

TC.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KURAKLIK VE TUZ STRESİ UYGULANAN BUĞDAY
(*Triticum aestivum* L.) ÇEŞİTLERİNDE ANTİOKSİDANT
ENZİM AKTİVİTESİNDEKİ DEĞİŞİMLERİN
BELİRLENMESİ**

**Tezi Hazırlayan
Ahmet Gencer YEDİYILDIZ**

**Tezi Yöneten
Yrd. Doç. Dr. Servet ÖZCAN**

**Biyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Temmuz 2008
KAYSERİ**

TC.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KURAKLIK VE TUZ STRESİ UYGULANAN BUĞDAY
(*Triticum aestivum* L.) ÇEŞİTLERİNDE ANTIOKSİDANT
ENZİM AKTİVİTESİNDEKİ DEĞİŞİMLERİN
BELİRLENMESİ**

**Tezi Hazırlayan
Ahmet Gencer YEDİYILDIZ**

**Tezi Yöneten
Yrd. Doç. Dr. Servet ÖZCAN**

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından EÜBAP-
FBT-06-73 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

**Temmuz 2008
KAYSERİ**

Yrd. Doç. Dr. Servet ÖZCAN danışmanlığında Ahmet Gencer YEDİYILDIZ tarafından hazırlanan “Kuraklık ve Tuz Stresi Uygulanan Buğday (*Triticum Aestivum* L.) Çeşitlerinde Antioksidan Enzim Aktivitesindeki Değişimlerin Belirlenmesi” adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

24.07.2008

JÜRİ:

Başkan : Yrd. Doç. Dr. Ertuğrul YÜZBAŞIOĞLU

Üye : Yrd. Doç. Dr. Servet ÖZCAN

Üye : Yrd. Doç. Dr. Mikail AKBULUT

1 Temmuz
Servet Özcan
M. Akbulut

ONAY:

Bu tezin kabulü, Enstitü Yönetim Kurulunun ~~22/07/2008~~ tarih ve ~~2008.121-11~~..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Prof. Dr. Necmettin MARAŞLI
Enstitü Müdürü V.

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca bana göstermiş olduğu anlayış, yardım ve yönlendirmelerden dolayı değerli hocam sayın Yrd. Doç. Dr. Servet ÖZCAN' a teşekkürü bir borç bilirim.

İhtiyaç duyduğum her an değerli yardımlarını benden esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Mikail AKBULUT, Doç. Dr. Coşkun TEZ, Yrd. Doç. Dr. Ertuğrul YÜZBAŞIOĞLU' na ve tüm Biyoloji Bölümü hocalarına teşekkürlerimi bildiririm.

Bir özel teşekkür de laboratuvar ortamını paylaştığım çalışma arkadaşlarım Güler TOPRAK, Kadiriye URUÇ, Mustafa ÇEVRİM, Nuri ERCAN, Canan TORUN, Şeyda ERDOĞAN, Dilek KAAAN, Uzm. Rıdvan TEMİZGÜL ve Arş. Gör. Fahriye SÜMER için.

Ve hayatım boyunca maddi ve manevi katkılarını esirgemeyen değerli annem, babam ve kardeşlerime, özellikle çalışmalarımda yanımda olan, sabrını hiçbir zaman esirgemeyen sevgili eşim Meral YEDİYILDIZ' a ve biricik oğlum Arda YEDİYILDIZ' a sonsuz teşekkür ederim.

**KURAKLIK VE TUZ STRESİ UYGULANAN BUĞDAY
(*Triticum aestivum* L.) ÇEŞİTLERİNDE ANTİOKSİDAN ENZİM
AKTİVİTESİNDEKİ DEĞİŞİMLERİN BELİRLENMESİ**

Ahmet Gencer YEDİYILDIZ

Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü

Yüksek Lisans Tezi, Temmuz 2008

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Servet ÖZCAN

ÖZET

Bu çalışmada stres dirençli *Triticum aestivum* L. (Bayraktar) ve stres duyarlı *Triticum aestivum* L. (Atay) çeşitlerinde tuz ve kuraklık streslerinin antioksidan enzimlerin aktiviteleri üzerinde etkileri incelenmiştir. Üç gün boyunca çimlendirilen tohumlar çimlenmeyi takiben 3 gün süreyle 1mM glycine betaine (GB) ve 1mM trehalose (Tre) uygulaması yapılmış ve ardından 5 gün boyunca tuz (200 mM NaCl) ve kuraklık (%18 PEG) stresleri uygulanmıştır. Lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak malondialdehit (MDA) miktarı, osmotolerant prolin miktarı ve antioksidan enzimlerden süperoksid dismutaz (SOD), katalaz (CAT), askorbat peroksidaz (APX), glutatyon redüktaz (GR) ve glutatyon-s-transferaz (GST) aktiviteleri ölçülmüştür. Her iki çeşitte de tuz stresi altında APX aktivitesi iki kat artmıştır. Fakat kontrole göre CAT aktivitesi üçte bir oranında azalmıştır. Her iki çeşitte stres koşullarında SOD aktivitesinde önemli bir değişim olmamıştır. Tuz stresinde GR aktivitesi yaklaşık olarak iki kat artmıştır ancak kuraklık stresinde değişmemiştir. Her iki çeşitte de kuraklık ve tuz streslerinde prolin seviyesinin önemli derecede arttığı belirlenmiştir. GB uygulaması her iki stres koşullarında prolin seviyesini düşürmüştür.

Anahtar Kelimeler: Kuraklık, Tuz, Katalaz (CAT), Süperoksit Dismütaz (SOD), Askorbat Peroksidaz (APX), Glutatyon Redüktaz (GR), Glutatyon S-Transferaz (GST), MDA, Prolin, GB, Tre. *Triticum aestivum* L.

**APPLICATION OF DROUGHT AND SALT STRESSES ON TWO WHEAT
CULTIVARS (*Triticum aestivum* L. cv. Bayraktar and Atay 85) FOR
MONITORING THE ACTIVITY OF ANTIOXIDATIVE ENZYMES**

Ahmet Gencer YEDIYILDIZ

Erciyes University, Graduate School of Natural and Applied Sciences

M.Sc. Thesis, July 2008

Thesis Supervisor: Assist. Prof. Dr. Servet ÖZCAN

ABSTRACT

In this study, we investigated the effects of drought and salt stresses on the activities of antioxidant enzymes in two cultivars of wheat [stress tolerant ***Triticum aestivum* L.** (cv. Bayraktar) and stress sensitive ***Triticum aestivum* L.** (cv. Atay)]. The seedlings were grown for 3 days in a controlled environment. After, exogenous application of 1 mM glycinebetain (GB) and 1 mM trehalose (Tre) for 3 consecutive days, the compatible solutes was removed. Seedlings were then exposed to drought (%18 PEG) and salt (200 mM NaCl) stresses for 5 days. Levels of malondialdehyde (MDA), proline and the activity of antioxidant enzymes; superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX), glutathione reductase (GR) and glutathione-s-transferase (GST) were measured. Ascorbate peroxidase activity was increased two fold under salt stress for both cultivars. On the other hand, Catalase activity was decreased about one third of the control groups. Significant changes were not observed for SOD activity in both stress conditions. Approximately two fold increases was observed for GR activity under salt stress, but the GR activity was not changed under drought conditions. A significant increase was determined in proline level under salt and drought conditions for both cultivars. Additionally, exogenous betaine application elevated the proline level significantly in both stress conditions.

Keywords: Drought, salt, Ascorbate peroxidase (APX), Catalase (CAT), Superoxide dismutase (SOD), Glutathione reductase (GR), Glutathione-s-transferase (GST), MDA, GB, Proline, Trehalose. ***Triticum aestivum* L.**

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|-----|
| KABUL VE ONAY | i |
| TEŞEKKÜR..... | ii |
| ÖZET..... | iii |
| ABSTRACT..... | iv |
| KISALTMALAR | ix |
| ŞEKİLLER LİSTESİ..... | x |
| 1. BÖLÜM | |
| GİRİŞ | 1 |
| 1.1. Buğday (<i>Triticumaestivum</i> L.)..... | 1 |
| 1.2. Stres | 2 |
| 1.2.1. Stres Faktörleri (Stresörler) | 3 |
| 1.2.1.1. Kuraklık Stresi..... | 3 |
| 1.2.1.2. Bitkilerde Kuraklık Stresinin Etkileri..... | 4 |
| 1.2.1.2.1. Mekanik Etki..... | 4 |
| 1.2.1.2.2. Metabolik Etki | 5 |
| 1.2.1.2.3. Oksidatif Etki..... | 5 |
| 1.2.1.3. Kuraklığın Fotosentez Üzerine Etkileri..... | 6 |
| 1.2.1.3.1. Stomatal Sınırlamalar..... | 6 |
| 1.2.1.3.2. Stomatal Olmayan Sınırlamalar..... | 7 |
| 1.2.3. Kuraklık Stresine Karşı Geliştirilen Dayanıklılık Mekanizmaları..... | 7 |
| 1.2.4. Kuraklık Stresine Karşı Oluşturulan Cevaplar..... | 8 |
| 1.2.5. Tuz Stresi..... | 9 |
| 1.2.5.1. Bitkilerde Tuz Stresinin Etkileri..... | 10 |

| | |
|--|----|
| 1.2.5.2. Tuz Stresine Karşı Geliştirilen Dayanıklılık Mekanizmaları..... | 12 |
| 1.2.5.3. Tuz Sresine Karşı Oluşturulan Cevaplar..... | 13 |
| 1.2.6. Serbest Oksijen Radikaller (Oksidanlar)..... | 15 |
| 1.2.6.1. Oksidanların Biyolojik Sistemler Üzerine Etkileri | 16 |
| 1.2.6.2.1. Proteinlerde Meydana Gelen Hasarlar..... | 16 |
| 1.2.6.2.2. DNA'da Meydana Gelen Hasarlar | 17 |
| 1.2.6.2.3. Lipitlerde Meydana Gelen Hasarlar..... | 17 |
| 1.2.7. Antioksidan Savunma Sistemi..... | 18 |
| 1.2.7.1. Enzimatik Olmayan Savunma Sistemi..... | 18 |
| 1.2.7.2. Enzimatik Savunma Sistemi..... | 18 |
| 1.2.7.2.1. Katalaz (EC 1. 11. 1. 6)..... | 18 |
| 1.2.7.2.2. Süperoksit Dismütaz (EC 1. 15. 1.1)..... | 20 |
| 1.2.7.2.3. Askorbat Peroksidaz (EC 1. 11. 1. 11)..... | 21 |
| 1.2.7.2.4. Glutasyon Redüktaz (EC 1. 6. 4. 2)..... | 21 |
| 1.2.7.2.5. Glutasyon S-Transferaz (2. 5. 1. 18)..... | 22 |
| 1.2.7.3. Antioksidanlar..... | 23 |
| 1.2.8. Çalışmanın Amacı..... | 24 |

2. BÖLÜM

| | |
|--|----|
| MATERYAL VE YÖNTEM..... | 26 |
| 2.1. Bitki Materyali..... | 26 |
| 2.2. Yöntem..... | 26 |
| 2.2.1. Bitki Yetiştirme ve Stres Uygulamaları..... | 26 |
| 2.2.2. Prolin Miktarının Tayini..... | 27 |
| 2.3. Antioksidan Aktivitesi..... | 29 |

| | |
|---|----|
| 2.3.1. Membran Lipid Peroksidasyonunun Belirlenmesi..... | 29 |
| 2.4. Enzim Aktiviteleri İçin Protein Örneklerinin Hazırlanması..... | 29 |
| 2.5. Protein Miktarının Belirlenmesi..... | 29 |
| 2.6. Enzim Aktivitelerinin Tayini..... | 31 |
| 2.6.1. Süperoksit Dismütaz Aktivitesinin Belirlenmesi..... | 31 |
| 2.6.2. Katalaz Aktivitesinin Belirlenmesi..... | 34 |
| 2.6.3. Askorbat Peroksidaz Aktivitesinin Belirlenmesi..... | 35 |
| 2.6.4. Glutasyon Redüktaz Aktivitesinin Belirlenmesi..... | 35 |
| 2.6.5. Glutasyon S-Transferaz Aktivitesinin Belirlenmesi..... | 36 |
| 2.6.6. Verilerin Analizi..... | 36 |

3. BÖLÜM

| | |
|--|----|
| BULGULAR | 37 |
| 3.1. Bitki Çeşitleri ve Stres Faktörlerinin Etkisi..... | 37 |
| 3.2.1. Stres ve Glycine-betain Uygulamasında APXa Ait Bulgular..... | 37 |
| 3.2.2. Stres ve Trehaloz Uygulamasında APX'a Ait Bulgular..... | 38 |
| 3.3.1. Stres ve Glycine-betain uygulamasında Katalaz'a Ait Bulgular..... | 39 |
| 3.3.2. Stres ve Trehaloz uygulamasında Katalaz'a Ait Bulgular..... | 40 |
| 3.4.1. Stres ve Glycine-betain Uygulamasında SOD'a Ait Bulgular..... | 41 |
| 3.4.2. Stres ve Trehaloz Uygulamasında SOD'a Ait Bulgular..... | 42 |
| 3.4.1. Stres ve Glycine-betain Uygulamasında GR'a Ait Bulgular..... | 43 |
| 3.4.2. Stres ve Trehaloz Uygulamasında GR'a Ait Bulgular..... | 44 |
| 3.5.1. Stres ve Glycine-betain Uygulamasında GST'a Ait Bulgular..... | 45 |
| 3.5.2. Stres ve Trehaloz Uygulamasında GST'a Ait Bulgular..... | 46 |
| 3.6. Lipid Peroksidasyonu ve Prolin İçeriği..... | 47 |

| | |
|--|----|
| 3.6.1. Stres ve Glycine-betain Uygulamasında MDA (Malondialdehit) Seviyesi.. | 47 |
| 3.6.2. Stres ve Trehaloz Uygulamasında Malondialdehit Seviyesi (MDA) | 48 |
| 3.6.3. Stres ve Glycine-betain Uygulamasında Prolin Seviyesi..... | 49 |
| 3.6.4. Stres ve Trehaloz Uygulamasında Prolin Seviyesi..... | 50 |
| | |
| 4. BÖLÜM | |
| TARTIŞMA VE SONUÇLAR..... | 52 |
| 4.1. Askorbat Peroksidaz (APX)..... | 54 |
| 4.2. Katalaz (CAT)..... | 55 |
| 4.3. Süperoksid dismutaz (SOD)..... | 57 |
| 4.4. Glutasyon Redüktaz (GR)..... | 58 |
| 4.5. Glutasyon S-Transferaz (GST)..... | 60 |
| 4.6. Malondialdehit (MDA)..... | 61 |
| 4.7. Prolin..... | 62 |
| | |
| KAYNAKLAR..... | 64 |
| | |
| EKLER..... | 70 |
| | |
| ÖZGEÇMİŞ..... | 72 |

KISALTMALAR

| | |
|------------------------------|-------------------------------|
| Perhidroksil radikali..... | OOH [·] |
| Singlet oksijen..... | O ₂ ¹ |
| Reaktif Oksijen Türleri..... | ROS |
| Süperoksit Dismütaz..... | SOD |
| Glutasyon redüktaz..... | GR |
| İndirgenmiş glutasyon..... | GSH |
| Okside glutasyon..... | GSSG |
| Hidrojen peroksit..... | H ₂ O ₂ |
| Süperoksit radikali..... | O ²⁻ |
| Hidroksil radikali..... | OH |
| Distile su..... | dH ₂ O |
| Katalaz..... | CAT |
| Askorbat peroksidaz..... | APX |
| Malondialdehit | MDA |
| Glycine-betaine..... | GB |
| Polyethylene glycol..... | PEG |
| Trikloroasetik asit | TCA |
| Bovine serum albümini..... | BSA |

ŞEKİLLER LİSTESİ

| | |
|---|----|
| Şekil 2.1. Bitki yetiştirme çemberinde çimlendirme kasnaklarının kullanımı ve stres uygulamaları sonucu büyüyen bitkiler..... | 27 |
| Şekil 2.2. Prolin hesaplamasında kullanılan standart eğrisi ve formülü..... | 28 |
| Şekil 2.1. BSA standartlarından elde edilen grafik..... | 31 |
| Şekil 2.2. SOD Standartlarından elde edilen logaritmik grafik..... | 33 |
| Şekil 2.3. Doğrusal standart SOD grafiği..... | 34 |
| Şekil 3.1. Stres ve glycine-betain uygulamalarında APX aktivite seviyesi..... | 38 |
| Şekil 3.2. Stres ve trehaloz uygulamalarında APX aktivite seviyesi | 39 |
| Şekil 3.3. Stres ve glycine-betain uygulamalarında CAT aktivite seviyesi..... | 40 |
| Şekil 3.4. Stres ve trehaloz uygulamalarında CAT aktivite seviyesi..... | 41 |
| Şekil 3.5. Stres ve glycine-betain uygulamalarında SOD aktivite seviyesi..... | 42 |
| Şekil 3.6. Stres ve trehaloz uygulamalarında SOD aktivite seviyesi..... | 43 |
| Şekil 3.7. Stres ve Glycine-betain uygulamalarında GR aktivite seviyesi..... | 44 |
| Şekil 3.8. Stres ve trehaloz uygulamalarında GR aktivite seviyesi | 45 |
| Şekil 3.9. Stres ve Glycine-betain uygulamalarında GST aktivite seviyesi..... | 46 |
| Şekil 3.10. Stres ve trehaloz uygulamalarında GST aktivite seviyesi | 47 |
| Şekil 3.11. Stres ve Glycine-betain Uygulamasında MDA (Malondialdehit) Seviyesi.. | 48 |
| Şekil 3.12. Stres ve Trehaloz Uygulamasında MDA (Malondialdehit) Seviyesi..... | 49 |
| Şekil 3.13. Stres ve Glycine-betain Uygulamasında Prolin Seviyesi..... | 50 |
| Şekil 3.14. Stres ve Trehaloz Uygulamasında Prolin Seviyesi..... | 50 |

1. BÖLÜM

GİRİŞ

Tüm dünyada ve ülkemizde gerek ekiliş gerekse üretim bakımından tahıllar başta gelen ürün grubunu oluşturmakta ve ülkemizde tarla bitkileri ekim alanı içinde tahıllar %70 pay almaktadır. Tahıl ürünleri içerisinde buğday büyük paya sahip olup, gerek insan beslenmesinde gerekse hayvan beslenmesinde temel bir besin maddesidir. Endüstride ham madde olarak kullanılması ise, son yıllarda tarım teknolojisindeki gelişmelere ve buğday ürünlerine olan talebin artışına paralel olarak hızla artmaktadır.

1.1. Buğday (*Triticum aestivum*)

Triticum aestivum'un taksonomisi

| | | |
|---------|---|---------------|
| Alem | : | Plantae |
| Şube | : | Magnoliophyta |
| Sınıf | : | Liliopsida |
| Takım | : | Poales |
| Familya | : | Poaceae |
| Cins | : | Triticum |

Buğday iyi bir besin hammaddesi oluşu, adaptasyon sınırının genişliği, üretiminin sadeliği, taşıma, depolama ve işleme kolaylığı gibi nedenlerden dolayı dünya nüfusunun yaklaşık %35'inin temel besini durumundadır. Buğday tanesi yaklaşık olarak %65- 75 nişasta, %8-15 protein, %1-5 yağ, %1.5-3 şeker, %1-2 kül, %11-13 su içerir. Buğday tanesinde karbonhidrat, yağ ve proteinin yanında, insan ve hayvan beslenmesinde önemli derecede rol oynayan vitaminler de bulunmaktadır [1]. Dünyada 212 milyon hektar ekim alanında 635.3 milyon ton üretilmektedir. Türkiye'de 8.5 milyon hektar ekim alanı ve 18.2 milyon ton üretimiyle bitkisel üretimde en önemli kültür bitkisi durumundadır. Dünya'da toplam tahıl ekim alanının %32'sini, üretimin de %35'ini, Türkiye'de toplam tahıl ekilişinin %67'sini ve üretiminde de %62'sini tek

başına sağlamaktadır [2]. Buğday, ülkemizde ve dünyada üretimi ve tüketimi en yaygın olan tahıl cinsidir. Çeşitli yayınlarda, ülkemizde nüfus başına yıllık buğday tüketim verileri farklı olmakla birlikte; bildirilen değerler genellikle 200 kg/yıl dolayındadır. Buğday un haline getirilerek, ekme ve diğer unlu gıdaların imalatında, bulgur, yem sektöründe ham madde olarak ve enerji kaynağı olan bioetanol üretiminde de kullanılmaktadır [3].

Buğdayın Dünya’da ve Türkiye’de son on yılda ekim alanlarında artış olmamışken; dünyanın üretim artışı, ülkemiz üretiminden daha belirgin olmuştur. Ülkemizde çeşit sayısındaki yükselişe karşın; buğday verim ve üretiminde belirgin artışlar sağlanmamıştır. Ekim alanlarının tarla alanları üst sınırına ulaşması ve üretimin kurak koşullarda yapılması; verimi ve dolayısıyla üretim düşmektedir. Son on yılda dünya buğday üretimi 2445-2750 kg/ha, Türkiye buğday verimi ise 1787-2235 kg/ha arasında değişmektedir [4].

1.2. Stres

Bitkide metabolizmayı, büyüme ve gelişmeyi etkileyen veya engelleyen, uygun olmayan herhangi bir durum veya madde stres olarak kabul edilir ve bitki toleransı ile yakından ilişkilidir [5].

Kuraklık, yüksek sıcaklık, tuzluluk, metal, pestisid ve toprak pH’sı gibi stres faktörleri bitkilerdeki tüm metabolizmayı olumsuz etkileyerek, ürün verimini, büyümeyi ve gelişmeyi sınırlandırmakta, hatta bitkiye öldürücü zararlar da verebilirler. Bitkiler bu durumda hayatta kalmayı sağlamak için eşitli stratejilerle tepkiler oluşturmaktadır. Tüm bitki seviyelerinde stresin etkisinin genellikle reaktif oksijen üretimi, büyüme ve fotosentezdeki azalma arasında bir ilişkinin olduğu gösterilmiştir [5, 6].

Stres faktörleri nedeniyle hücrede meydana gelen oksidatif stres; Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) (superoksid radikalleri (O_2^-), hidrojenperoksid (H_2O_2), singlet oksijen ve hidroksil radikalleri (OH^-) gibi) oluşmasına neden olur. Biyotik ve abiyotik stres faktörlerinin sebep olduğu ROS’lar, lipid peroksidasyonu ve membran zararlarında önemli bir role sahiptir. Bitkilerde ROS’ların temizlenmesinde antioksidan maddeler ve enzimler (süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), peroksidaz (POD), askorbat

peroksidaz (APX), glutatyon redüktaz (GR) ve glutatyon s-transferaz (GST)) görev yapmaktadırlar [7, 8, 9].

1.2.1. Stres Faktörleri (Stresörler)

Bitkiler yaşamları sürecince birçok stres faktörü ile karşılaşılırlar. Bitki üzerinde ender olarak tek başlarına etki yapabilen bu stres faktörleri, genellikle etkilerini eş zamanlı olarak gerçekleştirmektedirler. Biyotik (patojen, diğer organizmalarla rekabet vb.) ve abiyotik (kuraklık, tuzluluk, radyasyon, kimyasal maddeler, yüksek sıcaklık veya don vb.) stresler ekonomik önemi olan tahıllar dâhil, tüm bitkilerin normal fizyolojik işlevlerinde değişikliklere yol açmaktadır. Tüm bu stresler bitkilerin biyosentetik kapasitelerini azaltır, normal fonksiyonlarını değiştirir ve bitkinin ölümüne yol açabilecek zararlara neden olabilir [9, 10, 11].

Dünya üzerinde kullanılabilir alanlar stres faktörlerine göre sınıflandırıldığında doğal bir stres faktörü olan kuraklık stresi %26'lık payıyla en büyük dilimi içermektedir. Bunu % 20 ile mineral stresi ve %15 ile soğuk ve don stresleri takip etmektedir. Bunların dışında kalan tüm diğer stresler %29'luk bir pay alırken, yalnızca %10'luk bir alan herhangi bir stres faktörüne maruz kalmamaktadır [12]. Bu durumda, kuraklık ve tuz stresleri büyümeyi ve verimi etkileyen en yaygın çevresel streslerden olup bitkilerde birçok fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler cevabı indüklemekte ve buna bağlı olarak bitkiler, sınırlı çevresel koşullara adapte olmayı sağlayacak tolerans mekanizmaları geliştirebilmektedirler [9, 13].

1.2.1.1. Kuraklık Stresi

Kuraklık, genel anlamda meteorolojik bir olgu olup toprağın su içeriği ile bitki gelişiminde gözle görülür azalmaya neden olacak kadar uzun süren yağışsız dönemdir. Yağışsız dönemin kuraklık oluşturması; toprağın su tutma kapasitesi ve bitkiler tarafından gerçekleştirilen evapo-transpirasyon hızına bağlı olarak gerçekleşmektedir. Kuraklık genel olarak su noksanlığı ve kuruma olarak iki tipe ayrılabilir. Buna göre:

1. Su noksanlığı, stomalarda kapanmaya ve gaz değişiminde kısıtlamaya neden olan orta düzeydeki su kaybıdır. Oransal su kapsamının yaklaşık %70'te kaldığı

hafif su noksanlığına maruz kalan bitkilerde stomaların kapanmasına bağlı olarak karbondioksit alımı kısıtlanmaktadır.

2. Kuruma, metabolizma ve hücre yapısının tamamen bozulmasına ve sonunda enzimle katalizlenen reaksiyonların durmasına neden olabilecek potansiyele sahip olan aşırı miktardaki su kaybı olarak tanımlanabilir. Genel bir kural olarak, kurumaya duyarlı vasküler bitkilerin çoğunda vejetatif doku, %30'un altındaki oransal su kapsamında iyileşme sürecine giremez [14].

1.2.1.2. Bitkilerde Kuraklık Stresinin Etkileri

Kuraklık stresi genellikle tarımsal üretimde ürün veriminin düşmesine, fotosentezin gerçekleşmesini engellemekte, klorofil içeriği ve elemanlarında değişmelere neden olmakta ve fotosentetik elemanlara zarar vermektedir [9]. Ayrıca fotokimyasal aktiviteleri engellenmekte ve Calvin Döngüsü'nde enzimlerin etkilerini azaltmaktadır [15]. Çevresel stresler bitkilerin büyümesi ve fotosentetik yeteneklerini azaltmakta, antioksidan savunma ve aktif oksijen türleri arasındaki ayarlamayı bozmaktadır. Aktif oksijen türleri'nin birikmesine neden olmakta, proteinler, membran lipidleri ve diğer hücresel elemanlar için oksidatif stresler oluşturmaktadır [9].

