

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

134586

GENÇ PİRİNÇ FİDELERİNE DIŞARIDAN
GLİSİNΒETAİN UYGULANMASIYLA, TUZA
(NaCl) TOLERANSININ
ARTTIRILMASINDA ANTİOKSİDANT
ENZİM AKTİVİTESİNİN ROLÜNÜN
ARAŞTIRILMASI

DEMİRAL, Tijen
Biyoloji Anabilim Dalı
Bilim Dalı Kodu: 401.01.00
Sunuş Tarihi : 10. 01. 2003

Tez Danışmanı : Prof. Dr. İsmail TÜRKAN

Bornova-İZMİR

134586
T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ
T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

Sayın Tijen DEMİRAL tarafından YÜKSEK LİSANS tezi olarak sunulan “Genç Pirinç Fidelerine Dışarıdan Glisinbetain Uygulanmasıyla Tuza (NaCl) Toleransının Arttırılmasında Antioksidant Enzim Aktivitesinin Rolünün Araştırılması” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 10/ 01/ 2003 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Prof. Dr. İsmail TÜRKAN

Raportör Üye : Doç. Dr. Filiz ÖZDEMİR

Üye : Yrd. Doç. Dr. Sami DOĞANLAR

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

ÖZET**GENÇ PİRİNÇ FİDELERİNE DIŞARIDAN
GLİSİNBETAİN UYGULANMASIYLA, TUZA (NaCl)
TOLERANSININ ARTTIRILMASINDA ANTİOKSİDANT
ENZİM AKTİVİTESİNİN ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

DEMİRAL, Tijen

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Yöneticisi: Prof. Dr. İsmail TÜRKAN

Ocak 2003, 75 Sayfa

Bu çalışmada, farklı tuz toleransına sahip iki çeltik (*Oryza sativa* L.) çeşidi (tuza toleranslı Pokkali ve tuza duyarlı IR-28)'na dıştan uygulanan glisinbetainin (GB), NaCl stresine bağlı olarak oluşan oksidatif zarara karşı koruyucu rolü, büyüme parametreleri (kök ve gövde), bağıl su içeriği, net fotosentetik verim, fotosentetik pigment içeriği, protein, prolin, malondialdehit miktarları ve süperoksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (AP), katalaz (CAT), peroksidaz (POX) ve glutasyon redüktaz (GR) gibi antioksidant enzim aktiviteleri bakımından karşılaştırma yapılarak araştırılmıştır.

GB ön uygulaması, her iki çeşitte tuz stresıyla oluşan tepkileri farklı şekillerde etkilemiştir. Tuz stresine bağlı olarak her iki kültivarın büyüme parametrelerinde, fotosentetik veriminde, pigment ve bağıl su içeriğinde oluşan azalma glisinbetain sayesinde önlenmiştir. Pokkali'de gerek temel gerekse NaCl stresıyla oluşan lipid peroksidasyonu IR-28'den daha düşük düzeydedir. Tuz

VI

uygulamasına bağlı olarak Pokkali'nin SOD, AP, CAT ve GR aktivitelerinde artış, POX aktivitesinde ise azalma görülürken; IR-28'in SOD, AP, ve POX aktivitelerinde artış, CAT ve GR aktivitelerinde ise azalma görülmüştür. GB  n muamelesi Pokkali'de, tuza bağlı olarak artan SOD, AP, CAT ve GR aktivitelerini azaltmış ve tuz stresiy le azalan POX'ı arttırmıştır. Buna karşın GB  n uygulamasıyla IR-28'de NaCl stresiy le SOD ve AP'ın artan aktivitelerinin daha çok teşvik edildiği, CAT ve GR'da oluşan azalmanın önlendiği ve POX'daki artışın ise azaldığı görülmüştür. Dolayısıyla dıştan GB uygulaması her iki k ltivardaki antioksidant enzim aktivitelerini farklı şekillerde etkilemiştir.

Elde edilen bu bulgular, GB uygulamasının Pokkali ve IR-28'i NaCl stresinden koruyarak, k ltivarların NaCl'e bağlı oksidatif streten daha az etkilenmesini sağlamıştır.

Anahtar sözcükler : Antioksidant enzimler,  eltik (*Oryza sativa* L.), lipit peroksidasyonu, tuz stresi

ABSTRACT

**INVESTIGATION OF THE ROLE OF ANTIOXIDANT
ENZYME ACTIVITIES IN YOUNG RICE SEEDLINGS
APPLIED WITH EXOGENOUS GLYCINEBETAIN UNDER
SALT STRESS IN RELATION TO SALT TOLERANCE
INCREMENT**

DEMİRAL, Tijen

MSc in Biology Department

Supervisor: Prof. Dr. İsmail TÜRKAN

January 2003, 75 pages

In this study, the role of exogenously applied glycinebetaine (GB) in the alleviation of oxidative damage caused by NaCl stress was studied in view of growth parameters, relative water content, net photosynthetic efficiency, photosynthetic pigments, protein, proline, malondialdehyde contents and activities of some antioxidant enzymes such as superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, catalase, peroxidase, and glutathione reductase in two rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salt tolerance (salt tolerant Pokkali and salt sensitive IR-28), comparatively.

GB application affected salt stress responses of two rice cvs. in a different way. Reductions in growth parameters, photosynthetic efficiency, pigment contents and relative water content of rice cvs. under salt stress were compensated by GB application. Both constitutive and induced lipid peroxidation

VIII

levels of Pokkali induced by NaCl were lower than of IR-28. While activities of SOD, AP, CAT and GR increased but POX decreased in Pokkali, activities of SOD, AP, and POX increased but CAT and GR decreased in IR-28 under salt stress. GB application decreased and increased, respectively, enhanced activities of SOD, AP, CAT, GR and reduced activity of POX in Pokkali under salt stress. Whereas, GB treatment more induced increased activities of SOD and AP, prevented CAT and GR activities from decreasing and also decreased increased activity of POX in IR-28 under NaCl stress. Therefore, exogenously applied GB affected activities of antioxidant enzymes differently in both rice cultivars.

These findings suggest that GB treatment protects Pokkali and IR-28 against NaCl stress by lessening the effect of oxidative damage.

Keywords: Antioxidant enzymes, rice (*Oryza sativa* L.), lipid peroxidation, salt stress.

IX

TEŞEKKÜR

Bu Yüksek Lisans tez çalışması, Harran Üniversitesi Araştırma Fon Saymanlığı 249 No'lu proje ile desteklenmiştir. Adı geçen kuruma sağladığı destekten dolayı teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarım esnasında hafta sonları dahi beni laboratuarda yalnız bırakmayan ve büyük bir sabırla bana destek veren aileme, çalışma konumun belirlenmesinde, çalışma koşullarımın en iyi şekilde sağlanmasında ve konuyla ilgili literatür bilgilerine ulaşmamda ilgisini esirgemeyen, büyük maddi ve manevi desteklerini gördüğüm danışmanım Prof. Dr. İsmail TÜRKAN'a, bilimsel açıdan bana kazandırdığı önemli tecrübelerin yanı sıra, insani değerlere sahip bir bilim adamının da bizzat örneğini kendisinde gördüğüm sevgili Doç. Dr. Filiz ÖZDEMİR'e, her zamanki sevecenliği, samimiyeti, yardımseverliği ile beni motive ettiği için sevgili Dr. Melike BOR'a, çalışmalarım esnasında benden özverili yardımlarını hiç esirgemeyen arkadaşlarım Araş. Gör. A. Hediye SEKMEN'e, ve Hulusi KOCA'ya, ve çalışmada kullandığım tohumların sağlanmasında yardımcı olduğu için Uluslararası Çeltik Araştırma Enstitüsü'nden (IRRI, Filipinler) Digna R. IZON'a yürekten teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	V
ABSTRACT.....	VII
TEŞEKKÜR.....	IX
İÇİNDEKİLER.....	XI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XIII
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	XVII
1. GİRİŞ.....	1
2. MATERYAL METOD.....	23
2.1 Bitki Materyali ve Glisinbetain Uygulamaları.....	23
2.2 Büyüme Parametreleri.....	24
2.3 Bağlı Su İçeriği.....	24
2.4 Klorofil Floresans Ölçümleri.....	24
2.5 Fotosentetik Pigment İçeriği.....	25
2.6 Antioksidant Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	25
2.6.1 Enzim ekstraktlarının hazırlanması.....	25
2.6.2 Süperoksit dismutaz enziminin aktivite tayini.....	25
2.6.3 Askorbat peroksidaz enziminin aktivite tayini.....	26
2.6.4 Katalaz enziminin aktivite tayini.....	26
2.6.5 Peroksidaz enziminin aktivite tayini.....	27
2.6.6 Glutasyon redüktaz enziminin aktivite tayini.....	27
2.7 Protein Miktarının Belirlenmesi.....	27
2.8 Prolin Miktarının Belirlenmesi.....	27

İÇİNDEKİLER (devam)

	Sayfa
2.9 Lipit Peroksidasyonu.....	28
3. SONUÇLAR.....	32
3.1 Büyüme Parametrelerinin Sonuçları.....	32
3.2 Bağlı Su İçeriği Sonuçları.....	36
3.3 Klorofil Flüoresans Ölçüm Sonuçları.....	37
3.4 Fotosentetik Pigment İçeriği Sonuçları.....	39
3.5 Antioksidant Enzim Aktivitelerinin Sonuçları.....	41
3.5.1 Süperoksit dismutaz enzim aktivite sonuçları.....	41
3.5.2 Askorbat peroksidaz enzim aktivite sonuçları.....	43
3.5.3 Katalaz enzim aktivite sonuçları.....	44
3.5.4 Peroksidaz enzim aktivite sonuçları.....	46
3.5.5 Glutasyon redüktaz enzim aktivite sonuçları.....	48
3.6 Total Protein Miktarı Sonuçları.....	49
3.7 Prolin Miktarı Sonuçları.....	51
3.8 Lipid Peroksidasyonu Sonuçları.....	52
4. TARTIŞMA.....	54
5. KAYNAKLAR DİZİNİ.....	63
6. ÖZGEÇMİŞ.....	75

