



**T.C.
AKSARAY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**TUZ VE KURAKLIK STRES KOŞULLARINA MARUZ
BIRAKILAN *PHASEOLUS VULGARIS* L. (FASULYE)
BİTKİSİNDE GİBERELLİK ASİT UYGULAMASININ GABA
VE ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMİNE ETKİSİNİN
BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Seyda YILMAZ

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Fazilet Özlem ÇEKİÇ

AKSARAY, 2015



**T.C.
AKSARAY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**TUZ VE KURAKLIK STRES KOŞULLARINA MARUZ
BIRAKILAN *PHASEOLUS VULGARIS* L. (FASULYE)
BİTKİSİNDE GİBERELLİK ASİT UYGULAMASININ GABA VE
ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMİNE ETKİSİNİN
BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Seyda YILMAZ

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Fazilet Özlem ÇEKİÇ

AKSARAY, 2015

AKSARAY ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ONAY BELGESİ

Aksaray Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 132307407 numaralı Tezli Yüksek Lisans öğrencisi, "Seyda YILMAZ", ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı "TUZ VE KURAKLIK STRES KOŞULLARINA MARUZ BIRAKILAN *PHASEOLUS VULGARIS* L. (FASULYE) BİTKİSİNDE GİBERELLİK ASİT UYGULAMASININ GABA VE ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMİNE ETKİSİNİN BELİRLENMESİ" başlıklı tezini, aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Yrd.Doç. Dr.Fazilet Özlem ÇEKİÇ**
 Aksaray Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. Serpil ÜNYAYAR**
 Mersin Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Doç. Dr. Mahmut ERZENGİN**
 Aksaray Üniversitesi

Teslim Tarihi: 22 Nisan 2015
Savunma Tarihi: 22 Mayıs 2015

DOĞRULUK BEYANI

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmayı, bilimsel etik, ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yol ve yardıma başvurmaksızın yazdığımı, yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden oluştuğunu ve bu eserleri her kullanışımında alıntı yaparak yararlandığımı belirtir; bunu şerefimle doğrularım.

Enstitü tarafından belli bir zamana bağlı olmaksızın, tezimle ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara katlanacağımı bildiririm.

Seyda YILMAZ

ÖNSÖZ

Günümüzde değişen çevre koşullarının etkisiyle daha fazla stres koşulu bitkileri etkilemektedir. Özellikle söz konusu stres şartlarına maruz kalan ekin bitkilerinin fizyolojik cevaplarının bilinmesi gelecekte tarımın sürdürülebilirliği açısından oldukça önemlidir. Bitki gelişiminde önemli rolü olan giberellik asitin çoklu stres koşullarında, bitkilerde çeşitli fizyolojik fonksiyona sahip olan GABA metabolizması ve antioksidan savunma sistemi hakkında çalışmalar oldukça sınırlıdır. Bu çalışmada tarımsal açıdan oldukça önemli bir bitki olan *Phaseolus vulgaris* L. (Fasulye) bitkisinin tuz ve kuraklık stres koşullarında antioksidan savunma sistemi ve GABA metabolizmasındaki değişiklikler incelenmiştir. Bu çalışma TÜBİTAK tarafından desteklenen 113Z885 numaralı “Çoklu Stres Koşullarına Maruz Bırakılan Farklı Fasulye Çeşitlerinde Giberellik Asit Uygulamasının Bitki Savunma Sistemi ve GABA Metabolik Yoluna Etkilerinin Araştırılması” başlıklı proje kapsamında gerçekleştirilmiştir.

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca her konuda destek olan, sabrı ve hoşgörüsüyle fikirlerini, deneyimlerini esirgmeden paylaşan değerli danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Fazilet Özlem ÇEKİÇ'e teşekkür ederim.

Bu tez TÜBİTAK tarafından desteklenen 113Z885 numaralı proje kapsamında Aksaray Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı'nda (ASUBTAM) gerçekleştirilmiştir. Tüm destekleri için TÜBİTAK ve Aksaray Üniversitesi'ne teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Aksaray Üniversitesi Kimya bölümü yüksek lisans öğrencisi Sema AKAY'a ve Hacettepe Eczacılık bölümü öğrencisi sevgili kardeşim Nida KOYUNCU'ya teşekkür ederim.

Bütün hayatım boyunca maddi ve manevi destekleri ile bugünlere gelmemde büyük pay sahibi olan, her konuda beni destekleyen ve her zaman da destekleyeceklerine inandığım canım AİLEM ve EŞİM'e sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖNSÖZ.....	i
TEŞEKKÜR.....	ii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	3
2.1 Gamma Aminobütirik Asit (GABA)	3
2.2 GABA'nın Sentez Yolu.....	4
2.3 Bitkilerde Stres Metabolizmasında GABA'nın Rolü.....	6
2.4 Giberellik Asit (GA ₃).....	8
2.5 Oksidatif Stres ve Antioksidan Savunma Sistemi	8
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	13
3.1 Bitki Yetiştirme Koşulları.....	13
3.2 Oransal Su İçeriği Analizi.....	14
3.3 Klorofil Analizi.....	14
3.4 Antioksidan Enzim Analizleri.....	14
3.5 GABA Analizi.....	15
3.6 Malondialdehit Analizi.....	19
3.7 İstatistiksel Analiz.....	19
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	20
4.1 Oransal Su İçeriği.....	20
4.2 Toplam Klorofil Miktarı.....	22
4.3 Antioksidan Enzim Aktivitesi.....	23
4.3.1 SOD aktivitesi.....	23
4.3.2 KAT aktivitesi.....	26
4.3.3 APX aktivitesi.....	28
4.3.4 GR aktivitesi.....	30
4.4 GABA Miktarı.....	32
4.5 Malondialdehit (MDA) Miktarı.....	34
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	37
KAYNAKLAR.....	38
ÖZGEÇMİŞ	

ÖZET

TUZ VE KURAKLIK STRES KOŞULLARINA MARUZ BIRAKILAN PHASEOLUS VULGARIS L. (FASULYE) BİTKİSİNDE GİBERELLİK ASİT UYGULAMASININ GABA VE ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMİNE ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

Tuzluluk ve kuraklık dünyada bitki verimliliğini azaltan önemli çevresel stres faktörleridir. Bu nedenle, özellikle tarımsal açıdan önemli olan bitkilerin stres koşullarına karşı oluşturdıkları mekanizmaların anlaşılması üretkenliği artırmak için oldukça önemlidir. Fakat, çoklu abiyotik stres koşullarına karşı bitkilerin oluşturdıkları savunma mekanizmaları ve γ -aminobutirik asit (GABA) metabolizması arasındaki ilişki henüz tam olarak bilinmemektedir. Bu çalışmada, tuzluluk ve kuraklık stres koşullarına maruz bırakılan *Phaseolus vulgaris* L. bitkisinde giberellik asit (GA) uygulamasının oransal su içeriği (OSİ), klorofil miktarı, antioksidan savunma sistemi, malondialdehit (MDA) ve GABA miktarı üzerine etkileri incelenmiştir. Tuz ve kuraklık çoklu stres koşullarında GA'nın OSİ üzerine olumlu etkisinin olduğu, bununla birlikte toplam klorofil içeriğinde belirgin değişikliğe neden olmadığı belirlendi. GA uygulamalarında süperoksit dismutaz (SOD) ve askorbat peroksidaz (APX) aktivitelerinde belirgin değişiklik olmadığı, katalaz (KAT) ve glutatyon redüktaz (GR) aktivitelerinin ise kontrol grubuna göre azaldığı gözlemlendi. Tuz konsantrasyonunun yüksek olduğu durumda GABA miktarında artış olduğu, bununla birlikte GA uygulamasının GABA miktarında belirgin değişikliğe neden olmadığı belirlendi. Tuz ve kuraklık stres koşullarında GA uygulamasının MDA miktarını azalttığı gözlemlendi. Bu çalışmadan elde edilen verilere göre, çoklu stres koşulunda fasulye bitkisinde gibberellik asitin antioksidan savunma sisteminde etkilerinin olduğu, fakat GABA metabolizmasında önemli değişikliğe neden olmadığı bu nedenle özellikle stres koşullarında farklı bitki hormonları ve GABA arasındaki ilişkinin çalışılması ile GABA metabolizmasının daha fazla aydınlatılabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler : Antioksidan Enzimler, Kuraklık, Tuzluluk, Gibberellik Asit, GABA, *Phaseolus vulgaris* L.

ABSTRACT

DETERMINATION OF THE EFFECTS OF GIBBERELLIC ACID ON GABA AND ANTIOXIDANT DEFENCE SYSTEM IN *PHASEOLUS VULGARIS* L. (BEAN) PLANTS EXPOSED TO SALT AND DROUGHT STRESSES

Drought and salinity are important environmental stress factors which reduce the plant productivity all around the world. Therefore, understanding the mechanisms of crop plants against abiotic stress conditions is very important to increase the productivity. However, the defence mechanisms of plants against multiple abiotic stress conditions and the relation between GABA metabolism are still unknown. In this study, the effects of gibberellic acid (GA) on RWC, chlorophyll content, antioxidant defence system, malondialdehyde (MDA) and GABA contents were investigated in *Phaseolus vulgaris* L. plants exposed to salinity, drought and combined stress conditions. In salt and drought stress conditions, GA had positive impact on RWC, however GA did not cause significant changes in total chlorophyll content. In GA applications, it was observed that CAT and GR activities were decreased compared to the control plants, however significant differences were not found in SOD and APX activities. GABA was increased by high salt concentration, however GA application did not cause any significant changes in GABA content. GA application decreased MDA content in salt and drought stress conditions. According to the data obtained from this study, in multiple stress conditions, GA had effects on defence mechanism in bean plants, but GA did not cause any significant changes in GABA metabolism. Therefore, it is thought that studying the relationship between different plant hormones and GABA in stress conditions, could clarify GABA metabolism particularly.

Keywords : Antioxidant Enzymes, Drought, Salinity, Gibberellic Acid, GABA, *Phaseolus vulgaris* L.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1: Glutamat dekarboksilaz (GAD) aktivitesi ile GABA sentezi.....	4
Şekil 2.2: Bitkilerde GABA metabolik yolu ve düzenlenmesi	5
Şekil 2.3: GABA'nın biyotik ve abiyotik stres koşullarında düzenlenmesi, hücre içi ve hücrelerarası taşınımı.....	6
Şekil 2.4: Abiyotik stres ile ROT üretimi ve etkileri.....	9
Şekil 2.5: Enerji transferi ile ROT üretimi.....	10
Şekil 2.6: ROT ve antioksidan savunma mekanizmaları.....	11
Şekil 3.1: HPLC (Agilent 1200) cihazının genel görünüşü.....	16
Şekil 3.2: GABA standart analizi.....	16
Şekil 3.3: <i>Phaseolus vulgaris</i> L. cv.Akman 98 bitkisinin yapraklarındaki GABA analizi (enjeksiyon hacmi 20 uL, akış hızı 1 mL min ⁻¹).....	17
Şekil 3.4: <i>Phaseolus vulgaris</i> L. cv.Akman 98 bitkisinin yapraklarındaki GABA analizi (enjeksiyon hacmi 10 uL, akış hızı 1 mL min ⁻¹).....	18
Şekil 3.5: <i>Phaseolus vulgaris</i> L. cv.Akman 98 bitkisinin yapraklarındaki GABA analizi (enjeksiyon hacmi 5 uL, akış hızı 1 mL min ⁻¹).....	19
Şekil 4.1: <i>Phaseolus vulgaris</i> L.cv.Akman 98 bitkisinin yapraklarındaki oransal su içeriği (OSİ).....	20
Şekil 4.2: <i>Phaseolus vulgaris</i> L.cv.Akman 98 bitkisinin yapraklarındaki toplam klorofil miktarı.....	22
Şekil 4.3: <i>Phaseolus vulgaris</i> L.cv.Akman 98 bitkisinin yapraklarındaki SOD aktivitesi.....	24
Şekil 4.4: <i>Phaseolus vulgaris</i> L.cv.Akman 98 bitkisinin yapraklarındaki KAT aktivitesi.....	27
Şekil 4.5: <i>Phaseolus vulgaris</i> L.cv.Akman 98 bitkisinin yapraklarındaki APX aktivitesi.....	29
Şekil 4.6: <i>Phaseolus vulgaris</i> L.cv.Akman 98 bitkisinin yapraklarındaki GR aktivitesi.....	31
Şekil 4.7: <i>Phaseolus vulgaris</i> L. cv.Akman 98 bitkisinin yapraklarındaki GABA miktarı.....	32
Şekil 4.8: <i>Phaseolus vulgaris</i> L. cv.Akman 98 bitkisinin yapraklarındaki MDA miktarı.....	35

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1: Hücre içinde ROT üretimi ve detoksifikasyon mekanizması.....	11
Çizelge 3.1: <i>P. vulgaris</i> L. cv.Akman 98 bitkisine uygulanan deneme deseni.....	13

KISALTMALAR DİZİNİ

AAP	Amino Asit Permeaz
APX	Askorbat Peroksidaz
CaM	Kalmodulin
DHA	Dehidroaskorbik Asit
DHAR	Dehidroaskorbat Redüktaz
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit
GABA	γ - aminobütirik asit
GABA-T	GABA Transaminaz
GA	Giberellik Asit
GAD	Glutamat Dekarboksilaz
GDH	Glutamat Dehidrogenaz
GHB	γ -hidroksibütirik Asit
GSH	Glutasyon
GSSG	Glutasyon Disülfid
GR	Glutasyon Redüktaz
KAT	Katalaz
MDHA	Monodehidroaskorbik Asit
MDHAR	Monodehidroaskorbat Redüktaz
MDA	Malondialdehit
NBT	Nitroblue tetrazolium
PEG	Polietilen Glikol
PVPP	Polivinil Polipirolidon
ProT	Prolin Taşıyıcısı

OSİ	Oransal Su İçeriği
ROT	Reaktif Oksijen Türleri
SOD	Süperoksit Dismutaz
SSA	Süksinik Semialdehit
SSADH	Süksinik Semialdehit Dehidrogenaz
SSR	Süksinik Semialdehit Redüktaz
TBA	Tiobarbtirik Asit
TCA	Trikloroasetik Asit

1. GİRİŞ

Tuzluluk ve kuraklık ülkemizde ve dünyada oldukça önemli çevresel sorunlardır ve bitki metabolizmasını olumsuz yönde etkilemektedir (Saeidi-Sar vd., 2013). Bitkiler söz konusu stres faktörlerine maruz kaldıklarında enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemlerini geliştirmektedir (Gill vd., 2010). Strese yanıt olarak uyarılan γ -aminobutirik asit (GABA), özellikle son yıllarda dikkat çeken önemli bir metabolittir (Kinnersly ve Turano, 2000; Bouche ve Fromm, 2004).

GABA, prokaryotik ve ökaryotik organizmalarda yaygın olarak bulunan protein olmayan dört karbonlu bir aminoasittir (Shelp vd., 1999). GABA, sitozolik pH'ın düzenlenmesi, TCA döngüsü, azot ve karbon metabolizması, böceklerle karşı savunma, oksidatif strese karşı koruma, ozmotik düzenleme gibi fizyolojik yanıtlarda görev almaktadır (Bouche ve From, 2004; Yolcu vd., 2013). Daha önceki yıllarda yapılan çalışmalar sonucu, bitkilerde abiyotik stres toleransı ile GABA metabolizması arasında önemli bir ilişki olduğu tespit edilmiştir (Bouche vd., 2003).

Giberellik asit (GA), bitki büyüme ve gelişiminde görev alan tohum çimlenmesi, yaprak genişlemesi ve çiçeklenmeyi kontrol eden bir bitki hormonudur. Giberellik asit biyosentezi, gelişimsel ve çevresel olarak kontrol edilmektedir. Tuz stresinde giberellik asitin bitki dokularında iyon dağılımı ve depolanmasını, stres toleransı ile ilişkili olan poliaminlerle düzenlediği bildirilmektedir. Fakat giberellik asitin tuz toleransını indüklediği hakkındaki bilgilerin yetersiz olduğu bildirilmiştir (Iqbal ve Ashraf, 2013).

Dünya nüfusunun protein açısından beslenme kaynağı olarak oldukça önemli bir bitki olan *Phaseolus vulgaris* L. (fasulye), diğer baklagillere göre kuraklık ve tuzluluk stresine nispeten duyarlılık göstermektedir (Lazcano ve Lovatt, 1999; Hnatuszko-Konka vd., 2014). Bu nedenle fasulye bitkisinde tuzluluk ve kuraklığın etkilerinin bilinmesi, gelecekteki tarımın sürdürülebilirliği açısından oldukça önemlidir.

Bu çalışmanın amacı, tuz ve kuraklık streslerine maruz bırakılan, tarımsal açıdan önemi olan *Phaseolus vulgaris* L. (fasulye) bitkisine giberellik asit uygulamasının bitki savunma sistemi ve GABA metabolik yoluna etkileri ve GA uygulanan fasulye bitkilerinde tuzluluk, kuraklık ve çoklu stres koşullarının uyardığı oksidatif strese karşı savunma sisteminin oluşturabileceği tolerans derecesinin ve GABA'nın savunma sistemindeki etkisinin belirlenmesidir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

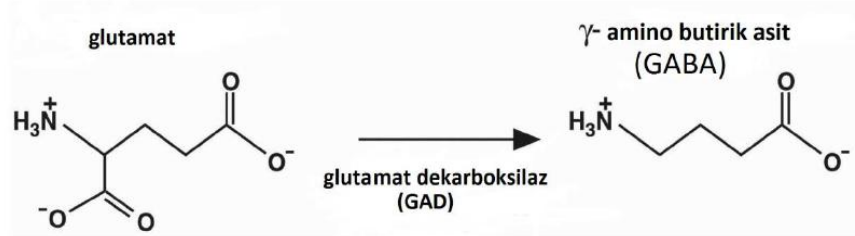
2.1 Gamma Aminobütirik Asit (GABA)

Gamma aminobütirik asit (GABA), dört karbonlu protein yapısında olmayan, amino asit havuzu içinde yer alan önemli serbest bir bileşendir. GABA, prokaryotik ve ökaryotik organizmalar arasında oldukça yaygın olarak bulunmaktadır. Hayvanların merkezi sinir sisteminde özellikle ağrı ve anksiyete hafifleten baskın bir inhibitör nörotransmitter maddedir ve kan basıncı, kalp hızı gibi kardiyovasküler işlevlerin düzenlenmesinde önemli görevleri bulunmaktadır (Shelp vd., 1999; Li vd., 2010). Fizyolojik ve genetik araştırmalar sonucu bitkilerin GABA reseptörlerine sahip olduğu ve bu reseptörlerin hayvanlardaki reseptörler ile benzerlik gösterdiği bilinmektedir (Kinnersly ve Turano, 2000).

