

**Tuz Stresi Altındaki Kanola Fidelerinde Lipoik Asit ve
Salisilik Asit Uygulamalarının Bazı Biyokimyasal Parametreler
ve Proteom Değişimleri Üzerine Etkilerinin Araştırılması**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Nermin AKÇALI

DANIŞMAN

Doç. Dr. Mustafa YILDIZ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Ağustos, 2014

Bu tez çalışması **13.FENED.06** numaralı proje ile **Afyon Kocatepe Üniversitesi** tarafından desteklenmiştir.

AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**TUZ STRESİ ALTINDAKİ KANOLA FİDELERİNDE LİPOİK ASİT ve SALİSİLİK
ASİT UYGULAMALARININ BAZI BİYOKİMYASAL PARAMETRELER ve
PROTEOM DEĞİŞİMLERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Nermin AKÇALI

DANIŞMAN

Doç. Dr. Mustafa YILDIZ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Ağustos, 2014

TEZ ONAY SAYFASI

Nermin AKÇALI tarafından hazırlanan “**Tuz Stresi Altındaki Kanola Fidelerinde Lipoik Asit ve Salisilik Asit Uygulamalarının Bazı Biyokimyasal Parametreler ve Proteom Değişimleri Üzerine Etkilerinin Araştırılması**” adlı tez çalışması lisansüstü eğitim ve öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca 15/08/2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Mustafa YILDIZ

İmza

Başkan : Prof. Dr. Yasemin EKMEKÇİ
Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi

Üye : Doç. Dr. Mustafa YILDIZ
Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi

Üye : Doç. Dr. Azmi YERLİKAYA
Dumlupınar Üniversitesi, Tıp Fakültesi

Afyon Kocatepe Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun
...../...../..... tarih ve
..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

.....
Prof. Dr. Yılmaz YALÇIN
Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

15.08.2014

Nermin AKÇALI

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TUZ STRESİ ALTINDAKİ KANOLA FİDELERİNDE LİPOİK ASİT ve SALİSİLİK ASİT UYGULAMALARININ BAZI BİYOKİMYASAL PARAMETRELER ve PROTEOM DEĞİŞİMLERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Nermin AKÇALI

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Mustafa YILDIZ

Bu araştırmada, hidroponik olarak büyütülen kanola (*Brassica napus* L. cv. Sary) fidelerinde NaCl toleransının artırılmasında dışsal uygulanan lipoik asit (LA) ve salisilik asidin (SA) koruyucu potansiyelleri incelenmiştir. Bu amaçla, 18 günlük kanola fideleri altı farklı uygulama grubuna (kontrol, LA, SA, NaCl, NaCl+LA ve NaCl+SA) ayrılmış ve 7 gün daha büyütülmüşlerdir. Fidelerin yapraklarına gün aşırı 0.1 mM LA veya SA spreyleneştir. Uygulamaları takiben fide büyümesi, klorofil içeriği, malondialdehit (MDA) içeriği, prolin içeriği, sistein içeriği, protein olmayan tiyol (NPT) içeriği, antioksidan [askorbat (AsA) ve glutatyon (GSH)] içerikleri ve antioksidan enzimlerin [süperoksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APX), guaiakol peroksidaz (POD) ve katalaz (CAT)] aktivitesi 25 günlük fidelerde belirlenmiştir. Tuz stresi gövde ve kök büyümesi, AsA ve GSH içeriklerini azaltmış, malondialdehit (MDA), prolin, sistein ve NPT içeriklerini ve SOD, POD, CAT ve APX gibi antioksidan enzimlerin aktivitesini arttırmıştır. Bununla birlikte, dışsal LA ve SA uygulamaları fide büyümesindeki NaCl-teşvikli azalmayı hafifletmiş ve MDA içeriğini azaltmıştır. LA ve SA uygulamaları prolin içeriğini etkilememiştir. LA ve SA uygulamaları prolin içeriğini etkilememiştir. Tuz stresi altındaki fidelerde LA ve SA uygulamaları sistein içeriğini daha fazla artırırken, NPT içeriğini azaltmıştır. Tuz stresi altındaki fidelerde AsA içeriği dışsal LA

uygulanmasında daha fazla azalırken, SA uygulaması önemli bir etki göstermemiştir. Tuz stresi altında, sadece SA uygulaması GSH içeriğini arttırmıştır. Tuz stresi altındaki fidelerde dışsal LA ve SA uygulamaları POD ve CAT aktivitelerini artırırken, APX aktivitesinde azalmaya neden olmuştur. Bu sonuçlar, kısa süreli tuz stresi altında savunma sistemlerini etkileyerek fide büyümesinin arttırılmasında LA'nın en az SA kadar etkili olabileceğini göstermektedir.

Bu çalışmanın ikinci basamağında, kanola fidelerinde tuza tolerans mekanizmaları üzerine dışsal uygulanan LA'nın etkisi proteomik yaklaşım kullanılarak araştırılmıştır. Bu amaçla, kontrol, LA, NaCl ve NaCl+LA uygulamalarına maruz kalan kanola fidelerinin yaprak dokularından elde edilen proteinler, iki-yönlü (2-D) jel elektroforez [izoelektrik fokuslama (IEF)/Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAJE)] ve MALDI-TOF/TOF kütle spektrometrisi tanımlanmıştır. İfade profilinde değişiklik gösteren 28 proteinden 22'si tanımlanmıştır. Bu proteinlerin 17'si artan yönde ve 5'i ise azalan yönde düzenlenmiştir. Sadece LA uygulaması ile 5 (fotosistem II reaksiyon merkezi PSB28 proteini, tiyoredoksin M-tip 4, 50S ribozomal protein L12-3, 2-Cys peroksiredoksin BAS1 ve sedoheptulo-1,7-bifosfataz) proteinin ifadesi artan yönde düzenlenmiştir. Bununla birlikte, karbonik anhidraz, magnezyum-şelataz altbirim chli, RuBisCO aktivaz, triozfosfat izomeraz ve tiazol biyosentetik enziminin ifade seviyeleri NaCl stresi veya LA uygulaması tarafından azalan yönde düzenlenmiştir. Tanımlanan proteinlerin fotosentez, enerji metabolizması, stres savunma ve sinyal iletiminde fonksiyon gördüğü belirlenmiştir. Tuz stresi altındaki kanola fidelerinde LA'nın iyileştirici etkilerinin proteomik çalışma ile ortaya konulması tuza tolerans mekanizmalarında proteinlerin fonksiyonlarını değerlendirmede yeni bir bakış açısı sağlamıştır.

2014, xii + 94 sayfa

Anahtar kelimeler: *Brassica napus* L., Lipoik asit, Salisilik asit, Tuz toleransı, Proteomik

ABSTRACT

M.Sc Thesis

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF LIPOIC ACID AND SALICYLIC ACID APPLICATIONS ON SOME BIOCHEMICAL PARAMETERS AND PROTEOME CHANGES IN CANOLA SEEDLINGS UNDER SALINITY STRESS

Nermin AKÇALI

Afyon Kocatepe University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mustafa YILDIZ

In this study, the protective potential of exogenously applied lipoic acid (LA) and salicylic acid (SA) in inducing salinity tolerance in hydroponically grown canola (*Brassica napus* L. cv. Sary) seedlings. For this purpose, 18 day-old canola seedlings divided into six treatment groups (control, LA, SA, NaCl, NaCl+LA and NaCl+SA), and they were grown another seven days. The leaves of seedlings were sprayed every alternate day with 0.1 mM of LA or SA. Following these treatments, the seedling growth, chlorophyll content, malondialdehyde (MDA) content, proline content, cysteine content, non-protein thiol (NPT) content, antioxidant [ascorbate (AsA) and glutathione (GSH)] contents and activities of some antioxidant enzymes [superoxide dismutase (SOD), guaiacol peroxidase (POD), catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX)] were determined in 25-day-old canola seedlings. Salinity stress decreased the growth of shoots and roots and contents of AsA and GSH, and increased the contents of malondialdehyde (MDA), proline, cysteine and NPT and the activities of antioxidant enzymes such as SOD, POD, CAT and APX. However, exogenous applications of LA or SA alleviated the salt stress-mediated seedling growth and decreased the MDA content. LA or SA applications could not influence the proline content. While the LA and SA applications more increased the cysteine content, decreased NPT content in

seedlings under salinity stress. Exogenous application of LA further reduced AsA content in salt-stressed seedlings, while SA had no significant impact in this respect. Under salinity stress, only SA application improved the GSH content. Exogenous applications of LA or SA increased the activities of POD and CAT, while these applications caused reduction in the APX activity of the salt-stressed seedlings. These results suggest that under short-term salinity stress, LA is at least as effective as SA for improving growth by influencing defense systems.

In the second stage of this study, the influence of exogenously applied LA on the salt tolerance mechanism in seedlings of canola was investigated using proteomic approach. For this purpose, proteins from the leaf tissues of canola seedlings subjected to control, LA, NaCl and NaCl+LA treatments were identified by two-dimensional (2-D) gel electrophoresis [isoelectric focusing (IEF)/Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS/PAGE)] and MALDI-TOF/TOF mass spectrometer. Among the 28 proteins exhibiting alterations in expression pattern, 22 proteins were identified. Among them, 17 proteins were up-regulated and 5 proteins were down-regulated. The expression levels of 5 proteins (photosystem II reaction center PSB28 protein, thioredoxin M-type 4, 50S ribosomal protein L12-3, 2-Cys peroxiredoxin BAS1 and sedoheptulose-1,7-bisphosphatase) were regulated by only LA treatment. However, the expression levels of carbonic anhydrase, magnesium-chelatase subunit chl_i, RuBisCO activase, triosephosphate isomerase and thiazole biosynthetic enzyme were down-regulated by NaCl stress or LA application. The identified proteins were involved in various cellular responses and metabolic processes such as photosynthesis, energy metabolism, stress defense and signal transduction. The revealing of the protective roles of LA in canola seedlings under salt stress by proteomics study provides new insight to evaluating protein functions in salt tolerance mechanisms.

2014, xii + 94 pages

Keywords: *Brassica napus* L., Lipoic acid, Salicylic acid, Salinity tolerance, Proteomics

TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın konusu, deneysel çalışmaların yönlendirilmesi, sonuçların değerlendirilmesi ve yazımı aşamasında yapmış olduğu büyük katkılarında dolay tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Mustafa YILDIZ'a, araştırma ve yazım süresince yardımlarını esirgemeyen doktora ğrencisi Sayın Hakan TERZİ'ye, her konuda öneri ve eleştirileriyle yardımlarını gördüğüm hocalarıma ve arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bu araştırma boyunca maddi ve manevi desteklerinden dolay aileme de teşekkür ederim.

Nermin AKÇALI

AFYONKARAHİSAR, 2014

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR BİLGİLERİ	5
2.1 Kanola (<i>Brassica napus</i> L.) Bitkisi	5
2.2 Lipoik Asit	5
2.3 Salisilik Asit.....	8
2.3.1 Fizyolojik Roller.....	10
2.3.2 Bitki Tuz Toleransında Dışsal Salisilik Asit Uygulaması.....	12
2.4 Bitkilerde Tuz stresi ve Proteom Değişimleri	14
2.4.1 Fotosentez ve Solunum Metabolizması	16
2.4.2 Reaktif Oksijen Türlerine (ROT'lar) Karşı Savunma Sistemleri	17
2.4.3 Tuz Stresine Cevapta Sinyal Yolları.....	20
2.4.4 İyon Homeostazisi	22
2.4.5 Transkripsiyon ve Protein sentezi	24
2.4.6 Hücre İskeleti ve Hücre Çeperi Bileşenleri	25
3. MATERYAL ve METOT	28
3.1 Bitki Yetiştirme Koşulları ve Uygulamalar	28

3.2 Toprak Üstü Organların Taze ve Kuru Ağırlıklarının Belirlenmesi.....	30
3.3 Fotosentetik Pigment İçeriğinin Belirlenmesi	30
3.4 Prolin İçeriğinin Belirlenmesi	30
3.5 Sistein ve Tiyoil İçeriklerinin Belirlenmesi	31
3.6 Lipid Peroksidasyonunun Belirlenmesi	32
3.7 Antioksidan Enzim Aktiviteleri ve Antioksidanların İçeriklerinin Belirlenmesi	32
3.7.1 Enzim Ekstraksiyonu.....	32
3.7.2 Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesinin Belirlenmesi	33
3.7.3 Askorbat Peroksidaz (APX) Aktivitesinin Belirlenmesi	33
3.7.4 Guaiakol Peroksidaz (POD) Aktivitesinin Belirlenmesi.....	33
3.7.5 Katalaz (CAT) Aktivitesinin Belirlenmesi.....	34
3.7.6 Askorbat (AsA) ve Glutatyon (GSH) İçeriklerinin Belirlenmesi.....	34
3.8 Proteomik Analizler.....	35
3.8.1 Protein Ekstraksiyonu.....	35
3.8.2 İki Yönlü (2-D) Jel Elektroforezi	36
3.8.3 Görüntü Analizleri	37
3.8.4 Jelde Triptik Kesim.....	37
3.8.5 Kütle Spektrometrisi Analizleri.....	38
3.9. İstatistiksel Analizler	39
4. BULGULAR.....	40
4.1 Tuz Stresi Altındaki Kanola Fidelerinde Fide Büyümesi Üzerine Dışsal Lipoik Asit ve Salisilik Asit Uygulamalarının Etkisi	40
4.2 Tuz Stresi Altındaki Kanola Fidelerinde Lipid Peroksidasyonu Üzerine Dışsal Lipoik Asit ve Salisilik Asit Uygulamalarının Etkisi	41

4.3 Tuz Stresi Altındaki Kanola Fidelerinde Klorofil İçeriği Üzerine Dışsal Lipoik Asit ve Salisilik Asit Uygulamalarının Etkisi	42
4.4 Tuz Stresi Altındaki Kanola Fidelerinde Prolin İçeriği Üzerine Dışsal Lipoik Asit ve Salisilik Asit Uygulamalarının Etkisi	42
4.5 Tuz Stresi Altındaki Kanola Fidelerinde Sistein ve NPT İçerikleri Üzerine Dışsal Lipoik Asit ve Salisilik Asit Uygulamalarının Etkisi.....	43
4.6 Tuz Stresi Altındaki Kanola Fidelerinde Askorbat ve Glutasyon İçerikleri Üzerine Dışsal Lipoik Asit ve Salisilik Asit Uygulamalarının Etkisi	45
4.7 Tuz Stresi Altındaki Kanola Fidelerinde Antioksidan Enzimlerin Aktivitesi Üzerine Dışsal Lipoik Asit ve Salisilik Asit Uygulamalarının Etkisi	47
4.8 Tuz Stresi Altındaki Kanola Fidelerinde Proteom Değişimleri Üzerine Dışsal Lipoik Asit Uygulamasının Etkisi	48
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	57
KAYNAKLAR.....	71
ÖZGEÇMİŞ.....	94

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

dH ₂ O	Distile su
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HCl	Hidroklorik asit
\cdot OH	Hidroksil radikali
mA	Miliamper
μ M	Mikromolar
mM	Milimolar
μ g	Mikrogram
μ L	Mikrolitre
O ₂ ⁻	Süperoksit radikali

Kısaltmalar

POD	Guaiakol peroksidaz
GSH	Glutasyon
GR	Glutasyon redüktaz
LA	Lipoik asit
MDA	Malondialdehit
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NBT	Nitro blue tetrazolium
NPT	Proteine bağlı olmayan tiyol
GSSG	Okside glutasyon
PAJE	Poliakrilamid jel elektroforez
PT	Proteine bağlı tiyol
ROT	Reaktif oksijen türleri
SA	Salisilik asit
SOD	Süperoksit dismutaz
TBA	Tiyobarbütirik asit
TCA	Trikloroasetik asit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1 Lipoik ve dihidrolipoik asidin kimyasal yapısı.	6
Şekil 2.2 Antioksidan metabolitlerin yeniden oluşturulmasında rol oynayan enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma sisteminin şematik gösterimi.	7
Şekil 2.3 Salisilik asit biyosentezi ve metabolizması için biyosentetik yol.	9
Şekil 2.4 Tuz-teşvikli ve tuz stresi ile azalmış farklı fonksiyonel kategorideki proteinlerin ifade profilleri.....	15
Şekil 2.5 Bitkilerde ROT savunma sisteminde tuza cevapta proteinler/enzimlerin şematik gösterimi	18
Şekil 4.1 NaCl stresi altındaki kanola fidelerinin yaprak dokularında malodialdehit (MDA) içeriği üzerine dışsal LA veya SA uygulamalarının etkisi.	41
Şekil 4.2 NaCl stresi altındaki kanola fidelerinin yaprak dokularında klorofil içeriği üzerine dışsal LA veya SA uygulamalarının etkisi.....	42
Şekil 4.3 NaCl stresi altındaki kanola fidelerinin yaprak dokularında prolin içeriği üzerine dışsal LA veya SA uygulamalarının etkisi.....	43
Şekil 4.4 NaCl stresi altındaki kanola fidelerinin yaprak dokularında sistein içeriği üzerine dışsal LA veya SA uygulamalarının etkisi.....	44
Şekil 4.5 NaCl stresi altındaki kanola fidelerinin yaprak dokularında non-protein tiyol (NPT) içeriği üzerine dışsal LA veya SA uygulamalarının etkisi.	44
Şekil 4.6 NaCl stresi altındaki kanola fidelerinin yaprak dokularında askorbat (AsA) içeriği ve AsA/DHA oranı üzerine dışsal LA veya SA uygulamalarının etkisi. ...	45
Şekil 4.7 NaCl stresi altındaki kanola fidelerinin yaprak dokularında glutatyon (GSH) içeriği ve GSH/GSSG oranı üzerine dışsal LA veya SA uygulamalarının etkisi. .	46

Şekil 4.8 NaCl stresi altındaki kanola fidelerinin yaprak dokularında (a) süperoksit dismutaz (SOD), (b) guaiakol peroksidaz (POD), (c) katalaz (CAT) ve (d) askorbat peroksidaz (APX) aktivitesi üzerine dışsal LA veya SA uygulamalarının etkisi.....	47
Şekil 4.9 Kontrol, LA, NaCl ve NaCl+LA uygulamalarına maruz bırakılan kanola fidelerinin yaprak dokularından ekstrakte edilen proteinlerin iki-yönlü (2-D) elektroforetik profilleri.	49
Şekil 4.10 Şekil 4.9’da ifadesinde değişiklik gösteren protein beneklerinin büyütülmüş gösterimi.	54

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 3.1 Kanola fidelerinin maruz bırakıldığı uygulama grupları	28
Çizelge 4.1 Tuz stresi altındaki kanola fidelerinin toprak üstü ve kök taze (TA) ve kuru (KA) ağırlıkları üzerine dışsal LA ve SA uygulamalarının etkisi.....	40
Çizelge 4.2 Kontrol, LA, NaCl ve NaCl+LA uygulamalarına maruz bırakılan kanola fidelerinin yaprak dokularında MALDI-TOF/TOF kütle spektrometrisi ile tanımlanmış proteinler	50
Çizelge 4.3 MALDI-TOF/TOF kütle spektrometrisi ve MASCOT taraması ile tanımlanan proteinlerin fonksiyonlarına göre sınıflandırılması ve hücrel lokalizasyonu	56

1. GİRİŞ

Toprak tuzluluğu dünyada bitki verimliliğini oldukça sınırlayan önemli abiyotik streştir. Dünyadaki karasal alanların %6'dan fazlasının ve sulanan alanların yaklaşık %20'sinin tuzluluktan etkilendiği tahmin edilmektedir (Munns and Tester 2008). Tuz stresi giderek artan ciddi bir problem olup; bitkilerin tuza toleransını geliştirmede genetik mühendisliği teknolojileri gibi stratejilerin kullanımı önemlidir. Tuz stresine tolerans, bitki transkriptomu, proteomu ve metabolomunun kompozisyonundaki değişikliklere eşlik eden gen ifadesindeki önemli değişiklikleri kapsamaktadır. Fizyolojik, moleküler genetik ve fonksiyonel genomik çalışmalarla tuz toleransı hakkında önemli bilgiler sağlanmıştır. Bitkinin tuza cevabı ve adaptasyonunda fonksiyonları olan ozmolit sentezi, iyon kanalları, sinyal faktörleri ve tuza cevap enzimlerine ait proteinleri kodlayan bazı önemli genler klonlanmış ve karakterize edilmiştir (Tuteja 2007). İlaveten, büyük ölçekli transkriptomik çalışmalar, mRNA seviyesinde gen ifadesi ile ilgili veriler sağlamıştır (Puranik *et al.* 2011, Xu *et al.* 2013, Podda *et al.* 2014). Bu veriler, farklı bitkilerde tuza cevap genlerinin evrensel bir görüşünü sunar. Bununla birlikte, post-transkripsiyonal kanıtlar ve post-translasyonel modifikasyonlar (fosforilasyon ve glikosilasyon gibi), mRNA seviyelerinin genellikle proteinlerin ifade seviyeleri ile ilişkili olmadığını göstermiştir. Bitki stres cevabını direkt olarak yansıtan bu durum, bitki proteomunun önemini ortaya koymaktadır. Enzimlere ilaveten proteinler, transkripsiyon ve translasyon mekanizmalarının bileşenlerini kapsadığından transkript ve protein seviyesinde bitki stres cevabını regüle edebilir (Kosová *et al.* 2011). Böylece, protein seviyesinde stres koşullarına bitki cevabının incelenmesi, bitki stres toleransının altında yatan fizyolojik mekanizmaları ortaya çıkarmak için oldukça kuvvetli bir araçtır.

Proteomik ve özellikle kantitatif proteomik, tarımsal bitkilerin abiyotik stres toleransını araştırmada güçlü bir tekniktir. Proteomik, stres ve toleransla ilişkili yeni proteinlerin kantitasyonu ve hızlı kimliklendirilmesi potansiyelini sağlamaktadır (Barkla *et al.* 2013). Büyük ölçekli kantitatif proteomik teknolojileri proteom çalışmalarını kolaylaştırmaktadır. İki-yönlü elektroforez (2-DE) ve DIGE (difference gel electrophoresis) yaklaşımları tuza cevap proteinlerini belirlemek için kullanılmıştır. 2-

DE, yüksek çözünürlüklü protein ayırma, özellikle protein izoform analizi için güçlü bir teknolojidir. DIGE ise 2-DE'nin bazı sınırlamalarını (örneğin; verimlilik, tekrar edilebilirlik ve duyarlılık) ortadan kaldırabilmektedir. Bazı kütle spektrometresi (MALDI-TOF/TOF MS, LC-MS/MS gibi) cihazları protein kimliklendirmesi için kullanılmaktadır. Bu teknolojiler temelinde, mevcut proteomik çalışmalar ile bazı proteinlerin tuza tepki olarak sentezlendiği belirlenmiştir (Gao *et al.* 2011, Yang *et al.* 2012, Li *et al.* 2013b). Ozmotin (Qureshi *et al.* 2007), reaktif oksijen türleri ile savaşılan enzimler (Abbasi and Komatsu 2004) ve patojen ilişkili (Dani *et al.* 2005) proteinler gibi stres proteinleri tuza tolerans geliştirmede önemli moleküler markörler olarak kullanılmıştır.

Tuz stresi tarımsal üretimi sınırlamakta ve üretimde yaklaşık %50 kayba neden olduğu tahmin edilmektedir (Kreps *et al.* 2002). Bu nedenle, tarımsal bitkilerde tuz toleransının artırılması için başarılı stratejilere gereksinim duyulmaktadır. Tuz stresine toleranslı tarımsal bitkilerin üretilmesi geleneksel seleksiyon ve ıslah yöntemleri veya modern moleküler biyoloji yaklaşımları ile sağlanabilmektedir. Bitki ıslahçıları geleneksel ıslah veya transgenik yaklaşım ile tuza toleranslı genotipleri üretmiş olmasına karşın (Ashraf and Akram 2009), abiyotik stres toleransının genetik olarak kompleks mekanizmaları bu durumu oldukça zorlaştırmaktadır (Vinocur and Altman 2005). Son yıllarda, salisilik asit (SA), poliaminler (PA), absisik asit (ABA) ve jasmonik asit (JA) gibi bazı bitki büyüme düzenleyicilerinin bitkilerde tuz toleransının artırılmasında kullanılabileceği fikri ortaya çıkmıştır (Yoon *et al.* 2009, Roychoudhury *et al.* 2011, Singh and Gautam 2013, Sripinyowanich *et al.* 2013). Bitkilerde kompleks fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler değişimlere neden olan çevresel stresler içsel bitki büyüme düzenleyicilerinin seviye ve oranlarını değiştirebilmektedir (Wang *et al.* 2005a; Ashraf *et al.* 2008). Bu değişimler stres koşullarında bitki büyüme ve gelişimini etkileyen ciddi metabolik bozukluklara neden olmaktadır. Genel olarak tuz stresi bitki büyüme düzenleyicilerinin sentezini azaltmakta veya degradasyona neden olabilmektedir (Kuiper *et al.* 1988). Çevresel stres koşulları altındaki bitkilere dışsal uygulanan bitki büyüme düzenleyicilerinin, içsel büyüme düzenleyicilerinin konsantrasyonlarındaki eksikliği ortadan kaldırabilmekte ve stresin inhibe edici etkisini azaltabilmektedir (Ashraf and Foolad 2007, Ashraf *et al.*

2008). Bununla birlikte, bu etkilerin altında yatan mekanizmalar tam olarak bilinmemekte ve tuz toleransındaki artış direkt olarak bu bileşiklerin fizyolojik rolleri ile ilişkili olmadığı bildirilmektedir (Ashraf *et al.* 2008).

Bilinen diğer birçok bitki büyüme düzenleyicileri ve SA, tuz stresine maruz kalan bitkilerde birçok metabolik olayı düzenleyerek bitki büyüme ve gelişiminde önemli rol oynamaktadır (Ashraf *et al.* 2010, Hussain *et al.* 2011). Salisilik asit birçok patojene karşı oluşturulan bitki savunma cevaplarında önemli role sahip bir sinyal molekülüdür (Snyman and Cronjé 2008). Bununla birlikte, SA'nın tuzluluk, kuraklık, sıcaklık ve ağır metaller gibi birçok strese karşı oluşturulan bitki cevaplarının düzenlenmesinde önemli rollere sahip olduğu bildirilmiştir (Hayat *et al.* 2010). Bu bulgular, SA'nın oldukça kompleks stres cevaplarına katılan birkaç fonksiyonel molekülle veya diğer sinyal molekülleri ile etkileşime girerek stres toleransını arttırabileceğini ileri sürmektedir.

Lipoik asit (LA); pirüvat ve glisin metabolizmasında fonksiyon gören bazı enzimlerin (pirüvat dehidrogenaz kompleksi ve glisin dekarboksilaz kompleksi) kofaktörü olarak işlev gören ve kükürt içeren bir moleküldür (Gueguen *et al.* 2000). Enerji metabolizmasındaki işlevlerinin yanında LA, hem indirgenmiş dihidrolipoik asit (DHLLA) hem de yükseltgenmiş lipoik asit (LA) formlarında koruyucu fonksiyonlarını koruyabilen eşsiz bir antioksidan moleküldür (Navari-Izzo *et al.* 2002). Tuz stresi altındaki bitkilerde LA'nın rolünü belirleyen birkaç çalışma olmasına karşın (D'Amico *et al.* 2004, Pérez-López *et al.* 2010), tuz stresinin teşvikinde dışsal uygulanan LA'nın etkilerini araştıran bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu araştırmada, kanola (*Brassica napus* L. cv. Sary) fidelerinde dışsal lipoik asit (LA) ve salisilik asit (SA) uygulamalarının tuz toleransı ve tuz stresi altındaki fidelerde LA uygulamasının proteom değişimleri üzerine etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, 18 günlük kanola fideleri artan NaCl konsantrasyonlarına [50 mM (24 sa), 100 mM (24 sa) ve 150 mM (5 gün)] maruz bırakılırken, tuz stresi ile birlikte yapraklara spreyleme yoluyla 0.1 mM LA veya SA gün aşırı uygulanmıştır. LA ve SA uygulamalarının

7. gününde, büyüme parametreleri (kök ve toprak üstü dokuların taze ve kuru ağırlıkları), yaprak dokularında fotosentetik pigment içeriği, prolin içeriği, sistein ve tiyol içerikleri, lipid peroksidasyonu, antioksidan bileşiklerin [askorbat (AsA) ve glutatyon (GSH)] içerikleri, bazı antioksidan enzimlerin [süperoksit dismutaz (SOD), peroksidaz (POD), askorbat peroksidaz (APX), katalaz (CAT)] aktiviteleri belirlenmiştir. İlâveten, tuz stresi altındaki kanola fidelerinde dışsal lipoik asit uygulamasının yaprak proteom değişimleri üzerine etkisi 2-D [izoelektrik fokuslama-SDS-poliakrilamid jel elektroforez (IEF-SDS/PAJE)] tekniği ve kütle spektrometresi kullanılarak araştırılmıştır.

2. LİTERATÜR BİLGİLERİ

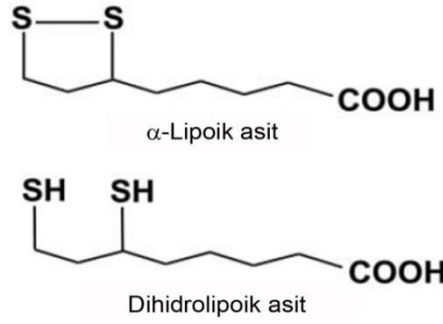
2.1 Kanola (*Brassica napus* L.) Bitkisi

Brassicaceae familyası yaklaşık 338 cins ve 3709 türden oluşmaktadır (Warwick *et al.* 2006). Bu familyada bir yağ bitkisi olarak üretimi yapılan kanola kışlık ve yazlık olarak ekilmektedir. Kanola Türkiye’de yaklaşık 7.8 milyon dekar yağlı tohum ekiliş alanının 311 bin dekarını ve yaklaşık 3.3 milyon ton yağlı tohum üretiminin 102 bin tonu ile ayçiçeği, çiğit, soya fasulyesi ve yer fıstığından sonra yer alan bir bitkidir (TÜİK 2013).

Yüksek erusik asit seviyesine ve tohumları işlendikten sonra kükürt yönünden zengin glukozinolatlara sahip olan kolza bitkisi insan sağlığı için risk oluşturduğundan dolayı, bu bileşenleri düşük seviyede içeren kanola (**Canadian Oil Low Acid**) çeşidi Kanada’da ıslah edilmiştir. Düşük oranda yağ asitleri içeren kanola bitkisinin Dünya’daki ekim alanı 34.1 milyon ha ve üretimi 65.1 milyon tondur. Dünya’daki en fazla yıllık kanola üretimi Kanada’da 15.4 milyon ton olarak belirlenmiştir (FAO 2012).

2.2 Lipoik Asit

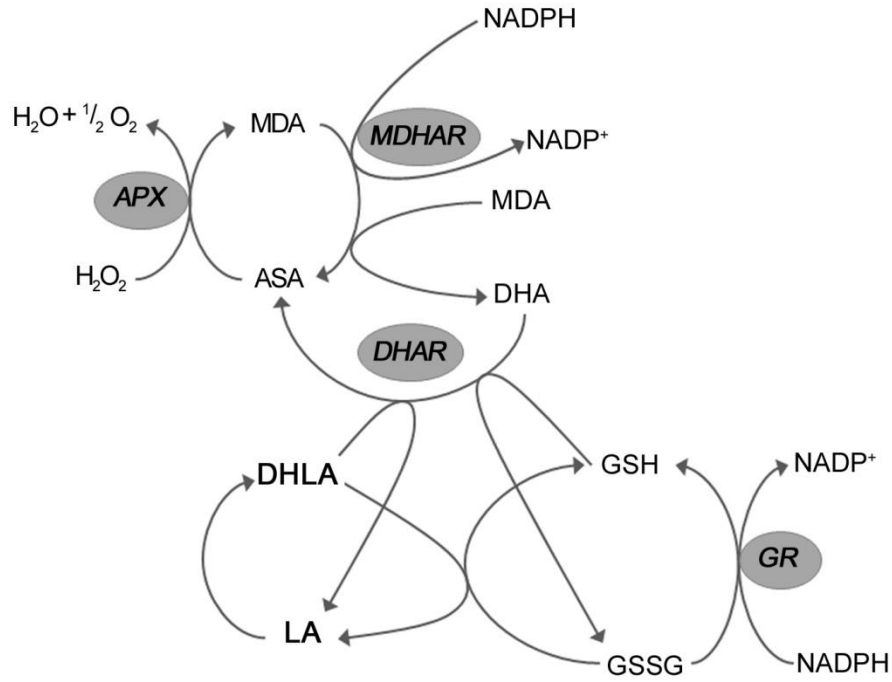
Lipoik asit (LA); pirüvat ve glisin metabolizmasında fonksiyon gören bazı enzimlerin (pirüvat dehidrogenaz kompleksi ve glisin dekarboksilaz kompleksi) kofaktörü olarak işlev gören ve kükürt içeren bir moleküldür (Şekil 2.1) (Gueguen *et al.* 2000). Bitkilerde LA biyosentezinin sadece mitokondrilerde değil, plastitlerde de mevcut olduğu bildirilmiştir (Wang *et al.* 1991). Enzimatik olmayan antioksidanlar arasında LA, hem yükseltgenmiş LA hem de indirgenmiş dihidrolipoik asit (DHHLA) formlarının (Şekil 2.1) koruyucu fonksiyonlarını sürdürmesinde özgün olmasına rağmen DHHLA çok daha etkili bir antioksidandır. DHHLA/LA oranı, tuzun metabolik etkilerine bağlı olarak değişmektedir (Navari-Izzo *et al.* 2002). Nispeten düşük moleküler ağırlıklı ve karboksilik asit uç-grubuyla 8-karbon zinciri olması nedeniyle su ve lipidte çözünebilir



Şekil 2.1 Lipoik ve dihidrolipoik asidin kimyasal yapısı.

olan DHLA, hücre membranındaki antioksidanların aktivitesi (α -tokoferol) ile sitoplazmadaki antioksidanların [askorbik asit (AsA) ve glutatyon (GSH)] aktivitesi arasında bağlantı kurarak antioksidan ağını kuvvetlendirir (Şekil 2.2) (Navari-Izzo *et al.* 2002). LA'ya göre daha düşük redoks potansiyeline sahip olan DHLA glutatyon ve askorbati indirgeyebilir (Gossett *et al.* 1994). Hidroperoksil, singlet oksijen (1O_2), $O_2^{\bullet-}$, $^{\bullet}OH$ gibi reaktif oksijen türlerinin temizlenmesinde LA direkt olarak işlev görmektedir (Navari-Izzo *et al.* 2002). Sadece LA formu, tiyosülfatları ve tiyosülfonatları oluşturan singlet oksijen ile reaksiyona girme yeteneğindedir (Borbe and Ulrich 1989). LA, dehidrogenazın substratından $NAD(P)^+$ ye elektronları taşıyan, bir redoks çifti olarak fonksiyon gören farklı multienzim komplekslerini kapsamaktadır (Navari-Izzo *et al.* 1988). Böylece GSH ve AsA'nın okside formlarına (GSSG ve DHA) bir elektron vererek bu bileşiklerin indirgenmesini sağlayabilmektedir (Şekil 2.2) (Biewenga *et al.* 1997). İndirgenmiş form olan DHLA'nın hayvan mitokondrilerinde lipid peroksidasyonuna karşı hücrelerin korunmasında rol oynadığı gösterilmiştir (Lapenna *et al.* 2003). Lipoik asit içeriği buğday, patates, domates ve kuşkonmaz gibi bitki türlerinde de varolduğu belirlenmiştir (Navari-Izzo *et al.* 2002, D'Amico *et al.* 2003, Sgherri *et al.* 2007, 2008). Gövdeye göre köklerde daha fazla miktarda bulunan LA'nın gövdedeki plastitlere taşınım için sentezlenmediği; ancak direkt olarak tuzluluğa maruz kalındığında savunma sistemlerine katkıda bulunabilmek için sentezlendiği ileri sürülmüştür (D'Amico *et al.* 2004). Kloroplastlarda LA sentezi bu organellerde savunma sistemine önemli katkı sağladığının bir göstergesidir. Bununla birlikte, tuz stresini takiben DHLA'nın gövdelerde azalması ve köklerde artması direkt olarak oksidatif strese maruz kalan bitki

kısımlarında içsel antioksidanların oluşması gerekliliğini bildiren bir sinyal olabilir (D'Amico *et al.* 2004). Tuz stresi altındaki bitkilerde, içsel LA ve tuz toleransı arasında birkaç çalışma olmasına karşın (D'Amico *et al.* 2004, Pérez-López *et al.* 2010), tuz toleransının teşvikinde dışsal LA uygulamasının etkilerini araştıran bir çalışma bulunmamaktadır. Pérez-López *et al.* (2010), tuza toleranslı ve hassas arpa çeşitleri arasında antioksidan metabolizmasında farklılıkların olduğunu bildirmiştir. Bu bağlamda, artan tuz konsantrasyonuna bağlı olarak tuza toleranslı arpa çeşidinde hassas çeşide göre DHLA'nın önemli düzeyde yüksek miktarlarda var olduğunu belirlemişlerdir (Pérez-López *et al.* 2010).