1.2.1.2.1. Mekanik Etki

Bitkiler hücrelerinde belirgin su yitimi gerçekleştiği zaman bitkide turgor kaybıyla kendini gösteren birincil strestir. Plazma membranının yapısı hücredeki sulu ortamın bir sonucudur; bu yapı membrandaki hidrofobik fosfolipid kuyrukların su tarafından itilmesi ile oluşur (sıvı-katı faz). Hücreden su kaybıyla beraber, membran yapısı değişikliğe uğrar; fosfolipidlerin hidrofilik baş kısımları birbirine yaklaşır ve membranlar kompakt bir görünüm alır (jel faz). Bu yeni yapıda membran lipidleri sıvı-katı fazında olduğundan daha az kinetik enerji ile lateral ve rotasyonel harekete sahiptir. Su kaybına bağlı olarak hücrede hacim de azalır ve plazma membranı hücre duvarından ayrılarak yalnız plazmodezmler aracılığıyla ilişkisini sürdürür (plazmoliz). Gerilim altındaki plazma membranı ve tonoplastta gerçekleşen çökme, yırtılmalara yol açabilir ve bu durum, zararları üzerinde yerleşmiş olan hidrolitik enzimlerin serbest kalmasına ve dolayısıyla sitoplazmanın otoliziyle sonuçlanabilir. Bu zarar, normal hücresel metabolizmayı genelde kalıcı olarak bozar.

1.2.1.2.2. Metabolik Etki

Hücre içeriğinin büyük bir kısmını oluşturması, taşıyıcı olması, hücresel reaksiyonlar ve işlevler için çözücü rolü oynaması gibi fonksiyonel özelliklerinden dolayı suyun, hücreden kaybı durumunda, normal regülasyon devam edemez ve metabolizma bozulur. Su kaybına bağlı olarak gerçekleşen iyon-birikimi, membran bütünlüğünün ve proteinlerin yapısının bozulmasına yol açarak hücreye zarar verebilir. Su kaybı sonucunda; proteinlerin yapısında bulunan hidrofobik ve hidrofilik amino asitlerin su ile etkileşimleri bozulur ve bu durum da protein denatürasyonlarına ve enzim inhibisyonlarına neden olur. Kuraklık stresi sırasındaki hasarda bir başka faktör, DNA ve RNA gibi nükleik asitlerin degradasyonudur. Kessler' e göre, kuraklık stresine maruz kalmış olan yapraklarda RNA az aktivitesi artmakta ve bu da enzimin bağlı durumdan serbest duruma geçmesinden kaynaklanmaktadır. Nükleik asitlerin yıkımından sorumlu diğer moleküller ise serbest radikaller olabilir [14].

1.2.1.2.3. Oksidatif Etki

Serbest radikallerin, özellikle aktif oksijen türlerinin süperoksit molekülü (O_2^-), singlet oksijen (1O_2), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikallerini (OH^-) oluşumunu içerir. Serbest radikaller, eşleşmemiş elektron içeren moleküller olup oldukça reaktiftirler. Bu radikaller; plazma membranı, mitokondri, ER membranlarında da oluşabilir [7, 8, 9]. Bununla beraber, suyun kısıtlı olduğu periyotlarda, vejetatif bitki dokularında oksidatif stresin en yaygın nedeni kloroplastta gerçekleşen ışık-klorofil etkileşimleri diye düşünülmektedir [16]. Su kısıtlı hale gelirken, bitki daha fazla su kaybetmemek için, genelde, stomalarını kapatır; bu da fotosentezle fiksasyon için gerekli CO_2 'nin alımının kısıtlanmasına neden olur. Bu durum; kuantum verimini azaltır ve fotosentetik aparatın reaksiyon merkezlerindeki eksitasyon enerjisinin aşırılığına neden olur. Bu durumda; $NADP^+$ (fotosentezdeki e^- akseptörü) kısıtlı hale gelir ve ferrodoksin $NADP^+$ yerine oksijeni redükler; böylece, fotosistem I (PSI) 'in elektronları O_2 'ye transferi sonucunda reaktif O_2^- radikali üretilir (Mehler reaksiyonu) [17]. Birçok türde kuraklık stresi altında artan O_2^- oluşum hızı; lipid peroksidasyonuna, yağ asidi doygunluğuna ve sonuçta membranların bütünüyle zarar görmesine neden olur. Süperoksitin kendisi fazla reaktif değildir ve daha çok H_2O_2 ve daha sonra OH^- oluşturmak suretiyle etkili olur. Hidrojen peroksit Calvin döngüsünün birçok enziminin inaktivasyonuna yol açmaktadır.

Süperoksit ve hidrojen peroksidin OH^- radikalini oluşturmak üzere tepkimesi sırasında (Haber-Weiss reaksiyonu), artan demir ya da bakır gibi diğer geçiş metalleri, bu reaksiyonları hızlandırmak suretiyle oksidatif hasarı daha da arttırabilir (Fenton reaksiyonu). Bunların yanı sıra, fotosistem II (PS II)' deki suyu parçalayan bölgede de serbest radikal oluşabilir. Bitkilerde, oksidatif zararın yol açtığı yıkıcı etkilerle mücadele etmek için; yağda çözünen ve membrana bağlı antioksidantlar [doğrudan lipid peroksidasyonunun serbest radikallerini (triplet klorofil ve $^1\text{O}_2$) gideren α -tokoferol, β -karoten], suda çözünen antioksidantlar [O_2^- ve H_2O_2 'nin detoksifikasyonunda rol oynayan glutatyon ve askorbat] ve enzimatik antioksidantlar [süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), perksidaz (POD), askorbat peroksidaz (APX) ve glutatyon redüktaz (GR)]'dan oluşan karmaşık bir antioksidant koruyucu sistemine sahiplerdir. Kuraklık stresine maruz kalan bitkiler antioksidant savunma sistemlerin bazılarının ya da tamamının aktivasyonu ile oksidatif stresin üstesinden gelebilirler [7, 8, 13, 18]. Bununla beraber, uzun süreli ve akut; hatta bazen kısa süreli stres durumunda bile, savunma mekanizmalarının kapasiteleri aşılar ve bu durum, gözle görülür zararlara ve hatta bitki ölümüne neden olabilir [19].

1.2.1.3. Kuraklığın Fotosentez Üzerine Etkileri

Kuraklık sırasında fotosentezin gerilemesi büyük ölçüde iki nedene bağlı olarak gerçekleşmektedir. Orta düzeydeki su noksanlığı koşulları altında stomaların kapanmasına bağlı olarak gerçekleşen stomatal sınırlamalar ve genellikle daha uzun süreli ve daha şiddetli streslerde ortaya çıkan stomatal olmayan sınırlamalardır.

1.2.1.3.1. Stomatal Sınırlamalar

Kuraklığa karşı oluşturulan en erken tepkilerden biri, kloroplastlara CO_2 difüzyonunu kısıtlayan stoma kapanması olayıdır. Kuraklık sırasında bitkilerin stomalarını kapatmalarına neden olan iki temel etken, hidrolik sinyaller (yaprak su potansiyeli, hücre turgoru) ve kimyasal sinyaller (absisik asit) ' dir. Köklerde sentezlenen ve transpirasyon akıntısıyla bekçi hücrelerine taşınan absisik asit (ABA), bekçi hücrelerindeki hipotetik ABA reseptörüne bağlanarak, kuraklık stresi koşulları altında stomaların kapanmasını sağlar. Stoma kapanmasının yapraktaki su potansiyelinden çok, toprağın su potansiyeline bağlı olduğu görülmüştür. Son zamanlarda birçok araştırmacı

tarafından; aynı anda ya da farklı zamanlarda gerçekleşen hidrolik ve kimyasal sinyal tipleri arasında bir kombinasyon oluşuna dair kanıtlar öne sürülmektedir [14].

1.2.1.3.2. Stomatal Olmayan Sınırlamalar

Şiddetli su noksanlığına maruz bırakılan bitkilerden izole edilen kloroplastlarda fotosentetik elektron transportu ve fotofosforilasyon kapasitelerinin azaldığı gösterilmiştir. Fotosentetik elektron zincir reaksiyonlarının inhibisyonu, foto indirgeyici ya da foto oksidatif hasara neden olabilecek aktif oksijen türlerinin oluşumuna neden olabilir. İzole edilen kloroplastlardaki çalışmalar iki fotosistemin ve özellikle de PSII' nin kuraklık stresi ile etkilendiği göstermiştir. Fotosentezin stomatal olmayan sınırlanması; kloroplast lipidlerinin, pigmentlerinin ya da proteinlerinin oksidatif olarak hasar görmesiyle ilişkili olabilir. Bitkilerde fotosentetik kapasite, ortamının ışık yoğunluğu ve oransal su kapsamının değişimine bağlı olarak da etkilenmektedir [17].

1.2.3. Kuraklık Stresine Karşı Geliştirilen Dayanıklılık Mekanizmaları

Kuraklık stresi bitkilerde sınırlı çevresel koşullara adapte olmayı sağlayacak birçok fizyolojik, biyokimyasal ve moleküller cevabı indüklemektedir. Vejetatif dokularda kuraklık stresine karşı geliştirilen iki ana savunma mekanizması stresten kaçınma ve stres toleransıdır. Stresten kaçınma mekanizmalarında ilki efemerlerde görülen kaçıştır. Çöl efemeri kurak mevsim sırasında yalnızca dormant tohumlar olarak varlık göstermek suretiyle kuraklıktan kaçan tek yıllık bitkilerdir. Protoplazmaları hiçbir zaman şiddetli negatif su potansiyellerine maruz kalmaz. Diğer bir kaçınma mekanizması ise sukkulent bitkilerde görülür. Bu bitkiler, kuraklığa karşı, sukkulent dokularında su depolayarak direnir ve su kayıp oranlarının son derece düşük olmasından dolayı nem almaksızın uzun periyotlarda canlılıklarını sürdürebilirler. Protoplazmaları aşırı derecede negatif su potansiyellerine maruz kalmadığından gerçek anlamda kuraklığa –toleranslı değillerdir. Çöl herdem yeşil bitkileri ise su noksanlığı boyunca dokularındaki turgoru sürdürmek için osmotik koruyucular sentezleyerek kuraklıktan kaçınırlar. Stresten kaçınan bitkiler yalnızca orta şiddetteki kuraklık stresi durumunda hayatta kalırken strese toleranslı bitki grupları ise koruyucu mekanizmaları çalıştırmak suretiyle çok daha şiddetli kuraklık stresi durumunda hayatta kalabilirler. Kurumaya –toleranslı olan bitki grupları içersinde yer alan dirilen (ressurrection) bitkilerde, suyun kısıtlı olduğu periodlarda vejetatif

dokulardaki bağıl su içeriğinin %5'ine kadar kaybedilebildiği ve suyun yeniden alınabilir olması durumunda rehidrasyonun gerçekleşebildiği oldukça farklı bir strateji izlenir. Bu bitkilerin vejetatif dokuları ışık varlığında gerçekleşen aşırı kuraklıkta ilişkili streslerle mücadele edebilme yeteneğine sahiptir. Fotooksidatif stresten kaçınmak için geliştirdikleri stratejiye göre iki gruba ayrılırlar:

1. Klorofil Alıkoyucu Dirilen Bitkiler (Homiochlorophyllous Resurrection Bitkiler):

Kuruma sırasında klorofillerin alıkoyarlar. Klorofil- ışık etkileşimlerinin tehlikeleri ise klorofilin saklanması ile önlenir. Yaprakların kıvrılma ve katlanması ışık stresinden kaçınmada önemli bir mekanizmadır.

2. Klorofil Kaybeden Dirilen Bitkiler (Poikilochlorophyllous Resurrection Bitkiler):

Tüm klorofilleri yıkarlar ve kloroplastların tilakoit membranlarını parçalarlar. Böylece, kloroplastta serbest radikal oluşturan reaksiyonlar gerçekleşemezler. Suyun tekrar alınmasıyla beraber, fotosentetik aparat tekrar oluşur ve fotosentez yeniden başlar. Bunu başarmak için; bitki tarafından rehidrasyon sırasında onarım proteinleri sentezlenir. Kurumaya karşı duyarlı olan bitkilerde turgor kaybıyla beraber, hücre membranlarına ve hücre çeperine uygulanan mekanik basınç ortadan kalkar ve bunun sonucunda genellikle hücre çeperi çöküşü ve membran zararı gerçekleşir; bu zararlar onarılmaz. Bununla beraber, dirilen bitkilerde, hücre hacmindeki azalmaya ilişkili olan mekanik stres çeşitli koruma mekanizmaları aracılığıyla engellenir. Demet kını hücreleri, çok sayıda (küçük) vakuol oluşturmak suretiyle hücre hacminin değişmeden kalmasını sağlar. Bu vakuollerde su, prolin gibi osmotik düzenleyiciler aracılığıyla yeniden kazanılır.

1.2.4. Kuraklık Stresine Karşı Oluşturulan Cevaplar

Su noksanlığına karşı oluşturulan cevaplar; türe, genotipe, su kaybı şiddetine ve uzunluğuna, bitkinin gelişme durumuna, yaşına, organ ile hücre tipine ve hücresel kompartmanlaşmaya (hücre çeperi ve hücre zarı gibi)'a bağlı olarak değişmektedir. Oluşturulan bu cevaplar birkaç saniye içinde gerçekleşebilir (bir proteinin fosforilasyon derecesinde meydana gelen bir değişikliklik gibi) ya da dakikalar veya saatler sürebilir (gen ifadesinde meydana gelen bir değişikliklik gibi). Strese karşı oluşturulan cevapta yer alan genler iki tiptir:

1. **Erken cevap genleri:** çok hızlı (dakikalar içinde) ve geçici olarak indüklenir. İndüklemeleri yeni protein sentezine gereksinim duymaz;çünkü tüm sinyal bileşenleri önceden mevcuttur.
2. **Geç cevap genleri:** strese karşı daha yavaş (saatler içinde) indüklenir ve ifadeleri çoğunlukla devamlıdır. Strese cevapta yer alan genlerin büyük bir kısmını oluştururlar. Erken cevap genleri tipik olarak geç cevap genlerini aktive edecek transkripsiyon faktörlerini kodlamaktadır [14].

1.2.5. Tuz Stresi

Tuz, yeryüzünde yaşam süresi boyunca karşılaşılan ilk kimyasal faktörlerden biridir. Başlangıçtan itibaren organizmalar, iyonların düzenlenmesi ve protoplazmik yapıların stabilizasyonu için etkili mekanizmaları geliştirmek zorunda kalmışlardır [5]. Tuzluluk; özellikle kurak ve yarı kurak iklim bölgelerinde yikanarak yer altı suyuna karışarak çözünebilir. Tuzların yüksek taban suyuyla birlikte kapillarite yoluyla toprak yüzeyine çıkması ve buharlaşma sonucu suyun topraktan ayrılarak tuzun toprak yüzeyinde ve yüzeye yakın bölümünde birikmesi olayıdır [14].

Tuzlar; bitkilerin vejetasyon süresince, evaporasyon ve transpirasyondan kalan kalıntılar olarak bitki bünyesinde birikebilmektedir. Yaprak ve diğer kısımların ölererek yere düşmelerinden sonra da tuzlar, yağışlarla toprağa tekrar geri dönebilmektedir. Toprak tuzluluğu, topraktan oluşan evaporasyonun yıl boyunca toprağa süzülen yağış miktarından daha fazla olduğu kurak bölgelerde büyük ölçüde artma göstermektedir.

Nemli bölgelerde tuzlu topraklar esas olarak NaCl içerirler. Bu tip nötral tuzlu topraklar kurak bölgelerde de meydana gelmektedir. Step ve çöl toprakları ise kendilerini daha alkalın yapan Na, Mg ve Ca 'un sülfat ve karbonatlarına sahiptirler. Stepelerde meydana gelen sodyum topraklarının (solonetz) yüksek pH değerleri (8.5- 11), NaHCO_3 , NaCO_3 ve NaOH gibi temel tuzların varlığından kaynaklanmaktadır. Yarı- kurak alanlarda oldukça tuzlu (solonçek) topraklar genellikle, yüzeydeki tuz kırıntıları ile tanınırlar. Bunlar sodyum, magnezyum ve kalsiyumun klorid, sülfat ve bi-karbonatlarından ibarettirler. Bu tip topraklar, yüksek miktarlarda jips içerirler, kuruduklarında yüzey serttir ve çatlaklara sahiptirler [5].

1.2.5.1. Bitkilerde Tuz Stresinin Etkileri

Tuz stresi, tarımsal üretimi sınırlayan en önemli stres faktörlerinden birtanesidir. Özellikle dünyanın kurak ve yarı kurak bölgelerinde daha yaygın olarak hüküm sürmektedir. Her yıl tuzluluk nedeniyle daha sınırlı tarımsal alanlar oluşmaktadır [20]. Aşırı tuzluluk, dünyanın birçok bölgesinde bitkilerin doğal habitatlarında yayılmasını sınırlamakta ve şiddetle artan bir tarımsal problem oluşturmaktadır. Tuzlu koşulların bitki büyümesi üzerindeki zararları etkileri genel olarak iki şekildedir. Birinci olarak kökleşme ortamının osmotik potansiyelinin azaltılması ve ikincisi özel iyon toksitesidir [21].

Bitkilerde tuzun en basit etkisi, topraktaki sudan bitkinin yararlanamaması yanında bitki besinlerinin alımının azalmasıdır. Tuzlu topraklarda artan osmotik potansiyelden dolayı bitkilerin suyu yeteri kadar kullanamaması ya da ortamda aşırı miktarlarda bulunan Na^+ ve Cl^- un neden olduğu toksik etkiden dolayı azalma olmaktadır. Tuzlu koşullarda yetiştirilen bitkilerin iyon dengesinin bozulmasına paralel olarak mineral madde konsantrasyonlarında da önemli sayılabilecek oranlarda değişimler olmaktadır. Tuz stresinden etkilenmeyen ya da göreceli olarak daha az etkilenen bitkilerin dokularında Na^+ ve Cl^- iyonları az, prolin miktarı ise daha fazladır. Bitkiler tarafından alınan aşırı miktardaki tuzun hücre fonksiyonlarını bozar, hücre ve organel zarlarında meydana gelen tahribatlar nedeniyle fotosentez, solunum vb. işlevlerin sekteye uğraması tuz zararının sonuçlarındandır [14]. Ayrıca toprakta tuz konsantrasyonunun artmasıyla, bitkinin topraktan su alımı güçleşmekte, toprağın yapısı bozularak bitki gelişimi yavaşlamakta, hatta durmaktadır [23]. Toprak içerisinde yeterli miktarda su bulunmasına rağmen bazı koşullar altında bitkilerin solmaya başladıkları görülmüştür. Bu durum genellikle yüksek toprak tuzluluğunun yarattığı “fizyolojik kuraklık” durumundan kaynaklanmaktadır. Fizyolojik kuraklık durumunda yüksek osmotik basınç nedeniyle bitki kökleri topraktaki mevcut suyu alamamaktadırlar [24].

Toprak suyu tuzluluğunun bitki gelişimi üzerindeki zararlı etkileri şu şekilde özetlenebilir;

1. Yavaş ve yetersiz çimlenme,
2. Fizyolojik kuraklık, solma ve kuruma,
3. Bodurluk, küçük yapraklar, kısa gövde ve dallar,

4. Mavimsi yeşil yapraklar
5. Çiçeklenmenin gecikmesi, daha az çiçek açma ve tohumların daha küçük olması,
6. Tuza dayanıklı yabancı otların gelişmesi,
7. Meyvelerin küçük kalmasına, kalitenin düşmesine ve ürün kayıplarına neden olmaktadır.

Bitkiler normal gelişmeleri için toprakta sürekli olarak, gelişmelerini engellemeyecek düzeyde suyun bulunması gerekmektedir. Kök bölgesinde suyun azalması ile bitkilerin su kullanımlarında da azalma görülmektedir. Tuzluluk toprak ortamında bitkinin suyu kolaylıkla almasını engelleyen durumlardan birisidir. Kök bölgesi çözelti ortamında tuz konsantrasyonunun artması ile bitkinin bu suyu alabilmek için harcamak zorunda kaldığı enerji miktarı da artar ve sonuçta tuzluluk arttıkça bitkinin su kullanımı azalır. Bitkinin su kullanımının zorlaşması ve su kullanımının azalması, bitki verimi ve kalitesini azaltıcı etkiye bulunur [25].

Tarımı yapılan kültür bitkilerinin tümü, tuzluluğa karşı aynı tepkimeyi göstermezler. Bazı bitkiler tuzluluğa karşı daha hassas iken, bazı bitkiler daha dayanıklıdır. Dayanıklı bitkiler, tuzlu topraklarda su gereksinimlerini karşılamak amacıyla osmotik etkiye karşı daha fazla güç geliştirebilen bitkilerdir. Bitkinin tuza dayanımlarının incelenmesi, özellikle toprak tuzluluğunun belirli bir düzeyin altına düşürülmediği alanlarda, ekonomik düzeyde ürün verebilecek bitkilerin seçilerek yetiştirilmesi amacıyla önemlidir [26].

Tuzlar bitki büyümesine üç şekilde etki ederler;

1. **Fiziksel Etki;** Osmotik basıncın yükselmesi sonucu bitkinin su alımı ve dolayısıyla beslenmesi yavaşlar veya tamamıyla durur. Bitki su alımında güçlük çeker. Buna osmotik basıncın etkisi de denir.
2. **Kimyasal Etki;** Bir kısım tuzlar, bitki besin maddelerinin alımını zorlaştırıp, metabolizmayı bozarak bitkinin büyümesine zarar verirler. Buna özel iyonların toksisitesi de denir.
3. **Dolaylı Etkiler;** Tuzluluk veya sodyumluluğun toprak üzerinde meydana getirdiği değişiklikler, bitkilerin gelişmesine etki eder. Örneğin su alımının

sağlanması için metabolik enerjinin kullanılması ve verimde düşme meydana gelmesi gibi.

Toprak çözeltisinde çözülmüş halde bulunan fazla tuzun bitkiler üzerine ana etkisi toprak osmotik basıncını artırarak dolaylı olarak bitkinin su almasının engellemesidir. Bitki kökleri çoğu tuzları geçirmeyen ancak su moleküllerinin geçmesine de engel olmayan yarı-geçirgen hücre zarını ihtiva etmektedir. Tuz etkisiyle ilgili önemli bir husus da, bazı bitkilerin özellikle tohumlarının çimlenmesi veya fide devrelerinde tuzluluğa karşı oldukça hassas olmalarıdır [25].

Tuz stresi, bodurlaşmaya ve bitki büyümesinin engellenmesine yol açmaktadır. Bu stresin artması ile tomurcuk açması gecikmekte, sürgünlerin boyu kısalmakta, yapraklar küçülmekte ve hücrelerin ölümü gerçekleşmektedir. Ayrıca köklerde, tomurcuklarda, yaprak kenarlarında ve sürgün uçlarında nekrozlar oluşmakta, yapraklar sararmakta ve sürgünün tüm kısımlarında kurumalar meydana gelmektedir. Bitkilerde hormonal denge, tuzluluk tarafından etkilenen önemli bir faktördür. Sitokininin düşük seviyeleri, absisik asit ve etilenin aratan miktarları, olgunlaşmanın erken başlamasında etkili olmaktadır.

Tuz stresi, bitkilerde ölüme yol açabilmekte, tuz konsantrasyonu ve bitkinin dayanıklılığına göre büyümeyi engellemekte, yaprak yanıklığı gibi nekrozlara, klorozlara, dölllenme bozukluklarına, meyvelerin küçük kalmasına, kalitenin düşmesine ve ürün kayıplarına neden olabilmektedir [5].

1.2.5.2. Tuz Stresine Karşı Geliştirilen Dayanıklılık Mekanizmaları

Tuzlu habitatlarda büyüyen bitkiler, tuz etkilerinden kaçınamayabilirler ve bu nedenle en azından bir miktar dayanıklılık geliştirmek zorundadırlar. Tuza maruz kalan bitkilerde büyüme ve metabolizmanın korunabilme derecesi “tuza dayanıklılık” olarak adlandırılmaktadır. Tuza dayanıklılık, bir bitkinin ya protoplazmada ulaşılan aşırı tuz miktarlarının düzenlenmesi (tuz regülasyonu) yolu ile olan kaçınma veya alternatif olarak, artan iyon konsantrasyonu ile bir araya gelen toksik ve osmotik etkileri tolere etme yeteneği ile sağlanabilmektedir.

Bitkiler tuza tolerans kapasiteleri bakımından iki grupta yer almaktadır.

1. **Halofitler (tuzcul bitkiler)** : Yüksek tuz konsantrasyonlarında gelişebilirler. Tuz düzeyin düşük koşullarda yaşayamazlar. Obligat halofitlerde büyüme, tuzun ılımlı miktarlarının alınımı ile ilerletilebilir. Sadece tuz yüksek seviyeler ulaştığında büyüme bozulur ve bitki stres sinyalleri gösterir.
2. **Glikofitler** : Tuza duyarlı bitkilerdir. Yüksek tuz konsantrasyonlarında yaşayamazlar. Tarımı yapılan bitkiler arasında mısır, soğan, ceviz, turunçgiller, fasulye ve marul tuza yüksek oranda duyarlı, pamuk ve arpa orta derecede toleranslı, şeker pancarı ile hurma ağacı ise yüksek oranda toleranslı bitkilerdir.

Halofitler tuz içeriklerini birkaç yolla düzenleyerek tuzdan kaçınmaya çalışırlar.

Tuzu bünyeye alma: Kök ve sürgünlerdeki tuz taşınımının engellenmesi söz konusudur. Halofobik türlerde fazla miktarlardaki iyonlar, köklerde, sapın üst kısımlarında, yaprak ve çiçek saplarında tutulurlar. Böylelikle de uzun meristemlere, gelişmekte olan yapraklara ve genç meyvelere ulaşan miktar azaltılmış olur.

Tuz eliminasyonu : Bazı bitkiler, tuzları kök ve sürgün yüzeyleri ile dışarı atarak, özelleşmiş bezler ve tüylerde dışarı atarak, uçucu metal halinde serbest bırakarak ve tuz içeren bitki kısımlarını dökerek kendisini aşırı tuzdan koruyabilir. Tuzu gidermenin diğer bir yolu, önemli miktardaki tuzu biriktiren yaşlı yaprakların absisyonudur.

Tuzun seyreltilmesi : Tuzun konsantrasyon artışını önlemek üzere suyun yeterli miktarda absorbe edilmesi sonucu hücre özsuyunun seyreltilmesi ile elde edilmektedir.

Tuzun protoplastlardaki bölmelerde biriktirilmesi : Halofitler ve tuzlu topraklarda yaşayan karasal bitkiler, hücre özsularında tuz biriktirerek ozmotik potansiyellerini azaltırlar ve turgorlarını korumaya çalışırlar. Ozmotik potansiyel, tuz birikiminin yanı sıra, organik asitler ve karbonhidratlar ilerde azaltılabilir. Tuz iyonlarını çoğu vakuollerde biriktirmektedir. Böylelikle stoplazmanın ve kloroplastların maruz kaldıkları konsantrasyonlar azaltılarak, bunların enzim sistemleri doğrudan tuz stresinden korunmuş olmaktadır [5].