GABA'nın bitkilerdeki işlevi hala tartışılmasına rağmen, çevresel uyartıların çoğuna karşı yanıt sırasında hücre seviyesinde birikmesi dikkat çekmektedir (Kinnersly ve Turano, 2000; Bouche ve Fromm, 2004). Daha önce yapılan çalışmalar, GABA'nın bitkilerde biyotik ve abiyotik streslere karşı hızlı ve yüksek oranda üretildiği bildirilmektedir (Kinnersly ve Turano, 2000; Bouche ve Fromm, 2004). Bununla birlikte, son yıllarda GABA'nın özellikle sinyal molekül rolüne odaklanılmıştır (Bouche ve Fromm, 2004). GABA, stres yanıtı olarak sitosolik pH değerini düzenleyerek azot metabolizmasına katılmaktadır ve oksidatif hasara karşı sinyal koruma molekülü olarak görev almaktadır (Al-Quraan vd., 2013).

2.2 GABA'nın Sentez Yolu

GABA, temel olarak sitozolik glutamat dekarboksilaz (GAD) aktivitesi ile 5 karbonlu bir molekül olan L-glutamattan sentezlenir (Renault vd., 2010) (Şekil 2.1).



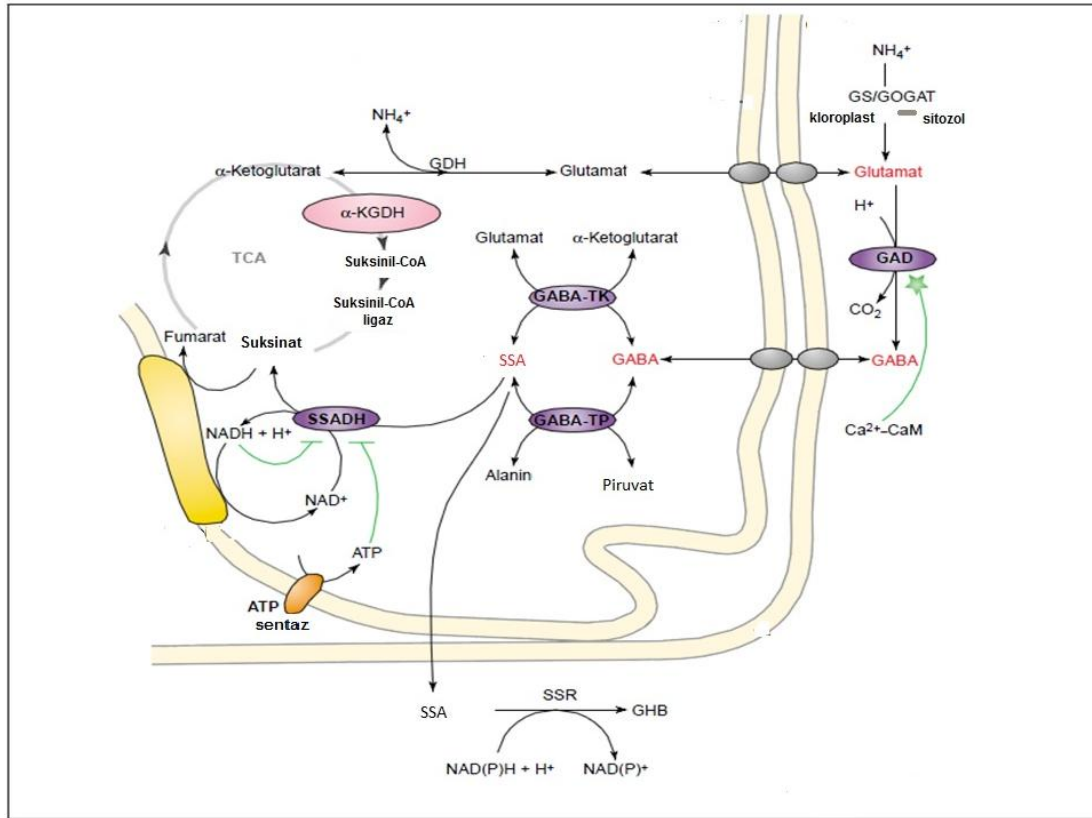
Şekil 2.1: Glutamat dekarboksilaz (GAD) aktivitesi ile GABA sentezi (Jorgensen, 2005).

Bitkiler ve hayvanlarda GABA sentezi, mitokondri ve sitozolde benzer şekilde gerçekleşmektedir (Renault vd., 2010). Glutamat dehidrogenaz (GDH), glutamat katabolizmasında ilk olarak görev yapan geri dönüşümlü olarak çalışabilen bir enzimdir. GABA yolağında esas olarak 3 enzim görevlidir:

Glutamat dekarboksilaz (GAD), glutamatın geri dönüşümsüz olarak dekarboksilasyonu ile GABA'yı oluşturur. GABA daha sonra mitokondriye taşınır.

GABA transaminazlar (GABA-TK, α-ketoglutarat bağımlı GABA aminotransferaz; GABA-TP, piruvat bağımlı GABA aminotransferaz), GABA'nın süksinik semialdehide dönüşümünü katalizler.

Süksinik semialdehit dehidrogenaz (SSADH), süksinik semialdehiti indirger ve süksinat oluşturulur. Süksinat daha sonra TCA döngüsüne katılır (Bouche ve Fromm, 2004) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2: Bitkilerde GABA metabolik yolu ve düzenlenmesi (Bouche ve Fromm, 2004).

Süksinik semialdehit dehidrogenaz (SSADH) aktivitesi, ATP ve NADH tarafından inhibe edebilmektedir. Süksinil CoA sentetaz ve α -ketoglutarat dehidrogenaz, TCA döngüsünde görevlidir ve oksidatif strese karşı duyarlıdır. Süksinik semialdehit, süksinik semialdehit redüktaz (SSR) aracılığıyla γ -hidroksibütirik asite (GHB) indirgenebilir (Şekil 2.2). SSR hayvanlar ve bitkilerde sitozolde bulunmaktadır, hayvanlarda ayrıca nörotransmitter olduğu bilinmektedir (Bouche ve Fromm, 2004).

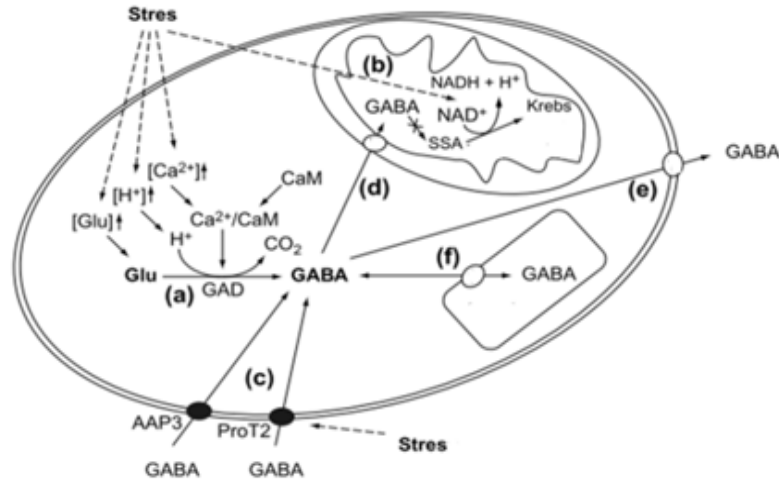
Stres koşullarında Ca^{+2} /kalmodulin tarafından düzenlenen sitozolik enzim olan GAD ve mitokondriyal GABA-T ve SSADH görev yapmaktadır (Snedden ve Fromm, 1999).

Bitkilerde GABA; glutamat dekarboksilaz ile kataliz edilen geri dönüşü olmayan glutamat α -dekarboksilasyon reaksiyonu ile sentezlenirken, poliamin bozunma yolu ile de sentezlenmektedir. Poliamin ilk önce diamin oksidaz tarafından γ -aminobutiraldehide dönüştürülerek daha sonra aminoaldehit dehidrogenaz tarafından GABA sentezi gerçekleşmektedir (Yin vd., 2014). Bununla birlikte tuz stresi sonucu

GABA oluşumunun sadece GAD aktivasyonu ile değil, tohumda bulunan diamin oksidaz ve aminoaldehit dehidrogenaz tarafından da gerçekleştiği bildirilmektedir (Yin vd., 2014).

2.3 Bitkilerde Stres Metabolizmasında GABA'nın Rolü

Bitkilerde stres, bir sinyal iletişim yolu başlatır. Artan sitozolik Ca^{+2} , glutamat dekarboksilaz aktivitesi ve GABA sentezini aktive etmektedir (Shelp vd., 1999) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3: GABA'nın biyotik ve abiyotik stres koşullarında düzenlenmesi, hücre içi ve hücrelerarası taşınımı.

Stres, sitozolik Ca^{+2} /kalmodulin, H^{+} ya da glutamat miktarlarını artırarak GABA'nın glutamat dekarboksilaz aracılığıyla üretilmesini düzenlemektedir (a) Stres, NAD:NADH oranını azaltabilir, bu oranın azalması süksinik semialdehit dehidrogenaz aktivitesini inhibe eder ve süksinik semialdehit birikimi gerçekleşir, bu durum GABA transaminazı inhibe etmektedir (b) Stres, GABA'nın ve diğer bileşiklerin hücre içine taşınımını artırmaktadır (c) GABA birikimi aynı zamanda mitokondriye (d) ve hücreden dışına taşınımın azalmasından da kaynaklanmaktadır (e). AAP amino asit permeaz; CaM, kalmodulin; GAD, glutamat dekarboksilaz; ProT, prolin taşıyıcısı; SSA, süksinik semialdehit (Shelp vd., 1999) (Şekil 2.3).

Strese yanıt olarak hücre içi Ca^{+2} depolarından sitozole Ca^{+2} salınır ve Ca^{+2} /kalmodulin miktarı artmaktadır. Artan Ca^{+2} /kalmodulin ve stresle birlikte vakuolden sitozole salınan H^{+} glutamat dekarboksilazın aktive olmasına neden

olmaktadır. GAD, optimum pH 5.8’de aktivite göstermektedir (Kinnersly ve Turano, 2000).

Bitkilerde GABA miktarının farklı streslere yanıt olarak önemli ölçüde arttığını bildiren çalışmalar bulunmaktadır (Shelp vd., 1999; Snedden ve Fromm, 1999). *Triticum aestivum* (Buğday) (Bartyzel vd., 2003), *Phaseolus vulgaris* (fasulye) (Raggi, 1994), *Glycine max* (soya fasulyesi) (Simon-Sarkadi vd., 2006), *Arabidopsis thaliana* (Allan vd., 2008), *Sesamum indicum* (susam) (Bor vd., 2009) bitkilerinde kuraklık stresi ile GABA düzeylerinde belirgin artış olduğu bildirilmiştir.

Tuz stresi koşullarında ise *Lycopersicon esculentum* (domates) kök ve yapraklarında (Bolarin vd., 1995), *Sesamum indicum* (susam) (Bor vd., 2009) ve *A. thaliana* yapraklarında (Allan vd., 2008) stres uygulamasının erken aşamalarından itibaren GABA miktarının uyarıldığı vurgulanmıştır. Bununla birlikte oksijen yetersizliği, donma, sıcaklık, tuzluluk ve kuraklık streslerine maruz kalan bitki dokularında hızlı bir şekilde GABA biriktirildiği vurgulanmaktadır (Kinnersly ve Turano, 2000). *E.coli* ile yapılan bir çalışmada ise benzer şekilde stres uygulaması sonucu glutamat dekarboksilaz aktivitesinin uyarıldığı ve GABA üretildiği bildirilmiştir (Iyer vd., 2002).

Saccharomyces cerevisiae ile yapılan bir çalışmada ise GABA metabolizmasındaki mutasyon sonucu mayanın H₂O₂’e daha duyarlı olduğu belirtilmiştir (Bouche’ vd., 2003). *Arabidopsis* bitkisinde de benzer şekilde süksinik semialdehit dehidrogenazın mutasyonu ile H₂O₂’in etkili olarak süpürülemediği bildirilmiştir (Bouche ve Fromm, 2004). Ayrıca kuraklık ya da tuz stresinde indüklenen prolin miktarı ile prolin-GABA taşıyıcı proteinlerinin strese karşı savunmada ortak rol oynadığı vurgulanmaktadır (Bouche ve Fromm, 2004).

GABA, inhibitör bir nörotransmitter olduğundan dolayı, bitkilerin herbivorlar gibi biyotik strese karşı GABA ürettikleri bilinmektedir. Bitkilerde GABA düzeylerinin mekanik uyarı ve yaprak ile temas halinde de arttığı bildirilmiştir (Ramputh ve Bown, 1996; Bown vd., 2002).

2.4 Giberellik Asit (GA₃)

Gibberellinler (GA) bitki hormonlarının bir sınıfı olup bitki büyümesi ve gelişimi üzerinde önemli etkilere sahiptir (Hooley, 1994). GA, ilk olarak pirinç bitkisine patojen olan *Gibberella fujikuroi* mantarından izole edilmiştir. Bununla birlikte GA, diğer mantar ve bakteriler tarafından da sentezlenebilmektedir (MacMillan, 2002).

Günümüzde bilinen gibberellin çeşitleri, bitki türlerinden elde edilerek özellikleri belirlenmiştir. Tarımsal açıdan önemli olan gibberellin hormonu, çoğunlukla *Gibberella* fungusundan fermentasyon yoluyla izole edilmektedir. GA₃, ticari amaçlı kullanılan en yaygın giberellindir (Güleryüz, 1982; Walsh, 2003; Westwood, 1993).

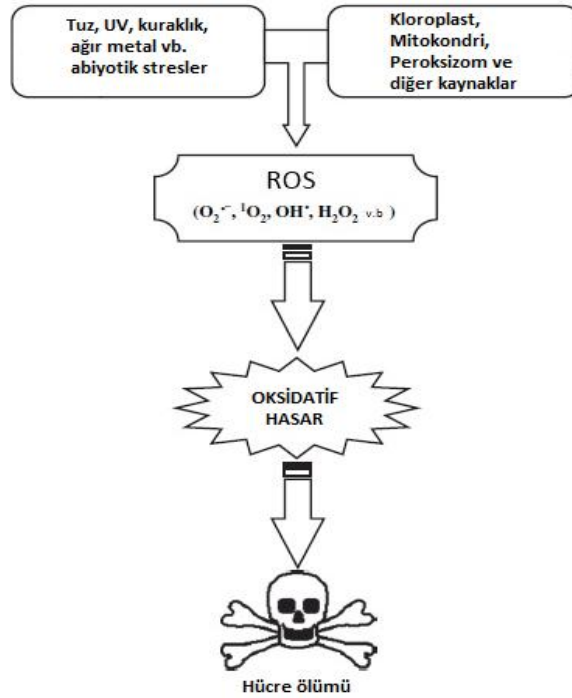
Gibberellinler yaprak, çiçek ve tohum gelişimi, kök uzaması ve tohum çimlenmesi dahil bitki büyüme ve gelişiminin çeşitli aşamalarını kontrol etmektedir (Hopkins, 1995; Yamaguchi, 2008). Bununla birlikte, GA düzeyleri ve stres yanıtı arasında belirli bir korelasyon olduğu ve GA'nın strese karşı korumada önemli rol oynadığı bildirilmiştir (Vettakkorumakankav vd., 1999). GA₃'nın, tuz miktarını düzenleyen proteinler üzerinde önemli bir etkisi olduğu vurgulanmaktadır (Wen vd., 2009).

Dışsal olarak düşük konsantrasyonda GA₃ uygulaması, savunma mekanizmasını geliştirerek tıbbi bitkilerin aktif madde düzeyleri için potansiyel bir araç olarak kullanılmaktadır (Jaleel vd., 2007). Yapraktan uygulanan GA₃'nın bitki gelişimini arttırdığı vurgulanmaktadır (Sadowska vd., 1984). GA₃'nın dıştan uygulanmasının ayrıca kuraklık stresinin etkilerini azalttığı bildirilmiştir (Kaya vd., 2006). Bununla birlikte bazı konsantrasyonlarda GA₃ uygulamasının, aşırı kök uzaması ve verimin düşmesine neden olabileceği belirtilmektedir (Neumaier vd., 1987).

2.5 Oksidatif Stres ve Antioksidan Savunma Sistemi

Bitkiler, kuraklık, tuzluluk, sıcaklık, radyasyon, mineral eksikliği veya fazlalığı gibi abiyotik streslerin yanı sıra bakteri, virüs, mantar, parazit, yararlı ve zararlı böcekler ve zararlı otlar gibi biyotik streslere maruz kalmaktadır (Pardo, 2010). Biyotik ve abiyotik stres faktörleri, bitkilerin fotosentez ve solunum metabolizmasında yer alan elektron taşıma sisteminin işleyişini bozarak reaktif oksijen türleri (ROT) üretiminde artışa neden olmaktadır. Bu nedenle bitki hücrelerinin kloroplast, mitokondri ve

peroksizomları aktif oksijen türlerinin önemli hücre içi üreticileridir (Mittova vd., 2002; Halliwell ve Gutteridge, 2006; Gill vd., 2010) (Şekil 2.4).