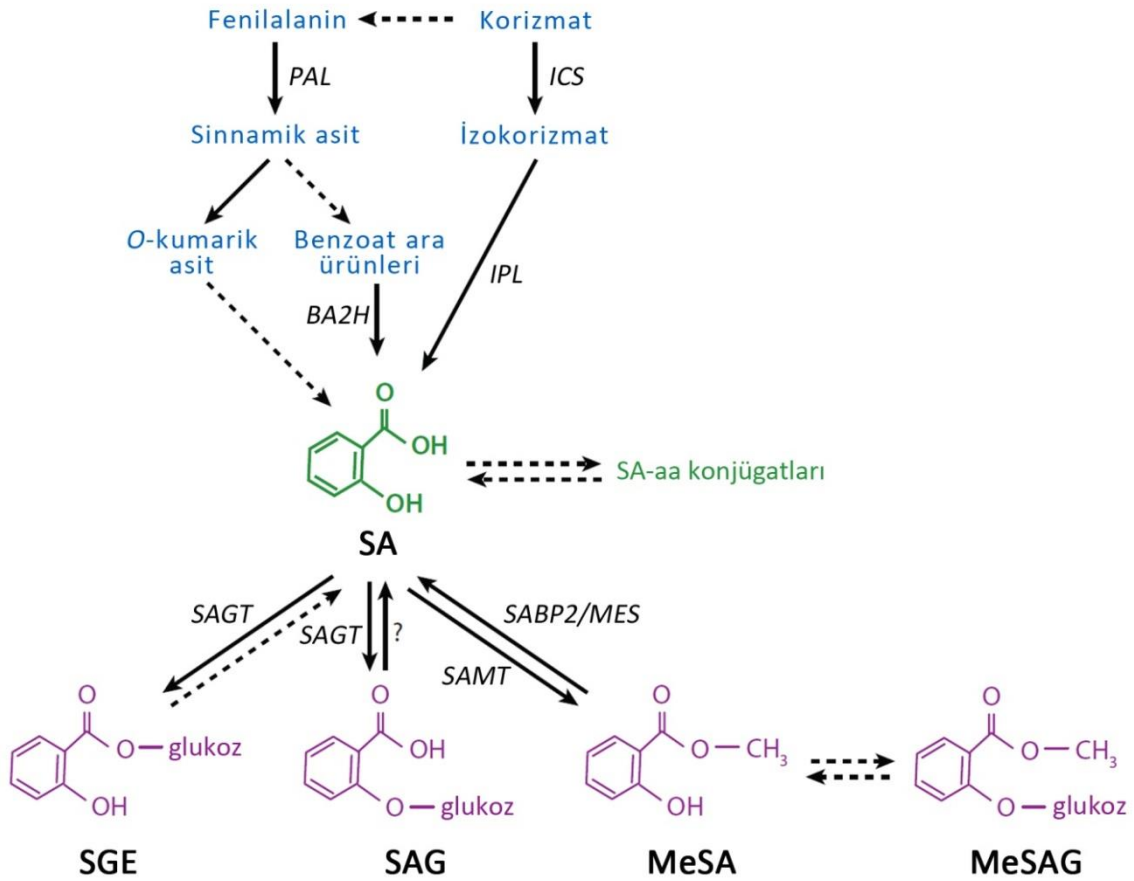
Şekil 2.2 Antioksidan metabolitlerin yeniden oluşturulmasında rol oynayan enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma sisteminin şematik gösterimi. APX, askorbat peroksidaz; AsA, indirgenmiş askorbat; DHA, dehidroaskorbat; DHAR, dehidroaskorbat redüktaz; DHLA, dehidrolipoik asit; GR, glutatyon redüktaz; GSH, indirgenmiş glutatyon; GSSG, okside glutatyon; LA, okside lipoik asit; MDA, monodehidroaskorbat; MDHAR; monodehidroaskorbat redüktaz.

2.3 Salisilik Asit

Salisilik asit (SA), bitkilerde birçok metabolik ve fizyolojik cevabı oluşturan ve dolayısıyla bitki büyüme ve gelişmesini etkileyen içsel bir bitki büyüme düzenleyicisidir (Hayat *et al.* 2010). SA, lokal patojen saldırısına karşı bitki savunma cevaplarında (hipersensitif cevap) ve sistemik kazanılmış dirençte önemli rol oynamaktadır (Alvarez 2000). SA stres koşullarında büyüme, gelişme ve savunma cevaplarında önemli rol oynayan bitki bir sinyal molekülüdür (Cameron 2000). Bitkilerde hastalık direnci sağlamanın yanında SA, birçok stres durumuna karşı bitki cevaplarını düzenleyebilmektedir (Shirasu *et al.* 1997).

Bitkilerde SA, primer metabolit korizmat gerektiren iki farklı enzimatik yol aracılığı ile oluşturulabilmektedir (Garcion and Métraux 2006, Wildermuth 2006). Korizmat-kökenli L-fenilalanin, ilk olarak fenilalanin amonyak liyaz (PAL) ile katalizlenen bir seri enzimatik reaksiyonlarla hem benzoat ara ürünleri hem de kumarik asit yoluyla SA'ya dönüştürülebilmektedir (Şekil 2.3). PAL enzimi farklı abiyotik ve biyotik stresler tarafından teşvik edilen, çok fonksiyonlu fenoliklerin farklı tiplerinin ortaya çıkmasına neden olan fenilpropanoid yolunun anahtar düzenleyicisidir (Yalpani *et al.* 1991). Korizmat, izokorizmat sentaz (ICS) ve izokorizmat pirüvat liyazın (IPL) fonksiyon gördüğü iki basamaklı reaksiyonla izokorizmat aracılığıyla SA'ya dönüştürülebilmektedir (Şekil 2.3) (Wildermuth *et al.* 2001, Strawn *et al.* 2007). *Arabidopsis*'te izokorizmat sentaz enzimini kodlayan iki gen (*ICS1* ve *ICS2*) teşhis edilmiştir. Patojen direncinin yanı sıra SA üretiminin ciddi şekilde azaldığı fonksiyonel *ICS1*'den yoksun mutantlarda, *ICS1*'in patojen veya UV ışığı ile teşvik edilen SA üretiminin yaklaşık %90'ından sorumlu olduğu gösterilmiştir (Wildermuth *et al.* 2001, Garcion *et al.* 2008). *ics1/ics2* çift mutantında rezidüel SA'nın ortaya çıkışı, *Arabidopsis*'de ICS yolunun tek SA kaynağı olmadığını doğrulamaktadır (Garcion *et al.* 2008). Bitkide üretilen salisilik asidin çoğu, patojen teşvikli SA glukozil transferaz (SAGT) ile SA O- β -glukozide (SAG) dönüştürülür (Şekil 2.3) (Dean *et al.* 2005, Song 2006). *Arabidopsis*'te SAGT enzimini kodlayan iki gen tanımlanmıştır: Biri tercihen SA'yı SAG'a çevirirken, diğeri daha az bolluktaki SA türevi olan salisilolil glukoz esterini (SGE) oluşturur (Dean and Delaney 2008). SA muhtemelen

kloroplastlarda sentezlenirken (Wildermuth *et al.* 2001, Garcion *et al.* 2008), SAGT'nin sitozolde lokalize olduğu ortaya çıkmaktadır (Dean *et al.* 2005). SAG, sitozolden vakuole aktif olarak taşınır ve vakuolde SA'ya geri dönüştürülebilir inaktif depo formu olarak fonksiyon görebilmektedir (Dean *et al.* 2005, Grün *et al.* 2006).



Şekil 2.3 Salisilik asit biyosentezi ve metabolizması için biyosentetik yol. PAL, fenilalanin amino liyaz; ICS, izokorizmat sentaz; IPL, izokorizmat pirüvat liyaz; BA2H, benzoik asit-2-hidroksilaz; SA, salisilik asit; SAGT, SA glukozil transferaz; aa, amino asit; SAMT, SA metil transferaz; SABP2, SA-bağlayıcı protein 2; MES, metil esteraz; SGE, SA glukoz esteri; SAG, SA O-β-glukozid; MeSA, metil salisilat; MeSAG, metil salisilat O-β-glukozid (Vlot *et al.* 2009'dan değiştirilerek).

Hücrelerde sentezlenen salisilik asit hücreler, dokular ve organların içinde veya dışında serbestçe hareket edebilir (Kawano *et al.* 2004) ve bu hareket ROT ve Ca²⁺ tarafından hassas bir şekilde düzenlenmektedir (Chen *et al.* 2001). Metil salisilat (MeSA), enfekte olmuş dokulardan enfekte olmamış dokulara floem aracılığı ile hareket eden uçucu

uzun mesafeli bir sinyal molekülüdür. MeSA, gerekli olduğunda salisilik aside dönüşebilen ve transloke olabilen SA'nın inaktif bir öncüsüdür. Radyoaktif etiketlenmiş SA'nın, tütün hücre süspansiyonu kültürlerinde SAG ve MeSAG'a hemen hemen eşit miktarlarda çevrildiği, MeSA seviyelerinin ise yaklaşık 5 kez daha düşük olduğu belirtilmiştir (Dean *et al.* 2005). Tütünde iki enzim SA ve MeSA arasındaki dengeyi kontrol etmektedir: Biyolojik olarak inaktif MeSA'yı aktif SA'ya çeviren SA bağlama protein 2 (SABP2) (Forouhar *et al.* 2005) ve SA'dan MeSA oluşumunu katalize eden SA metil transferaz 1 (SAMT1) (Ross *et al.* 1999). Park ve ark. (2007), MeSA'nın tütün bitkisinde önemli uzun mesafeli sistemik kazanılmış direnç sinyali olarak fonksiyon gördüğünü belirtmiştir.

2.3.1 Fizyolojik Roller

Salisilik asit bitki büyüme ve gelişmesi, fotosentez, stomatal regülasyon, solunum, çiçeklenme, senesens ve iyon alımında önemli rol oynamaktadır (Vicente and Plasencia 2011). Bitkilerde SA-aracılı büyüme ve gelişmenin moleküler durumları ile ilgili araştırmalar, SA'nın etki mekanizmalarının yanı sıra fizyolojik rollerinin daha iyi anlaşılmasını sağlamaktadır (Swain *et al.* 2011). Tohum çimlenmesinde SA'nın rolü ile ilişkili çalışmalar çelişkili olup; SA'nın ya çimlenmeyi inhibe ettiği ya da tohum canlılığını arttırdığı ileri sürülmüştür (Xie *et al.* 2007, Lee *et al.* 2010). Bildirilen bu etkiler, uygulanan SA konsantrasyonları ile ilişkili olabilmektedir. *Arabidopsis thaliana*'da, 1 mM'ın üzerindeki SA konsantrasyonlarının çimlenmeyi geciktirebildiği veya hatta inhibe edebildiği bildirilmiştir (Rajjou *et al.* 2006). Tohum çimlenmesinin negatif bir regülatörü olarak SA'nın etkisi, muhtemelen SA-teşvikli oksidatif stresten kaynaklanmaktadır. SA'nın büyümeyi stimüle edici etkileri soya fasulyesi (Gutierrez-Coronado *et al.* 1998), buğday (Shakirova *et al.* 2003), mısır (Gunes *et al.* 2007) ve papatyada (Kováčik *et al.* 2009) rapor edilmiştir. SA'nın büyümeyi teşvik edici etkilerinin hormonal durumdaki değişikliklerle (Shakirova *et al.* 2003, Abreu and Munne-Bosch 2009) veya fotosentez, transpirasyon ve stomatal iletkenliğin geliştirilmesiyle (Stevens *et al.* 2006) ilişkili olduğu ileri sürülmüştür. Bununla birlikte, SA'nın normal koşullarda *Arabidopsis* tohum

çimlenmesini geciktirdiği, buna karşın yüksek tuz konsantrasyonlarında oksidatif stresi azaltarak tohum çimlenmesini teşvik ettiği bildirilmiştir (Lee *et al.* 2010).

Salisilik asit bitkilerde metabolik cevapların geniş bir skalasını oluşturur ve hatta fotosentetik parametreleri ve bitki su ilişkilerini de etkiler. Fotosentez parametreleri üzerinde dışsal SA'nın etkileri, test edilen bitki türüne ve doza bağlıdır. Yüksek SA konsantrasyonunun (10^{-3} M) domates bitkilerinde stoma iletkenliği, CO₂ fiksasyon oranı, RuBisCO ve fotosentetik quantum etkinliğinde azalmaya neden olarak fidelerin ölümüne yol açtığı rapor edilmiştir (Poór *et al.* 2011). Düşük konsantrasyondaki (10^{-5} M) salisilik asitle ön-uygulama yapılmış tanelerden elde edilen buğday fidelerinde pigment içeriği önemli düzeyde artarken, daha yüksek konsantrasyonların yararlı olmadığı tespit edilmiştir (Hayat *et al.* 2005). SA'nın dışsal uygulamasının *Brassica juncea*'da net fotosentetik oran, içsel CO₂ konsantrasyonu, su kullanım etkinliği, stomatal iletkenlik ve transpirasyon oranını arttırdığı bulunmuştur (Fariduddin *et al.* 2003). Bununla birlikte, SA'nın alternatif oksidaz (AOX) yolunu teşvik ettiği kanıtlanmıştır (Rhoads and McIntosh 1992, Lei *et al.* 2008). AOX kloroplast ve mitokondriyal elektron transport zinciri boyunca hareket eden elektronları saptırmakta ve bu elektronları, oksijenin suya indirgenmesinde kullanarak ROT'ların üretimini azaltmaktadır. Salisilik asit uygulanmış *Cucumis sativus* ve *Lupinus luteus* bitkilerinde hem AOX transkript seviyesinin hem de protein seviyesinin arttığı bildirilmiştir (Lei *et al.* 2010, Belozeroва *et al.* 2014). Bununla birlikte, AOX yolunun düzenlenişi ve SA arasındaki ilişki halen açık değildir.

SA yaprak senesensi sırasında gen ifadesinin kontrolünde (Morris *et al.* 2000) ve *Arabidopsis* gibi bitkilerde çiçeklenme zamanının ilerlemesinde (Martinez *et al.* 2004) önemli bir rol oynamaktadır. Hücre redoks homeostazisi ve fotosentezde SA'nın önemli rolü incelendikten sonra bu bitki hormonunun senesens regülasyonuna katılması sürpriz değildir. Senesens ile SA sinyal yolunun ilişkisi, *Arabidopsis*'in yaşlanan yapraklarında detaylanmış gen ifade analizi ile doğrulanmıştır (Buchanan-Wollaston *et al.* 2005). SA birçok bitkide çiçeklenmeyi teşvik etmektedir (Martin-Mex *et al.* 2005,

Shimakawa *et al.* 2012). Salisilik asidin çiçeklenmeyi teşvik edici etkisi sadece stres koşulları altında gözlenmiş; bu nedenle SA'nın çiçeklenme için gerekli olabildiği, fakat çiçeklenmeyi teşvik etmek için yeterli olmadığı görülmektedir (Wada and Takeno 2010, Wada *et al.* 2010).

2.3.2 Bitki Tuz Toleransında Dışsal Salisilik Asit Uygulaması

Bir bitki fenolik bileşiği olan salisilik asit (SA), hormon-benzeri içsel bir düzenleyici olarak değerlendirilmektedir. Biyotik ve abiyotik stresörlere karşı savunma mekanizmalarında SA'nın rolü çok iyi karakterize edilmiştir (Gautam and Singh 2009, Zhang *et al.* 2011, Loutfy *et al.* 2012). Bitkilerin tuz stresine maruz kalması turgor, büyüme, fotosentetik oran, stomatal iletkenlikte azalma ve hücrel bileşenlerin zararlarını içeren ciddi fizyolojik ve biyokimyasal bozukluklara neden olmaktadır (Munns and Tester 2008). Tuz stresi altında büyüme ve gelişmenin sürdürülmesi ozmotik ayarlama, ozmokeruyucular/uyumlu ozmolitlerin sentezi veya bazı halofitlerde vakuolde Na^+ 'un birikimi ve alıkonmasıyla ilişkilidir (Kavi Kishor *et al.* 2005, Chinnusamy *et al.* 2005). Toprağa ilave edilen SA, tuz stresi sırasında mısır bitkilerinin canlılığı üzerinde iyileştirici etkiye sahiptir ve Na^+ ve Cl^- birikimi azalmıştır (Gunes *et al.* 2007). Ahmed ve ark. (2009), tuz stresi altında büyütülen domates bitkilerinin büyüme ortamına SA uygulamasının membran bütünlüğü ve fotosentetik pigmentlerin içeriğini koruyarak stresin zararlı etkilerinin azaltıldığını bildirmişlerdir. İlaveten, K^+ , Ca^{+2} ve Mg^{+2} alımında bir artış ve Na^+ ve Cl^- 'un alımında bir azalma saptanmıştır (Ahmed *et al.* 2009). Keza SA'nın yaprağa uygulanması ile farklı bitkilerde inorganik iyonların alınımı ve taşınımının değiştiği gösterilmiştir. Örneğin, tuz stresi altında büyütülen SA-uygulanmış mısır bitkilerinde N, Mg^{+2} , Fe^{+2} , Cu^{+2} ve Mn^{+2} birikimi önemli düzeyde artarken Na^+ ve Cl^- azalmıştır (Gunes *et al.* 2005). NaCl stresinde büyütülen domates bitkilerinde, yaprağa SA uygulaması ile gövde ve köklerde Na^+ 'un azalması, K^+ ve Mg^{+2} 'un artmasıyla NaCl'nin toksik etkisi önemli düzeyde azalmıştır (He and Zhu 2008).

SA ön-uygulamasını takiben tuz uygulamalarına maruz bırakılan domates fidelerinin yapraklarında uyumlu ozmolitler (örneğin; glukoz, fruktoz, sorbitol ve prolin) belirgin

bir şekilde birikmiş ve bitki büyümesi önemli düzeyde teşvik edilmiştir (Szepesi 2006). Yaprak su potansiyelinde tuz-teşvikli azalma köklerde ABA'nın artan birikimine neden olduğu ve tuzlu koşullarda gen ifadesi ve ABA sinyal transdüksiyon yollarını başlattığı belirlenmiştir (Szepesi 2006). Salisilik asit uygulanmış salatalık fidelerinde çözünebilir şekerlerin ve özellikle köklerde indirgeyici olmayan şekerlerin birikiminin ozmotik düzenleme ve bitki hücrelerinde su alımının kolaylaştırılmasında fonksiyon görerek NaCl stresine karşı fidelerin toleransını arttırdığı bildirilmiştir (Dong *et al.* 2011).

Misra ve Saxena (2009), mercimeklerde prolin metabolizmasında anahtar enzimlerin aktiviteleri ve bitki büyümesi üzerinde köke uygulanmış SA'nın etkisini incelemiştir. Uyumlu çözünenler, hücre dışında yüksek tuz konsantrasyonunu dengelemek ve vakuolde sodyum ve klor iyonlarının yüksek konsantrasyonlarını engellemek için esas olarak sitozolde birikirler (Kavi Kishor *et al.* 2005). Ekim öncesi buğday tohumlarının SA ile muamelesi, ozmotik potansiyel, K^+/Na^+ oranı ve fotosentetik pigmentlerin içeriğini kontrol ve tuzlu koşullarda pozitif olarak düzenlediği bildirilmiştir (Kaydan *et al.* 2007). Tuz stresi SA'nın varlığında mısır bitkilerinde prolin birikimini arttırmış ve bu durumun ozmotik ayarlama önemli olduğu belirtilmiştir (Gautam and Singh 2009). Prolin ve glisin betain gibi uyumlu çözünenlerin SA-teşvikli oluşumu, membranların ve proteinlerin kararlı olmasına ve böylece tuz stresine karşı toleransın artmasında etkilidir (Deef 2007).

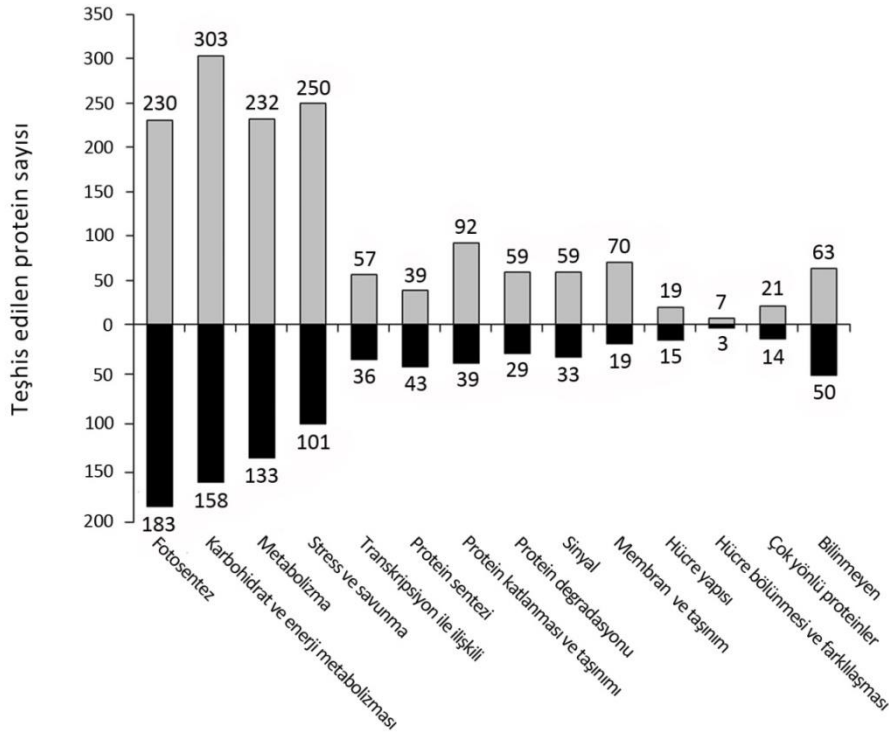
Salisilik asidin dışsal uygulaması, tuz stresine girmiş buğday bitkilerinde oksin ve sitokinin seviyelerinin düşmemesine, kök apikal meristeminde hücre bölünmesinin ilerlemesine ve verimliliğin artmasına neden olmuştur (Shakirova *et al.* 2003). Mısır yapraklarına SA uygulaması tuzun zararlı etkilerini ortadan kaldırmış ve fotosentetik kapasite, RuBisCO aktivitesi ve büyümenin artmasına neden olmuştur (Khodary 2004). Benzer etki, ayçiçeğinde fotosentetik etkinliğin geliştirilmesi şeklinde de gözlenmiştir (Noreen and Ashraf 2008).

Salisilik asit, bitkilerde bilinen diğer enzimatik olmayan antioksidanlara benzer olarak etkili bir antioksidandır (Rao and Davis 1999). Bir antioksidan olarak SA'nın direkt etkilerine ilave olarak, SA farklı antioksidan enzimlerin stimüle edilmesiyle bitki savunma mekanizmalarını teşvik edebilir. Farklı antioksidan enzimlerin aktiviteleri, tuzluluğa maruz kalma ve/veya SA uygulamasının sonucu olarak prolin içeriğindeki artışla uyumlu olarak artmış ve böylece tuz stresine karşı toleransın artması sağlanmıştir (Yusuf *et al.* 2008). İleri moleküler yaklaşımlar, savunma cevabında önemli rol oynayan proteinler/enzimleri kodlayan birçok detoksifiye ve antioksidan genleri ortaya çıkarmıştir (Holuigue *et al.* 2007). Stres koşulları altında SA ile artan yönde regüle olan genler S-transferaz, glikozil transferaz, peroksiredoksin, peroksidaz, tiyoredoksin, glutaredoksin ve patojen direnci genlerini içerir (Vanderauwera *et al.* 2005, Wang *et al.* 2005b). *Vigna radiata* bitkisinin tuza toleranslı (Pusa Vishal) ve hassas (T44) çeşitlerinde 0.5 mM SA uygulamasının, azot ve sülfür özümlemesi, glutatyon içeriği, askorbat peroksidaz ve glutatyon redüktaz aktivitesini arttırdığı, buna karşın 1.0 mM SA uygulamasının inhibitör etki gösterdiği bildirilmiştir (Nazar *et al.* 2011). Ayrıca SA'nın tuza hassas çeşide göre toleranslı çeşitte fotosentezde tuz teşvikli azalmayı hafiflettiği, nitrat redüktaz ve ATP sülfürlaz aktivitesini teşvik ettiği ve antioksidan metabolizmasını arttırdığı bildirilmiştir. Tuz stresi (250 mM NaCl) sırasında SA (0.5 mM) uygulanmış buğday fidelerinde askorbik asit ve glutatyon döngüsü enzimlerini kodlayan genlerin transkript seviyeleri ile askorbik asit ve glutatyon içeriklerinin arttığı belirtilmiştir (Li *et al.* 2013a).

2.4 Bitkilerde Tuz stresi ve Proteom Değişimleri

Proteomik, farklı proteomların kompozisyonlarının karşılaştırılması temelindedir. Bitki abiyotik stres araştırma alanında, en yaygın durum kontrol ve stres koşulları altındaki uygulama gruplarından izole edilen proteomların karşılaştırılmasıdır (Kosová *et al.* 2011). Tuz stresi ile teşvik edilmiş değişimlerle ilgili proteomik çalışmalar çok sayıda olup; esas olarak kontrol ve stres uygulanmış bitkiler arasında protein bolluğunda kantitatif değişiklikler üzerinde yoğunlaşmıştir (Liu *et al.* 2012, Yang *et al.* 2012, Li *et al.* 2013b). Spesifik olarak karbohidrat, azot ve özellikle glikolitik ve trikloroasetik asit

enzimleri olmak üzere enerji metabolizmasını kapsayan proteinlerin genel bir regülasyonu ortaya çıkmaktadır. Üstelik stres reaktif oksijen türlerinin (ROT'lar) oluşumu ve birikimini teşvik eden metabolik dengesizliklere neden olabilir (Suzuki *et al.* 2012); bu nedenle oksidatif zararı azaltmak için fonksiyon gören süperoksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APX) ve glutatyon redüktazı (GR) kapsayan, yani ROT'larla savaşan proteinlerin yaygın olarak kimliklendirilmesinin şaşırtıcı olmadığı bildirilmiştir (Gill and Tuteja 2010). Birçok çalışmada, hücre iskeleti kararlılığı kadar protein sentezi, işlenmesi, etkinliği ve parçalanmasını kapsayan diğer proteinler kimliklendirilmiştir. Fotosentetik işlevlerle ilgili olarak klorofil biyosentezi ile ilişkili proteinlerin seviyesinde genel bir azalma belirlenirken ışık-bağımlı reaksiyonlarda görev alan proteinlerde bir artma gözlenmiştir. Kimliklendirilmiş bazı proteinler bitkilerde genel strese cevap yolunun belirleyicisidir. Sinyal, trafikleme, transport ve hücre yapısı kategorilerinde kimliklendirilmiş proteinler daha az yaygındır (Şekil 2.4) (Barkla *et al.* 2013).



Şekil 2.4 Tuz-teşvikli ve tuz stresi ile azalmış farklı fonksiyonel kategorideki proteinlerin ifade profilleri. x eksenindeki sütunlar tuz-teşvikli ve altındaki sütunlar ise tuz stresi ile azalmış proteinlerin sayısını göstermektedir (Zhang *et al.* 2012).

2.4.1 Fotosentez ve Solunum Metabolizması

Tuz stresine maruz kalan birçok bitkide sıklıkla fotosentetik kapasitelerindeki azalma ile ilişkili olarak büyümede azalma genel bir olaydır. Tuz stresinde fotosentezdeki azalma esas olarak CO₂ özümlemesinin karbon indirgeme işlevlerini kapsayan kısmi stoma kapanması ve/veya stomatal olmayan sınırlama ile ilişkilidir (Brugnoli and Bjorkman 1992, Qiu and Lu 2003). Proteomik sonuçlar, tuz stresine cevap ve tuza toleransın altında yatan fotosentetik işlevlerin anlaşılmasını önemli düzeyde arttırmıştır. Bu tuza-cevap proteinleri ışık reaksiyonu, CO₂ özümlemesi ve diğer fotosentezle ilişkili işlevlerin regülasyonunu kapsar (Zhang *et al.* 2012).

Fotosentezin anahtar bir bileşeni olan fotosistem II (PSII)'nin merkez ünitesi, suyun ışık tarafından moleküler oksijene ayrıştığı, plastokinonun indirgendiği ve bir transmembran proton gradientinin olduğu öz kompleksidir (Zouni 2001). PS II'nin proteinlerindeki artma ya da azalma; fotosentez (Ruban *et al.* 2003), ışık-zararı (Wykoff *et al.* 1998) ve fotoinhibisyonu (Silva *et al.* 2003) etkilemektedir. PS II'nin lümen kenarına bağlı oksijen çıkış kompleksi, PS II'nin verici bölge fotoinhibisyonunda reaksiyon merkez-bağlama proteini D1'in çapraz bağlı ürünlerinin oluşumunu düzenler (Yamamoto 2001). Işık toplayıcı kompleks klorofil a/b-bağlama proteini ve oksijen çıkışını arttıran protein tuzluluğa cevap olup; tuz stresinin üstesinden gelmede PS II'nin aktivitesine neden olmaktadır (Pang *et al.* 2010, Bandehagh *et al.* 2011, Fatehi *et al.* 2012). Üstelik PS II'den serbest kalan elektronlar, sitokrom b₆f kompleksi aracılığı ile PS I'e transfer edilmektedir. Proteomik sonuçlar, sitokrom b₆f kompleksi kadar PS I reaksiyon merkezi proteininin miktarının da tuz stresinden etkilendiğini göstermiştir (Wang *et al.* 2009, Xu *et al.* 2010, Pang *et al.* 2010). Miktardaki değişiklikler elektron transfer etkinliği ve transmembran elektrokimyasal proton gradientlerini değiştirebilir, dolayısıyla ATP sentezi ve NADPH oluşumu etkilenir. Tuz stresine maruz kalan bitkilerde, kloroplast ATP sentazlar ve ferredoksin NADP(H) oksidoredüktazların çoklu izoformlarının tuzluluk tarafından regüle olduğu bulunmuştur (Zörb *et al.* 2009, Yu *et al.* 2011, Li *et al.* 2011). Bu sonuçlar, tuz stresi altındaki bitkilerde ATP sentezinin ayarlanması ve termal dağılımında bu enzimlerin çoklu izoformlarının yer aldığı

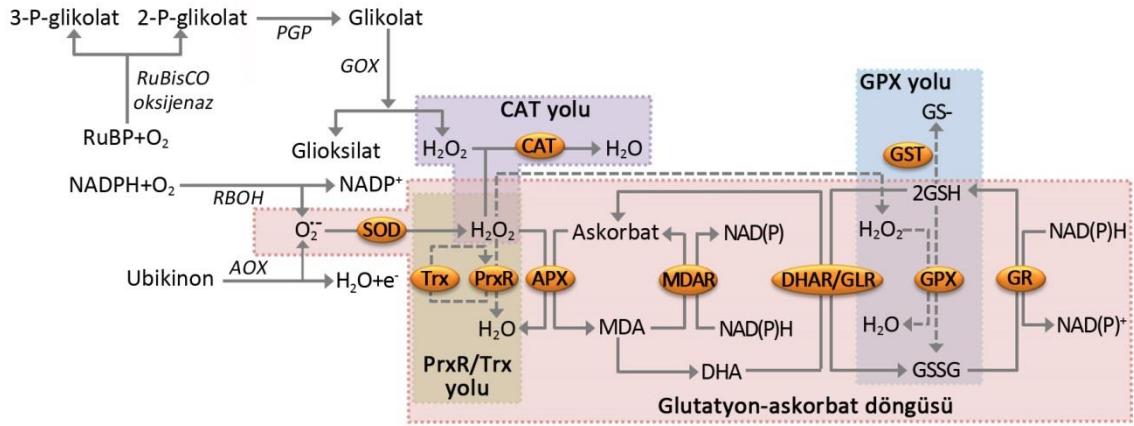
anlamına gelmektedir (Zhang *et al.* 2012). Işık reaksiyon değişikliklerine ilaveten, karbonik anhidraz, ribuloz-1,5-bifosfat sentetaz, RuBisCO, rubisko aktivaz, RuBisCO bağlayan protein, fruktoz bifosfataz, sedoheptulaz-1,7-bifosfataz ve fosforibulokinaz gibi Calvin döngüsü enzimlerinin ifadesi tuzluluk tarafından etkilenmektedir (Caruso *et al.* 2008, Pang *et al.* 2010, Yu *et al.* 2011). Bu CO₂ özümlemesi ile ilişkili enzimlerin çoğu tuz stresi altında farklı bitki türlerinde çeşitli değişiklikler göstermektedir (Zhang *et al.* 2012).

