K.V. and Vivekanandan, M.,** 2004, Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants, *Journal of Plant Physiology*, 161, 1189–1202 pp.
- Renault, H., Roussel, V., Amrani, A.E., Arzel, M., Renault, D. and Bouchereau, A.,** 2010. The Arabidopsis pop2-1 mutant reveals the involvement of GABA transaminase in salt stress tolerance. *BMC Plant Biology*, 10-20 pp.
- Roberts, M.R.,** 2007, Does GABA act as a signal in plants? Hints from molecular studies, *Plant Signaling & Behavior*, 2, 408–409 pp.
- Rolin, D., Baldet, P., Just, D., Chevalier, C., Biran, M. and Raymond, P.,** 2000, NMR study of low subcellular pH during the development of cherry tomato fruit, *Australian Journal of Plant Physiology*, 27, 61–69 pp.
- Rosegrant, M.W. and Cline, S.A.,** 2003, Global food security: challenges and policies, *Science*, 302, 1917–1919 pp.
- Saito, T., Matsukura, C., Sugiyama, M., Watahiki, A., Ohshima, I., Iijima, Y., Konishi, C., Fujii, T., Inai, S., Fukuda, N., Nishimura, S. and Ezura, H.,** 2008, Screening for γ -aminobutyric acid (GABA)-rich tomato varieties, *Journal of The Japanese Society for Horticultural Science*, 77, 242–250 pp.
- Sakuma, Y., Liu, Q., Dubouzet, J.G., Abe, H., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K.,** 2002, DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of Arabidopsis DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 290, 998–1009 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Sakuma, Y., Maruyama, K., Osakabe, Y., Qin, F., Seki, M., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K., 2006, Functional analysis of an Arabidopsis transcription factor, DREB2A, involved in drought-responsive gene expression, *Plant Cell*, 18, 1292–1309 pp.

Satya Narayan, V. and Nair, P.M., 1990. Metabolism, enzymology and possible role of 4-aminobutyrate in higher plants, *Phytochemistry*, 29, 367–375 pp.

Schroeder, J.I., Kwak, J.M. and Allen, G.J., 2001, Guard cell abscisic acid signaling and engineering drought hardiness in plants, *Nature*, 410, 327–330 pp.

Scotti Campos P. and Thu Pham Thi A., 1997, Effects of abscisic acid pretreatment on membrane leakage and lipid composition of *Vigna unguiculata* leaf discs subjected to osmotic stress, *Plant Science*, 130, 11-18 pp.

Scott-Taggart, C.P., Van Cauwenberghe, O.R., McLean, M.D. and Shelp, B.J., 1999, Regulation of γ -aminobutyric acid synthesis in situ by glutamate availability, *Physiologia Plantarum*, 106, 363–369 pp.

Shelp, B.J., Bown, A.W. and McLean, M.D., 1999. Metabolism and functions of gammaaminobutyric acid. *Trends in Plant Science*, 4, 446–452 pp.