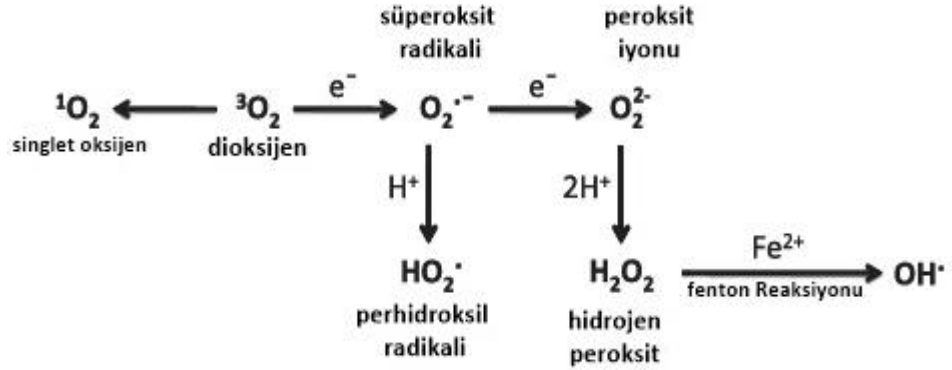


Şekil 2.4: Abiyotik stres ile ROT üretimi ve etkileri (Gill vd., 2010).

ROT, oksidatif strese neden olarak protein, lipid, karbonhidrat, DNA hasarı, mitokondride aerobik solunumun bozulması ve litik enzimlerin aktive olmasına neden olmaktadır (Halliwell ve Gutteridge, 2006; Gill vd., 2010). ROT, atmosferik oksijenin kısmen indirgenmiş formlarıdır. Oksijenin uyarılması sonucu singlet oksijen ($^1\text{O}_2$) ya da oksijene bir, iki veya üç elektron transferi ile süperoksit radikali ($\text{O}_2^{\bullet-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2), ya da hidroksil radikali ($\text{OH}^{\bullet}$) oluşmaktadır (Mittler, 2002) (Şekil 2.5).

Tekli oksijen ($^1\text{O}_2$), klorofilin uyarılmış hali nedeniyle P680 reaksiyon merkezinde ve elektron taşıma zincirinde aşırı yüklenme olduğunda ışık yakalama komplekslerinde üretilmektedir (Asada, 2006). $^1\text{O}_2$, lipid peroksidasyonu ve dokularda hasara yol açmaktadır (Moller vd., 2007; Triantaphylides vd., 2008). Süperoksit radikali, kloroplastlarda ve mitokondride meydana gelmektedir. Süperoksit dismutaz (SOD), süperoksidin en önemli gidericisidir ve SOD aktivitesi sonucunda hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşmaktadır. SOD aktivitesinin ürünü olan hidrojen peroksit, APX veya KAT tarafından H_2O ve O_2 'e dönüşmektedir. Hidroksil

radikali ($\text{OH}^\bullet$), Fenton reaksiyonu ve Haber-Weiss reaksiyonu sonucu hidrojen peroksitten oluşmaktadır (Gill vd., 2010) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5: Enerji transferi ile ROT üretimi (Gill vd., 2010).

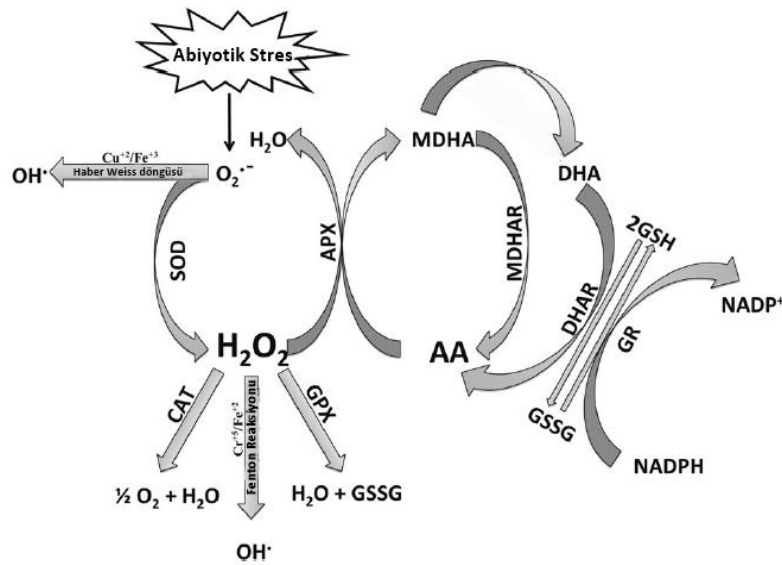
Toksik etki gösteren ROT'lardan korunmak için enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemi ile reaktif oksijen türleri süpürülerek oksidatif strese karşı koruma sağlanmaktadır (Ashraf, 2009; Gill vd., 2010). Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT), peroksidaz (POX), askorbat peroksidaz (APX), glutatyon redüktaz (GR), ROT süpüren antioksidan enzimlerdir. Enzimatik olmayan antioksidanlar olarak askorbik asit, glutatyon, karetenoid ve tokoferoller görev almaktadır (Ashraf, 2009) (Çizelge 2.1).

Yüksek bitkilerde hücre içinde ROT üretim yerleri ve ROT süpürülme mekanizması Çizelge 2.1'de özetlenmiştir.

Çizelge 2.1: Hücre içinde ROT üretimi ve detoksifikasyon mekanizması (Scandalios, 1993).

Subselüler Lokasyon	Aktif O ₂ Türlerinin Tipi	Aktif O ₂ Türlerinin Kaynağı	Enzimatik Süpürme Sistemleri	Ürünler	Enzimatik Olmayan Süpürme Sistemleri
Kloroplast	Süperoksit H ₂ O ₂	PS II Enzimik	SOD APX	H ₂ O ₂ Dehidroaskorbat GSH NADP ⁺	Karotenoid Ksantofiller
Mitokondri	Süperoksit H ₂ O ₂	Elektron Taşınımı ve Enzimik	SOD POX KAT	H ₂ O ₂ H ₂ O O ₂	
Sitozol	Süperoksit H ₂ O ₂	Enzimik	SOD KAT POX	H ₂ O ₂ H ₂ O O ₂	
Peroksizom	H ₂ O ₂	Fotorespirasyon	KAT	H ₂ O O ₂	

H₂O₂'nin hücre içinde birikimi katalaz ya da askorbat-glutasyon döngüsü ile önlenmektedir. APX, askorbat-glutasyon döngüsünde hidrojen peroksidi suya indirgemekle görevlidir. Bu sırada askorbat, monodehidroaskorbata (MDHA) okside olmaktadır. MDHA, monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR) tarafından askorbata dönüştürülmektedir. Bununla beraber MDHA'nın iki molekülü enzimatik olmayan yol ile MDHA ve dehidroaskorbata (DHA) dönüştürülmektedir. DHA, dehidroaskorbat redüktaz (DHAR) tarafından askorbata indirgenmektedir. Bu reaksiyondan sonra redükte glutasyon (GSH), DHAR'ın etkisi ile okside glutatyona (GSSG) dönüşür ve GSSG, GR tarafından GSH'a geri indirgenmektedir (Shalata vd., 2001, Shigeoka vd., 2002) (Şekil 2.6).



Şekil 2.6: ROT ve antioksidan savunma mekanizmaları (Gill vd., 2010).

Yüksek antioksidan enzim aktivitesine sahip olan bitkilerin oksidatif hasara karşı daha fazla dirence sahip olduğu bildirilmektedir (Saed-Moucheshi vd., 2014). Bununla birlikte ROT, aynı zamanda bazı genlerin ekspresyonunu etkileyen ve bu nedenle büyüme, hücre döngüsü, programlanmış hücre ölümü, abiyotik stres tepkileri, patojen savunma, sistemik sinyalizasyon gibi çok sayıda işlemi kontrol etmektedir (Gill vd., 2010). ROT aynı zamanda sinyal iletiminde ikincil haberci olarak da görev almaktadır (Foyer ve Noctor, 2005).

Stres koşullarında oluşan reaktif oksijen türlerinin antioksidan mekanizma ile süpürülebilmesi bitki verimliliği açısından oldukça önemlidir. Günümüzde stresi daha fazla tolere edebilen bitkilerin eldesi, gelecekteki tarımın sürdürülebilirliği açısından oldukça önemlidir. Bu nedenle stres sırasındaki fizyolojik cevapların bilinmesi gereklidir. Özellikle çoklu stres koşullarının bitki savunma sistemi üzerine fizyolojik etkileri hakkındaki çalışmalar daha sınırlıdır. Bu nedenle çoklu stres koşullarının bitkiler üzerine etkisinin belirlenmesi günümüz ve gelecek için önem teşkil etmektedir. Bu çalışmada tuz ve kuraklık stres koşullarına maruz bırakılan *Phaseolus vulgaris* L. (Fasulye) bitkisine giberellik asit uygulamasının, antioksidan savunma sistemi ve GABA metabolizmasına etkileri araştırılmıştır.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1 Bitki Yetiştirme Koşulları

Eskişehir Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nden temin edilen *Phaseolus vulgaris* L. cv. Akman 98 fasulye bitkisinin tohumları % 5 NaOCl solüsyonunda yüzey sterilizasyon işlemi sonrasında çimlenmeye bırakıldı. Çimlenen tohumlar perlit içeren saksılara ekilerek 26°C/22°C gündüz gece sıcaklığında 16/8 saat aydınlık karanlık uygulanarak % 65-70 nem aralığında 175 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddetinde iklim kabini (RUMED 3501) yetiştirildi. Bitkiler ½ oranında Hoagland çözeltisi ile sulanarak 5 hafta sonunda Hoagland solüsyonu içinde 1 hafta boyunca 0, 100, 200 mM NaCl ve/veya % 10 Polietilen glikol 6000 (PEG) ve/veya 0.1 mM GA çözeltileri Çizelge 3.1'de belirtilen deneme deseni şeklinde uygulandı.

Çizelge 3.1: *P. vulgaris* L. cv.Akman 98 bitkisine uygulanan deneme deseni.

Deneme Deseni	Kontrol Grubu	Tuz	Kuraklık	Tuz ve Kuraklık	GA	GA + Tuz	GA + Kuraklık	GA + Tuz ve Kuraklık
Örnek No	1,2,3	(100 mM NaCl) 4,5,6	(PEG) 10,11,12	(100 mM NaCl+PEG) 13,14,15	19,20,21	(GA+100 mM NaCl) 22,23,24	(GA+PEG) 28,29,30	(GA+100 mM NaCl+PEG) 31,32,33
		(200 mM NaCl) 7,8,9		(200 mM NaCl+PEG) 16,17,18		(GA+200 mM NaCl) 25,26,27		(GA+200 mM NaCl+PEG) 34,35,36

Hasat işlemi gerçekleştirildikten hemen sonra yapraklarda oransal su içeriği belirlendi ve yaprak örnekleri 0.2, 0.3, 0.5 ve 1 g olarak tartılarak sıvı azotta dondurulup -80 °C'de analizlere kadar saklandı.

3.2 Oransal Su İçeriği Analizi

Yapraklardaki oransal su içeriği (OSİ), hasat günü yapraklardan eğit büyüklükte diskler alınarak ağırlık ölçümü yapıldıktan sonra bir gece boyunca 4  C’de deiyonize suda bırakıldı ve yaprakların turgorlu ağırlıkları ölçüldü. 70  C’de 8 saat kurutulduktan sonra kuru ağırlık elde edildi. Oransal su içeriği aŐaĐıdaki formül yardımıyla hesaplandı (Zhang vd., 2013).

$$\text{OSİ (\%)} = (\text{YA} - \text{KA}) / (\text{TA} - \text{KA}) \times 100\% \quad (3.1)$$

3.3 Klorofil Analizi

Toplam klorofil içeriği spektrofotometrik olarak Arnon (1949)’a göre gerçekleştirildi. 0,3 g yaprak dokusu sıvı azotta ezilerek 15 mL tüplere aktarıldı. 5 mL %80 aseton eklenerek tp karıŐtırıldı ve karanlıkta 1 gece bekletildi. 4  C’de 15 dakika 3000 rpm’de santrifüjlendikten sonra supernatan yeni bir santrifüj tüpüne aktarıldı. Toplam klorofil miktarı %80 aseton kr olarak kullanılarak spektrofotometrik olarak ölçüldü ve aŐaĐıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\text{Chl a+b (mg/g)} = [8.02 \times A_{663} + 20.20 \times A_{645}] \times V / 1000 \times W \quad (3.2)$$

(V, ekstraktın mL hacmi; W, g taze yaprak) (Zhang vd., 2013).

3.4 Antioksidan Enzim Analizleri

0,5 g yaprak rneği, 1 mM EDTA ve %2 polivinilpolipirolidon (PVPP) içeren 50 mM sodyum fosfat tamponunda (pH 7.8) homojenize edildi. APX aktivite ölçümü, homojenizasyon tamponuna 2 mM askorbat ilave edilerek gerçekleştirildi. Örnekler 12000 g’de 20 dakika 4 C’de santrifüjlendikten sonra supernatan, enzim aktivitesi ve protein içeriği analizlerinde kullanıldı. Toplam protein içeriği, Bradford (1976)’a göre bovine serum albumin standartı kullanılarak belirlendi. Spektrofotometrik analizler spektrofotometrede (T80+UV-VIS Spectrometer PG Instruments) gerçekleştirildi. Superoksit dismutaz (SOD; EC 1.15.1.1) aktivitesi Beuchamp ve Fridovich (1971)’e göre 33  M NBT, 10 mM L-metiyonin, 0.66 mM EDTA ve 0.0033 mM riboflavin içeren 50 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7.8) 10 dakika ıŐıkta inkübe edildikten sonra 560 nm’de ölçüm gerçekleştirildi. 1 nite SOD enzimi, NBT’nin %50 inhibisyonuna karŐılık olarak (mg protein)⁻¹ olarak hesaplandı.

Katalaz (KAT; EC 1.11.1.6) aktivitesi, Bergmeyer (1970)'e göre 240 nm'de H_2O_2 'nin azalma oranına göre ölçüldü. 1 mM EDTA ve % 3 H_2O_2 içeren 50 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7.0) içeren reaksiyon karışımına enzim ekstraktı eklenmesi ile reaksiyon başlatıldı. 1 unite KAT enzimi 1 μ mol H_2O_2 azalmasına göre hesaplandı. Askorbat peroksidaz (APX, EC 1.11.1.11) aktivitesi, Nakano ve Asada (1981)'e göre 290 nm'de gerçekleştirildi. 50 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7.0), 0.5 mM askorbat, 0.1 mM EDTA, 1.2 mM H_2O_2 içeren reaksiyon karışımına enzim ekstraktı eklendikten sonra absorbans azalmasına göre ϵ , $2.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ kullanılarak 1 unite enzim, 1 μ mol (mL okside askorbat) $^{-1} \text{ dk}^{-1}$ olarak hesaplandı. Glutatyon reduktaz (GR, EC 1.6.4.2) aktivitesi, Foyer ve Halliwell (1976)'e göre gerçekleştirildi. 25 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7.8), 5 mM GSSG, 1.2 mM NADPHNa₄ içeren reaksiyon karışımına enzim ekstraktı eklenip 340 nm'de ölçüm gerçekleştirildi. NADPH için $\epsilon=6.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ kullanılarak 1 unite enzim 1 μ mol (mL okside GSSG) $^{-1} \text{ min}^{-1}$ olarak hesaplandı. Spesifik enzim aktiviteleri unit (mg protein) $^{-1}$ olarak ifade edildi.

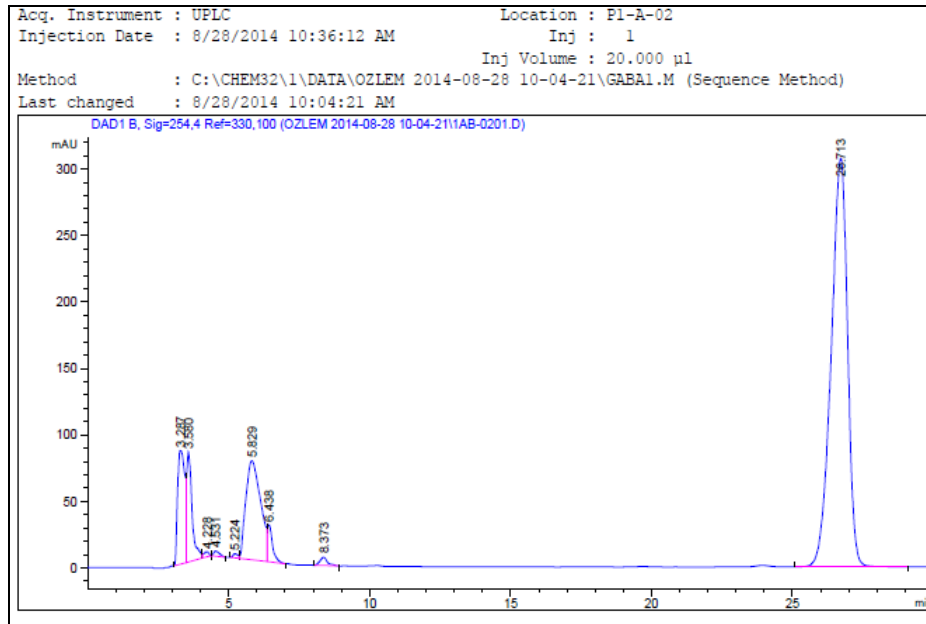
3.5 GABA Analizi

GABA miktarı, Bor ve ark. (2009)'e göre bazı değişiklikler yapılarak HPLC (Agilent 1200) ile belirlendi. 0.5 g yaprak örneği sıvı azot ile dondurulup 3 mL su:kloroform:metanol (3:5:12,v/v/v) solüsyonunda homojenize edilerek 10000 g'de 4 °C'de santrifüj edildi, sonra supernatan kurutuldu. Kurutulan örnek, 100 μ L su, 150 μ L Boraks tamponu (pH 8) ve 250 μ L türevlendirme maddesi 2-hidroksinaptaldehit (HN) (metanol içinde % 0,3 w/v) içinde çözülerek karışım 80°C'de su banyosunda 30 dakika boyunca ısıtıldı ve oda sıcaklığında soğuması beklendi. Son hacim 1 mL metanol eklenerek elde edildi. Örnekler filtreden (MILLEXFH 25 mm PHOBIC PTFE.45 μ m NS) geçirildikten sonra HPLC ile Supelco LC18; (250 mm $\times$ 4.6 mm, 2.5 μ m) kolonda 330 nm'de UV dedektör ile analiz edildi. Hesaplamalar, saf GABA standartları ile karşılaştırılarak gerçekleştirildi. GABA analizinde ilk olarak farklı konsantrasyonda GABA standardı hazırlandı ve örneklerin türevlendirildiği şekilde 2-hidroksinaptaldehit (HN) ile türevlendirilip inkübasyon işleminden sonra HPLC ile analiz edildi (Şekil 3.1).