XIII

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 : <i>E. coli</i> 'de (1), bitkilerde (2) ve <i>Arthrobacter globiformis</i> 'te (3) görülen Kolin-glisinbetain metabolik yolu.....	10
2.1 : Tuz stresinden önce (0. gün), GB ve NaCl uygulanmamış kontrol grubundaki (sağdaki havuz), ve 120mM NaCl uygulanacak olan GB uygulanmamış gruptaki (ortadaki ve soldaki havuzlar) çeltik bitkileri.....	29
2.2 : Tuz uygulamasından önce (0. gün), GB uygulanmamış kontrol grubundaki çeltik bitkileri. (P) : Pokkali; (IR) : IR-28.....	29
2.3 : Tuz uygulamasının 7. gününde, GB ve NaCl uygulanmamış kontrol grubundaki (sağdaki havuz) ve 120mM NaCl uygulanmış fakat GB uygulanmamış gruptaki (soldaki havuzlar) çeltik bitkileri. (P):Pokkali, (IR):IR-28.....	30
2.4 : Tuz uygulamasından önce GB uygulanmış (sağdaki havuz) ve GB uygulanmamış (soldaki havuz) çeltik kültürlerinin tuz stresinden sonraki (7. gün) görünümleri. (P):Pokkali, (IR):IR-28.....	30
2.5 : Tuz uygulamasından sonra (7. gün), GB ve NaCl uygulanmamış kontrol grubundaki (sağdaki havuz) ve 120mM NaCl uygulanmış fakat GB uygulanmamış gruptaki (soldaki havuz) çeltik bitkileri. (P):Pokkali, (IR):IR-28.....	31

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil

Sayfa

2.6 : Tuz uygulamasından sonra (7. gün), GB ve 120mM NaCl uygulanmış gruptaki (sağdaki havuz) ve sadece GB uygulanmış kontrol grubundaki (soldaki havuz) çeltik bitkileri.	
(P):Pokkali, (IR):IR-28.....	31
3.1 : İki farklı çeltik (<i>Oryza sativa</i> L.) kùltivarının (Pokkali ve IR-28), glisinbetain (15 mM) uygulamasından sonra tuz stresine (120mM NaCl) maruz bırakılmalarını takiben 0. ve 7. günlerde total SOD aktivitesinde (ünite / mg protein) gözlenen değışimler.....	42
3.2 : İki farklı çeltik (<i>Oryza sativa</i> L.) kùltivarının (Pokkali ve IR-28), glisinbetain (15 mM) uygulamasından sonra tuz stresine (120mM NaCl) maruz bırakılmalarını takiben 0. ve 7. günlerde AP aktivitesinde (ünite / mg protein) gözlenen değışimler.....	44
3.3 : İki farklı çeltik (<i>Oryza sativa</i> L.) kùltivarının (Pokkali ve IR-28), glisinbetain (15 mM) uygulamasından sonra tuz stresine (120mM NaCl) maruz bırakılmalarını takiben 0. ve 7. günlerde CAT aktivitesinde (ünite / mg protein) gözlenen değışimler.....	45
3.4 : İki farklı çeltik (<i>Oryza sativa</i> L.) kùltivarının (Pokkali ve IR-28), glisinbetain (15 mM) uygulamasından sonra tuz stresine (120mM NaCl) maruz bırakılmalarını takiben 0. ve 7. günlerde POX aktivitesinde (ünite / mg protein) gözlenen değışimler.....	47

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.5 : İki farklı çeltik (<i>Oryza sativa</i> L.) kültivarının (Pokkali ve IR-28), glisinbetain (15 mM) uygulamasından sonra tuz stresine (120mM NaCl) maruz bırakılmalarını takiben 0. ve 7. günlerde GR aktivitesinde (�nite / mg protein) gözlenen değişimler.....	49
3.6 : İki farklı çeltik (<i>Oryza sativa</i> L.) kültivarının (Pokkali ve IR-28), glisinbetain (15 mM) uygulamasından sonra tuz stresine (120mM NaCl) maruz bırakılmalarını takiben 0. ve 7. günlerde PR miktarında (mg/ g yaş ağırlık) gözlenen değişimler.....	50
3.7 : İki farklı çeltik (<i>Oryza sativa</i> L.) kültivarının (Pokkali ve IR-28), glisinbetain (15 mM) uygulamasından sonra tuz stresine (120mM NaCl) maruz bırakılmalarını takiben 0. ve 7. günlerde prolin miktarında (�mol/g yaş ağırlık) gözlenen değişimler.....	51
3.8 : İki farklı çeltik (<i>Oryza sativa</i> L.) kültivarının (Pokkali ve IR-28), glisinbetain (15 mM) uygulamasından sonra tuz stresine (120mM NaCl) maruz bırakılmalarını takiben 0. ve 7. günlerde malondialdehit miktarında (nmol/g yaş ağırlık) gözlenen değişimler.....	52

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
3.1 : İki farklı çeltik (<i>Oryza sativa</i> L.) kùltivarının (Pokkali ve IR-28), glisinbetain (15 mM) uygulamasından sonra tuz stresine (120mM NaCl) maruz bırakılmalarını takiben 0. ve 7. günlerde gövde ve kök uzunluklarında (cm) gözlenen değışimler.....	33
3.2 : İki farklı çeltik (<i>Oryza sativa</i> L.) kùltivarının (Pokkali ve IR-28), glisinbetain (15 mM) uygulamasından sonra tuz stresine (120mM NaCl) maruz bırakılmalarını takiben 0. ve 7. günlerde gövde yaş (YA.)ve kuru ağırlığında (KA.) (g) gözlenen değışimler.....	34
3.3 : İki farklı çeltik (<i>Oryza sativa</i> L.) kùltivarının (Pokkali ve IR-28), glisinbetain (15 mM) uygulamasından sonra tuz stresine (120mM NaCl) maruz bırakılmalarını takiben 0. ve 7. günlerde kök yaş (YA.)ve kuru ağırlığında (KA.) (g) gözlenen değışimler.....	35
3.4 : İki farklı çeltik (<i>Oryza sativa</i> L.) kùltivarının (Pokkali ve IR-28), glisinbetain (15 mM) uygulamasından sonra tuz stresine (120mM NaCl) maruz bırakılmalarını takiben 0. ve 7. günlerde yaprak bağıl neminde (%) gözlenen değışimler.....	36
3.5 : Tuza toleranslı çeltik (<i>Oryza sativa</i> L.) kùltivarının (Pokkali), glisinbetain (15 mM) uygulamasından sonra tuz stresine (120mM NaCl) maruz bırakılmasını takiben 7 gün boyunca fotosentetik veriminde (F_V/F_M) meydana gelen değışimler.....	38

XVIII

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

Çizelge

Sayfa

3.6 : Tuza duyarlı çeltik (<i>Oryza sativa</i> L.) kültivarının (IR-28), glisinbetain (15 mM) uygulamasından sonra tuz stresine (120mM NaCl) maruz bırakılmasını takiben 7 gün boyunca fotosentetik veriminde (F_v/F_m) meydana gelen değişimler.....	38
3.7 : İki farklı çeltik (<i>Oryza sativa</i> L.) kültivarının (Pokkali ve IR-28), glisinbetain (15 mM) uygulamasından sonra tuz stresine (120mM NaCl) maruz bırakılmalarını takiben 0. ve 7. günlerde klorofil a miktarında ($mg\ g^{-1}$ yaş ağırlık) gözlenen değişimler.....	40
3.8 : İki farklı çeltik (<i>Oryza sativa</i> L.) kültivarının (Pokkali ve IR-28), glisinbetain (15 mM) uygulamasından sonra tuz stresine (120mM NaCl) maruz bırakılmalarını takiben 0. ve 7. günlerde klorofil b miktarında ($mg\ g^{-1}$ yaş ağırlık) gözlenen değişimler.....	40
3.9 : İki farklı çeltik (<i>Oryza sativa</i> L.) kültivarının (Pokkali ve IR-28), glisinbetain (15 mM) uygulamasından sonra tuz stresine (120mM NaCl) maruz bırakılmalarını takiben 0. ve 7. günlerde karotenoid miktarında ($mg\ g^{-1}$ yaş ağırlık) gözlenen değişimler.....	41

GENÇ PİRİNÇ FİDELERİNE DIŞARIDAN GLİSİNİBETAIN UYGULANMASIYLA, TUZA (NaCl) TOLERANSININ ARTTIRILMASINDA ANTİOKSİDANT ENZİM AKTİVİTESİNİN ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

1. GİRİŞ

Karasal ökaryotlar, toprak-atmosfer devamlılığının ara bir fazını oluştururlar. Bitki temelde gelecek tohum neslini üretebilme çabasıyla, çevresel sinyaller, mineral beslenmedeki değişim, suyun miktarında ve kalitesinde oluşan farklılıklar, sıcaklık değişimi, dışarıdan (eksojen) kimyasal madde (doğal veya sentetik) uygulaması gibi her türlü stresle başa çıkmak zorunda olan oldukça duyarlı bir protoplazma kitlesidir. Bitki her bir strese karşı, farklı büyüme dönemlerinde farklı tepkiler gösterir. Farklı gen içerikleri, farklı çevresel koşullarda bulunan bitkilerin hayatta kalmalarına olanak sağlamıştır. Bu durum, farklı streslere adaptasyonun bir etmeni olmaktan daha ziyade, farklı stres koşullarında hayatta kalabilmenin bir ölçüsüdür. Bu nedenle bitkinin hayatta kalma şansını hangi mekanizmaların arttırdığının bilinmesi, tolerans/direnç reaksiyonlarını yöneten kompleks mekanizmaların anlaşılması bakımından büyük bir önem taşımaktadır (Wilkinson, 1994).

Bir çok çalışmada, abiotik stresin ıslahını amaçlayan yöntemler araştırılmıştır. Fakat piyasada bununla ilgili ticari ürünler bulunmamaktadır. Bunun nedeni olasılıkla, bu özelliklerin nicel olmasından ve aslında bu süreçlerle ilgili olarak da çok az şey bilinmesinden kaynaklanmaktadır. Mineral stresi, herbisid ve patojen direnci, tuzlu toprak ve sıcaklık stresi toleransı, su ve gübre alma-kullanma verimi gibi taktikler; üretim girdilerini azaltmak, çevresel kirliliği en aza indirmek ve güçlü bir ekolojik sistem oluşturmak için potansiyel olarak oldukça yararlı yöntemlerdir. Sürdürülebilir tarım uygulamaları, edafik çevreyi bitkinin ihtiyaçlarına göre değiştirmek yerine bitkinin kısıtlı girdilere sahip

ortamlara tolere edebilmelerini sağlayan genetik manipölasyonlar yapma yönünde değişmiştir. Bu yüzden, çevresel streslere karşı bitkilerin gösterdiği direnci arttırmada, gerek savunmada rol alan kompleks sistemlerin işleyişinin ortaya çıkarılmasının, gerekse tolerans/direnç reaksiyonlarını yöneten mekanizmaların anlaşılmasının özel bir önemi vardır. Bu çevresel streslerden birini oluşturan tuzluluk, yaygın bir şekilde tahılların verimini ve dağılımını sınırlayan en önemli çevresel faktörlerden birisidir. Dünyanın tarım yapılan bir çok bölgesinde diğer tuzların oluşturduğu stresin de önemli olmasına karşın, en sık karşılaşılan tuzluluk sorununu NaCl oluşturmaktadır. Radyoaktif markırların kullanılmasıyla Na^+ katyonu ve Cl^- anyonunun oluşturduğu zararlı etkiler arasında net bir farklılık bulunmuştur. Bununla birlikte genel olarak her iki iyon da fotosentezi önemli derecede engellemekte ve sonuçta oksidatif hasara neden olmaktadır.