NaCl stresi altında, bitkiler enerjiyi korumak için enerji metabolizma hızlarını azaltır ve ROT oluşumunu sınırlar (Moller 2001). Glikoliz, TCA siklusu, mitokondrial solunum ve pentoz fosfat yollarının bileşenlerinin transkript bolluğu NaCl uygulanmış bitkilerde genellikle değişmiştir (Jiang and Deyholos 2006, Jiang *et al.* 2007). Fruktoz bifosfat aldolaz, triozfosfat izomeraz, gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz, fosfogliserat kinaz, fosfogliserat mutaz, enolaz, pirüvat dekarboksilaz ve alkol dehidrogenazı içeren glikolize ilişkin çoğu proteinler tuz stresi altında artmıştır (Peng *et al.* 2009, Du *et al.* 2010, Li *et al.* 2010, Manaa *et al.* 2011). Benzer etkiler pirüvat dehidrogenaz, dihidrolipoamid dehidrogenaz, akonitat dehidrataz, izositrat dehidrogenaz, süksinil-CoA ligaz ve malat dehidrogenazı içeren TCA siklusundaki tuza cevap enzimleri için de gözlenmiştir (Du *et al.* 2010, Zhou *et al.* 2011, Nam *et al.* 2012). Üç proton-taşıyan ATPaz'lar, iki vakuolar ATP sentetaz ve bir mitokondrial ATP sentaz delta zincirini içeren diğer enerji ile ilişkili proteinler NaCl teşvikine cevap olarak saptanmıştır (Jiang *et al.* 2007, Wang *et al.* 2008). Mitokondrial ATP sentaz, solunum zincirinin elektron transport kompleksleri tarafından oluşturulan proton gradientinin varlığında ADP'den ATP oluşturur (Das 2003).

2.4.2 Reaktif Oksijen Türlerine (ROT'lar) Karşı Savunma Sistemleri

Tuz stresi, mitokondri ve kloroplastlardaki elektron transport zinciri, fotorespirasyon, yağ asidi oksidasyonu ve çeşitli detoksifikasyon reaksiyonlarının aşırı indirgenmesine neden olmaktadır (Miller *et al.* 2010). Bu işlemlere, birçok hücrel bileşen ve yapılarda oksidatif zarara neden olan ve hücrel redoks dengesini bozan ROT'ların hızlı artışları

eşlik eder (Parida and Das 2005). Bugüne kadar, süperoksit dismutaz (SOD) yolu, katalaz (CAT) yolu, askorbat (AsA)-glutatyon (GSH) siklusu, glutatyon peroksidaz (GPX)/GST yolu, peroksidaz (POD) yolu ve peroksiredoksin (PrxR)/tiyoredoksin (Trx) yolu gibi ROT seviyesini regüle etmek için farklı antioksidatif mekanizmalar tanımlanmıştır (Şekil 2.5) (Munns and Tester 2008).



Şekil 2.5 Bitkilerde ROT savunma sisteminde tuza cevapta proteinler/enzimlerin şematik gösterimi. AOX, alternatif oksidaz; APX, askorbat peroksidaz; CAT, katalaz; DHA, dehidroaskorbat; DHAR, dehidroaskorbat redüktaz; GLR, glutaredoksin; GOX, glikolat oksidaz; GPX, glutatyonperoksidaz; GR, glutatyon redüktaz; GSH, indirgenmiş glutatyon; GSSG, okside glutatyon; GST, glutatyon S-transferaz; MDA, monodehidroaskorbat; MDAR, monodehidroaskorbat redüktaz; NAD⁺/NADH, nikotinamid adenin dinükleotid; NADP⁺/NADPH, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat; PGP, fosfoglikolat fosfotaz; PrxR, peroksiredoksin; RBOH, solunum oksidaz homologu (NADPH oksidaz); RuBisCO, ribuloz-1,5-bifosfat karboksilaz/oksijenaz; RuBP, ribuloz-1,5-bifosfat; SOD, süperoksit dismutaz; Trx, tiyoredoksin (Zhang *et al.* 2012'den değiştirilerek).

SOD'lar, süperoksidin oksijen ve H₂O₂'ye dismutasyonunu katalizler ve bir hücre içinde ROT'a karşı savunmanın ilk basamağını oluşturur (Alscher *et al.* 2002). İlginç olarak, üç tip SOD geni transkriptlerinin NaCl uygulamasına cevap olarak azaldığı mikroarray analizleriyle belirlenmiştir (Jiang and Deyholos 2006). Proteomik çalışmalarda, SOD'un miktarındaki artış, tuza cevap veren türlerin birçoğunda bulunmuştur (Peng *et al.* 2009, Du *et al.* 2010, Zhou *et al.* 2011). SOD'un aktivite ve miktarındaki değişiklikler, tuz stresinin üstesinden gelmek için anahtar bir ROT savaşçısı olarak iş gördüğünü göstermektedir (Zhao *et al.* 2013).

Katalaz (CAT) sitozol, mitokondri, kloroplast ve peroksizomlarda oluşan H_2O_2 'yi uzaklaştırmak için önemli bir antioksidan koruma sistemlerinden biridir (Miller *et al.* 2010). Katalazlar esas olarak peroksizomlarda lokalize olmuştur ve hücrel indirgeyici eşdeğerleri tüketilmeksizin H_2O_2 'yi parçalar (del Rio *et al.* 2002). Bitkiler katalazların izozimlerine sahiptir. CAT-1 ve CAT-2 peroksizomlarla, CAT-3 ise mitokondri ile ilişkilidir. Proteomik çalışmalar, tuz stresi koşullarında *Oryza sativa*'da CAT seviyelerinin arttığını (Kim *et al.* 2005, Li *et al.* 2010); fakat *Citrusaurantium*, *Hordeum vulgare* ve *Cucumis sativus*'da azaldığını göstermiştir (Tanou *et al.* 2009, Witzel *et al.* 2009, Du *et al.* 2010).

ROT savunmasında önemli rolü olan peroksidazların (POD'lar) tuz stresi altındaki bitkilerde seviyelerinin arttığı gösterilmiştir (Sugimoto and Takeda 2009, Du *et al.* 2010). GPX/GST yolu genellikle oksidatif membran zararına karşı önemli enzimatik savunma sistemi olarak değerlendirilmiştir (Yoshimura *et al.* 2004). GPX, GSH ve/veya diğer indirgeyici eşdeğerleri kullanılarak hidroksil bileşiklere karşılık gelen H_2O_2 'yi indirgeyebilir. Glutasyon S-transferazlar, GPX aktivitesine sahiptir ve yağ asitleri ve nükleik asitlerin organik hidroperoksitlere indirgenmesi için GSH'ı kullanabilir (Cummins *et al.* 1999). Proteomik literatürlerinde, GST'lerin çoğu tuz stresi altındaki bitkilerde artmıştır (Pang *et al.* 2010, Ruan *et al.* 2011, Kumar Swami *et al.* 2011). Bununla birlikte, AsA-GSH döngüsü ile H_2O_2 yok edilebilir. Bu işlevde, monodehidroaskorbat (MDHAR), dehidroaskorbat redüktaz (DHAR) ve glutasyon redüktaz (GR) tarafından katalizlenen redoks reaksiyonlarında APX AsA'yı kullanarak H_2O_2 'yu H_2O 'ya indirger (Miller *et al.* 2010). APX, MDAR, DHAR ve GR'yi içeren AsA-GSH döngüsü enzimleri tuz stresi proteomik çalışmalarında bulunmuştur ve bu enzimler farklı ifade profilleri göstermiştir (Tanou *et al.* 2009, Wang *et al.* 2009, Li *et al.* 2010). Peroksiredoksin/Tiyoredoksin (PrxR/Trx) yolu bitkilerde merkezi antioksidan savunma sistemidir. PrxR'ler, ROT metabolizmasını kapsayan multigenik bir familyayı oluşturur (Horling *et al.* 2003). PrxR'ler, H_2O_2 'yu indirgemek için tiyol-temelli katalitik mekanizmayı kullanır ve elektron vericileri olarak Trx'leri kullanarak yeniden oluşur

(Dietz 2011). PrXR'ler ve Trx'de bir artış tuz stresi koşullarında bazı türlerde gözlenmiştir (Kim *et al.* 2007, Zörb *et al.* 2010, Fatehi *et al.* 2012).

2.4.3 Tuz Stresine Cevapta Sinyal Yolları

Tuz stresi sinyali; iyonik, ozmotik, detoksifikasyon, hücre bölünmesi ve genişlemesini düzenlemek için sinyallerini içerir (Zhu 2002). Plazma membranı veya sitoplazmada lokalize olan geçici tuz sinyal reseptörleri tuza cevap proteomik çalışmalarında kimliklendirilmiştir (Cheng *et al.* 2009, Zhang *et al.* 2009). Tuz toleransının sinyal transdüksiyonu önemli bir konudur ve tuza aşırı duyarlı sinyal yolu, ABA sinyal yolu, Ca⁺² sinyal transdüksiyon yolu, protein kinaz yolu, fosfolipid yolu, etilen sinyal yolu ve jasmonik asit teşvikli sinyal yolu gibi birçok tuza cevap sinyal yolu belirlenmiştir (Zhu 2002, Cao *et al.* 2008, Mahajan *et al.* 2008).

Abiyotik stres koşullarına cevapta heterotrimerik G-proteini kompleksi ve ilgili G-protein eşleşme reseptörleri önemli bir rol oynamaktadır (Misra *et al.* 2007). Heterotrimerik GTP-bağlama proteinleri (G protein), bir sinyalin spesifik bir hücrenel cevaba dönüştürmek için spesifik bir sinyal kaskad düzenleyicisi olarak bilinmekte (Perfus-Barbeoch *et al.* 2004) ve bu heterotrimerik proteinin alt ünitesi bitkilerde tuza toleransta görev almaktadır (Tuteja 2007). Proteomik çalışmalar ile bazı bitki türlerinde tuzla teşvik edilmiş G proteini ve birkaç küçük G proteini belirlenmiştir (Wang *et al.* 2008, Zhang *et al.* 2009). İlaveten, G proteininin iki alt ünitesini kodlayan genler NaCl uygulamasıyla artan yönde regüle olmuş (Misra *et al.* 2007, Wang *et al.* 2008) ve bir G proteini transkripti tuz stresine girmiş *Mesembryanthemum crystallinum*'da da artmıştır (Bolte *et al.* 2000). Proteomik sonuçlar, tuza cevapta G proteinlerindeki miktar değişimleri üzerine yeni bilgiler sağlamaktadır. G protein mutantları ve protein-protein ilişkilerinin proteomik analizleri, tuzluluk cevabında sinyal ağları ve G protein fonksiyonu hakkında bilgiyi arttırmıştır (Zhao *et al.* 2013).

Tuz stresi teşvikli Ca⁺² bağımlı sinyal ağı, Na⁺ homeostazisi ve tuz direncine aracılık etmektedir (Mahajan *et al.* 2008). Bitki hücrelerinde Ca⁺², çok sayıda sinyal yolunda

özgün bir sekonder mesajcıdır. Kalmodulin (CaM), kalretikulin gibi farklı Ca^{+2} bağlayan proteinler ve sitozolik Ca^{+2} homeostazisinin regülasyonuna katılan gelişimsel olarak regüle olan plazma membranı polipeptidleri-benzeri proteinlerin (Ca^{+2} bağlama için glutamatça zengin bölge) tuz stresine girmiş bitkilerde teşvik edildiği proteomik çalışmalarla ortaya konmuştur (Jiang *et al.* 2007, Cheng *et al.* 2009, Li *et al.* 2010, Zörb *et al.* 2010).

Ökaryotlarda 14-3-3 proteinleri özgündür ve kalsiyum bağımlı protein kinaz ve mitojenle-aktive edilmiş protein kinaz (MAPK) kaskadları gibi birçok hücrel sinyal yollarını kapsar (Wu *et al.* 1997). Bitkilerde 14-3-3 proteinleri, iyon transportu ve sitoplazmik pH'ın kontrolü için gerekli olan plazma membranında elektrokimyasal gradienti kontrol eden plazma membranı H^{+} -ATPaz'ın pozitif düzenleyicileri olarak etki eder (Palmgren 1998). 14-3-3 proteinlerinin düşük sıcaklık, kuraklık ve tuz streslerine cevapta fonksiyon gördüğü bilinmektedir (Malakshah *et al.* 2007). MAPK'lar ilk olarak serin/treonin kinazlar olarak tanımlanmıştır. MAPK'lar çeşitli ikincil mesajcılar tarafından iletilmiş çoklu hücre içi sinyallerin birleştirilmesinde önemli rol oynamaktadır (Wrzaczek and Hirt 2001). Proteomik çalışmalarda, 14-3-3 grup proteinlerinin birçok üyesinin tuz stresi altındaki *Triticum aestivum*, *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* ve *Zea mays* gibi bitki türlerinde artan yönde regüle olduğu belirtilmiştir (Ndimba *et al.* 2005, Wang *et al.* 2008, Cheng *et al.* 2009, Zörb *et al.* 2010). Bununla birlikte, *A. thaliana* ve *Lathyrus sativus* bitkilerinde yapılan proteomik çalışmalar MAPK'ların tuz stresine cevap olarak artan yönde regüle olduğunu ortaya koymuştur (Pang *et al.* 2010, Chattopadhyay *et al.* 2011). Ayrıca MAPK'ların, patojen ve diğer streslere karşı uygun cevapların sağlanması için salisilik asit ve jasmonik asit bağımlı sinyallerin birleştirilmesinde fonksiyon gördüğü belirtilmiştir (Zhang *et al.* 2012).

Tuza aşırı duyarlı (SOS) stres sinyal yolu, bitki iyon homeostazisi ve tuz toleransının esas düzenleyicisi olarak tanımlanmıştır (Hasegawa *et al.* 2000b, Sanders *et al.* 2002). SOS sinyal iletim yolunda, miristoyillenmiş kalsiyum-bağlayan protein SOS3, tuz stresi

tarafından ortaya çıkarılan sitozolik kalsiyum değişikliklerine duyarlıdır. SOS3 fiziksel olarak SOS2 (serin/treonin kinaz) ile ilişkilidir ve onu aktive eder. SOS3/SOS2 kinaz kompleksi, *sos1* geni tarafından kodlanan plazma membranı Na^+/H^+ antiportörünü fosforile ve teşvik eder. SOS1 (plazma membranı Na^+/H^+ antiportörü)'in transport fonksiyonunun yanı sıra düzenleyici bir role sahip olabileceği ve hatta Na^+ için yeni bir sensör olabileceği ileri sürülmüştür (Shi *et al.* 2000). Karşılaştırmalı proteomik çalışmaları protein kinaz kaskadlarında daha fazla NaCl'ye cevap veren proteinleri ortaya çıkarmıştır (Chitteti and Peng 2007, Peng *et al.* 2009, Zhou *et al.* 2011). Bununla birlikte, fosfoproteomik bir çalışma ile de fosfoproteinler ve tuz stres sinyal transdüksiyonundaki fosfoproteinlerde meydana gelen dinamik değişiklikler saptanmıştır (Zhao *et al.* 2013).

2.4.4 İyon Homeostazisi

Tuzlu koşullar altında, Na^+ ve Cl^- 'un yüksek apoplastik seviyeleri sulu ve iyonik termodinamik dengesini değiştirir. Bu hiperozmotik stres, iyonik dengesizlik ve toksisite ile sonuçlanır. Stresin üstesinden gelmek için, bitki kökleri iyon homeostazisini modüle etmek için artan Na^+ çıkışı ve kompartımanlaşması ve azalan Na^+ girişi mekanizmalarını geliştirmiştir (Zhang *et al.* 2012). İyon (K^+ ve Na^+) homeostazisinin sürdürülmesi oldukça hassas bir işlemdir ve esas olarak H^+ -ATPaz'lar, farklı iyon kanalları ve transportörlerinin aksiyonu tarafından oluşturulan proton-itici güce dayanır (Gong *et al.* 2000).

Vakuolar H^+ -ATPaz, tonoplast Na^+/H^+ antiportörü tarafından kullanılan sürdürücü güç olan bir proton elektrokimyasal gradienti oluşturarak vakuole Na^+ kompartımanlaşmasını sağlar (Chinnusamy *et al.* 2005). V-ATPaz, bitkilerde hücre Na^+/K^+ homeostazisini sürdürmek için vakuolar sodyum ayrıştırmasına aracılık eden tonoplastta Na^+/H^+ antiportörünü harekete geçirmek için proton itici güç sağladığı bilinmektedir (Barkla *et al.* 2002). Bu durum, V-ATPaz'ın iyon zararından hücreleri korumada kritik bir öneme sahip olduğunu göstermektedir. V-ATPaz'ın sentezindeki artış, tuz stresine girmiş bazı bitkilerde bulunmuştur (Wang *et al.* 2008, Du *et al.* 2010,

Yang *et al.* 2012). Vakuolar H⁺-ATPaz'ların artan seviyeleri ve/veya aktiviteleri, tuz stresi altında Na⁺ ayrıştırması ve ozmotik ayarlama için oldukça etkili strateji olarak değerlendirilmiştir (Pang *et al.* 2010).

ABC transportörleri; alkaloidler, terpenoidler, polifenoller ve kinonlar gibi stres ilişkili sekonder metabolitlerin taşınmasından sorumludur (Yazaki 2006). İlâveten, ABC transportörleri bitkilerde tuz stres cevabı ve K⁺ homeostazisine katılmaktadır. *Arabidopsis* atmrp5-2 mutanlığı tuzlu koşullarda yabancı tip bitkilerden daha fazla Na⁺ ve daha az K⁺ biriktirir (Lee *et al.* 2004). Diğer ABC transportör geni *Ospdr9* tuz stresi altında çeltik köklerinde teşvik edilmiştir (Moons 2003). Tuza toleranslı ve duyarlı buğday çeşitlerinde ABC transportörlerindeki artış, bu transportörlerin tuza cevaptaki önemini göstermektedir (Wang *et al.* 2008, Peng *et al.* 2009). Üstelik voltaj-geçitli potasyum kanalı (VGPC), voltaj-bağımlı anyon kanalı (VDAC) ve siklik nükleotid-geçitli kanal (CNGC) proteinlerini içeren önemli iyon kanal proteinleri tuz stresine cevap olarak kök proteomlarında belirlenmiştir (Dreyer and Uozumi 2011). VGPC, tuz stresinin üstesinden gelmek için köklerde anormal K⁺/Na⁺ korumak için sitozolde K⁺ konsantrasyonunu düzenler ve K⁺ taşır (Dreyer and Uozumi 2011). Toleranslı ve duyarlı buğday çeşitlerinin köklerinde VGPC'nin miktarındaki artış, tuzluluk altında iyon homeostazisinin sürdürülmesinde VGPC'nin rolünü göstermektedir (Peng *et al.* 2009). VDAC proteini, *Zea mays* ve *Beta vulgaris*'de tuz stresi tarafından teşvik edilmiştir (Kawasaki *et al.* 2001, Zörb *et al.* 2010). VDAC, membranlar arası boşluğa küçük moleküllerin (<1000 Da) geçişinden sorumludur. Bununla birlikte, proteomik çalışmalar temelinde birçok anneksin izoformları *Triticum aestivum*, *Arabidopsis thaliana*, *Glycine max*, *Oryza sativa* ve *Solanum lycopersicum*'da tuzlulukla teşvik edilmiştir (Peng *et al.* 2009, Pang *et al.* 2010, Manaa *et al.* 2011). Anneksinin ROT-teşvikli pasif Ca⁺² transport yolunun oluşumu için endomembran ve plazma membranında Ca⁺²-geçirebilir kanal olarak fonksiyon gördüğü bilinmektedir (Laohavisit *et al.* 2010).

2.4.5 Transkripsiyon ve Protein sentezi

Bitkilerde farklı stres koşullarına cevap olarak tuza cevap genlerinin transkripsiyonel regülasyonu önemli bir stratejidir (Jiang *et al.* 2007). Tuz stresine cevapta ve tuzluluk toleransında, transkripsiyon faktörleri ve transkripsiyon ilişkili proteinlerin seviyelerinin önemli bir rol oynadığı proteomik çalışmalarla gösterilmiştir (Zhang *et al.* 2012). Bazı genlerin transkripsiyonu, tuz-teşvikli transkripsiyon faktörleri, çinko parmak proteini, temel/heliks-ilmek-heliks ve reverse transkriptazdan dolayı tuz stresi altında köklerde teşvik edilmiştir (Chitteti and Peng 2007, Peng *et al.* 2009, Manaa *et al.* 2011, Zhou *et al.* 2011). RNA işleme enzimleri/faktörleri, farklı stres koşulları altında farklı ifade profilleri göstermiştir. Bunlara birer örnek olarak tuz teşvikli RNA splicing ilişkili proteinler olan tRNA splicing proteini ve AAR2 proteini (splicing pre-mRNA için bir protein) ile RNA parçalanması için ribonükleaz verilebilir (Wang *et al.* 2008, Zörb *et al.* 2010). İlaveten, helikazlar kadar artan DNA polimerazlar ve DNA topoizomerazların tuz stresinde DNA replikasyonu, unwindingi ve transkripsiyonunu arttırdığı ileri sürülmüştür (Zörb *et al.* 2004, Wang *et al.* 2009, Pang *et al.* 2010).

Protein sentezi abiyotik stres adaptasyonunda önemli bir rol oynamaktadır. Proteomik çalışmalar, farklı ribozomal proteinler, translasyon başlama faktörleri, poli(A)-bağlama proteinleri, translasyon uzama faktörleri, translasyon olarak kontrol edilen tümör proteinleri, RNA tanıma motifi içeren proteinler ve t-RNA sentazları içeren protein sentez mekanizmasının birçok bileşeninin tuz stresi koşullarında ifadesinde değişiklikler olduğunu ortaya çıkarmıştır (Jiang *et al.* 2007, Peng *et al.* 2009, Pang *et al.* 2010). Uygun protein katlanma ve işlenmesi tuz stresi altında kök fonksiyonu için gereklidir. Moleküler şaperonlar (sıcaklık şok proteinleri, T-kompleks protein 1), protein disülfid izomerazlar, siklofilinler ve FK506-bağlama proteini gibi proteinler tuza cevap proteinleri olarak belirlenmiştir (Xu *et al.* 2010, Nam *et al.* 2012, Yang *et al.* 2012). Bu proteinler, stresle zarar görmüş proteinlerin onarılması ve renatürasyonu, normal protein katlanmasını sürdürmek için fonksiyon göstermektedir. Tuz stresi altında, ubikuitin/poliubikuitin/tetraubikuitin, SKP1 protein, proteozom bileşenleri, farklı proteazlar ve peptidazlar, proteaz inhibitörleri ve geri dönüşebilen protein-metiyonin-

S-oksit redüktazlar gibi proteozom yollarının bazı üyeleri miktarlarında değişiklikler göstermektedir (Wang *et al.* 2008, Pang *et al.* 2010, Xu *et al.* 2010). Protein turnoverındaki önemli rollerine ilaveten proteinlerin ubiquitin aracılığı ile degradasyonu, sinyal transdüksiyonu ve transkripsiyonu gibi diğer hücresel işlevlerin regülasyonunda fonksiyon gördüğü kesin değildir. Böylece bu tuza cevap proteinleri tuz toleransı için önemlidir (Zhang *et al.* 2012).

2.4.6 Hücre İskeleti ve Hücre Çeperi Bileşenleri

Tuzluluk koşullarında, hücre iskeleti hücre turgorunun sürdürülmesi için hücre boyutunun ayarlanmasını sağlamak için hızlıca yeniden modellenmektedir (Li *et al.* 2011). Tuz stresi koşullarında, temel hücre iskeleti bileşenleri (aktin ve tübülün), ksiloglukan endotransglikosilaz (XET) hidrolazlar, miyozin, kinezin motor ve diğer hücre iskeleti ile ilişkili proteinlerin (bazı aktin-bağlayan proteinler) miktar değişimlerinin ölçülmesiyle hücre iskeletinin dinamikleri proteomik çalışmalarla belirlenmiştir (Yan *et al.* 2005, Jiang *et al.* 2007, Wang *et al.* 2009, Zörb *et al.* 2010). Aktin filamentleri ve mikrotübülleri, tuza cevapta birçok hücresel işlevleri için son derece dinamik ağa hizmet eder. Tuzluluk, *Arabidopsis*'de aktin filamentlerinin düzenlenmesini ve demet oluşumunu teşvik eder; uzun süreli yüksek tuz uygulaması aktin filamentlerinin depolarizasyonuna neden olabilir (Wang *et al.* 2009). Birçok aktin bağlama proteini, aktin filamentlerinin fonksiyonel özellikleri ve dinamiklerini düzenlemektedir. Profilin aktine bağlanan özgün bir proteindir ve aktin filamentlerinin polimerizasyonu veya depolimerizasyonu ile hücre iskeletinin yapısını etkiler ve internal ve eksternal sinyallere hücrelerin cevabını sağlar (Shavrukov *et al.* 2010). Profilinin artan yönde regülasyonu, tuzun önemli miktarlarında hücresel davranışı ayarlamak ve tuzun toksitesini minimuma indirmek için görev yaptığı belirtilmiştir (Fatehi *et al.* 2012). Tuz stresi koşullarında, hücre iskeleti dinamikleri diğer fizyolojik değişiklikler ile ilişkilidir. Örneğin, aktin organizasyonunun ozmotik stresle regülasyonu bekçi hücrelerinde K⁺ kanal aktivitesiyle ilişkilidir (Luan 2002). İlaveten, tübülünler P-tipi ATPaz'lar ile birlikte göç eder (Campetelli *et al.* 2005) veya hücre genişlemesi ve morfolojisini kontrol etmek için plazma membranı ile ilişkilidir (Drykova *et al.* 2003).

Streslere cevap olarak, selüloz, hemiselüloz, pektin, yapısal proteinler ve lignin polimerlerini kapsayan hücre çeperindeki kompleks makromoleküller, farklı hücre çeperi enzimlerinin koordinasyonu aracılığı ile dinamik değişiklikleri sağlar (Liepman *et al.* 2010). Mevcut proteomik çalışmalar ile köklerde hücre çeperi polisakkarit sentezi/hidrolizi ve lignin biyosentezini kapsayan tuza cevap enzimleri tanımlanmıştır (Du *et al.* 2010, Manaa *et al.* 2011). Hücre çeperinde lignin oluşumu ve depozisyonu kök yapısının mekanik direncini etkiler (Degenhardt and Gimmler 2000). Tuz uygulamasının kök lignifikasyonunu teşvik ettiği (Neves *et al.* 2010) ve ligninleşmiş boruların sayısının arttığı (Sánchez-Aguayo *et al.* 2004) bildirilmiştir. Fenilpropanoid sentezi için de gerekli olan fenilalanin amonyak liyaz (PAL), lignin biyosentezinin ilk basamağında fenilalaninin sinnamilata dönüşümünü katalizler (Bonawitz and Chapple 2010). Buğday ve çeltik köklerinde PAL'ların azaldığı proteomik çalışmalarla tespit edilmiştir (Peng *et al.* 2009, Li *et al.* 2010). Bunlar arasında kafeik asit 3-O-metiltransferaz (CCOMT) ve kafeoil CoA 3-O-metiltransferaz hücre çeperinin lignin biyosentezinde önemli rol oynar (Pakusch *et al.* 1989). Lignin monomer oluşumuna paralel yolda CCOMT'ın katıldığı bildirilmiştir (Zhong *et al.* 1998). Tuz stresinden dolayı tilkikuyruğu darı fidelerinde kafeoil-CoA O-metil transferaz ve kafeik asit 3-O-metiltransferazın artan yönde regülasyonu proteomik çalışmalarla gösterilmiştir. Bu çalışmalar ile bu O-metil transferazların tuz stresine toleransta önemli rol oynadığı ileri sürülmüştür (Veeranagamallaiah *et al.* 2008). CCOMT'ın suberin ve lignin biyosentezini sağladığı ve artan lignifikasyonun apoplastik bir yol aracılığı ile köklere girişine Na⁺ iyonlarına izin veren su akışını sağlamada yardımcı olduğu ileri sürülmüştür (Yeo *et al.* 1999).

Bu araştırmada, kanola (*Brassica napus* L. cv. Sary) fidelerinde dışsal lipoik asit (LA) ve salisilik asit (SA) uygulamalarının tuz toleransı ve tuz stresi altındaki fidelerde LA uygulamasının yaprak proteom değişimleri üzerine etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, 18 günlük kanola fideleri artan NaCl konsantrasyonlarına [50 mM (24 sa), 100 mM (24 sa) ve 150 mM (5 gün)] maruz bırakılırken, tuz stresi ile

birlikte yapraklara spreyleme yoluyla 0.1 mM LA veya SA gün aşırı uygulanmıştır. LA ve SA uygulamalarının 7. gününde;

- 1) Büyüme parametreleri (kök ve toprak üstü dokuların taze ve kuru ağırlıkları), yaprak dokularında fotosentetik pigment içeriği, prolin içeriği, sistein ve tiyol içerikleri, MDA içeriği, antioksidan bileşiklerin [askorbat (AsA) ve glutatyon (GSH)] içerikleri, bazı antioksidan enzimlerin [süperoksit dismutaz (SOD), peroksidaz (POD), askorbat peroksidaz (APX), katalaz (CAT)] aktiviteleri belirlenmiştir.
- 2) Tuz stresi altındaki kanola fidelerinde dışsal lipoik asit uygulamasının yaprak proteom değişimleri üzerine etkisi 2-D [İzoelektrik fokuslama-SDS-poliakrilamid jel elektroforez (IEF-SDS/PAJE)] tekniği ve kütle spektrometresi (MALDI-TOF/TOF) kullanılarak araştırılmıştır.

3. MATERYAL ve METOT

3.1 Bitki Yetiştirme Koşulları ve Uygulamalar

Bu araştırmada, kanola (*Brassica napus* L. cv. Sary) tohumları ticari firmadan elde edilmiştir. Kanola çeşidine ait tohumlar, içerisinde distile su ile ıslatılmış iki kat filtre kağıdı bulunan 20×11.5×5 cm boyutlarında şeffaf plastikten yapılmış çimlendirme kaplarında kontrollü iklim kabininde (23°C, karanlık, %60 nem) 24 saat çimlendirilmiştir. Yaklaşık aynı kök uzunluğuna sahip çimlenmiş tohumlar seçilmiş ve perlite doldurulmuş (yaklaşık 10 cm³) drenajlı polistren tüplere (yaklaşık 50 cm³) ekilmiştir. Bu tüpler, 0.5 L besin çözeltisi [(mM): 2.4 Ca(NO₃)₂, 1.0 KH₂PO₄, 3.0 KNO₃, 1.0 MgSO₄ ve 0.5 NaCl, (µM): 23.1 H₃BO₃, 4.6 MnCl₂, 0.38 ZnSO₄, 0.16 CuSO₄, 0.052 H₂MoO₄ ve 44.8 FeEDTA; pH: 6.0] içeren 1 L'lik plastik saksıların kapaklarındaki deliklere yerleştirilmiştir. Fideler 3 gün daha kontrollü iklim kabininde hidroponik kültür ortamında karanlıkta büyütülmüştür. Bu süre sonunda, her bir kültür kabında toplam 10 fide kalacak şekilde seyreltmeye gidilmiştir. Dört günlük etiyole fideler kontrollü iklim kabininde (23°C, 110 µmol m⁻² s⁻¹ ışık yoğunluğu, 16:8 saat fotoperiyot ve %60 nem) 14 gün daha büyütülmüş ve besin çözeltileri gün aşırı değiştirilmiştir. Daha sonra kontrol ve artan tuz (NaCl) uygulamalarına transfer edilen 18 günlük fidelerin yapraklarına 7 gün boyunca lipoik asit (LA, %0.1 Tween-80 içeren %1'lik etil alkolde çözülmüş 0.1 mM lipoik asit çözeltisi) veya salisilik asit (SA, %0.1 Tween-80 içeren %1'lik etil alkolde çözülmüş 0.1 mM salisilik asit çözeltisi) çözeltileri spreyleneştir. Buna göre aşağıdaki uygulama grupları oluşturulmuştur (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1 Kanola fidelerinin maruz bırakıldığı uygulama grupları.

Uygulama	Açıklama
Kontrol (K)	Sadece besin çözeltisi içeren her bir kültür ortamındaki 18 günlük fidelerin yapraklarına 7 gün boyunca gün aşırı 12.5 mL'lik etil alkol (%1) + Tween 80 (% 0.1) karışımı püskürtülmüştür.
LA	Sadece besin çözeltisi içeren her bir kültür ortamındaki 18 günlük fidelerin yapraklarına 7 gün boyunca gün aşırı 12.5 mL'lik LA (0.1 mM) + Tween 80 (%0.1) karışımı püskürtülmüştür.

Çizelge 3.1 Devamı.

Uygulama	Açıklama
SA	Sadece besin çözeltisi içeren her bir kültür ortamındaki 18 günlük fidelerin yapraklarına 7 gün boyunca gün aşırı 12.5 mL'lik SA (0.1 mM) + Tween 80 (%0.1) karışımı püskürtülmüştür.
NaCl	Ozmotik şokun engellenmesi için 18 günlük fideler, 19. gün 50 mM, 20. gün 100 mM ve 21. gününden itibaren 150 mM NaCl içeren kültür ortamına transfer edilmiştir. Tuz uygulamaları ile aynı zamanda başlayarak gün aşırı olmak üzere fidelerin yapraklarına 12.5 mL'lik etil alkol (%1) + Tween 80 (%0.1) karışımı püskürtülmüştür.
NaCl + LA	Ozmotik şokun engellenmesi için 18 günlük fideler, 19. gün 50 mM, 20. gün 100 mM ve 21. gününden itibaren 150 mM NaCl içeren kültür ortamına transfer edilmiştir. Tuz uygulamaları ile aynı zamanda başlayarak gün aşırı olmak üzere fidelerin yapraklarına 12.5 mL'lik LA (0.1 mM) + Tween 80 (%0.1) karışımı püskürtülmüştür.
NaCl + SA	Ozmotik şokun engellenmesi için 18 günlük fideler, 19. gün 50 mM, 20. gün 100 mM ve 21. gününden itibaren 150 mM NaCl içeren kültür ortamına transfer edilmiştir. Tuz uygulamaları ile aynı zamanda başlayarak gün aşırı olmak üzere fidelerin yapraklarına 12.5 mL'lik SA (%1) + Tween 80 (%0.1) karışımı püskürtülmüştür.

Kontrol ve tuz uygulamalarına ait besin çözeltileri de gün aşırı değiştirilmiştir. Bununla birlikte, 18 günlük fidelerde ozmotik şokun engellenmesi amacıyla 19. gün 50 mM, 20. gün 100 mM ve 21. gün 150 mM NaCl olmak üzere aşamalı NaCl stres uygulamaları sonucu örneklemelerin yapılabildiği en yüksek konsantrasyon değeri (150 mM NaCl) yapılan ön çalışmalarla belirlenmiştir. İlaveten, yine yapılan ön çalışmalar ile belirlenen 0.1 mM LA ve SA konsantrasyonu, kanola fidelerinde NaCl toleransını teşvik etmek için optimum konsantrasyon olarak belirlenmiştir. Fideler, uygulamaların 7. gününde yapılacak analizlere uygun olarak hasat edilmiştir.

3.2 Toprak Üstü Organların Taze ve Kuru Ağırlıklarının Belirlenmesi

Altı farklı uygulamaya maruz bırakılan kanola fidelerinin (Çizelge 3.1) toprak üstü organlarının (gövde + yaprak) taze ağırlıkları (mg fide⁻¹) belirlendikten sonra 80°C'lik etüvde 48 sa süreyle kurutulmuş ve bu süre sonunda kuru ağırlıkları (mg fide⁻¹) belirlenmiştir.