Şekil 3.1: HPLC (Agilent 1200) cihazının genel görünüşü.

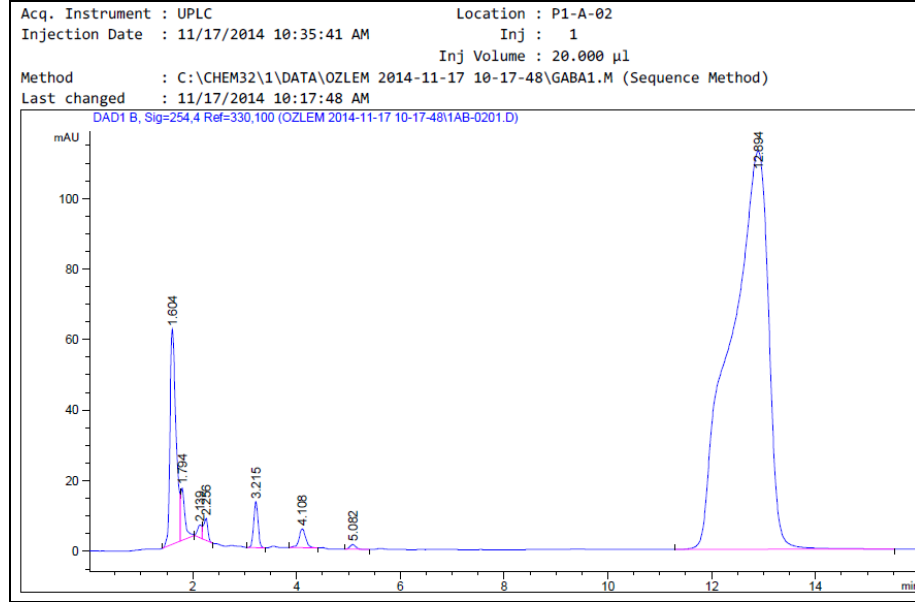
İlk yapılan GABA standart çalışmaları Şekil 3.2’de belirtilmiştir. Literatür bilgisine göre akış hızı $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ olarak belirtilen önceki çalışmalarda istenilen pikin 12. dakikada görüldüğü bildirilmiştir. Fakat çalışmamızda literatürdeki aynı şartların sağlanmasına rağmen istenilen pik 26. dakikada elde edildi (Şekil 3.2).



Şekil 3.2: GABA standart analizi (Enjeksiyon hacmi 20 μL , akış hızı $0,5 \text{ mL min}^{-1}$).

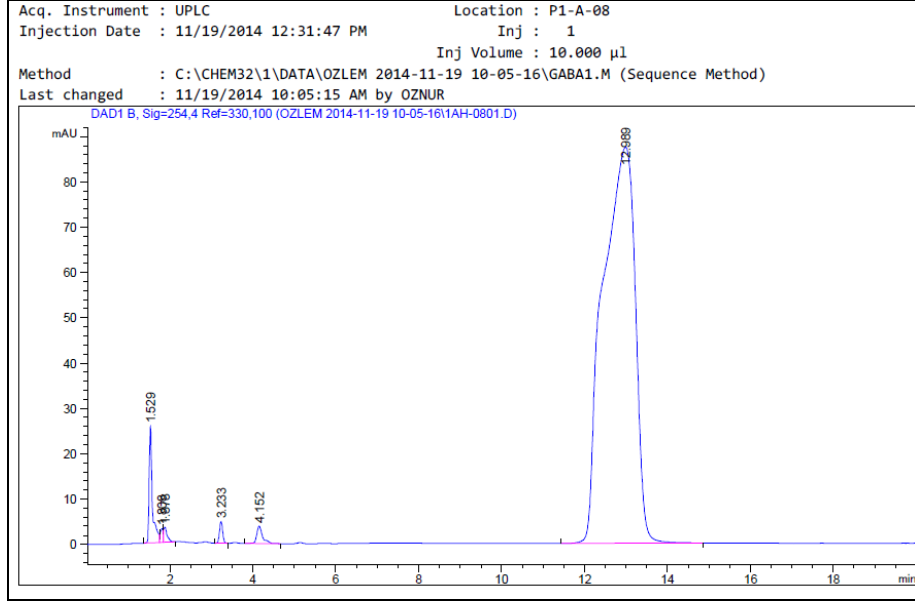
Literatürde akış hızı $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ belirtildiği için akış hızı öncelikle bu şekilde uygulandı. Fakat metotda değişikliğe gidilerek akış hızı $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ yerine 1 mL min^{-1} olarak çalışma gerçekleştirildi. 1 mL min^{-1} akış hızı ile istenilen pik yaklaşık 12. dakikada elde edildi. Bu nedenle sonraki çalışmalarda alıkonma zamanı 30 dakikadan 16 dakika olarak değiştirilip, iki analiz arası süre (postrun:5 dk) uygulandı. GABA standart analizinde özellikle en düzgün standart eğriyi elde edebilmek için çok sayıda deneme yapıldı.

Fasulye örnekleri ile çalışma gerçekleştirildiğinde ise pikde kuyruklanma elde edildi (Şekil 3.3). Bununla birlikte farklı bitkilerle de denemeler yapıldı fakat benzer şekilde kuyruklanma tespit edildi.



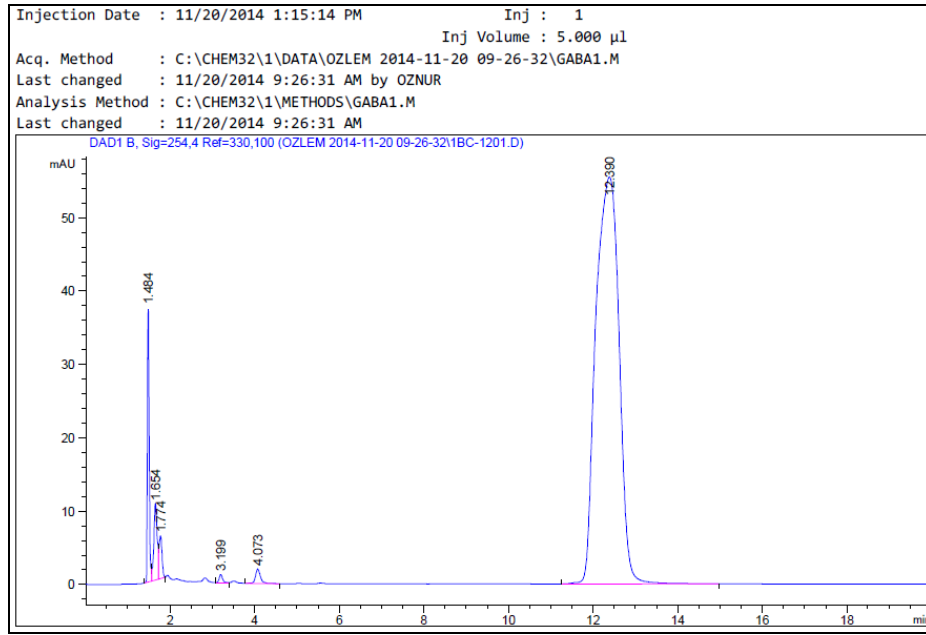
Şekil 3.3: *Phaseolus vulgaris* L. cv.Akman 98 bitkisinin yapraklarındaki GABA analizi (Kontrol grubu,enjeksiyon hacmi 20 uL, akış hızı 1 mL min⁻¹).

Pikde kuyruklanma analiz sonuçlarında hataya neden olan istenilmeyen bir durum olması nedeniyle, bu durumun çözümü için çalışıldı. Çözeltilerin polaritesi ile değişiklikler yapıp farklı şekilde denemeler gerçekleştirildi. Fakat kuyruklanmanın bu durumdan dolayı olmadığı enjeksiyon hacminin değiştirildiği sonraki çalışmalar neticesinde belirlendi. Literatürde enjeksiyon hacmi 20 µL olarak belirtildiği için ilk denemelerde söz konusu enjeksiyon hacmi uygulandı. Fakat enjeksiyon hacmi 10 µL yapıldığında kuyruklanmanın azaldığı tespit edildi. Akış hızı 1 mL min⁻¹ ve alıkonma zamanı 20 dakika olarak analize devam edildi. Pik benzer şekilde yaklaşık 12. dakikada elde edildi (Şekil 3.4).



Şekil 3.4: *Phaseolus vulgaris* L. cv.Akman 98 bitkisinin yapraklarındaki GABA analizi (Kontrol grubu, enjeksiyon hacmi 10 uL, akış hızı 1 mL min⁻¹).

Kuyruklanmanın az miktarda devam etmesinden dolayı sonraki çalışmalarda enjeksiyon hacmi 5 µL olarak analiz gerçekleştirildi. Söz konusu değişiklikler ile elde edilen piklerde kuyruklanma görülmedi. Analizi desteklemek için fasulye bitkisi dışında farklı bitkilerden GABA analizi yapıldı ve pikde hacim 5 µL olduğunda kuyruklanmanın görülmeyişi net bir şekilde belirlendi (Şekil 3.5). Tüm örnekler bu şekilde analiz edildi. Örneklerdeki GABA miktarları GABA standartları ile karşılaştırılarak hesaplandı.



Şekil 3.5: *Phaseolus vulgaris* L. cv. Akman 98 bitkisinin yapraklarındaki GABA analizi (Kontrol grubu, enjeksiyon hacmi 5 uL, akış hızı 1 mL min⁻¹).

3.6 Malondialdehit Analizi

Lipid peroksidasyonunun belirteci olan malondialdehit (MDA) analizi için 0,2 g yaprak örneği sıvı azotta homojenize edildikten sonra üzerine 5 mL % 0,1(w/v) trikloroasetik asit solüsyonu (TCA) eklenip 12 000 g'de 10 dakika santrifüjlendi. 1 mL supernatan % 20 (w/v) TCA içeren % 0,5 (w/v) tiobarbitirik asit (TBA) solüsyonu ile reaksiyona sokularak karışım 96°C'de 30 dakika inkübe edildikten sonra 12 000 g'de 10 dakika santrifüjlenerek, 532 ve 600 nm'de spektrofotometrede UV dedektör ile ölçüm yapıldı. MDA içeriği 155 (mmol/L) tükenme katsayısı kullanılarak hesaplandı (Carmak ve Horst, 1991; Zhang vd., 2013).

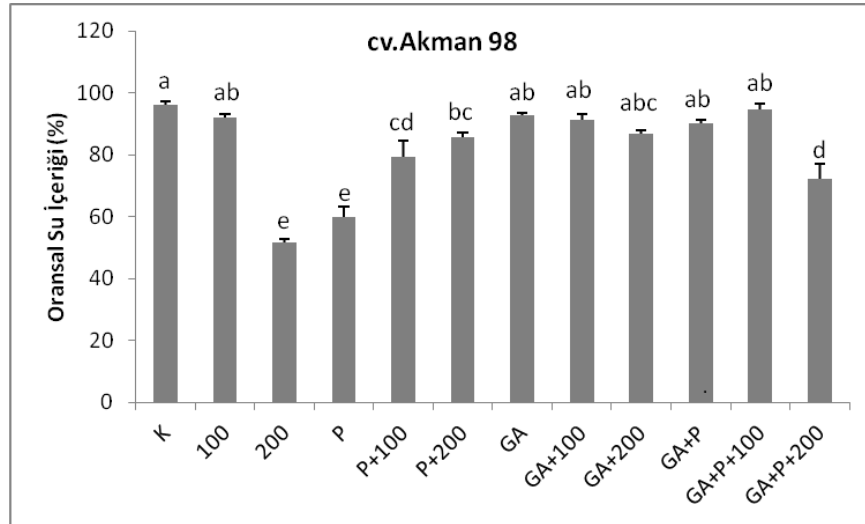
3.7 İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz SPSS12 kullanılarak yapıldı. Her bir analiz için 3 tekrar kullanıldı. Stres koşullarına maruz bırakılan bitkiler ve kontrol bitkiler arasındaki farklılıklar LSD testi yapılarak tek yönlü varyans analizi ANOVA ile gerçekleştirildi.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Oransal Su İçeriği

Stres koşulları ve GA uygulamalarında *Phaseolus vulgaris* L.cv.Akman 98 bitkisinin yapraklarındaki oransal su içeriği (OSİ) miktarında meydana gelen değişimler Şekil 4.1’de verilmiştir. Oransal su içeriği, en yüksek olarak kontrol grubunda gözlemlendi. Tuzluluk, özellikle 200 mM NaCl ve kuraklık uygulamalarının oransal su içeriğini kontrol grubuna göre belirgin bir şekilde azalttığı belirlendi ($p<0,05$). Tuzluluk ve kuraklığın bir arada olduğu çoklu stres koşulunda da oransal su içeriğinin kontrol grubuna göre azaldığı gözlemlendi. Giberellik asit uygulamasının ise oransal su içeriğini diğer stres uygulamalarına göre artırdığı ve çoklu stres koşulunda da giberellik asitin oransal su içeriğinde olumlu etki yaptığı belirlendi ($p<0,05$). Kontrol grubu ile özellikle 200 mM NaCl, PEG, PEG+100 mM NaCl, PEG+200 mM NaCl ve GA+PEG+200 mM NaCl uygulamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu belirlendi ($p<0,05$).



Şekil 4.1: *Phaseolus vulgaris* L.cv.Akman 98 bitkisinin yapraklarındaki oransal su içeriği (OSİ) (K:Kontrol; 100:100 mM NaCl; 200:200 mM NaCl; P:PEG; P+100:PEG+100 mM NaCl; P+200:PEG+200 mM NaCl; GA:Giberellik asit; GA+100:Giberellik asit+100 mM NaCl; GA+200:Giberellik asit+200 mM NaCl; GA+P:Giberellik asit+PEG; GA+P+100:Giberellik asit+PEG+100 mM NaCl; GA+P+200:Giberellik asit+PEG+200 mM NaCl).

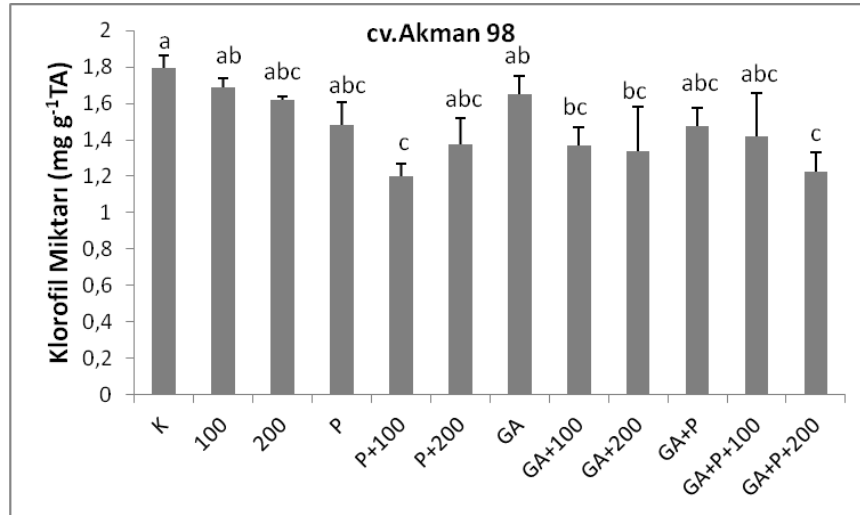
Tuzluluk ve kuraklık, dünyada tarımsal verimliliği sınırlayan önemli abiyotik streslerdir (Bray, 1993; Chitteti ve Peng, 2007). Tuz stresi; iyon toksisitesi, besin eksikliği, büyüme inhibisyonu, verim azalması ve hatta bitki ölümlerine neden olmaktadır (Wen vd., 2009). Kuraklık koşullarında, toprak ve bitkinin su potansiyeli azalır ve daha ileri safhalarda stomalarda kapanma, turgor basıncında azalma, yaprak gelişiminde inhibisyon ve fotosentez oranında azalma meydana gelmektedir (Monti vd., 1986). Bununla birlikte, GA₃'nın tuz stresinde tuz düzenleyici metabolitlerin oluşturulmasıyla yararlı bir etki gösterdiği rapor edilmiştir (Wen vd., 2009).