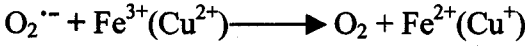
Ortamda yüksek konsantrasyonda tuz (tipik olarak Na^+) bulunması, bitki hücrelerinden su çıkışını ve hücre içine aşırı miktarda iyon girmesini sonuçlandırır. Sitoplazmada Na^+ iyonu konsantrasyonundaki artış, bitki hücrelerinde iyon dengesinin, bir çok fizyolojik sürecin ve enzimatik aktivitenin bozulmasına ve bunun sonucunda hücre büyümesinin önlenmesine neden olur (Dash ve Panda, 2001). Bu nedenle, eğer ortam düzelmezse her iki iyonun varlığı, ekonomik kayıplara neden olur.

Özellikle fazla sulama yapılan tarımsal alanlarda giderek artan bir sorun haline gelen tuzluluk, yüksek bitkilerde çok çeşitli metabolik bozukluklara neden olur. Ekonomik olarak en önemli kültür bitkileri tuzlu toprak koşullarına oldukça duyarlıdır. Bu duyarlı türlerden biri olan çeltik, dünya popülasyonun yaklaşık 1/3'den fazlasının en temel besin maddesini oluşturur ve insan beslenmesinde önemli bir yer tutar. Tahıl üretiminde dünyanın ilk 10 ülkesi içinde yer alan Türkiye'de özellikle Karadeniz ve Marmara Bölgeleri'nde yapılan çeltik

retiminde, GAP Projesiyle birlikte önemli artışlar beklenmektedir. Türkiye yüzölçümünün yaklaşık onda biri büyüklüğünde (75 bin km²) bir alanı içine alan ve dünyada şimdiye kadar yapılmış en entegre projelerden biri olan GAP Projesi 2005 yılında tamamlandığında, bölgedeki 3.1 milyon hektarlık işlenebilir tarım arazisinin 1.7 milyon hektarlık kısmı (%55) sulanabilecektir. GAP'ın tamamlanmasıyla birlikte ürün deseninde de büyük değışiklikler olması beklenmektedir. Türk halkının temel besin maddeleri arasına girdiğı için üretimi tüketimine yetmeyen ve bu nedenle her yıl önemli miktarda ithal edilen eltiğın üretiminde, hem ekiliş alanlarına hem de verimlilik artışlarına bağılı olarak önemli artışlar beklenmektedir.

Doğal ve tarımsal sistemlerde yaygın bir stres oluşturan topraktaki yüksek sodyum (Na⁺) konsantrasyonunun etkisiyle su potansiyeli ve iyon dağılımında oluşan dengesizlikler, oksidatif hasara neden olan oksijen radikallerin oluşumunu teşvik eder. Tuz stresinin yanı sıra kuraklık, düşük sıcaklık ve donma gibi stres faktörleri, magnezyum veya potasyum kıtlığı gibi besin sınırlamaları, ozon ve kükürt dioksit gibi hava kirleticileri, paraquat ve asiflorfen gibi herbisitler de, hücresel yapılara zarar veren oksijen radikallerinin oluşumunu arttırmaktadır (Sato ve Murata, 1998). Ayrıca, H₂O₂ (hidrojen peroksit), süperoksit (O₂⁻) radikalleri, hidroksil radikalleri (•OH) ve tek değerklikli oksijen (¹O₂) gibi aktif oksijen türleri bitki hücrelerinde meydana gelen kloroplastik, mitokondriyal, ve peroksizomal oksidatif reaksiyonlarla da; üretilmektedir. Moleküler oksijen (O₂)'in oldukça kararlı bir yapıya sahip olmasına karşın, yaşamsal reaksiyonların talihsiz bir sonucu olarak veya streslerin teşvikiyle oluşan bu aktif oksijen türleri, koruyucu mekanizmalar işlev grmediğı taktirde, sadece bitkilerin değıl, herhangi bir aerobik organizmanın hücre yapı ve işlevine zarar verebilir. Stresiz koşullarda, antioksidant savunma sistemi aktif oksijen türlerine karşı gerekli korunmayı sağılar (Fridowich, 1998; akmak ve ark., 1993).

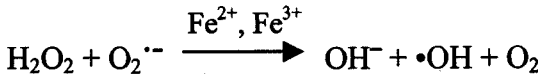
Yüksek yapılı bitkilerde, fotosentetik elektron transferi esnasında, ferrodoksin çok fazla indirgendiği zaman elektronlar süperoksit radikalleri oluşturmak üzere fotosistem I (PS I)'den oksijene transfer olurlar. Bu süreç Mehler Reaksiyonu olarak isimlendirilir (Heldt, 1997). Süperoksit radikali kimyasal bakımdan çok kararsız bir moleküldür. Bu radikal, hücrede mevcut olan Fe^{3+} ve Cu^{2+} metal iyonlarını indirger ve kararlı hale geçer (O_2).



Bu yüzden süperoksit radikallerinin etkin bir şekilde ortadan kaldırılması gerekir. Tilakoid zarında bulunan Süperoksit dismutaz (SOD; süperoksit: süperoksit oksidoredüktaz, EC 1.15.1.1) enzimi, süperoksitin H_2O_2 ve O_2 'ne dönüşümünü katalizleyerek savunma sisteminde anahtar bir rol oynar. Bu reaksiyona 2 proton alınımı eşlik eder (Bowler ve ark.,1992).

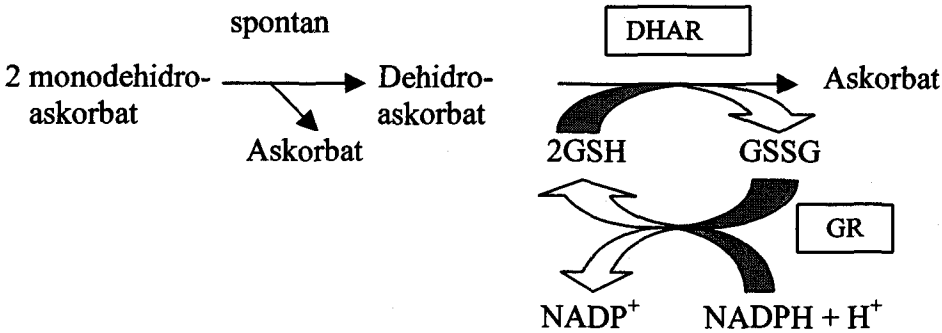


İndirgenmiş metal iyonları varlığında, süperoksit ve hidrojen peroksit, Haber-Weiss reaksiyonu ile hidroksil radikallerini oluşturmak üzere tepkimeye girebilir (Bowler ve ark., 1992).



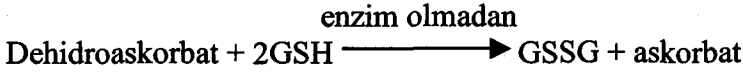
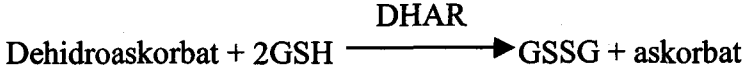
Hidroksil radikali ($\cdot OH$) de çok kararsız bir molekül olup, oksidasyon ile enzimlere ve lipitlere zarar verir. Bitki hücresi $\cdot OH$ radikaline karşı koruyucu enzimlere sahip değildir. Bu nedenle, $O_2^{\cdot-}$ 'in SOD tarafından hızlıca elimine edilmesi sayesinde metal iyonlarının indirgenmesi önlenmiş olur. Fakat SOD aktivitesiyle oluşan H_2O_2 'in de derhal ortadan kaldırılması gerekir, çünkü kloroplastlarda CO_2 -indirgenme döngüsünde görev alan bir çok enzim

(fruktozbifosfataz, ribulozfosfat kinaz, NADP-gliseraldehit fosfat dehidrogenaz v.b.) hidrojen peroksit'e oldukça duyarlı olduğundan CO_2 fiksasyonu inhibe edilmektedir (Satoh ve Murata, 1998). Biyolojik sistemlerden H_2O_2 'nin uzaklaştırılmasında gliksizomlar, peroksizomlar ve mitokondride yer alan **katalaz** enzimleri ile, çeşitli formlardaki **peroksidazlar** görev almaktadır. Askorbat peroksidazlar (AP; EC 1.11.1.11) sitozolde, peroksizomlarda ve kloroplastların tilakoid zarlarında bulunurlar (Nakano ve Asada, 1981; Asada, 1992). Peroksizomlarda bulunan AP, fotorespirasyonun glikolat metabolizmasıyla bol miktarda üretilen H_2O_2 'nin uzaklaştırılmasında katalaz enzimine yardımcı olmaktadır. AP, askorbatı elektron vericisi olarak kullanarak H_2O_2 'i suya indirger (Asada, 1992). Bitki hücrelerinin önemli bir antioksidantı olan askorbat, AP enzimi tarafından monodehidroaskorbat (MDHA) radikaline okside edilir. MDHA, kloroplast stromasında ve sitozolde bulunan, NAD(P)H bağımlı bir monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR; EC 1.6.5.4) enzimi tarafından askorbata indirgenir veya MDHA, indirgenmiş ferrodoksin aracılığıyla spontan olarak PS-I tarafından yeniden askorbata dönüştürülür. 2 molekül MDHA radikali bir başka alternatif olarak Askorbat (Asc) ve dehidroaskorbata parçalanabilir.



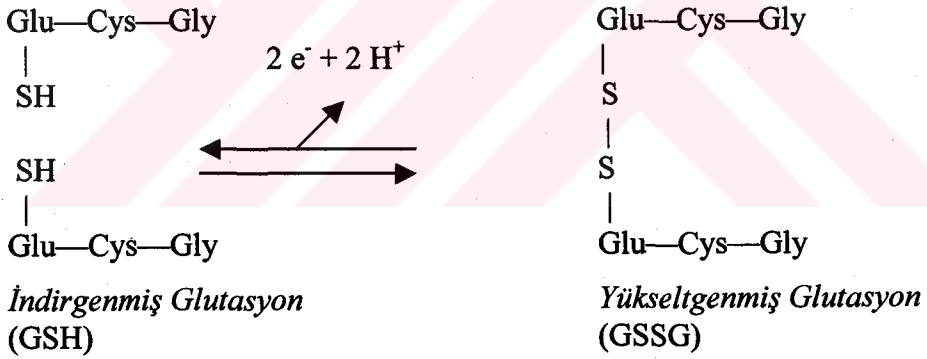
MDHA hızlıca Asc ve DHA'a parçalandığından dolayı hücrelerin MDHA konsantrasyonları genellikle düşüktür. MDHA radikali, lipid gibi diğer moleküllerle hemen etkileşime girmediğinden nispeten zararsızdır.