1.2.5.3. Tuz Sresine Karşı Oluşturulan Cevaplar

Tuz stresine karşı oluşturulan cevaplar protoplazmanın ait olduğu bitki türüne, doku tipine ve dirençliliğe bağlı olarak, tuz stresi ile bir arada olan iyonik dengesizliği ve

artan iyon konsantrasyonlarının osmotik etkilerini tolere edebildiği dereceyi kapsamaktadır. Familya, cins ve türler arasında, hatta aynı türe ait çeşitler arasında da tuza toleranslılık bakımından farklılıklar bulunmaktadır. Artan tuz konsantrasyonlarında, belirli DNA dizininin aktivasyonundan sonra ve 3-6 saat içinde stres proteinleri teşvik edilir. Sitoplazma ve farklı hücre bölmeleri arasındaki ozmotik denge, uygun ve toksik olmayan organik bileşikler tarafından muhafaza edilir. Gerçekte birçok bitki; aşırı tuz, kuraklık ve dondan kaynaklanan strese spesifik olmayan bir reaksiyon üretmektedir. Çözünür karbonhidratlar ve aminoasitler, yüksek iyonik konsantrasyonlarının protein ve biyomembranlara verecekleri zararlı etkilerinden korunulmasında katkıda bulunmaktadır [23] ve ilk gelişme dönemlerinde tuza karşı çok duyarlıdır. Arpa, buğday ve çeltik özellikle fide devresinde tuza karşı daha duyarlıdır. Şeker pancarı özellikle çimlenme devresinde tuza karşı duyarlıdır.

Yurtseven ve Baran brokoli bitkisi için tuz ve su miktarlarının verim ve mineral madde içeriğine etkisini araştırmışlardır. Tuzluluğun artması ve su miktarının azalması bitki kuru madde miktarlarının azalmasına neden olurken, toplam kül içeriklerinin artırmıştır.

Yurtseven tuzluluğun patlıcan bitkisinin bitki su tüketimine etkisini araştırmış ve tuzluluk artışı ile bitki su tüketiminin azaldığını belirlemiştir. Bu azalma toprak ortamındaki çözelti konsantrasyonunun sulama suyu ile iletilen tuzlar nedeniyle artması ve bunun bir sonucu olarak osmotik basıncın yükselmesinin bitki su alımını zorlaştırmasından kaynaklanmıştır.

Yurtseven ve ark. biberde çimlenme ve fide oluşumu dönemleri ile sonraki bitki gelişme dönemlerindeki sulama suyu tuzluluklarının bazı verim parametrelerine üzerine olan etkilerini incelemiştir. Biberde çimlenme üzerine tuzluluk önemli bir etki oluşturmamıştır [23].

Grieve ve ark. tuzluluğun tohum üretimi ve gelişmeye olan etkilerini araştırmışlardır. Tuzlulukta birlikte tohum üretimi önemli bir şekilde azalma göstermiştir [23].

Tuzluluğun bitki gelişimi üzerine olan olumsuz etkilerinden bir diğeri de özel iyon etkisi olup bitkilerin temel bitki besin elementlerini dengeli bir biçimde alabilmelerini engellemektedir.

Tuzluluğun bitki gelişimi üzerine olan etkileri ile ilgili özet olarak şunlar söylenebilir.

1. İklim öğelerinden sıcaklık ve nemlilik tuzlulaşmayı etkilemektedir.
2. Sulama suyu kalitesi başlı başına toprak tuzluluğunu etkileyebilmektedir. Çünkü tuzlar büyük oranda toprağa sulama suları ile taşınmaktadır.
3. Toprak fiziksel özelliklerinden tekstür ve gözeneklilik, tuzlulaşma üzerinde etkilidir.
4. Yetiştirilecek bitki çeşidi, tuzluluğun belli düzeylerin altına düşürülemediği alanlarda, ekonomik düzeyde ürün elde edebilmek açısından önemli olmaktadır.
5. Drenajın yeterliliği tuzluluğun kontrolünde mutlak sağlanması gereken konulardan birisidir.
6. Tuzluluğun giderilemediği veya toprak ıslahının mümkün olmadığı durumlarda tuza dayanıklı bitkilerden yararlanılabilir [25].

1.2.6. Serbest Oksijen Radikaller (Oksidanlar)

Kimyasal bileşikler iki veya daha çok elementin aralarında kimyasal bağ oluşturması ile meydana gelir. Bu bağlar negatif yüklü elektronlarla sarılmıştır ve bu elektronların düzeni bileşiğe kararlılık sağlar. Kararlı bileşiklerin elektronları çiftlenmiş halde bulunur. Eğer elektron çiftlenmemiş ise molekül daha reaktif ve kararsız duruma geçer. Bir ya da daha fazla sayıda çiftlenmemiş elektrona sahip element veya bileşiklere “serbest oksijen radikaller” (SOR) denir.

Serbest radikallerdeki çiftlenmemiş elektronlar kararlı duruma geçmek ister ve kararlı halde bulunan bir bileşikten elektron alarak, bu bileşiği yeni bir radikal haline dönüştürür. Serbest radikallerin başlattığı bu zincirleme reaksiyonlar dizisi, antioksidanlar tarafından durduruluncaya kadar devam eder. Oksidasyon olayı aslında hayatın her evresinde yaşanmakta olan bir süreçtir. Günlük hayatımızda, örneğin kabuğu soyulan bir elmanın bir süre sonra kahverengileşmesini oksidasyon olayına bir örnek olarak verebiliriz. Canlılarda SOR’lar eksojen ve endojen, fizyolojik veya endojen patolojik mekanizmalar sonucu oluşabilir.

Moleküler oksijen, yaşam için vazgeçilmez bir molekül olmasına rağmen, yapısında bulunan iki tane eşleşmemiş elektronu olan biradikal bir molekül olup aynı zamanda canlılarda reaktif oksijen türlerinin oluşmasına neden olur. Reaktif oksijen türleri metabolizmaya zarar verebilecek bir dizi reaksiyonu başlatır ve bunlar canlı için aynı zamanda bir tehdit unsuru haline gelir.

Organizmada serbest radikaller gerek normal metabolik faaliyetlerin bir yan ürünü olarak, gerekse biyotik ve abiyotik stres faktörlerin etkisi ile oluşur. Metabolizma yan ürünleri olarak oksijen türevli serbest radikaller; süperoksit anyonu (O_2^-), singlet oksijen (1O_2), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikallerini (OH^-) içerir. Ayrıca NADPH oksidaz gibi bazı enzimler küçük miktarlarda Reaktif Oksijen Türleri (ROS) üretir. Hücre içi ROS'un %90'dan fazlası aerobik solunum reaksiyonları zincirinde mitokondriumun iç membranında üretilir [8, 9, 27, 28, 29]. İki tarafı keskin bir bıçak gibi kabul edilen ROS, düşük dozlarda çeşitli stres tepkimelerinde arabulucu gibi rol oynarken, yüksek dozlarda (oksidatif stres gibi) hücrel zararlara yol açar. Oksidan ve mutajen özellikte olan bu metabolizma yan ürünleri DNA, proteinler, lipidler ve diğer makro moleküllerde hasarlara hatta hücrenin ölümüne neden olur [27, 30].

1.2.6.1. Oksidanların Biyolojik Sistemler Üzerine Etkileri

Serbest oksijen radikalleri (süperoksit anyonu (O_2^-), singlet oksijen (1O_2), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikallerini (OH^-)) biyolojik sistemlerde birçok stres faktörleri sırasında oluşturulmakta ve membran yapısına, fotosentetik pigment, protein, lipid, karbonhidrat ve DNA gibi birçok makro moleküllere zarar vermektedir. Bitki hücrelerinde mitokondri, kloroplast ve peroksizomlar serbest oksijen radikallerini üreten intraselüler yapılardır [31].

1.2.6.2.1. Proteinlerde Meydana Gelen Hasarlar

Proteinlere yapılan oksidatif saldırılar spesifik amino asit modifikasyonlarına, peptit zincirlerinin parçalara ayrılmasına, çapraz bağ kurmuş ürünlerin kümeleşmesine, elektriksel yük değişimlerine, parçalanmalara duyarlılığın artmasına neden olur. Proteinlerin primer, sekonder ve tersiyer yapısı ve amino asitlerin çeşidi proteinlerin reaktif saldırılara karşı duyarlılığını değiştirir ve peptidin reaktivitesini etkiler. Özellikle kükürt içeren amino asitler ve tiol grupları oldukça duyarlı olanlardır.

Proteinlerin oksidatif olarak zarar görmesi durumu Fe^{+3} gibi redoks dönüşümü yapabilen metal kofaktörlerin varlığında artar. Böyle durumlarda metal, proteinin iki değerlikli katyonları bağlayan bölgesine bağlanır ve hidrojen peroksit ile reaksiyona girer. Reaksiyon sonunda hidroksil radikali meydana gelir ve bu radikalde amino asit dizilerini oksitler [22].

1.2.6.2.2. DNA’da Meydana Gelen Hasarlar

DNA diğer makromoleküllere nazaran oksidatif hasarlara karşı daha az toleransa sahiptir. Aktif oksijen türleri DNA’da mutasyona kadar birçok ölümcül etkinin oluşumunu tetikler. DNA’nın şeker ve bazları oksidasyona karşı oldukça hassastır ve oksidasyon, bazların degradasyonuna, tek zincirde kırılmalara ve proteinlere bağlanmalara sebep olur [22, 32].

1.2.6.2.3. Lipitlerde Meydana Gelen Hasarlar

Serbest oksijen radikalleri, hücrel membranlara lipit peroksidasyonu yoluyla zarar verir. Peroksidasyon reaksiyonları yağ asitlerinin açıl zincirindeki çift bağlarla serbest oksijen radikalleri arasında gerçekleşir [22].

Lipitlerin peroksidasyonu üç farklı adımda gerçekleşir. Bu aşamalar başlangıç, uzama ve sonlanma basamaklarıdır. Reaksiyonun başlama basamağı doymamış yağ asitleri ve hidroksil radikalleri arasında olur. Uzama basamağında ise ilk basamakta meydana gelen yapı triplet oksijenle reaksiyona girer ve ilerleyen reaksiyon basamaklarında lipit peroksitler oluşur. Bu reaksiyonlarda hidroksil radikallerinin rolü yangını başlatan kıvılcım gibidir. Lipit sistemlerinde hidroksil radikallerinin sıra dışı reaktivitesinin temelinde çok düşük konsantrasyonlarda bir zincir reaksiyonu başlatabilmesi yatar. Meydana gelen lipit peroksitler metal katalizleyicilerin varlığında oldukça kararsızdır. Membran lipitlerindeki peroksidasyon reaksiyonu radikal olmayan konjuge ürünleri meydana getirmek için karbon veya peroksi radikalleri ile çapraz bağ kurulduğunda sonlanır. Reaksiyon sonunda malondialdehit gibi aldehitler ve etan ve etilen gibi hidrokarbonlar lipit peroksidasyonunun son ürünleri olarak ortaya çıkar [33].

1.2.7. Antioksidan Savunma Sistemi

İnsanlarında içinde bulunduğu tüm aerobik canlılar oksidatif özellikteki bileşiklerin vereceği hasarlara karşı bir savunma sistemine sahiptir.

1.2.7.1. Enzimatik Olmayan Savunma Sistemi

Enzimatik olmayan savunma antioksidan maddeler olarak bilinen glutatyon, askorbat (vitamin C), tokoferol (vitamin E) ve flavonoidler, lignin, tanin gibi bileşikler tarafından yürütülür. Bir tripeptit olan glutatyon (γ -Glu- Cys-Gly, GSH) düşük moleküler ağırlığa sahip olup bir dokuda, hücrede ve hücrel kompartmanlarda bulunur. GSH en fazla kloroplastlarda bulunur, fakat önemli miktarlarda da sitozolde mevcuttur. GSH'nin antioksidan özelliği sisteminin sülfidril grubundan kaynaklanır. GSH ikinci bir GSH molekülü ile sülfidril grubundan bağlanarak bir disülfid bağı oluşturur ve ortaya okside glutatyon (GSSG) çıkar.

GSH kimyasal olarak singlet oksijen ile süperoksit ve hidroksil radikalleri ile reaksiyona girerek serbest radikalleri etkisizleştirmede doğrudan rol oynar. Ayrıca lipit peroksidasyonu sırasında açığa çıkan açıl peroksitleri uzaklaştırarak membran yapısının kararlılığına katkı sağlar [22, 32].

Askorbik asit (vitamin C) hayvan ve bitki dokularında bulunan önemli antioksidan bileşikler arasında yer alır. Askorbat indirgeyici olarak çalışarak oksidatif hasara karşı koruma sağlar. Ayrıca askorbat birçok reaksiyonda elektron vericisi olarak da rol oynar.

Hidrofobik doğasından ötürü α -tokoferol membranda yer alır ve iyi bir membran stabilizasyonu sağlar. Serbest yağ asitleri ile kompleks oluşturabilme özelliklerinden dolayı da membranda deterjan gibi davranarak lipit tabakasının dağılmasına ve membran agregasyonuna neden olabilir [33].

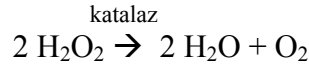
1.2.7.2. Enzimatik Savunma Sistemi

1.2.7.2.1. Katalaz (EC 1. 11. 1. 6)

Hidrojen peroksit (H_2O_2) reaktif bir oksijen türü olup hücreler tarafından yağ asitlerinin peroksizomlarda β -oksidasyonu, fotorespirasyon ve pürin katabolizması gibi normal aerobik reaksiyonlarda oluşturulur ve farklı konsantrasyon seviyelerinde mitojenik

büyümeden apoptosise kadar bir çok hücrel cevap mekanizmasında etkinlik gösterir. Katalaz çeşitli streslere karşı geliştirilen cevap mekanizmalarındandır. Ayrıca patojenlerin öldürülmesinde de savunma sistemi hücreleri tarafından üretilir. Yüksek konsantrasyonlardaki H₂O₂ hücrelere zarar verir ve hücrelerde birikimi protein, lipid ve DNA gibi hücrel hedeflerin oksidasyonuna yol açar. Bu durum ise mutasyonların oluşmasına ve/veya hücre ölümüne yol açar. Bu sebeple H₂O₂'nin hücreden uzaklaştırılması oksidatif hasardan korunmak için önemlidir [34] ve bu görevde katalaz tarafından yürütülür.

Hidroperoksidaz olarak da isimlendirilen katalaz bir sitokrom sistemine sahip tüm aerobik canlılarda bulunan ve H₂O₂'in su ve oksijene parçalanmasını katalizleyen özel bir proteindir.

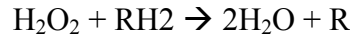


Hidrojen peroksitin (H₂O₂) bu şekilde uzaklaştırılması sayesinde daha reaktif olan hidroksil radikallerinin oluşumu önlenmiş olur. Bu reaktif oksijen türlerinin uzaklaştırılması aerobik ortamda yaşamayı kolaylaştırır.

Aktif oksijen türlerine karşı etkili olmasından dolayı, çoğu aerobik organizma üç temel enzim sınıfından birine ait katalaz enzimine sahiptir. Bu enzim sınıflarından en geniş olanına ait katalaz enzimi tipik tek fonksiyonlu özellikte olup hem-gurubu içerir ve 60 kDa veya 80 kDa alt ünitelere sahiptir. İkinci en geniş guruba üye katalazlar ise katalaz-peroksidaz şeklinde iki fonksiyona sahip hem-gurubu içerirler, ancak sekans olarak bitki ve fungus peroksidazlarına benzerlik gösterirler. Üçüncü gurup ise en küçük gurubu oluşturur. Bu gurubun üyesi katalazlar ise hem-gurubu içermezler veya Mn içerirler.

Küçük alt üniteye sahip tek işlevli katalaz enzimi tüm ökaryot ve prokaryotlarda bulunmasına rağmen arkealarda tespit edilememiştir [35]. İnsanlarda katalaza en çok karaciğerde, böbrekte ve eritrositlerde rastlanmıştır. Ökaryotik katalazlar NADPH'a bağlı olarak bulunurlar. Bu durum onların daha kararlı yapıda kalmasını sağlar ve normal katalitik döngü dışında ikinci tip bileşiklerin oluşmasını önler [36]. Büyük alt üniteye sahip katalaza ise fungus ve bakterilerde rastlanmıştır. İki fonksiyonlu katalaz-peroksidaz aktivitesi gösteren guruba ise prokaryotlarda ve arkealarda rastlanmıştır.

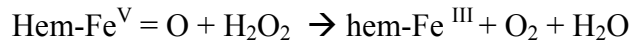
Hem-gurubu içermeyen katalaza ise yalnızca bakterilerde rastlanmıştır. Katalaz ve peroksidaz enzimlerinin her ikisi de H₂O₂'i parçalar. Ancak katalaz hem elektron alıcısı hem de elektron vericisi olarak H₂O₂ kullanırken, peroksidazlar ise H₂O₂'i indirgemek için organik bir substurata (RH₂) gereksinim duyarlar.



H₂O₂'in parçalanmasını sağlayan reaksiyon iki aşamada gerçekleşir. İlk aşamada H₂O₂, suya ve oksiferil türlerine (bileşik I) ayrılır.



Bileşik I bir diğer H₂O₂ molekülü ile reaksiyona girer ve sonuçta su ve moleküler oksijen meydana gelir [37].



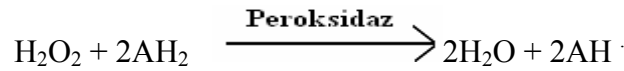
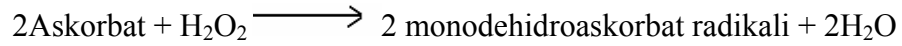
1.2.7.2.2. Süperoksit Dismütaz (EC 1. 15. 1. 1)

Aktif oksijen türleri yüksek reaktif özelliklerinden dolayı herhangi bir koruma mekanizması olmadığı takdirde hücre duvarının yapısına ve fonksiyonlarına zarar verir [38]. Süperoksit dismütaz (SOD), ilk defa McCord ve Fridovitch tarafından izole edilmiştir ve yüksek derecede reaktif olan aktif oksijen türlerinden süperoksit anyon radikallerini (O₂⁻) katalizleyerek organizmalara oksijen varlığında hayatta kalma imkanını veren bir enzimdir. Bu reaksiyon oksijen metabolize eden tüm organizmalarda ve bazı anaerobik canlılarda gerçekleşir ve sonucunda moleküler oksijen (O₂) ve hidrojen peroksit (H₂O₂) açığa çıkar. Bu katalitik mekanizma metal iyonunun ardışık oksidasyon ve redüksiyonuna dayanır. SOD prostetik gurup olarak demir, manganez veya bakır + çinkoyu taşıyan bir metalloproteindir. Bu metal iyonları süperoksit radikallerinin enzim aktif bölgesine elektrostatik olarak yönlendirilmesini sağlar. Bu enzim genelde aktif oksijen oluşturan hücre kompartmanlarında bulunur. Cu-Zn içeren SOD birçok ökaryotik canlıdan izole edilmiştir. Ayrıca şaşırtıcı şekilde birkaç bakteride de rastlanmıştır. Mn-SOD prokaryotlarda ve ökaryotların mitekondrilerinde tespit edilmiştir. Fe-SOD ise birkaç prokaryotik organizmada bulunmuştur [39].

Prokaryotik Mn-SOD ve Fe-SOD ve ökaryotik Cu/Zn-SOD enzimleri dimer yapıdadır. Mitekondrilerdeki Mn-SOD ise tetramerik yapıdadır. SOD'un tüm formları çekirdek tarafından kodlanır ve amino ucunun işaretlenmesi ile de gideceği hücre kompartmanı belirlenir [37].

1.2.7.2.3. Askorbat Peroksidaz (EC 1. 11. 1. 11)

Askorbat peroksidaz hem peroksidaz enzim ailesinin bir üyesi olup mayadan insana kadar pek çok canlıda bulunur. Askorbat peroksidaz hidrojen peroksida bağlı olarak farklı substratları katalizler. Fakat enzimin fizyolojik substratı askorbattır (vitamin C). Askorbatın dışında bazı aromatik substratların (AH₂) da oksidasyonunu katalizler.



Askorbata bağlı askorbat peroksidaz aktivitesi ilk olarak 1979 yılında bulundu. Bu enzim sınıf I peroksidaz enzim ailesine ait olup bitkilerde, alglerde ve sadece siyanobakterilerde hidrojen peroksida bağlı askorbat oksidasyon reaksiyonunu katalizler [40].

Fizyolojik koşullar altında reaksiyonun ara ürünü monodehidroaskorbat radikali olup başka bir enzimce tekrar askorbata indirgenir. Askorbat peroksidaz sitozolde, kloroplastlarda, peroksizomlarda bulunur [13]. Bütün askorbat peroksidaz enzimleri elektron vericisi olarak askorbata yüksek özgülük gösterir. Fakat enzimin fizyolojik koşullarda bulunmayan substratları da okside etme yeteneği de vardır [41].

1.2.7.2.4. Glutasyon Redüktaz (EC 1. 6. 4. 2)

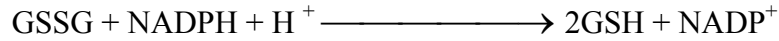
Glutasyon redüktaz, okside glutasyonun (GSSG) glutatyona (GSH) indirgenmesini katalizleyen bir enzimdir. Glutasyon redüktaz redoks döngüsünde önemli bir enzim olup, indirgenmiş hücresel GSH'ın hücrede yeterli seviyede kalmasını sağlar. GSH antioksidan olarak görev yapar ve serbest radikal ve organik peroksitlerle reaksiyona girer, amino asit taşınımında görev alır, organik peroksitlerin detoksifiyesinde ve

zenobiyotiklerin metabolizmasında görevli glutatyon peroksidaz ve glutatyon S-transferaz enzimlerinin substratıdır.

Bu homodimerik enzim flavoprotein disülfid oksidoredüktaz enzim ailesinin bir üyesidir. Her bir alt ünite dört domaine sahiptir. Bunlar N-ucundan başlayarak: FAD bağlanma domaini, NADPH bağlayan domain, merkezi bir domain ve bir ara domain. Enzimin aktif bölgesi dimerik yüzde yer alır. GSSG bağlayan enzim bölgesi her iki alt ünitenin residülerinden oluşsa da sadece dimerik form aktiftir.

Okside glutatyonun indirgenmesi çok aşamalı bir reaksiyondur. Başlangıç olarak enzim NAHPH tarafından indirgenir. İndirgenmiş glutatyon redüktaz GSSG molekülü ile reaksiyona girer ve bu reaksiyon bir disülfid değişimi ile sonuçlanır. Sonuçta GSH molekülü ve GR_{red} – SG kompleksi ortaya çıkar. GR_{red} – SG kompleksinde ikinci bir disülfid değişimi ile sonuçlanan bir elektron düzenlemesi gerçekleşir. İkinci GSH molekülünün enzimden ayrılması ile enzim tekrar okside forma dönüşür [42].

Glutatyon Redüktaz

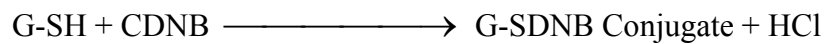


Glutatyon redüktaz hayvanlarda, bitkilerde ve bakterilerde bulunur. Bu enzim askorbat-glutatyon reaksiyon yolunda görevli önemli bir enzimdir. Bu sistem sayesinde memeliler hemoglobin ve diğer proteinlerini peroksidlerin verebileceği zarardan korur. Endojen veya ekzojen nitrik oksit uygulaması GSH oluşumunu azalttığı için hücresel dengeyi bozar. Bir stres meydana gelir ve enzimin inhibisyonu gerçekleşir. Glutatyon redüktaz mitekondrilerde ve peroksizomlarda bulunmuştur [43].

1.2.7.2.5. Glutatyon S-Transferaz (2. 5. 1. 18)

Glutatyon S-transferaz bir enzim ailesi olup çeşitli bileşiklerle indirgenmiş glutatyon arasında konjugasyonu sağlar. Bu reaksiyon sonunda aktif olamayan, suda çözünebilir, daha az zararlı ürünler ortaya çıkar.

GST



Bilinen tüm sitozolik GST enzimleri homodimer veya heterodimer yapıda olup alt ünitelerinin moleküler ağırlığı 23–29 kDa arasında değişir [44].

GST canlılarda geniş bir dağılım gösterir. Aerobik organizmaları oksidatif hasarlardan ve elektrofilik saldırılardan korur. GST mutajenlerin, karsinojenlerin ve diğer toksik maddelerin etkisizleştirilmesinde görevlidir. GST aktivitesinin bitkilerde, böceklerde, mayalarda, bakterilerde ve özellikle karaciğer olmak üzere çoğu memeli dokularında bulunduğu ve detoksifikasyonda anahtar rol oynadığı bilinmektedir. Memelilerde GST'nin biyofonksiyonelliği ve sekans benzerlikleri dikkate alınarak α , κ , μ , ω , π , σ , ξ , θ sınıflarına ayrılmıştır [45].

Çevresel stres faktörlerince oluşumu tetiklenen reaktif oksijen türlerine karşı GST'ler hücre membranını, DNA'yı ve proteinleri korur. Memelilerde lökosit ve diğer fagositik hücrelerin mikropları yok etme çalışmaları sırasında kullandıkları nitrojen oksit, süperoksit hipoklorit ve hidrojen peroksit gibi kimyasal bileşikler aynı zamanda DNA'nın oksidatif hasarına sebep olabilir. Benzer bir savunma sistemine bitkilerde de rastlanmıştır. GST ise tüm bu bileşiklerin zararlarına karşı koruma sağlar [44].

Biyolojik sistemlerde oksidanların zararlı etkilerine karşı korumada antioksidan savunma sistemi görev yapmaktadır. Bu sistem yalnızca hücre içi kompartımanlarla sınırlı değildir. Ayrıca apoplastlarda da bulunurlar. Antioksidanlar; katalaz-CAT, süperoksit dismutaz-SOD, glutathione peroksidaz-GP, glutathione redüktaz-GR, askorbat peroksidaz-APX, sitokrom-C-oksidadz, makro ve mikromoleküllerdir [13].

1.2.7.3. Antioksidanlar

Normal büyüme koşullarında çeşitli metabolik faaliyetler sonucu ortaya çıkan serbest radikallere karşı vücutta doğal bir savunma mekanizması vardır. Bu savunma mekanizmasını oluşturan bileşiklere 'antioksidanlar' denir [9,46]. Antioksidanlar doğal antioksidanlar ve ilaç olmak üzere iki grupta toplanabilir.

Doğal antioksidanlar arasında enzimler (süperoksit dismutaz-SOD,katalaz-CAT, glutathione peroksidaz-GP, glutathione redüktaz-GR, askorbat peroksidaz-APOX, sitokrom-C-oksidadz, hidroksiperoksidaz), makromoleküller (seruloplazmin, transferin, ferritin, myoglobin, haptoglobilin), ve mikromoleküller (β -karoten, A-vitamini, C-

vitamini, E-vitamini, tokoferol, tiol içerenler, glutatione (GSH), N-asetil sistein, metionin, kaptopril, ubiguinon) sayılabilir [47, 27]. Askorbat, glutation ve tokoferol oksijenli hücrelerde; karotenoidler fotosentetik sistemde ve antioksidan sistem hücrenin tüm bölümlerinde toksik oksijen türlerine karşı savunmada önemli role sahiptir. [46].

Antioksidanlar dört yolla oksidanları etkisiz hale getirir.

1. **Süpürme Etkisi (Scavenging):** Oksidanları daha zayıf yeni bir moleküle dönüştürerek etkisizleştirir. Antioksidan enzimler ve mikro moleküller bu yolla etki eder.
2. **Söndürme Etkisi (Quenching):** Oksidantlara bir hidrojen aktararak inaktive etmesine denir. Vitaminler, flavanoidler, timetazidin ve mannitol bu şekilde etki eder.
3. **Zincir Reaksiyonlarını Kırma Etkisi (Chain Breaking):** Hemoglobn, serüloplazmin ve ağır mineraller oksidanları kendilerine bağlar ve inaktive eder.
4. **Onarma Etkisi (Repair):** Oksidatif hasar görmüş biyomolekülleri onarırlar.