Oransal su içeriği (OSİ), bitki büyümesi için oldukça önem taşımaktadır. Tuz stresi uygulanan *Oryza sativa* (Tuna vd., 2008; Mostofa vd., 2014), *Nicotiana sylvestris* (Akçay vd., 2012) bitkilerinde OSİ miktarının azaldığı, kuraklık stresi uygulanan domates genotiplerinde ise OSİ miktarının kuraklığa dayanıklı *Lycopersicon peruvianum* bitkisinde değişmezken, *L.esculentum* bitkisinde azaldığı rapor edilmiştir (Ünyayar vd., 2005). *P. vulgaris* bitkisi ile yapılan bir çalışmada ise benzer şekilde PEG uygulaması ile zamana bağlı olarak OSİ miktarında azalma olduğu, bununla birlikte kuraklığa dayanıklı *P. acutifolius* bitkisinde PEG uygulaması ile OSİ miktarında önemli bir değişiklik olmadığı bildirilmiştir (Türkan vd., 2005).

Önceki yapılan çalışmalara paralel olarak bu çalışmada, *P. vulgaris* cv.Akman 98 bitkisinin yapraklarında 200 mM NaCl, PEG, tuz+PEG ve GA+PEG+200 mM NaCl uygulamalarında OSİ miktarı kontrol grubuna göre belirgin şekilde azalmıştır. Bununla birlikte GA uygulamasının stres koşullarında, GA+PEG+200 mM NaCl uygulaması dışında, OSİ miktarına olumlu etki gösterdiği, fakat kontrol grubuna yakın değerler gözlenmiştir. Bu nedenle tuz ve PEG stres uygulamalarında, GA'nın OSİ miktarı üzerine olumlu etkisinin olduğu söylenebilir. Çalışmamıza paralel olarak Tuna vd. (2008), yapraktan uygulanan GA₃'nın tuzluluğun olumsuz etkilerini azalttığını rapor etmiştir.

4.2 Toplam Klorofil Miktarı

Stres koşulları ve GA uygulamalarında *P. vulgaris* L.cv.Akman 98 bitkisinin yapraklarındaki toplam klorofil miktarı Şekil 4.2’de verilmiştir. *P. vulgaris* cv.Akman 98 bitkisinin yapraklarındaki en yüksek toplam klorofil miktarı, kontrol grubunda belirlendi. Tuzluluk, kuraklık ve çoklu stres uygulamalarının toplam klorofil miktarını kontrol grubuna göre belirgin şekilde azalttığı gözlemlendi. Giberellik asit uygulamasında ise klorofil miktarı, istatistiksel olarak kontrol grubuna yakın olarak belirlendi. Bununla birlikte, çoklu stres koşulunda (PEG+100 mM NaCl) giberellik asitin klorofil miktarı üzerine olumlu etkisi olduğu, fakat tuz konsantrasyonu yüksek olduğunda (PEG+200 mM NaCl) klorofil miktarında belirgin bir azalmanın olduğu gözlemlendi. Uygulama grupları arasında ve kontrol grubu ile özellikle PEG+100 mM NaCl ve GA+PEG+200 mM NaCl uygulamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farkın olduğu belirlendi ($p<0,05$).



Şekil 4.2: *Phaseolus vulgaris* L.cv.Akman 98 bitkisinin yapraklarındaki toplam klorofil miktarı (K:Kontrol; 100:100 mM NaCl; 200:200 mM NaCl; P:PEG; P+100:PEG+100 mM NaCl; P+200:PEG+200 mM NaCl; GA:Giberellik asit; GA+100:Giberellik asit+100 mM NaCl; GA+200:Giberellik asit+200 mM NaCl; GA+P:Giberellik asit+PEG; GA+P+100:Giberellik asit+PEG+100 mM NaCl; GA+P+200:Giberellik asit+PEG+200 mM NaCl).

Tuz stresinin olumsuz etkilerinden biri de fotosentezin sınırlanmasıdır. Tuz stresini uygulanan *P. vulgaris* (Saeidi-Sar vd., 2013), *Oryza sativa* (Mostofa vd., 2014), *Gossypium hirsutum* (Zhang vd., 2014), *Solanum tuberosum* (Gao vd., 2015), *Triticum aestivum* bitkilerinde toplam klorofil miktarının tuz konsantrasyonuna bağlı

olarak azaldığı (Al-Quraan vd., 2013) bildirilmiştir. Kuraklık stresi uygulanan *L.esculentum* bitkisinde ise toplam klorofil içeriği azalırken, kuraklığa dayanıklı *L.peruvianum* bitkisinde belirgin değişiklik olmadığı vurgulanmıştır (Ünyayar vd., 2005). Kuraklık stresi uygulanan farklı fasulye genotiplerinde ise toplam klorofil içeriğinin önemli ölçüde azaldığı belirtilmiştir (Terzi vd., 2010). Önceki yapılan çalışmalara paralel olarak bu çalışmada bitki büyüme ve gelişimi için önem taşıyan toplam klorofil içeriğinin, tuz ve PEG uygulamalarında azaldığı, bu azalmanın özellikle PEG+100 mM NaCl uygulamasında belirgin olduğu gözlenmiştir.

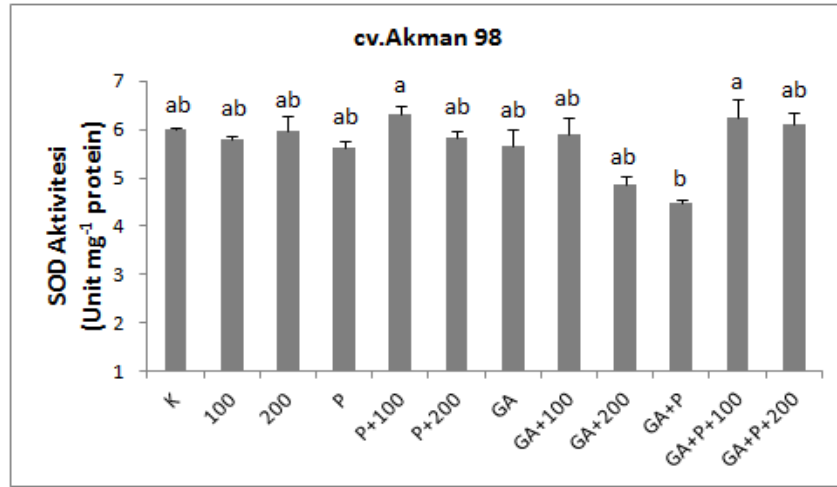
Zea mays bitkisi ile yapılan bir çalışmada, benzer şekilde tuz stresi ile klorofil miktarında azalmanın olduğu, bununla birlikte GA uygulamasının klorofil miktarında olumlu etkiye neden olduğu bildirilmiştir (Tuna vd., 2008). Çalışmamızda, tuz ve PEG ile GA uygulamasının toplam klorofil miktarında belirgin değişikliğe neden olmadığı belirlendi. Cipollini vd., (1997) ise GA₃ uygulamasının bitki büyümesi açısından olumlu etkilerinin olduğunu vurgulamıştır, fakat çalışmamızda *P. vulgaris* cv.Akman 98 bitkisinde, tuz ve kuraklık stres koşullarında GA'nın toplam klorofil içeriği üzerine kontrol grubuna göre belirgin değişikliğe neden olmadığı, ayrıca GA+100 mM NaCl, GA+200 mM NaCl ve GA+P+200 mM NaCl uygulamalarında toplam klorofil içeriğinin belirgin şekilde azaldığı gözlemlendi. Bu durumun çoklu stres uygulamasından kaynaklanabileceği söylenebilir. Çalışmamıza paralel olarak, tuz stresinde *Brassica juncea* bitkisinde GA uygulamasının klorofil içeriğini azalttığı bildirilmiştir (Shah, 2007).

4.3 Antioksidan Enzim Aktivitesi

4.3.1 SOD aktivitesi

Stres koşulları ve GA uygulamalarında *P. vulgaris* L.cv.Akman 98 bitkisinin yapraklarındaki SOD aktivitesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.3'de verilmiştir. SOD aktivitesinin PEG+100 mM NaCl ve GA+PEG+100 mM NaCl uygulanan gruplarda, kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu belirlendi. En düşük SOD aktivitesi, GA+PEG uygulanan bitkilerde gözlemlendi. Tuz ve kuraklık uygulamalarının SOD aktivitesi ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak belirgin farklılık olmadığı, giberellik asit uygulamasının da benzer şekilde olduğu belirlendi. Bununla birlikte GA+200mM NaCl ve giberellik asit ve kuraklık uygulamasının SOD aktivitesini kontrol grubuna göre belirgin şekilde azalttığı gözlemlendi (p<0,05).

Uygulama grupları arasında (PEG+100 mM NaCl, GA+PEG ve GA+PEG+100 mM NaCl) istatistiksel olarak anlamlı farklılık belirlendi ($p<0,05$).



Şekil 4.3: *Phaseolus vulgaris* L.cv.Akman 98 bitkisinin yapraklarındaki SOD aktivitesi (K:Kontrol; 100:100 mM NaCl; 200:200 mM NaCl; P:PEG; P+100:PEG+100 mM NaCl; P+200:PEG+200 mM NaCl; GA: Giberellik asit; GA+100:Giberellik asit+100 mM NaCl;GA+200: Giberellik asit+200 mM NaCl; GA+P:Giberellik asit+PEG; GA+P+100:Giberellik asit+PEG+100 mM NaCl; GA+P+200:Giberellik asit+PEG+200 mM NaCl).

Bitkiler yaşamları boyunca biyotik ve abiyotik stres faktörleri ile karşılaştıklarında hücrel savunma sistemi ile strese yanıt vermektedir (Gill vd., 2010; Gill ve Tuteja, 2014). Stres koşullarında bitki metabolizmasına önemli zararlar veren ROT üretilmektedir. SOD, APX, KAT ve GR, antioksidan savunma mekanizmasında görev alan, ROT süpürücü enzimlerdir. SOD, hücrelerde hasara neden olan süperoksit radikalini hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşüm reaksiyonunu katalizler. Oluşan hidrojen peroksit, eğer süpürülmez ise hücrelerde çeşitli hasarlara neden olur. APX ve KAT ise hidrojen peroksidi oksijen ve suya dönüştürür (Scandalios, 1993; Shalata vd., 2001, Shigeoka vd., 2002).

Terzi vd., (2010), farklı fasulye çeşitlerinin reaktif oksijen türlerini temizlemek için farklı antioksidan enzim aktivitesine sahip olduklarını rapor etmiştir. Wang vd., (2009) da benzer şekilde tuzluluk ve kuraklık koşullarında yonca bitkisinin canlılığını koruması için antioksidan enzimlerin önemini vurgulamıştır. Türkan vd., (2005) kuraklığa dayanıklı *P. acutifolius* bitkisinin, kuraklığa hassas olan *P. vulgaris* bitkisine göre yüksek antioksidan enzim aktivitesi ile oksidatif hasara karşı daha iyi

koruma mekanizmasına sahip olduğunu belirtmiştir. Böylelikle stres sonucu oluşabilecek reaktif oksijen türlerinin temizlenebilmesi sağlanabilmektedir.

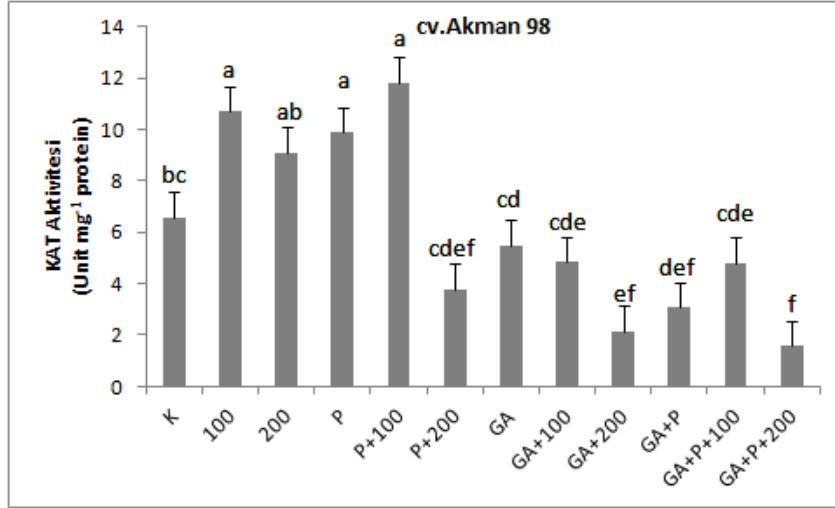
Önceki yapılan çalışmalarda, tuz stresi uygulanan *Gossypium hirsutum* (Zhang vd.2014), *Oryza sativa* (Mostofa vd., 2014), *Solanum tuberosum* (Gao vd., 2015) ve *Phaseolus vulgaris* (Talaat, 2015) bitkilerinde SOD aktivitesinde artış olduğu bildirilmiştir. Farklı fasulye genotipleriyle yapılan başka bir çalışmada ise *P. vulgaris* bitkisinde tuza toleranslı genotipin daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu, bu şekilde tuz stresinden daha az etkilendiği ve SOD aktivitesinin tuz toleransı ile kuvvetli bir şekilde ilişkili olduğu vurgulanmıştır (Jebara vd., 2005). Jebara vd., (2005) da benzer şekilde tuz stresi altında yüksek SOD enzim aktivitesi ile stresin olumsuz etkilerinden koruma sağlanabildiğini vurgulamıştır. Farklı bitki organları ile yapılan bir çalışmada ise SOD aktivitesinin nodüllere göre köklerde daha yüksek olduğu, bununla birlikte nodül SOD aktivitesinin tuz stresi ile arttığı, kök SOD aktivitesinin ise azaldığı belirtilmiştir (Jebara vd., 2005). Çalışmamızda ise *P. vulgaris* cv.Akman 98 bitkisinde tuz stresinde SOD aktivitesi kontrol grubuna göre belirgin değişiklik göstermemiştir.

PEG uygulanan *Cucumis sativus* (Liu vd., 2009) ve *Brassica napus* (Mirzaee vd., 2013) bitkilerinde kuraklık stresi sonucunda SOD aktivitesinin arttığı bildirilmiştir. Kuraklık stresi uygulanan *L.esculentum* ve *L. peruvianum* bitkilerinde kontrol grubuna kıyasla SOD aktivitesinin arttığı belirtilmiştir (Ünyayar vd., 2005). Kuraklığa dayanıklı *P. acutifolius* bitkisinde ise PEG uygulaması ile SOD aktivitesinin uygulamanın 7. ve 14. gününde arttığı, fakat *P. vulgaris* bitkisinde SOD aktivitesinin 7. günde arttığı, 14. günde azaldığı bildirilmiştir (Türkan vd., 2005). *Sesamum indicum* bitkisi ile yapılan bir çalışmada da SOD aktivitesinin 7. günde artarken, 21. günde azaldığı rapor edilmiştir (Koca vd., 2007). Kuraklık stresinin bazı *P.vulgaris* genotiplerinde ise SOD aktivitesinde artışa neden olduğu, bununla birlikte bazı genotiplerde SOD aktivitesinde önemli bir değişiklik gözlenmediği belirtilmiştir (Terzi vd., 2010). Çalışmamızda ise PEG uygulamasının SOD aktivitesinde kontrol grubuna göre belirgin değişikliğe neden olmadığı gözlenmiştir. Bu nedenle çalışmamızda *P.vulgaris* L.cv.Akman 98 bitkisinde tuzluluk ve kuraklık stres koşulları altında, SOD aktivitesi bakımından etkili olmadığı söylenebilir.

Tuz ve PEG uygulanan *Medicago sativa* bitkisinde (Wang vd., 2009) ve balkabağı genotiplerinde (Kusvuran vd., 2013) SOD aktivitesinde artış olduğu bildirilmiştir. Mısır bitkisinde ise tuz stresinin SOD aktivitesinde belirgin bir artışa neden olduğu, giberellik asit ve tuz uygulamasının ise SOD aktivitesinde kontrol grubuna göre belirgin değişikliğe neden olmadığı vurgulanmıştır (Tuna vd., 2008). Çalışmamızda ise özellikle GA+PEG uygulamasında SOD aktivitesinin kontrol grubuna göre azaldığı gözlenmiştir. Tıbbi bitkiler ile yapılan bir çalışmada, GA uygulamasının kök ve yaprakta SOD, APX, KAT aktivitelerini artırdığı ve GA'nın antioksidan potansiyeli ve alkaloid üretimi için faydalı olabileceği vurgulanmıştır (Jaleel vd., 2007). Çalışmamızda ise PEG+100 mM NaCl ve GA+PEG+100 mM NaCl uygulanan grupta SOD aktivitesinde kontrol grubuna göre artış belirlenmiştir. Bu artışın tuz stresinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

4.3.2 KAT aktivitesi

Stres koşulları ve GA uygulamalarında *P. vulgaris* L.cv.Akman 98 bitkisinin yapraklarındaki KAT aktivitesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.4'de verilmiştir. Tuz ve kuraklık uygulamalarının KAT aktivitesinde kontrol grubuna göre artışa neden olduğu gözlemlendi. Çoklu stres uygulamalarında ise PEG+100 mM NaCl uygulamasının KAT aktivitesini kontrol grubuna göre artırdığı gözlenirken, tuz konsantrasyonu arttığında PEG+200 mM NaCl uygulamasında KAT aktivitesinde azalma belirlendi. Giberellik asit uygulamalarında ise KAT aktivitesinin kontrol grubuna göre azaldığı özellikle bu azalmanın GA+PEG+200 mM NaCl uygulamasında daha belirgin olduğu gözlemlendi. Kontrol grubu ile tuz, kuraklık ve giberellik asit ile uygulanan tuz ve kuraklık uygulamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu belirlendi ($p<0,05$).