3.3 Fotosentetik Pigment İçeriğinin Belirlenmesi

Altı farklı uygulamaya maruz bırakılan kanola fidelerinin (Çizelge 3.1) yaprak dokularından toplam klorofil (Klo *a* + *b*) ve karotenoidlerin ekstraksiyonu ve konsantrasyon tayinleri Wellburn (1994)'e göre yapılmıştır. Uygulamalara ait fidelerin yapraklarından yaklaşık 50 mg taze yaprak dokusu alınmıştır. Küçük parçalara ayrılan dokular, 10 mL soğutulmuş metanol içeren ağzı kapaklı cam test tüplerine alınmıştır. Pigmentlerin tamamen metanole geçmesi için tüpler 48 sa süresince +4°C ve karanlıkta bekletilmiştir. Her uygulamaya ait çözeltinin Klo *a*, Klo *b* ve karotenoidlerin absorpsanları sırasıyla 666, 653 ve 470 nm dalga boylarında, TU-1880 Double Beam UV-VIS spektrofotometre kullanılarak ölçülmüş ve konsantrasyonlar aşağıdaki formüllere göre taze ağırlık (TA) temelinde mg g⁻¹ TA olarak hesaplanmıştır (Wellburn 1994):

$$\text{Klorofil } a \text{ (Klo } a) = 15.65A_{666} - 7.34A_{653} \times S^*$$

$$\text{Klorofil } b \text{ (Klo } b) = 27.05A_{653} - 11.21A_{666} \times S$$

$$\text{Karotenoidler} = (1000A_{470} - 2.86\text{Klo } a - 129.2\text{Klo } b)/221 \times S$$

* S: Seyreltme katsayısı

3.4 Prolin İçeriğinin Belirlenmesi

Altı farklı uygulamaya maruz bırakılan kanola fidelerinin (Çizelge 3.1) yaprak dokularında prolin içeriği Bates vd. (1973)'nin bildirdiği metoda göre belirlenmiştir. Sıvı azotta dondurulmuş yaprak dokusu (200 mg) havanda dövülmüş ve proteinlerin çöktürülmesi için 1.5mL %3'lük sülfosalisilik asit eklenmiştir. Örnekler ependorf tüplerine transfer edilmiş ve 8000 ×g'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Her bir örnekten

500 µL süpernatant ağzı kapaklı cam test tüplerine alınmış ve tüplere 2 mL glasiyal asetik asit ve 2 mL asit ninhidrin [%60'lık 6 M fosforik asitte %3'lük (w/v) ninhidrin] eklenmiştir. Test tüpleri 95°C'de 1 sa tutulmuştur. Tüpler buzda soğutulduktan sonra 2 mL toluen tüplere eklenerek vortekslenmiş ve oluşan üst faz kuvars küvete alınarak 520 nm'de TU-1880 DoubleBeam UV-VIS spektrofotometre ile absorbanları okunmuştur. Prolin konsantrasyonları, hazırlanan prolin standardı (0-100 µg mL⁻¹) kullanılarak hesaplanmıştır.

3.5 Sistein ve TiyoI İçeriklerinin Belirlenmesi

Altı farklı uygulamaya maruz bırakılan kanola fidelerinin (Çizelge 3.1) yaprak dokularında sistein içerikleri Gaitonde (1967)'nin bildirdiği standart protokole göre belirlenmiştir. Yaprak dokuları (500 mg) %5'lik perklorik asitte ekstrakte edilmiş ve homojenatlar +4°C ve 10000 ×g'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra süpernatant eş hacimde ninhidrin ayırıcı ve glasiyal asetik asit ile muamele edilmiştir. Örnekler 95°C'de 30 dakika inkübe edildikten sonra buz üzerinde soğutularak reaksiyon durdurulmuştur. Oluşan renk 560 nm dalga boyunda okunmuş ve sistein içeriği L-sistein ile elde edilen standart eğriyle belirlenmiştir. Sistein içeriği nmol g⁻¹ TA olarak ifade edilmiştir.

Altı farklı uygulamaya maruz bırakılan kanola fidelerinin (Çizelge 3.1) yaprak dokularında tiyoI içerikleri Nagalakshmi ve Prasad (2001)'a göre belirlenmiştir. Yaprak dokuları (500 mg) sıvı azot kullanılarak havanda toz haline getirildikten sonra 20 mM EDTA ve 20 mM askorbik asit içeren ekstraksiyon tamponunda homojenize edilmiştir. Homojenatlar +4°C ve 12000 ×g'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Protein olmayan (non-protein) tiyoI (NPT) içeriklerinin belirlenmesi için 1 mL süpernatant 2 mL %10'luk (w/v) sülfosalisilik asit ile karıştırılmıştır. Daha sonra bu karışım 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 15 dakika 3000 ×g'de santrifüj edilmiştir. Santrifügasyondan sonra 2 mL süpernatant 1.9 mL 400 mM Tris-HCl (pH 8.9) tamponu ve 0.1 mL 10 mM 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoik asit (Ellman's ayırıcı) ile karıştırılmıştır. Karışımlar 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 412 nm'de absorbanları

ölçülmüştür. Tiyol grupları ekstinksiyon katsayısı ($\varepsilon = 13.100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) kullanılarak hesaplanmıştır (Harmens *et al.* 1993).

3.6 Lipid Peroksidasyonunun Belirlenmesi

Altı farklı uygulamaya maruz bırakılan kanola fidelerinin (Çizelge 3.1) yaprak dokularında lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan malondialdehit (MDA) miktarının belirlenmesi Heath ve Packer (1985)'in bildirdiği metoda göre yapılmıştır. 250 mg yaprak dokusu 5 mL %5'lik trikloroasetik asit (TCA) ile homojenize edilmiştir. Homojenatlar +4°C ve 12000 $\times g$ 'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatanttan 250 μL alınarak üzerine %0.5 tiyobarbütirik asit (TBA) içeren %20'lik TCA çözeltisi eklenmiştir. Bu karışım daha sonra 95°C'de 30 dakika su banyosunda tutulmuştur. Su banyosundan çıkarılan tüplerdeki reaksiyonları durdurmak için tüpler buz banyosuna konulmuştur. Sonrasında örnekler 2 mL'lik test tüplerine alınarak 10000 $\times g$ 'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar kuvars küvetlere alınarak 532 ve 600 nm'de TU-1880 Double Beam UV-VIS spektrofotometre ile absorbansları ölçülmüştür. Kör olarak %0.5 TBA ihtiva eden %20'lik TCA çözeltisi (örnek içermeyen) kullanılmıştır. Yaprak dokularının MDA içeriği molar ekstinksiyon katsayısı ($\varepsilon = 155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) kullanılarak $\mu\text{mol g}^{-1}$ TA olarak belirlenmiştir.

3.7 Antioksidan Enzim Aktiviteleri ve Antioksidanların İçeriklerinin Belirlenmesi

3.7.1 Enzim Ekstraksiyonu

Altı farklı uygulamaya maruz bırakılan kanola fidelerinin (Çizelge 3.1) yaprak dokuları (500 mg) 1 mM EDTA, %1 (w/v) polivinilpirrolidon (PVP) ve 5 mM askorbik asit (yalnızca APX için) içeren 5 mL 50 mM potasyum fosfat tamponunda (pH 7.0) homojenize edilmiştir. Homojenat +4°C ve 14 000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar süperoksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APX), guaiakol peroksidaz (POD) ve katalaz (CAT) gibi antioksidan enzimlerin aktivitesinin belirlenmesi için kullanılmıştır. Süpernatantlardaki protein miktarı Bradford (1976)'a göre belirlenmiştir.

3.7.2 Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesinin Belirlenmesi

Süperoksit dismutaz (SOD; EC 1.15.1.1) aktivitesi, nitroblue tetrazolium (NBT) metoduna göre (Beauchamp and Fridovich 1971) NBT'nin fotoindirgenmesinin 560 nm'de ölçülmesi ile belirlenmiştir. Aktivite tayini için 50 mM fosfat tamponu (pH 7.8), 0.1 mM EDTA, 13 mM metiyonin, 75 µM NBT ve %1'lik Triton X-100 içeren karışıma 70 µl enzim ekstraktı ilave edilmiştir. Daha sonra bu karışıma ve 2 µM riboflavin eklenmiş ve test tüplerinin 10 dakika için beyaz ışık kaynağı altına yerleştirilmesiyle reaksiyon başlatılmıştır. Örneklerin absorbans değerleri 560 nm dalga boyunda spektrofotometrik (TU-1880 Double Beam UV-VIS) olarak belirlenmiştir. Bir ünite SOD, deneysel koşullar altında NBT indirgenmesinde %50 inhibisyona neden olan enzim miktarı olarak ifade edilmiştir. Toplam SOD aktivitesi U mg⁻¹ protein olarak hesaplanmıştır.

3.7.3 Askorbat Peroksidaz (APX) Aktivitesinin Belirlenmesi

Askorbat peroksidaz (APX; EC 1.11.1.11) aktivitesi Nakano ve Asada (1987)'ya göre belirlenmiştir. Reaksiyon karışımı 50 mM fosfat tamponu (pH 7.0), 0.1 mM EDTA, 0.25 mM askorbat, 5 mM H₂O₂ ve 20 µL enzim ekstraktından oluşmaktadır. Reaksiyon, 100 µL 5 mM H₂O₂'in ilavesi ile başlatılmıştır. Askorbik asidin oksidasyon oranı, spektrofotometre kullanılarak 3 dakika için 290 nm'de absorbanstaki azalmayı takiben belirlenmiştir. Toplam APX aktivitesi, askorbatın ekstinksiyon katsayısı ($\epsilon = 2.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) kullanılarak µmol min⁻¹ mg⁻¹ protein olarak hesaplanmıştır.

3.7.4 Guaiakol Peroksidaz (POD) Aktivitesinin Belirlenmesi

Guaiakol peroksidaz (POD; EC 1.11.1.7) aktivitesi Mika ve Lüthje (2003)'ye göre belirlenmiştir. Reaksiyon karışımı 25 mM sodyum-asetat-HCl (pH 5.0), 51.3 mM guaiakol, 12.5 mM H₂O₂ ve enzim ekstraktı içermektedir. Reaksiyon enzim ekstraktının ilavesiyle başlatılmış ve absorbanstaki değişim 470 nm'de 3 dakika süre boyunca takip edilmiştir. Toplam POD aktivitesi, guaiakolun ekstinksiyon katsayısı ($\epsilon = 26.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) kullanılarak µmol min⁻¹ mg⁻¹ protein olarak belirlenmiştir.

3.7.5 Katalaz (CAT) Aktivitesinin Belirlenmesi

Toplam katalaz aktivitesi (CAT; EC 1.11.1.6) Aebi (1984)'ye göre belirlenmiştir. Reaksiyon karışımı 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7.0) ve 10.6 mM H₂O₂ içermektedir. Reaksiyon 25 µL enzim ekstraktının ilave edilmesi ile başlatılmıştır. CAT aktivitesi, H₂O₂'in 3 dakika için 240 nm'de ($\epsilon = 39.4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) bozunması ile $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ protein olarak belirlenmiştir.

3.7.6 Askorbat (AsA) ve Glutasyon (GSH) İçeriklerinin Belirlenmesi

Altı farklı uygulamaya maruz bırakılan kanola fidelerinin (Çizelge 3.1) yaprak dokularında toplam askorbat [AsA + dihidroaskorbik asit (DHA)] ve indirgenmiş askorbat (AsA) içerikleri Hodges vd. (1996)'ne göre belirlenmiştir. Taze yaprak dokuları (300 mg) %5'lik ö-fosforik asit içerisinde homojenize edildikten sonra 12000 $\times g$ 'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Toplam askorbat içeriği süpernatant, 5 mM EDTA içeren 150 mM potasyum fosfat tamponu ve DHA'ı AsA'a indirgemek için 10 mM ditiyoteritol (DTT) içeren reaksiyon karışımı ile belirlenmiştir. Bu karışım 50 dakika laboratuvar koşullarında tutulduktan sonra fazla DTT'nin uzaklaştırılması için üzerine %0.5'lik N-etilmaleimid ilave edilmiştir. Daha sonra her bir tüpe 0.61 M trikloroasetik asit, 0.8 M ortofosforik asit, α, α' -bipiridil ve 30 g L⁻¹ FeCl₃ eklenmiş ve 1 saat 40°C'de inkübe edilmiştir. AsA içeriği ise DTT ve N-etilmaleimid yerine distile su kullanılarak yukarı belirtilen metoda göre belirlenmiştir. Toplam askorbat ve indirgenmiş askorbat içerikleri, L-askorbat ile hazırlanan standart eğri ile belirlenmiştir. DHA içeriği ise toplam AsA'dan indirgenmiş AsA'nın çıkarılması ile hesaplanmıştır.

Altı farklı uygulamaya maruz bırakılan kanola fidelerinin (Çizelge 3.1) yaprak dokularında indirgenmiş (GSH) ve yükseltgenmiş (GSSG) glutasyon içerikleri Griffith (1980)'in bildirdiği metoda göre belirlenmiştir. Taze yaprak dokusu (500 mg) %5'lik sülfosalisilik asit çözeltisinde homojenize edilmiş ve homojenant +4°C'de 10 dakika 12000 $\times g$ 'de santrifüj edilmiştir. Santifügasyon sonrası 300 µL süpernatant 18 µL 7.5 M trietanolamin ile nötralize edilmiştir. Yalnızca GSSG'nin belirlenebilmesi için 150 µL

nötralize edilmiş örnek 3 µL 2-vinilpiridin ile 60 dakika 20°C'de inkübe edilmiştir. Diğer 150 µL'lik örnek ise toplam glutatyonun (GSH+GSSG) içeriğinin belirlenmesi için kullanılmıştır. Her iki tip örnekten 50 µL alınmış ve 0.3 mM NADPH, 10 mM ditiyobisnitro benzoik asit (DTNB) ve 6.3 mM EDTA içeren 125 mM sodyum fosfat tamponu (pH 6.5) ile karıştırılmıştır. Karışıma 10 µL glutatyon redüktaz (5 U mL⁻¹) ilavesiyle reaksiyon başlatılmış ve absorbanstaki değişim 421 nm'de izlenmiştir. GSH ve GSSG kullanılarak hazırlanan standart eğriler GSH ve GSSG içeriklerinin belirlenmesi için kullanılmıştır.

3.8 Proteomik Analizler

Kontrol (K), lipoik asit (LA), tuz (NaCl) ve artan tuz uygulaması ile birlikte LA (NaCl + LA) uygulamalarını (Çizelge 3.1) takiben fidelerin yaprakları örneklenerek sıvı azota alınmıştır.

3.8.1 Protein Ekstraksiyonu

Uygulama gruplarından elde edilen fidelerin yaprak dokularından proteinlerin ekstraksiyonu fenol metoduna göre gerçekleştirilmiştir (Hurkman and Tanaka 1986, Ahsan *et al.* 2008). Yaprak dokuları (500 mg) havan ve tokmağı kullanılarak sıvı azot içerisinde toz haline getirilmiş ve 0.5 M Tris-HCl (pH 8.3), %2 v/v NP-40, 20 mM MgCl₂, %2 v/v β-merkaptoetanol, 1 mM fenilmetansülfonilfluorid ve 0.7 M sukroz içeren 5 mL Mg/NP-40 ekstraksiyon tamponunda homojenize edilmiştir (Kim *et al.* 2001). Daha sonra homojenata eşit hacimde Tris-HCl ile doyurulmuş fenol çözeltisi eklenmiş ve 2 dakika boyunca vortekslendikten sonra 3500 ×g'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifügasyondan sonra üst kısımda kalan fenol faz ayrı bir tüpe alınmış ve tekrar ekstraksiyon tamponu ile karıştırılmış ve santrifüj edilmiştir. Santrifügasyon sonrası fenol faz yeni bir tüpe alınmış ve proteinlerin çöktürülmesi için üzerine 0.1 M amonyum asetat içeren 4 hacim soğuk metanol ilave edilmiş ve -20°C'de inkübe edilmiştir. Bu periyot sonunda çöktürülmüş proteinler 10 dakika 3500 ×g'de santrifüj edilmiş ve elde edilen protein peleti 3 kez daha 0.1 M amonyum asetat içeren soğuk

metanol ile yıkanmıştır. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra tüpte kalan peletler desikatörde kurutulurken kullanılıncaya kadar -20°C'de saklanacaktır. Peletler rehidrasyon tamponunda (7 M urea, 2 M thiourea, %4 (w/v) CHAPS, 65 mM DTT ve %0.4 Ampholyte (pH 3-10) çözülmüş ve peletlerdeki protein miktarları Bradford (1976)'a göre hesaplanmıştır. Protein standardı olarak Bovine Serum Albumin (BSA) kullanılmıştır.

3.8.2 İki Yönlü (2-D) Jel Elektrofizi

Protein profillerindeki polimorfizmler iki-yönlü (2-D) poliakrilamid jel elektrofizi (İzoelektrik Fokaslama/Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektrofizi, IEF/SDS-PAJE) tekniği kullanılarak analiz edilmiştir. Elektrofizin ilk yönü olan IEF'de, Protean IEF Cell (Bio-Rad) sisteminde IPG (Immobilized pH Gradient) stripleri (pH 4-7, 17 cm) kullanılarak proteinlerin izoelektrik noktalarına göre ayrıştırılması sağlanmıştır. Stripler 80 µg protein içeren rehidrasyon tamponuyla muamele edilmiş ve Protean IEF Cell sistemine transfer edilmiştir. Stripler 50 V akımda aktif olarak rehidrate edilmiştir. Rehidrasyon basamağından sonra izoelektrik fokaslama toplam 70000 V olacak şekilde 20°C'de gerçekleştirilmiştir. IEF'den sonra stripler 10 dakika dengeleme çözeltisi I [6 M urea, 0.375 M Tris-HCl, pH8.8, %2 (w/v) SDS, %20 (v/v) gliserol ve %2 (w/v) DTT] ve 10 dakika dengeleme çözeltisi II [6 M urea, 0.375 M Tris-HClpH 8.8, %2 (w/v) SDS, %20 (v/v) gliserol ve %2.5 (w/v) iodoacetamide] ile muamele edilmiştir. Dengeleme basamağından sonra ikinci yön olan SDS-PAGE %12'lik akrilamid jelde (%30 akrilamid/bisakrilamid, 1.5 M Tris-HCl tamponu, pH 8.8, %10 SDS, %10 amonyum persülfat ve TEMED) Laemmli (1970)'ye göre gerçekleştirilmiştir. 2-D elektrofiz protean II XL Cell (Bio-Rad)'de gerçekleştirilmiştir. Protein standardı olarak Sigma moleküler markör (MWSDS-70L, Sigma, St. Louis, MO) kullanılmıştır. Görüntü analizlerinin yapılacağı analitik jellerdeki protein benekleri gümüş boyama (Sinha *et al.* 2001) ile kütle spektrometrisi analizlerinde kullanılacak jeller ise koloidal Coomassie Brilliant Blue (CBB) boyama ile görünür hale getirilmiştir (Neuhoff *et al.* 1988).

3.8.3 Görüntü Analizleri

Gümüş boyalı jeller ChemiDoc™ MP jel görüntüleme sistemi (Bio-Rad) ile görüntülenmiştir. İfadesinde değişiklik gösteren (ifadesi artan ve/veya azalan yönde düzenlenen) protein benekleri PDQuest yazılımı (versiyon 8.0.1, Bio-Rad) ile saptanmış ve nispi hacimleri temelinde miktarları belirlenmiştir. Belirli bir protein beneğinin yoğunluğu, jel görüntüsündeki beneği oluşturan tüm piksellerin toplam yoğunluğu olarak tanımlanan protein hacmi olarak ifade edilmiştir. Bununla birlikte, protein miktar tayini, örnek yükleme veya jel boyama basamaklarında meydana gelebilecek olası hataları telafi etmek için her bir protein beneğinin hacmi, jelde bulunan tüm protein beneklerinin toplam hacminin yüzdesi olacak şekilde normalize edilmiştir.

3.8.4 Jelde Triptik Kesim

Seçilmiş protein benekleri CBB boyalı jellerden EXQuest Benek Cutter (Bio-Rad) cihazı kullanılarak kesilmiş ve 0.6 mL'lik steril tüplere alınmıştır. Protein beneklerinin triptik kesimi için In-Gel Tryptic Digestion Kiti (Thermo Scientific) kullanılmıştır. Fazla boyanın uzaklaştırılması için kesilen jel parçaları 2 g/L amonyum bikarbonat %50 asetonitril çözeltisi ile 37°C'de 30 dakika muamele edilmiştir. Boya uzaklaştırma çözeltisi tüplerden uzaklaştırıldıktan sonra indirgeme ve alkilasyon basamaklarına geçilmiştir. İndirgeme basamağı için jel parçacıkları 50 mM Tris(2-karboksietil)fosfin çözeltisi içeren 2 g/L amonyum bikarbonat çözeltisi ile 60°C'de 10 dakika muamele edilmiştir. Bu periyot sonunda indirgeme çözeltisi uzaklaştırılmış ve alkilasyon için jel parçacıkları 100 mM iyodoasetamid ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. Alkilasyon tamponu uzaklaştırıldıktan sonra jel parçaları 2 g/L amonyum bikarbonat %50 asetonitril çözeltisi ile 37°C'de 15 dakika muamele edilmiştir. Jel parçalarını dehidrate etmek için örnekler konsantre asetonitril ile oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilmiştir. Asetonitril çözeltisi uzaklaştırıldıktan sonra örnekler oda sıcaklığında kurutulmuştur. Daha sonra kurutulmuş jel parçacıkları üzerine aktive edilmiş tripsin (10 ng/μL) eklenmiş ve 30°C'de gece boyunca inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda tüpler içerisindeki çözelti yeni bir tüpe alınmış ve vakum konsantratör (Eppendorf, Germany) ile kurutulmuştur.

Daha sonra kurutulmuş örnekler 10 µL %0.1'lik trifloroasetik asit (TFA) ile yeniden süspanse edilmiş ve kütle spektrometrisi analizlerinde kullanılıncaya kadar -20°C'de saklanmıştır.

3.8.5 Kütle Spektrometrisi Analizleri

Kütle spektrometrisi analizleri için %0.1'lik TFA'da çözülmüş peptidler ZipTip C₁₈ (Millipore, Bedford, MA, USA) kullanılarak konsantre hale getirilmiştir. Peptid çözeltileri, %50 asetonitril ve %0.1 TFA ile doyurulmuş 10 mg L⁻¹ α-cyano-4-hydroxycinnamic asit (matriks) ile karıştırılmıştır. Daha sonra yaklaşık 1 µL çözelti MALDI plakasına yerleştirilmiş ve kuruması sağlanmıştır. Kütle spektrometrisi analizleri AB Sceix TOF/TOF 5800 kütle spektrometrisi cihazı (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kütle spektrumu (m/z 800–3000) pozitif iyon reflektör modunda elde edilmiştir. Her bir protein beneği için MS modundan elde edilen 10 pik MS/MS fragmentasyonu için seçilmiştir. MS/MS modu 1 kV'lık çarpışma (collision) enerjisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çarpışma teşvikli fragmentasyon için çarpışma gazı olarak hava kullanılmıştır. Öncü MS spektrumları için internal kalibrasyon olarak otolitik tripsin peptidleri kullanılmıştır. Glu-Fib fragmentleri ile elde edilen eksternal kalibrasyon ise MS/MS spektrumlarına uygulanmıştır. MS/MS verileri GPS Explorer (Applied Biosystem) ve MASCOT (Matrix Science, London, UK) yazılımları kullanılarak protein veri tabanlarına karşı taranmıştır. Veri tabanı araması SwissProt ve NCBI'nin protein veri tabanına karşı yapılmıştır. Arama kriterleri olarak Çizelge 3.2'deki parametreler kullanılmıştır. MS/MS verileri için %95'den daha büyük olarak belirlenen önemli derecede yüksek MASCOT skorları, güvenilir şekilde tanımlanmış protein olarak kabul edilmiştir.

Çizelge 3.2 Protein tanımlamada seçilen tarama parametreleri.

Parametre	
Enzim	Tripsin
Değişken modifikasyonlar	Metiyonin oksidasyonu
Sabit modifikasyonlar	Sistein karbamidometilasyonu
Peptid toleransı	50 ppm
MS/MS toleransı	0.4 Da
Taksonomi	Viridiplantae (yeşil bitkiler)
Cihaz	MALDI-TOF/TOF

3.9. İstatistiksel Analizler

Denemeler, rastgele deneme deseninde düzenlenmiştir. Denemelerden elde edilen veriler en az üç tekrarlı olarak düzenlenmiş üç bağımsız denemeden elde edilmiştir. Proteomik çalışmalar dışındaki diğer analizlerden elde edilen verilere SPSS (versiyon 16) paket programı kullanılarak varyans analizi yapılmıştır. Veriler arasındaki önemli farklılıklar Duncan çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir ($P < 0.05$).

4. BULGULAR

4.1 Tuz Stresi Altındaki Kanola Fidelerinde Fide Büyümesi Üzerine Dışsal Lipoik Asit ve Salisilik Asit Uygulamalarının Etkisi

Bu araştırmada, kanola (*Brassica napus* L. cv. Sary) fidelerinde NaCl stresi ve tuz stresi altındaki kanola fidelerinde dışsal uygulanan lipoik asit (LA) ve salisilik asidin (SA) fide büyümesi üzerine etkisi incelenmiştir. Bu amaçla, 18 günlük kanola fideleri kontrol, LA, SA, NaCl stresi, NaCl stresi + LA (NaCl+LA) ve NaCl stresi + SA (NaCl+SA) uygulamalarına maruz bırakılmıştır. Bu uygulamaların 7. gününde fide büyümesi (toprak üstü ve kök dokularının taze ve kuru ağırlıkları) belirlenmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1 Tuz stresi altındaki kanola fidelerinin toprak üstü ve kök taze (TA) ve kuru (KA) ağırlıkları üzerine dışsal LA ve SA uygulamalarının etkisi.

Uygulamalar	Toprak üstü TA	Toprak üstü KA	Kök TA	Kök KA
	mg fide ⁻¹			
Kontrol	1486 ± 39.1 ^{a*}	103.3 ± 4.4 ^a	104.4 ± 5.2 ^a	5.96 ± 0.41 ^{ab}
LA	1499 ± 25.0 ^a	105.8 ± 2.1 ^a	103.1 ± 1.8 ^a	5.73 ± 0.10 ^b
SA	1467 ± 28.1 ^a	108.0 ± 7.0 ^a	106.5 ± 1.2 ^a	6.51 ± 0.26 ^a
NaCl	848 ± 24.4 ^c	74.3 ± 1.3 ^c	75.3 ± 2.7 ^c	4.87 ± 0.10 ^c
NaCl+LA	1022 ± 18.4 ^b	88.5 ± 1.7 ^b	91.3 ± 2.2 ^b	6.37 ± 0.19 ^{ab}
NaCl+SA	991 ± 46.8 ^b	90.5 ± 4.5 ^b	88.6 ± 2.4 ^b	6.04 ± 0.15 ^{ab}

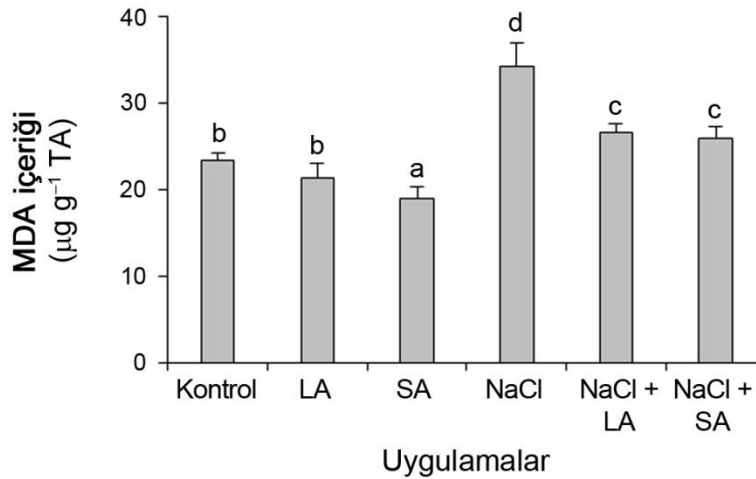
* Her bir sütundaki farklı harfler, uygulamalar arasındaki önemli düzeydeki farklılıkları göstermektedir ($P<0.05$). Her bir değer, her tekrarda 10 fidenin örneklediği üç tekrarın ortalamasıdır. Standart hata (\pm SH).

Kanola fidelerinin toprak üstü dokularının taze ve kuru ağırlıkları kontrole göre NaCl uygulamasında önemli düzeyde ($P<0.05$) azalmıştır (Çizelge 4.1). Bu azalma, toprak üstü dokularının taze ağırlıkları için %42.9, kuru ağırlıkları için %28.1 olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte, NaCl stresi kök dokularının taze ve kuru ağırlıklarını kontrole göre sırasıyla %27.8 ve %18.2 oranında azaltmıştır. LA ve SA uygulamaları fidelerin taze ve kuru ağırlıkları üzerinde gösterdikleri etki önemsizken, NaCl stresi altındaki fidelerin taze ve kuru ağırlıklarında LA ve SA uygulamaları iyileştirici etki göstermiştir. LA ve SA uygulamaları toprak üstü dokularının taze ağırlıklarını NaCl

stresine göre sırasıyla %20.5 ve %16.8 oranında arttırırken, kuru ağırlıkları sırasıyla %19.2 ve %21.8 oranında arttırmıştır. Bununla birlikte, LA ve SA uygulamaları kök dokularının taze ağırlıklarını NaCl stresine göre sırasıyla %21.2 ve %17.6 oranında arttırırken, kuru ağırlıkları sırasıyla %30.9 ve %24.0 oranında arttırmıştır. Ayrıca tuz stresi altındaki fidelerin büyüme parametreleri üzerine dışsal LA ve SA uygulamaları benzer etkiler göstermiştir (Çizelge 4.1).

4.2 Tuz Stresi Altındaki Kanola Fidelerinde Lipid Peroksidasyonu Üzerine Dışsal Lipoik Asit ve Salisilik Asit Uygulamalarının Etkisi

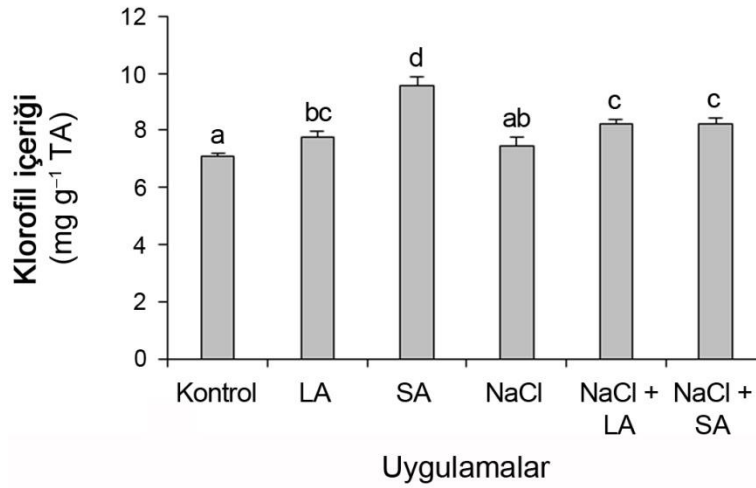
Kanola fidelerinin yaprak dokularında lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan malondialdehit (MDA) içerikleri NaCl uygulamasında önemli düzeyde ($P<0.05$) artmıştır (Şekil 4.1). SA uygulaması MDA içeriğini kontrole göre %19.0 oranında azaltmıştır. NaCl stresi MDA içeriğinde kontrole göre %46.0 oranında artışa neden olmuştur. Bununla birlikte, NaCl stresi altındaki fidelerde LA ve SA uygulamaları MDA içeriklerini NaCl stresine göre sırasıyla %22.1 ve %24.2 oranında azaltmıştır. (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 NaCl stresi altındaki kanola fidelerinin yaprak dokularında malodialdehit (MDA) içeriği üzerine dışsal LA veya SA uygulamalarının etkisi. Farklı harfler, uygulamalar arasında Duncan Çoklu Karşılaştırma testine göre önemli düzeydeki ($P<0.05$) farklılıkları göstermektedir. Barlar standart hatayı (\pm SH) göstermektedir.

4.3 Tuz Stresi Altındaki Kanola Fidelerinde Klorofil İçeriği Üzerine Dışsal Lipoik Asit ve Salisilik Asit Uygulamalarının Etkisi

Kanola fidelerinin yaprak dokularında klorofil içeriği üzerine NaCl uygulamasının önemli bir etkisi belirlenmemiştir (Şekil 4.2). Bununla birlikte, LA ve SA uygulamaları klorofil içeriklerini kontrole göre arttırmıştır. Bu etki, LA uygulamasında %9.2 olarak belirlenirken, SA uygulamasında %35.2 oranında belirlenmiştir. Bununla birlikte, NaCl+LA ve NaCl+SA uygulamaları klorofil içeriklerini NaCl uygulamasına göre yaklaşık %10'luk oranla önemli düzeyde arttırmıştır (Şekil 4.2).

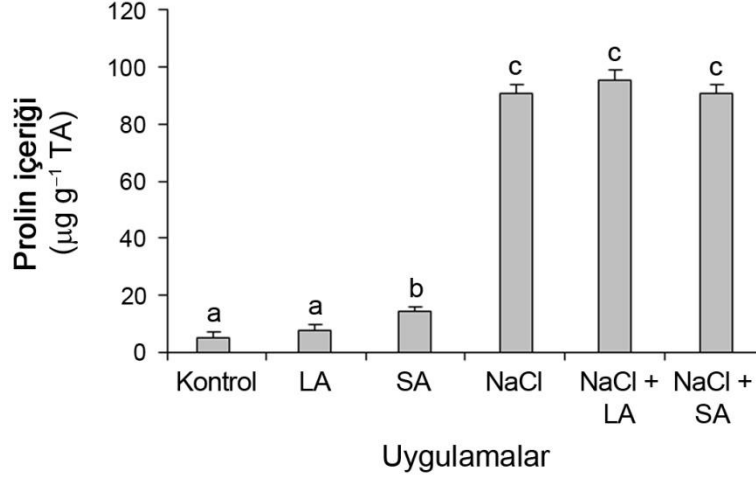


Şekil 4.2 NaCl stresi altındaki kanola fidelerinin yaprak dokularında klorofil içeriği üzerine dışsal LA veya SA uygulamalarının etkisi. Farklı harfler, uygulamalar arasında Duncan Çoklu Karşılaştırma testine göre önemli düzeydeki ($P < 0.05$) farklılıkları göstermektedir. Barlar standart hatayı ($\pm SH$) göstermektedir.

4.4 Tuz Stresi Altındaki Kanola Fidelerinde Prolin İçeriği Üzerine Dışsal Lipoik Asit ve Salisilik Asit Uygulamalarının Etkisi

Kanola fidelerinin yaprak dokularında prolin içeriği NaCl uygulamasında önemli düzeyde ($P < 0.05$) artmıştır (Şekil 4.3). SA uygulaması prolin içeriğini kontrole göre önemli düzeyde arttırmıştır. NaCl stresi prolin içeriğinde kontrole göre 17 kat artışa

neden olmuştur. Bununla birlikte, NaCl stresi altındaki fidelerde prolin içeriği üzerine LA ve SA uygulamalarının önemli bir etkisi belirlenmemiştir (Şekil 4.3).