Düzgün çalışan bir metabolizmada mitokondriyel sitokrom sistemi, sitozoldeki organelleri oksidanların zararlı etkilerinden korur. Bu sistemin yetersiz kaldığı durumlarda doğal enzimler devreye girer. Enzimlerce etkisiz hale getirilemeyen oksidanlar ilk olarak hücre membranındaki lipidleri etkileyerek ‘lipid peroksidasyonu’nu başlatır. Lipid peroksidasyonu, membranlarda bulunan çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) serbest oksijen radikalleri tarafından peroksitler, alkoller, aldehytler gibi çeşitli ürünlere yıkılması reaksiyonudur ve sonuçta ortaya çıkan biyo-aktif aldehytler hücre hasarına neden olur. Lipid peroksidasyonu sırasında yeterli düzeyde Vit-E ve Vit-C gibi antioksidan vitaminlerin bulunması halinde bu tip hücresel hasarların önüne geçilir [48].

1.2.8. Çalışmanın Amacı

Bu çalışma, *Triticum aestivum* çeşitlerinin tuz ve kuraklık streslerine direçli *Triticum aestivum* L. (cv. Bayraktar) ve duyarlı *Triticum aestivum* L. (cv. Atay) varyetelerinin stres göstergesi olan prolin ve MDA birikiminin saptanması, antioksidan enzimler düzeyinde verdiği yanıtın moleküler seviyede belirlenmesi amaçlanmıştır. Tuz ve su streslerinin veya bu stresleri geriye döndürme kullanılan yarışmacı (compatatör)

moleküller varlığında büyütülen buğdaylarda antioksidant enzimlerin kompozisyon içeriklerindeki değişimleri ve antioksidant enzim aktivitelerinin farklılaştığını dirençli ve duyarlı buğday varyetelerinde belirlemektir.

2. BÖLÜM

MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Bitki Materyali

Bu çalışmada T.C Tarım Orman Bakanlığı Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsünden temin edilen kuraklık ve tuz stresine dirençli ve duyarlı iki farklı buğday çeşidi [*Triticum aestivum* L. (cv. Bayraktar), *Triticum aestivum* L. (cv. Atay)] kullanılmıştır.

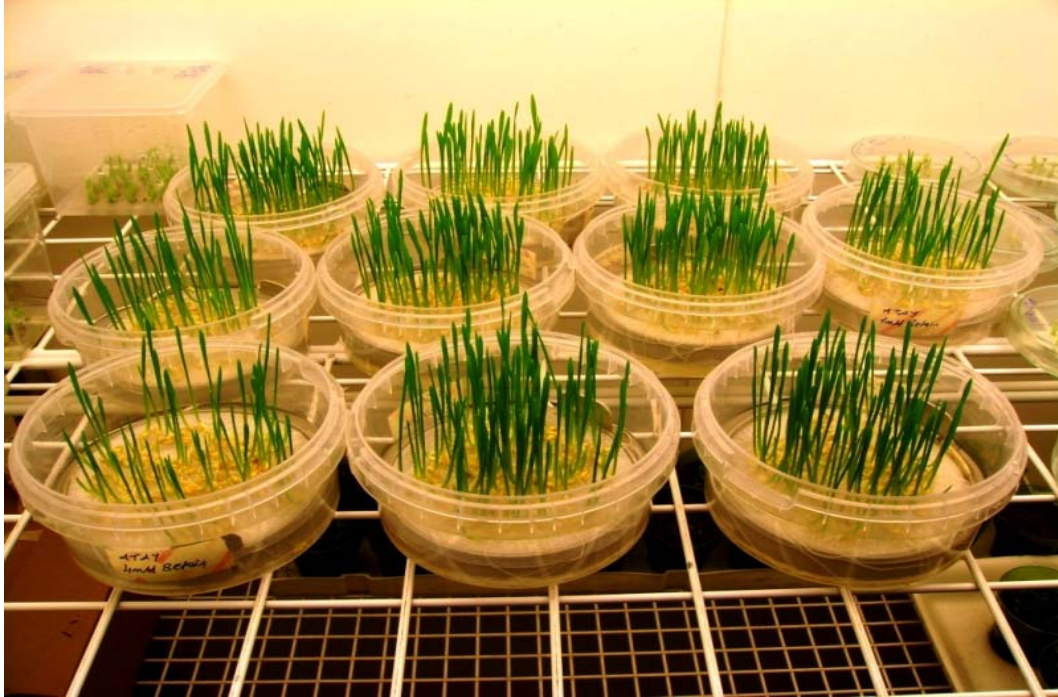
2.2. Yöntem

2.2.1. Bitki Yetiştirme ve Stres Uygulamaları

Dirençli *Triticum aestivum* L. (cv. Bayraktar) ve duyarlı *Triticum aestivum* L. (cv. Atay) buğday tohumları deney koşullarına uygun gruplara ayrılarak bitki yetiştirme kabininde Hoagland çözeltisinde (Ek 1) %60 nem ve 23 °C de 3 gün petri kapları içerisinde karanlık ortamda çimlendirilmiştir. Çimlenmiş fideler 3 gün boyunca Hoagland çözeltisinde boyları 5–7 cm oluncaya kadar büyütülmüştür. Çimlendirmede kullanılan düzenek Şekil 2.1 de gösterilmektedir. Stres uygulamalarında 200 mM NaCl (tuz) ve %18 PEG (kuraklık) çözeltileri kullanılmıştır (Tablo 2.1). Kontrol ve stres uygulaması 5 gün süresince (her gün 11 cm çapında ve 7 cm yüksekliğinde plastik kaplar içerisindeki solüsyon tamamen yenisiyle değiştirilerek) uygulanmıştır ve 5. gün sonunda örnekler petri kaplarından kesilerek sıvı azot şoklaması ile dondurulup -20 °C de gerekli çalışmalara kadar saklanmıştır. Büyüme esnasında fidelere stres etkisini iyileştirdiği bilinen 1mM glycine betaine ve trehaloz (trehalose) uygulaması stres öncesi yapılmıştır.

Tablo 2.1. Çalışmada kullanılan deneysel parametreler.

| Duyarlı Çeşit Seti | Dirençli Çeşit Seti |
|--------------------|------------------------|
| Atay-Kontrol | Bayraktar-Kontrol |
| Atay-Betain | Bayraktar-Betain |
| Atay-Tuz | Bayraktar-Tuz |
| Atay-Tuz-Betain | Bayraktar-Tuz-Betain |
| Atay-Peg | Bayraktar-Peg |
| Atay-Peg-Betain | Bayraktar-Peg-Betain |
| Atay-Kontrol | Batraktar-Kontrol |
| Atay-Trehaloz | Bayraktar-Trehaloz |
| Atay-Tuz | Bayraktar-Tuz |
| Atay-Tuz-Trehaloz | Bayraktar-Tuz-Trehaloz |
| Atay-Peg | Bayraktar-Peg |
| Atay-Peg-Trehaloz | Bayraktar-Peg-Trehaloz |



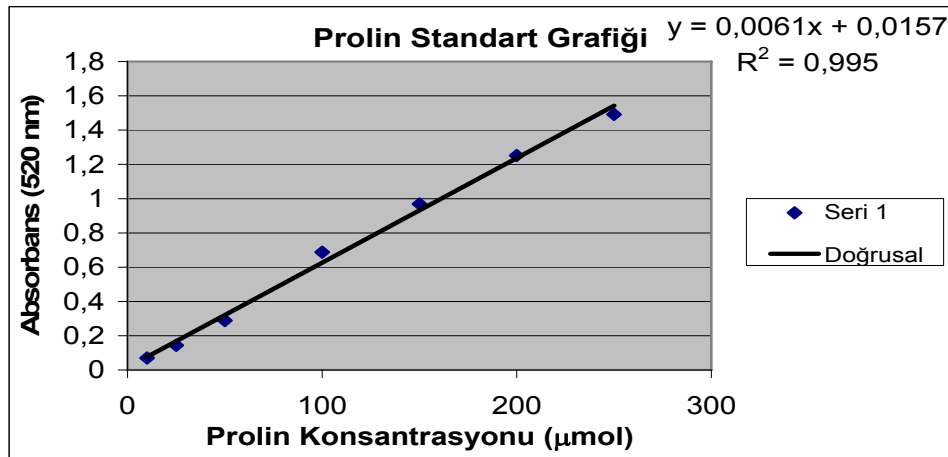
Şekil 2.1. Bitki yetiştirme çemberinde çimlendirme kasnaklarının kullanımı ve stres uygulamaları sonucu büyüyen bitkiler.

2.2.2. Prolin Miktarının Tayini

Kontrol grubu ya da strese maruz bırakılan uygulamalardan sulfosalisilik asitle ekstraksiyon yapılarak prolin miktarı Bates ve ark., (1973) geliştirdiği yöntemle tayin edilmiştir. Kasnak sistemi üzerinde yetişen örnekler kesilerek sıvı azot şoklaması ile

dondurulmuş ve -20°C de muhafaza edilmiş ya da hemen kullanılmıştır. 250 mg taze veya sıvı azotta dondurulmuş örnek %3 lük sülfosalisilik asit çözeltisi ile havan yardımı ile ezilmiştir. Homojenizasyon işlemi; önce bitki dokusu 1 mL %3 lük sülfosalisilik asit çözeltisi ile havanda ezilmiş ve bu homojenatın üzerine 4 mL daha eklenerek toplam 5 mL'e tamamlanmıştır. Homojenat pastör pipeti yardımı ile santrifüj tüplerine aktarılmıştır. 5000 g'de oda sıcaklığında 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatanttan 2 mL alınıp 13 x 160 mm'lik vida kapaklı tüpe aktarılmıştır. Bunun üzerine 2 mL Glasiyal Asetik asit eklenip vorteks ile karıştırılmış ve daha sonra 2 mL asetik asit-fosforik asit ninhidrin çözeltisi eklenip ve tekrar karıştırılmıştır. Hot-plate üzerinde kaynamaya bırakılmış ve kaynama başlayınca zaman başlatılıp 1 saat süresince bu koşullarda bekletilmiştir. Süre sonunda tüpler çeşme suyu ile ani soğutmaya bırakılmıştır. Soğutulmuş örneklerin üzerine 4 mL toluen eklenip emülsiyon oluşuncaya kadar vortekslenmiştir. Dinlenmeye bırakılan tüplerde oluşan renkli toluen fazı pastör pipeti yardımıyla alınarak cam veya quartz küvette OD_{520} de okunmuştur. Kör (blank) olarak bitki örneği hariç tüm işlemler aynen takip edilmiştir. Standart kalibrasyon eğrisinin oluşturulması için ticari saflaştırılmış prolin %3 lük sülfosalisilik asit çözeltisi ile aynen bitki örnekleri gibi muamele edilmiş ve 0.01 ila 1.125 mM aralığında seri dilüsyon (seyreltme) oluşturularak standart eğri çizilmiştir (Şekil 2.2). Yaş ve kuru örneklerde bulunan prolin miktarı bu eğriden yararlanarak dilüsyon miktarlarında göz önüne alınarak hesaplanmıştır (y =örneklerin abs). Buna göre formül aşağıdaki gibidir:

$$x=(y-0,0157)/(0,0061)$$



Şekil 2.2. Prolin hesaplamasında kullanılan standart eğrisi ve formülü.

2.3. Antioksidan Aktivitesi

2.3.1. Membran Lipid Peroksidasyonunun Belirlenmesi

Lipid peroksidasyonu, Madhava ve Sresty (2000)'nin thiobarbutirik asit metoduna göre (TBA) ölçülmüştür. Buna göre 0.5 gr taze veya sıvı azotta dondurulmuş örnekler % 10'luk trikloroasetik asit (TCA) çözeltisi ile havan yardımıyla ezilmiştir. Homojenize edilmiş bitki örnekleri 12000 g 'de 25 °C' de çeşitli sürelerde santrifüj edilerek, her 1 mL örneğe % 0.5 thiobarbutirik asit içeren, %20 TCA ilave edilmiştir. Karışımlar 95 °C' de, 30 dakika ısıtılmış, tekrar santrifüj edilmiş ve supernatantları alınarak 600 nm'de okunan değerden 532 nm deki değerden çıkartılarak nonspesifik türbidite değerlendirilmez MDA içeriği $155\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ekstinksiyon sabiti kullanılarak hesaplanmıştır.

2.4. Enzim Aktiviteleri İçin Protein Örneklerinin Hazırlanması

Stres uygulanmış ve kontrol bitkilerden elde edilen taze bitki dokuları enzim analizi için kullanılmıştır. Taze dokular hasat edilir edilmez, sıvı azot içerisinde dondurulmuş ve enzim deneyi için kullanılmaya kadar -20 °C de muhafaza edilmiştir. 1 gram taze doku 3 mL 1mM EDTA ve %2 PVP içeren 0.05 M Na-fosfat tamponu (pH=6.8) içerisinde proteaz inhibitörleri bulunan [1 mM Phenylmethanesulphonyl Fuloride (PMSF) ve 284 μM N α -P-Tosyl-L-Phenylalanine Ketone (TPCK)] tamponda sıvı azot ile havanlarda tamamen homojenize edilmiştir. Askorbat peroksidaz enziminin ekstraksiyonu için 50 mM Tris-HCl (pH 7.8), 0,3 M mannitol, 1 mM EDTa,% 0.1 BSA, % 0.05 sistein içeren tampon kullanılmıştır. Homojenatlar 15 000 g de, 4 °C de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant protein miktarının belirlenmesi ve enzim deneyleri için temiz ependorf tüplere alınmıştır. Örnekler hemen çalışılmak üzere buza alındı veya sonraki çalışmalar için -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

2.5. Protein Miktarının Belirlenmesi

Örneklerin protein konsantrasyonu Bradford yöntemine göre belirlenmiştir. Protein miktarının belirlenmesinden önce 5X Bradford ayırıcı 1:5 oranında distile su (dH₂O) ile seyreltilmiş ve Whatman # 1 numaralı filtre kağıdı ile filtre edilmiştir. Bradford ayırıcı hazırlanışı ise kısaca; 500 mg Comassie Brilliant Blue G 250 (Amresco), 250 mL % 96

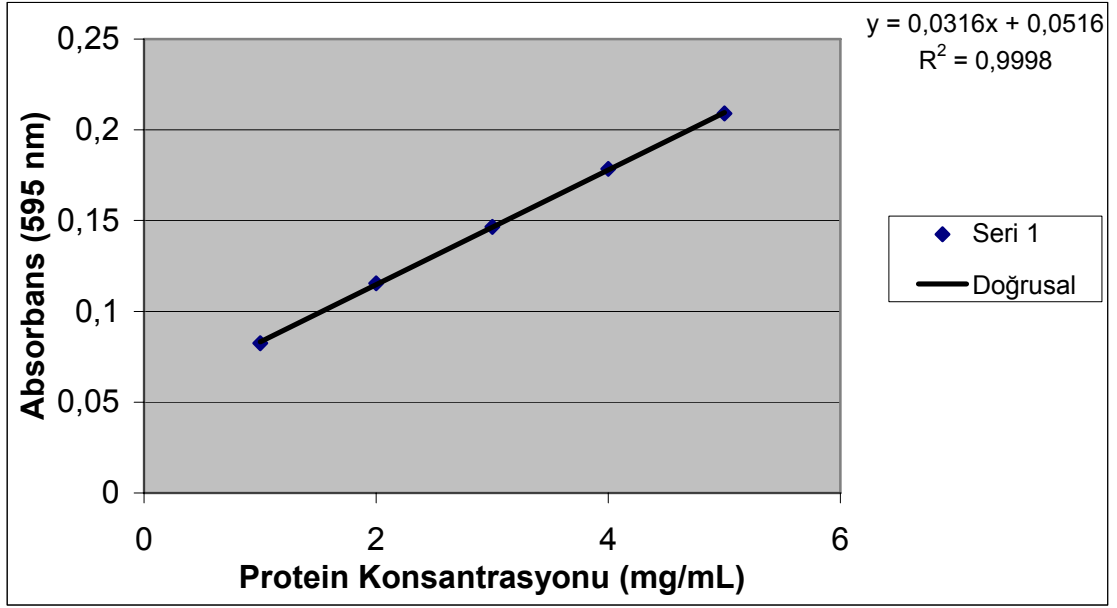
etanol içinde iyice çözülmüş, daha sonra 500 mL % 85 orto-fosforik asit ilave edilmiş ve son hacim distile su (dH₂O) ile 1 litreye tamamlanmıştır.

Protein konsantrasyonunun tespiti için sığır serum albümini (BSA) Fraksiyon V (Sigma) kullanılarak standart serisi oluşturulmuştur. 1 mg/mL BSA stoğundan 5, 10, 15, 20, 25 µL alınarak hazırlanan cam tüplere aktarılmış ve son hacimleri 500 µL olacak şekilde distile su ile tamamlanmıştır. Tüplerin üzerine son hacim 5 mL olacak şekilde 1X Bradford ayırıcı eklenmiştir.

Örneklerin protein konsantrasyonlarının tespiti için 4 °C' de buzlu suda tutulan her örnekten 5 µL protein ekstraktı alınıp cam tüplere aktarılmış ve yine son hacim 500 µL' ye distile su ile tamamlanarak seyreltilmiştir (seyreltme katsayısı 100). Bu aşamalardan sonra 1:5 oranında dilüe edilmiş 1X Bradford ayırıcından 5 mL karışıma ilave edilmiştir. Oda sıcaklığında yaklaşık 10-15 dakika bekletilmiştir. 595 nm' deki absorbans değerleri belirlenmiştir. Absorbans okumalarında cam küvet kullanılmıştır. Standartlara ait absorbans değerleri kullanılarak bir grafik elde edilmiştir (Şekil 2. 1). Grafikten elde edilen denklem yardımı ile de protein konsantrasyonu bilinmeyen örneklerin konsantrasyonları formülden tespit edilmiştir. Denklemde x eğim, y ise örneklerin Bradford sonucu ölçülen absorbans değerlerini temsil etmektedir. Hesaplamaya dilüsyon faktörü olarak 100 katsayısı da dahil edilmiştir.

Tablo 2.1. Bradford Standartlarının Hazırlanması.

| Standartlar | 1 mg/mL stok BSA (µL) | dH ₂ O (µL) | 1X Bradford Ayırıcı (mL) |
|-------------|-----------------------|------------------------|--------------------------|
| Kör | 0 | 500 | 5 |
| 0,01 mg/mL | 5 | 495 | 5 |
| 0,02 mg/mL | 10 | 490 | 5 |
| 0,03 mg/mL | 15 | 485 | 5 |
| 0,04 mg/mL | 20 | 480 | 5 |
| 0,05 mg/mL | 25 | 475 | 5 |



Şekil 2.1. BSA standartlarından elde edilen grafik.

Kontrol ve ağır metal uygulama örneklerinde protein konsantrasyonları tespit edildikten sonra tüm örneklerin ortak bir konsantrasyon değerinde olması için ezme tamponuyla gereken seyreltme yapılmıştır. Ayarlamaları yapılan örnekler yeterli küçük hacimlere (aliquatlara) ayrılarak enzim çalışmalarında kullanılmış veya sonraki çalışmalar için -80°C ' de saklanmıştır.

2.6. Enzim Aktivitelerinin Tayini

Bütün enzim ekstraktları enzim çalışmaları süresince $0-4^{\circ}\text{C}$ ' de buzlu suda tutulmuştur. Ayrıca ışığın olumsuz etkisi olabileceği ihtimali de göz önünde tutularak tüm örnekler mümkün olduğunca ışıktan korunmaya çalışılmıştır.

2.6.1. Süperoksit Dismütaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Süperoksit dismütaz aktivitesi tayininde modifiye yöntem kullanılmıştır [46]. Reaksiyon karışımı 20 mM sodyum fosfat pH 7.5, 0.1 mM EDTA, 10 mM metionin, 0.1 mM p-Nitro Blue Tetrazolium (NBT), 0.005 mM riboflavin içerecek şekilde hazırlanmıştır. NBT metanol içinde, riboflavin ise 0.1 N NaOH içinde 8 mg/mL olacak şekilde çözülerek stoklar hazırlanmıştır. NBT' nin ve riboflavinin ışıktan olumsuz

etkilenebilecekleri ihtimali göz önünde bulundurularak solüsyon ışık geçirmeyen (amber) şişelere hazırlanmış ve bu iki kimyasal karışıma en son ilave edilmiştir.

SOD ölçümünde tek dalga boyu kullanıldığı için, hata payını en aza indirmek amacıyla örnekler ikişerli gruplar (dublike) şeklinde çalışılmıştır. Cam tüplere öncelikle 50 µg/mL olacak şekilde enzim örneklerinden ilave edilmiş ve son hacim 3 mL olacak şekilde tüplerin üzerine reaksiyon karışımı ilave edilmiştir ve vortekslenmiştir. Ağızları bir tıpa yardımı ile kapatılan tüpler 15 dakika süre ile 300 µmol m⁻² s⁻¹ ışığa maruz bırakılmıştır. Işıklandırma bitki büyütme çemberi kullanılarak yapılmıştır. Sürenin tamamlanmasının ardından örneklerin absorbans değerleri 560 nm’ de spektrofotometrede okunmuş ve % inhibisyon hesaplaması için kaydedilmiştir. Kör olarak ışık muamelesi yapılmamış reaksiyon karışımı kullanılmıştır. Örnek uygulamalarına ilaveten enzim ekstraktı içermeyen, yalnız reaksiyon karışımı içeren iki tüpte örneklerle birlikte ışık uyarısına maruz bırakılmıştır.

Örneklerdeki SOD konsantrasyonlarının belirlenmesi için SOD standartları hazırlanmıştır. Standartların hazırlanmasında sığır eritrositlerinden elde edilmiş SOD 4470 U/mg (Sigma) kullanılmıştır. Bu enzimden 0.01 mg/mL bir ara stok hazırlanmıştır. Standartların hazırlanması Tablo 2.’ de belirtildiği gibi yapılmıştır.

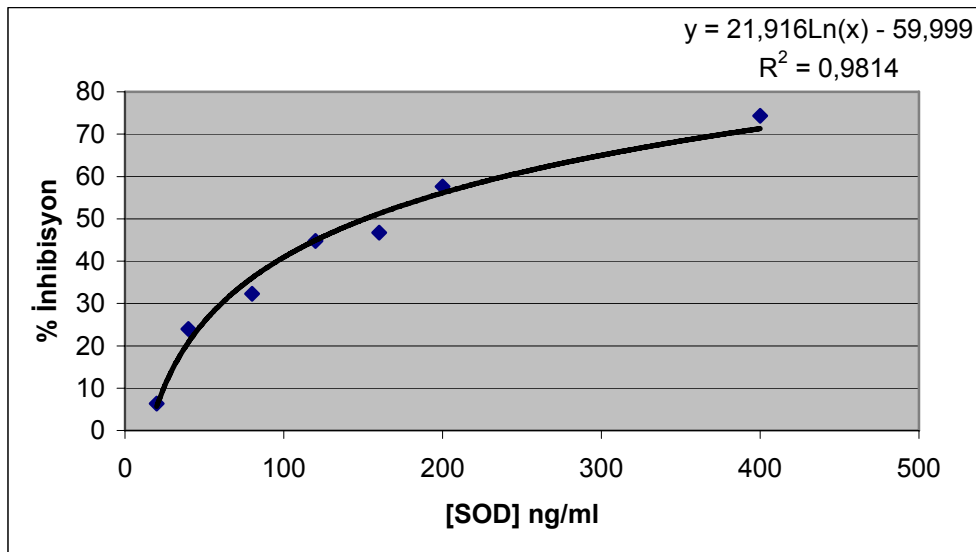
Tablo 2.2. SOD standartlarının hazırlanması.

| standartlar | 10 mM sodyum fosfat pH 7.5 (µL) | 0,01 mg/mL SOD stoğu (µL) | Reaksiyon karışımı (mL) |
|-------------|---------------------------------|---------------------------|-------------------------|
| Kör | 500 | – | 2,5 |
| 20 ng/mL | 499 | 1 | 2,5 |
| 40 ng/mL | 498 | 2 | 2,5 |
| 80 ng/mL | 496 | 4 | 2,5 |
| 120 ng/mL | 494 | 6 | 2,5 |
| 160 ng/mL | 492 | 8 | 2,5 |
| 200 ng/mL | 490 | 10 | 2,5 |
| 400 ng/mL | 482 | 20 | 2,5 |
| ışık | 500 | – | 2,5 |

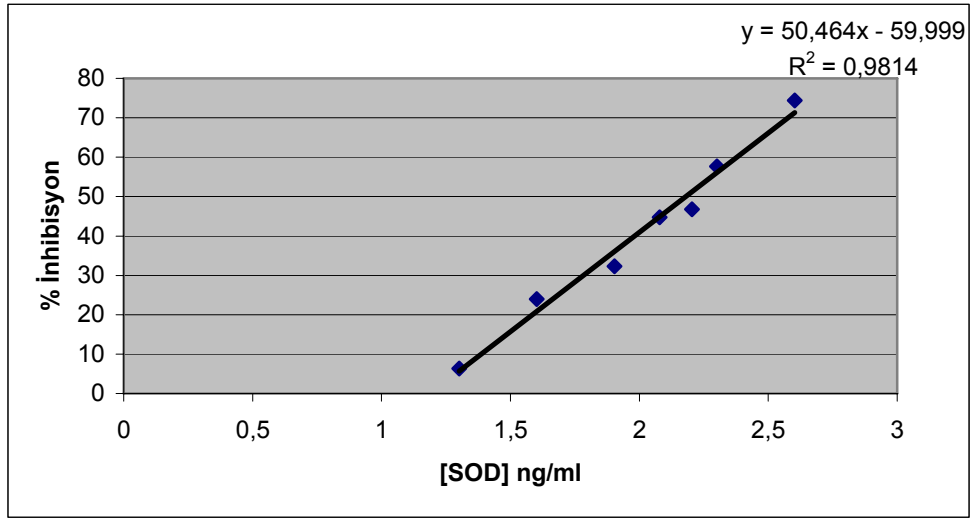
Örnek uygulamasında olduğu gibi standartların bulunduğu tüplerde 15 dakika boyunca ışığa tabi tutulmuştur. Standartlara ait absorbans değerleri yine 560 nm' de spektrofotometrede okunmuştur. Tüm absorbans okumaları cam veya plastik küvette yapılmıştır. Standartların absorbans değerleri kaydedilmiş ve % inhibisyon değerlerini hesaplama da kullanılmıştır. Hesaplama aşağıdaki formüle göre yapılmıştır.

$$\% \text{ inhibisyon} = (\text{Işık Kont. Abs.} - \text{Örneğin Absorbansı}) \times 100 / \text{ışık kont. absorbansı}$$

% inhibisyona karşılık enzim konsantrasyonlarından logaritmik bir grafik elde edilmiştir (Şekil 2. 2). Grafikte kullanılan standart SOD enzim konsantrasyonlarının logaritmaları alınarak ve % inhibisyon değerleri ise aynen kullanılarak yeni bir doğrusal denklem çizilmiştir (Şekil 2. 3). Grafikten elde edilen formül kullanılarak SOD konsantrasyonları bilinmeyen uygulamaların enzim konsantrasyonları belirlenmiştir. Formülde y değeri % inhibisyonu, x ise SOD konsantrasyonunu ng/mL cinsinden belirtmektedir. Bir SOD ünitesi ise % 50 inhibisyon sağlayan enzim miktarı olarak tanımlandığı için konsantrasyon değerleri üniteye çevrilmiştir. Bu dönüşümde de % 50 inhibisyona karşılık gelen SOD konsantrasyonu doğrusal grafikten elde edilen formül yardımı ile belirlenmiş ve bu değer örnek konsantrasyonlarının üniteye çevrilmesinde kullanılmıştır.