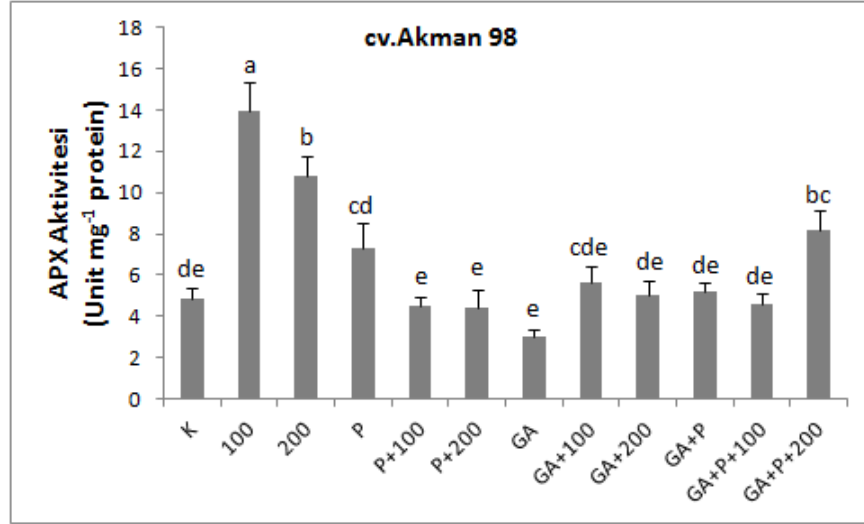
Şekil 4.4: *Phaseolus vulgaris* L.cv.Akman 98 bitkisinin yapraklarındaki KAT aktivitesi (K:Kontrol; 100:100 mM NaCl; 200:200 mM NaCl; P:PEG; P+100:PEG+100 mM NaCl; P+200:PEG+200 mM NaCl; GA:Giberellik asit; GA+100:Giberellik asit+100 mM NaCl; GA+200:Giberellik asit+200 mM NaCl; GA+P:Giberellik asit+PEG; GA+P+100:Giberellik asit+PEG+100 mM NaCl; GA+P+200:Giberellik asit+PEG+200 mM NaCl).

Tuz uygulaması ile *Phaseolus vulgaris*, *Medicago sativa* (Tejera García vd., 2007), *P. vulgaris* (Tejera García vd., 2007), *Oryza sativa* (Mostofa vd.,2014) ve *Gossypium hirsutum* (Zhang vd., 2014) bitkilerinde yapraktaki KAT aktivitesinin inhibe olduğu belirtilmiştir. Bununla birlikte tuz stresi uygulanan *P. vulgaris* (Talaat, 2015), *Solanum tuberosum* (Gao vd., 2015) bitkilerinde KAT aktivitesinin belirgin bir şekilde arttığı vurgulanmaktadır. *Medicago sativa* bitkisinde ise tuz stresi ile sürgünde KAT aktivitesinde belirgin artış olduğu, fakat bununla birlikte kökte önemli değişikliğin olmadığı vurgulanmıştır (Wang vd., 2009). Kuraklık stresinde *Phaseolus* genotiplerinde (Terzi vd., 2010), *Cucumis sativus* (Liu vd., 2009) ve *Brassica napus* (Mirzaee vd., 2013), *Lycopersicon esculentum* ve *L. notabilis* (Ünyayar ve Çekiç, 2005) bitkilerinde KAT aktivitesinde artış gözlemlendiği belirtilmiştir. Kuraklık stresi uygulanan domates bitkisinde ise KAT aktivitesinin *L.esculentum* bitkisinde azalırken, kuraklık stresine dayanıklı *L. peruvianum* bitkisinde arttığı bildirilmiştir (Ünyayar vd., 2005). *P. acutifolius* ve *P. vulgaris* bitkilerinde ise PEG uygulaması ile KAT aktivitesinin kontrol grubuna göre belirgin değişiklik göstermediği, bununla birlikte tuza toleranslı olan türde KAT aktivitesinin *P.vulgaris*'e göre daha yüksek olduğu rapor edilmiştir (Türkan vd., 2005). Tuz ve kuraklık stresinde ise balkabağı genotiplerinde KAT aktivitesinin arttığı belirtilmiştir (Kusvuran vd., 2013).

Çalışmamızda tuz, PEG, PEG+100 mM NaCl uygulamalarında KAT aktivitesinde kontrol grubuna göre belirgin artış gözlemlendi. Bununla birlikte 100 mM NaCl uygulamasında KAT aktivitesinin 200 mM NaCl uygulamasına göre daha yüksek olduğu belirlendi. GA uygulamalarında ise KAT aktivitesinde kontrol grubuna göre belirgin azalma olduğu gözlemlendi. Bu azalmanın özellikle GA+ 200 mM NaCl ve GA+PEG+200 mM NaCl uygulamalarında belirgin olduğu belirlendi. Bu durumun tuzun yüksek konsantrasyonundan kaynaklanabileceği söylenebilir. Ayrıca, GA ve stres arasında bir ilişki olduğu ve GA miktarının stres korumasında önemli rol oynadığı bilinmektedir (Vettakkorumakankav vd., 1999). Fakat çalışmamızda GA'nın KAT aktivitesini söz konusu stres koşullarında indüklediği gözlemlendi.

4.3.3 APX aktivitesi

Stres koşulları ve GA uygulamalarında *P. vulgaris* L. cv.Akman 98 bitkisinin yapraklarındaki APX aktivitesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.5'de verilmiştir. Tuz ve PEG uygulamalarının APX aktivitesini kontrol grubuna göre belirgin şekilde artırdığı belirlendi. Çoklu stres olarak NaCl ve PEG bir arada uygulandığında APX aktivitesinin kontrol grubuna göre azaldığı fakat yakın değerlerde olduğu gözlemlendi. Giberellik asit uygulamasında ise APX aktivitesinin kontrol grubuna göre azaldığı belirlendi. GA ile birlikte tuz ve kuraklık uygulandığında genel olarak APX aktivitesinin kontrol grubuna yakın değerlerde olduğu, bununla birlikte GA+PEG+200 mM NaCl uygulamasında APX aktivitesinin kontrol grubuna göre arttığı gözlemlendi. Gruplar arasında ve kontrol grubu ile 100 mM NaCl, 200 mM NaCl, PEG ve GA+PEG+200 mM NaCl uygulamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu belirlendi ($p<0,05$).



Şekil 4.5: *Phaseolus vulgaris* L.cv.Akman 98 bitkisinin yapraklarındaki APX aktivitesi (K:Kontrol; 100:100 mM NaCl; 200:200 mM NaCl; P:PEG; P+100:PEG+100 mM NaCl; P+200:PEG+200 mM NaCl; GA:Giberellik asit; GA+100:Giberellik asit+100 mM NaCl; GA+200:Giberellik asit+200 mM NaCl; GA+P:Giberellik asit+PEG; GA+P+100:Giberellik asit+PEG+100 mM NaCl; GA+P+200:Giberellik asit+PEG+200 mM NaCl).

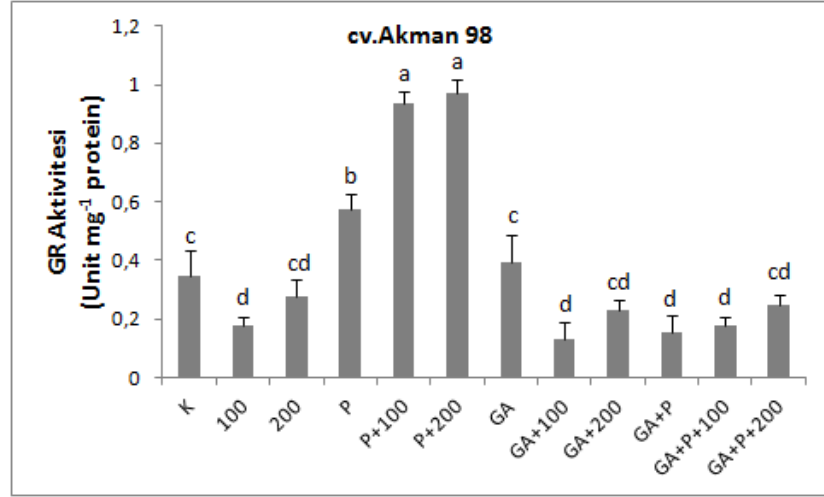
Tuz stresi ile *Sesamum indicum* (Koca vd., 2007) bitkisinde APX aktivitesinin arttığı, *Gossypium hirsutum* bitkisinin yapraklarında ise azaldığı bildirilmiştir (Zhang vd., 2014). Bununla birlikte tuz uygulamasıyla nodüler APX aktivitesinin de önemli ölçüde inhibe olduğu belirtilmiştir (Jebara vd., 2005). Kuraklık stresi uygulanan *L.esculentum* ve *L. peruvianum* bitkilerinde ise APX aktivitesinin kontrol grubuna kıyasla azaldığı bildirilmiştir (Ünyayar vd., 2005). *Medicago sativa* bitkisinin farklı genotiplerinde ise 200 mM NaCl ve PEG uygulamalarının sürgün ve köklerinde APX aktivitesini arttırdığı rapor edilmiştir (Wang vd., 2009).

PEG uygulanan *Cucumis sativus* (Liu vd., 2009), *Brassica napus* (Kanola) (Mirzaee vd., 2013) bitkilerinde APX aktivitesinde belirgin artışa neden olduğu bildirilmiştir. Türkan vd., (2005), *P.vulgaris* bitkisinde PEG uygulaması ile APX aktivitesinin kontrol grubuna göre azaldığı, fakat kuraklığa toleranslı *P. acutifolius* bitkisinde stresin 14. gününde APX aktivitesinin arttığını bildirmiştir. Farklı *P.vulgaris* genotipleri ile yapılan başka bir çalışmada ise kuraklık stresi ile APX aktivitesinde artış olduğu vurgulanmıştır (Terzi vd., 2010). Tuz ve kuraklık stres uygulamasının balkabağı genotiplerinde APX aktivitesini artırdığı vurgulanmaktadır (Kusvuran vd., 2013). APX özellikle olumsuz çevresel koşullarına karşı hücre koruma mekanizmasında görev almaktadır (Caverzan vd., 2012). Bu nedenle APX

aktivitesindeki değişiklikler oldukça önemlidir. Çalışmamızda özellikle 100 mM NaCl, 200 mM NaCl ve PEG uygulamalarında APX aktivitesinde kontrol grubuna göre belirgin bir artış gözlemlendi. Bununla birlikte GA uygulamasında, APX aktivitesinde kontrol grubuna göre belirgin değişiklik olmadığı belirlendi. Ancak GA+PEG+200 mM NaCl uygulamasında APX aktivitesinin arttığı gözlemlendi. Bu durumda GA'nın *P.vulgaris* cv.Akman 98 genotipinde APX aktivitesini özellikle tekli stres koşullarında artırmadığı ve dolayısıyla H₂O₂ detoksifikasyonunda önemli ölçüde etkili olmadığı söylenebilir.

4.3.4 GR aktivitesi

Stres koşulları ve GA uygulamalarında *P. vulgaris* L.cv.Akman 98 bitkisinin yapraklarındaki GR aktivitesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.6'da verilmiştir. GR aktivitesinin tuzluluk koşullarında kontrol grubuna göre azaldığı, bununla birlikte PEG ve PEG+100 mM NaCl, PEG+200 mM NaCl uygulamalarının GR aktivitesini kontrol grubuna göre belirgin şekilde artırdığı gözlemlendi. GA uygulamasında ise GR aktivitesinin kontrol grubuna yakın değerde olduğu belirlendi. Ayrıca GA ile birlikte uygulanan tuzluluk ve kuraklık uygulamalarında ise GR aktivitesinin kontrol grubuna göre azaldığı gözlemlendi. Uygulama grupları arasında istatistiksel olarak belirgin farklılık olduğu ve kontrol grubu ile özellikle PEG, PEG+100 mM NaCl ve PEG+200 mM NaCl uygulamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu belirlendi (p<0,05).



Şekil 4.6: *Phaseolus vulgaris* L.cv.Akman 98 bitkisinin yapraklarındaki GR aktivitesi (K:Kontrol; 100:100 mM NaCl; 200:200 mM NaCl; P:PEG; P+100:PEG+100 mM NaCl; P+200:PEG+200 mM NaCl; GA:Giberellik asit; GA+100:Giberellik asit+100 mM NaCl; GA+200:Giberellik asit+200 mM NaCl; GA+P:Giberellik asit+PEG; GA+P+100:Giberellik asit+PEG+100 mM NaCl; GA+P+200:Giberellik asit+PEG+200 mM NaCl).

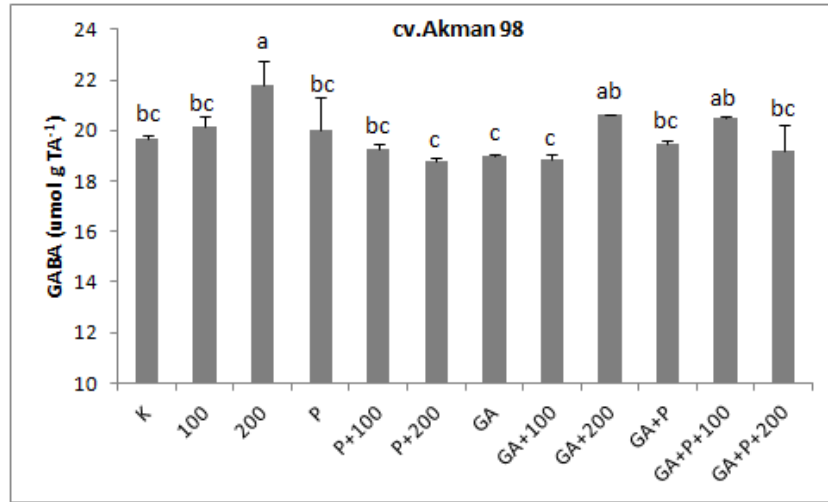
Tuz stresi uygulanan *Gossypium hirsutum* bitkisinin farklı genotiplerinde (Zhang vd., 2014) ve *Phaseolus vulgaris* (Talaat, 2015) bitkisinde GR aktivitesinde artışın olduğu belirtilmiştir. Kuraklık stresi ile *Lycopersicon esculentum* ve *L. notabilis* (Ünyayar ve Çekiç, 2005), *Cucumis sativus* (Liu vd., 2009) bitkilerinde GR aktivitesinin kontrol grubuna göre arttığı bildirilmiştir. PEG uygulanan *P. acutifolius* ve *P. vulgaris* bitkilerinde GR aktivitesinin, 7. gününde belirgin artış gösterdiği, fakat 7.güne kıyasla, 14. günde daha düşük GR aktivitesinin olduğu belirtilmiştir (Türkan vd., 2005). Kuraklık stresi uygulanan domates genotipleri ile yapılan bir çalışmada ise GR aktivitesinin kuraklık stresine dayanıklı *L. peruvianum* bitkisinde arttığı, *L.esculentum* bitkisinde ise azaldığı bildirilmiştir (Ünyayar vd., 2005). Bununla birlikte tuz ve kuraklık stres uygulamasının balkabağı genotiplerinde GR aktivitesinin arttığı belirtilmiştir (Kusvuran vd., 2013).

Çalışmamızda ise, tuz uygulamalarında GR aktivitesinde kontrol grubuna göre azalma gözlenirken, PEG ve PEG+NaCl uygulamalarında GR aktivitesinde kontrol grubuna göre belirgin artış gözlemlendi. GA uygulamalarının ise GR aktivitesini kontrol grubuna göre azalttığı, özellikle bu azalmanın GA+100 mM NaCl, GA+PEG ve GA+PEG+100 mM NaCl uygulamalarında belirgin olduğu gözlemlendi. Bu durumda GA'nın tuz, PEG, tuz+PEG stres koşullarında *P. vulgaris* cv.Akman 98 genotipinde

GR aktivitesini kontrol grubuna göre artırmadığı görülmektedir. Önceki yapılan bir çalışmaya göre, GA₃ uygulamasının antioksidan sistemini uyararak tuz ve kuraklık streslerinin olumsuz etkilerini indirdiği vurgulanmıştır (Tuna vd., 2008). Bununla birlikte çalışmamızda *P. vulgaris* cv.Akman 98 bitkisinde GA'nın tuz ve kuraklık stres koşullarında GR aktivitesini indüklediği gözlemlendi.

4.4 GABA Miktarı

Tuz ve kuraklık streslerinin GABA miktarını artırdığı, özellikle 200 mM NaCl uygulamasında bu artışın belirgin düzeyde olduğu gözlemlendi (Şekil 4.7). Çoklu stres koşulunda ise GABA miktarının azaldığı fakat bu değerlerin kontrol grubuna yakın değerler olduğu belirlendi. Giberellik asit uygulamasında çoklu stres koşulunda olduğu gibi benzer sonuçlar elde edildi. Bununla birlikte, GA+200 mM NaCl, GA+PEG+100 mM NaCl uygulamalarında GABA miktarının kontrol grubuna göre arttığı gözlemlendi. Uygulama grupları arasında ve kontrol grubu ile 200 mM NaCl, GA+200 mM NaCl, GA+PEG+100 mM NaCl uygulamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu belirlendi ($p < 0,05$).



Şekil 4.7: *Phaseolus vulgaris* L. cv.Akman 98 bitkisinin yapraklarındaki GABA miktarı (K:Kontrol; 100:100 mM NaCl; 200:200 mM NaCl; P:PEG; P+100:PEG+100 mM NaCl; P+200:PEG+200 mM NaCl; GA:Giberellik asit; GA+100:Giberellik asit+100 mM NaCl; GA+200:Giberellik asit+200 mM NaCl; GA+P:Giberellik asit+PEG; GA+P+100:Giberellik asit+PEG+100 mM NaCl; GA+P+200:Giberellik asit+PEG+200 mM NaCl).

GABA metabolik yolu ve ROT arasında önemli bir ilişki bulunmaktadır. GABA'nın bitkilerde stres yanıtını artırdığı ve hücre savunma sisteminde anahtar role sahip olduğu vurgulanmaktadır (Kinnersly ve Lin, 2000; Fait vd., 2005; Kim vd., 2013). Michaeli vd., (2010), sitosolden mitokondriye GABA taşınımının, GABA kaynaklı solunum ve karbon metabolizması ve bitki büyümesi için önemli olduğunu vurgulamıştır. *Arabidopsis* bitkisinde GABA taşıyıcısının işlevinin bozulması ile tuz toleransının indirgendiği, ve tuz toleransında GABA katabolizmasının belirleyici olduğu, aynı zamanda bu durumun kökte tuz toleransında N ve C metabolizması ile bağlantılı olduğu vurgulanmıştır (Renault vd., 2010). Deleu vd., (2013) benzer şekilde GABA katabolizması bozulan bitkilerde kök büyüme inhibisyonunun, primer metabolizmadaki bozukluklardan dolayı olduğunu vurgulamaktadır.