Dehidroaskorbat (DHA)'tan, glutasyonun yükseltgenmesiyle askorbat üretilir ve bu reaksiyon Dehidroaskorbat redüktaz (DHAR; EC 1.8.5.1) enzimi tarafından katalizlenir.

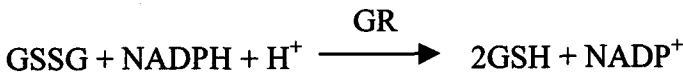


Glutasyonun metabolik düzenleyici ve antioksidant olarak oynadığı bir çok rol (Noctor ve Foyer, 1998) onun glutasyon disülfid'e (GSSG) okside olmasıyla sonuçlanır. Glutasyonun oksidasyonu, 2 glutasyon molekülündeki sistein aminoasitleri arasında bir disülfid bağının oluşmasıyla gerçekleşir.

Glutasyonun redoks reaksiyonu:



Fakat glutasyon işlevlerinin birçoğunu indirgenmiş formda (GSH) gerçekleştirebilir. Okside olmuş glutasyonun (GSSG), GSH'a indirgenmesi Glutasyon redüktaz enzimi (GR) tarafından, NADPH bağımlı bir reaksiyonla gerçekleştirilir (Foyer ve Halliwell, 1976).



Bu nedenle GR enzimi, glutasyonu ve askorbatı içeren oksidasyon-redüksiyon döngüsü aracılığıyla içsel H_2O_2 'in kontrolünde önemli bir rol almaktadır (Foyer ve Halliwell, 1976; Noctor ve Foyer, 1998).

Literatürde çevresel streslere maruz kalan bitkilerde aktif oksijeni uzaklaştıran enzim aktivitelerinin arttığı ve çoğu durumda bu artışa, bu enzimlere ait proteinlerin ve mRNA'ların seviyelerinde meydana gelen artışların da eşlik ettiği bildirilmektedir (Satoh ve Murata, 1998). Ayrıca, fotooksidatif stresler tarafından teşvik edilmiş yüksek antioksidant enzim aktivitelerine sahip bitkilerin şiddetli strese karşı direnç gösterdikleri ve bitkilerin çevresel streslere karşı gösterdiği tolerans ile aktif oksijeni ortadan kaldıran enzimleri arasında yakın bir ilişki olduğu rapor edilmiştir (Scandalios, 1993; Çakmak ve ark., 1993; Hasegawa ve ark., 2000; Acar ve ark., 2001; Sato ve ark., 2001; Kang ve Saltveit, 2002).

Glutasyon (GSH), askorbat (Asc), tokoferol gibi çeşitli redoks elemanlarını ve SOD, AP, GR, MDHAR, DHAR, CAT, POD gibi enzimleri kapsayan aktif oksijen uzaklaştıran sistem bitki yaşamı için zorunludur. Bu sistem, uygun olmayan koşullarda büyüyen bitkilerin yaşamlarını devam ettirebilmeleri için çok önemli bir sistemdir.

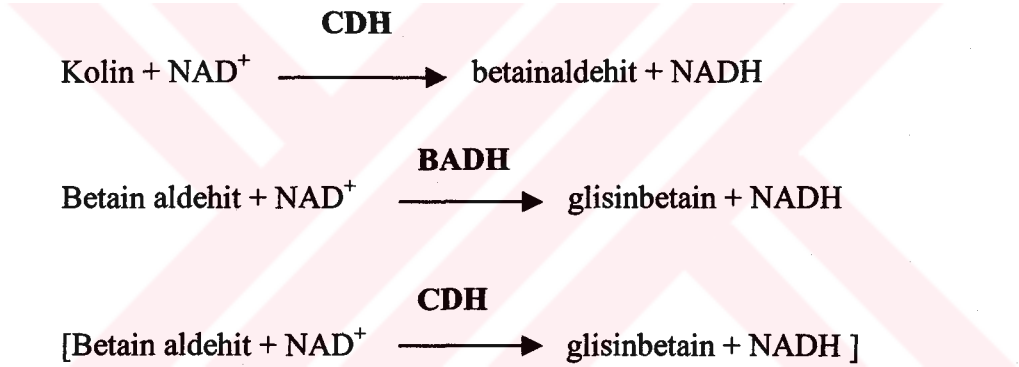
Tuzluluk, kuraklık, düşük veya yüksek sıcaklık gibi çeşitli çevresel streslere maruz kalan yüksek yapılı bitkinin gösterdiği önemli reaksiyonlardan birisi de, bir çok inorganik iyonların sentezlendiği vakuol içeriği, veya hücre dışı bölmeyle (apoplast) ilişkili bir ozmotik denge sağlamaya yöneliktir. Bu işlem, hücrelerin sitoplazmalarında bazı ozmolit bileşikler biriktirmeleriyle gerçekleşir. Bu ozmotik koruyucu bileşikler genellikle, düşük moleküler ağırlıklı olan, yüksek konsantrasyonlarda bulunduklarında metabolizmayı engellemeyen ve fizyolojik pH'da net bir yük taşımayan organik bileşikler olarak tanımlanırlar. Bu bileşikler, mannitol gibi polihidroksilli şeker alkollerini, prolin gibi aminoasitleri ve

bunların türevlerini, tersiyer sülfürlü bileşikleri ve kuaterner amonyum bileşiklerini içerir. Ozmotik koruyucular sitoplazmadaki ozmotik basıncı yükseltmelerinin yanında uygun olmayan tuz veya sıcaklık düzeylerinde proteinleri ve membranları stabilize ederler. Bu nedenle ozmotik koruyucular hücrelerin çeşitli olumsuz çevre koşullarına uyum sağlamasında önemli rol oynarlar.

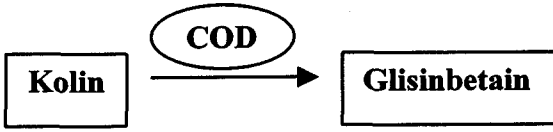
Bitkilerin uygun olmayan çevre koşullarında sentezleyerek biriktirdiği ozmotik koruyucu bileşiklerin önemli bir grubunu oluşturan betainler, azot atomunun tamamen metillendiği amino asit türevleri yani kuaterner amonyum bileşikleridir. Glisinbetain, probetain, β -Alabetain, kolin-*O*-sülfat ve 3-dimetilsülfoniopropionat (DMSP), betainlerden bazılarıdır (Rhodes ve Hanson, 1993). Bunlar arasında en çok bilinen ve çalışılmış olanı, **glisinbetain**dir. Glisinbetain (GB) çeşitli deniz alglerinde, Chenopodiaceae, Amaranthaceae, Gramineae, Compositae ve Malvaceae'yi içeren en az 10 çiçekli bitki familyasında bulunmaktadır (Rhodes ve Hanson, 1993; Gorham, 1996; Blunden ve ark., 1999). GB'in sentezi daha çok Chenopodiaceae türlerinde ve kısmen Amaranthaceae ve Gramineae'de çalışılmıştır. Chenopodiaceae'nin tüm üyelerinde glisinbetain evrensel bir bileşik olarak sentezlenip biriktirilmesine rağmen, Gramineae'nin tüm üyeleri glisinbetain sentezleyememektedir ve çeltik bu gruba giren bir bitkidir. Glikofit bir bitki olan çeltik bitkisinin su gereksiniminin fazla olması, topraklardaki aşırı sulamadan kaynaklanan tuzlaşma nedeniyle, tuz stresine maruz kalmasına yol açmaktadır. Bu durum ayrıca, çeltik yetiştirilen arazilerin sıtma hastalığına neden olan ortamı oluşturması sebebiyle, zaten ülkemizde yasal olarak sınırlandırılmış olan çeltik üretimine diğer bir kısıtlama getirmektedir. Bu yüzden glisinbetainin çeltiğin tuz stresine karşı direncinin artırılmasındaki rolü ve etki mekanizmasının anlaşılması özel bir önem taşımaktadır.

Glisinbetain, bakteriler, yüksek yapıli bitkiler ve hayvanları da içeren bir çok organizma grubu tarafından sentezlenir ve biriktirilir (Rhodes ve Hanson, 1993). *In vivo*'da çeşitli familyalara ait GB-biriktiren bitki türleriyle yapılan radyoaktif veya kararlı izotop izleme çalışmaları, GB'in bir ara ürün olan betain aldehit aracılığıyla, kolin'den 2 basamağı kapsayan bir oksidasyonla sentezlendiğini göstermiştir (Rhodes ve Hanson 1993) (Şekil:1.1).

Escherichia coli'de glisinbetain; kolin'i betain aldehite ve daha sonra glisinbetain'e okside eden **Kolin dehidrogenaz** [CDH; EC 1.1.99.1] enzimi tarafından, iki basamakta sentezlenir.



E. coli'nin 9-kbp fragmentinde, büyüme ortamına kolin eklendiği zaman ozmotik tolerans (0,6 M NaCl'den fazla yoğunluktaki ortamda büyüebilme yeteneği) sağlayan, 4 gen tanımlanmıştır: *betA*, *betB*, *betI* ve *betT*. Bu genlerden (*betA*), kolin dehidrogenaz [EC 1.1.99.1]; (*betB*), betain aldehit dehidrogenaz [EC 1.2.1.8]; (*betI*), *bet* regulonunun kolin-duyarlı bir represörünü ve (*betT*) ise yüksek afiniteli bir kolin taşıyıcısını kodlamaktadır. *Bet* gen dizisinin tümü tanımlanmış ve promotor bölgeler karakterize edilmiştir. Bu genlerin ekspresyonu glisinbetain, sıcaklık, ozmolarite, oksijen ve kolin tarafından transkripsiyonal düzeyde kontrol edilmektedir.

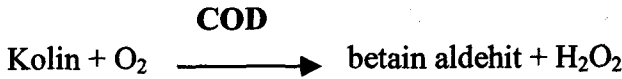
(1) *E.coli*(2) *A.globiformis*

(3) Bitkiler

**CDH**Kolin dehidrogenaz (O_2 , elektron taşıma sistemi)**BADH**Betain aldehit dehidrogenaz (NAD^+)**CMO**Kolin monooksijenaz (O_2 , Fd_{red})**COD**Kolin oksidaz (O_2)

Şekil 1.1: *E. coli*'de (1), *Arthrobacter globiformis* 'te (2) ve bitkilerde (3) görülen Kolin-glisinbetain metabolik yolu

Gram-pozitif toprak bakterisi olan *Arthrobacter pascens* ve *A. globiformis* 'te kolini okside eden alternatif bir enzim tanımlanmıştır. Herhangi bir kofaktör gerektirmeyen **kolin oksidaz (COD)** [EC 1.1.3.17] enzimi elektron alıcısı olarak O₂'ni kullanır (Sakamoto ve Murata 2000) (Bkz. Şekil:1.1).