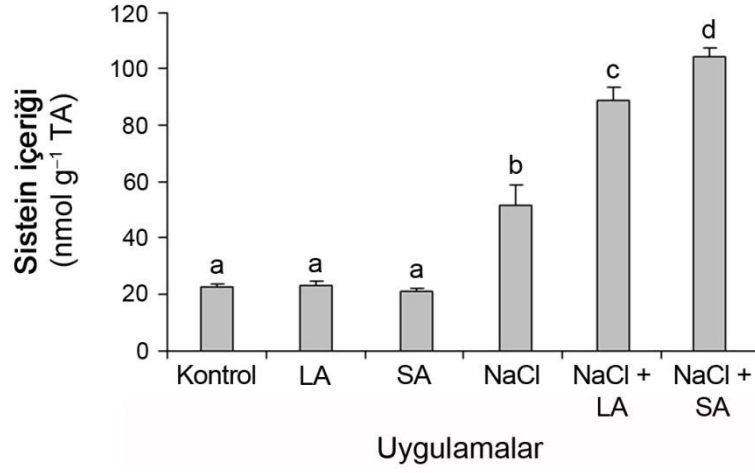


Şekil 4.3 NaCl stresi altındaki kanola fidelerinin yaprak dokularında prolin içeriği üzerine dışsal LA veya SA uygulamalarının etkisi. Farklı harfler, uygulamalar arasında Duncan Çoklu Karşılaştırma testine göre önemli düzeydeki ($P<0.05$) farklılıkları göstermektedir. Barlar standart hatayı (\pm SH) göstermektedir.

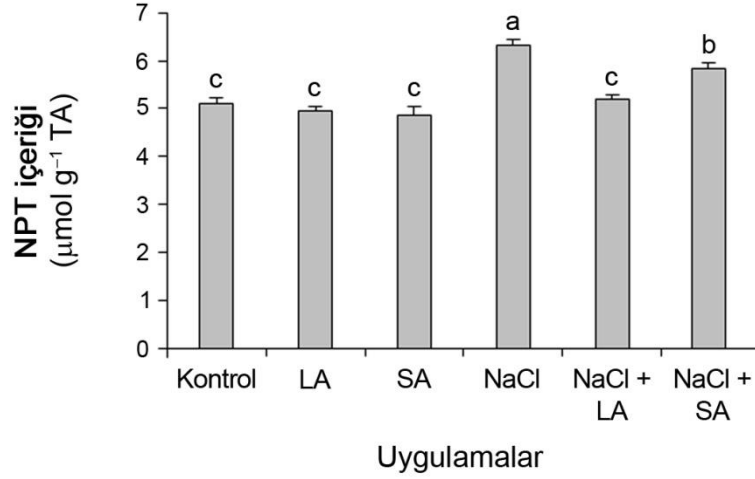
4.5 Tuz Stresi Altındaki Kanola Fidelerinde Sistein ve NPT İçerikleri Üzerine Dışsal Lipoik Asit ve Salisilik Asit Uygulamalarının Etkisi

Kanola fidelerinin yaprak dokularında sistein içeriği NaCl uygulamasında önemli düzeyde ($P<0.05$) artmıştır (Şekil 4.4). NaCl stresi sistein içeriğinde kontrole göre 2.3 kat artışa neden olmuştur. Bununla birlikte, NaCl stresi altındaki fidelerde LA veya SA uygulamaları sistein içeriklerinde ilave artışa neden olmuştur. Bu artma, LA uygulamasına göre SA uygulamasında daha yüksek bulunmuştur (Şekil 4.4).

Kanola fidelerinin yaprak dokularında non-protein tiyol (NPT) içeriği NaCl uygulamasında önemli düzeyde ($P<0.05$) artmıştır (Şekil 4.5). Bununla birlikte, NaCl stresi altındaki fidelerde LA ve SA uygulamaları NPT içeriklerinde önemli düzeyde azalmaya neden olmuştur. Bu etki, LA uygulamasında %18 olarak belirlenirken, SA uygulamasında %8 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.5).



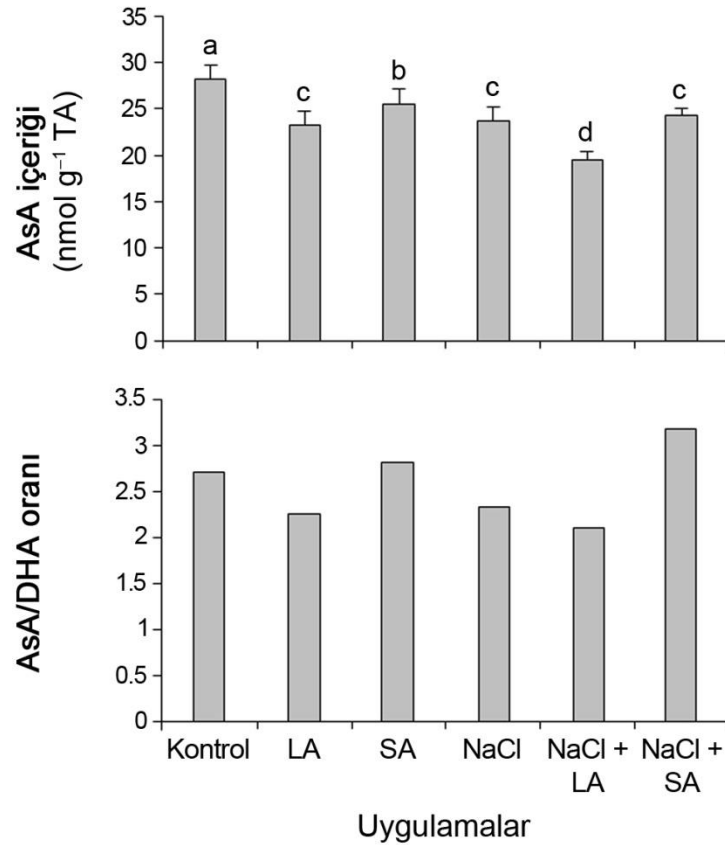
Şekil 4.4 NaCl stresi altındaki kanola fidelerinin yaprak dokularında sistein içeriği üzerine dışsal LA veya SA uygulamalarının etkisi. Farklı harfler, uygulamalar arasında Duncan Çoklu Karşılaştırma testine göre önemli düzeydeki ($P < 0.05$) farklılıkları göstermektedir. Barlar standart hatayı ($\pm SH$) göstermektedir.



Şekil 4.5 NaCl stresi altındaki kanola fidelerinin yaprak dokularında non-protein tiyol (NPT) içeriği üzerine dışsal LA veya SA uygulamalarının etkisi. Farklı harfler, uygulamalar arasında Duncan Çoklu Karşılaştırma testine göre önemli düzeydeki ($P < 0.05$) farklılıkları göstermektedir. Barlar standart hatayı ($\pm SH$) göstermektedir.

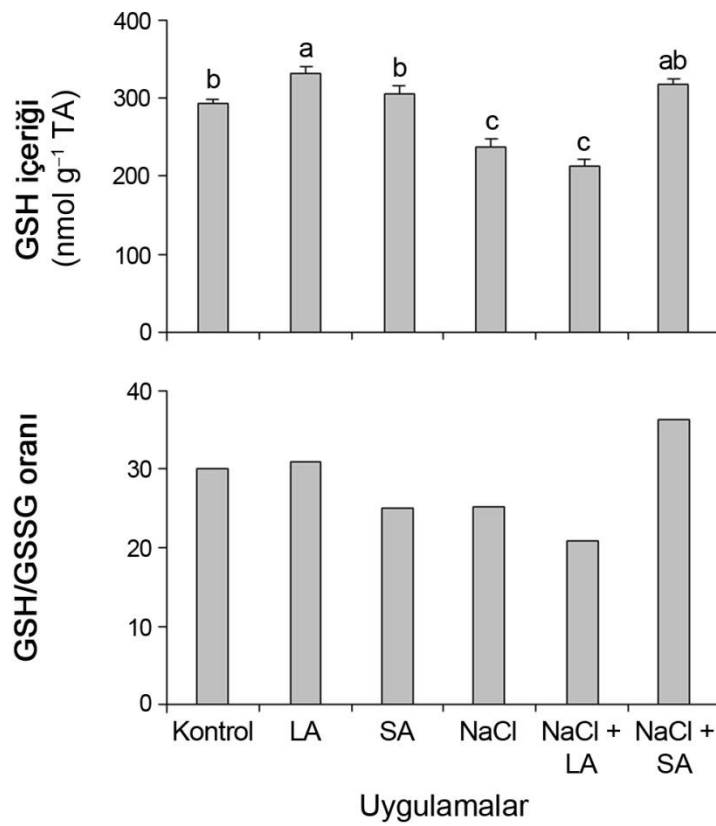
4.6 Tuz Stresi Altındaki Kanola Fidelerinde Askorbat ve Glutatyon İçerikleri Üzerine Dışsal Lipoik Asit ve Salisilik Asit Uygulamalarının Etkisi

Kanola fidelerinin yaprak dokularında askorbat (AsA) içeriği NaCl uygulamasında önemli düzeyde ($P<0.05$) azalmıştır (Şekil 4.6). LA ve SA uygulamaları AsA içeriklerinde kontrole göre sırasıyla %18 ve %10 azalmaya neden olmuştur. Bununla birlikte, NaCl stresi altındaki fidelerde LA uygulaması AsA içeriğinde %18 oranında azalmaya neden olurken, SA uygulamasının etkisi önemsizdir. Diğer taraftan, LA, NaCl ve NaCl+LA uygulamaları AsA/DHA oranında kontrole göre azalmaya neden olmuştur. NaCl stresi altındaki fidelerde SA uygulaması AsA/DHA oranını NaCl uygulamasına göre arttırmıştır (Şekil 4.6).



Şekil 4.6 NaCl stresi altındaki kanola fidelerinin yaprak dokularında askorbat (AsA) içeriği ve AsA/DHA oranı üzerine dışsal LA veya SA uygulamalarının etkisi. Farklı harfler, uygulamalar arasında Duncan Çoklu Karşılaştırma testine göre önemli düzeydeki ($P<0.05$) farklılıkları göstermektedir. Barlar standart hatayı (\pm SH) göstermektedir.

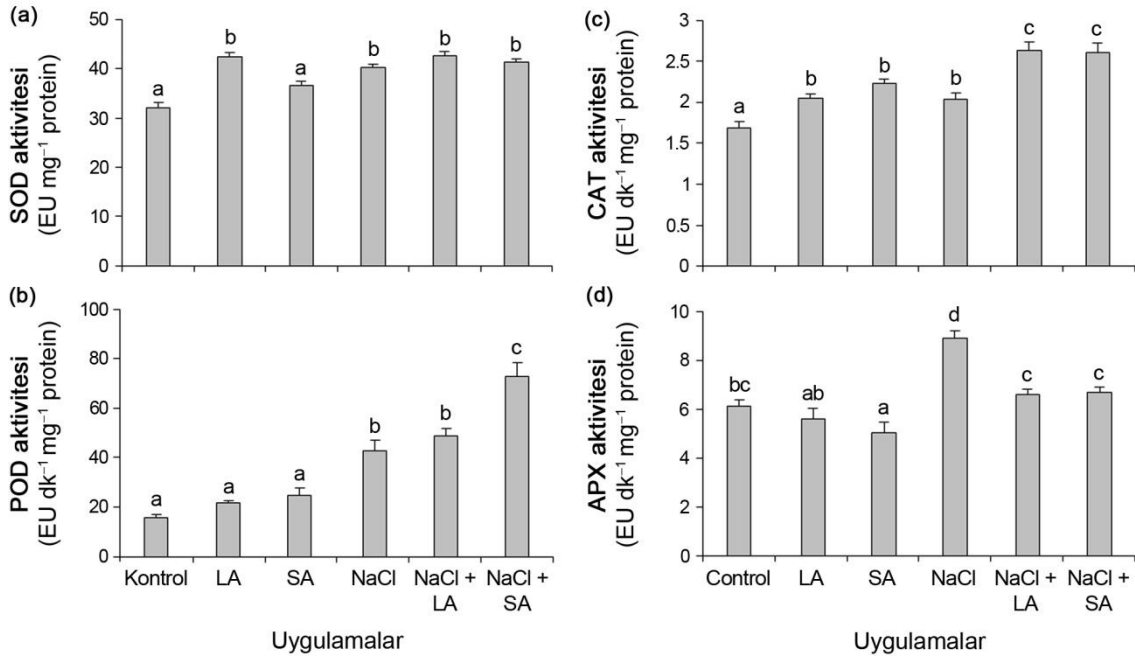
Kanola fidelerinin yaprak dokularında glutatyon (GSH) içeriği NaCl uygulamasında önemli düzeyde ($P<0.05$) azalmıştır (Şekil 4.7). LA uygulaması GSH içeriğinde kontrole göre artışa neden olmuştur. Bununla birlikte, NaCl stresi altındaki fidelerde SA uygulaması GSH içeriklerinde artışa neden olurken, LA uygulamasının etkisi önemsiz bulunmuştur. Diğer taraftan, kontrole göre NaCl stresi GSH/GSSG oranında azalışa neden olmuştur. NaCl stresi altındaki fidelerde LA uygulaması NaCl uygulamasına göre GSH/GSSG oranını azaltırken, SA uygulaması bu oranı arttırmıştır (Şekil 4.7).



Şekil 4.7 NaCl stresi altındaki kanola fidelerinin yaprak dokularında glutatyon (GSH) içeriği ve GSH/GSSG oranı üzerine dışsal LA veya SA uygulamalarının etkisi. Farklı harfler, uygulamalar arasında Duncan Çoklu Karşılaştırma testine göre önemli düzeydeki ($P<0.05$) farklılıkları göstermektedir. Barlar standart hatayı (\pm SH) göstermektedir.

4.7 Tuz Stresi Altındaki Kanola Fidelerinde Antioksidan Enzimlerin Aktivitesi Üzerine Dışsal Lipoik Asit ve Salisilik Asit Uygulamalarının Etkisi

Kanola fidelerinin yaprak dokularında NaCl uygulaması süperoksit dismutaz (SOD), guaiakol peroksidaz (POD), katalaz (CAT) ve askorbat peroksidaz (APX) aktivitesinde önemli düzeyde ($P<0.05$) artışa neden olmuştur (Şekil 4.8). Kontrole göre LA uygulaması SOD aktivitesinde önemli düzeyde artışa neden olmuştur. Bununla birlikte, NaCl stresi altındaki fidelerde LA ve SA uygulamalarının SOD aktivitesi üzerine etkisi önemsiz bulunmuştur. NaCl stresi altındaki fidelerde SA uygulaması POD aktivitesinde NaCl uygulamasına göre artışa neden olurken, LA uygulamasının etkisi önemsiz bulunmuştur. Kontrole göre LA ve SA uygulamaları CAT aktivitesinde artışa neden olmuştur. Bununla birlikte, NaCl stresi altındaki fidelerde LA ve SA uygulamaları CAT aktivitesinde NaCl uygulamasına göre artışa neden olmuştur. Kontrole göre SA uygulaması APX aktivitesinde artışa neden olurken, LA uygulamasının etkisi önemsiz bulunmuştur. NaCl stresi altındaki fidelerde LA ve SA uygulamaları APX aktivitesini kontrol fidelerinin seviyesine kadar azaltmıştır (Şekil 4.8).



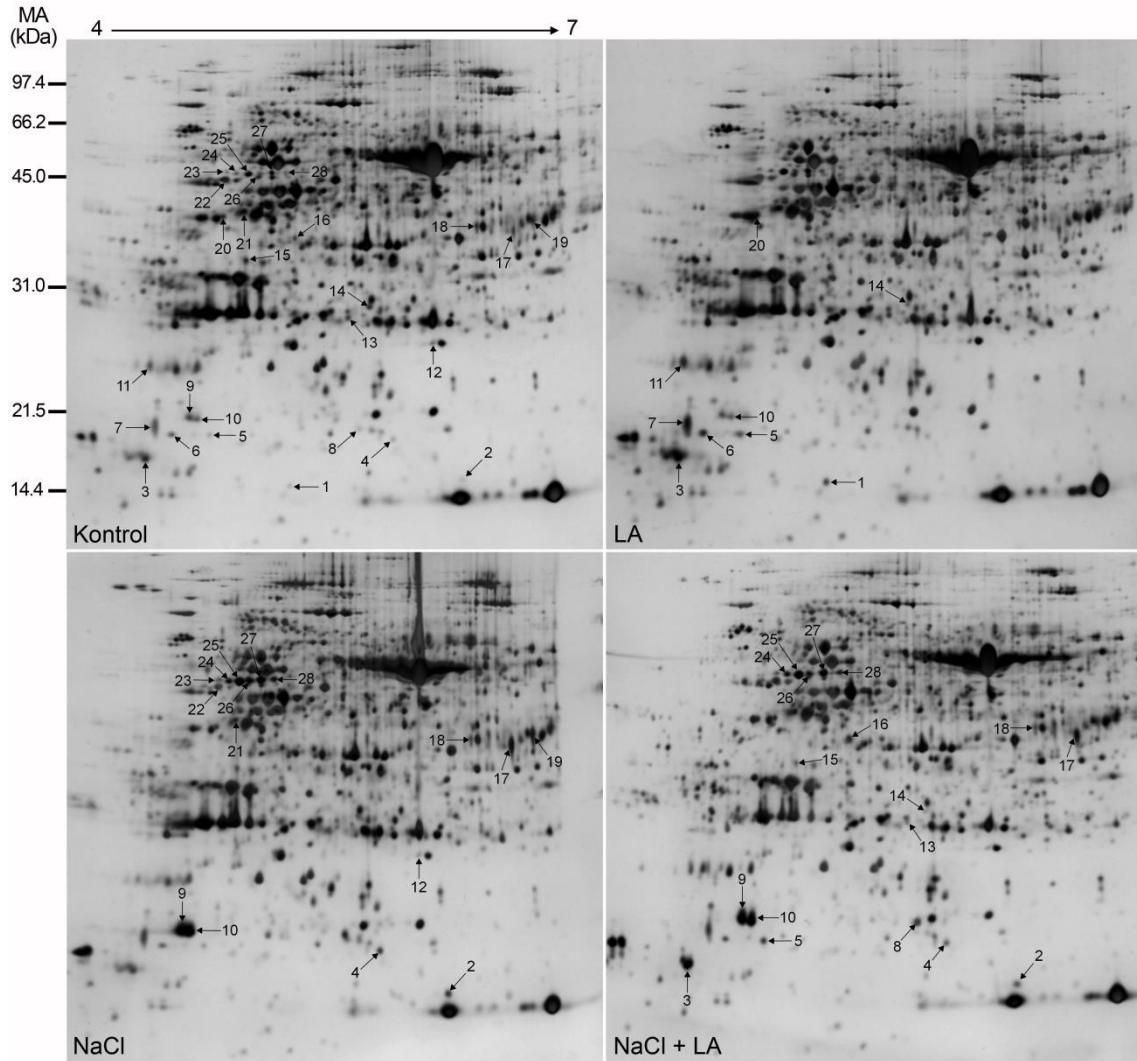
Şekil 4.8 NaCl stresi altındaki kanola fidelerinin yaprak dokularında (a) süperoksit dismutaz (SOD), (b) guaiakol peroksidaz (POD), (c) katalaz (CAT) ve (d) askorbat peroksidaz (APX) aktivitesi üzerine dışsal LA veya SA uygulamalarının etkisi. Farklı harfler, uygulamalar arasında Duncan Çoklu Karşılaştırma testine göre önemli düzeydeki ($P<0.05$) farklılıkları göstermektedir. Barlar standart hatayı (\pm SH) göstermektedir.

4.8 Tuz Stresi Altındaki Kanola Fidelerinde Proteom Değişimleri Üzerine Dışsal Lipoik Asit Uygulamasının Etkisi

Bu araştırmada, kontrol, LA, NaCl ve NaCl+LA uygulamalarında elde edilen fidelerin yapraklarından ekstrakte edilen proteinlerin 3 tekrarlı profilleri 2-D (IEF/SDS-PAGE) yöntemi ile belirlenmiştir (Şekil 4.9). Elde edilen 2-D jellerinde, protein profillerindeki değişimler PDQuest programı kullanılarak analiz edilmiştir. Bu programla, ifade profilinde nispi bolluğu 2 kat veya daha fazla (≥ 2) olan 28 protein beneği belirlenmiştir (Çizelge 4.2). Bu bağlamda, ifadesinde değişiklik gösteren proteinlerden 21'i ifadesi artan yönde düzenlenen (up-regulated) ve 7'si ise ifadesi azalan yönde düzenlenen (down-regulated) protein olarak belirlenmiştir. Bu protein benekleri MALDI-TOF/TOF kütle spektrometrisi ile analiz edilip, NCBI ve Swiss-Prot veri tabanları tarandığında 22 tane protein (9, 10, 12, 18, 23 ve 24 nolu benekler dışındaki benekler) başarılı şekilde tanımlanmıştır (Çizelge 4.2). İfadesinde değişiklik gösteren 22 protein beneği Şekil 4.10'da büyütülerek tekrar gösterilmiştir.

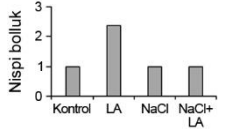
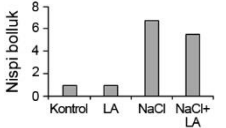
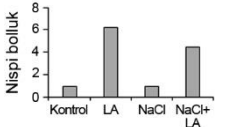
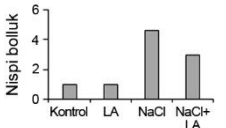
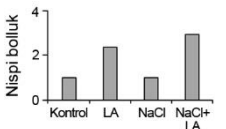
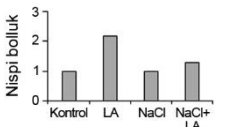
Tanımlanan 22 protein fizyolojik fonksiyonlarına göre fotosentez, enerji metabolizması, stres savunma ve sinyal iletimi olmak üzere dört farklı kategoride sınıflandırılmıştır (Çizelge 4.3). Mevcut araştırmada, fotosentez ve ATP üretimi ile ilişkili 8 proteinin (1, 2, 3, 7, 8, 14, 21, 22 ve 28 nolu benekler) LA, NaCl ve NaCl+LA, uygulamalarında farklı şekilde ifade olduğu bulunmuştur (Şekil 4.9 ve 4.10, Çizelge 4.2 ve 4.3). Bu proteinlerden fotosistem II reaksiyon merkezi PSB28 proteini (benek 1) ve 50S ribozomal protein L12-3 (benek 7)'ün ifade seviyesi LA uygulamasında artan yönde düzenlenmiştir. Glukoz-1-fosfat adenililtransferaz küçük alt birimin (benek 28) ifade seviyesi sadece NaCl uygulamasında artan yönde düzenlenmiştir. Bununla birlikte, ATP sentaz epsilon zinciri (benek 2)'nin ifade seviyesi NaCl ve NaCl+LA uygulamalarında, glisin ayırma sistemi H protein 1 (benek 3)'in ifade seviyesi ise LA ve NaCl+LA uygulamalarında artan yönde düzenlenmiştir. Ayrıca sitokrom b_6-f kompleksi demir-kükürt alt biriminin (benek 8) ifade seviyesi NaCl+LA uygulamasında artan yönde düzenlenmiştir. Bununla birlikte, LA ve NaCl+LA uygulamalarında karbonik anhidraz (benek 14) proteininin ifade seviyesi azalan yönde düzenlenmiştir. Ayrıca RuBisCO

aktivaz (benek 22) ve magnezyum-şelataz alt birim chli (benek 21) proteinlerinin ifade seviyesi NaCl uygulamasında azalan yönde düzenlenirken, bu proteinlerin miktarındaki NaCl-teşvikli azalma dışsal LA uygulaması ile ortadan kaldırılmıştır (Şekil 4.9 ve 4.10, Çizelge 4.2 ve 4.3).

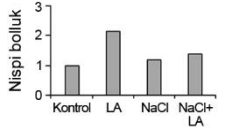
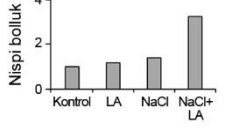
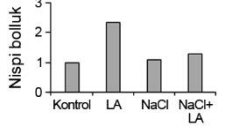
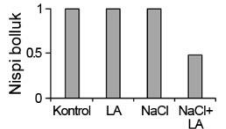
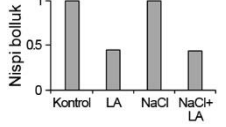


Şekil 4.9 Kontrol, LA, NaCl ve NaCl+LA uygulamalarına maruz bırakılan kanola fidelerinin yaprak dokularından ekstrakte edilen proteinlerin iki-yönlü (2-D) elektroforetik profilleri. Total proteinler (80 µg) 17 cm'lik IPG striplere (pH 4-7) yüklenmiş ve SDS-PAJE %12'lik jelde gerçekleştirilmiştir. Proteinler gümüş boyama ile görünür hale getirilmiştir. Jel profillerinde oklar ile gösterilmiş ve numaralandırılmış (1-28) proteinler artan ya da azalan şekilde ifade olan proteinlerdir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2 Kontrol, LA, NaCl ve NaCl+LA uygulamalarına maruz bırakılan kanola fidelerinin yaprak dokularında MALDI-TOF/TOF kütle spektrometrisi ile tanımlanmış proteinler.

Benek ^a	Aksesyon numarası ^b	Protein ^c	Organizma ^d	Skor ^e	Deneysel pI/MA ^f	Teorik pI/MA ^g	EPS ^h	İfade profili ⁱ
1	PSB28_ARATH	Fotosistem II reaksiyon merkezi PSB28 proteini	<i>A. thaliana</i>	192	5.3/14.5	9.5/20.2	5	
2	ATPE_ARATH	ATP sentaz epsilon zinciri	<i>A. thaliana</i>	525	6.3/14.9	5.0/14.5	14	
3	GCSH1_ARATH	Glisin ayırma sistemi H protein 1	<i>A. thaliana</i>	80	4.6/16.5	5.2/17.9	5	
4	SODCP_ARATH	Süperoksit dismutaz [Cu-Zn]	<i>A. thaliana</i>	273	5.9/18.3	6.5/22.2	8	
5	PRX2E_ARATH	Peroksiredoksin-2E	<i>A. thaliana</i>	98	5.0/18.6	9.1/24.7	4	
6	TRXM4_ARATH	Tiyoredoksin M-tip 4	<i>A. thaliana</i>	108	4.7/18.7	9.6/21.2	8	

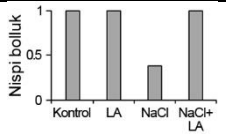
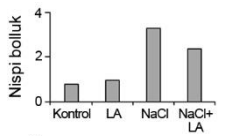
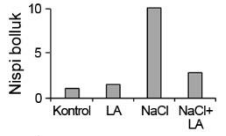
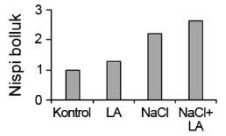
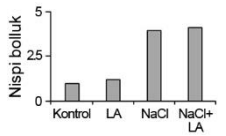
Çizelge 4.2 Devamı.

Benek ^a	Aksesyon numarası ^b	Protein ^c	Organizma ^d	Skor ^e	Deneysel pI/MA ^f	Teorik pI/MA ^g	EPS ^h	İfade profili ⁱ
7	RK123_ARATH	50S ribozomal protein L12-3	<i>A. thaliana</i>	223	4.6/19.0	5.5/19.7	7	
8	UCRIA_ARATH	Sitokrom b ₆ -f kompleksi demir-kükürt altbirimi	<i>A. thaliana</i>	113	5.7/20.0	8.8/24.4	5	
9	---	Tanımlanamayan protein						
10	---	Tanımlanamayan protein						
11	BAS1A_ARATH	2-Cys peroksiredoksin BAS1	<i>A. thaliana</i>	248	4.6/24.2	6.9/29.1	4	
12	---	Tanımlanamayan protein						
13	TPIS_ARATH	Triozofosfat izomeraz	<i>A. thaliana</i>	110	5.7/28.8	5.4/27.2	6	
14	CAHC_ARATH	Karbonik anhidraz	<i>A. thaliana</i>	159	5.8/29.6	5.7/37.4	8	

Çizelge 4.2 Devamı.

Benek ^a	Aksesyon numarası ^b	Protein ^c	Organizma ^d	Skor ^e	Deneysel pI/MA ^f	Teorik pI/MA ^g	EPS ^h	İfade profili ⁱ
15	THI4_ARATH	Tiazol biosentetik enzim	<i>A. thaliana</i>	119	5.1/34.4	5.8/36.6	4	
16	ANXD1_ARATH	Anneksin D1	<i>A. thaliana</i>	216	5.3/37.0	5.2/36.2	13	
17	LONH1_ARATH	Lon proteaz homologu 1	<i>A. thaliana</i>	46	6.6/37.8	97.8	1	
18	---	Tanımlanamayan protein						
19	ALF2_PEA	Fruktoz-bifosfat aldolaz, sitoplazmik izozim 2	<i>P. sativum</i>	152	6.7/38.7	6.8/38.5	6	
20	S17P_ARATH	Sedoheptuloz-1,7-bifosfataz	<i>A. thaliana</i>	111	5.0/39.2	6.2/42.4	6	
21	CHLI_ARATH	Magnezyum-şelataz altbirim chli	<i>A. thaliana</i>	173	5.1/40.1	6.1/46.2	15	

Çizelge 4.2 Devamı.

Benek ^a	Aksesyon numarası ^b	Protein ^c	Organizma ^d	Skor ^e	Deneysel pI/MA ^f	Teorik pI/MA ^g	EPS ^h	İfade profili ⁱ
22	RCA_ARATH	RuBisCO aktivaz	<i>A. thaliana</i>	250	5.1/44.5	5.9/51.9	12	
23	---	Tanımlanamayan protein						
24	---	Tanımlanamayan protein						
25	MB31_ARATH	Mirosinaz-bağlayıcı protein-benzeri At3g16470	<i>Arabidopsis thaliana</i>	147	5.1/45.0	48.5	1	
26	PGKH_SPIOL	Fosfogliserat kinaz	<i>S. oleracea</i>	56	5.2/45.5	5.8/45.5	4	
27	PGKH_ARATH	Fosfogliserat kinaz	<i>A. thaliana</i>	76	5.2/45.5	6.2/49.9	5	
28	GLGS_BRANA	Glukoz-1-fosfat adenililtransferaz küçük alt birim	<i>B. napus</i>	413	5.3/45.5	5.9/57.0	19	

^a 2-D jellerde gösterilen benek numarasını ifade eder (Şekil 4.9).

^b SwissProt ve NCBI veri tabanlarına karşı yapılan MASCOT taramasının en iyi sonucuna göre belirlenen aksesyon numarasını ifade eder.

^c SwissProt ve NCBI veri tabanlarına karşı yapılan MASCOT taramasının en iyi sonucuna göre belirlenen proteini ifade eder.

^d SwissProt ve NCBI veri tabanlarına karşı yapılan MASCOT taramasının en iyi sonucuna göre belirlenen bitki türünü ifade eder.

^e MS analizleri ve MASCOT taraması temelinde yapılan protein tanımlaması için olasılık skorunu ifade eder.

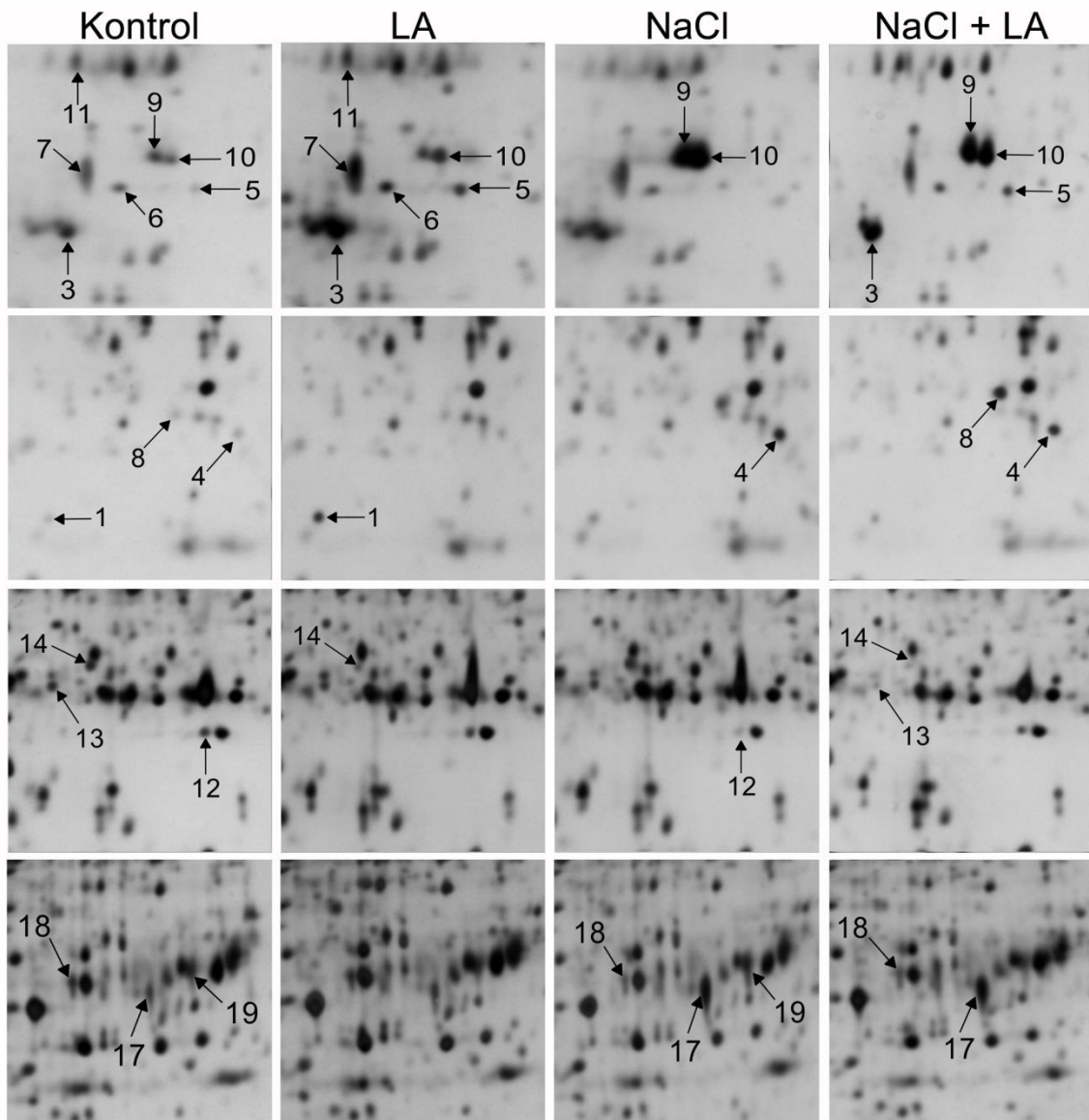
^f Tanımlanan protein için deneysel izoelektrik noktasını (pI) ve moleküler ağırlığı (MA, kDa) ifade eder.

^g Tanımlanan protein için teorik izoelektrik noktasını (pI) ve moleküler ağırlığı (MA, kDa) ifade eder.