Kinnersley ve Turano (2000), farklı bitkilerde çeşitli stres koşullarında, GABA'nın hızlı bir şekilde biriktirildiği; bu durumun çevresel stres ve zamana bağlı fizyolojik yanıtlar ile birlikte gerçekleştiğini belirtmiştir. *Glycine max* bitkisinde tuz (Guo vd., 2012; Queiroz vd., 2012) ve tuz, CaCl_2 , tuz+ CaCl_2 (Yin vd., 2014), *Triticum aestivum* bitkisinde ise tuz, mannitol ve sorbitol (Al-Quraan vd., 2013) uygulamalarında GAD aktivitesi ve GABA içeriğinin arttığı bildirilmiştir. Benzer şekilde çalışmamızda, tuz stresi ile özellikle 200 mM NaCl uygulamasında GABA miktarının arttığı gözlemlendi.

Sesamum indicum bitkisinde ise %15 PEG, 150 mM NaCl ve 50 °C sıcaklık uygulamalarının GABA miktarını kontrol grubuna göre arttırdığı bildirilmiştir (Bor vd., 2009). Kısa ve uzun süre uygulanan tuz stresinde *Nicotiana sylvestris* bitkisinde GABA birikiminin uyarıldığı ve GABA metabolizmasının özellikle uzun dönem tuzluluğa maruz kalma durumunda etkili olduğu vurgulanmıştır (Akçay vd., 2012). Al-Quraan vd., (2013) *Triticum aestivum* bitkisinde GABA metabolizmasının, tuz ve ozmotik strese adaptasyon için sinyal ve metabolik anahtar bir yol olduğunu belirtmiştir. *Nicotiana sylvestris* WT bitkisinde ise kısa ve uzun süreli tuz stresinde GAD aktivitesinin arttığı, bununla birlikte mutant bitkilerde azaldığı bildirilmiştir (Akçay vd., 2012).

Arabidopsis bitkisinde de tuz uygulaması ile GABA miktarında artış olduğu, GABA metabolizmasının NaCl'e karşı yanıt olarak düzenlendiği bildirilmiştir (Renault vd., 2010). Benzer şekilde çalışmamızda özellikle yüksek konsantrasyondaki tuz

uygulamas (200 mM NaCl) ile GABA miktarında artış olduğu belirlendi. GABA'nın bir sinyal molekül olarak, tuz stresi altında bitki gen ekspresyonunun düzenlenmesinde etkili olduğu (Shi vd., 2010), ayrıca prolin ve GABA miktarlarının bitki köklerinde artması durumunun, tuzluluğa karşı adaptasyon ile ilişkili olabileceği vurgulanmıştır (Queiroz vd., 2012).

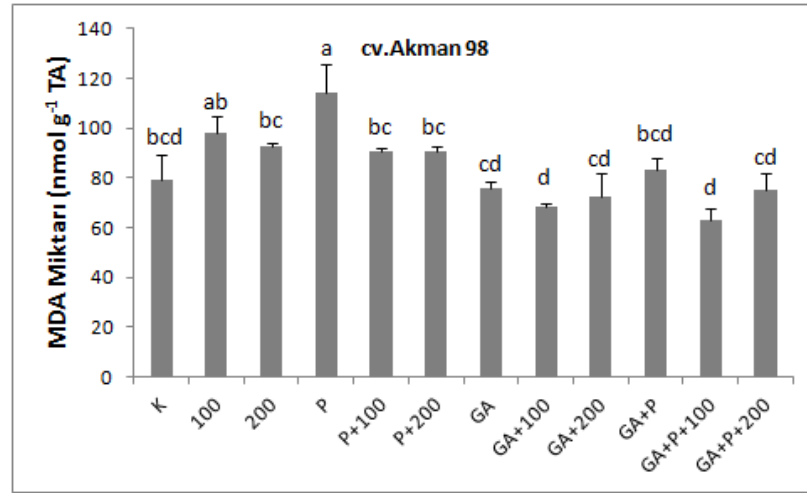
Çimlenen fasulye bitkisinde karanlık uygulaması ile GABA miktarının ışık ortamına göre daha yüksek olduğu belirtilmiştir (Liao vd., 2013). Li vd., (2010) çimlenmiş bakla bitkisinin GABA-zengini yiyecek olduğu, bununla birlikte kültür koşullarının GABA içeriği üzerine önemli etkilerinin olduğu bildirilmiştir. Çiçeklenmeden sonra meyve olgunlaşması sırasında da GAD aktivitesinin ve GABA miktarının arttığı fakat daha sonra azaldığı rapor edilmiştir (Akihiro vd., 2008). Bununla birlikte, soğuk stresi ile GAD aktivitesinin ve GABA miktarının arttığı ve bu işlemin fonksiyonel gıdalar için uygulanabilirliği vurgulanmıştır (Lee vd., 2010; Liao vd., 2013).

Sıcaklık (Kinnersly ve Lin, 2000), ağır metal (Bor vd., 2009), oksijen yetersizliği (Yang vd., 2013) gibi farklı stres koşullarında da GABA miktarında artış olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte Bor vd., (2009) ağır metal stresine maruz kalan susam bitkisinde GABA birikiminin, korumadan daha çok stres algısı ile ilgili olduğunu, ayrıca farklı abiyotik stres koşullarının büyüme üzerine olumsuz etkilerinin GABA tarafından tam olarak düzeltilemeyeceğini vurgulamıştır. Bu nedenle özellikle çoklu stres koşullarında farklı bitkilerde GABA'nın etki mekanizmalarının ayrıntılı bir şekilde araştırılması bitki savunma cevabını öğrenebilmek için oldukça önemlidir. Çalışmamızda stres koşullarında özellikle tuz konsantrasyonunun yüksek olduğu durumda GABA miktarında artış olduğu, bununla birlikte GA uygulamasının GABA miktarında kontrol grubuna göre belirgin değişikliğe neden olmadığı gözlenmiştir. Bitki hormonlarının bitki stres yanıtlarını uyardıklarından dolayı (Pedranzani vd., 2003), özellikle stres koşullarında bitki hormonları ve GABA arasındaki ilişkinin farklı bitkilerde de çalışması ile GABA metabolizmasının daha fazla aydınlatılabileceği düşünülmektedir.

4.5 Malondialdehit (MDA) Miktarı

Stres koşulları ve GA uygulamalarında *P. vulgaris* L. cv.Akman 98 bitkisinin yapraklarındaki MDA miktarında meydana gelen değişimler Şekil 4.8'de verilmiştir.

Çalışmamızda MDA miktarı en yüksek olarak PEG uygulamasında gözlemlendi. Bununla birlikte tuzluluk ve çoklu stres uygulamalarında da MDA miktarının kontrol grubundan daha yüksek olduğu belirlendi. Giberellik asit uygulanan bitkilerde ise MDA içeriğinin kontrol grubuna göre azaldığı, stres ve GA uygulamalarında da benzer şekilde kontrol bitkilerine göre daha düşük MDA içeriği gözlemlendi. Uygulama grupları arasında ve kontrol grubu ile özellikle tuz ve kuraklık uygulamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu belirlendi ($p<0,05$).



Şekil 4.8: *Phaseolus vulgaris* L. cv.Akman 98 bitkisinin yapraklarındaki MDA miktarı (K:Kontrol; 100:100 mM NaCl; 200:200 mM NaCl; P:PEG; P+100:PEG+100 mM NaCl; P+200:PEG+200 mM NaCl; GA:Giberellik asit; GA+100:Giberellik asit+100 mM NaCl; GA+200:Giberellik asit+200 mM NaCl; GA+P:Giberellik asit+PEG; GA+P+100:Giberellik asit+PEG+100 mM NaCl; GA+P+200:Giberellik asit+PEG+200 mM NaCl).

Hücre zarlarında lipid peroksidasyonunun belirteci olan malondialdehit oluşumu ile bitkilerde çevresel streslerin etkisi belirlenebilmektedir. Önceki yapılan çalışmalarda tuz stresi ile *Triticum aestivum* (Al-Quraan vd., 2013), *Oryza sativa* (Mostofa vd., 2014), *Gossypium hirsutum* (Zhang vd., 2014), *Sesamum indicum* (Koca vd., 2007) ve *Glycine max* (Yin vd., 2014), *Solanum tuberosum* (Gao vd., 2015), *Phaseolus vulgaris* (Talaat, 2015) bitkilerinde MDA miktarının arttığı bildirilmiştir. Çalışmamızda da benzer şekilde MDA miktarı, 100 mM NaCl ve PEG uygulamalarında kontrol grubuna göre belirgin düzeyde arttığı gözlemlendi.

Tuz stresine benzer şekilde kuraklık stresi altında farklı fasulye genotiplerinde (Terzi vd., 2010), *Cucumis sativus* (Liu vd., 2009), *Arachis hypogaea* (Celikkol Akcay, 2010), *Brassica napus* (Mirzaee vd.2013) bitkilerinde MDA miktarının dolayısıyla

lipid peroksidasyonunun önemli ölçüde arttığı bildirilmiştir. *P. vulgaris* bitkisinde ise PEG uygulaması ile MDA içeriği, kuraklığa toleranslı fasulye bitkisine göre kademeli bir artış gösterdiği rapor edilmiştir (Türkan vd., 2005). Tuzluluk ve kuraklık streslerinde de yonca bitkisinde benzer şekilde MDA miktarında artış olduğu bildirilmiştir (Wang vd., 2009). Tuz ve kuraklık stres uygulamasının balkabağı genotiplerinde de MDA birikimini artırdığı belirtilmiştir (Kusvuran vd., 2013).

Önceki yapılan çalışmalara paralel olarak çalışmamızda tuz, PEG, tuz+PEG uygulamalarında MDA miktarının kontrol grubuna göre arttığı, bununla birlikte PEG+NaCl uygulamalarında MDA miktarının kontrol grubuna yakın değerlerde olduğu belirlendi. GA uygulamasında ise MDA miktarının kontrol grubuna göre azaldığı, bu azalmanın özellikle GA+100 mM NaCl, GA+PEG+100 mM NaCl uygulamalarında belirgin olduğu gözlemlendi. Çalışmamızda GA uygulamasının özellikle tuz ve kuraklık stres koşullarında *P. vulgaris* cv.Akman 98 bitkisine lipid peroksidasyonu açısından olumlu etkisinin olduğu belirlendi. Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre GA'nın tuz ve kuraklık streslerinde MDA birikimini indirdiği, böylece söz konusu stres koşullarının olumsuz etkisini azaltabileceği söylenebilir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Phaseolus vulgaris cv.Akman 98 bitkisinde; tuz ve PEG çoklu stres koşulunda GA'nın OSİ üzerine olumlu etkisinin olduğu belirlendi. Tuz ve PEG stres koşullarında, GA'nın toplam klorofil içeriği üzerine kontrol grubuna göre belirgin değişikliğe neden olmadığı gözlemlendi. Bu etkinin çoklu stres uygulamasından kaynaklandığı söylenebilir.

Tuz ve PEG stres koşullarının SOD aktivitesinde belirgin değişiklik göstermediği, KAT aktivitesinin ise tuz, PEG, tuz (100 mM NaCl)+PEG stres koşullarında arttığı; bununla birlikte APX aktivitesinin tuz ve PEG stresi, GR aktivitesinin ise PEG ve çoklu stres koşullarında artış gösterdiği belirlendi. GA uygulamalarında ise SOD ve APX aktivitelerinde belirgin değişiklik olmadığı, bununla birlikte KAT ve GR aktivitelerinin kontrol grubuna göre azaldığı gözlemlendi. MDA miktarının tuz ve kuraklık stres koşullarında arttığı, fakat GA'nın MDA birikimini azalttığı, böylece stres koşullarının olumsuz etkisini azaltılabileceği söylenebilir.

Çalışmamızda stres koşullarında özellikle tuz konsantrasyonunun yüksek olduğu durumda GABA miktarında artış olduğu, bununla birlikte GA uygulamasının GABA miktarında kontrol grubuna göre belirgin değişikliğe neden olmadığı belirlendi. Bitki hormonları ile stres arasında bir ilişki olduğu ve GA içeriğinin stres korumasında rol almasından dolayı, özellikle stres koşullarında bitki hormonları ve GABA arasındaki ilişkinin farklı bitkilerde de çalışılması ile GABA metabolizmasının daha fazla aydınlatılabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Akçay, N., Bor, M., Karabudak, T., Ozdemir, F. ve Türkan, I., 2012. Contribution of Gamma amino butyric acid (GABA) to salt stress responses of *Nicotiana sylvestris* CMSII mutant and wild type plants, *Journal of Plant Physiology*, 169, 5, 452–458.
- Akihiro, T., Koike, S., Tani, R., Tominaga, T., Watanabe, S., Iijima, Y. ve Ezura, H., 2008. Biochemical Mechanism on GABA Accumulation During Fruit Development in Tomato, *Plant Cell Physiology*, 49, 9, 1378–1389.
- Allan, W.L., Simpson, J.P., Clark, S.M. ve Shelp B.J., 2008. Ulation in plants is a general response to abiotic stress: putative regulation by redox balance and glyoxylate reductase isoforms, *Journal of Experimental Botany*, 59, 9, 2555–2564.
- Al-Quraan, N., Sartawe, F.A.B. ve Qaryouti, M.M., 2013. Characterization of γ -aminobutyric acid metabolism and oxidative damage in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings under salt and osmotic stress, *Journal of Plant Physiology*, 170, 11, 1003–1009.
- Arnon D.I., 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts in *Beta vulgaris*, *Plant Physiology*, 24, 1, 1-15.
- Asada, K., 2006. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions, *Plant Physiology*, 141, 2, 391-396.
- Ashraf, M., 2009. Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers, *Biotechnology Advances* 27, 1, 84–93.
- Bartzel, I., Pelczar, K. ve Paszkowski, A., 2003. Functioning of the gamma-aminobutyrate pathway in wheat seedlings affected by osmotic stress, *Biology Plant*, 47, 2, 221–225.
- Bergmeyer, N., 1970. *Methoden der enzymatischen Analyse*, Vol:1, AkademieVerlag, Berlin, Germany.
- Beuchamp C., Fridovich I., 1973. Isoenzymes of superoxide dismutase from wheat germ, *Biochimica et Biophysica Acta* , 317, 1, 50-64.
- Bolarin, M.C., Santa-Cruz, A., Cayuela, E., Perez-Alfocea, F., 1995. Short term solute changes in leaves and roots of cultivated and wild tomato seedlings under salinity, *Journal of Plant Physiology*, 147, 3-4, 463–468.

- Bor, M., Seckin, B., Ozgur, R., Yilmaz, O., Ozdemir, F. ve Turkan, I., 2009. Comparative effects of drought, salt, heavy metal and heat stresses on gamma-aminobutyric acid levels of sesame (*Sesamum indicum* L.), *Acta Physiologiae Plantarum*, 31, 3, 655–659.
- Bouche', N., Fait, A., Bouchez, D., Moller, S.G. ve Fromm, H., 2003. Mitochondrial succinic-semialdehyde dehydrogenase of the gaminobutyrate shunt is required to restrict levels of reactive oxygen intermediates in plants, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 11, 6843–6848.
- Bouché, N. ve Fromm, H., 2004. GABA in plants: just a metabolite, *Trends in Plant Science*, 9, 3, 110-115.
- Bown, A.W., Hall, D.E. ve MacGregor, K.B., 2002. Insect footsteps on leaves stimulate the accumulation of 4-aminobutyrate and can be visualized through increased chlorophyll fluorescence and superoxide production, *Plant Physiology*, 129, 4, 1430–1434.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of the protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72, 1-2, 248-254.
- Bray E.A., 1993. Molecular responses to water deficit, *Plant Physiology* 103, 4, 1035–1040
- Carmak I., Horst W.J., 1991. Effects of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, Catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*), *Physiology Plant*, 83, 3, 463-468.
- Caverzan, A., Passaia, G., Rosa, S. B., Ribeiro, C. W. ve Lazzarotto, F. ,2012. Plant responses to stresses: Role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection, *Genetics and Molecular Biology*., 35, 4, 1011–1019.
- Celikkol Akcay, U., Ercan, O., Kavas, M., Yildiz, L., Yilmaz, C., Oktem, H.A. ve Yucel, M., 2010. Drought-induced oxidative damage and antioxidant responses in peanut (*Arachis hypogaea* L.) seedlings, *Plant Growth Regulation*, 61, 1, 21–28.
- Chitteti B.R., Z. Peng, 2007. Proteome and phosphoproteome differential expression under salinity stress in rice (*Oryza sativa*) roots, *Journal of Proteome Research*, 6, 5, 1718–1727.
- Cipollini, J.D.F., 1997. Gibberellic acid treatment reduces the tolerance of field-grown common bean to leaf removal, *Journal of Plant Growth Regulation*, 16, 3, 123–127.
- Deleu, C., Faes, P., Niogret, M.F. ve Bouchereau, A. ,2013. Effects of the inhibitor of the γ -aminobutyrate-transaminase, vinyl- γ -aminobutyrate, on development

- and nitrogen metabolism in *Brassica napus* seedlings, *Plant Physiology and Biochemistry : PPB / Société Française de Physiologie Végétale*, 64, 0, 60–9.
- Fait, A., Yellin, A. ve Fromm, H., 2005. GABA shunt deficiencies and accumulation of reactive oxygen intermediates: insight from *Arabidopsis* mutants, *FEBS Letters*, 579, 2, 415–20.
- Foyer C.H., Halliwell B., 1976. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism, *Planta*, 133, 1, 21-25.
- Foyer, C.H. ve Noctor, G., 2005. Oxidant and antioxidant signalling in plants : a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context, *Plant, Cell & Environment*, 28, 8, 1056–1071.
- Gao, H.J., Yang, H.Y., Bai, J.P., Liang, X.Y., Lou, Y., Zhang, J.L. ve Chen, Y.L., 2015. Ultrastructural and physiological responses of potato (*Solanum tuberosum* L.) plantlets to gradient saline stress, *Frontiers in Plant Science*, 5, 787.
- Gill, S.S. ve Tuteja, N., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants, *Plant Physiology and Biochemistry : PPB / Société Française de Physiologie Végétale*, 48, 12, 909–930.
- Gill, S.S. ve Tuteja, N., 2014. Polyamines and abiotic stress tolerance in plants, *Plant Signaling & Behavior*, 5, 1, 26–33.
- Guo, Y., Yang, R., Chen, H., Song, Y. ve Gu, Z., 2012. Accumulation of γ -aminobutyric acid in germinated soybean (*Glycine max* L.) in relation to glutamate decarboxylase and diamine oxidase activity induced by additives under hypoxia, *European Food Research and Technology*, 234, 4, 679–687.
- Gücleryüz, M., 1982. Bahçe ziraatında büyütücü ve engelleyici maddelerin kullanılması ve önemi, Atatürk Üniversitesi Yayınları, No: 279.
- Halliwell, B. ve Gutteridge J.M.C., 2006. Free radicals in biology and medicine, Fourth Edition, Oxford: Clarendon Press, England.
- Hnatuszko-Konka, K., Kowalczyk, T., Gerszberg, A., Wiktorek-Smagur, A. ve Kononowicz, A.K., 2014. *Phaseolus vulgaris* recalcitrant potential, *Biotechnology Advances*, 32, 7, 1205–1215.
- Hooley, R. 1994. Gibberellins: perception, transduction and responses, *Plant Molecular Biology*, 26, 1529–1555.
- Hopkins, W.G., 1995. Introduction to Plant Physiology, First Edition, JohnWiley and Sons Inc. Press, New York, USA.
- Iqbal, M. ve Ashraf, M., 2013. Gibberellic acid mediated induction of salt tolerance in wheat plants: Growth, ionic partitioning, photosynthesis, yield and hormonal homeostasis, *Environmental and Experimental Botany*, 86, 76–85.