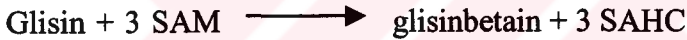
CDH'da olduğu gibi COD enzimi de betain aldehiti okside edebilme yeteneğine sahiptir (Betain aldehit için Km=8,7 mM, kolin için Km=1,2 mM).



Toprak bakterisi *Arthrobacter globiformis*'teki kolin oksidaz geni *codA* olarak belirlenmiştir. Kolin oksidaz her ne kadar metabolik yolun her iki adımını katalizleyebilse de, BADH'ın varlığı daha avantajlıdır çünkü, bu enzim betain aldehit için COD'dan, 17-28 kat daha düşük Km (Michaelis-Menten sabiti) değerine sahiptir ve ayrıca son ürün olarak H₂O₂ yerine NAD(P)H üretmektedir. Buna karşın Sakamoto ve Murata (2001), GB-biriktirmeyen organizmalarda genetik manipülasyonlarla bir GB-biyosentetik yolu oluşturmak için, GB sentezlenmesinde rol alan 3 temel metabolik yoldan, COD enziminin katalizlediği yolun çok daha kullanışlı olduğunu ileri sürmüşlerdir. Bu bilim adamlarına göre, COD enziminin kataliz için herhangi bir kofaktör gerektirmemesi ve bu enzim aracılığıyla kolinden GB sentezlettiren metabolik yolun organizmaya aktarılmasında, ilgili genle gerçekleştirilecek tek bir transformasyona izin vermesi, genetik mühendislikte COD metabolik yolunun tercih edilme sebebidir (Sakamoto ve Murata, 2001).

COD enzimi, *Arthrobacter* türlerine ozmotik tolerans bakımından bir yarar sağlamasa da (bu enzim *Arthrobacter* türlerinde kolin katabolizmasında rol oynamaktadır), *cod* geni, glisinbetain sentezleyemeyen *E. coli* mutantlarında ifade edildiği zaman, glisinbetain birikimi meydana gelmekte ve dışarıdan kolin veya betain aldehit temin edildiğinde, ozmotik tolerans sağlanmaktadır (Rozwadowski ve ark. 1991).

Glisin aminoasitinin, kolin meydana getirmek üzere doğrudan metillenmesiyle hayvanlarda ve bakterilerde glisinbetain tek adımda oluşturulabilir (Konishi ve Fujioka, 1987; Roberts ve ark., 1992); fakat bugüne kadar bu metabolik yol bitki dokularında rapor edilmemiştir. Son derece halofit ve fototrofik bir bakteri olan *Ectothiorhodospira halochloris* bakterisinde glisinbetain kolinden sentezlenmeyip, doğrudan glisin aminoasitinin metilasyonu ile sentezlenir (Galinski ve Truper, 1994).



(SAM= S-adenozilmethionin ve SAHC= S-adenozilhomosistein)

Bu şekilde gerçekleşen N-metilasyon reaksiyonları **glisin sarkozin metiltransferaz** ve **sarkozin dimetilglisin metiltransferaz** olarak bilinen 2 metiltransferaz tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu metiltransferazlar betain birikiminin meydana geldiği ve tuz toleransının geliştiği *E. coli*'de başarılı bir şekilde ifade edilmektedir.

Memelilerde, özellikle böbreklerde uyumlu bileşik olarak önemli bir rol oynayan (Bagnasco ve ark., 1986) glisinbetainin sentezi, *E. coli*'deki gibi olup, özel mitokondriyal bir CDH ve çözümlü bir BADH tarafından (Chern ve Pietruszko, 1995) katalizlenir.

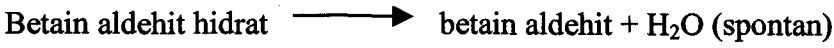
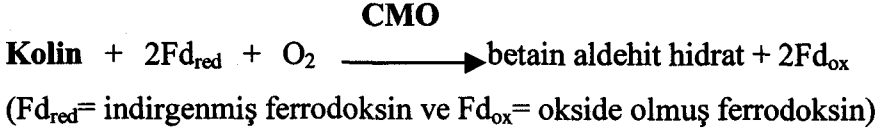
Farklı taksonomik gruplara ait bir çok bitki glisinbetain biriktiricisidir. Bunlardan en çok çalışılan grup Chenopodiaceae familyasına ait bitkilerdir. Glisinbetainin kolinden sentezlenmesiyle ilgili olarak yüksek bitkilerde olduğu ileri sürülen, biyosentetik yol: serin $\rightarrow$ etanolamin $\rightarrow$ metiletanolamin $\rightarrow$ dimetiletanolamin $\rightarrow$ kolin $\rightarrow$ betainaldehit $\rightarrow$ betain şeklindedir (Coughlan ve Wyn Jones, 1982; Arakawa ve ark., 1990). GB'in öncüsü olan kolin, yüksek yapılı bitkilerde serin aminoasidinden özellikle de serin'in etanolamin'e dekarboksilasyonu ile türevlenmektedir.



Oluşan etanolamin'in NH_2 - grubu daha sonra ya serbest etanolamin bazları, ya *O*-fosfo-etanolamin veya *O*-fosfotidil-etanolamin bazları seviyesinde, *S*-adenozilmethionin (SAM)-bağımlı *N*-metiltransferaz enzimleri tarafından, $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+$ şeklinde metilasyona uğratılır.

Bitkiler de glisinbetaini 2 adımda sentezlemekle birlikte, ilk oksidasyonun 1. basamağı kloroplast stromasında bulunan ferrodoksin-bağımlı bir **Kolin monooksijenaz**; 2. basamak ise NAD^+ -bağımlı **Betain aldehit dehidrogenaz** [EC 1.2.1.8] enzimi tarafından kataliz edilir (Rhodes ve Hanson, 1993) (bkz. Şekil:1). CMO enzimi substrat olarak moleküler oksijeni kullanır. CMO'ın katalizlediği reaksiyonda ara ürün olarak, betain aldehitle $[(\text{CH}_3)_3\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{C}(\text{OH})=\text{O}]$ sitokiyometrik bir denge halinde bulunan betain aldehit hidrat $[(\text{CH}_3)_3\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})_2]$ bileşiği meydana gelir (Lerma ve ark., 1988). Bu reaksiyon için gerekli indirgeyici güç fotosentetik olarak üretilir ve kolin oksidasyonunun, gerek *in vivo*'da gerekse izole edilen kloroplastlarda ışık tarafından etkili bir şekilde teşvik edildiği görülmüştür (Rhodes ve Hanson, 1993). GB'in kolinden sentezlenmesinde gerçekleşen bu ilk adım O_2 'ne

gereksinim gösterdiğinden, çoğunlukla tuzlu bataklıklarda karşılaşılan aşırı hipoksi durumuna bağlı olarak, kök hücrelerinin sitoplazmalarının ozmotik düzenlenmesinde önemli bir engel oluşturabilir.



Glisinbetain sentezindeki 2. basamağı katalizleyen BADH enzimi piridin nükleotidine bağımlıdır. CMO (Brouquisse ve ark., 1989) ve BADH enzimleri, BADH'ın ıspanak yapraklarındaki %10'luk küçük bir sitozolik izozim aktivitesi dışında (Weigel ve ark., 1986), Chenopodlar'ın yoğun olarak kloroplast stromasında aktivite göstermektedir (Weigel ve ark., 1986). Nakamura ve ark. (1997) ise yaptıkları çalışmada monokotiledon bitkilerdeki BADH'ın peroksizomlarda yer aldığını ileri sürmüşlerdir.

Tuz uygulanan ıspanak yapraklarında ozmotik düzenleme sağlayan glisinbetain, baskın olarak kloroplastlarda yer almaktadır (Robinson ve Jones, 1986). Ispanaktaki CMO enzimi membrana bağlı olmayıp, ferrodoksine ve Mg^{2+} 'a gereksinim gösterir ve kolin okside eden bakteriyel enzimlerden (CDH ve COD) farklı olarak betain aldehitin glisinbetaine oksidasyonunu katalize etmemektedir (Brouquisse ve ark., 1989).

Toksik olmayan bir ozmolit olan glisinbetain (*N,N,N*-trimetilglisin), tuz stresine ya da su kıtlığına maruz bırakılan bir çok bitki ve bakteri türünde doğal

olarak nispeten yüksek konsantrasyonlarda birikir (Rhodes ve Hanson, 1993). Betain dipolar bir molekül olup, fizyolojik pH'da nötr özellik gösterir. Glisinbetainin; (1) ozmotik denge sağlayarak (Pollard ve Wyn Jones, 1979, Rhodes ve Hanson 1993), (2) oksijeni kullanan fotosistem-II kompleksi gibi çoğu fonksiyonel birimleri stabilize ederek (Bum Lee ve ark. 1997, Harinasut ve ark. 1996, Rajasekaran ve ark. 1997), (3) Ribulobifosfat karboksilaz/oksigenaz gibi enzimlerin yapılarını koruyarak (Incharoensakdi ve ark. 1986, Mäkelä ve ark. 2000) ve (4) membranların yapısal bütünlüğünü sürdürerek (Coughlan ve Heber 1982; Zhao ve ark. 1992; Mansour 1998) bitkileri tuz/ozmotik strese karşı koruduğu bilinmektedir (Prasad ve ark. 2000). Dolayısıyla, stres altındaki organizmalar stresten korunmak amacıyla bünyelerinde GB biriktirmekte ve böylece stresten korunmaktadır. Bununla ilgili literatürde bir çok çalışma mevcuttur. Örneğin, glisinbetainin arpada, soğuk stresi altında biriktiği bulunmuştur (Kishitani ve ark. 1994). Bir başka çalışmada, 6 gün boyunca 2M NaCl'de yetiştirilen *Aphanothece halophytica* hücreleri, 0,5 M NaCl'de yetiştirilen kontrol hücrelerinden çok daha fazla miktarda glisinbetain biriktirmiş ve sentezlemiştir. Ayrıca ortamın tuz konsantrasyonunun artışına bağlı olarak, kolin dehidrogenaz ve betainaldehit dehidrogenaz aktivitelerinin arttığı gözlenmiştir (Incharoensakdi ve Wutipraditkul 1999). Besin çözeltisinde yetiştirilen *Sorghum bicolor*, ortama NaCl ve CaCl₂ eklenerek -0,8 MPa'a düşürülen ozmotik basınca tepki olarak betain seviyesinde önemli oranda bir artış meydana getirmiştir (Grieve ve Maas 1984). Glisinbetain, enzimleri, yüksek konsantrasyonlardaki inorganik iyonların inhibitör etkilerinden de korumaktadır. Incharoensakdi ve ark. (1986), tuz stresi altında *Aphanothece halophytica*'da biriken glisinbetainin, KCl etkisiyle aktivitesini kaybeden ribuloz-1,5-bifosfat karboksilaz/ oksigenaz'ın (RuBisCO), aktivitesini koruduğunu göstermiştir.