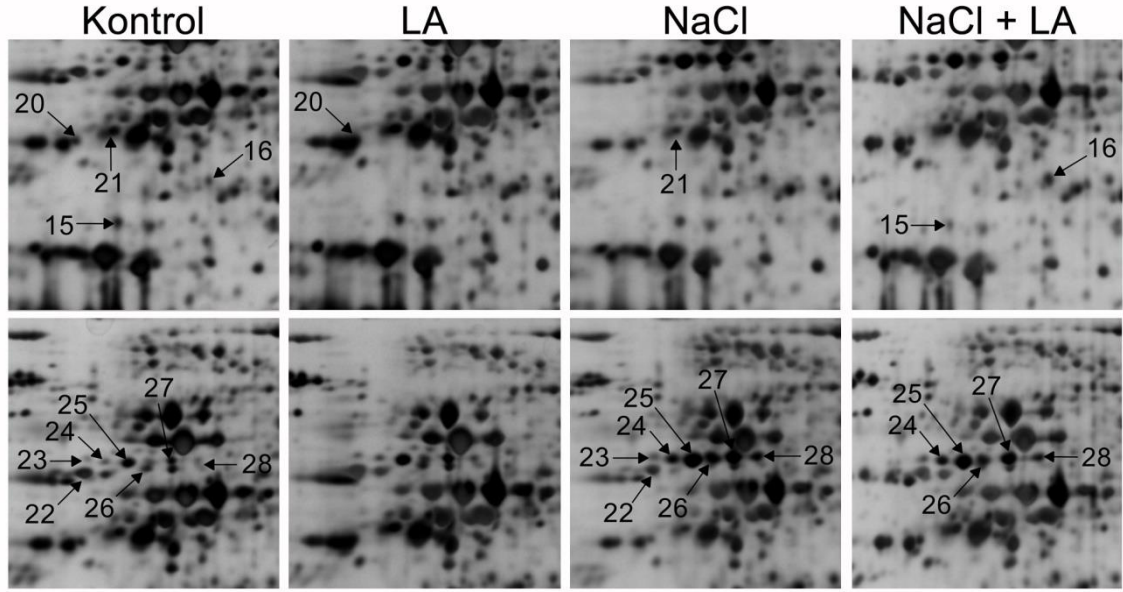
^h Eşleşen peptid sayısını ifade eder.

ⁱ Uygulamalara bağlı olarak protein bolluğundaki değişimleri ifade eder.

Mevcut araştırmada, enerji metabolizması ile ilgili 4 proteinin (19, 20, 26 ve 27 nolu benekler) ifadesi artan yönde düzenlenirken, 1 proteinin (benek 13) ifadesi azalan yönde düzenlenmiştir (şekil 4.9 ve 4.10, Çizelge 4.2 ve 4.3). Enerji metabolizması ile ilişkili olarak sedoheptuloz-1,7-bifosfat (benek 20) ifadesi sadece LA uygulamasında artan yönde düzenlenmiştir. Fruktoz-bifosfat aldolaz sitoplazmik izozim 2 (benek 19) ve fosfogliserat kinaz (benek 26) enzimlerinin ifadesi sadece NaCl stresi altındaki fidelerde artan yönde düzenlenmiştir. Bununla birlikte, triozfosfat izomeraz (benek 13) proteininin ifadesi NaCl+LA uygulamasında azalan yönde düzenlenmiştir (şekil 4.9 ve 4.10, Çizelge 4.2 ve 4.3).



şekil 4.10 şekil 4.9'da ifadesinde değişiklik gösteren protein beneklerinin büyütölmüş gösterimi.



Şekil 4.10 (Devamı) Şekil 4.9’da ifadesinde değişiklik gösteren protein beneklerinin büyütülmüş gösterimi.

Mevcut araştırmada, stres savunma ile ilgili 4 proteinin (4, 5, 6 ve 11 nolu benekler) ifadesi artan yönde düzenlenirken, 1 proteinin (benek 15) ifadesi azalan yönde düzenlenmiştir (Şekil 4.9 ve 4.10, Çizelge 4.2 ve 4.3). Kanola fidelerinin yaprak dokularında tioredoksin M-type 4 (benek 6) ve 2-Cys peroksiredoksin BAS1 (benek 11) proteinlerinin ifadesi LA uygulamasında artan yönde düzenlenmiştir. Peroksiredoksin-2E (benek 5) proteininin ifadesi LA ve NaCl+LA uygulamalarında artan yönde düzenlenmiştir. Süperoksit dismutaz [Cu-Zn] (benek 4) ifadesi NaCl uygulamasında 4.6 kat artarken, NaCl+LA uygulamasında 2.9 kat artmıştır. Bununla birlikte, tiazol biyosentetik enzimin (benek 15) ifadesi NaCl+LA uygulamasında azalan yönde düzenlenmiştir. Son olarak, sinyal iletimi ile ilgili olarak anneksin D1 (benek 16) proteininin ifadesi NaCl+LA uygulamasında artan yönde düzenlenmiştir (Şekil 4.9 ve 4.10, Çizelge 4.2 ve 4.3).

Çizelge 4.3 MALDI-TOF/TOF kütle spektrometrisi ve MASCOT taraması ile tanımlanan proteinlerin fonksiyonlarına göre sınıflandırılması ve hücrel lokalizasyonu.

Benek	Protein	Lokalizasyon	Fonksiyon
1	Fotosistem II reaksiyon merkezi PSB28 proteini	Kloroplast	Fotosentez
2	ATP sentaz epsilon zinciri	Kloroplast	ATP sentezi
3	Glisin ayırma sistemi H protein 1	Mitokondri	Primer metabolizma
4	Süperoksit dismutaz [Cu-Zn]	Kloroplast	Stres savunma
5	Peroksiredoksin-2E	Kloroplast	Stres savunma
6	Tiyoredoksin M-tip 4	Kloroplast	Stres savunma
7	50S ribozomal protein L12-3	Kloroplast	Primer metabolizma
8	Sitokrom b ₆ -f kompleksi demir-kükürt altbirimi	Kloroplast	Fotosentez
11	2-Cys peroksiredoksin BAS1	Kloroplast	Stres savunma
13	Triozfosfat izomeraz	Sitozol	Enerji metabolizması
14	Karbonik anhidraz	Kloroplast	Fotosentez
15	Tiazol biyosentetik enzim	Kloroplast	Stres savunma
16	Anneksin D1		Sinyal iletimi
17	Lon proteaz homologu 1	Peroksizom	Şaperon
19	Fruktoz-bifosfat aldolaz, sitoplazmik izozim 2	Sitozol	Enerji metabolizması
20	Sedoheptuloz-1,7-bifosfataz	Kloroplast	Enerji metabolizması
21	Magnezyum-şelataz altbirim chli	Kloroplast	Fotosentez
22	RuBisCO aktivaz	Kloroplast	Fotosentez
25	Mirosinaz-bağlayıcı protein-benzeri At3g16470		Stres savunma
26	Fosfogliserat kinaz	Kloroplast	Enerji metabolizması
27	Fosfogliserat kinaz	Kloroplast	Enerji metabolizması
28	Glukoz-1-fosfat adenililtransferaz küçük alt birim	Kloroplast	Primer metabolizma

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

5.1 Tuz Toleransı Üzerine Dışsal Lipoik Asit ve Salisilik Asit Uygulamalarının Etkisi

Tuz stresi bitkilerde ozmotik basıncı, iyon homeostazisi, besin alınımı ve fotosentetik aygıtları olumsuz etkileyerek bitki büyüme ve gelişimi ile ilgili birçok fizyolojik ve biyokimyasal mekanizmayı etkileyen önemli bir stres faktörüdür. Bu nedenle, tarımsal bitkilerde tuz toleransının artırılması son yıllarda önemli bir araştırma konusu haline gelmiştir (Ashraf and Akram 2009). Bitkilerde tuz toleransının artırılmasında bitki büyüme düzenleyicileri ve antioksidan moleküllerin dışsal uygulamaları yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle bu çalışmada, kanola fidelerinde tuz toleransının artırılmasında dışsal uygulanan lipoik asit (LA) ve salisilik asidin (SA) etkinliği değerlendirilmiştir. Bu amaçla, NaCl stresi altındaki kanola fidelerinin yaprak dokularına spreyleme yoluyla LA ve SA uygulanmış ve fide büyüme parametreleri belirlenmiştir. Tuz stresi kanola fidelerinin toprak üstü ve kök dokularının taze ve kuru ağırlıklarında önemli düzeyde azalmaya neden olmuştur. Benzer etki, kanola bitkileri ile yapılan önceki çalışmalarda da bildirilmiştir (Qasim *et al.* 2003, Hashemi *et al.* 2010, Naeem *et al.* 2010). Mevcut çalışmada dışsal uygulanan LA ve SA, tuz stresi altındaki kanola fidelerinin büyüme parametrelerindeki (taze ve kuru ağırlık) NaCl-teşvikli azaltmayı hafifletmiştir. Bu etki, LA ve SA uygulamaları için benzer bulunmuştur. Dışsal uygulanan SA'nın, fide büyümesi üzerine tuz stresinin olumsuz etkilerini azalttığı salatalık (Dong *et al.* 2011), buğday (Li *et al.* 2013) ve *Brassica juncea* (Syed *et al.* 2011) bitkilerinde gösterilmiştir. Tuz stresi altında, fide büyümesindeki SA-teşvikli artışın büyüme karakteristiklerinin teşviki ve membranlar üzerine SA'nın koruyucu rolleri ile ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür (Wang *et al.* 2007). Bununla birlikte, dışsal SA uygulamasının bitkilerde şeker metabolizması, fotosentezi ve antioksidan savunma sistemini etkileyerek tuz stresine karşı toleransı arttırdığı bildirilmiştir (Dong *et al.* 2011, Syed *et al.* 2011, Li *et al.* 2013). Salisilik asidin aksine LA'nın tuz toleransı üzerine etkilerini araştırma çalışmaya literatürde rastlanılmamıştır. Bir antioksidan olarak LA koruyucu rollere sahip olduğundan, dışsal LA uygulaması bitkilerde abiyotik streslerin olumsuz etkilerini hafifletmede potansiyele sahip olabilir. Çalışmamızın bir

sonucu olarak dışsal uygulanan LA kanola fidelerinin tuz stresine karşı olan cevaplarını dzenlemiştir. Tuz stresi altında fide büyümesinin iyileştirilmesinde SA gibi LA'nın da potansiyele sahip olduğu ileri sürülebilir.

Lipid peroksidasyonunun seviyesi ile gösterilen plazma membranlarının fonksiyonu çevresel streslerden olumsuz etkilenmektedir. Araştırmamızda, membran btnlğu ve lipid peroksidasyonunun bir indeksi olarak çalışılan malondialdehit (MDA) içeriği tuz stresi altındaki kanola fidelerinin yaprak dokularında artış göstermiştir. Membran zararının reaktif oksijen türlerinin aşırı üretiminden veya doymamış yağ asitlerinin direkt degradasyonundan kaynaklandığı belirtilmiştir (Sairam *et al.* 2000). Mevcut araştırmada, dışsal LA ve SA uygulamaları MDA içeriğindeki NaCl-teşvikli artışı azaltmıştır. Benzer sonuçlara neden olan LA ve SA uygulamalarının, tuz stresi altındaki kanola fidelerinde lipid peroksidasyonunu önlediği ileri sürülebilir. Dışsal uygulanan SA'nın tuz stresi altında MDA içeriğini azalttığına ilişkin benzer sonuçlar mısır bitkilerinde bildirilmiştir (Gunes *et al.* 2007, Gautam and Singh 2009). Diğer taraftan, tuz stresi koşullarında LA'nın direkt olarak reaktif oksijen türlerini detoksifiye ettiği ve antioksidan savunma sisteminde önemli rol oynadığı belirtilmiştir (Prez-Lpez *et al.* 2010). Bu bağlamda araştırmamızda, tuz stresi altındaki kanola fidelerinde dışsal LA uygulamasının reaktif oksijen türlerini detoksifiye ederek lipid peroksidasyonunu azalttığı ve membran btnlğu koruduğu, böylelikle tuz toksisitesini azaltarak bitki büyümesini olumlu etkilediği ileri sürebilir.

Tuz stresine maruz kalan bitkilerde fotosentetik pigmentlerin içeriğindeki azalma, ışık yakalama kapasitesinde ve dolayısıyla bitkinin fotosentetik kapasitesinde azalmaya neden olabilmektedir (Gautam and Sing 2009, Hayat *et al.* 2010b). Mevcut araştırmada, kontrole göre NaCl stresi kanola fidelerinin klorofil içeriğinde önemli bir değişime neden olmamıştır. Diğer taraftan, LA, SA, NaCl+LA ve NaCl+SA uygulamaları fidelerin klorofil içeriğinde artışa neden olmuştur. Mısır bitkilerinde dışsal SA uygulamasının klorofil içeriğindeki NaCl teşvikli azalmayı hafiflettiği bildirilmiştir (Gautam and Sing 2009). Salisilik asidin içsel nitratın mobilize edilmesi ve klorofil

biyosenteziyle fotosentetik aparatların fonksiyonel durumunu arttırdığı belirtilmiştir (Shi *et al.* 2006). Mevcut araştırmada, klorofil içeriğindeki LA teşvikli artışın tuz stresi koşullarında oksidatif stresteki azalmayla ilişkili olabileceği ileri sürülebilir.

Prolin çevresel streslere karşı bitki savunma sisteminde fonksiyon gören önemli bir imino asittir (Rai 2002). Stres koşullarında, prolin birikiminin bitkilerde ozmotik düzenlemeyi kolaylaştırdığı ve tolerans sağladığı bildirilmiştir (Misra and Gupta 2005). Mevcut araştırmada, NaCl stresi kontrole göre kanola çeşitlerinin yaprak dokularında prolin içeriğinde önemli bir artışa neden olmuştur. Benzer olarak prolin içeriğindeki artış tuz stresi altındaki *B. juncea* (Yusuf *et al.* 2008), mısır (Gautam and Singh 2009), *Vigna radiata* (Hayat *et al.* 2010b), çeltik (Roychoudhury *et al.* 2011) ve arpa (Yıldız and Terzi 2013) gibi bitki türlerinde de belirlenmiştir. Araştırmamızda, tuz stresi altındaki kanola fidelerinde dışsal LA ve SA uygulamalarının prolin içeriğinde önemli bir değişime neden olmadığı belirlenmiştir. Gautam ve Singh (2009), tuz stresi altındaki mısır bitkilerinde SA uygulamasının prolin içeriğini azalttığını ve bu azalışın prolin biyosentezindeki enzimlerin azalmasından veya prolin parçalanmasındaki enzimlerin artışından kaynaklanabileceğini bildirmiştir. Bununla birlikte, tuz stresi altında prolin birikimi ve bitki büyümesi arasında pozitif bir korelasyonun olduğu ve prolin sentez enzimlerindeki SA teşvikli değişimlerin tuz toleransına katkıda bulunduğu belirtilmiştir (Misra and Saxena 2009). Ayrıca prolin tuz stresine karşı bir dizi SA teşvikli koruyucu reaksiyonun önemli bir bileşeni olarak ifade edilmiştir (Yusuf *et al.* 2008). Bu sonuçlara göre, tuz stresi altındaki kanola fidelerinde dışsal LA ve SA uygulamalarında belirlenen tuz toleransının prolin metabolizmasından bağımsız bir yolla gerçekleştiği ileri sürülebilir.

Sistein ve sistein içeren bileşikler bitkilerin strese karşı toleransında önemli rol oynayabilmektedir. Serbest sülfidril grupları içeren sistein ve diğer metabolitler yaygın bir şekilde tiyoller olarak adlandırılmaktadır (Höfgen *et al.* 2001). Mevcut araştırmada, NaCl stresi kanola fidelerinin yaprak dokularında sistein ve protein olmayan tiyollerin (NPT) içeriklerinde artışa neden olmuştur. Bu belirgin artış, tuz stresine cevap olarak

tiyol içeren bileşiklerin sentezlendiğini göstermektedir. Bununla birlikte, dışsal LA ve SA uygulamaları tuz stresi altındaki fidelerde sistein içeriğinde ilave artışa neden olurken, bu artış SA uygulamasında daha fazla bulunmuştur. Diğer taraftan, tuz stresi altındaki fidelerde LA ve SA uygulamaları NPT içeriklerinde azalmaya neden olmuştur. Sistein molekülünün bir parçası olarak sülfür grupları enzimlerin aktivitesini düzenleyen ve hücreleri oksidatif strese karşı koruyan biyolojik redoks reaksiyonlarında fonksiyon görmektedir (Nazar *et al.* 2011). Bununla birlikte, kükürt içeren bileşiklerin ozmolit veya antioksidan olarak sergiledikleri rollerden dolayı tuz stresi sırasında yüksek oranda sistein gereksinimi olduğu bildirilmiştir (Barroso *et al.* 1999). Sonuçlarımız dahilinde, LA ve SA uygulamalarının sistein içeriğini arttırarak tuz stresinin büyüme üzerindeki olumsuz etkilerini azaltabileceği ileri sürülebilir.

Bitkilerde askorbat (AsA) ve glutatyon (GSH) reaktif oksijen türlerinin direkt olarak temizlenmesinde rol oynayan önemli enzimatik olmayan antioksidanlardandır (Noctor and Foyer 1998). Ayrıca GSH'un tuz stresi koşullarında redoks durumunu sürdürerek koruyucu rol oynadığı bildirilmiştir (Shalata *et al.* 2001). Mevcut araştırmada, kontrole göre NaCl stresi kanola fidelerinin AsA ve GSH içeriklerinde azalmaya neden olmuştur. Bununla birlikte, AsA içeriğini dışsal LA ve SA uygulamaları azaltmıştır. Ayrıca LA uygulaması tuz stresi altındaki fidelerin AsA içeriğinde ilave azalışa neden olurken, SA uygulaması önemli bir etki göstermemiştir. Çalışmamıza zıt olarak tuz stresi altındaki bitkilerde dışsal SA uygulamasının AsA içeriğini arttırdığı bildirilmiştir (He and Zhu 2008, Barba-Espín *et al.* 2011, Li *et al.* 2013). Kanola fidelerinin AsA içeriğindeki azalış düşük AsA/DHA oranıyla da gösterildiği gibi artan DHA içeriğiyle ilişkili olabilir. DHA birikiminin hücre metabolizması için olumsuz bir durum olduğu belirtilmiştir (De Gara *et al.* 2000). Mevcut çalışmada, NaCl+SA uygulaması GSH içeriğindeki tuz stresi teşvikli azalmayı ortadan kaldırmıştır. Bu durum kanola fidelerinde SA teşvikli tuz toleransının artan GSH içeriği ve GSH/GSSG oranı ile ilişkili olabileceğini ileri sürebilir. Lipoik asit hücre membranındaki antioksidanların aktivitesi ile sitoplazmadaki antioksidanların aktivitesi arasında bağlantı kurarak antioksidan ağını güçlendirmesine rağmen (Navarilzo *et al.* 2002), araştırmamızda tuz stresi altındaki kanola fidelerinin AsA ve GSH

içeriklerinde dışsal LA uygulamasının önemli teşvik edici etkisi belirlenmemiştir. Bu durum, LA'nın reaktif oksijen türlerini direkt detoksifiye etmesinden veya LA uygulamasının GSH ve AsA'nın okside formlarını indirgemediye yetersiz kalmış olmasından kaynaklanmış olabilir.

Antioksidan savunma sisteminin etkinliği antioksidan havuzunun boyutu veya metabolizmanın antioksidanları aktif formlarında tutma yeteneği tarafından belirlenmektedir. Bu durum bitkilerin reaktif oksijen türlerine karşı gösterdikleri cevaplardaki farklılıkları ve tolerans seviyelerini ortaya çıkarmaktadır. Sonuç olarak, tuz toleransının kazanılması oksidatif strese karşı artan direncin bir sonucu oluşabilmektedir (Hernández *et al.* 2000). Mevcut araştırmada, tuz stresi kanola fidelerinin yaprak dokularında süperoksit dismutaz (SOD), guaiakol peroksidaz (POD), katalaz (CAT) ve askorbat peroksidaz (APX) gibi antioksidan enzimlerin aktivitesinde artışa neden olmuştur. Bununla birlikte, tuz stresi altındaki kanola fidelerinde antioksidan enzimlerin aktivitesi LA ve SA uygulamalarından farklı seviyede etkilenmiştir. LA uygulaması kontrol fidelerinde SOD aktivitesini arttırırken, tuz stresi altındaki fidelerin SOD aktivitesi LA ve SA uygulamaları tarafından etkilenmemiştir. Dışsal SA uygulaması tuz stresi altındaki fidelere POD aktivitesini arttırırken, LA uygulaması önemli bir etki göstermemiştir. Bununla birlikte, CAT aktivitesi LA, SA, NaCl+LA ve NaCl+SA uygulamalarında artmıştır. Tuz stresi altındaki kanola fidelerinde LA ve SA teşvikli CAT ve POD aktivitelerindeki artışın H₂O₂'i azalttığı ve oksidatif stresin etkilerini hafiflettiği ileri sürülebilir. Bununla birlikte, yalnızca NaCl uygulaması ile karşılaştırıldığında tuz stresi altındaki fidelere LA ve SA uygulamaları APX aktivitesinde azalmaya neden olmuştur. Bu sonuç, tuz stresi altındaki salatalık fidelerinde dışsal SA uygulamasının APX aktivitesini azalttığını bildiren Barba-Espín vd. (2011)'nin bulgularıyla benzerlik göstermektedir. Bu araştırmacılar, SA uygulanmış tuz stresi altındaki fidelere APX aktivitesindeki azalmanın artan H₂O₂ seviyesi ile korelasyon gösterdiğini bildirmiştir. Tuz stresine maruz bırakılmış kanola fidelerinde dışsal LA ve SA uygulamalarını takiben lipid peroksidasyonundaki azalmanın antioksidan enzimlerin aktivitesindeki değişimler ile ilişkili olduğu ileri sürülebilir. Sonuç olarak, tuz stresi

altındaki fidelerde LA ve SA uygulamaları ile antioksidan enzimlerin aktivitesindeki değişimlerin oksidatif stresi hafiflettiği ve böylece bitki büyümesini arttırdığı söylenebilir.

Sonuç olarak, kanola fidelerinde NaCl stresi bitki büyümesi, AsA ve GSH içeriklerini azaltmış, lipid peroksidasyonu, prolin, sistein ve tiyol içeriklerini ve antioksidan enzimlerin aktivitesini arttırmıştır. Bu araştırmada, bitkilerde tuz toleransını teşvik ettiği bilinen SA uygulamasının yanı sıra dışsal LA uygulamasının da antioksidan savunma sistemini aktive ederek tuz stresinin büyüme üzerine olan olumsuz etkilerini hafiflettiği belirlenmiştir. Bununla birlikte, LA uygulamasına göre SA uygulaması daha etkin bir şekilde sistein içeriği, GSH içeriği ve POD aktivitesini teşvik etmiş olmasına karşın, büyüme parametrelerinde benzer etki göstermiştir. Araştırma sonuçlarımız, birçok çalışmada yaygın olarak kullanılan ve tuz toleransındaki olumlu etkileri iyi bilinen SA gibi dışsal LA uygulamasının da etkili olduğunu göstermiştir. Bu bağlamda, LA kimyasalının tarımsal uygulamalardaki öneminin araştırılması gerekmektedir.

5.2 Proteom Değişimleri Üzerine Dışsal Lipoik Asidin Etkileri

Bu araştırmanın ikinci aşamasında, proteomik yaklaşım kullanılarak kanola fidelerinde tuz toleransının artırılmasında dışsal LA uygulamasının etkisi değerlendirilmiştir. Bu amaçla, 2-D IEF-SDS/PAJE yöntemi kullanılarak proteom profilleri elde edilmiştir. Bu profillerde, PDQuest yazılımı kullanılarak kantitatif görüntü analizleri ile ifade seviyesi 2 kat veya daha fazla artan veya azalan yönde düzenlenen 28 protein beneti belirlenmiştir. Bu protein beneklerinden 22'si MALDI-TOF/TOF kütle spektrometrisi ve veri tabanı taraması ile başarılı bir şekilde tanımlanmıştır. Çizelge 4.2'de gösterildiği gibi tanımlanan proteinlerin deneysel ve teorik moleküler ağırlıkları (MA) ve izoelektrik noktaları (pI) arasında farklılıklar gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, 4 proteinin teorik pI değerlerinin kullanılan IPG striplerinin pH aralığının üzerinde olduğu belirlenmiştir. Bu durumun tuz stresi altındaki soya fasulyesi fidelerinde de belirlendiği ve genomik bilginin noksanlığı, gen ifadesi ürünlerinin farklılığı, post-translasyonel modifikasyonlar ve degradasyon gibi faktörlerden kaynaklanabileceği bildirilmiştir (Ma *et al.* 2012).

Tuz stresi genellikle bitkilerin fotosentetik oranlarında azalmaya neden olmaktadır (Sudhir and Murthy 2004). Fotosentetik oranlardaki tuz-teşvikli azalmanın ozmotik stresten kaynaklı stoma kapanması, fotosentetik aygıtlardaki zarardan ve karbon özümlemesi için RuBisCO etkinliğinin azalmasından kaynaklandığı bildirilmiştir (Chaves *et al.* 2009). Mevcut araştırmada, dışsal LA uygulaması ve NaCl stresi kanola fidelerinin yaprak dokularında fotosentez ile ilişkili proteinlerin ifade seviyelerinde değişimlere neden olmuştur. Bu bağlamda, fotosistem II reaksiyon merkezi PSB28 proteini ve 50S ribosomal protein L12-3'ün ifade seviyesi dışsal LA uygulamasında artan yönde düzenlenmiştir. Fotosistem II (PSII) reaksiyon merkezi fotosentetik membrana içsel ve dışsal yerleşmiş polipeptidleri içeren çok altbirimli protein-pigment kompleksidir (Raymond and Blankenship 2004). Düşük moleküler ağırlıklı transmembran proteini PSB28 oksijen çıkaran kompleksin bir altbirimidir. PSB28 proteininin, PSII biyogenezini ve kurulumunu düzenlediği (Shi *et al.* 2000b) ve fotoinhibisyonun sonrasındaki PSII'nin onarılmasını kolaylaştırdığı (Hagman *et al.* 1997) bildirilmiştir. PSB28 proteininin ifade seviyesi LA uygulamasında artmış olmasına karşın, NaCl+LA uygulaması bu etkiyi ortadan kaldırmıştır. Bu sonuçlar, LA uygulamasının kanola fidelerinde fotosentetik oranı düzenleyebileceğini göstermektedir. Diğer taraftan, 50S ribosomal altbirim protein sentezinde peptidil-transfer reaksiyonunu kataliz etmektedir. 50S ribosomal proteininin ifade seviyesinin tuz stresi altındaki soya fasulyesi bitkilerinde azalan (Sobhanian *et al.* 2010), buğday fidelerinde ise artan yönde düzenlendiği bildirilmiştir (Fatehi *et al.* 2012).

Sitokrom *b₆f* kompleksi, fotosistem II (PSII) ve fotosistem I (PSI) arasındaki elektron transferine ve döngüsel elektron akışına aracılık etmektedir. Bu kompleksin ışık enerjisinin termal dağılımına ve lümenin asitleşmesine katkıda bulunarak fotooksidatif zarara karşı direnç sağladığı bildirilmiştir (Munekage *et al.* 2001, Maiwald *et al.* 2003). Mevcut araştırmada, sitokrom *b₆f* kompleksi demir-kükürt altbiriminin ifade seviyesi NaCl+LA uygulamasında artan yönde düzenlenmiştir. Bu sonuca göre, sitokrom *b₆f* kompleksi demir-kükürt alt biriminin ifade seviyesinin NaCl+LA uygulamasında artması ile birlikte LA'nın tuz toleransına katkı sağlayabileceği ileri sürülebilir.

Karbonik anhidraz C4 bitkilerinde karbon dioksidin bikarbonata dönüşümünü katalizleyen önemli bir enzimdir (Hatch and Burnell 1990). Karbonik anhidrazın pH düzenlemesi, iyon değiş tokuşu, solunum ve fotosentetik CO₂ fiksasyonunu içeren birçok biyolojik işlevde fonksiyon gördüğü bildirilmiştir (Tashian 1989, Badger and Price 1994, Smith and Ferry 2000, Moroney *et al.* 2001). Mevcut araştırmada karbonik anhidraz proteininin ifade seviyesi LA ve NaCl+ LA uygulamalarında azalan yönde düzenlenmiştir. LA uygulamalarına maruz kalan kanola fidelerinde karbonik anhidraz bolluğundaki azalmanın sonucu olarak LA uygulamalarının karbon fiksasyon etkinliğini azalttığı ileri sürülebilir. Bununla birlikte, kanola fidelerinde LA teşvikli tuz toleransında karbonik anhidrazın rolünün anlaşılması için daha fazla çalışmaya gereksinim olduğu görülmektedir.

Magnezyum-şelataz klorofil biyosentezinde fonksiyon gören üç altbirimden oluşan bir enzimdir ve Mg⁺² iyonunun protoporfirin IX'un yapısına katılımını kataliz etmektedir (Rissler *et al.* 2002). Mevcut araştırmada, magnezyum-şelataz alt birim chli proteininin ifade seviyesi NaCl uygulamasında azalan yönde düzenlendiği belirlenmiştir. Bununla birlikte, NaCl stresi koşullarında dışsal uygulanan LA magnezyum-şelataz proteininin ifade seviyesindeki NaCl-teşvikli azalmayı ortadan kaldırmıştır. Tuz stresi koşullarında bu proteinin LA uygulaması ile artan yönde düzenlenmesi, dışsal LA uygulamasının klorofil biyosentezindeki inhibisyonu azalttığı ve böylece tuz toleransına katkıda bulunduğu ileri sürebilir.

RuBisCO aktivaz, RuBisCO'nun aktif bölgesinden ribuloz-1,5-bifosfatı ATP hidrolizi ile uzaklaştıran önemli bir fotosentetik enzimdir (Jordan and Chollet 1983). Ayrıca RuBisCO aktivazın stres koşullarında bir şaperon olarak fonksiyon gördüğü de bildirilmiştir (Sobhanian *et al.* 2010). Tuz stresi altındaki soya fasulyesi bitkilerinde RuBisCO aktivazın azalan yönde (Sobhanian *et al.* 2010), kanola ve buğday fidelerinde ise artan yönde düzenlendiği bildirilmiştir (Bandeogh *et al.* 2011, Fatehi *et al.* 2012). Mevcut araştırmada, RuBisCO aktivaz proteininin ifade seviyesi NaCl uygulamasında azalan yönde düzenlenmiştir. Bununla birlikte, NaCl-teşvikli RuBisCO aktivaz

proteininin ifade seviyesindeki bu azalma NaCl+LA uygulamasında ortadan kalkmıştır. Bu sonuçlar, stres koşulları altında dışsal uygulanan LA'nın RubisCO aktivaz proteininin ifade seviyesini arttırarak karbon fiksasyonunu arttırdığı ve tuz toleransına önemli katkı sağlayabileceğini göstermektedir.

Tuz stresi altında, reaktif oksijen türlerinin daha fazla üretilmesini sınırlamak ve enerjiyi korumak için enerji metabolizma hızlarını azaltırlar (Moller 2001). Mevcut araştırmada, LA ve NaCl uygulamalarında kanola fidelerinin yaprak dokularında 5 proteinin ifade seviyesi artan yönde düzenlenirken, bir proteinin ifade seviyesi azalan yönde düzenlenmiştir. ATPaz'lar membranlardan protonların taşınımını sağlayarak ATP sentezinden sorumlu membrana bağlı enzim kompleksleridir. Araştırmamızda, bir F-ATPaz olan kloroplastik ATP sentaz epsilon zincir proteininin ifade seviyesi NaCl ve NaCl+LA uygulamalarında artan yönde düzenlenmiştir. NaCl stresi altında bu proteinin sentezindeki artışın muhtemelen artan enerji gereksinimi karşılamak olabileceği ileri sürülebilir.

Bitkiler stres koşullarında normal büyüme ve gelişimlerini sürdürebilmek için glikoliz ve trikarboksilik asit (TCA) döngüsü gibi metabolik yolları düzenlemek zorundadırlar. Glikolizin önemli enzimlerinden biri olan sitozolik trioz fosfat izomeraz enzimi dihidroksiaseton fosfat ve gliseraldehit 3-fosfat arasındaki geri dönüşümlü reaksiyonu kataliz etmekte ve etkin bir enerji üretiminde önemli bir rol oynamaktadır. Araştırmamızda, NaCl+LA uygulaması triozfosfat izomeraz proteininin ifade seviyesinde azalmaya neden olmuştur. Bununla birlikte, NaCl stresi diğer bir glikolitik enzim olan fruktoz-bifosfat aldolazın ifade seviyesini arttırırken, dışsal LA uygulaması bu etkiyi ortadan kaldırmıştır. Fruktoz-bifosfat aldolazın karbohidrat metabolizmasında ve sinyal iletiminde önemli triozfosfatlar ve türevlerinin üretiminde önemli rol oynadığı bildirilmiştir (Schaeffer *et al.* 1997). Fruktoz-bifosfat aldolaz ifadesinin tuz stresi altındaki salatalık ve *Arabidopsis* köklerinde azalan yönde düzenlendiği bildirilmiştir (Jiang *et al.* 2007, Du *et al.* 2010). Araştırmamızda, NaCl ve NaCl+LA uygulamasının

glükoliz reaksiyonları ile ilgili proteinleri düzenleyerek karbohidrat ve nişasta seviyelerini kontrol ederek tuz toleransına katkıda bulunabileceği ileri sürülebilir.

Sedoheptuloz-1,7-bifosfat Calvin döngüsü, fosfogliserat kinaz ise hem Calvin hem de glükolizde fonksiyon görmektedir (Anderson *et al.* 2004). Sedoheptuloz-1,7-bifosfat sakkaroz ya da nişasta sentezi yerine ribuloz-1,5-bifosfatın oluşumuna katılmaktadır. Bununla birlikte, transgenik çeltik bitkilerinde sedoheptuloz-1,7-bifosfat geninin (*Ossbp*) aşırı ifadesinin tuzluluk ve yüksek sıcaklık streslerine karşı toleransı arttırdığı bildirilmiştir (Feng *et al.* 2007a, b). Mevcut araştırmada, sedoheptuloz-1,7-bifosfat proteininin ifadesi LA uygulamasında artan yönde düzenlenmiştir. Bununla birlikte, kloroplastik fosfogliserat kinaz proteininin ifade seviyesi ise NaCl ve NaCl+LA uygulamalarında artan yönde düzenlenmiştir. Bu sonuçlar, Calvin döngüsündeki bazı enzimlerin LA, NaCl ve NaCl+LA uygulamalarındaki ifade profillerindeki değişiklikler sayesinde tuz stresine karşı toleransta önemli rol oynayabileceklerini göstermektedir.

Bitkilerde tuz stresi genellikle reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimine neden olduğu bilinmektedir. Bitkilerin bu toksik bileşiklerin üstesinden gelebilmek için çeşitli antioksidan savunma sistemlerini geliştirdiği ve bitki tuz toleransının etkin bir antioksidan savunma sistemi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Parida and Das 2005). Araştırmamızda, stres savunma ile ilişkili Cu-Zn süperoksit dismutaz, peroksiredoksin-2E, tiyoredoksin M-tip 4, 2-Cys peroksiredoksin BAS1, tiazol biyosentetik enzim ve mirosinaz-bağlayıcı protein-benzeri At3g16470 proteinlerinin ifade seviyelerinde farklılıklar belirlenmiştir. Süperoksit dismutaz (SOD) çeşitli biyotik ve abiyotik streslerin sonucu olarak oluşan reaktif oksijen türlerine karşı ilk savunma hattını oluşturmaktadır (Hernandez and Almansa 2002, Grene 2002). Demir-SOD (Fe-SOD), mangan-SOD (Mn-SOD) ve bakır/çinko-SOD olmak üzere üç tip SOD farklı hücresel kısımlarda lokalize olmaktadır (Grene 2002). Araştırmamızda, NaCl ve NaCl+LA uygulamaları kloroplastik Cu/Zn-SOD proteininin ifade seviyesinde sırasıyla 4.6 ve 2.9 kat artışa neden olmuştur. Bu sonuca göre, NaCl stresi altındaki kanola fidelerine dışsal LA uygulaması ile birlikte

SOD aktivitesindeki azalmanın süperoksit radikalının oluşumundaki azalma ile ilişkili olabileceği ileri sürülebilir.