- Iyer, R., Iverson, T.M., Accardi, A. ve Miller, C., 2002. A biological role for prokaryotic ClC chloride channels, *Nature*, 419, 715–718.
- Jaleel, C.A., Gopi, R., Manivannan, P., Sankar, B., Kishorekumar, A. ve Panneerselvam, R., 2007. Antioxidant potentials and ajmalicine accumulation in *Catharanthus roseus* after treatment with giberellic acid *Colloids and Surfaces, B, Biointerfaces*, 60, 2, 195–200.
- Jebara, S., Jebara, M., Limam, F. ve Aouani, M.E., 2005. Changes in ascorbate peroxidase, Catalase, guaiacol peroxidase and superoxide dismutase activities in common bean (*Phaseolus vulgaris*) nodules under salt stress, *Journal of Plant Physiology*, 162, 8, 929–36.
- Jorgensen, E.M., 2005. GABA, The *C. elegans* Research Community, *Worm Book*.
- Kaya, C., Tuna, A.L. ve Alves, A.A.C., 2006. Gibberellic acid improves water deficit tolerance in maize plants, *Acta Physiologiae Plantarum*, 28, 4, 331–337.
- Kim, N.H., Kim, B.S. ve Hwang, B.K., 2013. Pepper arginine decarboxylase is required for polyamine and γ -aminobutyric acid signaling in cell death and defense response, *Plant Physiology*, 162, 4, 2067–2083.
- Kinnersley, A.M. ve Lin, F., 2000. Receptor modifiers indicate that 4-aminobutyric acid (GABA) is a potential modulator of ion transport in plants, *Plant Growth Regulation*, 32, 1, 65–76.
- Kinnersley A.M., Turano F.J, 2000. Gamma aminobutyric acid (GABA) and plant responses to stress gamma aminobutyric acid (GABA) and plant responses to stress , *Critical Reviews in Plant Sciences*, 19, 6, 37-41.
- Koca, H., Bor, M., Özdemir, F. ve Türkan, İ., 2007. The effect of salt stress on lipid peroxidation, antioxidative enzymes and proline content of sesame cultivars, *Environmental and Experimental Botany*, 60, 3, 344–351.
- Kusvuran, S., Ellialtıoglu, S. ve Polat, Z., 2013. Applications of salt and drought stress on the antioxidative enzyme activities and malondialdehyde content in callus tissues of pumpkin genotypes, *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 11, 2, 496-500.
- Lazcano-Ferrat, C.J. Lovatt, 1999. Relationship between relative water content, nitrogen pools and growth of *Phaseolus vulgaris* and *P. acutifolius* A. Gray during water deficit, *Crop Science*, 39, 2, 467–475.
- Lee, J.H., Kim, Y.J., Jeong, D.Y., Sathiyaraj, G., Pulla, R.K., Shim, J.S. ve Yang, D.C., 2010. Isolation and characterization of a Glutamate decarboxylase (GAD) gene and their differential expression in response to abiotic stresses from *Panax ginseng* C. A. Meyer, *Molecular Biology Reports*, 37, 7, 3455–3463.

- Li, Y., Bai, Q., Jin, X., Wen, H. ve Gu, Z., 2010. Effects of cultivar and culture conditions on gamma-aminobutyric acid accumulation in germinated fava beans (*Vicia faba* L.), *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90, 1, 52–57.
- Liao, W.C., Wang, C.Y., Shyu, Y.T., Yu, R.C. ve Ho, K.C., 2013. Influence of preprocessing methods and fermentation of adzuki beans on γ -aminobutyric acid (GABA) accumulation by lactic acid bacteria, *Journal of Functional Foods*, 5, 3, 1108–1115.
- Liu, Z.J., Zhang, X.L., Bai, J.G., Suo, B.X., Xu, P.L. ve Wang, L., 2009. Exogenous paraquat changes antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in drought-stressed cucumber leaves, *Scientia Horticulturae*, 121, 2, 138–143.
- MacMillan, J., 2002. Occurrence of Gibberellins in vascular plants, fungi, and bacteria, *Journal of Plant Growth Regulation*, 20, 4, 387–442.
- Michaeli, S., Fait, A., Lagor, K., Nunes-Nesi, A., Grillich, N., Yellin, A. ve Fromm, H., 2011. A mitochondrial GABA permease connects the GABA shunt and the TCA cycle, and is essential for normal carbon metabolism, *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 67, 3, 485–498.
- Mirzaee, M., Moieni, A. ve Ghanati, F., 2013. Effects of drought stress on the lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in two canola (*brassica napus* l.) cultivars, *Journal of Agricultural Science & Technology*, 15, 3, 593–602.
- Mittler, R. , 2002. Oxidative stress , antioxidants and stress tolerance, *Trends in Plant Science*, 7, 9 , 405–410.
- Mittova, V., Tal, M., Volokita, M. ve Guy M., 2002. Up-regulation of the leaf mitochondrail and peroxisomal antioxidative systems in response to salt-induced oxidative stress in the wild salt-tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii*, *Plant Cell Environment*, 26, 6, 845–856.
- Moller, I.M., Jensen, P.E. ve Hansson, A., 2007. Oxidative modifications to cellular components in plants, *Annual Review of Plant Biology*, 58, 459–481.
- Monti, L. M., 1986. Breeding Plants for Drought Resistance: The Problem and its Relevance, *Drought Resistance in Plants, Meeting Held in Amalfi, 19 to 23 October 1986, Belgium*, 1-8.
- Mostofa, M.G., Hossain, M.A. ve Fujita, M., 2014. Trehalose pretreatment induces salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings: oxidative damage and co-induction of antioxidant defense and glyoxalase systems, *Protoplasma*, 252, 2, 461–475.
- Nakano y., Asada K., 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts, *Plant Cell Physiology*, 22, 5, 867-880.
- Neumaier, E.E., Blessington, T.M. ve Price, J.A., 1987. Effect of gibberellic acid on flowering and quality of double Persian violet, *HortScience*, 22, 5, 908–911.

- Pardo, J.M., 2010. Biotechnology of water and salinity stress tolerance, *Current Opinion in Biotechnology*, 21, 2, 185–196.
- Pedranzani, H., Racagni, G., Alemano, S., Miersch, O., Ramírez, I., Peña-Cortés, H., Taleisnik, E., Machado-Domenech, E. ve Abdala, G., 2003. Salt tolerant tomato plants show increased levels of jasmonic acid, *Plant Growth Regulation* 41, 2, 149-158.
- Queiroz, H.M., Sodek, L., Regina, C. ve Haddad, B., 2012. Effect of salt on the growth and metabolism of glycine max, *Brazilian Archives of Biology and Technology* , 55, 6, 809–817.
- Raggi, V., 1994. Changes in free amino acids and osmotic adjustment in leaves of water stressed bean, *Physiol Plant*, 91, 427–434.
- Ramputh, A.I. ve Bown, A.W., 1996. Rapid γ -aminobutyric acid synthesis and the inhibition of the growth and development of obliquebanded leafroller larvae, *Plant Physiol.*, 111, 1349–1352 .
- Renault, H., Roussel, V., El Amrani, A., Arzel, M., Renault, D., Bouchereau, A. ve Deleu, C., 2010. The *Arabidopsis* pop2-1 mutant reveals the involvement of GABA transaminase in salt stress tolerance, *BMC Plant Biology*, 10, 20.
- Sadowska, A., Racka, M., Staszkievicz, J., Sadowska, M., 1984. Effect of some growth substances upon rooting of cuttings, yield and alkaloid content of *Catharanthus roseus*, *Acta Horticulturae*, 144 , 99-102.
- Saed-Moucheshi, A., Shekoofa, A. ve Pessarakli, M., 2014. Reactive Oxygen Species (ROS) Generation and Detoxifying in Plants, *Journal of Plant Nutrition*, 37, 10, 1573–1585.
- Saeidi-Sar, S., Abbaspour, H., Afshari, H. ve Yaghoobi, S.R., 2013. Effects of ascorbic acid and gibberellin A₃ on alleviation of salt stress in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings, *Acta Physiologiae Plantarum*, 35, 3, 667-677.
- Scandalios, J.G., 1993. Oxygen stress and superoxide dismutase, *Plant Physiol*, 101, 7–12.
- Shah, S. H. , 2007. Effects Of Salt Stress On Mustard As Affected By Gibberellic Acid Application, *Gen Appl Plant Physiol*, 33, 1-2, 97-106.
- Shalata, A., Mittova, V., Volokita, M., Guy, M. ve Tal M., 2001. Response of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to salt-dependent oxidative Stress: The root antioxidant system, *Physiol Plant*, 112 , 487–94.
- Shelp, B.J., Bown, A.W. ve McLean, M.D., 1999. Metabolism and functions of γ -aminobutyric acid, *Trends Plant Science*, 4, 11, 446–452 .

- Shi, S.Q., Shi, Z., Jiang, Z.P., Qi, L.W., Sun, X.M., Li, C.X. ve Zhang, S.G., 2010. Effects of exogenous GABA on gene expression of *Caragana intermedia* roots under NaCl stress: regulatory roles for H₂O₂ and ethylene production, *Plant, Cell & Environment*, 33, 2, 149–162.
- Shigeoka, S., Ishikawa, T., Tamoi, M., Miyagawa, Y., Takeda T. ve Yabuta Y., 2002. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes, *Journal of Experimental Botany*, 53, 372, 1305–1319.
- Simon-Sarkadi, L., Kocsy, G., Varhegyi, A., Galiba, G. ve De Ronde, J.A., 2006. Stress induced changes in the free amino acid composition in transgenic soybean plants having increase proline content, *Biologia Plantarum*, 50, 4, 93–796.
- Snedden, W.A. ve Fromm, H., 1999. Regulation of the γ -aminobutyrate synthesizing enzyme, glutamate decarboxylase, by calcium/calmodulin: a mechanism for rapid activation in response to stress, 549-574, In: Lerner HR (Editor) *Plant responses to environmental stresses: from phytohormones to genome reorganization*, Dekker, New York, USA.
- Talaat, N.B., 2015. Effective Microorganisms Improve Growth Performance and Modulate the ROS-Scavenging System in Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Plants Exposed to Salinity Stress, *Journal of Plant Growth Regulation*, 34, 1, 35–46.
- Tejera García, N.A., Iribarne, C., Palma, F. ve Lluch, C., 2007. Inhibition of the Catalase activity from *Phaseolus vulgaris* and *Medicago sativa* by sodium chloride, *Plant Physiology and Biochemistry: PPB / Société Française de Physiologie Végétale*, 45, 8, 535–541.
- Terzi, R., Sağlam, A., Kutlu, N., Nar, H. ve Kadioğlu, A., 2010. Impact of soil drought stress on photochemical efficiency of photosystem II and antioxidant enzyme activities of *Phaseolus vulgaris* cultivars, *Turkish Journal Of Botany* , 34, 1–10.
- Triantaphylides, C., Krischke, M., Hoeberichts, F.A., Ksas, B., Gresser, G., Havaux, M., Van Breusegem, F. ve Mueller, M.J., 2008. Singlet oxygen is the major reactive oxygen species involved in photo-oxidative damage to plants, *Plant Physiology* 148, 960–968.
- Tuna, A.L., Kaya, C., Dikilitas, M. ve Higgs, D., 2008. The combined effects of gibberellic acid and salinity on some antioxidant enzyme activities, plant growth parameters and nutritional status in maize plants, *Environmental and Experimental Botany*, 62, 1, 1–9.
- Türkan, İ., Bor, M., Özdemir, F. ve 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, 1, 223–231.

- Ünyayar, S. ve Çekiç, F. Ö., 2005. Changes in Antioxidative Enzymes of Young and Mature Leaves of Tomato Seedlings under Drought Stress, *Turkish Journal of Biology*, 29, 211–216.
- Ünyayar, S., Çekiç, F.Ö. ve Keleş, Y., 2005. The antioxidative response of two tomato species with different drought tolerances as a result of drought and cadmium stress combinations, *Plant Soil Environment*, 51, 57–64.
- Vettakkorumakankav, N.N., Falk, D., Saxena, P. ve Fletcher, R.A., 1999. A Crucial role for gibberellins in stress protection of plants, *Plant and Cell Physiology*, 40, 5, 542–548.
- Walsh, C.S., 2003. *Plant Hormones. Concise Encyclopedia of Temperate Tree Fruit*, Edited by Baugher T. A and Singha, 245-250, Haworth Press.
- Wang, W.B., Kim, Y.H., Lee, H.S., Kim, K.Y., Deng, X.P. ve Kwak, S.S., 2009. Analysis of antioxidant enzyme activity during germination of alfalfa under salt and drought stresses, *Plant Physiology and Biochemistry: PPB/ Société Française de Physiologie Végétale*, 47, 7, 570–577.
- Wen, F., Zhang, Z., Bai, T., Xu, Q. ve Pan, Y., 2009. Proteomics reveals the effects of gibberellic acid (GA₃) on salt-stressed rice (*Oryza sativa* L.) shoots, *Plant Science*, 178, 2, 170–175.
- Westwood, M.N., 1993. *Hormones and growth regulators, temperate zone pomology: physiology and culture*, Timber Press Inc, Portland, Oregon, USA.
- Yamaguchi, S., 2008. Gibberellin metabolism and its regulation, *Annual Review of Plant Biology*, 59, 225–51.
- Yang, R., Guo, Q. ve 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, 1, 152–159.
- Yin, Y., Yang, R., Guo, Q. ve Gu, Z., 2014. NaCl stress and supplemental CaCl₂ regulating GABA metabolism pathways in germinating soybean, *European Food Research and Technology*, 238, 5, 781–788.
- Yolcu, S., Ozdemir, F. ve Bor, M., 2013. Gamma-amino butyric acid, glutamate dehydrogenase and glutamate decarboxylase levels in phylogenetically divergent plants, *Plant Systematics and Evolution*, 299, 2, 403-412.
- Zhang Z., Zhang Q., Wu J., Zheng X., Zheng S., Sun X., Qiu Q. ve Lu T., 2013. Gene knockout study reveals that cytosolic ascorbate peroxidase 2(OsAPX2) plays a critical role in growth and reproduction in rice under drought, salt and cold stresses, *Plos one*, 8, 2, 57472.
- Zhang, L., Ma, H., Chen, T., Pen, J., Yu, S. ve Zhao, X., 2014. Morphological and physiological responses of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plants to salinity, *Plos One*, 9, 11 , e112807.

ÖZGEÇMİŞ

Seyda YILMAZ, 20 Şubat 1988 yılında Konya’da doğdu. İlkokulu Canada Toronto’da Pape Avenue Public School’da okudu. Daha sonra Konya Güventaş Anadolu Lisesi’nden mezun oldu. Lisans eğitimini 2013 yılında Aksaray Üniversitesi Biyoloji Bölümü’nde tamamladı. Daha sonra Aksaray Üniversitesi Biyoloji ABD’de yüksek lisans eğitimine başladı. TÜBİTAK tarafından desteklenen 113Z885 numaralı projede bursiyer olarak çalıştı.

Uluslararası Kongrelerde Sunulan Bildiriler:

1. Fazilet Özlem Çekiç, **Seyda Yılmaz** "Gamma-aminobutyric acid (GABA) analyses by HPLC in Phaseolus vulgaris L. plants exposed to drought and salt stresses" Pittcon Conference & Expo 2015, 08-12 Mart 2015, New Orleans, USA.