Bu bulgular araştırmacıları, gerek GB-sentezleyen gerekse – sentezleyemeyen organizmalarda stres toleransının, dıştan GB uygulamasıyla artırılabilceği görüşüne götürmüştür. Örneğin, *in vivo*'da buğdaya dışarıdan uygulanan glisinbetain, tuz stresi esnasında foto fonksiyonu koruyan uyumlu bir ozmotik bileşen rolünü oynayarak kloroplast hacmini korumuş ve fotosentezde NaCl'ün teşvik ettiği azalmayı önlemiştir (Rajasekaran ve ark., 1997). Kuraklık veya tuz stresi altında yetiştirilen domates bitkilerinin yapraklarına dıştan uygulanan glisinbetain, protein ve klorofil içeriğini ve de, RuBisCO'nun başlangıç ve total aktivitesini arttırmıştır (Mäkelä ve ark., 2000).

Fotosentetik sistemlerde glisinbetain, yüksek NaCl konsantrasyonu içeren ortamda oksijen kullanan fotosistem II kompleksini (Harinasut ve ark., 1996) ve RuBisCO'yu stabilize eder (Incharoensakdi ve ark., 1986). Glisinbetain ortam ile ozmotik bir denge sağlayarak ve kompleks proteinlerin kuaterner yapısını koruyarak, arpadaki malat dehidrogenaz ve pirüvat kinaz enzimlerini tuz stresine karşı korumuştur; fakat GB'nin koruyucu etkisi tüm enzimler için geçerli değildir, örneğin fosfoenol-piruvat-karboksilaz enzimi üzerinde koruyucu etki göstermemiştir (Pollard ve Wyn Jones, 1979).

Bum Lee ve ark. (1997)' ın yaptığı bir çalışmada, *Synechococcus* PCC7002'den glisinbetainli ortamda izole edilen aktif tilakoid membranlarda PS-II aktivitesi, GB tarafından arttırılmış ve stabilize edilmiştir. Ayrıca bu tilakoid membranlara yapılan yüksek sıcaklık uygulaması, ortamda GB olduğu zaman oksijen kullanan PS-II sistemini, inaktive olmaktan korumuştur (Bum Lee ve ark. 1997). Bununla birlikte, çeşitli soğuğa karşı koruyucu bileşikler içinde glisinbetain, ıspanaktan izole edilen tilakoidlerde dondurucu sıcaklığın etkisiyle (-20 °C'de 3 saat) tilakoid fotofosforilasyonunda oluşan dengesizliği, diğer bileşiklere göre daha fazla önlenmiştir. Bu sonuçlar glisinbetainin tilakoitte düşük

sıcaklık etkisiyle oluşan inaktivasyona karşı korunma sağladığını göstermektedir (Coughlan ve Heber, 1982).

Yang ve ark. (1996), glisinbetain sentezleyen (*Bet1/Bet1*) ve glisinbetain sentezleyemeyen (*bet1/bet1*) homozigot mısır serilerinin yüksek sıcaklık stresine verdikleri fizyolojik yanıtları araştırmışlardır. Tam bir bitkiyi, bitkiden uzaklaştırılan yaprakları ve yaprak parçalarını yüksek sıcaklığa maruz bıraktıktan sonra, elektrolit sızması ve PS-II'nin *in vivo* fotokimyasal aktivitesi üzerindeki etkisi incelenmiştir. 45 °C'den yüksek sıcaklıklara maruz bırakılan *Bet1/Bet1* serilerinin, yakın izogenikleri olan *bet1/bet1* kardeş serilerine göre daha az membran hasarına uğradıkları bulunmuştur (Yang ve ark., 1996). Ayrıca, *Bet1/Bet1* serilerinin PS-II fonksiyonu bakımından da daha fazla termostabilite gösterdikleri rapor edilmiştir (Yang ve ark., 1996).

Bir başka çalışmada da, *Medicago sativa* L.'nin, 0,2 M glisinbetainle muameleden sonra -6 °C dondurucu sıcaklığa maruz bırakılması, gövde dokularındaki iyon kaybını önlemiş ve membranları koruyarak bitkilerin donmaya karşı dirençlerini arttırmıştır (Zhao ve ark., 1992). Mansour (1998), soğan epidermal hücrelerinin plazma membranıyla yaptığı çalışmada, 150mM NaCl uygulamasıyla hücrelerin mortalite oranlarında ve plazma membranının geçirgenliğinde meydana gelen artışın, GB veya Prolin ön muameleleri sayesinde önlendiğini, ve GB'in bir membran koruyucusu olarak prolinden daha fazla etkili olduğunu ileri sürmüştür. Gadallah (1999) tarafından yapılan bir çalışmada, NaCl ve CaCl₂ ile tuz stresine maruz bırakılan fasulye bitkileri, kuru ağırlıkta, klorofil miktarında, çözünür ve hidrolize edilen şekerler ve çözünür proteinlerin içeriğinde azalma; total serbest aminoasit, Na⁺, Ca²⁺ ve Cl⁻ içeriğinde ise artış göstererek yanıt vermişlerdir. Fakat yapraklarına uygulanan prolin ve glisinbetain sayesinde membranda oluşan hasar azalırken K⁺ alınımları ve büyüme artmış, sadece GB alan bitkilerde ise PS-II'nin korunması ve kloroplast membranlarının

kararlılığının artması sayesinde bu bitkilerin daha fazla klorofil biriktirmeleri sağlanmıştır (Gadallah, 1999).

Yüksek miktardaki sodyum (Na^+), tuza duyarlı birçok bitkinin ve glikofitlerin büyümesini inhibe ettiğinden, tuz stresine karşı toleranslı transgenik bitkilerin oluşturulması, üretim teknolojisinde önemli bir konuyu oluşturmaktadır. Kuraklık veya tuz stresıyla oluşan ozmotik stresi geçiştirmede glisinbetainin oynadığı fizyolojik rol, strese maruz bırakılan bazı bitkilerde bu maddenin birikimindeki artıştan kaynaklanmaktadır. Fakat çeltik, domates, patates, tütün gibi tarımsal bakımdan önemli bir çok bitkinin glisinbetain sentezleyememeleri, bu bitkileri genetik mühendislik aracılığıyla betain biyosentezinde kullanılacak potansiyel birer hedef yapmaktadır. Ticari öneme sahip olan bu bitkilerin modern genetik yöntemlerle ozmotik strese karşı toleranslarını arttırmak için bazı çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda GB biyosentezinde rol alan enzimlerin (kolin oksidaz, kolin monooksijenaz ve/veya betainaldehit dehidrogenaz) sentezinden sorumlu genler bu bitkilere aktarılmakta ve oluşan transgenik bitkilerin glisinbetain sentezlemesi sağlanmaktadır.

En önemli tahıllardan birisi olan çeltik, Gramineae familyasına ait diğer türlerle karşılaştırıldığında çevresel streslere karşı oldukça duyarlı olan bir bitkidir. Rathinasabapathi ve ark. (1993) yaptıkları radyoaktif çalışmalar sonucu, glisinbetain biyosentezinde meydana gelen her iki metabolik yolun çeltik bitkisinde işlemediğini, daha doğrusu kolin monooksijenaz ve betainaldehit dehidrogenaz enzimlerinin bu bitkide aktivite göstermediğini ileri sürmüşlerdir. Buna karşın, Nakamura ve ark. (1997) çeltik genomunun, GB sentezindeki son adımı katalizleyen betainaldehit dehidrogenaz enziminin (BADH) sentezinden sorumlu bir gene sahip olduğunu ve bu genin yüksek konsantrasyondaki tuza tepki olarak, düşük seviyelerde ifade edildiğini göstermişlerdir. Yine Rathinasabathi ve ark. (1994), çeltikteki betain aldehit (BA) metabolizmasını

incelemek için, tuz uygulanan çeltik bitkilerine 1 hafta boyunca aseptik koşullar altında BA uygulanmıştır. BA yüksek seviyelerde toksik etki yaptığından, 1 mM gibi düşük konsantrasyon uygulanmıştır. ¹H-NMR spektroskopuyla yapılan bu çalışmada, çeltik bitkilerinin dışarıdan verilen BA'ı kökleriyle alarak bunu yapraklarında yaklaşık 1 µmol/g taze ağırlık konsantrasyonda GB'e dönüştürdüğü görülmüştür (Rathinasabathi ve ark., 1994). Çalışmada karşılaşılan ilginç bir durum, çeltik bitkilerinin BA'e karşı direnç göstermeleri ve 5 mM gibi, normalde tütün fideleri için oldukça toksik olan bir BA seviyesinde büyüyebilmiş olmalarıdır (Rathinasabathi ve ark., 1994). Bu sonuçlar çeltik bitkilerinin enzimatik olarak aktif bir BADH'a sahip olduklarını ileri süren Nakamura ve ark.(1997)'in bulduğu sonuçlarla da uyusmaktadır.

Kishitani ve ark. (2000)'a göre, BADH'ın substratı olan betain aldehit, dışarıdan yeterli miktarda verildiği zaman çeltik bitkileri bunu kökleriyle alarak GB'e çevirme yeteneğine sahiptir, yani çeltikte bulunan BADH geni dışarıdan verilen BA'ı GB'e dönüştürmek için yeterli aktiviteye sahiptir. Kishitani ve ark. (2000), arpadan betainaldehit dehidrogenaz enzimi için oluşturdukları bir cDNA ile transgenik çeltik bitkileri meydana getirerek, oluşan bu bitkilerin tuza, düşük ve yüksek sıcaklıklara gösterdiği toleransı incelemişlerdir. Transgenik çeltik bitkileri, dışarıdan verilen 10 mol m⁻³ konsantrasyonundaki betain aldehiti, yabani çeltik bitkilerinden daha etkili bir şekilde GB'e dönüştürmüşlerdir. Tuz stresi altında, dışarıdan BA verilmeyen bitkilerdeki PS-II aktivitesi; BA uygulanan gerek transgenik, gerekse yabani-tip bitkilerin PS-II aktivitesinden çok daha dramatik bir düşüş göstermiştir (Kishitani ve ark., 2000). Ayrıca 10 mol m⁻³ BA uygulaması altında 5 °C'ye maruz bırakılan transgenik bitkilerin gövdelerinin önemli derecede soğuğa tolerans göstermesi, çeltik bitkilerine dışarıdan uygulanan BA sonucu biriken GB'in, soğuk stresiyle meydana gelen hasarın derecesini azalttığını göstermektedir (Kishitani ve ark., 2000). Benzer şekilde 5

veya 10 mol m^{-3} BA uygulanan ve 5 saat boyunca 45°C 'ye maruz bırakılan bitkilerin sıcaklığa toleranslarının, GB biriktirmeyenlerden önemli derecede fazla olduğu bulunmuştur (Kishitani ve ark., 2000).