Şekil 2.2. SOD Standartlarından elde edilen logaritmik grafik.



Şekil 2.3. Doğrusal standart SOD grafiği.

2.6.2. Katalaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Katalaz aktivitesinin belirlenmesinde modifiye edilen yöntem kullanılmıştır [47]. Aktivite tayin ortamında ise 20 mM sodyum fosfat pH 7.5, 15 mM H₂O₂ (Fluka %3' lük H₂O₂) ve 40 µg/mL olacak şekilde örnek ekstraktı kullanılmıştır. Daha konsantre kullanılarak gerekli konsantrasyon ayarlamaları çalışılan uygun küvet içinde yapılmıştır. Küvet içinde çalışılan reaksiyon hacmi 1 mL olarak belirlenmiştir. Kör olarak da yalnız tampon kullanılmıştır. Her defasında örnekler küvete yüklenmeden önce iyice vortekslenmiştir. Reaksiyon H₂O₂ ilavesi ile başlatılmış ve 240 nm dalga boyunda 3 dakika boyunca absorbans değerindeki düşüş gözlenmiştir. Absorbans okumaları quartz küvette yapılmıştır. Reaksiyonun başlangıç ve bitiş anındaki absorbans değerleri kaydedilip aktivite hesaplamalarında kullanılmıştır. Hesaplama formülü olarak $\Delta\text{Abs}/\text{dk} = \varepsilon \times c \times l$ kullanılmıştır. Buradaki l çalışılan küvete ait ışık yolunun uzunluğudur ve l' e eşittir. c ise küvette çalışan enzimin konsantrasyonudur. ε değeri ise parçalanma katsayısı olup katalaz için 40 mM⁻¹ cm⁻¹ 'dir. Formülle yapılan hesaplamadan elde edilen değer kullanılarak da katalaza ait spesifik aktivite değerleri elde edilmiştir. Spesifik aktivitenin (SA) birimi µmol/mL/dakika = ünite/mg cinsinden elde edilmiştir. Katalaz için kullanılan formülün son hali ise şu şekilde olmuştur.

$$SA = \frac{\Delta\text{Abs}/\text{dk}}{\varepsilon \times l} \times 1000 \mu\text{g} / 7.5 \mu\text{g}/\text{mL}$$

2.6.3. Askorbat Peroksidaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Askorbat Peroksidaz aktivitesinin belirlenmesinde 50 mM potasyum fosfat pH 6.6, 0.25 mM askorbat ve 1 mM H₂O₂ (Fluka %3' lük H₂O₂) reaksiyon karışımı kullanılmıştır. Askorbat stoğu 10 mM olarak belirlenmiş ve tartılan miktar distile suda çözülerek stok hazırlanmıştır. Reaksiyonu başlatmak için küvete 100 µg/mL olacak şekilde enzim ekstraktı ilave edilmiştir. Reaksiyon hacmi 1 mL olarak belirlenmiştir. Kör olarak yalnız tampon kullanılmıştır. Askorbat ve H₂O₂ ışıktan etkilendikleri için stok hazırlamakta amber şişeler kullanılmıştır. Reaksiyon 290 nm' de 3 dakika boyunca quartz küvet ile spektrofotometrede okunmuştur. Reaksiyonun başlangıç ve bitiş absorbans değerleri kaydedilmiştir. Askorbata ait ϵ değeri 2.8 mM⁻¹ cm⁻¹ dir. SA hesaplamasında aşağıdaki formül kullanılmıştır.

$$SA = \frac{\Delta Abs / dk}{\epsilon \times l} \times 1000 \mu g / 100 \mu g / mL$$

2.6.4. Glutasyon Redüktaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Bu enzimin aktivite okuması yönteminin modifiye edilmesine göre yapılmıştır [44]. Aktivite ortamı olarak 100 mM sodyum fosfat pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.1 mM NADPH, 1 mM GSSG içeren tampon kullanılmıştır. 2.5 mM NADPH stoğu ve 20 mM GSSG stoğunun her ikisi de distile suda çözülerek hazırlanmıştır. Reaksiyon ortamında konsantrasyon ayarlaması yapılmıştır. Küvetin son hacmi 1 mL olacak şekilde çalışılmıştır. Fosfat tamponu ve EDTA kör olarak okunmuştur. Okumalarda quartz küvet kullanılmıştır. Reaksiyon 50 µg/mL enzim örneğinin ilave edilmesi ile başlatıldı ve 5 dakika boyunca 340 nm' de spektrofotometrede okunmuştur. Başlangıç ve bitiş absorbans değerleri kullanılarak enzime ait SA hesaplamaları yapılmıştır. GSSG için ϵ değeri 6.2 mM⁻¹ cm⁻¹, dir. SA hesaplamasında şu formül kullanılmıştır.

$$SA = \frac{\Delta Abs / dk}{\epsilon \times l} \times 1000 \mu g / 20 \mu g / mL$$

2.6.5. Glutasyon S-Transferaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Glutasyon S-Transferaz aktivite ölçümü buğday için optimize edilen değerlere göre yapılmıştır [47]. Reaksiyon ortamı olarak 100 mM potasyum fosfat (pH 6.5), 1 mM EDTA, 1 mM CDNB (1-Kloro 2.4-Dinitro Benzen), 2 mM GSH kullanılmıştır. CDNB ve GSH için 20 mM'lık stoklar hazırlanmıştır. Uygun miktarlarda tartılan GSH stoku distile su yardımı ile çözüldü ve örneklerle birlikte 4 °C' de tutulmuştur. CDNB için ise tartılan miktar ilk önce 1.8 mL etanolda iyice çözülmüştür. Ardından üzerine 1.2 mL distile su ilave edilmiş ve stok hazırlanması tamamlanmıştır. Tüm absorbans okumaları quartz küvette yapılmıştır. Kör olarak tampon ve EDTA kullanılmıştır. 1 mL küvet hacmi ile çalışılmıştır. GSH'ın enzimatik olmayan parçalanması söz konusu olmuşturğundan ve bu durumun aktivite hesaplamalarını yanıltması ihtimali oluşturduğu için bu etkinin ortadan kaldırılması adına enzim dışında tüm bileşikleri içeren küvet 5 dakika boyunca bekletilmiştir. Enzimsiz beklenen bu zamanın ardından küvete 50 µg/mL protein örnek ilave edilerek reaksiyon başlatılmış ve 340 nm' de 5 dakika boyunca takip edilmiştir. Sürenin başlangıcında ve bitişindeki örneklerin absorbans değerleri kaydedilmiştir ve SA hesaplamalarında kullanılmıştır. CDNB için ϵ değeri $9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ dir. Hesaplamalarda aşağıdaki formül kullanılmıştır.

$$SA = \frac{\Delta \text{Abs} / \text{dk}}{\epsilon \times l} \times 1000 \mu\text{g} / 50 \mu\text{g} / \text{mL}$$

2.6.6. Verilerin Analizi

Tüm uygulamalar birbirinden bağımsız olarak yetiştirilen üç set üzerinden yürütülmüştür. Her sete ait çalışmalar kendi içinde üç kez tekrarlandı. Elde edilen sonuçların istatistiksel analizi %95 güven aralığında tek-yönlü ANOVA testine göre yapılmıştır.

3. BÖLÜM

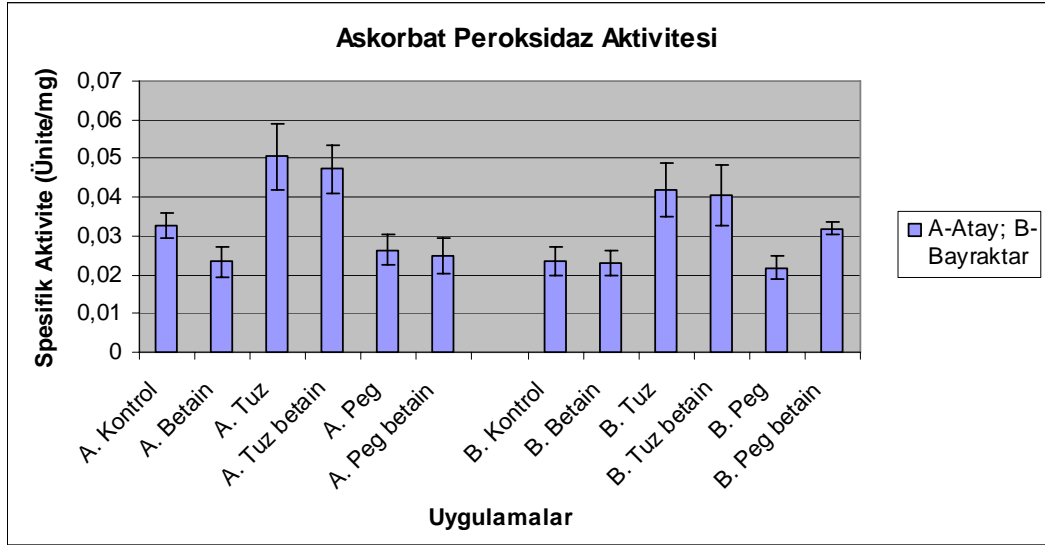
BULGULAR

3.1. Bitki Çeşitleri ve Stres Faktörlerinin Etkisi

Bu çalışmada kuraklık ve tuz stresine dirençli *Triticum aestivum* L. (cv. Bayraktar) ve duyarlı *Triticum aestivum* L. (cv. Atay) kullanılmıştır. Uygulamalar sonucunda stres faktörlerinin fidelerde antioksidan maddelerin birikimine ve antioksidan enzimlerin değişimine neden olduğu gözlenmiştir.

3.2.1. Stres ve Glycine-betain Uygulamasında Askorbat Peroksidaz'a Ait Bulgular

Kuraklık ve tuz stresi uygulanan duyarlı (Atay) ve dirençli (Bayraktar) *Triticum aestivum* çeşitleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, askorbat peroksidaz aktivitesinin tuzlu koşullarda arttığı, kuraklık (PEG) koşullarında ise azaldığı görülmüştür (Şekil 3.1). Bu sonuçların %95 güven aralığında yapılan ANOVA testinde anlamlı farkların olduğu tespit edilmiştir ($P < 0.05$). Her iki buğday çeşidinde ve tüm gruplar arasında en fazla artışın A.-tuz uygulamasında en düşük seviyenin ise B.-PEG uygulamasında olduğu görülmüştür. Kontrol grubu ile kıyaslandığında her iki kültür için kontrol-betain ve PEG gruplarında aktivitenin daha az olduğu, tuz ve tuz-betain uygulamalarında ise aktivitenin arttığı belirlenmiştir. PEG-betain uygulaması için duyarlı kültürde aktivite daha düşük olarak tespit edilirken, dirençli kültürde daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Tuz ve tuz-betain uygulamalarında her iki çeşit için tuz-betain grubunun daha düşük aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir. PEG ve PEG-betain uygulamasında duyarlı kültür için PEG-betain sonuçları daha düşük bir aktivite göstermişken, aktivitenin dirençli kültürde daha yüksek olduğu görülmüştür.



Şekil 3.1. Stres ve glycine-betain uygulamalarında APX aktivite seviyesi.

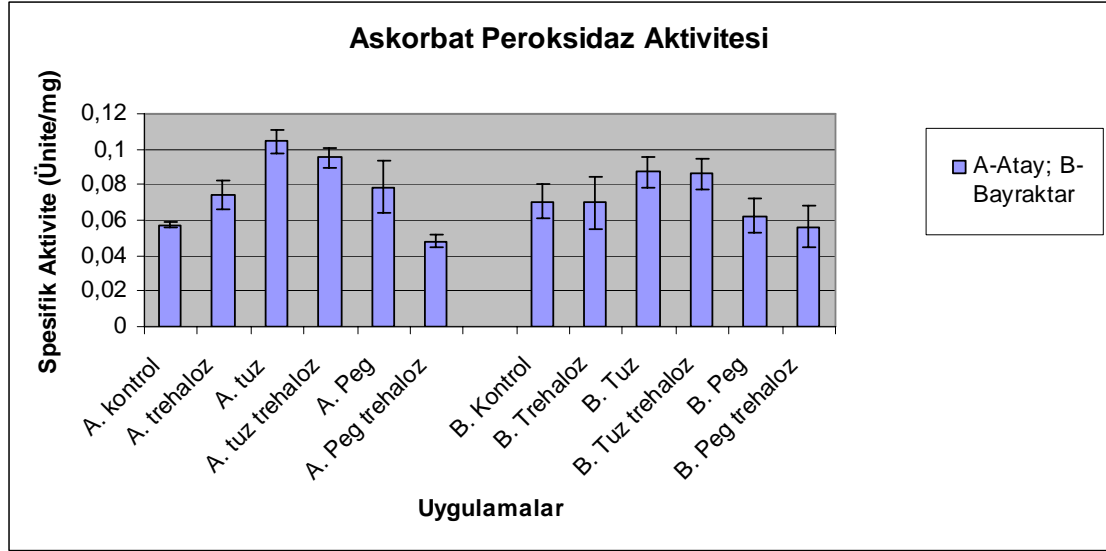
Her iki kültür var kıyaslandığında APX aktivitesi duyarlı kültür varda daha yüksek olmuştur.

İstatiksel olarak ANOVA testine göre duyarlı kültür varda kontrol-betain ile tuz uygulaması arasında anlamlı farklılıklar gözlenmiş ($P < 0.05$), fakat dirençli kültür varda istatistiksel olarak önemli bir fark gözlenmemiştir.

3.2.2. Stres ve Trehaloz Uygulamasında Askorbat Peroksidaz'a Ait Bulgular

Kuraklık ve tuz stresi uygulamalarında stres duyarlı ve dirençli her iki kültür var içinde en yüksek askorbat peroksidaz aktivitesinin tuz ve tuz-trehaloz uygulamalarında olduğu görülmüştür (Şekil 3.2). Kontrol grupları ile karşılaştırıldığında duyarlı kültür var için kontrol-trehaloz uygulamasında aktivite artarken, dirençli kültür varda önemli bir fark oluşmamıştır. PEG uygulaması için duyarlı atay kültür varında kontrole göre daha yüksek bir aktivite belirlenmiş, dirençli bayraktar çeşidinde aktivite daha düşük olduğu tespit edilmiştir. PEG-trehaloz için ise her iki kültür varda kontrole kıyasla daha düşük enzim ifadesi gözlenmiştir. Stres ve stresin etkisini iyileştirdiği düşünülen trehaloz uygulamaları karşılaştırmalarında trehalozun enzimin aktivitesini düşürdüğü görülmüştür. En düşük aktivitenin ise PEG-trehaloz uygulamalarında olduğu tespit

edilmiştir. Genel olarak duyarlı kültürde enzim aktivitesinin daha yüksek olduğu görülmüştür.

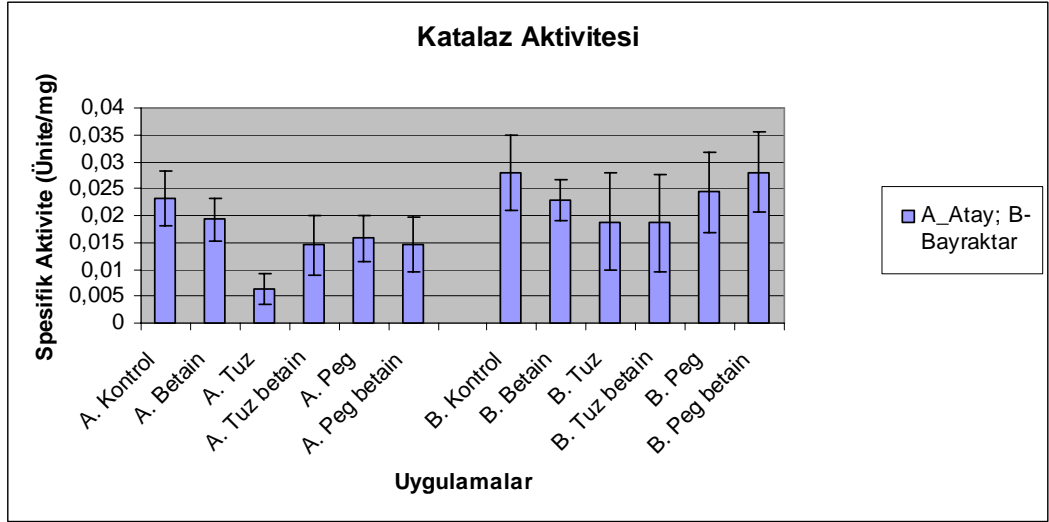


Şekil 3.2. Stres ve trehaloz uygulamalarında APX aktivite seviyesi.

ANOVA testi ile yapılan analize göre duyarlı ve dirençli çeşitleri arasındaki enzim aktivitesi ile duyarlı kültürde kontrol ile tuz uygulaması arasındaki farkın önemli olduğu görülmüştür ($P < 0.05$). Diğer uygulamalar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı belirlenmiştir.

3.3.1. Stres ve Glycine-betain Uygulamasında Katalaz'a Ait Bulgular

Katalaz ile ilgili yapılan çalışmada genel olarak dirençli kültürdeki enzim aktivitesinin duyarlı kültüvare göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. En yüksek aktivitenin dirençli bayraktar çeşidine ait kontrol ve PEG-betain uygulamalarında ve en düşük aktivitenin ise duyarlı atay çeşidine ait tuz uygulamasında olduğu görülmüştür (Şekil 3.3). Kontrole kıyasla dirençli kültürde PEG-betain uygulaması hariç her iki kültürde de tüm uygulamalarda düşük aktivite değerleri gözlenmiştir. Sadece betain uygulamasının kontrol grupları ve dirençli çeşitte PEG ve PEG-betain uygulaması dışında her iki çeşit içinde yüksek bir aktivite gösterdiği belirlenmiştir. En düşük aktivitenin ise genel olarak tuz ve tuz-betain uygulamalarında olduğu görülmüştür.

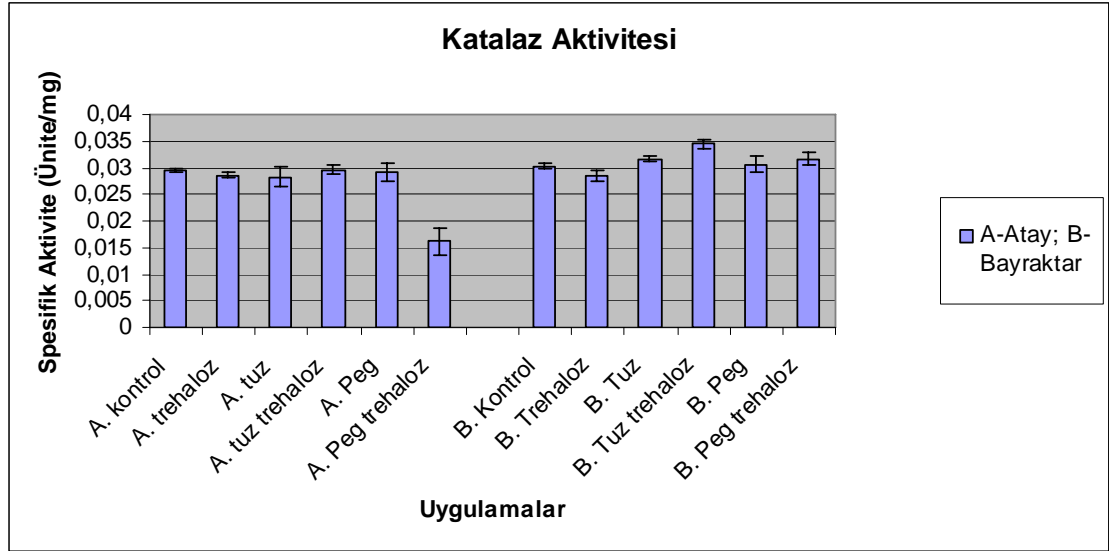


Şekil 3.3. Stres ve glycine-betain uygulamalarında CAT aktivite seviyesi.

Tüm uygulamalar için ANOVA testine göre önemli bir farkın oluşmadığı tespit edilmiştir.

3.3.2. Stres ve Trehaloz Uygulamasında Katalaz'a Ait Bulgular

Stresin neden olduğu enzim aktivitesi değişim sonuçlarına göre kontrol ile karşılaştırıldığında uygulamalarda en düşük aktivitenin duyarlı Atay çeşitinde PEG-trehaloz uygulamasında ve en yüksek aktivitenin de dirençli Bayraktar çeşitinde tuz-trehaloz uygulamasında olduğu görülmüştür (Şekil 3.4). Duyarlı ve dirençli kültürlerin kontrol grupları ve kontrol-trehaloz arasında fark oluşmadığı görülmüştür. Uygulamalar arasında dirençli kültürde daha yüksek bir aktivite gözlenmiştir. Stres uygulamaları ile birlikte verilen trehalozun enzimin aktivitesini düşürmesi beklenirken bu sonucun sadece A.-PEG trehaloz uygulamasında ortaya çıktığı tespit edilmiştir. Genel olarak dirençli kültürde daha yüksek CAT aktivitesi gözlenmiştir.

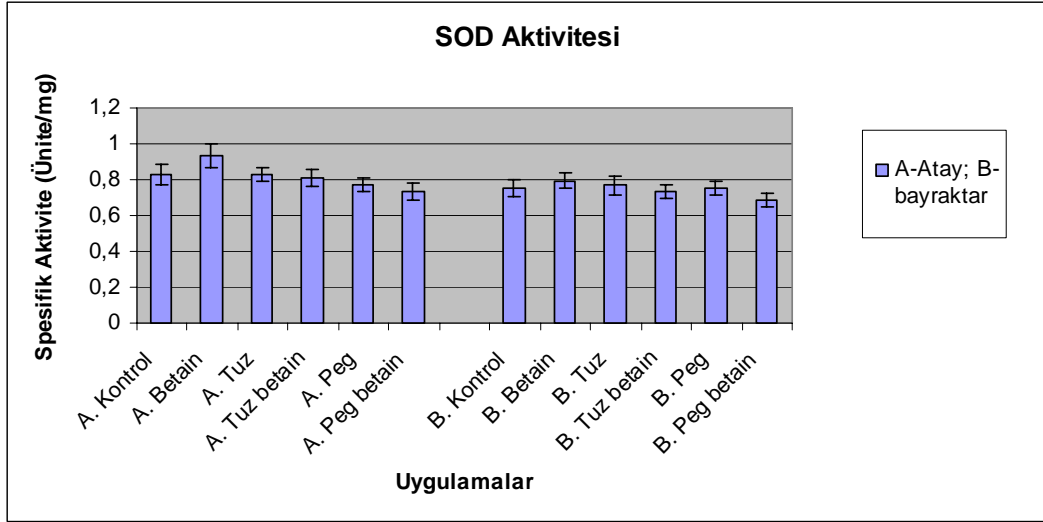


Şekil 3.4. Stres ve trehaloz uygulamalarında CAT aktivite seviyesi.

Her iki kültür için yapılan ANOVA analizine göre çeşitlerin kendi içinde ve birbirleriyle karşılaştırılmalarında anlamlı farklılıkların olduğu belirlenmiştir. Ayrıca B.-kontrol, B.-tuz-trehaloz, B.-trehaloz, B.-tuz-trehaloz ve A.-kontrol ile Atay'a ait diğer uygulamalar arasındaki istatistiksel farkın önemli olduğu görülmüştür ($P < 0.05$).

3.4.1. Stres ve Glycine-betain Uygulamasında SOD'a Ait Bulgular

Kontrolle karşılaştırıldığında strese bağlı en yüksek SOD aktivitesinin kontrol-betain uygulamasında ortaya çıkmıştır. Stres faktörlerinin enzimin aktivitesinde bir artışa neden olmadığı belirlenmiştir. Kontrolle birlikte betain uygulamasını aktiviteyi artırdığı ancak strese birlikte betain uygulamalarının enzimin ifadesini düşürdüğü görülmüştür (Şekil 3.5). Duyarlı Atay kültürü için tuz stresinin kuraklık, stresine göre aktiviteyi artırdığı, dirençli Bayraktar kültüründe ise önemli bir fark oluşturmadığı tespit edilmiştir. Her uygulama kendi aralarında değerlendirildiğinde duyarlı çeşitte daha yüksek bir SOD aktivitesi belirlenmiştir. En düşük aktivite her iki çeşit içinde PEG-betain uygulamasında olduğu gözlenmiştir.

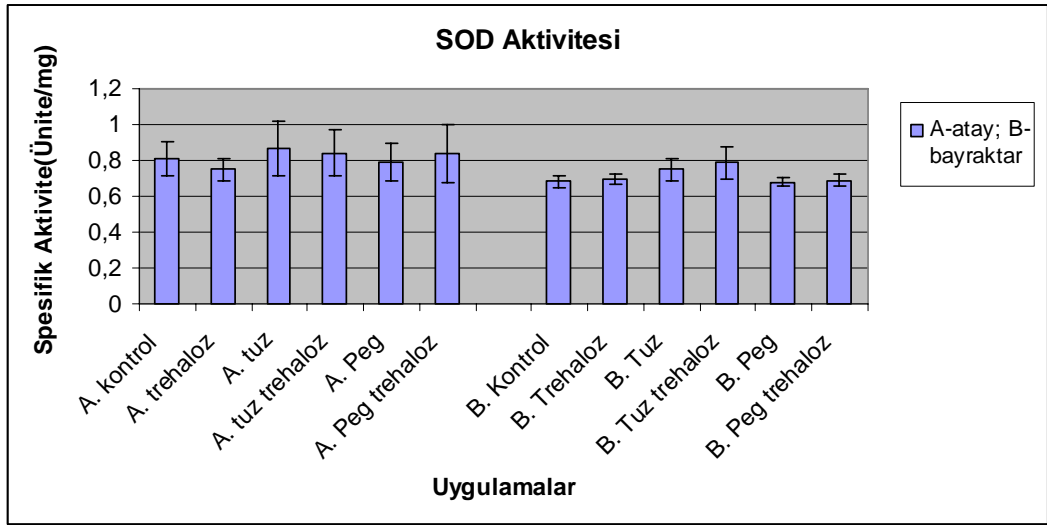


Şekil 3.5. Stres ve glycine-betain uygulamalarında SOD aktivite seviyesi.

Her iki kültür için uygulamaların kendi içlerinde kıyaslamasının ve duyarlı kültür ile dirençli kültürün uygulamaları arasında istatistiksel olarak ANOVA testine göre anlamlı farklılıkların oluşmadığı görülmüştür.