Tiyol spesifik peroksidazlar olan peroksiredoksinler antioksidan savunma sisteminin önemli bileşenleri olup; tiyoredoksin veya glutaredoksin sistemi aracılığıyla sağlanan indirgeyici güç ile hidrojen peroksit ve alkil hidroperoksitleri indirgemektedir (Dietz 2003, Villiers *et al.* 2011). Bununla birlikte, peroksiredoksinlerin kloroplastlardaki redoks homeostazisinde fonksiyon görebileceği bildirilmiştir (Hall *et al.* 2011). Tiyoredoksinler disülfid bağlarını indirgemekte ve hidrojen peroksit detoksifikasyonunda fonksiyon gören peroksiredoksinler gibi enzimlere elektron vermektedir (Dietz *et al.* 2006). Tiyoredoksin veya peroksiredoksin proteinlerinin miktarındaki artış tuz stresi altındaki *Cucumis sativus* bitkilerinin kök dokusunda (Du *et al.* 2010) ve arpa bitkilerinin yaprak dokusunda (Fatehi *et al.* 2012) belirlenmiştir. Mevcut araştırmada, dışsal LA uygulaması ve NaCl+LA uygulamasında peroksiredoksin-2E ve 2-Cys peroksiredoksin BAS1 proteinlerinin ifade seviyesi artan yönde düzenlenmiştir. NaCl stresi altındaki kanola fidelerinin yapraklarında peroksiredoksin-2E proteininin dışsal LA uygulaması tarafından artan yönde düzenlenmesi, LA tarafından aktive olan savunma mekanizmalarının tuz toleransında muhtemelen önemli rolü olabileceğini göstermektedir.

Tiazol biyosentetik enzim oksidatif stresin azaltılmasında önemli rolü olan tiaminin öncüsü tiazolün oluşumunda fonksiyon gördüğü bildirilmiştir (Nandi *et al.* 2005). Bununla birlikte, tiazol biyosentetik enzimin birçok stres durumuna karşı adaptasyonda fonksiyon gördüğü ve DNA zararına karşı tolerans sağladığı bildirilmiştir (Papini-Terzi *et al.* 2003). Araştırmamızda, NaCl stresi ile birlikte uygulanan LA tiazol biyosentetik enzimin ifadesini azalan yönde düzenlemiştir. Bu sonuç, tiazol biyosentetik yolun NaCl+LA uygulamasından etkilendiğini göstermektedir.

Mirosinazlar glukozinolatların haşere ve patojenlere karşı biyolojik aktivitelere sahip bileşiklere parçalanmasını kataliz etmekte (Bones and Rossiter 1996) ve

glukozinolatlarda bulunan azot ve kükürte gereksinim duyulduğunda bu enzim aktivite göstermektedir (Alvarez *et al.* 2009). Mirosinaz-benzeri protein olan jacalin lektin proteininin (At3g16470) ifade seviyesindeki artış NaCl stresi altındaki *Arabidopsis* köklerinde belirlenmiştir (Jiang *et al.* 2007). Araştırmamızda, mirosinaz-bağlayıcı proteininin ifade seviyesi NaCl uygulamasında azalan yönde düzenlenirken, NaCl+LA uygulaması ile bu etki kontrol bitkilerinin seviyesine ulaşmıştır. Tuz stresi koşullarında LA uygulaması ile bu proteinin ifadesindeki artışın tuz toleransı ile ilişkili olabileceği ileri sürülebilir.

Glisin ayırma multienzim kompleksinin bir parçası olan glisin ayırma H proteini bitki mitokondrisinde lokalize olmaktadır. Glisin dekarboksilaz veya glisin ayırma sistemi olarak adlandırılan bu enzim, fotosolunum döngüsünün peroksizom evresinde oluşan glisinin mitokondriyal evrede serine dönüşümünü katalizlemektedir (Vauclare *et al.* 1996). Bezelye bitkilerinde düşük sıcaklık ve kuraklık stresi koşullarında oluşan reaktif oksijen türlerinin H proteinine zarar verdiği ve glisin dekarboksilaz enziminin inhibisyonuna neden olduğu bildirilmiştir (Taylor *et al.* 2002). Ayrıca patates bitkilerinde düşük sıcaklık ve tuz stresinin H proteinini kodlayan genlerin ifadesini azalttığı belirtilmiştir (Evers *et al.* 2012). Bununla birlikte, düşük sıcaklık, su eksikliği ve tuz stresi altındaki bitkilerde glisin dekarboksilaz proteininin ifade seviyesindeki artış yapılan proteomik çalışmalarla gösterilmiştir (Taylor *et al.* 2005, Veeranagamallaiah *et al.* 2008, Fatehi *et al.* 2012). Araştırmamızda, glisin ayırma sistemi H proteininin ifade seviyesi LA ve NaCl+LA uygulamalarında artan yönde düzenlenmiştir. Bu sonuca göre artan protein bolluğu artan fotosolunum oranını yansıtabilir. Bu sonuç, LA uygulamasının stres koşullarında fotosolunumun devamlılığını sağlayarak Calvin döngüsünün gerçekleşmesine katkıda bulunabileceğini göstermektedir. Bu nedenle, strese karşı koymada LA'nın önemli bir sinyal molekülü olabileceği de ileri sürülebilir.

Tuz stresi altında bitkiler sinyal iletim ağlarını kullanarak stres sinyallerini algılar ve iletirler. Bitkiler, birkaç sinyal iletim yolu aracılığıyla çok sayıda fonksiyonel proteinin ifade seviyelerini düzenleyerek strese karşı tolerans sağlayabilirler. Anneksinler

Ca⁺²-bağımlı veya -bağımsız plazmamembran veya endomembran bağlayıcı proteinlerin bir ailesidir (Mortimer *et al.* 2008). Anneksinlerin peroksidaz aktivitesine sahip olduğu, oksidatif stresin etkilerini hafifletebildiği, kanallar olarak fonksiyon gördüğü ve fide gelişimi sırasında golgi veziküllerinin sekresyonunu düzenlediği bildirilmiştir (Clark *et al.* 2005, Gorecka *et al.* 2005, Laohavisit *et al.* 2009). Araştırmamızda, anneksin D1 proteininin ifade seviyesi NaCl+LA uygulamasında artan yönde düzenlenmiştir. Anneksin proteininin ifadesindeki artışın hücre sinyal iletim ağının düzenlenmesinde ve kontrolünde muhtemelen önemli bir fonksiyona sahip olduğu ve bu fonksiyonun yerine getirilmesinde LA'nın önemli bir role sahip olabileceği ileri sürülebilir.

Normal koşullar altında düşük seviyelerde bulunan birkaç önemli stres proteininin moleküler şaperonlar olarak fonksiyon gördüğü ve stres koşullarında bu proteinlerin hücrel homeoastazise katkıda buldukları belirtilmiştir (Wang *et al.* 2004). Ayrıca bitkilerin stres koşullarında proteinlerin yanlış etkileşimlere girmelerini engelleyen, katlanmamış veya hatalı katlanmış proteinlerin kümelenmesini önleyen ve proteinlerin doğru şekilde katlanmasını kolaylaştıran daha fazla şaperona ihtiyaç duydukları bilinmektedir (Henderson and Pockley 2005). ATP-bağımlı serin proteazlar peroksisom matriksinde yanlış katlanmış ve bağlı bulunmayan proteinlerin seçici degradasyonuna aracılık etmektedir (Lingard and Bartel 2009). Araştırmamızda, lon proteaz homologu 1 proteininin ifade seviyesi NaCl ve NaCl+LA uygulamalarında artan yönde düzenlenmiştir. Bu sonuç, proteinlerin yapı ve fonksiyonlarının korunması için gerekli olan şaperonların letal olmayan NaCl stresinde artarak strese karşı koymada önemli olabileceğini göstermektedir.

Glukoz-1-fosfat adenililtransferaz (ADP-glukoz pirofosforilaz), kloroplastta nişasta sentez yolunda glukoz-1-fosfattan ADP-glukoz oluşumunu katalize etmektedir (Ballicora *et al.* 2000). Mevcut araştırmada, glukoz-1-fosfat adenililtransferaz küçük alt biriminin ifade seviyesi NaCl ve NaCl+LA uygulamalarında artan yönde düzenlenmiştir. Bu enzimin ifade profilindeki artış, NaCl stresi koşullarında reaksiyonun nişasta sentezi yönünde devam ettiği; fakat NaCl+LA uygulamasında ilave bir artışın olmaması

muhtemelen LA'nın nişasta sentezi üzerinde önemli bir etkisinin olmadığını göstermektedir.

Sonuç olarak, proteomik yaklaşım bitkilerde tuz toleransından sorumlu moleküler mekanizmaların çalışılmasında güçlü bir tekniktir. Araştırmamızda, dışsal LA uygulaması ve NaCl stresine cevap olarak farklı şekilde ifade olan ve önemli biyolojik işlevlerde fonksiyon gören 22 protein beneği MALDI-TOF/TOF kütle spektrometrisi ile tanımlanmıştır. Çoğunlukla artan yönde düzenlenen bu proteinlerin tuz stresinin olumsuz etkilerinin üstesinden gelebilmek için bitki metabolizmasını etkilediği ileri sürülebilir. Bununla birlikte, kanola fidelerinde dışsal LA uygulamasıyla tuz toleransının artırılması fotosentez, savunma mekanizmaları, fotosolunum ve sinyal iletiminde fonksiyon gören proteinlerin artan ifadesiyle ilişkilendirilebilir. Bu bulgular, kanola fidelerinde LA uygulaması ile arttırılan tuz toleransı mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasına olanak sağlayacak ve sonraki fonksiyonel çalışmalar için bir temel oluşturacaktır.

KAYNAKLAR

- Abbasi, F.M. and Komatsu, S. (2004). A proteomic approach to analyze salt- responsive proteins in rice leaf sheath. *Proteomics*, **4**: 2072–2081.
- Abreu, M.E. and Munne-Bosch, S. (2009). Salicylic acid deficiency in *NahG* transgenic lines and *sid2* mutants increases seed yield in the annual plant *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, **60**: 1261–1271.
- Aebi, H. (1984). Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology*, **105**: 121–126.
- Ahmed, B., Abidi, H., Manaa, F., Hajer, A.M. and Ezzeddine, Z. (2009). Salicylic acid induced changes on some physiological parameters in tomato grown under salinity. The Proceedings of International Plant Nutrition Colloquium XVI UC Davis.
- Ahsan, N., Lee, D.G., Lee, S.H., Kang, K. Y., Lee, J.J., Kim, P.J., Yoon, H.S., Kim, J.S. and Lee, B.Y. (2007). Excess copper induced physiological and proteomic changes in germinating rice seeds. *Chemosphere*, **67**: 1182–1193.
- Ahsan, N., Lee, D.-G., Alam, I., Kim, P. J., Lee, J. J., Ahn, Y.-O., Kwak, S.-S., Lee, I.-J., Bahk, J.D., Kang, K.Y., Renaut, J., Komatsu, S., Lee, B.-H. (2008). Comparative proteomic study of arsenic-induced differentially expressed proteins in rice roots reveals glutathione plays a central role during As stress. *Proteomics*, **8**: 3561–3576.
- Alscher, R.G., Erturk, N. and Heath, L.S. (2002). Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*, **53**: 1331–1341.
- Alvarez, S., Berla, B.M., Sheffield, J., Cahoon, R. E., Jez, J.M. and Hicks, L.M. (2009). Comprehensive analysis of the *Brassica juncea* root proteome in response to cadmium exposure by complementary proteomic approaches. *Proteomics*, **9(9)**: 2419–2431.
- Alvarez, A.L. (2000). Salicylic acid in machinery of hypersensitive cell death and disease resistance. *Plant Molecular Biology*, **44**: 429–442.
- Anderson, L.E., Bryant, J.A. and Carol, A.A. (2004). Both chloroplastic and cytosolic phosphoglycerate kinase isozymes are present in the pea leaf nucleus. *Protoplasma*, **223(2-4)**: 103–110.
- Ashraf, M. and Foolad, M.R. (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany*, **59**: 206–216.

- Ashraf, M., Athar, H.R., Harris, P.J.C. and Kwon, T.R. (2008). Some prospective strategies for improving crop salt tolerance. *Advances in Agronomy*, **97**: 45–110.
- Ashraf, M. and Akram, N.A. (2009). Improving salinity tolerance of plants through conventional breeding and genetic engineering: An analytical comparison. *Biotechnology Advances*, **27**: 744–752.
- Ashraf, M. and Akram, N. (2010). The physiological, biochemical and molecular roles of brassinosteroids and salicylic acid in plant processes and salt tolerance. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **29**: 162–190.
- Badger, M.R. and Price, G.D. (1994). The role of carbonic anhydrase in photosynthesis. *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **45**: 369–392.
- Ballicora, M.A., Frueauf, J.B., Fu, Y., Schürmann, P. and Preiss, J. (2000). Thioredoxin ADP-glucose pyrophosphorylase by activation of the potato tuber. *Journal of Biological Chemistry*, **275**: 1315–1320.
- Bandehagh, A., Salekdeh, G.H., Toorchi, M., Mohammadi, A. and Komatsu, S. (2011). Comparative proteomic analysis of canola leaves under salinity stress. *Proteomics*, **11**: 1965–1975.
- Barkla, B.J., Vera-Estrella, R., Camacho-Emiterio, J. and Pantoja, O. (2002). Na⁺/H⁺ exchange in the halophyte *Mesembryanthemum crystallinum* is associated with cellular sites of Na⁺ storage. *Functional Plant Biology*, **29**: 1017–1024.
- Barkla, B., Vera-Estrella, R. and Pantoja, O. (2013). Progress and challenges for abiotic stress proteomics of crop plants. *Proteomics*, **13**: 1801–1815.
- Barroso, C., Romero, L.C., Cejudo, F.J., Vega, J.M. and Gotor, C. (1999). Salt-specific regulation of the cytosolic O-acetylserine(thiol)lyase gene from *Arabidopsis thaliana* is dependent on abscisic acid. *Plant Molecular Biology*, **40**: 729–736.
- Bates LS, Waldren RP, Teare ID. (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil*, **39**: 205–207.
- Beauchamp, C. and Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, **44**: 276–287.
- Belozerova, N.S., Baik, A.S. Butsanets, P.A., Kusnetsov, V.V., Shugaev, A.G. and Pojidaeva, E.S., (2014). Effect of salicylic acid on the alternative pathway of yellow lupine respiration. *Russian Journal of Plant Physiology*, **61**: 38–46.
- Biewenga, G.P., Haenen, G.R.M.M. and Bast, A. (1997). The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. *General Pharmacology*, **29**: 315–331.

- Bolte, S., Schiene, K. and Dietz, K.-J. (2000). Characterization of a small GTP-binding protein of the Rab 5 family in *Mesembryanthemum crystallinum* with increased level of expression during early salt stress. *Plant Molecular Biology*, **42**: 923–935.
- Bonawitz, N.D. and Chapple, C. (2010). The genetics of lignin biosynthesis: connecting genotype to phenotype. *Annual Reviews of Genetics*, **44**: 337–363.
- Bones, A. and Rossiter, J. (1996). The myrosinase-glucosinolate system, its organisation and biochemistry. *Physiologia Plantarum*, **97**: 194–208.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**: 248–254.
- Brugnoli, E. and Bjorkman, O. (1992). Growth of cotton under continuous salinity stress: influence on allocation pattern, stomatal and non-stomatal components of photosynthesis and dissipation of excess light energy. *Planta*, **187**: 335–347.
- Buchanan-Wollaston, V., Page, T., Harrison, E., Breeze, E., Lim, P.O., Nam, H.G., Lin, J.F., Wu, S.H., Swidzinski, J., Ishizaki, K. and Leaver, C.J. (2005). Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, **42**: 567–585.
- Cameron, R.K. (2000). Salicylic acid and its role in plant defense responses: what do we really know? *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **56**: 91–93.
- Compertelli, A.N., Previtali, G., Arce, C.A., Barra, H.S. and Casale, C.H. (2005). Activation of the plasma membrane H⁺-Atpase of *Saccharomyces cerevisiae* by glucose is mediated by dissociation of the H⁺-Atpase-acetylated tubulin complex. *FEBS Journal*, **272**: 5742–5752.
- Cao, Y.R., Chen, S.Y. and Zhang, J.S. (2008). Ethylene signaling regulates salt stress response: an overview. *Plant Signaling and Behavior*, **3**: 761–763.
- Caruso, G., Cavaliere, C., Guarino, C., Gubbiotti, R., Foglia, P. and Lagana, A. (2008). Identification of changes in *Triticum durum* L. leaf proteome in response to salt stress by two-dimensional electrophoresis and MALDI-TOF mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **391**: 381–390.
- Chattopadhyay, A., Subba, P., Pandey, A., Bhushan, D., Kumar, R., Datta, A., Chakraborty, S. and Chakraborty, N. (2011). Analysis of the grasspea proteome and identification of stress-responsive proteins upon exposure to high salinity, low temperature, and abscisic acid treatment. *Phytochemistry*, **72**: 1293–1307.

- Chaves, M.M., Flexas, J. and Pinheiro, C. (2009). Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany*, **103**: 551–560.
- Chen, H.-J., Hou, W.-C., Kuc, J. and Lin, Y.-H. (2001). Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent excretion modes of salicylic acid in tobacco cell suspension culture. *Journal of Experimental Botany*, **52**: 1219–1226.
- Cheng, Y.W., Qi, Y.C., Zhu, Q., Chen, X., Wang, N., Zhao, X., Chen, H.Y., Cui, X.J., Xu, L.L. and Zhang, W. (2009). New changes in the plasma-membrane-associated proteome of rice roots under salt stress. *Proteomics*, **9**: 3100–3114.
- Chinnusamy, V., Jagendorf, A. and Zhu, J.-K. (2005). Understanding and improving salt tolerance in plants. *Crop Science*, **45**: 437–448.
- Chitteti, B.R. and Peng, Z.H. (2007). Proteome and phosphoproteome differential expression under salinity stress in rice (*Oryza sativa*) roots. *Journal of Proteome Research*, **6**: 1718–1727.
- Clark, G.B., Lee, D., Dauwalder, M. and Roux, S.J. (2005). Immunolocalization and histochemical evidence for the association of two different *Arabidopsis* annexins with secretion during early seedling growth and development. *Planta*, **220(4)**: 621–631.
- Cummins, I., Cole, D.J. and Edwards, R.A. (1999). Role for glutathione transferases functioning as glutathione peroxidases in resistance to multiple herbicides in black-grass. *Plant Journal*, **18**: 285–292.
- D'Amico, M. L., Navari-Izzo, F., Sgherri, C., and Izzo, R. (2004). The role of lipoic acid in the regulation of the redox status of wheat irrigated with 20% sea water. *Plant Physiology and Biochemistry*, **42**: 329–334.
- Dani, V., Simon, W., Duranti, M. and Croy, R. (2005). Changes in the tobacco leaf apoplast proteome in response to salt stress. *Proteomics*, **5**: 737–745.
- Das, A.M. (2003). Regulation of the mitochondrial ATP-synthase in health and disease. *Molecular Genetics and Metabolism*, **79**: 71–82.
- De Gara, L., Paciolla, C., De Tullio, M.C., Motto, M. and Arrigioni, O. (2000). Ascorbate-dependent hydrogen peroxide detoxification and ascorbate regeneration during germination of a highly productive maize hybrid: evidence of an improved detoxification mechanism against reactive oxygen species. *Physiologia Plantarum*, **109**: 7–13.
- Dean, J.V., Mohammed, L.A. and Fitzpatrick, T. (2005). The formation, vacuolar localization, and tonoplast transport of salicylic acid glucose conjugates in tobacco cell suspension cultures. *Planta*, **221**: 287–296.

- Dean, J.V. and Delaney, S.P. (2008). Metabolism of salicylic acid in wild-type, *ugt74f1* and *ugt74f2* glucosyl-transferase mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum*, **132**: 417–425.
- Deef, H.E. (2007). Influence of salicylic acid on stress tolerance during seed germination of *Triticum aestivum* and *Hordeum vulgare*. *Advances in Biological Research*, **1**: 40–48.
- Degenhardt, B. and Gimmler, H. (2000). Cell wall adaptations to multiple environmental stresses in maize roots. *Journal of Experimental Botany*, **51**: 595–603.
- Del Rio, L.A., Corpas, F.J., Sandalio, L.M., Palma, J.M. and Gomez, M. (2002). Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. *Journal of Experimental Botany*, **53**: 1255–1572.
- Dietz, K.J. (2003). Plant peroxiredoxins. *Annual Review of Plant Biology*, **54**: 93–107.
- Dietz, K.J., Jacob, S., Oelze, M.L., Laxa, M., Tognetti, V., de Miranda, S.M.N., Baier, M. and Finkemeier, I. (2006). The function of peroxiredoxins in plant organelle redox metabolism. *Journal of Experimental Botany*, **57**: 1697–1709.
- Dietz, K.J. (2011). Peroxiredoxins in plants and cyanobacteria. *Antioxidant and Redox Signaling*, **15**: 1129–1159.
- Dong, C., Wang, X. and Shang, Q. (2011). Salicylic acid regulates sugar metabolism that confers tolerance to salinity stress in cucumber seedlings. *Scientia Horticulturae*, **129**: 629–636.
- Dreyer, I. and Uozumi, N. (2011). Potassium channels in plant cells. *FEBS Journal*, **278**: 4293–4303.
- Drykova, D., Cenklova, V., Sulimenko, V., Volc, J., Draber, P. and Binarova, P. (2003). Plant gamma-tubulin interacts with alpha beta-tubulin dimers and forms membrane-associated complexes. *Plant Cell*, **15**: 465–480.
- Du, C.X., Fan, H.F., Guo, S.R., Tezuka, T. and Li, J. (2010). Proteomic analysis of cucumber seedling roots subjected to salt stress. *Phytochemistry*, **71**: 1450–1459.
- Evers, D., Legay, S., Lamoureux, D., Hausman, J.F., Hoffmann, L. and Renaut, J. (2012). Towards a synthetic view of potato cold and salt stress response by transcriptomic and proteomic analyses. *Plant Molecular Biology*, **78**: 503–514.
- Fatehi, F., Hosseinzadeh, A., Alizadeh, H., Brimavandi, B. and Struik, P.C. (2012). The proteome response of salt-resistant and salt-sensitive barley genotypes to long-term salinity stress. *Molecular Biology Reports*, **39**: 6387–6397.

- Fariduddin, Q., Hayat, S. and Ahmad, A. (2003). Salicylic acid influences net photosynthetic rate, carboxylation efficiency, nitrate reductase activity and seed yield in *Brassica juncea*. *Photosynthetica*, **41**: 281–284.
- Feng, L.L., Wang, K., Li, Y., Tan, Y.P., Kong, J., Li, H., Li, Y. and Zhu, Y. (2007a). Overexpression of SBPase enhances photosynthesis against high temperature stress in transgenic rice plants. *Plant Cell Reports*, **26**: 1635–1646.
- Feng, L.L., Yan, Y.J., Liu, G., An, B.G., Yang, J., Yang, G.H., Li, Y. and Zhu, Y. (2007b). Overexpression of sedoheptulose-1,7-bisphosphatase enhances photosynthesis and growth under salt stress in transgenic rice plants. *Functional Plant Biology*, **34**: 822–834.
- Forouhar, F., Yang, Y., Kumar, D., Chen, Y., Fridman, E., Park, S.W., Chiang, Y., Acton, T.B., Montelione, G.T., Pichersky, E., Klessig, D.F. and Tong, L. (2005). Structural and biochemical studies identify tobacco SABP2 as a methyl salicylate esterase and implicate it in plant innate immunity. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, **102**: 1773–1778.
- Gaitonde, M.K. (1967). A spectrophotometric method for the direct measurement of cysteine in the presence of other naturally occurring amino acids. *Biochemical Journal*, **104**: 627–633.
- Gao, L., Yan, X., Li, X., Guo, G., Hu, Y., Ma, W. and Yan, Y. (2011). Proteome analysis of wheat leaf under salt stress by two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE). *Phytochemistry*, **72**: 1180–1191.
- Garcion, C. and Métraux, J.-P. (2006). Salicylic acid. In: *Plant Hormone Signaling*, Oxford: Blackwell Publishing Ltd. pp. 229–255.
- Garcion, C., Lohman, A., Lamodièrè, E., Catinot, J. and Buchala, A. (2008). Characterization and biological function of the *ISOCHORISMATE SYNTHASE 2* gene of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, **147**: 1279–1287.
- Gautam, S. and Singh, P.K. (2009). Salicylic acid-induced salinity tolerance in corn grown under NaCl stress. *Acta Physiologia Plantarum*, **31**: 1185–1190.
- Gill, S.S. and Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, **48**: 909–930.
- Gong, Z.Z., Koiwa, H., Cushman, M.A., Ray, A., Bufford, D., Kore-Eda, S., Matsumoto, T.K., Zhu, J.H., Cushman, J.C., Bressan, R.A. and Hasegawa, P.M. (2001). Genes that are uniquely stress regulated in salt overly sensitive (SOS) mutants. *Plant Physiology*, **126**: 363–375.

- Gorecka, K.M., Konopka-Postupolska, D., Hennig, J., Buchet, R. and Pikula, S. (2005). Peroxidase activity of annexin 1 from *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **336**(3): 868–875.
- Greene, R. (2002). Oxidative stress and acclimation mechanisms in plants. In *The Arabidopsis Book*, USA: American Society of Plant Biologists, pp. 1-19.
- Griffith, O.W. (1980). Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Analytical Biochemistry*, **106**: 207–211.
- Grün, S., Lindermayr, C., Sell, S. and Durner, J. (2006). Nitric oxide and gene regulation in plants. *Journal of Experimental Botany*, **57**: 507–516.
- Gueguen, V., Macherel, D., Jaquinod, M., Douce, R. and Bourguignon, J. (2000). Fatty acid and lipoic acid biosynthesis in higher plant mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, **276**: 5016–5025
- Gunes, A., Inal, A., Alpaslan, M., Cicek, N., Guneri, E., Eraslan, F. and Guzelordu, T. (2005). Effects of exogenously applied salicylic acid on the induction of multiple stress tolerance and mineral nutrition in maize (*Zea mays* L.). *Archives of Agronomy and Soil Science*, **51**: 687–695.
- Gunes, A., Inal, A., Alpaslan, M., Eraslan, F., Bagci, E.G. and Cicek, N. (2007). Salicylic acid induced changes on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress and mineral nutrition in maize (*Zea mays* L.) grown under salinity. *Journal of Plant Physiology*, **164**: 728–736.
- Gutierrez-Coronado, M., Trejo, C.L. and Larque-Saavedra, A. (1998). Effects of salicylic acid on the growth of roots and shoots in soybean. *Plant Physiology and Biochemistry*, **36**: 563–565.
- Hagman, A., Shi, L.X., Rintamaki, E., Andersson, B. and Schroder, W.P. (1997). The nuclear-encoded PsbW protein subunit of photosystem II undergoes light-induced proteolysis. *Biochemistry*, **36**: 12666–12671.
- Hall, A., Nelson, K., Poole, L.B. and Karplus, P.A. (2011). Structure-based insights into the catalytic power and conformational dexterity of peroxiredoxins. *Antioxidants and Redox Signaling*, **15**(3): 795–815.
- Harmens, H., Den Hartog, P.R., ten Bookum, W.M. and Verkleij, J.A.C. (1993). Increased zinc tolerance in *Silene vulgaris* (Moench) Garcke is not due to increased production of phytochelatins. *Plant Physiology*, **103**: 1305–1309.
- Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.-K. and Bohnert, H.J. (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **51**: 463–499.

- Hashemi, A., Abdolzadeh, A. and Sadeghipour, H.R. (2010). Beneficial effects of silicon nutrition in alleviating salinity stress in hydroponically grown canola, *Brassica napus* L., plants. *Soil Science and Plant Nutrition*, **56**: 244–253.
- Hatch, M.D. and Burnell, J.N. (1990). Carbonic anhydrase activity in leaves and its role in the first step of C4 photosynthesis. *Plant Physiology*, **93**: 825–828.
- Hayat, S., Fariduddin, Q., Ali, B. and Ahmad, A. (2005). Effect of salicylic acid on growth and enzyme activities of wheat seedlings. *Acta Agronomica Hungarica*, **53**: 433–437.
- Hayat, Q., Hayat, S., Irfan, M. and Ahmad, A. (2010a). Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: A review. *Environmental and Experimental Botany*, **68**: 14–25.
- Hayat, S., Hasan, S. A., Yusuf, M., Hayat, Q. and Ahmad, A. (2010b). Effect of 28-homobrassinolide on photosynthesis, fluorescence and antioxidant system in the presence or absence of salinity and temperature in *Vigna radiata*. *Environmental and Experimental Botany*, **69**: 105–112.
- He, Y. and Zhu, Z.J. (2008). Exogenous salicylic acid alleviates NaCl toxicity and increases antioxidative enzyme activity in *Lycopersicon esculentum*. *Biologia Plantarum*, **52**: 792–795.
- Heath, R.L., Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **125**: 189–198.
- Henderson, B. and Pockley, A.G. (2005). *Molecular Chaperones and Cell Signalling*, Cambridge University Press, New York, pp. 3–21.
- Hernandez, J.A. and Almansa, M.S. (2002). Short-term effects of salt stress on antioxidant systems and leaf water relations of pea leaves. *Physiologia Plantarum*, **115**: 251–257.
- Hernández, J.A., Ferrer, M.A., Jiménez, A., Barceló, A.R. and Sevilla, F. (2001). Antioxidant systems and O_2^-/H_2O_2 production in the apoplast of pea leaves. Its relation with salt-induced necrotic lesions in minor veins. *Plant Physiology*, **127**: 817–831.
- Hodges, D.M., Andrews, C.J., Johnson, D.A. and Hamilton, R.I. (1996). Antioxidant compound responses to chilling stress in differentially sensitive inbred maize 23 lines. *Physiologia Plantarum*, **98**: 685–692.
- Horling, F., Lamkemeyer, P., König, J., Finkemeier, I., Kandlbinder, A., Baier, M. and Dietz, K.J. (2003). Divergent light-, ascorbate-, and oxidative stress-dependent

- regulation of expression of the peroxiredoxin gene family in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **131**: 317–325.
- Höfgen, R., Kreft, O., Willmitzer, L. and Hese, H. (2001). Manipulation of thiol contents in plants. *Amino Acids*, **20**: 291–299.
- Holuigue, L., Salinas, P., Blanco, F. and Garreton, V. (2007). Salicylic acid and reactive oxygen species in the activation of stress defense genes. In: Hayat, S., Ahmad, A. (Eds.), *Salicylic Acid: A Plant Hormone*. Springer, Dordrecht, The Netherlands. pp. 197–246.
- Hurkman, W.J. and Tanaka, C.K. (1986). Solubilization of plant membrane proteins for analysis of two-dimensional gel electrophoresis. *Plant Physiology*, **81**: 802–806.
- Hussain, S.S., Ali, M., Ahmad, M. and Siddique, K.H.M. (2011). Polyamines: natural and engineered abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Biotechnology Advances*, **29**: 300–311.
- Jiang, Y. and Deyholos, M. (2006). Comprehensive transcriptional profiling of NaCl-stressed *Arabidopsis* roots reveals novel classes of responsive genes. *BMC Plant Biology*, **6**: 25.
- Jiang, Y., Yang, B., Harris, N.S. and Deyholos, M.K. (2007). Comparative proteomic analysis of NaCl stress-responsive proteins in *Arabidopsis* roots. *Journal of Experimental Botany*, **58**: 3591–3607.
- Jordan, D.B. and Chollet, R. (1983). Inhibition of ribulose biphosphate carboxylase by substrate ribulose 1,5-bisphosphate. *Journal of Biological Chemistry*, **258**: 13752–13758.
- Kavi Kishore, P.B., Sangam, S., Amrutha, R.N., Laxmi, P.S., Naidu, K.R., Rao, K.R.S.S., Rao, S., Reddy, K.J., Theriappan, P. and Sreenivasulu, N. (2005). Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Current Science*, **88**: 424–438.
- Kawano, T., Furuichi, T. and Muto, S. (2004). Controlled free salicylic acid levels and corresponding signaling mechanisms in plants. *Plant Biotechnology*, **21**: 319–335.
- Kawasaki, S., Borchert, C., Deyholos, M., Wang, H., Brazille, S., Kawai, K., Galbraith, D. and Bohnert, H.J. (2001). Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. *Plant Cell*, **13**: 889–905.
- Kaydan, D., Yagmur, M. and Okut, N. (2007). Effects of salicylic acid on the growth and some physiological characters in salt stressed wheat (*Triticum aestivum* L.). *Tarim Bilimleri Dergisi*, **13**: 114–119.

- Khodary, S.E.A. (2004). Effect of salicylic acid on growth, photosynthesis and carbohydrate metabolism in salt-stressed maize plants. *International Journal of Agriculture and Biology*, **6**: 5–8.
- Kim, S.T., Cho, K.S., Jang, Y.S. and Kang, K.Y. (2001). Two-dimensional electrophoretic analysis of rice proteins by polyethylene glycol fractionation for protein arrays. *Electrophoresis*, **22**: 2103–2109.
- Kim, D.-W., Rakwal, R., Agarwal, G.-K., Jung, Y.-H., Shibato, J., Jwa, N.-S., Iwahashi, Y., Iwahashi, H., Kim, D.H., Shim, S. and Usui, K. (2005). A hydroponic rice seedling culture model system for investigating proteome of salt stress in rice leaf. *Electrophoresis*, **26**: 4521–4539.
- Kim, Y.O., Pan, S., Jung, C.H. and Kang, H.A. (2007). Zinc finger-containing glycine-rich RNA-binding protein, Atrz-1a, has a negative impact on seed germination and seedling growth of *Arabidopsis thaliana* under salt or drought stress conditions. *Plant Cell Physiology*, **48**: 1170–1181.
- Kosová, K., Vítámvás, P., Prášil, I.T. and Renaut, J. (2011). Plant proteome changes under abiotic stress-contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. *Journal of Proteomics*, **74**: 1301–1322.
- Kováčik, J., Klejdus, B., Hedbavny, J. and Backor, M. (2009). Salicylic acid alleviates NaCl-induced changes in the metabolism of *Matricaria chamomilla* plants. *Ecotoxicology*, **18**: 544–554.
- Kreps, J.A., Wu, Y., Chang, H., Zhu, T., Wang, X. and Harper, J.F. (2002). Transcriptome changes for *Arabidopsis* in response to salt, osmotic, and cold stress. *Plant Physiology*, **130**: 2129–2141.
- Kuiper, P.J.C., Kuiper, D. and Schuit, J. (1988). Root functional under stress condition: an introduction. *Plant and Soil*, **111**: 249–253.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680–685.
- Laohavisit, A., Brown, A.T., Cicuta, P. and Davies, J.M. (2010). Annexins: components of the calcium and reactive oxygen signaling network. *Plant Physiology*, **152**: 1824–1829.
- Lapenna D, Ciofani G, Pierdomenico SD, Giamberardino MA and Cuccurullo F. (2003) Dihydrolipoic acid inhibits 15-lipoxygenase-dependent lipid peroxidation. *Free Radical Biology and Medicine*, **35**: 1203–1209.
- Lee, E.K., Kwon, M., Ko, J.-H., Yi, H., Hwang, M.G., Chang, S. and Cho, M.H. (2004). Binding of sulfonyleurea by AtMRP5, an *Arabidopsis* multidrug resistance-related protein that functions in salt tolerance. *Plant Physiology*, **134**: 528–538.