Çeltik bitkisinin (*Oryza sativa*) kloroplastlarına hedeflenmiş olan *codA* geniyle transformasyonu, $1 \text{ } \mu\text{mol.g}^{-1}$ yaprak yaş ağırlık seviyesinde glisinbetain biriktirmesine yol açarken, sitoplazmasına hedeflenmiş olan *codA* geniyle transformasyonu, $5 \text{ } \mu\text{mol.g}^{-1}$ yaprak yaş ağırlık seviyesinde glisinbetain sentezlemesine sebep olmuştur (Sakamoto ve ark., 1998). Ayrıca, kolin oksidaz enzimini kloroplastlarında ifade eden çeltik bitkilerinin, tuz stresi ve düşük sıcaklık stresi altında oluşan fotoinhibisyona karşı, bu enzimi sitoplazmalarında ifade eden transgenik bitkilerden daha toleranslı oldukları görülmüştür (Sakamoto ve ark. 1998, Sakamoto ve Murata 2000).

Arthrobacter globiformis'ten alınan *codA* geniyle (kolin oksidaz [EC 1.1.3.17] enzimini kodlar) transforme edilmesi sonucu glisinbetain biriktiren *Arabidopsis thaliana*'nın, tuz, ışık, ısı ve düşük sıcaklık stresine karşı toleransı artmıştır (Alia ve ark., 1999, Hayashi ve ark., 1997). Transgenik bitkilerin tuz ve ışık stresi toleransında meydana gelen artış, PS-II aktivitesinin korunması veya PS-II kompleksinin foto-inaktif olmuş durumdan çabucak iyileşmesiyle ilişkilidir (Alia ve ark., 1999, Hayashi ve ark., 1997). *Arabidopsis*'in *codA* geniyle transformasyonu, H_2O_2 miktarında önemli artışlar meydana getirmiş ve transgenik bitkilerde, askorbat peroksidaz ve katalaz enzim aktiviteleri de artış göstermiştir (Alia ve ark., 1999). Bu durum, transforme olan bitkilerdeki kolin oksidaz aktivitesiyle üretilen H_2O_2 'in, hidrojen peroksiti parçalayan enzimlerin ifadesini arttırmış olabileceğini göstermektedir (Alia ve ark., 1999).

Glisinbetain biyosentezi için, tütün bitkisinin *E. coli*'nin genleriyle transformasyonu, GB biriktiren transgenik bitkilerin oluşumuyla sonuçlanmıştır (Holmström ve ark., 2000). Sadece CDH üreten bitkilerdeki betain

konsantrasyonu 35 nmol g^{-1} taze ağırlık olmasına karşın, her iki enzimi (CDH ve BADH) üreten bitkilerdeki betain konsantrasyonunun 2-3 kat daha fazla (66 nmol g^{-1} taze ağırlık) olduğu bulunmuştur. Ayrıca GB biriktiren transgenik tütün bitkilerinin yaprak parçalarının yüksek ışık ve tuz stresıyla oluşan fotoinhibisyon sonrası daha çabuk iyileştikleri ve düşük sıcaklık koşullarında fotoinhibisyona karşı toleranslarının arttığı görülmüştür (Holmström ve ark., 2000).

COD'ın ifade edilmesi için *A. globiformis*'ten alınan *codA* geni, aktif bir promotorun kontrolü altında, *Synechococcus* genomuna aktarılmış ve oluşan hücrelere dıştan kolin uygulandığı zaman, yaklaşık 80 mM GB biriktirdikleri gözlenmiştir. Bu hücrelerin büyüme, klorofil birikimi ve fotosentetik aktivitelerinin daha az etkilendiği bulunmuştur (Sakamoto ve Murata, 2001). Huang ve ark. (2000), *A. pascens*'ten aldıkları kolin oksidaz geniyle Arabidopsis (RLD ekotipi)'i transforme ettiklerinde, oluşan hücrelerdeki glisinbetain miktarının, tuz stresi altında olmayan bir çok doğal betain üretici bitkilerdeki betain seviyelerinden en az 10 kat daha düşük ($18,6 \text{ } \mu\text{mol g}^{-1}$ kuru ağırlık) olduğunu bulmuşlardır. Sitozoldeki COD'ın ifadesiyle biriken GB seviyesi, bu enzimi kloroplastlarında ifade eden bitkilerdeki GB seviyelerine yakın bulunmuştur (Sakamoto ve Murata, 2001). Dıştan kolin uygulanmasıyla GB seviyesi daha çok artış göstermiştir. Bu durum, GB sentezlemeyen türlerin, GB-biriktiren bitkilerdeki kadar yüksek miktarlarda GB biriktirmesi hedeflendiği zaman, substrat mevcudiyetinin GB sentezini sınırlayabileceğini göstermektedir (Huang ve ark., 2000). Diğer bir deyişle, transgenik bitkiler yüksek-tuz, kuraklık ve donma stresine orta derecede tolerans göstermişlerdir. Yapılan çalışmalarda transformasyon sonuçları arasında bulunan önemli farklılıklar, biyosentetik enzimin hedeflendiği hücre içi bölgenin bitkilerdeki GB birikiminin oynadığı fizyolojik rolü önemli derecede etkileyebileceğini göstermektedir (Sakamoto ve Murata, 2001).

Glisinbetain sentezleyemeyen *Brassica juncea*, glisinbetain biyosentezi için *Arthrobacter globiformis*'ten alınan *codA* geniyle transforme edildiğinde, oluşan transgenik bitkilerin tohumları tuz stresi altında yabani türün tohumlarına göre daha iyi çimlenmiştir (Prasad ve ark., 2000). Ayrıca, 200 mM NaCl varlığında yabani tiplerin gerek yaş, gerekse kuru ağırlığı, *codA* genini ifade eden transgenik fidelere göre daha fazla azalmıştır (Prasad ve ark., 2000). Bu çarpıcı sonuçlar, *Brassica juncea* cv. Pusa Jaikisan'da glisinbetain sentezi için biyosentetik bir yolun oluşturulmasının, bu bitkilerin tuz toleransını önemli ölçüde attırdığını göstermektedir.

Çeltik bitkisi glisinbetaini endojen olarak sentezleyip biriktirememesine rağmen kökleriyle absorbe ederek yapraklarında 5,0 $\mu\text{mol/g}$ YA seviyesine kadar biriktirmekte ve GB ile muamele edilen çeltik bitkilerinde tuz stresine karşı tolerans artmaktadır (Harinasut ve ark., 1996). Şu ana kadar *in vivo* veya *in vitro*'da bitki veya bitki parçalarıyla yapılan çalışmalarda, glisinbetainin çeşitli abiotik streslere olan direnci arttırmada oynadığı rol genellikle büyüme parametreleri, fotosentetik verim veya mineral iyon birikimi üzerindeki etkisi açısından çalışılmıştır. Fotosentezle ilgili olarak glisinbetainin, özellikle tilakoid zarların ve Fotosistem-II'nin bütünlüğü ve işlevi üzerindeki koruyucu etkisi üzerinde yoğunlaşmıştır. Ancak, gerek bitki su döngüsü ve gerekse zarların kararlılığı ile ilişkili olan antioksidant savunma sistemi üzerinde herhangi bir etki gösterip göstermediği araştırılmamıştır. Bu durum göz önüne alınarak bu çalışmada, genç çeltik fidelerinin köklerine dıştan uygulanan glisinbetainin NaCl toleransının artırılmasındaki rolü; büyüme parametreleri, pigment miktarları ve süperoksit dismutaz, katalaz, peroksidaz, askorbat peroksidaz ve glutasyon redüktaz gibi antioksidant enzimler üzerindeki etkileri açısından ele alınmıştır.

2. MATERYAL VE METOD

2.1 Bitki Materyali ve Glisinbetain Uygulamaları

Denememizde, tuza toleranslı **Pokkali** ve tuza duyarlı **IR-28** olmak üzere tuz toleransı farklı 2 çeltik kùltivarı kullanılmıştır. Bu kùltivarlara ait tohumlar Uluslararası Çeltik Araştırma Enstitüsü (IRRI Filipinler)'nden sağlanmıştır. Her bir kùltivara ait tohumlar de-iyonize su içinde 27 °C'de 6 saat şişirildikten sonra, de-iyonize su (dI-H₂O) ile ıslatılmış 2 kat steril filtre kağıdı üzerinde 28 °C'de karanlıkta (72 saat) çimlendirilmiştir. Çimlenen tohumlar, üzerinde delikler bulunan styrofoam kaplara teker teker ekilerek, aseptik ve kontrollü koşullarda; 27±2°C sıcaklık, 350 µmol m⁻²s⁻¹ ışık, ve %60-70 atmosferik nemli iklim odasında su kùltüründe yetiştirilmiştir. IRRI tarafından çeltik için geliştirilmiş bir solüsyon (pH 5,2) bitkilere verilmiş ve bu solüsyon haftada 2 kez yenisiyle değiştirilmiştir. Her bir kùltür ortamının pH'sı sabit tutulmuştur. Terlemeyle oluşan su kaybı, her gün dI-H₂O eklenmesiyle telafi edilmiştir. Çeltik fidelerinin büyümesi esnasında gereksinim duydukları demir gereksinimini karşılamak için hazırlanan %10'luk demir stok solüsyonundan, yapraklara haftada 3 kez püskürtülmüştür.

Tohumların ekiminden 28 gün sonra, besi solüsyonuna 120 mM NaCl eklenmesiyle tuz uygulaması başlatılmıştır. NaCl uygulamasından önce fidelere 4 gün boyunca 15 mM glisinbetain uygulanmış; daha sonraki periyotta bitkiler ortamda GB olmaksızın yetiştirilmiştir. Tuz uygulamasından itibaren 0. ve 7. günlerde bitkiler hasat edilerek, enzim analizlerinde kullanılacak örnekler analiz gününe kadar -20 °C'de derin dondurucuda saklanmıştır.