3.4.2. Stres ve Trehaloz Uygulamasında SOD'a Ait Bulgular

Kontrole kıyasla tuz stresinin enzimin ifadesini artırdığı ancak kuraklık stresinin değiştirmedığı tespit edilmiştir. Her iki kültürde SOD aktivitesi tuz stresinde kontrole göre daha yüksek olduğu gözlenirken, kuraklık stresinin kontrole yakın değerlerde olduğu görülmüştür (Şekil 3.6). Tuz-trehaloz uygulamasının tuz ile kıyaslanmasında duyarlı Atay çeşitinde daha düşük olduğu, Bayraktar çeşitinde ise daha yüksek olduğu ortaya çıkmıştır. PEG-trehaloz setinin PEG ile karşılaştırılmasında duyarlı kültürde aktivite artarken, dirençli kültürde değişmediği görülmüştür. Kontrole birlikte trehaloz uygulamasının enzimin aktivitesini duyarlı kültürde düşürdüğü fakat dirençli kültürde değiştirmedığı gözlenmiştir. Uygulamalar için en yüksek SOD aktivitesinin A.-tuz uygulamasında olduğu tespit edilmiştir.

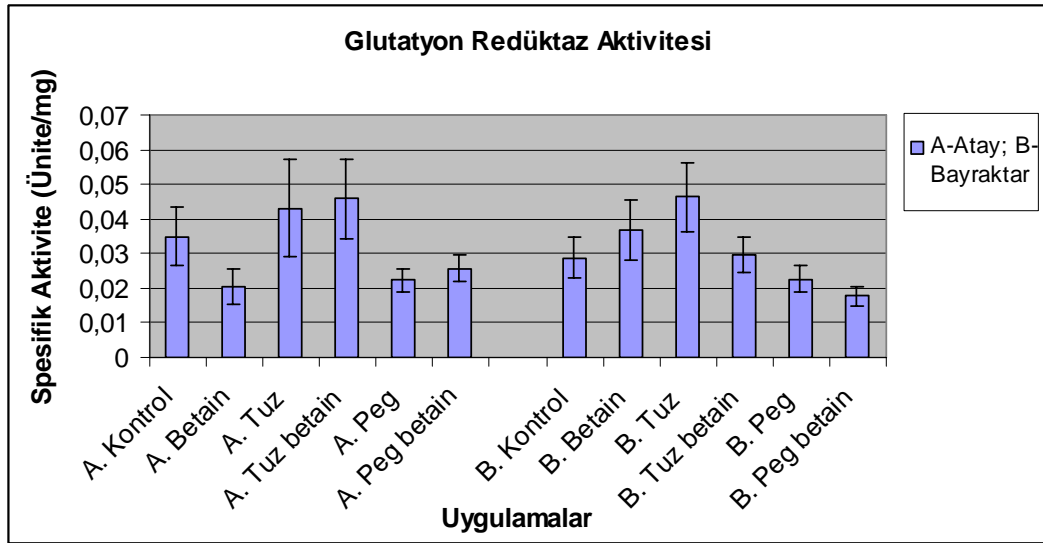


Şekil 3.6. Stres ve trehaloz uygulamalarında SOD aktivite seviyesi.

İstatiksel olarak ANOVA testine göre uygulamaların kendi içlerinde ve Atay-Bayraktar karşılaştırılmasının önemli olmadığı belirlenmiştir.

3.4.1. Stres ve Glycine-betain Uygulamasında Glutasyon Redüktaz'a Ait Bulgular

Stres faktörleri nedeniyle ortaya çıkan glutasyon redüktaz aktivitesi kontrolle kıyaslandığında her iki çeşit içinde en yüksek aktivitenin tuz stresinde meydana geldiği, kuraklık uygulamalarında ise enzim aktivitesinde düşüş olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.7). Tuz stresi ile birlikte betain uygulaması duyarlı kültürde aktivite artışına neden olmuş, dirençli kültürde aktiviteyi azaltıcı yönde etki etmiştir. PEG ve PEG-betain uygulamalarında her iki çeşit içinde düşük enzim aktivitesi görülmüştür. Duyarlı Atay kültüründe en yüksek aktivite tuz-betain uygulamasında, dirençli kültürde tuz uygulamasında olduğu ortaya çıkmıştır. En düşük aktiviteler ise Atay için kontrol-betain, Bayraktar için PEG-betain uygulamalarında gözlenmiştir. Dirençli kültür için stres koşulları ile betain uygulamasının enzimin aktivitesini düşürdüğü tespit edilmiş, duyarlı kültür için aktiviteyi artırdığı belirlenmiştir. Kontrol-betain uygulamasının duyarlı kültürde aktiviteyi düşürdüğü, dirençli kültürde aktiviteyi artırdığı görülmüştür. Tuz stresinde duyarlı çeşitte dirençli çeşite göre daha yüksek aktivite gözlenmiştir. Fakat kuraklık stresinde çeşitler arasında fark oluşmadığı tespit edilmiştir.

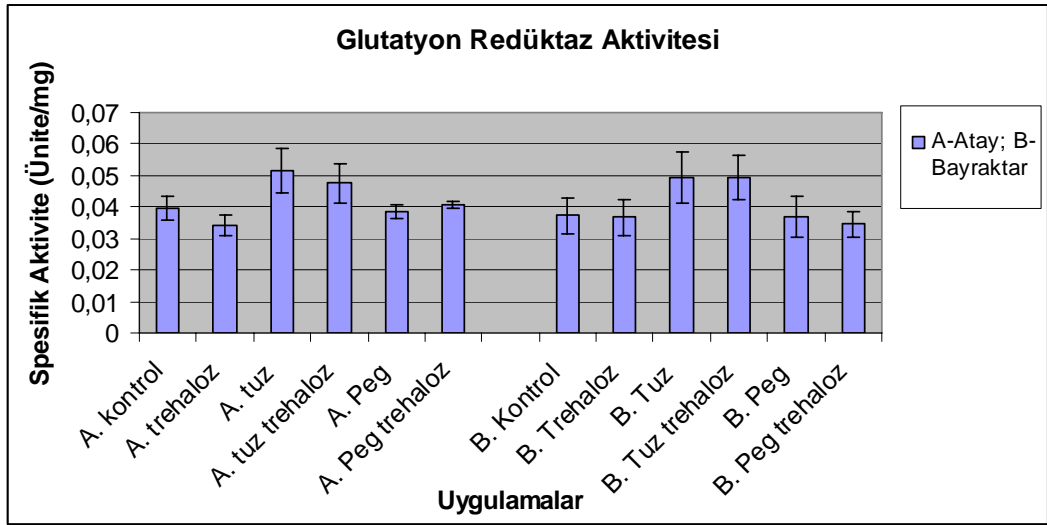


Şekil 3.7. Stres ve glycine-betain uygulamalarında SOD aktivite seviyesi.

ANOVA testi ile yapılan istatistiksel analizde dirençli Bayraktar kültürü için anlamlı sonuçlar elde edilmişken ($P < 0.05$, Tukey), duyarlı Atay kültürü için istatistiksel olarak önemli farklılıklar ortaya çıkmamıştır. Ayrıca duyarlı ve dirençli kültürlerin karşılaştırılmasından anlamlı sonuçlara ulaşılmamıştır.

3.4.2. Stres ve Trehaloz Uygulamasında Glutasyon Redüktaz'a Ait Bulgular

Stres faktörleri nedeniyle glutasyon redüktaz (GR) aktivitesi kontrole göre tuz stresi uygulamalarında daha yüksek görülmüş, kuraklık stresinde her iki çeşit içinde önemli bir fark oluşmadığı belirlenmiştir (Şekil 3.8). Kontrol-betain uygulamasında duyarlı kültürde aktivite daha düşük olup dirençli kültürde değişmemiştir. Tuz ve tuz-betain uygulamalarından A.-tuz-betain uygulamasında enzim seviyesi düşük olarak tespit edilmiş, dirençli kültürde fark gözlenmiştir. Atay çeşidinde PEG uygulamasında aktivite daha düşükken, dirençli çeşitte PEG-betain uygulaması daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Duyarlı ve dirençli çeşitleri karşılaştırdığımızda uygulamalar arasında benzer sonuçlar ortaya çıktığı görülmüştür.



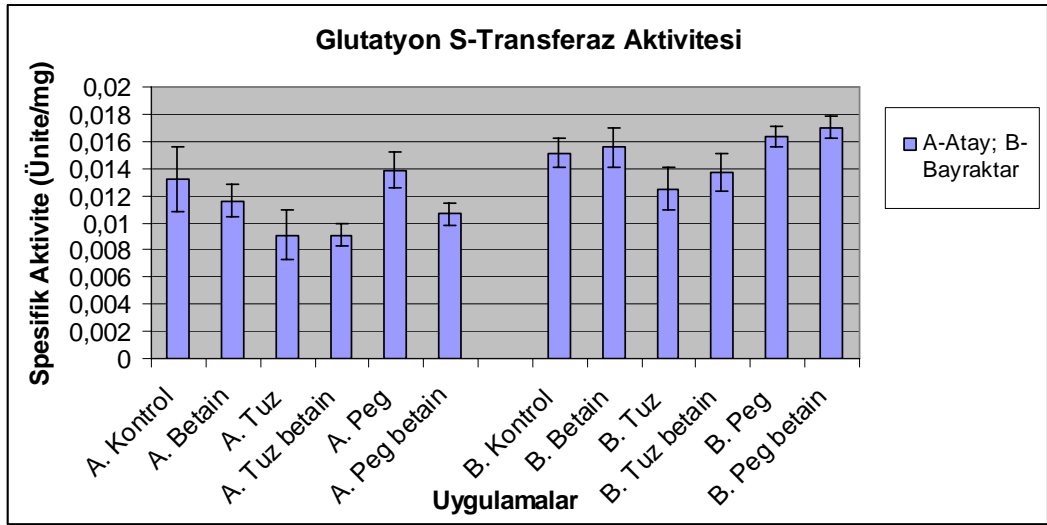
Şekil 3.8. Stres ve trehaloz uygulamalarında GR aktivite seviyesi.

İstatiksel olarak ANOVA testine göre uygulamaların kendi içlerinde ve Atay-Bayraktar karşılaştırılmasının önemli olmadığı belirlenmiştir.

3.5.1. Stres ve Glycine-betain Uygulamasında Glutasyon S-Transferaz'a Ait

Bulgular

Glutasyon S-Transferaz (GST) aktivitesi uygulamalara bağlı olarak kültürvarlar arasında bir kıyaslama yapıldığında dirençli Bayraktar kültürvarında daha yüksek aktivite gözlenmiştir (Şekil 3.9). Çeşitler kendi içlerinde karşılaştırıldığında kontrole göre duyarlı Atay çeşitinde betain, tuz, tuz-betain ve PEG-betain uygulamalarında düşük bir aktivite ortaya çıkmış, PEG uygulamasında daha yüksek aktivite görülmüştür. Dirençli çeşitte aynı karşılaştırmayı yaptığımızda tuz ve tuz-betain uygulamasında kontrole göre daha düşük aktivite tespit edilmiş, ancak kontrol-betain, PEG ve PEG-betain uygulamalarında ise daha yüksek bir aktivite ölçülmüştür. Her iki çeşit içinde tuz uygulamasında düşük aktivite oluşmuş, fakat kuraklık uygulamalarında daha yüksek aktivite ortaya çıkmıştır. Tuz uygulamasında duyarlı çeşitteki betain denemesinin enzimin aktivitesini değiştirmediği ancak dirençli çeşitte ise enzimin aktivitesini artırdiği gözlenmiştir. Kuraklık şartlarında betain uygulamasının duyarlı kültürvarda aktiviteyi düşürdüğü görülmüş, bunun yanında dirençli kültürvarda artırdiği tespit edilmiştir.

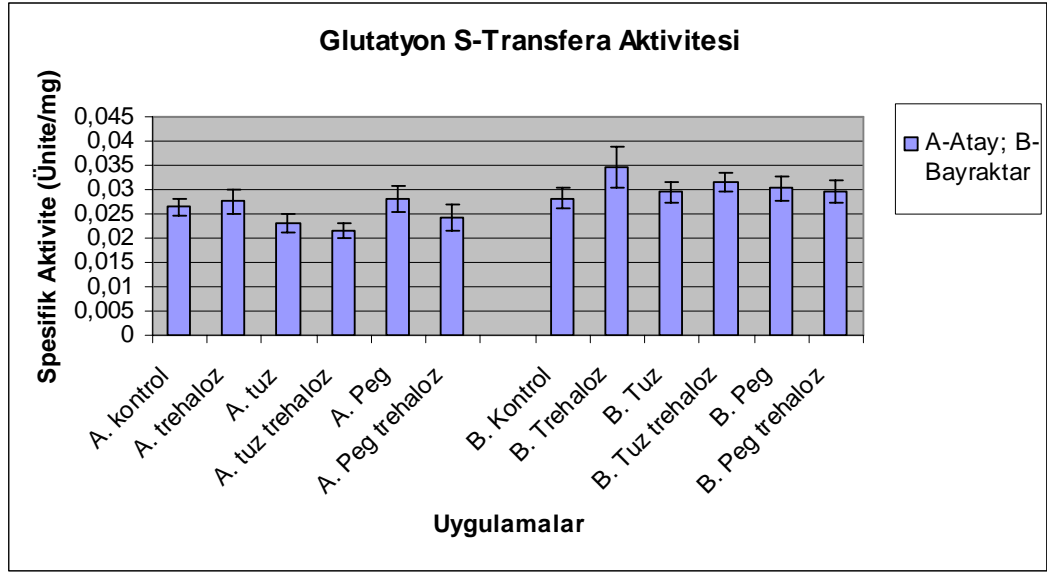


Şekil 3.9. Stres ve glycine-betain uygulamalarında GST aktivite seviyesi.

Her iki kültür için uygulamaların kendi içlerinde kıyaslamasının istatistiksel olarak ANOVA testine göre anlamlı farklılıkların oluşmadığı görülmüştür. Ancak kültürleri birbirleri ile karşılaştırdığımızda sonuçların önemli olduğu belirlenmiştir ($P < 0,05$, Tukey).

3.5.2. Stres ve Trehaloz Uygulamasında Glutasyon S-Transferaz'a Ait Bulgular

Kontrol grubu ile tuz stresinin duyarlı Atay çeşitinde GST aktivitesini düşürdüğü fakat kuraklık stresinde değiştirmedeği gözlenmiştir. Dirençli çeşitte tuz ve kuraklık streslerinde GST aktivitesinin arttığı görülmüştür (Şekil 3.10). Duyarlı kültürde kontrolle karşılaştırıldığında kontrol-trehaloz ve PEG uygulamalarında yüksek aktivite gözlenmiş, ancak tuz, tuz-trehaloz ve PEG-trehaloz uygulamalarında daha düşük aktivite ortaya çıkmıştır. Dirençli kültürde ise tüm uygulamalarda enzim aktivitesi kontrole göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Stres koşulları ile birlikte uygulanan trehaloz uygulaması duyarlı kültürde enzimin aktivitesini düşürdüğü, dirençli kültürde tuz-trehaloz uygulamasında tuz uygulamasına göre daha yüksek aktivite ortaya çıktığı, PEG-trehaloz uygulamasında ise PEG uygulamasına göre aktivitenin düştüğü görülmüştür. Genel olarak GST aktivitesinin dirençli çeşitte daha yüksek olduğu gözlenmiştir.



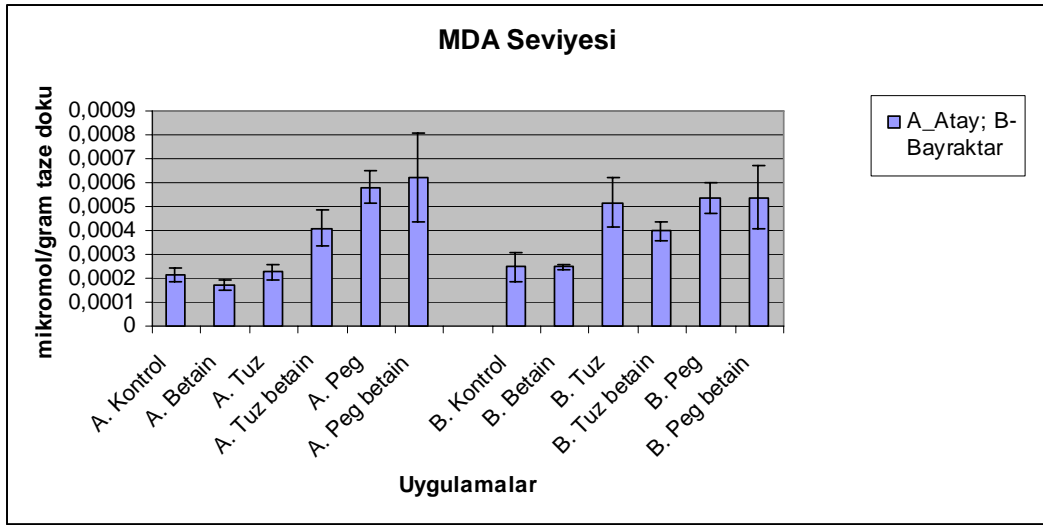
Şekil 3.10. Stres ve trehaloz uygulamalarında GST aktivite seviyesi.

Uygulanan ANOVA testine göre duyarlı ve dirençli her iki kültürde içinde anlamlı farklılıkların oluşmadığı ortaya çıkmış, ancak çeşitleri aralarında karşılaştırdığımızda önemli sonuçların oluştuğu tespit edilmiştir ($P < 0.05$, Tukey).

3.6. Lipid Peroksidasyonu ve Prolin İçeriği

3.6.1. Stres ve Glycine-betain Uygulamasında MDA (Malondialdehit) Seviyesi

Lipid peroksidasyonunun indirekt göstergesi olarak kontrol ve stres uygulamalarında MDA seviyesi tespit edilmiştir. Stres faktörlerinin her iki kültürde de lipid peroksidasyonunu artırdığı gözlenmiştir (Şekil 3.11). En yüksek MDA içeriğinin PEG uygulamalarında olduğu görülmüştür. Bununla birlikte tuz uygulamalarında da kontrole göre daha yüksek MDA seviyesi olduğu belirlenmiştir. Duyarlı kültürde stres faktörleri ile birlikte uygulanan betainin MDA seviyesini artırdığı ortaya çıkmıştır. Dirençli kültürde ise stres koşullarına göre tuz-betain ve PEG-betain uygulamalarında daha düşük bir MDA düzeyi ortaya çıkmıştır. Duyarlı ve dirençli kültürleri karşılaştırdığımızda tuz uygulamalarında dirençli kültürde daha yüksek MDA seviyesi gözlenmişken, duyarlı kültürde PEG uygulamalarında daha yüksek olduğu görülmüştür. Kontrol ve kontrol-betain uygulamalarında dirençli Bayraktar çeşidinde daha yüksek MDA seviyesi tespit edilmiştir.

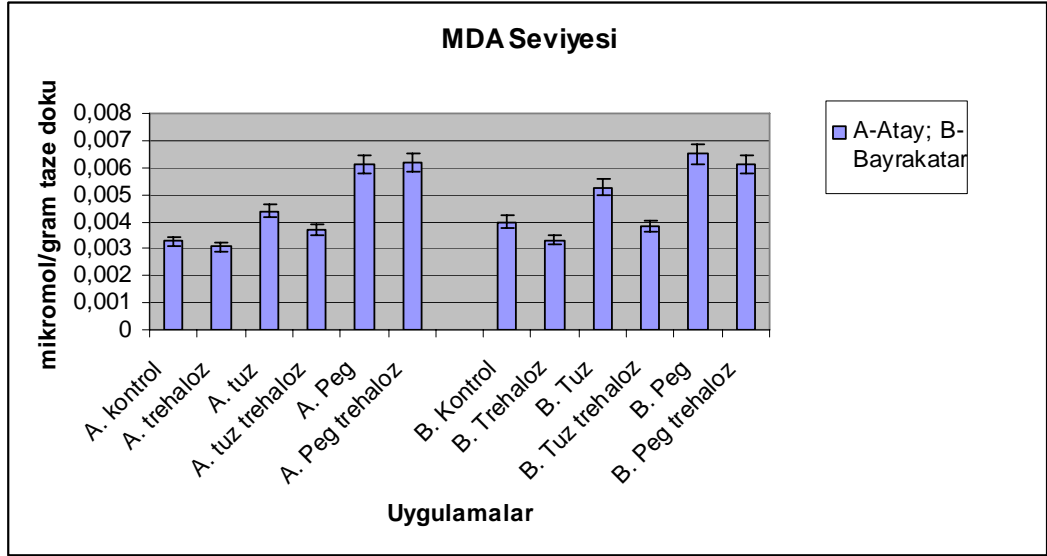


Şekil 3.11. Stres ve glycine-betain uygulamasında MDA (Malondialdehit) seviyesi.

İstatiksel olarak ANOVA testine göre Atay kültüründe Kontrol-Betain ile PEG-Betain uygulamaları arasındaki farkın önemli olduğu gözlenmiştir. Ayrıca duyarlı ve dirençli kültürlerin kendi içlerinde ve birbirleri ile kıyaslanmalarında anlamlı sonuçlar ortaya koymuştur ($P < 0.05$, Tukey).

3.6.2. Stres ve Trehaloz Uygulamasında MDA (Malondialdehit) Seviyesi

Stres ve Trehaloz uygulamalarına dayalı oluşan MDA düzeyinin kuraklık stresinde en yüksek olduğu görülmüştür. Bununla birlikte tuz stresinde de MDA düzeyinin arttığı belirlenmiştir (Şekil 3.12). Kontrolle karşılaştırıldığında duyarlı kültür için trehaloz uygulamasında düşük bir MDA seviyesi tespit edilmişken, tuz, tuz-trehaloz, PEG ve PEG-trehaloz uygulamalarında daha yüksek bir sonuç ortaya çıkmıştır. Dirençli kültürde trehaloz ve tuz-trehaloz uygulamasında MDA düzeyinin düştüğü belirlenmiştir. Ancak tuz, PEG ve PEG-trhaloz uygulamalarında daha yüksek lipid peroksidasyonu ölçülmüştür. Stres ile birlikte ekzojen olarak uygulanan trehalozun duyarlı kültürde PEG uygulaması dışında her iki çeşitte de lipid peroksidasyonunu düşürdüğü görülmüştür. En düşük MDA seviyesinin kontrol-trehaloz uygulamasında olduğu belirlenmiştir. Kültürler arasında uygulamalardaki MDA seviyesinde benzer sonuçlar ortaya çıkmıştır. Kuraklık stresinde çeşitler arasında benzer sonuçlar belirlenmişken diğer uygulamalar için dirençli çeşitte daha yüksek MDA seviyesi gözlenmiştir.



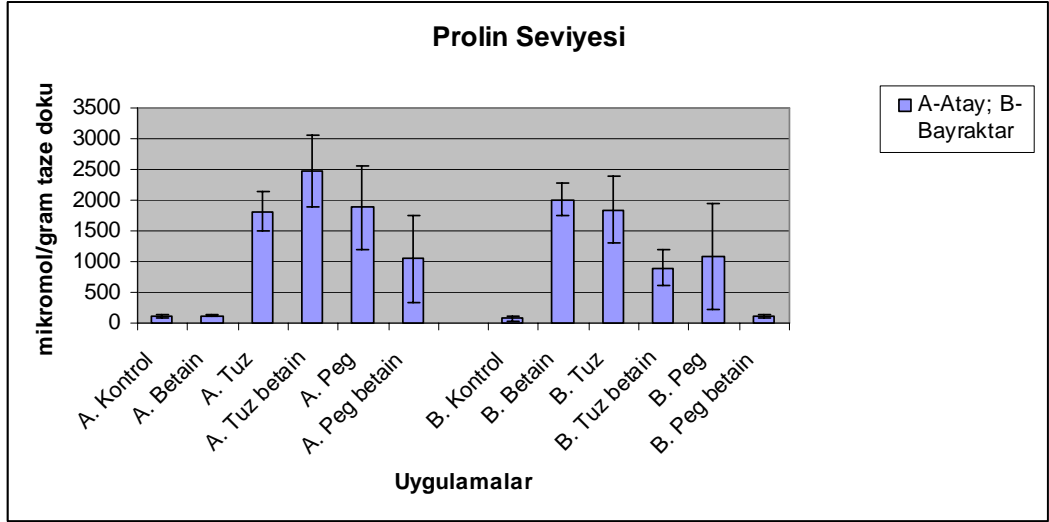
Şekil 3.12. Stres ve trehaloz uygulamasında MDA (Malondialdehit) seviyesi.

Yapılan ANOVA analizine göre uygulamalar arasında anlamlı bir farkın oluşmadığı tespit edilmiştir.

3.6.3. Stres ve Glycine-betain Uygulamasında Prolin Seviyesi

Kuraklık ve tuz stresine cevap olarak bitkilerin birçok tür ve çeşitleri yüksek konsantrasyonda prolin biriktirmektedirler. Kuraklık, tuz ve bunların Glycine-betain ile kombinasyonları prolin birikiminde değişimlere neden olmuştur (Şekil 3.13). En yüksek prolin birikiminin A.-tuz-betain uygulamasında ve en düşük seviyenin de A.-kontrol, A.-betain, B.-kontrol ve B.-PEG-betain uygulamalarında olduğu görülmüştür. Stres faktörleri ile uygulanan betainin A-tuz-betain seti hariç tüm uygulamalarda prolin düzeyini düşürdüğü belirlenmiştir. Kontrol-betain uygulamasının dirençli genotipte prolin birikimini artırdığı ancak duyarlı genotipte Stres koşullarında duyarlı Atay genotipe dirençli bayraktar genotipine göre daha yüksek bir prolin birikimi ortaya çıkmıştır.

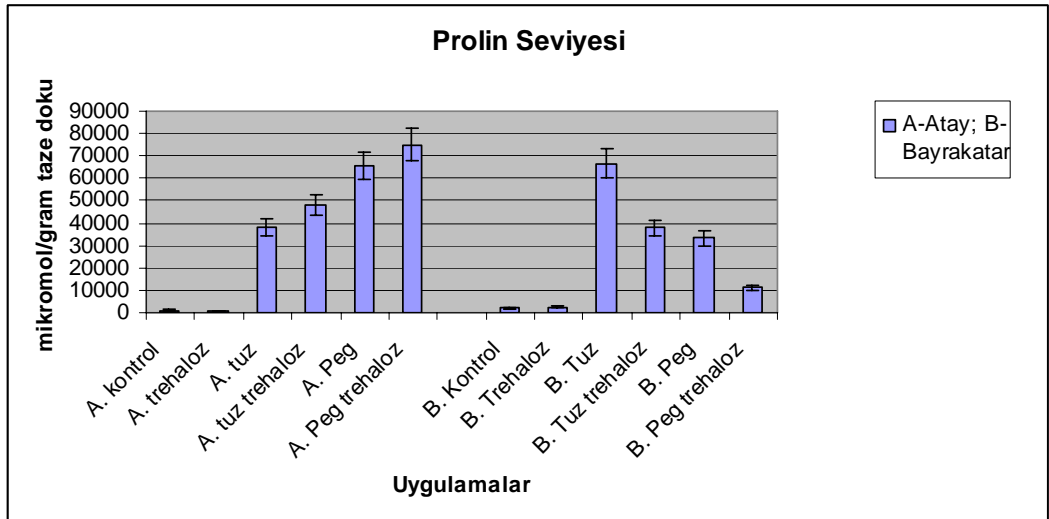
İstatiksel analizde ANOVA testi uygulandı. %95 güven aralığına göre duyarlı kültürde kontrol ile tuz-betain ve kontrol betain arasındaki farkın önemli olduğu belirlenmiştir. Ayrıca kültürlerin kendi içlerinde ve birbirleri ile karşılaştırılmalarında istatistiksel farkın anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($P < 0.05$, Tukey).