- Lee, S., Kim, S.-G. and Park, C.-M. (2010). Salicylic acid promotes seed germination under high salinity by modulating antioxidant activity in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, **188**: 626–637.
- Lei, T., Yan, Y.C., Xi, D.H., Feng, H., Sun, X., Zhang, F., Xu, W.L., Liang, H.G. and Lin, H.H. (2008). Effects of salicylic acid on alternative pathway respiration and alternative oxidase expression in tobacco calli. *Zeitschrift für Naturforschung*, **63**: 706–712.
- Lei, T., Feng, H., Sun, X., Dai, Q.L., Zhang, F., Liang, H.G. and Lin, H.H. (2010). The alternative pathway in cucumber seedlings under low temperature stress was enhanced by salicylic acid. *Plant Growth Regulation*, **60**: 35–42.
- Li, X.J., Yang, M.F., Chen, H., Qu, L.Q., Chen, F. and Shen, S.H. 2010. Abscisic acid pretreatment enhances salt tolerance of rice seedlings: proteomic evidence. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1804**: 929–940.
- Li, W., Zhang, C.Y., Lu, Q.T., Wen, X.G. and Lu, C.M. (2011). The combined effect of salt stress and heat shock on proteome profiling in *Suaeda salsa*. *Journal of Plant Physiology*, **168**: 1743-1752.
- Li, G., Peng, X., Wei, L. and Kang, G. (2013a). Salicylic acid increases the contents of glutathione and ascorbate and temporally regulates the related gene expression in salt-stressed wheat seedlings. *Gene*, **529**: 321–325.
- Li, B., He, L., Guo, S., Li, J., Yang, Y. and Yan, B. (2013b). Proteomics reveal cucumber Spd-responses under normal condition and salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, **67**: 7–14.
- Liepman, A.H., Wightman, R., Geshi, N., Turner, S.R. and Scheller, H.V. (2010). *Arabidopsis*-A powerful model system for plant cell wall research. *Plant Journal*, **61**: 1107–1121.
- Lingard, M.J. and Bartel, B. (2009). *Arabidopsis* LON2 is necessary for peroxisomal function and sustained matrix protein import. *Plant Physiology*, **151(3)**: 1354–1365.
- Liu, Y., Du, H., He, X., Huang, B. and Wang, Z. (2012). Identification of differentially expressed salt-responsive proteins in roots of two perennial grass species contrasting in salinity tolerance. *Journal of Plant Physiology*, **169**: 117–126
- Loutfy, N., El-Tayeb, M.A., Hassanen, A.M., Moustafa, M.F., Sakuma, Y. and Inouhe, M. (2012). Changes in the water status and osmotic solute contents in response to drought and salicylic acid treatments in four different cultivars of wheat (*Triticum aestivum*). *Journal of Plant Research*, **125**: 173–184.
- Luan, S. (2002). Signaling drought in guard cells. *Plant Cell and Environment*, **25**: 229–237.

- Ma, H., Song, L., Shu, Y., Wang, S., Niu, J. and Wang, Z. (2012). Comparative proteomic analysis of seedling leaves of different salt tolerant soybean genotypes. *Journal of Proteomics*, **75**: 1529–1546.
- Mahajan, S., Pandey, G.K. and Tuteja, N. 2008. Calcium- and salt-stress signaling in plants: shedding light on SOS pathway. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **471**: 146–158.
- Maiwald, D., Dietzmann, A., Jahns, P., Pesaresi, P., Joliot, P., Joliot, A., Levin, J.Z., Salamini, F. and Leister, D. (2003). Knock-out of the genes coding for the Rieske protein and the ATP-synthase delta-subunit of *Arabidopsis*. Effects on photosynthesis, thylakoid protein composition, and nuclear chloroplast gene expression. *Plant Physiology*, **133(1)**: 191–202.
- Malakshah, S.N., Rezaei, M.H., Heidari, M. and Salekdeh, G.H. (2007). Proteomics reveals new salt responsive proteins associated with rice plasma membrane. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **71**: 2144–2154.
- Manaa, A., Ben Ahmed, H., Valot, B., Bouchet, J.P., Aschi-Smiti, S., Causse, M. and Faurobert, M. (2011). Salt and genotype impact on plant physiology and root proteome variations in tomato. *Journal of Experimental Botany*, **62**: 2797–2813.
- Martinez, C., Pons, E., Prats, G. and Leon, J. (2004). Salicylic acid regulates flowering time and links defence responses and reproductive development. *The Plant Journal*, **37**: 209–217.
- Martin-Mex, R., Villanueva-Couoh, E., Herrera-Campos, T. and Larque-Saavedra, A. (2005). Positive effect of salicylates on the flowering of African violet. *Scientia Horticulturae*, **103**: 499–502.
- Mika, A. and Lüthje, S. (2003). Properties of guaiacol peroxidase activities isolated from corn root plasma membranes. *Plant Physiology*, **132**: 1489–1498.
- Miller, G., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S. and Mittler, R. (2010). Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant Cell and Environment*, **33**: 453–467.
- Misra, N. and Gupta, A.K. (2005). Effect of salt stress on proline metabolism in two high yielding genotypes of green gram. *Plant Science*, **169**: 331–339.
- Misra, S., Wu, Y., Venkataraman, G., Sopory, S.K. and Tuteja, N. (2007). Heterotrimeric G-protein complex and G-protein-coupled receptor from a legume (*Pisum sativum*): Role in salinity and heat stress and cross-talk with phospholipase C. *Plant Journal*, **51**: 656–669.
- Misra, N. and Saxena, P. (2009). Effect of salicylic acid on proline metabolism in lentil grown under salinity stress. *Plant Science*, **177**: 181–189.

- Moller, I.M. (2001). Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **52**: 561–591.
- Moons, A. (2003). *Ospdr9*, which encodes a PDR-type ABC transporter, is induced by heavy metals, hypoxic stress and redox perturbations in rice roots. *FEBS Letters*, **553**: 370–376.
- Moroney, J.V., Bartlett, S.G. and Samuelsson, G. (2001). Carbonic anhydrases in plants and algae. *Plant Cell and Environment*, **24**: 141–153.
- Morris, K., MacKerness, S. A., Page, T., John, C. F., Murphy, A. M., Carr, J. P. and Buchanan-Wollaston, V. (2000). Salicylic acid has a role in regulating gene expression during leaf senescence. *The Plant Journal*, **23**: 677–685.
- Mortimer, J.C., Laohavisit, A., Macpherson, N., Webb, A., Brownlee, C., Battey, N.H. and Davies, J.M. (2008). Annexins: multifunctional components of growth and adaptation. *Journal of Experimental Botany*, **59**: 533–544.
- Munekage, Y., Takeda, S., Endo, T., Jahns, P., Hashimoto, T. and Shikanai, T. (2001). Cytochrome b6f mutation specifically affects thermal dissipation of absorbed light energy in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, **28**: 351–359.
- Munns, R. and Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, **59**: 651–681.
- Naeem, M.S., Jin, Z.L., Wan, G.L., Liu, D., Liu, H.B., Yoneyama, K. and Zhou, W.J. (2010). 5-Aminolevulinic acid improves photosynthetic gas exchange capacity and ion uptake under salinity stress in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Plant and Soil*, **332**: 405–415.
- Nagalakshmi, N. and Prasad, M.N.V. (2001). Responses of glutathione cycle enzymes and glutathione metabolism to copper stress in *Scenedesmus bijugatus*. *Plant Science*, **160**: 291–299.
- Nakano, Y. and Asada, K. (1987). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Physiologia Plantarum*, **115**: 393–400.
- Nam, M., Huh, S., Kim, K. and Park, W. (2012). Comparative proteomic analysis of early salt stress-responsive proteins in roots of Snrk2 transgenic rice. *Proteome Science*, **10**: 25.
- Nandi, D., Patra, R.C. and Swarup, D. (2005). Effect of cysteine, methionine, ascorbic acid and thiamine on arsenic-induced oxidative stress and biochemical alterations in rats. *Toxicology*, **211**: 26–35.

- Navari-Izzo, F., Quartacci, M. F., and Sgherri, C. (2002). Lipoic acid: a unique antioxidant in the detoxification of activated oxygen species. *Plant Physiology and Biochemistry*, **40**: 463–470.
- Nazar, R., Iqbal, N., Syeed, S. and Khan, N. (2011). Salicylic acid alleviates decreases in photosynthesis under salt stress by enhancing nitrogen and sulfur assimilation and antioxidant metabolism differentially in two mungbean. *Journal of Plant Physiology*, **168**: 807–815.
- Ndimba, B.K., Chivasa, S., Simon, W.J. and Slabas, A.R. (2005). Identification of *Arabidopsis* salt and osmotic stress responsive proteins using two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics*, **5**: 4185–4196.
- Neuhoff, V., Arnold, N., Taube, D. and Ehrhardt, W. (1988). Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis*, **9**: 255–262.
- Neves, G.Y.S., Marchiosi, R., Ferrarese, M.L.L., Siqueira-Soares, R.C. and Ferrarese-Filho, O. (2010). Root growth inhibition and lignification induced by salt stress in soybean. *Journal of Agronomy and Crop Science*, **196**: 467–473.
- Noctor, G. and Foyer, C. (1998). Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **49**: 249–279.
- Noreen, S. and Ashraf, M. (2008). Alleviation of adverse effects of salt-stress on sunflower (*Helianthus annuus* L.) by exogenous application of salicylic acid: growth and photosynthesis. *Pakistan Journal of Botany*, **40**: 1657–1663.
- Pakusch, A.E., Kneusel, R.E. and Matern, U. (1989). S-adenosyl-L-methionine:transcaffeoyl-coenzyme A 3-O-methyltransferase from elicitor-treated parsley cell suspension cultures. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **271**: 488–494.
- Palmgren, M.G. (1998). Proton gradients and plant growth: role of the plasma membrane H⁺-ATPase. *Advanced in Botanical Research*, **28**: 1–70.
- Pang, Q.Y., Chen, S.X., Dai, S.J., Chen, Y.Z., Wang, Y. and Yan, X. (2010). Comparative proteomics of salt tolerance in *Arabidopsis thaliana* and *Thellungiella halophila*. *Journal of Proteome Research*, **9**: 2584–2599.
- Papini-Terzi, F.S., Galhardo, R.S., Farias, L.P., Menck, C.F. and Van Sluys, M.A. (2003). Point mutation is responsible for *Arabidopsis* tz-201 mutant phenotype affecting thiamin biosynthesis. *Plant Cell Physiology*, **44**: 856–860.

- Parida, A.K. and Das, A.B. (2005). Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **60**: 324–349.
- Park, J.-E., Park, J.-Y., Kim, Y.-S., Staswick, P.E., Jeon, J., Yun, J., Kim, S.Y., Kim, J., Lee, Y.H. and Park, C.M. (2007). GH3-mediated auxin homeostasis links growth regulation with stress adaptation response in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, **282**: 10036–10046.
- Peng, Z.Y., Wang, M.C., Li, F., Lu, H.J., Li, C.L. and Xia, G.M.A. (2009). Proteomic study of the response to salinity and drought stress in an introgression strain of bread wheat. *Molecular Cell Proteomics*, **8**: 2676–2686.
- Pérez-López, U., Robredo, A., Lacuesta, M., Sgherri, C., Mena-Petite, A., Navari-Izzo, F., and Muñoz-Rueda, A. (2010). Lipoic acid and redox status in barley plants subjected to salinity and elevated CO₂. *Physiologia Plantarum*, **139**: 256–68.
- Perfus-Barbeoch, L., Jones, A.M. and Assmann, S.M. (2004). Plant heterotrimeric G protein function: insights from *Arabidopsis* and rice mutants. *Current Opinion in Plant Biology*, **7**: 719–731.
- Podda, A., Simili, M., Del Carratore, R., Mouhaya, W., Morillon, R. and Maserti, B.E. (2014). Expression profiling of two stress-inducible genes encoding for miraculin-like proteins in citrus plants under insect infestation or salinity stress. *Journal of Plant Physiology*, **171**: 45–54.
- Poór, P., Gémes, K., Horváth, F., Szepesi, A., Simon, M.L. and Tari, I. (2011). Salicylic acid treatment via the rooting medium interferes with stomatal response, CO₂ fixation rate and carbohydrate metabolism in tomato, and decreases harmful effects of subsequent salt stress. *Plant Biology*, **1**: 105–114.
- Puranik, S., Jha, S., Srivastava, P.S., Sreenivasulu, N. and Prasad, M. (2011). Comparative transcriptome analysis of contrasting foxtail millet cultivars in response to short-term salinity stress. *Journal of Plant Physiology*, **168**: 280–287.
- Qasim, M., Ashraf, M., Ashraf, M.Y., Rehman, S.U. and Ma, E.S. (2003). Salt-induced changes in two canola cultivars differing in salt tolerance. *Biologia Plantarum*, **46**: 629–632.
- Qiu, N. and Lu, C. (2003). Enhanced tolerance for photosynthesis against high temperature damage in salt adapted halophyte *Atriplex centralasiatica*. *Plant Cell and Environment*, **26**: 1137–1145.
- Qureshi, M.I., Qadir, S. and Zolla, L. (2007). Proteomics-based dissection of stress-responsive pathways in plants. *Journal of Plant Physiology*, **164**: 1239–1260.
- Rai, V.K. (2002). Role of amino acids in plant responses to stress. *Biologia Plantarum*, **45**: 481–487.

- Rajjou, L., Belghazi, M., Huguet, R., Robin, C., Moreau, A., Job, C. and Job, D. (2006). Proteomic investigation of the effect of salicylic acid on *Arabidopsis* seed germination and establishment of early defense mechanisms. *Plant Physiology*, **141**: 910–923.
- Rao, M.V. and Davis, K.R. (1999). Ozone-induced cell death occurs via two distinct mechanisms in *Arabidopsis*: the role of salicylic acid. *The Plant Journal*, **17**: 603–614.
- Raymond, J. and Blankenship, R.E. (2004). The evolutionary development of the protein complement of photosystem 2. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1655(1-3)**: 133-139.
- Rhoads, D.M. and McIntosh, L. (1992). Salicylic acid regulation of respiration in higher plants: alternative oxidase expression. *Plant Cell*, **4**: 1131–1139.
- Rissler, H.M., Collakova, E., DellaPenna, D., Whelan, J. and Pogson, B.J. (2002). Chlorophyll biosynthesis. Expression of a second CHLI gene of magnesium chelatase in *Arabidopsis* supports only limited chlorophyll synthesis. *Plant Physiology*, **128**: 770–779.
- Ross, J.R., Nam, K.H., John, C., Auria, D. and Pichersky, E. (1999). S-adenosyl-L-methionine: salicylic acid carboxyl methyltransferase, an enzyme involved in floral scent production and plant defense, represents a new class of plant methyltransferases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **367**: 9–16.
- Roychoudhury, A., Basu, S. and Sengupta, D.N. (2011). Amelioration of salinity stress by exogenously applied spermidine or spermine in three varieties of Indica rice differing in their level of salt tolerance. *Journal of Plant Physiology*, **168**: 317–328.
- Ruan, S.L., Ma, H.S., Wang, S.H., Fu, Y.P., Xin, Y., Liu, W.Z., Wang, F., Tong, J.X., Wang, S.Z. and Chen, H.Z. (2011). Proteomic identification of *Oscyp2*, a rice cyclophilin that confers salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings when overexpressed. *BMC Plant Biology*, **11**: 34.
- Ruban, A.V., Wentworth, M., Yakushevskaya, A.E., Andersson, J., Lee, P.J., Keegstra, W., Dekker, J.P., Boekema, E.J., Jansson, S. and Horton, P. (2003). Plants lacking the main light-harvesting complex retain photosystem II macro-organization. *Nature*, **421**: 648–652.
- Sairam, R.K., Srivastava, G.C. and Saxena, D.C. (2000). Increased antioxidant activity under elevated temperature: a mechanism of heat stress tolerance in wheat genotypes. *Biologia Plantarum*, **43**: 245–251.

- Sánchez-Aguayo, I., Rodríguez-Galán, J.M., García, R., Torreblanca, J. and Pardo, J.M. (2004). Salt stress enhances xylem development and expression of S-adenosyl-l-methionine synthase in lignifying tissues of tomato plants. *Planta*, **220**: 278–285.
- Sanders, D., Pelloux, J., Brownlee, C. and Harper, J.F. (2002). Calcium at the crossroads of signaling. *Plant Cell*, **1**: 401–417.
- Schaeffer, G.W., Sharpe, F.T. and Sicher, R.C. (1997). Fructose 1,6-bisphosphate aldolase activity in leaves of a rice mutant selected for enhanced lysine. *Phytochemistry*, **46**: 1335–1338.
- Sgherri, C., Navari-Izzo, F., Pardossi, A., Soressi, G.P. and Izzo, R. (2007). The influence of diluted seawater and ripening stage on the content of antioxidants in fruits of different tomato genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**: 2452–2458.
- Sgherri, C., Kadlecova, Z., Pardossi, A., Navari-Izzo, F. and Izzo, R. (2008). Irrigation with diluted seawater improves the nutritional value of cherry tomatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**: 3391–3397.
- Shakirova, F.M., Sakhabutdinova, A.R., Bezrukova, M.V., Fatkhutdinova, R.A. and Fatkhutdinova, D.R. (2003). Changes in the hormonal status of wheat seedlings induced by salicylic acid and salinity. *Plant Science*, **164**: 317–322.
- Shalata, A., Mittova, V., Volokita, M., Guy, M. and Tal, M. (2001). Response of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to salt-dependent oxidative stress: the root antioxidative system. *Physiologia Plantarum*, **112**: 487–494.
- Shavrukov, Y., Gupta, N., Miyazaki, J., Baho, M., Chalmer, K., Tester, M., Langridge, P. and Collins, N. (2010). HvNAX3-A locus controlling shoot sodium exclusion derived from wild barley (*Hordeum vulgare* Ssp. *spontaneum*). *Functional and Integrative Genomics*, **10**: 277–291.
- Shi, H.Z., Ishitani, M., Kim, C.S. and Zhu, J.K. (2000a). The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter. *Proceedings of The National Academy of Sciences, USA*, **97**: 6896–6901.
- Shi, L.-X., Lorković, Z.J., Oelmüller, R. and Schröder, W.P. (2000b). The low molecular mass PsbW protein is involved in the stabilization of the dimeric photosystem II complex in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, **275**: 37945–37950.
- Shi, Q., Bao, Z., Zhu, Z., Ying, Q. and Qian, Q. (2006). Effects of different treatments of salicylic acid on heat tolerance, chlorophyll fluorescence and antioxidant enzyme activity in seedlings of *Cucumis sativa* L. *Plant Growth Regulation*, **48**: 127–135.

- Shimakawa, A., Shiraya, T., Ishizuka, Y., Wada, K.C., Mitsui, T. and Takeno, K. (2012). Salicylic acid is involved in the regulation of starvation stress-induced flowering in *Lemna paucicostata*. *Journal of Plant Physiology*, **169**: 987–991.
- Shirasu, K., Nakajima, A., Rajshekar, K., Dixon, R.A. and Lamb, C. (1997). Salicylic acid potentiates an agonist-dependent gain control that amplifies pathogen signal in the activation of defence mechanism. *Plant Cell*, **9**: 261–270.
- Silva, P., Thompson, E., Bailey, S., Kruse, O., Mullineaux, C.W., Robinson, C., Mann, N.H. and Nixon, P.J. (2003). FtsH is involved in the early stages of repair of photosystem II in *Synechocystis* Sp PCC 6803. *The Plant Cell*, **15**: 2152–2164.
- Singh, P. and Gautam, S. (2013). Role of salicylic acid on physiological and biochemical mechanism of salinity stress tolerance in plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, **35**: 2345–2353.
- Sinha, P., Poland, J., Schnölzer, M. and Rabilloud, T. (2001). A new silver staining apparatus and procedure for matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis of proteins after two-dimensional electrophoresis. *Proteomics*, **1**: 835–840.
- Smith, K.S. and Ferry, J.G. (2000). Prokaryotic carbonic anhydrases. *FEMS Microbiology Reviews*, **24**: 335–366.
- Snyman, M. and Cronjé, M.J. (2008). Modulation of heat shock factors accompanies salicylic acid-mediated potentiation of Hsp70 in tomato seedlings. *Journal of Experimental Botany*, **59**: 2125–2132.
- Sobhanian, H., Razavizadeh, R., Nanjo, Y., Ehsanpour, A.A., Jazii, F.R., Motamed, N. and Komatsu, S. (2010). Proteome analysis of soybean leaves, hypocotyls and roots under salt stress. *Proteome Science*, **8**: 10.
- Song, J.T. (2006). Induction of a salicylic acid glucosyltransferase, *AtSGT1*, is an early disease response in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Cells*, **22**: 233–238.
- Sripinyowanich, S., Klomsakul, P., Boonburapong, B., Bangyeekhun, T., Asami, T., Gu, H., Buaboocha, T. and Chadchawan, S. (2013). Exogenous ABA induces salt tolerance in Indica rice (*Oryza sativa* L.): The role of *OsP5CS1* and *OsP5CR* gene expression during salt stress. *Environmental and Experimental Botany*, **86**: 94–105.
- Stevens, J., Senaratna, T. and Sivasithamparam, K. (2006). Salicylic acid induces salinity tolerance in tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Roma): associated changes in gas exchange, water relations and membrane stabilization. *Plant Growth Regulation*, **49**: 77–83.

- Strawn, M.A., Marr, S.K., Inoue, K., Inada, N. and Zubieta, C. (2007). *Arabidopsis* isochorismate synthase functional in pathogen-induced salicylate biosynthesis exhibits properties consistent with a role in diverse stress responses. *Journal of Biological Chemistry*, **282**: 5919–5933.
- Sudhir, P. and Murthy, S.D.S. (2004). Effects of salt stress on basic processes of photosynthesis. *Photosynthetica*, **42**: 481-486.
- Sugimoto, M. and Takeda, K. (2009). Proteomic analysis of specific proteins in the root of salt-tolerant barley. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **73**: 2762–2765.
- Suzuki, N., Koussevitzky, S., Mittler, R. and Miller, G. (2012). ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. *Plant Cell and Environment*, **35**: 259–270.
- Swain, S., Roy, S., Shah, J., Wees, S.V., Pieterse, C.M. and Nandi, A.K. (2011). *Arabidopsis thaliana cdd1* mutant uncouples the constitutive activation of salicylic acid signaling from growth defects. *Molecular Plant Pathology*, **9**: 855–865.
- Swami, A.K., Alam, S., Sengupta, N. and Sarin, R. (2011). Differential proteomic analysis of salt stress response in *Sorghum bicolor* leaves. *Environmental and Experimental Botany*, **71**: 321–328.
- Syed, S., Anjum, N. and Nazar, R. (2011). Salicylic acid-mediated changes in photosynthesis, nutrients content and antioxidant metabolism in two mustard (*Brassica juncea* L.) cultivars differing in salt tolerance. *Acta Physiologiae Plantarum*, **33**: 877–886.
- Szepesi, A. (2006). Salicylic acid improves the acclimation of *Lycopersicon esculentum* Mill. L. to high salinity by approximating its salt stress response to that of the wild species *L. pennellii*. *Acta Biologica Szegediensis*, **50**: 177.
- Tanou, G., Job, C., Rajjou, L., Arc, E., Belghazi, M., Diamantidis, G., Molassiotis, A. and Job, D. (2009). Proteomics reveals the overlapping roles of hydrogen peroxide and nitric oxide in the acclimation of citrus plants to salinity. *Plant Journal*, **60**: 795–804.
- Tashian, R.E. (1989). The carbonic anhydrases: widening perspectives on their evolution, expression and function. *BioEssays*, **10**: 186–192.
- Taylor, N.L., Day, D.A. and Millar, A.H. (2002). Environmental stress causes oxidative damage to plant mitochondria leading to inhibition of glycine decarboxylase. *Journal of Biological Chemistry*, **277**: 42663–42668.

- Taylor, N.L., Heazlewood, J.L., Day, D.A. and Millar, A.H. (2005). Differential impact of environmental stresses on the pea mitochondrial proteome. *Molecular and Cellular Proteomics*, **4**: 1122–1133.
- Tuteja, N. (2007). How pea phospholipase C functions in salinity stress tolerance. *ISB News Report*, **2007**: 4–7.
- Vanderauwera, S., Zimmermann, P., Rombauts, S., Vandenabeele, S., Langebartels, C., Gruissem, W., Inze, D. and Breusegem, F. (2005). Genome-wide analysis of hydrogen peroxide-regulated gene expression in *Arabidopsis* reveals a high light-induced transcriptional cluster involved in anthocyanin biosynthesis. *Plant Physiology*, **139**: 806–821.
- Vauclare, P., Diallo, N., Bourguignon, J., Macherel, D. and Douce, R. (1996). Regulation of the expression of the glycine decarboxylase complex during pea leaf development. *Plant Physiology*, **112(4)**: 1523-1530.
- Veeranagamallaiah, G., Jyothsnakumari, G., Hippineswamy, M., Reddy, P.C.O., Surabhi, G.-K., Sriranganaykulu, G., Manesh, Y., Rajasekhar, B., Madhurarekha, C.H. and Sudhakar, C. (2008). Proteomic analysis of salt stress responses in foxtail millet (*Setaria italica* L. Cv. Prasad) seedlings. *Plant Science*, **175**: 631–641.
- Vicente, M.R.-S. and Plasencia, J. (2011). Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. *Journal of Experimental Botany*, **62**: 3321–3338.
- Villiers, F., Ducruix, C., Hugouvieux, V., Jarno, N., Ezan, E., Garin, J., Junot, C. and Bourguignon, J. (2011). Investigating the plant response to cadmium exposure by proteomic and metabolomic approaches. *Proteomics*, **11**: 1650–1563.
- Vinocur, B. and Altman, A. (2005). Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Current Opinion in Biotechnology*, **16**: 123–132.
- Vlot, A. (2009). Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology*, **47**: 177–206.
- Wada, K.C. and Takeno, K. (2010). Stress-induced flowering. *Plant Signaling and Behavior*, **5**: 1–4.
- Wada, K.C., Yamada, M., Shiraya, T. and Takeno, K. (2010). Salicylic acid and the flowering gene *FLOWERING LOCUS T* homolog are involved in poor-nutrition stress-induced flowering of *Pharbitis nil*. *Journal of Plant Physiology*, **167**: 447–452.
- Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O. and Altman, A. (2004). Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science*, **9**: 244–252.

- Wang, X., Li, X., Meisenhelder, J., Hunter, T., Yoshida, S., Asami, T. and Chory, J. (2005). Autoregulation and homodimerization are involved in the activation of the plant steroid receptor BRI1. *Developmental Cell*, **8**: 855–865.
- Wang, M.C., Peng, Z.Y., Li, C.L., Li, F., Liu, C. and Xia, G.M. (2008). Proteomic analysis on a high salt tolerance introgression strain of *Triticum aestivum/Thinopyrum tonticum*. *Proteomics*, **8**: 1470–1489.
- Wang, X.C, Fan, P.X., Song, H.M., Chen, X.Y., Li, X.F. and Li, Y.X. (2009). Comparative proteomic analysis of differentially expressed proteins in shoots of *Salicornia europaea* under different salinity. *Journal of Proteome Research*, **8**: 3331–3345.
- Wellburn, A.R. (1994). The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, **144**: 307–313.
- Wildermuth, M.C., Dewdney, J., Wu, G. and Ausubel, F.M. (2001). Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature*, **414**: 562–571.
- Wildermuth, M.C. (2006). Variations on a theme: synthesis and modification of plant benzoic acids. *Current Opinion in Plant Biology*, **9**: 288–296.
- Witzel, K., Weidner, A., Surabhi, G.-K., Börner, A. and Mock, H.-P. (2009). Salt stress-induced alterations in the root proteome of barley genotypes with contrasting response towards salinity. *Journal of Experimental Botany*, **60**: 3545–3557.
- Wrzaczek, M. and Hirt, H. (2001). Plant MAP kinase pathways: how many and what for? *Biology of The Cell*, **93**: 81–87.
- Wu, K., Rooney, M.F. and Ferl, R.J. (1997). The *Arabidopsis* 14-3-3 multigene family. *Plant Physiology*, **114**: 1421–1431.
- Wykoff, D.D., Davies, J.P., Melis, A. and Grossman, A.R. (1998). The regulation of photosynthetic electron transport during nutrient deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, **117**: 129–139.
- Xie, Z., Zhang, Z.-L., Hanzlik, S., Cook, E. and Sjen, Q.J. (2007). Salicylic acid inhibits gibberellin-induced alpha-amylase expression and seed germination via a pathway involving an abscisic-acid-inducible *WRKY* gene. *Plant Molecular Biology*, **64**: 293–303.
- Xu, C., Sibicky, T. and Huang, B. (2010). Protein profile analysis of salt-responsive proteins in leaves and roots in two cultivars of creeping bentgrass differing in salinity tolerance. *Plant Cell Reports*, **29**: 595–615.

- Xu, P., Liu, Z., Fan, X., Gao, J., Zhang, X., Zhang, X. and Shen, X. (2013). De novo transcriptome sequencing and comparative analysis of differentially expressed genes in *Gossypium aridum* under salt stress. *Gene*, **525**: 26–34.
- Yalpani, N., Silverman, P., Wilson, T.M.A., Kleier, D.A. and Raskin, I. (1991). Salicylic acid is a systemic signal and an inducer of pathogenesis-related proteins in virus-infected *tobacco*. *Plant Cell*, **3**: 809–818.
- Yamamoto, Y. (2001). Quality control of photosystem II. *Plant and Cell Physiology*, **42**: 121–128.
- Yan, S., Tang, Z., Su, W. and Sun, W. (2005). Proteomic analysis of salt stress-responsive proteins in rice root. *Proteomics*, **5**: 235–244.
- Yang, L., Ma, C., Wang, L., Chen, S. and Li, H. (2012). Salt stress induced proteome and transcriptome changes in sugar beet monosomic addition line M14. *Journal of Plant Physiology*, **169**: 839–850.
- Yazaki, K. (2006). ABC transporters involved in the transport of plant secondary metabolites. *FEBS Letters*, **580**: 1183–1191.
- Yeo, A.R., Flowers, S.A., Rao, G., Welfare, K., Senanayake, N. and Flower, T.J. (1999). Silicon reduces sodium uptake in rice (*Oryza sativa* L.) in saline conditions and this is accounted for by a reduction in the transpirational bypass flow. *Plant Cell and Environment*, **22**: 559–565.
- Yıldız, M. and Terzi, H. (2013). Effect of NaCl stress on chlorophyll biosynthesis, proline, lipid peroxidation and antioxidative enzymes in leaves of salt-tolerant and salt-sensitive barley cultivars. *Journal of Agricultural Sciences*, **19**: 79–88.
- Yoon, J.Y., Hamayun, M., Lee, S.-K. and Lee, I.-J. (2009). Methyl jasmonate alleviated salinity stress in soybean. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, **12**: 63–68.
- Yoshimura, K., Miyao, K., Gaber, A., Takeda, T., Kanaboshi, H., Miyasaka, H. and Shigeoka, S. (2004). Enhancement of stress tolerance in transgenic tobacco plants overexpressing *Chlamydomonas* glutathione peroxidase in chloroplasts or cytosol. *Plant Journal*, **37**: 21–33.
- Yu, J.J., Chen, S.X., Zhao, Q., Wang, T., Yang, C.P., Diaz, C., Sun, G.R. and Dai, S.J. (2011). Physiological and proteomic analysis of salinity tolerance in *Puccinellia tenuiflora*. *Journal of Proteome Research*, **10**: 3852–3870.
- Yusuf, M., Hasan, S.A., Ali, B., Hayat, S., Fariduddin, Q. and Ahmad, A. (2008). Effect of salicylic acid on salinity induced changes in *Brassica juncea*. *Journal of Integrative Plant Biology*, **50**: 1096–1102.

- Zhang, L., Tian, L.H., Zhao, J.F., Song, Y., Zhang, C.J. and Guo, Y. (2009). Identification of an apoplastic protein involved in the initial phase of salt stress response in rice root by two-dimensional electrophoresis. *Plant Physiology*, **149**: 916–928.
- Zhang, F., Zhang, H., Xia, Y., Wang, G., Xu, L. and Shen, Z. (2011). Exogenous application of salicylic acid alleviates cadmium toxicity and reduces hydrogen peroxide accumulation in root apoplasts of *Phaseolus aureus* and *Vicia sativa*. *Plant Cell Reports*, **30**: 1475–1483.
- Zhang, H., Han, B., Wang, T. and Chen, S. (2012). Mechanisms of plant salt response: insights from proteomics. *Journal of Proteome Research*, **11**: 49–67.
- Zhao, Q., Zhang, H., Wang, T., Chen, S. and Dai, S. (2013). Proteomics-based investigation of salt-responsive mechanisms in plant roots. *Journal of Proteomics*, **82**: 230–253.
- Zhong, R., Morrison, III W.H., Negrel, J. and Ye, Z.H. (1998). Dual methylation pathways in lignin biosynthesis. *Plant Cell*, **10**: 2033–2046.
- Zhou, S.P., Sauvé, R.J., Liu, Z., Reddy, S., Bhatti, S., Hucko, S.D., Fish, T. and Thannhauser, T.W. (2011). Identification of salt-induced changes in leaf and root proteomes of the wild tomato, *Solanum chilense*. *Journal of American Society of Horticultural Science*, **136**: 288–302.
- Zhu, J.K. (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Reviews of Plant Biology*, **53**: 247–273.
- Zouni, A. (2001). Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8Å resolution. *Nature*, **409**: 739–743.
- Zörb, C., Schmitt, S., Neeb, A., Karl, S., Linde, M and, Schubert, S. (2004). The biochemical reaction of maize (*Zea mays* L.) to salt stress is characterized by a mitigation of symptoms and not by a specific adaptation. *Plant Science*, **167**: 91–100.
- Zörb, C., Schmitt, S. and Muhling, K.H. (2010). Proteomic changes in maize roots after short-term adjustment to saline growth conditions. *Proteomics*, **10**: 4441–4449.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Nermin AKÇALI
Doğum Yeri ve Tarihi : 26.04.1989, Akhisar
Yabancı Dili : İngilizce
İletişim (Telefon/e-posta) : nermin_akcali@hotmail.com

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Özel Yüksel Lisesi, 2006
Lisans : Afyon Kocatepe Üniversitesi, 2011
Yüksek Lisans : Afyon Kocatepe Üniversitesi, 2014

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl : ---

Yayınları (SCI ve diğer) : ---