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.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- 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 Science*, 130–135 pp.
- Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K.,** 1996, Molecular responses to drought and cold stress, *Current Opinion in Biotechnology*, 7, 161–167 pp.
- Shinozaki, Y., Tobita, T., Mizutani, M. and Matsuzaki, T.,** 1996, Isolation and identification of two new diterpene glycosides from *Nicotiana tabacum*, *Bioscience, biotechnology and biochemistry*, 60, 903–905 pp.
- Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K.,** 1997, Gene expression and signal transduction in water-stress response, *Plant Physiology*, 115, 327–334 pp.
- Shinozaki, K. and Yamaguchi-Schinozaki, K.,** 1999, Molecular responses to cold, drought, heat and salt stress in higher plants, R.G. Landes Company, 169 p.
- Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K.,** 2000, Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways, *Current Opinion in Plant Biology*, 3, 217–223 pp.
- Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Seki, M.,** 2003, Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses, *Current Opinion in Plant Biology*, 6, 410–417 pp.
- Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K.,** 2007, Gene networks involved in drought stress response and tolerance, *Journal of Experimental Botany*, 221–227 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Signorelli, S., Arellano, J.B., Melø, T.B., Borsani, O. and Monza, J.,** 2015, Proline does not quench singlet oxygen: evidence to reconsider its protective role in plants, *Plant physiology and biochemistry*, 64, 80-83 pp.
- Smart, R. E., and Bingham, G. E.,** 1974, Rapid estimates of relative water content, *plant physiology*, 53,258-260 pp.
- Snedden, W.A., Arazi, T., Fromm, H. and Shelp, B.J.,** 1995, Calcium/calmodulin activation of soybean glutamate decarboxylase, *Plant Physiology*, 108, 543–549 pp.
- Somerville, C. and Briscoe, J.,** 2001, Genetic engineering and water, *Science*, 292, 2217 p.
- Studart-Guimarães, C., Fait, A., Nunes-Nesi, A., Carrari, F., Usadel, B. and Fernie, A.R.,** 2007, Reduced expression of succinyl-coenzymeA ligase can be compensated for by up-regulation of the γ -aminobutyrate shunt in illuminated tomato leave, *Plant Physiology*, 145(3), 626–639 pp.
- Suhita, D., Raghavendra, A.S., Kwak, J.M. and Vavasseur, A.,** 2004, Cytoplasmic alkalization precedes reactive oxygen species production during methyl jasmonate- and abscisic acid-induced stomatal closure, *Plant Physiology*, 134, 1536–1545 pp.
- Szabados, L. and Savouré, A.,** 2010, Proline: a multifunctional amino acid, *Trends in plant science*, 15(2), 89-97 pp.
- Taji, T., Ohsumi, C., Luchi, S., Seke, M., Kasuga, M., Kobayashi, M., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K.,** 2002, Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*, *The Plant Journal*, 29, 417–426 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Tataeizadeh, Z.**, 1998, Drought-induced responses in plant cells, International Review of Cytology, 182, 193–247 pp.
- Toivonen, P. and Vidaver, W.**, 1988, Variable chlorophyll a fluorescence and CO₂ uptake in water stressed white spruce seedlings, Plant Physiology, 86, 744–748 pp.
- Turkan, I., Bor, M., Ozdemir, F. and Koca, H.**, 2005, Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought-tolerant *P. acutifolius* Gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress, Plant Science, 168, 223–231 pp.
- Ueno, H.**, 2000, Enzymatic and structural aspects on glutamate decarboxylase, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 10, 67–79 pp.
- Uno, Y., Furihata, T., Abe, H., Yoshida, R., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K.**, 2000, Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 97, 11632–11637 pp.
- Valliyodan, B. and Nguyen, H.T.**, 2006, Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance in plants, Current Opinion in Plant Biology, 9(2), 189–195 pp.
- Vereecke, D., Messens, E., Klarskov, K., Bruyn, A., Montagu, M., Goethals, K.**, 1997, Patterns of phenolic compounds in leafy galls of Tobacco, Planta, 201, 342–348 pp.
- Wahid, A. and Rasul, E.**, 2005, Photosynthesis in leaf, stem, flower and fruit, Handbook of Photosynthesis, 479–497 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Wang, W., Vinocur, B. and Altman, A.,** 2003, Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance, *Planta*, 218, 1–14 pp.
- 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 sciences*, 78, 495–505 pp.
- Xiong, L. and Zhu, J.K.,** 2001, Abiotic stress signal transduction in plants: molecular and genetic perspectives, *Physiologia Plantarum*, 112, 152–166 pp.
- Xiong, L., Ishitani, M., Lee, H., Zhu, J.K.,** 2001, The *Arabidopsis* LOS5/ABA3 locus encodes a molybdenum cofactor sulfuryase and modulates cold stress- and osmotic stress-responsive gene expression, *Plant Cell*, 13, 2063–2083 pp.
- Xiong, L., Lee, H., Ishitani, M. and Zhu, J.K.,** 2002, Regulation of osmotic stress responsive gene expression by LOS6/ABA1 locus in *Arabidopsis*, *The Journal of biological chemistry*, 277, 8588–8596 pp.
- Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K.,** 1994, A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress, *Plant Cell*, 6, 251–264 pp.
- Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K.,** 2005, Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress responsive promoters, *Trends in Plant Science*, 10, 88–94 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

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*, 136, 152–159 pp.

Zhu, J.K., 2001, Cell signaling under salt, water and cold stresses, *Current Opinion in Plant Biology*, 4, 401–406 pp.

Zhu, J.K., 2002, Salt and drought stress signal transduction in plants, *Annual Review of Plant Biology*, 53, 247–273 pp.

ÖZGEÇMİŞ

Alpay PELVAN, 13 Aralık 1989 yılında Gönen’de doğmuştur. Gönen Anadolu Lisesini 2007 yılında bitirmiştir. 2013 yılında, Ege Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji ve Genetik opsiyonunudan mezun olmuştur. 2013 yılında Doç. Dr. Melike BOR danışmanlığında Ege Üniversitesi, Genel Biyoloji Dalı’nda lisansüstü eğitime başlamıştır.