Şekil 3.13. Stres ve glycine-betain uygulamasında prolin seviyesi.

3.6.4. Stres ve Trehaloz Uygulamasında Prolin Seviyesi

Stres faktörleri ve ekzojen trehaloz uygulamaları kontrolle kıyaslandığında prolin birikimini önemli derecede artırdığı belirlenmiştir. Duyarlı kültürde en yüksek seviyenin PEG-trehaloz uygulamasında olduğu görülmüş, dirençli kültürde ise tuz uygulamasında olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.12).



Şekil 3.14. Stres ve trehaloz uygulamasında prolin seviyesi.

Stres koşullarıyla birlikte uygulanan trehalozun duyarlı çeşitte prolin birikimini artırdığı gözlenmişken, dirençli kùltùvarda azalttığı sonucu çıkmıştır. Ayrıca stresin kùltùvarlar arasında prolin birikiminde farklı sonuçlar ortaya çıkmasına neden olduğu belirlenmiştir. Tuz stresine bağlı prolin birikimi dirençli Bayraktar çeşitinde daha yüksek olmuş, ancak kuraklık stresinde bu durumun duyarlı Atay çeşitinde daha yüksek seviyede olduğu sonucuna varılmıştır Kontrol ve kontrol-trehaloz uygulamalarında her iki kùltùvar içinde prolin birikiminin en dùřük olduğu gör÷lmüştür.. Duyarlı eřitte PEG uygulamasında tuz uygulamasına göre daha yüksek prolin birikimi gözlenmiştir. Ancak dirençli çeşitte bunun tam tersi bir durumun oluştuğu gör÷lmüştür. Tuz stresinin kuraklık stresinden daha fazla prolin birikimine neden olduğu belirlenmiştir.

Örneklerin istatıksel analizinde ANOVA testi uygulandı ve %95 güven aralığı kullanıldı. Elde edilen sonuçlar istatıksel açıdan önemli olmadığı tespit edilmiştir.

4. BÖLÜM

TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Tuzluluk ve kuraklık stresi bitki verimini etkileyen en önemli abiyotik stres faktörlerindedir. Bitkiler bu streslerle baş etmek için çok çeşitli mekanizmalar geliştirmişlerdir. İki farklı (strese duyarlı ve dirençli) buğday çeşidi kuraklık ve tuz stresine farklı tepkiler vermişlerdir. Stres sonucu bitkilerde morfolojik olarak kontrol grubuna göre önemli farklılıklar gözlenmiştir. Stres uygulanan bitkilerin gövde ve kök boyları önemli oranda küçülmüştür. Stres ile birlikte dışarıdan glycine-betain (GB) uygulaması bu durumu olumlu etkilemiştir.

Glycine-betain (GB) doğal olarak bakteri, siyanobakteri, alg, fungi, hayvan ve birçok bitki familyasında (*Gramineae*, *Composite*, *Amanontacea* ve *Malvaceae*) sentezlenmekte ve dolayısıyla biriktirilmektedir. Organizmalar stres koşullarında GB sentezini ve birikimini artırarak kendi kendilerini strese karşı korurlar. Daha yüksek yapılı bitkilerde yalnızca osmotik streslere karşı koruyucu ve osmotik düzenleyici değil, foto sistem-II'de, membranda, proteinlerin quaterner yapısının korunmasında ve RUBİSCO gibi enzimlerin dengelenmesinde görev alır [20]. GB'nin koruyucu etkisi birçok bitkide rapor edilmiştir. Bitkilerde ekzogen GB uygulaması stres koşullarında büyümeyi ve hayatta kalmayı artırdığı gözlenmiştir.

Pirinç bitkisinde yapılan çalışmada GB uygulamasının kontrol grubuna göre tuzlu koşullarda yetişen bitkilerde GB birikiminin arttığı görülmüştür. 10 mM GB bezelye bitkisinin yapraklarından spray yoluyla uygulanmış ve bitkinin tuza karşı toleransının arttığı belirlenmiştir. GB stresin sebep olduğu dehidrasyondan hücrenin zarar görmesini önleyici osmoprotektan bir rol oynadığı bildirilmiştir [20].

Trehaloz bitkilerde büyüme ve gelişmede önemli bir rol almaktadır. Kuraklık veya su eksikliğinde osmoprotektan olarak bilinmektedir. Trehaloz su emilimini sağlayan bir kapasiteye sahiptir. Bu molekül, hücreleri kurumanın zararlarından korumada diğer biyolojik moleküllerin (şekerlerin) en başında görülmektedir [8].

Trehalozun soğuk koşullarında mayalarda (*Saccharomyces*) osmotik düzenleyici olarak biriktirildiği bilinmektedir. Bu koşullarda mikroorganizmanın soğuk direncini artırarak düşük sıcaklıktan ve liyoflizasyondan koruduğu rapor edilmiştir [49]. Bakterilerde, bazı bitkilerde, mantarlarda, mikroskopik hayvanlarda ve böceklerde doğal olarak yüksek konsantrasyonda trehaloz bir karbonhidrat olarak biriktirilmekte ve çeşitli streslere ve oksijen radikallerine karşı bu organizmaları korumaktadır. Stres koşullarında bu organizmaların hayatta kalmaları genel olarak hücrelerinde buldukları trehaloz içerikleri ile ilişkilidir [50]. Normal olarak memeli hücrelerinde trehaloz sentezlenmez fakat trehaloz sentezini katalizleyen enzim bu organizmaların fibroblast hücrelerine *E. coli*'den verilmiş ve normal hücreler göre trehaloz sentezi yapan fibroblast hücrelerinin kurumaya karşı daha dirençli oldukları görülmüştür. Bitkilerde bu rolü yaygın olarak sükroz üstlenmektedir. Trehalozun yokluğu veya az bulunuşu birçok bitkide strese karşı protektan etkisinin ortandan kalkması demektir. Trehaloz metabolik olarak biriktirilen bir karbonhidrat olarak düşünülmekteydi. Ancak son yapılan çalışmalar trehalozun zor çevresel şartlara karşı hücreleri koruyucu önemli bir rol oynadığını göstermiştir. *Escherichia coli* ile yapılan çalışmada düşük sıcaklıkta trehalozun oksijen radikallerinin neden olduğu oksidatif zararlara karşı hücreleri koruduğu belirlenmiştir [51]. Pirinç bitkisinde tuz, soğuk ve kuraklık streslerinde karbonhidrat metabolizması (galaktoz, glukoz, fruktoz) çalışılmış ve tuz stresinde herhangi bir değişim görülmemiştir. Diğer taraftan soğuk ve kuraklık streslerinin hekzosların seviyesini artırdığı gözlenmiştir. Duyarlı pirinç çeşidinde abiyotik stres koşullarında galaktoz seviyesi azalmış veya değişmemiş ancak glukoz ve fruktoz düzeyleri artmıştır. Sukroz ve trehaloz gibi disakkaritler açısından soğuk stresinde her iki kültür açısından sukroz seviyesinde önemli bir artış olmamıştır. Fakat toleranslı kültürde tuz ve kuraklık streslerinde azalma görülmüştür. Trehaloz konsantrasyonundaki değişme stres uygulamasından sonra artmıştır. Bu disakkaritlerin duyarlı kültürdeki konsantrasyonları tuz stresinde yaklaşık iki katına çıkarken kuraklık stresinde yirmi kat artmıştır. Trehaloz konsantrasyonu kontrol gruplarında toleranslı kültürde duyarlı kültüvare göre dört kat

daha fazla olmuştur. Duyarlı genotipte su eksikliğinde trehaloz konsantrasyonunda büyük bir artış görülmüştür. Bu durum toleranslı kültürlerle karşılaştırıldığında su eksikliği ve tuz streslerinde duyarlı kültürün yaşama şansını artırmasının nedenini açıklayan bir sonuçtur [8].

4.1. Askorbat Peroksidaz (APX)

Askorbat peroksidaz askorbatı katalizleyen bir enzimdir. Bu işlemi yaparken hidrojen peroksidi kullanır. Bu şekilde hidrojen peroksid hücreden uzaklaştırılır. Doku askorbat peroksidaz aktivitesi özellikle tuz stresi ve tuz ile birlikte uygulanan GB'nin kontrole kıyasla enzimin aktivitesini artırdığı gözlenmiştir. Tuz stresi altında yetiştirilen pirinç ve domates bitkilerinde APX seviyesinin arttığı görülmüştür. GB pirinç bitkisinin yapraklarında biriktirilerek tuz stresinin neden olduğu oksidatif zararlar sınırlandırılmıştır [20]. Benzer şekilde buğday, mısır ve sorgum bitkileriyle yapılan çalışmada düşük sıcaklıkta ve tuz koşullarda APX düzeyinin arttığı görülmüştür. Bu sonuçlar çalışmalarımızı destekler niteliktedir [46]. *Beta maritima* ve *Beta vulgaris* çeşitlerinde tuz stresi uygulaması yapılmış ve artan tuz konsantrasyonuna paralel olarak enzimin aktivitesinin arttığı belirlenmiştir [52]. Çeşitli buğday genotipleriyle yapılan çalışmada tuz stresi altında APX aktivitesinin arttığı bildirilmiştir [31]. Deniz suyunda yetiştirilen buğday fidelerinde kontrol grubuna göre APX aktivitesinin kök ve yapraklarda arttığı gözlenmiştir [53]. Duyarlı ve direçli pirinç çeşitlerinde tuz stresi altına yapılan çalışmada kontrole göre APX aktivitesinin arttığı tespit edilmiştir [54]. Tütün bitkisiyle yapılan çalışmada kontrole karşılaştırıldığında tuzlu koşullarda APX aktivitesinin azaldığı görülmüştür. Tuzla birlikte dışarıdan GB uygulaması yapılmış fakat aktivitede önemli bir değişiklik görülmemiştir [55]. Kuraklık stresinde ve kontrol-betain uygulamalarında aktivitenin azaldığı görülmüştür. Kuraklık şartlarında yetiştirilen buğdaylarda enzimin aktivitesinin kontrole göre daha düşük olduğu görülmüştür. Bizim çalışmalarımızda da paralel sonuçlar elde edilmiştir. Kuraklık ile silicon uygulamasında ise enzimin aktivitesinde önemli bir değişikliğe yol açmadığı belirlenmiştir [9]. Bezelye bitkisinde kuraklık stresi altında askorbat seviyesindeki azalmanın oksidatif zararları artırdığını bulmuşlardır [46]. Bir başka çalışmada kuraklık stresinde buğday bitkisinde askorbat peroksidaz seviyesinin arttığı gözlenmiştir [56]. Fasulye bitkisiyle yapılan çalışmada kuraklık stresinin kontrole göre uygulamalarda

APX aktivitesinin dirençli kültürde artırdığı ancak duyarlı kültürde önemli bir değişikliğe yol açmadığı gözlenmiştir [57]. B.PEG-betain uygulaması dışında tüm uygulamalarda GB'nin enzimin aktivitesini düşürdüğü tespit edildi. İstatiksel olarak sonuçların anlamlı olduğu belirlenmiştir. Enzimin seviyesinde ki düşüşün GB'nin bitkide biriktirilerek osmoprotektan görev yaptığı düşünülebilir.

Stres koşulları ve GB uygulamasının neden olduğu enzim değişimlerine benzer sonuçlar trehaloz uygulamasında da görülmektedir. Her iki kültür için tuz stresinde ve duyarlı kültürde PEG uygulamasında enzimin seviyesi kontrole göre artmıştır. Ancak dirençli Bayraktar kültüründe kuraklık koşullarında daha düşük enzim düzeyi görülmüştür. Stres koşullarında dışarıdan trehaloz uygulaması enzimin seviyesinin düşmesine neden olmuştur. Bu durum trehalozun stresin etkisini azalttığı düşüncesini ortaya koymaktadır.

4.2. Katalaz (CAT)

Katalaz peroksizomlarda hidrojen peroksidi su ve oksijene parçalayan bir enzimdir. Bu şekilde gerçekleşen olay hücrelerde daha reaktif olan hidroksil radikallerinin oluşması engellenmektedir. GB ve trehaloz gibi osmoprotektan maddeler stres koşullarında oksidatif zararlara karşı hücreleri korumaktadırlar.

Kuraklık ve tuz stresi ile bunlarla birlikte dışarıdan uygulanan GB'nin CAT aktivitesi belirlenmiştir. Kuraklık ve tuz streslerinin kontrole kıyasla duyarlı ve dirençli kültürlerde enzimin aktivitesini azalttığı görülmüştür. Ancak aktivitenin kuraklık stresinde tuz stresine göre daha yüksek olduğu sonucuna varılmıştır. Tütün bitkisi ile yapılan çalışmada tuz stresi altında CAT aktivitesinin kontrole göre düşük olduğu gözlenmiştir. Tuz-GB uygulamasında da benzer sonuç ortaya çıkmıştır [58]. Kuraklık şartlarında yetiştirilen buğdaylarda enzimin aktivitesinin kontrole göre daha düşük olduğu görülmüştür. Çalışmalarımızda da benzer sonuçlar gözlenmiştir [9]. Keleş ve Öncel'in buğday bitkisinde düşük sıcaklık ve tuz stresi altında CAT aktivitesinin arttığını fakat uygun sıcaklık ve tuz stresi altında enzimin aktivitesinin azaldığını göstermişlerdir. Literatürdeki bazı çalışmalara göre de bazı buğday varyetelerinde kuraklık stresi sonrasında CAT aktivitesinde artış gözlenmiştir [46]. Tuz stresi altında buğday ile yapılan çalışmada CAT aktivitesinin arttığı gözlenmiştir. Ancak GB uygulamasının özellikle stres toleranslı buğday çeşidinde enzimin aktivitesinin azalttığı

görülmüştür. Tuzlu koşullarda bitkilerde Na^+ ve Cl^- birikimi artmaktadır. GB bitkilerin köklerinde biriktirilerek osmotik düzenleyici olarak görev yapmaktadır. Bu şekilde köklerde GB birikimi Na^+ ve Cl^- iyonlarının bitkilere geçmesini ve köklerden yapraklara taşınmasını engellemektedir [7]. Soğuk ve su stresi koşulların stres duyarlı ve toleranslı pirinç çeşitlerinde CAT aktivitesinin arttığı görülmüştür. Bununla birlikte tuz stresinde toleranslı kültüvarde enzimin aktivitesi artarken, duyarlı kültüvarda azalmıştır. Başka bir pirinç çeşidi ile yapılan çalışmada duyarlı kültüvarda CAT aktivitesi toleranslı kültüvardan daha yüksek bulunmuştur. Ancak tuzlu koşullarda enzimin aktivitesinin azaldığı görülmüştür. Duyarlı ve dirençli domates genotiplerinde tuz stresi altında CAT aktivitesindeki artış ve azalmaları gösterilmiştir. Stres koşulları altında CAT ve APX hidrojen peroksidi (H_2O_2) elimine etmektedirler. Tuz stresi altında yetiştirilen dirençli pirinç çeşitlerinde GB uygulamasının CAT aktivitesini azalttığı görülmüştür [20]. Kontrol-betain ve streslerle birlikte betain uygulamalarında da enzimin seviyesinin azaldığı gözlenmiştir. Dirençli Bayraktar çeşidinde enzimin aktivitesinin daha yüksek olduğu görülmüştür. Tütün bitkisiyle yapılan çalışmada kontrolle karşılaştırıldığında tuzlu koşullarda CAT aktivitesinin azaldığı görülmüştür. Tuzla birlikte dışarıdan GB uygulaması yapılmış ve aktivitenin kontrole göre daha düşük olduğu fakat tuz stresine göre arttığı görülmüştür [55].

Stres faktörlerinin ve stresle birlikte trehaloz uygulamasının enzimin aktivitesinde kontrolle karşılaştırıldığında önemli bir farkın olmadığı gözlenmiştir. En yüksek aktivite Bayraktar-tuz-betain uygulamasında ve en düşük aktivitenin de A.-PEG-betain uygulamasında olduğu belirlenmiştir.

Set içinde katalaz ve askorbat peroksidazın aktivitelerine bakıldığında zıt bir aktivitenin ortaya çıktığı belirlenmiştir. Stres koşullarında katalaz aktivitesi azalırken, askorbat peroksidaz aktivitesinin arttığı görülmüştür. CAT hücrelerde hidrojen peroksidin detoksifikasyonunda ve ROS'ların temizlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Tuz stresinde CAT aktivitesinde bir artışın olmaması diğer metabolik maddelerin (α -tokoferol, hekzoslar (glukoz, fruktoz, galaktoz), askorbat, flavonoidler) ROS'ları temizlemesinden kaynaklandığı bildirilmektedir [8].

Şeker pancarı ile yapılan çalışmada 12 gün farklı tuz konsantrasyonlarında yetiştirilmiş ve sonunda (*Beta maritima* ve *Beta vulgaris* cv. *ansa*) CAT aktivitesinin arttığı

görülmüştür [53]. *Catharanthus roseus* bitkisiyle farklı azot kaynakları ve tuz stresi altında yapılan çalışmada kontrole göre stres altında köklerde CAT aktivitesinin arttığı gözlenmiştir [59]. Fasulye bitkisiyle yapılan çalışmada kuraklık stresinin kontrole göre uygulamalarda CAT aktivitesinin dirençli kültürde artırdığı ancak duyarlı kültürde önemli bir değişikliğe yol açmadığı gözlenmiştir [57]. Duyarlı ve dirençli pirinç çeşitlerinde tuz stresi altına yapılan çalışmada kontrole göre dirençli kültürde CAT aktivitesi artarken duyarlı kültürde azaldığı tespit edilmiştir [54].

4.3. Süperoksid dismutaz (SOD)

Oksidatif stresler hücrelerde ROS'lar meydana gelmesine neden olur. SOD, GR, CAT ve APX gibi antioksidan enzimler ROS'ların hücrelerden temizlenmesini sağlarlar [8]. Bir ROS çeşidi olan süperoksid anyonu (negatif iyon, O_2^-) hücrelerde SOD enzimi tarafından H_2O_2 'ye dönüştürülür ve H_2O_2 CAT ve APX tarafından H_2O ve O_2 parçalanır [8, 20]. Tuz ve kuraklık stresi ve bunlarla birlikte GB ve trehaloz uygulaması ile yaptığımız çalışmada buğday çeşitlerinde kontrole kıyasla SOD aktivitesinde önemli farklılıkların olmağını gözlenmiştir. Çeşitli organizmalarda farklı stres koşullarında SOD aktivitesi incelenmiştir. Buğday çeşitlerinde artan SOD aktivitesine bağlı olarak bitkilerde tuz stresi toleransın arttığı gözlenmiştir [20, 31]. Kuraklık şartlarında yetiştirilen buğdaylarda enzimin aktivitesinin kontrole göre daha düşük olduğu görülmüştür [9]. En yüksek aktivitenin duyarlı genotipte kontrol-betain uygulamasında olduğu belirlenmiştir. Tuzlu koşullardaki enzim aktivitesinin kuraklık koşullarından daha yüksek olduğu görülmüştür. GB uygulamalarının kısmen de olsa stres koşullarında enzimin aktivitesini düşürdüğü sonucuna varılmıştır. Tütün bitkisiyle yapılan çalışmada kontrole karşılaştırıldığında tuzlu koşullarda SOD aktivitesinin azaldığı görülmüştür. Tuzla birlikte dışarıdan GB uygulaması yapılmış aktivitenin azaldığı gözlenmiştir [55]. Benzer şekilde diğer bir çalışmada dirençli ve duyarlı buğday kültürlerinde kontrol grubunda kontrol-GB uygulamasına göre SOD aktivitesi daha yüksek bulunmuştur. Kontrol ve tuz stresi ile birlikte GB uygulamasında dirençli genotipte enzimin aktivitesinin tüm koşullarda düştüğü, bununla birlikte kontrol-GB uygulamasında daha yüksek bir aktivitenin ortaya çıktığı görülmüştür. Fakat duyarlı kültürde kontrol grubunda SOD aktivitesi düşerken GB uygulamasının aktiviteyi artırdığı görülmüştür [7]. Trehaloz uygulamasında stres koşulları ve bunlarla birlikte uygulanan trehaloz

uygulamalarında tuz stresinde enzimin aktivitesinin arttığı ancak kuraklık stresinde belirgin bir değişimin olmadığı görülmüştür. Duyarlı kültürde trehalozun tuz stresinde enzimin aktivitesini azalttığı fakat her iki çeşit içinde diğer stres durumlarında kısmen artırdığı belirlenmiştir.

Tütün bitkisiyle yapılan çalışmada kontrol grubunda tuz ve tuz-GB uygulamalarına kıyasla SOD aktivitesinin arttığı görülmüştür. Tuz-GB uygulamasında tuz stresine göre daha düşük bir aktivite tespit edilmiştir [58]. Mısır köklerinde yürütülen çalışmada SOD aktivitesinin artan metal konsantrasyonuna paralel olarak arttığı gözlenmiştir [60]. Şeker pancarı ile yapılan çalışmada farklı tuz konsantrasyonlarında (*Beta maritima* ve *Beta vulgaris* cv. *ansa*) SOD aktivitesinin arttığı görülmüştür [52]. *Catharanthus roseus* bitkisiyle farklı azot kaynakları ve tuz stresi altında yapılan çalışmada kontrole göre stres altında köklerde SOD aktivitesinin arttığı gözlenmiştir [59].

Doğal olarak trehalozun çok çeşitli fonksiyonları vardır. Bunlar bakterilerde karbon ve enerji kaynağı, mantarlarda karbonhidrat depolanması ve taşınması, mayalarda ve bakterilerde streslere karşı koruma ve bitkilerde karbon akışı gibi fonksiyonlardır. Ayrıca hücrelerde proteinlerin korunmasına yardımcı olur [61]. Fasulye bitkisiyle yapılan çalışmada kuraklık stresinin kontrole göre uygulamalarda SOD aktivitesinin artırdığı gözlenmiştir [57]. Duyarlı ve dirençli pirinç çeşitlerinde tuz stresi altına yapılan çalışmada kontrole göre SOD aktivitesinin dirençli kültürde biraz arttığı ancak duyarlı kültürde azaldığı tespit edilmiştir [54].

4.4. Glutatyon Redüktaz (GR)

Glutatyon redüktaz, okside glutatyonun (GSSG) glutatyon (GSH) indirgenmesini katalizleyen antioksidan enzimlerden biridir. Bitkilerde glutatyon mitokondride, sitozolde ve kloroplastlarda bulunur. Çevresel streslere ve patojen etkilere karşı oluşturulan cevapta ve gen ifadesinin düzenlenmesinde rol oynar [13]. Stres faktörleri ile kontrol grupları GR aktivitesi yönünden karşılaştırıldığında buğday çeşitlerinde tuz stresi altında enzimin aktivitesinin arttığı fakat kuraklık stresinde azaldığı belirlenmiştir. Kuraklık şartlarında yetiştirilen buğdaylarda enzimin aktivitesinin kontrole göre daha düşük olduğu görülmüştür [9]. Bu sonuç çalışmalarımızla paralellik göstermektedir. Fasulye bitkisiyle yapılan çalışmada kuraklık stresinin kontrole göre uygulamalarda GR

aktivitesinin ilk yedi güne kadar arttığı sonra azaldığı gözlenmiştir [57]. Stresörlerle birlikte GB uygulamasının dirençli kültürarda enzimin aktivitesini düşürdüğü görülmüştür. Kontrolle birlikte GB uygulaması duyarlı Atay kültürarında enzimin aktivitesini düşürürken, dirençli Bayraktar kültürarında artırdığı gözlenmiştir. Buğday çeşitleri ile yapılan çalışmada yüksek sıcaklık ve düşük sıcaklık koşullarında kuraklık ve tuz stresleri uygulanmış ve bu şartlarda tuz ve kuraklık streslerinde kontrole göre enzimin aktivitesinin arttığı görülmüştür [54].

Trehaloz uygulamasında GB uygulamasına benzer sonuçlar ortaya çıkmıştır. Kontrolle kıyaslandığında tuz stresinde aktivitenin arttığı görülmüş ancak kuraklık stresinde azaldığı tespit edilmiştir. Streslerle birlikte trehalozun duyarlı kültürarda tuz uygulamasında ve dirençli kültürarda kuraklık stresinde enzimin aktivitesini düşürdüğü belirlenmiştir. Diğer taraftan duyarlı kültürarın tuz uygulaması ve dirençli kültürarın kuraklık uygulamalarında önemli farkın oluşmadığı gözlenmiştir. İstatiksel olarak oluşan farkların önemli olmadığı belirlenmiştir.

Bitkiler özellikle su yetersizliği durumlarında oluşan streslerde hücrel ayarlamalar yaparlar. Bu olay hücrenin osmotik potansiyeli düşürülerek sağlanır. Böyle durumlarda hücrede çözünür maddeler diye bilinen prolin, mannitol, sorbitol, polioller, glutamate GB, carnitine, fruktanlar, sukroz, inorganik iyonlar (K^+) ve trehaloz gibi osmoprotektanların birikimi artırılır. Böylece kuraklık ve hücrel dehidrasyona karşı direnç kazanırlar. Son çalışmalar kuraklık stresi altında bitkilerde fruktoz, glukoz, galaktoz ve trehaloz gibi karbonhidratların birikiminin arttığı ve kuraklığa direnç sağladığı gösterilmiştir [11].

Pirinç çeşitleri ile yapılan çalışmada dirençli kültürarda GR aktivitesi artarken, duyarlı kültürarda azaldığı görülmüştür. Dirençli kültürarda GR aktivitesine bağlı tuz toleransının arttığı tespit edilmiştir [25]. Tuz stresi altında pamuk çeşitlerinde GR aktivitesi araştırılmış ve tuz stresine bağlı olarak dirençli kültürarda GR aktivitesi artarken duyarlı kültürarda değişmediğini gözlemlemişlerdir [62]. *Beta maritima* ve *Beta vulgaris* kültürarlarına tuz stresi uygulanmış ve artan tuz konsantrasyonuna bağlı olarak GR aktivitesinin arttığı Ancak *B. maritima*' da aktivitenin *B. vulgaris*'den daha yüksek olduğu bildirilmiştir [52]. Çeşitli buğday genotipleriyle yapılan çalışmada tuz stresi altında GR aktivitesinin arttığı bildirilmiştir (40). *Catharanthus roseus* bitkisiyle

farklı azot kaynakları ve tuz stresi altında yapılan çalışmada kontrole göre stres altında köklerde GR aktivitesinin arttığı gözlenmiştir [59]. Bu çalışmada elde edilen değerler bizim çalışmalarımızla benzer sonuçlar göstermektedir. Deniz suyunda yetiştirilen buğday fidelerinde kontrol grubuna göre GR aktivitesinin kök ve yapraklarda arttığı gözlenmiştir. Aktivite artışının köklerde yapraklara göre daha fazla olduğu belirlenmiştir [53]. Duyarlı ve dirençli pirinç çeşitlerinde tuz stresi altına yapılan çalışmada kontrole göre GR aktivitesinin her iki kültürde de arttığı tespit edilmiştir [54]. Tütün bitkisiyle yapılan çalışmada kontrolle karşılaştırıldığında tuzlu koşullarda GR aktivitesinde önemli değişikliğe yol açmadığı belirlenmiştir. Fakat tuzla birlikte dışarıdan GB uygulaması yapılmış aktivitenin kontrole göre arttığı görülmüştür [55].

4.5. Glutasyon S-Transferaz (GST)

Glutasyon s-transferaz endobiyotik ve xenobiyotik bileşikleri glutasyonu hidrofobik bir substrata bağlayarak daha az reaktif duruma getirir. Stres faktörlerinin duyarlı çeşitte enzimin aktivitesini azaltırken dirençli çeşitte artırdığı görülmüştür. Dirençli kültürde kontrolle karşılaştırıldığında tuz stresinde enzimin aktivitesi düşerken kuraklık stresinde arttığı görülmüştür. Aynı çeşitte kontrol ve streslerle birlikte uygulanan GB'nin genel olarak enzimin aktivitesini artırdığı gözlenmiştir. Duyarlı kültürde kontrole kıyasla tuz stresinde azalan aktivitenin kuraklık stresinde önemli bir farkın oluşmadığı tespit edilmiştir. Duyarlı kültürde GB uygulamasının enzimin aktivitesini düşürdüğü görülmüştür.

Stres koşullarında ve trehaloz ile yapılan uygulamalar da enzim aktivitesinin dirençli kültürde genel olarak duyarlı kültüvare göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Kontrolle kıyaslandığında duyarlı kültürde stres koşullarında daha düşük bir aktivite gözlenirken, dirençli bayraktarda önemli farklılıkların olmadığı gözlenmiştir. Trehaloz uygulamalarının B.-tuz-trehaloz uygulaması dışında diğer stres koşullarında her iki çeşitte de enzimin aktivitesini düşürdüğü belirlenmiştir. Kontrol ile trehaloz uygulamasının aktiviteyi artırdığı görülmüştür.

Catharanthus roseus bitkisiyle farklı azot kaynakları ve tuz stresi altında yapılan çalışmada kontrole göre stres altında köklerde GST aktivitesinin arttığı gözlenmiştir [59]. Çalışmalarımızda tuz stresinde GST aktivitesinin azaldığı ancak kuraklık stresinde

arttığı gözlenmiştir. Bezelye bitkisi köklerinde yapılan çalışmada metallerin neden olduğu oksidatif stres sonucunda glutasyon s-transferaz aktivitesinin arttığı görülmüştür [63].

4.6. Malondialdehit (MDA)

ROS'lar ve toksik iyonlar stres koşulları altında hücrelerde birikerek membran üzerinde olumsuz etki yaparlar. Hücrelerde Na^+ ve Cl^- birikimi iyon dengesini değiştirmektedir. Bu iyonlar hücrelerde özellikle Ca^+ ve K^+ gibi proteinlerin fonksiyonlarını meydana getirmede önemli role sahip iyonların yerini alırlar. Serbest radikaller özellikle membranda lipidperoksidasyonuna neden olarak membran bütünlüğüne ve yapısına zarar verirler.

Stres faktörlerinin membran üzerinde lipidperoksidasyonu göstergesi olarak MDA içeriği çalışılmıştır. Yaptığımız çalışmada tuz ve kuraklık stresi uygulanmış duyarlı ve dirençli buğday kültürvarlarında MDA seviyelerini kontrol ile kıyasladığımızda duyarlı kültürarda özellikle kuraklık stresinde ve dirençli kültürarda ise her iki stres durumunda arttığı görülmüştür. Yapılan birçok çalışmada stres koşullarında lipidperoksidasyonu gösterilmiştir. Şeker pancarı ile yapılan çalışmada tuz konsantrasyonuna bağlı MDA düzeyinin arttığı gösterilmiştir [52]. Duyarlı ve dirençli pirinç genotipleriyle yapılan çalışmada tuz ve soğuk streslerinde MDA seviyesinin arttığı ancak kuraklık stresinde azaldığı belirlenmiştir. Ancak duyarlı çeşitteki artışın daha fazla olduğu gözlenmiştir [7]. Stres faktörleri ile birlikte GB uygulamasına baktığımızda duyarlı kültürarda stresle birlikte uygulamalarda MDA düzeyinin arttığı ancak dirençli kültürarda GB uygulamasının MDA seviyesini düşürdüğü görülmüştür. Pirinçle yapılan çalışmada tuz stresinde MDA seviyesinin arttığı ancak tuzla birlikte GB uygulamasının MDA seviyesini düşürdüğü gözlenmiştir [20]. Kontrol ile birlikte GB uygulamasının ise her iki çeşitte de önemli bir fark oluşturmadığı gözlenmiştir.

Stresle birlikte trehaloz uygulamasında da GB uygulamasına benzer sonuçlar elde edilmiştir. Her iki kültürar içinde stres faktörlerinin MDA seviyesini artırdığı belirlenmiştir. Kontrol ve stres ile birlikte GB uygulamasının MDA düzeyini düşürdüğü görülmüştür.

Yapılan uygulamalar ve alınan sonuçlara göre GB ve trehalozun lipidperoksidasyonunu belirli ölçüde olsa da önlediği sonucu çıkarılabilir.

Mısır bitkisinde yaşlanmaya bağlı lipidperoksidasyonun genç bitkiden yaşlıya bitkiye doğru arttığı belirlenmiştir [27]. Fasulye bitkisiyle yapılan çalışmada kuraklık stresinin kontrole göre uygulamalarda MDA düzeyini artırdığı gözlenmiştir [57]. Duyarlı ve dirençli pirinç çeşitlerinde tuz stresi altına yapılan çalışmada kontrole göre MDA seviyesinin duyarlı kültürde artarken dirençli kültürde değişmediği tespit edilmiştir [54]. Literatürdeki bu çalışmaların elde ettiğimiz sonuçlarla paralel olduğu görülmüştür.

Yapılan çalışmalarda alınan sonuçlara göre özellikle tuz stresinde MDA seviyesinin arttığı rapor edilmiştir. Bu durum çalışmamızın sonuçlarını destekler gözükmektedir.

4.7. Prolin

Prolin amino asidi hücrelerde osmotik düzenleyici, enzimlerin ve membran bütünlüğünü koruyucu role sahip önemli bir osmoprotektandır. Organizmalarda özellikle bakteriler ve bitkilerde tuz ve kuraklık stresleri altında hayatta kalma ve prolin birikimi arasında güçlü bir ilişki vardır. Birçok diğer çevresel streslerde bitkilerdeki prolin seviyesinde artışlar gösterilmiştir.

Duyarlı (Atay) ve dirençli (Bayraktar) buğday çeşitlerinde tuz ve kuraklık stresi ve bunlarla birlikte GB ve trehaloz uygulaması sonucu yaptığımız çalışmada stres koşulları ile birlikte prolin düzeyinde önemli bir artışın olduğu görülmüştür. Duyarlı ve dirençli pirinç çeşitleri ile yapılan çalışmada tuz stresi altında prolin seviyesinin arttığı gözlenmiştir. Mercimekle yapılan çalışmada tuzlu koşullarda prolin düzeyinin arttığı belirlenmiştir [22]. Duyarlı ve dirençli pirinç çeşitlerinde tuz stresi altına yapılan çalışmada kontrole göre prolin seviyesinin her iki kültürde de arttığı tespit edilmiştir. Ancak duyarlı kültürdeki artışın dirençli kültürden daha yüksek olduğu görülmüştür [56]. Her iki kültürde içinde özellikle kuraklık stresiyle birlikte GB uygulamasının prolin seviyesini düşürdüğü belirlenmiştir. Duyarlı kültürde tuz ile birlikte GB uygulaması prolin seviyesini artırırken dirençli kültürde düşürdüğü gözlenmiştir. Bu durum özellikle dirençli kültür için GB'nin osmotik düzenleyici rolünün bir sonucu olduğu kanısını ortaya koyabilir. Fasulye bitkisiyle yapılan

çalışmada kuraklık stresinin kontrole göre uygulamalarda prolin düzeyini artırdığı gözlenmiştir. Artışın dirençli kültüvarda daha yüksek olduğu görülmüştür [57].

Stres ve trehaloz uygulamalarında stres koşullarında buğday çeşitlerinde prolin seviyesinin önemli derecede arttığı görülmüştür. Kontrole birlikte trehaloz uygulamasının prolin düzeyinde herhangi bir değişikliğe neden olmadığı gözlenmiştir. Ancak stres koşullarıyla birlikte uygulandığı zaman dirençli kültüvarda prolin seviyesinin arttığı bununla birlikte dirençli kültüvarda düştüğü görülmüştür.

Duyarlı ve dirençli dut kültürvarları ile yapılan çalışmada artan tuz konsantrasyonu ile birlikte özellikle dirençli kültüvarda prolin seviyesinin arttığı görülmüştür [64]. Tuz stresi altında sorgum, biber, pamuk, tütün ve *Catharantus roseus* gibi bitkilerde prolin birikiminin arttığı rapor edilmiştir. *Abelmoschus esculentus* ile yapılan çalışmada kuraklık stresinde prolin birikiminin arttığı görülmüş ve bu artışın köklerde daha yüksek olduğu gözlenmiştir [65]. Başka bir çalışmada dışarıdan prolin uygulamasının MDA seviyesini düşürdüğü rapor edilmiştir [58].

Aktivite değerlendirmeleri yapıldığında uygulanan streslerin farklı enzimatik tepkilerin meydana gelmesine neden olduğu görülmüştür. Stres faktörleri, giderek daha da yoğunlaşmakta, diğer canlı organizmalarda olduğu gibi, bitkilerin yaşamlarını tehlikeye sokmakta ve metabolizmalarını zayıflatmaktadır. Ekolojik dengenin bozulması ile bitki ve çevre arasındaki ilişkilerde sorunlar ortaya çıkmaktadır. Bu durum; stress faktörlerinin moleküler temellerinin, dayanıklılık mekanizmalarının ve metabolizmada meydana gelen değişikliklerin öncelikli olarak incelenmesini gerektirmektedir.

KAYNAKLAR

1. Kün, E., Serin İklim Tahılları, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Ankara, 1988.
2. Gilgin, O., Bazı ekmeklik buğday (*Triticum aestivum* L.) çeşit ve hatlarının tane verimi ve bazı fenolojik özelliklerinin belirlenmesi, Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi, T.Ü., 58- 65, 2005.
3. Anonim, FAO
http://www.faostat.fao.org/faostat/collections?subset=agriculture,2002.
4. Kün, E. et al., Tahıl ve Yemeklik Tane Baklagiller Üretimi, Ankara.
5. Özcan, S., Gürel, E., Babaoğlu, M., Bitki Biyoteknolojisi –II-, syf., 308-313, S.Ü., Vakfı Yay., 2001.
6. Sankar, B. et al., Drought- induce biochemical modifications and proline metabolism in *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench, Acta Bot. Croat. 66 (1), 43-56, İndia, 2007.
7. Raza, H.S. et al., Glycinebetaine-induced modulation of antioxidant enzymes activities and ion accumulation in two wheat cultivars differing in salt tolerance, Environmental and Experimental Botany, 60: 368-376, 2006.
8. Mustafa, R. ve ark., Alternation of oxidative and carbohydrate metabolism under abiyotik stres in two rice (*Oyza sativa* L.) genotypes contrasting in chilling tolerance, Journal of Plant Physiology, 2005
9. Gong, H., Zhu, X., Chen, K., Wang, S., Zhang, C., Silicon Alleviates Oxidative Damage of Wheat Plants in pots under drought, Plant Science 169, 313-321, 2005.
10. Lichtenhaler, H. K., Vegetation stres: an introduction to the stres concept in plant, J. Plant Physiol., 148: 4-14, 1996.
11. Mahajan, S. et. al., Cold, salinity and drought stresses: An overview, Science Direct, 444: 139-158, 2005.
12. Blum, A., Breeding Crop Varieties for Stres Environments, Critical Reviews in Plant Sciences, 2: 199-237, 1986.
13. Arora, A. et al., Oxidative stress and antioxidative system in plant, Review Article, Curr. Sci., İndia, vol. 82, 2002.

14. Kalefetođlu, T., Ekmekçi, Y., The Effect of Drought on Plant and Tolerance Mechanisms, G.Ü. Fen Bilimleri Dergisi, Ankara, 18(4), 723-740, 2005.
15. Monakhova, O.F., Chernyad'ev, I.I., Protective role of kartolin- 4 in wheat plants exposed to soil drought, Appl. Biochem. Microbiol. 38: 373-380, 2002.
16. Farrant, J.M., A comparison of mechanisms of desiccation tolerance among three angiosperm resurrection plant species, Plant Ecol., 151:29-39, 2000.
17. Tambussi, E.A., Bartoli, C.G, Beltrano, J., Guiamet, J.J. and Araus, J.L., Oxidative damage to thylakoid proteins in water-stressed leaves of wheat (*Triticum aestivum*), Physiol. Plant., 108: 398-404, 2000.
18. Srivalli, B., Sharma, G. And Khanna-Chopra, R., 'antioxidative defence system in upland rice cultivar subjected to increasing intensity of water stres followed by recovery', Physiol. Plant., 119: 503-512, 2003.
19. Alexieva, V., Ivanov, S., Sergiev, I., and Karanov, E., 'Interaction between stres', Bulg. J. Plant Physiol., Special Issue, 1-17, 2003.
20. Demiral, T., Türkan, İ., Does exogenous glycinebetaine affect antioksidative system of rice seedlings under NaCl treatment, Journal of Plant Physiology, 161: 1089-1100, 2004.
21. Zhou, F. et al.,Physiological and Growth Responses of Tomato Progenies Harboring the Betaine Alhyde Dehydrogenase Gene to Salt Stres, Journal of Integrative Plant biology, 49 (5): 628-637, 2007
22. Cicerali, N. I., Effect of stress on antioxidant defense systems of sensitive and resistant cultivars of lentil (*Lens culinaris* M), Yüksek Lisans Tezi, ODTÜ, Ankara, 2004.
23. Kanber, R., Kırda, C., Tekinel, O., Sulama Suyu Niteliđi ve Sulamada Tuzluluk Sorunları, Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Genel Yayın No: 21, Ders kitapları Yayın no:6, Adana, 1992.
24. Ayyıldız, M., Sulama Suyu Kalitesi ve Tuzluluk Problemleri, Ankara Üniv. Ziraat Fakültesi, Kültürteknik Bölümü, Ankara Üniv. Ziraat Fakültesi Yayınları: 1196, Ders Kitabı: 344, 282s, Ankara, 1990.
25. Ekmekçi, E., Kaplan, M., Kara, T., Tuzluluğun Bitki Gelişimine Etkisi, OMÜ Zir. Fak. Dergisi, 20(3): 118-125, 2005.

26. Kotuby, J., Koenig, R. and Kitchen, B., Salinity and Plant Tolerance, Utah State University Extension, AG-SO-03., Utah, 1997.
27. Prochazkova, D. et al., Oxidative stress and antioxidant activity as the basis of senescence in maize leaves, *Plant Science*, 161: 765-771, 2001.
28. Wei, Y.H., pang, C.Y., The Role of Mitochondria in human aging process, *Biotech International*, 17: 8-13, 2005.
29. Agarwal, S. et al., Role of ABA, salicylic acid, calcium and hydrogen peroxide on antioxidant enzymes induction in wheat seedlings, *Science Direct*, 559-570, 2005.
30. Martin, G.M., J.C. Baret, Reactive oxygen species as double-edged swords in cellular processes: low dose cell signalling versus high-dose toxicity, *Hum. Exp. Toxicol.* 21: 71-75, 2002.
31. Sairam, R.K., Srivastava, G.C., Changes in antioxidant activity in sub-cellular fractions of tolerant and susceptible wheat genotypes in response to long term salt stress, *Plant Science* 162: 897-904, 2002.
32. Davies, K.J.A., Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems, *IUBMB Life* 50, 279-289, 2000.
33. McKersie, D. B., Oxidative Stress” Retrieved October 25, 2000 from the World Wide Web: <http://www.agronomy.psu.edu/Courses/AGRO518/Oxygen.htm>.
34. Northwest Life Science Specialties NWLSS™ catalase activity assay data sheet E-mail: sales@nwlifescience.com
35. Creighton, T.E., *Encyclopedia of Molecular Biology*, Vols 1-4, Syf. 631-632, Wiley, 1999.
36. Oxford Biomedical Research USA. spectrophotometric assay for catalase www.oxfordbiomed.com.
37. Creighton, T.E. *Encyclopedia of molecular biology*, Vols 1-4 Syf. 632-634, Wiley, 1999.
38. Bennicelli, R.P. et al., The effect of soil aeration on superoxide dismutase activity, malondialdehyde level, pigment content and stomatal diffusive resistance in maize seedlings, *Environ. Exp. Bot.*, 39, 203–211, 1998.

39. Öztürk, R. et al., Purification and characterization of superoxide dismutase from *Phanerochaete chrysosporium*, *Enzyme Microb. Tech.*, 25, 392–399, 1999.
40. Sharp, K.H., Raven, E., Enzyme-substrat interactions in askorbate peroxidase, University of Leicester, Cambridge, UK, NPR, 2003.
41. Raven, E.L., Understanding functional diversity and substrate specificity haem peroxidases, University of Leicester, *Nat. Prod. Rep.*, 20, 367-381, 2003.
42. *OxisResearch™*A Division of OXIS health products, inc. spectrophotometric assay for glutathione reductase for research, [http:// www.oxfordbiomed.com](http://www.oxfordbiomed.com), Catalog Number 21018D data sheete.
43. Hou, W. C. et al., Detection of glutathione reductase after electrophoresis on native or sodium dodecyl sulfat polyacrylamide gels, *Electrophoresis.*, 25, 2926–2931, 2004.
44. Boyoğlu, S., Characterization of glutathione s-transferase activity in red pine (*Pinus brutia*, Ten.) variation in environmentally stressed seedlings, Yüksek Lisans Tezi, ODTÜ, Ankara, 2004.
45. Lo, W. J. et al., Enzymatic and nonenzymatic synthesis of glutathione conjugates: application to the understanding of a parasite's defense system and alternative to the discovery of potent glutathione s-transferase inhibitors ,*Bioconjugate Chem.*, 18, 109-120, 2007.
46. Keleş, Y., Öncel, I., Response of antioxidative defence system to temperature and water stres combinations in wheat seedlings, *Plant Science*, 163: 783-790, 2002.
47. Hilmi, Ş., Oksidanlar ve antioksidanlar. *THTDrg*, 48: 1-2, 44-49, 1994.
48. Gökpınar, Ş. et al., Algal Antioksidanlar E.Ü. Su Ürünleri Dergisi 23-Ek (1/1), 85-89, 2006.
49. Savova, I., Donev, T., ve Sholeva, Z., An investigation of the trehalose accumulation Dynamics by yeasts from genus *Saccharomyces*, *Journal of Culture Colections*, Vol. 2, 1997-1998p pp. 40-43.
50. Schlupepmann, H. ve ark., Trehalose 6-phosphate is indispensable for carbohydrate utilization and growth in *Arabidopsis thaliana*, *Molecular Plant Physiology*, Hollanda, 2003., Kandror, O., ve ark., Trehalose synthesis is

- induced upon exposure of *E. coli* to cold and is essential for viability at low temperatures, Department of cell biology, Harvard Medical School, 2002.
51. Kandrór, O. ve ark., Trehalose synthesis is induced upon exposure of *E. coli* to cold and is essential for viability at low temperatures, Department of cell biology, Harvard Medical School, 2002.
 52. Bor, M. ve ark., The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in leaves of sugar beet *Beta vulgaris* L. And wild beet *Beta maritima* L., Plant Sci., 164, 77-84, 2003.
 53. D'Amico, M.L. ve ark., The role of lipoic acid in the regulation of the redox status of wheat irrigated with 20% seawater, Plant .Phy. and Bio., 42 329-334, 2004.
 54. Demiral. T., Türkan, İ., Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance, Env. and Exp. Botany, 2004.
 55. Anamul Hoque, M. ve ark., Exogenous proline and glycinebetain increase NaCl-induced ascorbate-glutathion cycle enzyme activities, and proline improves salt tolerance more than glycinebetaine in tobacco Bright Yellow-2 suspension-cultured cells, J. Of Plant Phy., 2006.
 56. Sairam, R.K. ve ark., Role of antioksidant system in wheat genotypes tolerance to water stres, Biologia Plantarum 41 (3): 387-394, 1998.
 57. Türkan, İ. ve ark., Differential responses of lipip peroxidation and antioxidants in leavse of drought-tolerant *P. acutifolius* gray and drought sensitive *P. vulgaris* L.subjected to polyethylene glycol mediated water stres, Plant Science, 2004
 58. Anamul Hoque, M. ve ark., Exogenous proline mitigates the detrimental effects of salt stres more than exogenous betaine by increasing antioxidant enzyme activities, Journal of plant physiology, 2006).
 59. Misra, N., Gupta, A.K.,Effect of salinity and diffrent nitrogen source on the activity of antioxidant enzymes and indole alkaloid content in *Catharanthus roseus* seedlings, J. Of Plant Phy., 163, 11-18, 2006.
 60. Boscolo, R.S.P. ve ark., Aluminum-induced oxidative stres in maize, Phytochemistry, 62, 181-189, 2003.

61. Würde, E., Trehalose and the nitrogen fixing nodule symbiosis of legumes: studies on rhizobia deficient in the trehalose-6-phosphate synthase gene *otsA*, Almanya, 2004.
62. Meloni, D.A. ve ark., Photosynthesis and activity of superoksid dismutase, peroksidase and glutathione reductase in cotton under salt stres, Environ. Exp. Bot., 49, 69-76, 2003.
63. Vivek, D. ve ark., Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativa* L. cv. Azad, J. Exp. Bot., 52, 1101-1109, 2001.
64. Kumar, S.G. ve ark., NaCl effect of proline metabolism in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) with contrasting salt tolerance, Plant Sci., 165 (6): 1245-1251, 2003.
65. Sankar, B. ve ark., Drought-induced biochemical mofication and proline metabolism in *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench, Acta Bot. Croat, 66 (1), 43-56, 2007.

EKLER

EK-1.

Hoagland Çözeltisi Hazırlanışı (1X)

| Kimyasallar | Stok Solüsyon | Kul.Miktar(mL/L) |
|--|----------------|------------------|
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 24.6g / 100mL | 1.0 mL |
| KH ₂ PO ₄ | 13.6 g / 100mL | 0.5 mL |
| KNO ₃ | 10.1 g / 100mL | 2.5 mL |
| Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O | 23.6 g / 100mL | 2.3 mL |

Solüsyon A : Mikronütrient solüsyonu 0.5 mL

Solüsyon B (Fe-EDTA) : Fe-EDTA solüsyonu 20.0 mL

NOT: Fe-EDTA solüsyonu otoklavdan sonra eklenecek.

Fe-EDTA solüsyonu dışındaki diğer solüsyonlar hazırlandıktan sonra pH 5.8'e ayarlanacak. pH ayarlamak için 1N NaOH (35 µL /1 L) veya 1M HCl kullanılacak.

Solüsyon A:

| Eklenen Maddeler | Stok Solüsyon (1X) |
|--|---------------------|
| 1- H ₃ BO ₃ | 2.86 g / L |
| 2- MnCl ₂ ·4H ₂ O | 1.82 g / L |
| 3- ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 0.22 g / L |
| 4- Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O | 0.09 g / L |
| 5- CuSO ₄ ·5H ₂ O | 0.09 g / L |

Solüsyon B:

| Eklenen Maddeler | Stok Solüsyon (1X) |
|--|---------------------|
| 1-FeCl ₃ ·6H ₂ O | 0.121 g / 250mL |
| 2-EDTA (Na ₂) | 0.375 g / 250mL |

Stres Çözeltileri Hazırlanışı

- 200 mM NaCl → tuz stresi için 11.7 g NaCl / 1000 ml H₂O
- %18 PEG (Mr 8000) 180 g PEG 1000 ml H₂O
- Kontrol sadece hoglan ile yapılmıştır.

EK-2.

Spectrofotometrik Ninhidrinli Prolin Tayin Yöntemi

1. 250 mg taze veya sıvı azotta dondurulmuş örnek %3 lük sülfosalisilik asit çözeltisi ile havan yardımı ile ezilir. Homojenizasyon işlemi; önce bitki dokusu 1 mL %3 lük sülfosalisilik asit çözeltisi ile havanda ezilir ve bu homojenatın üzerine 4 mL daha eklenerek toplam 5 mL e tamamlanır. Pastör pipeti yardımı ile santrifüj tüplerine aktarılır.
2. 5 000 x g de oda sıcaklığında 10 dakika santrifüj edilir.
3. Süpernatanttan 2 mL alınıp 13 x 160 mm lik tüpe aktarılır. Bunun üzerine 2 ml Gasiyal Asetik asit eklenip vorteks ile karıştırılır ve daha sonra 2 ml asetik asit-fosforik asit ninhidrin çözeltisi eklenir ve tekrar karıştırılır.
4. Hot-plate üzerinde kaynamaya bırakılır. Kaynamaya başlayınca zaman başlatılıp 1 saat süresince kaynatılır.
5. Süre sonunda tüpler çeşme suyu ile ani soğutmaya bırakılır.
6. Soğutulmuş örneklerin üzerine 4 mL Toluen eklenip karıştırılır.
7. Tüpteki karışımın üzerinden tolüenli kısım alınıp Cam veya Quarts küvette OD 520 de okunur. Kör (Blank) olarak bitki örneği hariç tüm işlemler aynen takip edilir yada tolüen kullanılır.

%3 lük Sülfosalisilik Asit Çözeltisi

3 gr Sülfosalisilik Asit (w/v) dH₂O ile 100 mL ye tamamlanır.

6 M Fosforik Asit

40.8 gr (w/v) dH₂O ile 100 mL ye tamamlanır [Yaklaşık 40.5 mL % 85 lik Orto-fosforik asit (v/v) olarak yeterlidir].

Asit Ninhidrin Çözeltisi

1 gr ninhidrin 25 mL Gasiyal Asetik Asit + 16 mL 6 M Fosforik Asit içinde çözülür. Ninhidrin ışığa duyarlıdır. Solüsyon Aliminyum Folyo ile sarılır. Çözünmesi biraz zaman aldığı için 40 °C gibi ısıda belirli bir süre

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Ahmet Gencer YEDİYILDIZ

Baba Adı: Nuri

Anne Adı: Sevim

Doğum Yeri: Aybastı/ORDU

12.01.1977 tarihinde ORDU İli, Aybastı İlçesi'ne bağlı Sarıyar Köyü'nde doğdu. İlkokulu Sarıyar Köyü'nde ve Orta Öğrenimini Aybastı Çok Programlı Lisesi'nde tamamladı. 1996 yılında Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nü kazandı ve 2000 yılında bu bölümden mezun oldu. 2002 yılında Ağrı İli, Aşkale İ.Ö.O'unda öğretmen olarak göreve başladı. 2004 yılında Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisansı kazandı. 2005-2008 yılları arasında Kayseri'de öğretmen olarak görev yaptı. Halen Giresun İli Dereli İlçesi'nde, Dereli Çok Programlı Lisesi'nde Biyoloji Öğretmeni olarak görev yapmaktadır. Evli ve bir çocuk babasıdır.

Adres: Aybastı/ORDU

Tel : 0 505 295 59 62 / 0 452 715 20 16

Elektronikposta: ahmet_yediyildiz@mynet.com