2.2 Büyüme Parametreleri

Tuz uygulamasının 0. ve 7. günlerinde her bir gruptan gelişigüzel bir şekilde 10'ar bitki alınarak yaprakları ve kökleri birbirinden ayrıldı. Yaprakların ve köklerin yaş ağırlıkları tartıldı ve uzunlukları ölçüldü. Örnekler 70 °C'de 72 saat bekletildikten sonra kuru ağırlıkları belirlendi.

2.3 Bağlı Su İçeriği

Tuz uygulamasının 0. ve 7. günlerinde her bir gruptaki bitkilerden 6 yaprak örneği alınarak yaş ağırlıkları ölçüldü. Daha sonra yapraklar 7 saat boyunca düşük ışık altında dI-H₂O içinde petrilere bekletilerek turgor haline gelmeleri sağlandı. Turgorlu yapraklar kurutulur kurutulmaz turgor ağırlıkları belirlendi. Daha sonra bu yapraklar 72 saat boyunca 70 °C'de bekletilerek kuru ağırlıkları saptandı. Her bir gruba ait yaprak örneklerinin bağlı su içeriği aşağıdaki formüle göre % olarak hesaplandı (Smart ve Bingham, 1974).

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

2.4 Klorofil Flüoresans Ölçümleri

Klorofil flüoresansı, çeltik bitkilerine tuz uygulamasının başlatıldığı 0. günden itibaren 7. güne kadar her gün takip edildi. Ölçümlerin tümü saat 10.00 ile 12.00 arasında, her bir uygulamaya ait 6 bitkinin en üstteki katlanmamış yaprakları kullanılarak yapıldı. Flüoresans ölçümlerinden önce yaprağın üst yüzeyindeki 1 cm² lik dairesel bir bölge 30 dk boyunca yaprak klipsleri kullanılarak karanlığa alıştırıldı. Bir bitki verim analiz cihazı (LICOR, Lincoln, NE) sayesinde yaprakların doymuş ışık demetine maruz bırakılmasıyla, değişken olmayan bazal klorofil flüoresansı (*F₀*), maksimum flüoresans indüksiyonu (*F_m*), değişken flüoresans (*F_v*) ve *F_v/F_m* oranları belirlendi. Her iki çeltik kültürünü

tuza gösterdikleri direnç bakımından karşılaştırmak için özellikle PS-II'nin fotokimyasal verimi (maksimum kuantum verimi F_v/F_m) dikkate alındı.

2.5 Fotosentetik Pigment İçeriği

Her gruptan alınan 0,5 g yaprak örneği % 80'lik (v/v) aseton ile homojenize edildikten sonra homojenat filtre kağıdından süzdürüldü. Daha sonra klorofil-a için 663 nm'de, klorofil-b için 645 nm'de ve karotenoid için 480 nm'de absorpsiyon alındı (Arnon, 1949). Fotosentetik pigmentlerin miktarları aşağıdaki formüllere göre hesaplandı:

$$Kl-a = \Delta A_{663} \times 12,70 - \Delta A_{645} \times 2,69$$

$$Kl-b = \Delta A_{645} \times 22,90 - \Delta A_{663} \times 4,68$$

$$\text{Karotenoid} = \Delta A_{480} + \Delta A_{663} \times 0,114 - \Delta A_{645} \times 0,638/112,50$$

2.6 Antioksidant Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

2.6.1 Enzim ekstraktlarının hazırlanması

Antioksidant enzimlerin ekstraksiyonu için derin dondurucuda saklanmış olan yapraklar, soğutulmuş havanda %2 (w/v) polivinilpolipirrolidon (PVPP) ve 1 mM EDTA içeren 0,05 M sodyum fosfat tamponuyla (pH 6,8) homojenize edildi. Homojenat 4 °C'de 13.000 g'de 40 dk santrifüj edildi ve oluşan süpernatant enzim aktivitesinin tayininde kullanıldı. Ekstraksiyon prosedürünün tümü ± 4 °C'de gerçekleştirildi.

2.6.2 Süperoksit dismutaz (SOD; süperoksit: süperoksit oksidoredüktaz, EC 1.15.1.1) enziminin aktivite tayini

SOD aktivitesi, Beauchamp ve Fridowich (1971)'in metoduna göre, SOD'un fotokimyasal olarak nitro blue tetrazolium (NBT)'un indirgenmesini

inhibe etme yeteneğinin ölçülmesiyle tayin edilmiştir. 3 ml reaksiyon karışımı; 50 mM fosfat tamponu (pH 7,8), 33 μ M NBT, 10 mM L-metionin, 0,66 mM EDTA Na_2 , 0,0033 mM Riboflavin içermektedir. Süpernatant seyreltikten sonra karışım 10 dk 300 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık şiddeti altında bekletildi. Daha sonra reaksiyon karışımının 560 nm’de verdiği absorban değerleri okundu. SOD için 1 enzim birimi; fotoredüksiyonun % 50 inhibisyonuna neden olan protein miktarı (mg) olarak tanımlandığından yaprak örneklerindeki SOD aktiviteleri buna göre belirlendi.

2.6.3 Askorbat peroksidaz (AP; EC 1.11.1.11) enziminin aktivite tayini

AP aktivitesinin tayini Nakano ve Asada (1981)’ya göre yapıldı. Askorbat okside oldukça, spektrofotometreden 290 nm’deki absorbansta oluşan azalma okundu ve hesaplamalar askorbatın ekstinksiyon katsayısı kullanılarak ($2,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) yapıldı. Reaksiyon karışımında 50 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7), 0,5 mM askorbat, 0,1 mM EDTA Na_2 ve 1,2 mM H_2O_2 bulunuyordu. Askorbatın oksidasyonu, enzim ekstraktının katılmasıyla başlatıldı ve absorbanstaki azalma 180 sn boyunca takip edildi. 1 birim AP aktivitesi dakikada okside olan 1 mmol ml^{-1} Askorbat olarak ifade edildi.

2.6.4 Katalaz (CAT; EC 1.11.1.6) enziminin aktivite tayini

Katalaz enzimi aktivitesinin belirlenmesi Bergmeyer (1970)’in metoduna göre gerçekleştirildi. H_2O_2 ’in miktarında oluşan azalma; 240 nm’de gösterdiği maksimum absorbanstaki düşüşle belirlendi. 1ml’lik son hacme sahip kuvartz küvetlerdeki reaksiyon karışımı; 0,1 mM EDTA, 50 mM Na-fosfat tamponu (pH:7), dI- H_2O ve % 0,3 H_2O_2 ’den oluşuyordu. Reaksiyon boyunca absorbansta oluşan düşüş 180 sn boyunca takip edildi. CAT aktivitesi dakikada harcanan $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ olarak ifade edildi.

2.6.5 Peroksidaz (POD; EC 1.11.1.7) enziminin aktivite tayini

POD aktivitesi Herzog ve Fahimi (1973)'ye göre belirlendi. Aktivite 465 nm'de, 3,3'-diaminobenzidin tetrahidroklorid (DAB)'in oksidasyonu ile absorbansta meydana gelen artış takip edilerek hesaplandı. Polystyrene küvetteki reaksiyon karışımı, DAB solüsyonu, % 0,6'lık H_2O_2 , dI- H_2O ve enzim ekstraktından oluşmaktaydı. Reaksiyon H_2O_2 'in katılmasıyla başlatıldı ve 180 sn boyunca absorbans artışı takip edildi. Spesifik enzim aktivitesi dakikada tüketilen $\mu\text{mol ml}^{-1} H_2O_2$ olarak ifade edildi.

2.6.6 Glutasyon redüktaz (GR; EC 1.6.4.2) enziminin aktivite tayini

Glutasyon redüktaz aktivitesi, 340 nm'deki absorbans azalmasından yola çıkılarak hesaplandı (Foyer ve Halliwell, 1976). NADPH varlığında, okside glutasyon miktarındaki azalma, kuvartz küvette, köre karşı 180 sn boyunca takip edildi. Hesaplamalar glutasyon redüktaz enziminin ekstinksiyon katsayısı kullanılarak ($6,2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) yapıldı. Spesifik enzim aktivitesi, dakikada indirgenen 1 mmol ml^{-1} GSSG miktarı olarak ifade edildi.

2.7 Protein miktarının belirlenmesi

Protein içeriği Bradford'a (1976) göre, bovine serum albumin standart olarak kullanılmak suretiyle yapıldı. Standartlar 0,02-0,2 mg/ml aralığında hazırlandı.

2.8 Prolin Miktarının Belirlenmesi

Serbest prolin içeriğinin belirlenmesi Bates ve ark. (1973)'na göre yapıldı. Her bir gruptan 0,5 g yaprak örnekleri tartılarak, % 3'lük (w/v) sülfosalisilik asitle homojenize edildi ve homojenat filtre kağıdından süzdürüldü. Asit ninhidrin ve glasiyal asetik asit eklendikten sonra oluşan karışım 100°C 'de 1 saat

su banyosunda bekletildi. Daha sonra reaksiyon buz banyosu kullanılarak durduruldu. Bu karışıma tolüen ilave edilerek, sıvı fazdan aspire edilen tolüen fraksiyonunun 520 nm'deki absorbansı spektrofotometreden okundu. Prolin konsantrasyonu kalibrasyon eğrisi kullanılarak hesaplandı ve $\mu\text{mol proline g}^{-1}$ taze ağırlık olarak ifade edildi.

2.9 Lipit Peroksidasyonu

Yapraklarda meydana gelen lipit peroksidasyon derecesinin belirlenmesi için, lipit peroksidasyonunun son ürünü olan malondialdehit seviyesi ölçüldü. MDA miktarı Madhava Rao ve Sresty (2000)'e göre belirlendi. Bunun için 0,5 g yaprak örneği, TCA (trikloroasetik asit) ile homojenize edildi. Santrifüjden sonra süpernatanta TBA (tiobarbitürik asit) ve TCA içeren reaksiyon karışımı pipetlendi ve tüm deney tüpleri 95°C 'de 30dk ısıtıldı. Karışım $10.000\text{ g} \times 15\text{ dk}$ santrifüjlendi. Oluşan süpernatantın 532 ve 600 nm'deki absorbans değerleri okundu. MDA konsantrasyonu ekstinksiyon katsayısı ($\epsilon = 155\text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) kullanılarak hesaplandı. Tüm ölçümler 6 tekerrür halinde yapıldı.



Şekil 2. 1: Tuz stresinden önce (0. gün), GB ve NaCl uygulanmamış kontrol grubundaki (sağdaki havuz), ve 120mM NaCl uygulanacak olan GB uygulanmamış gruptaki (ortadaki ve soldaki havuzlar) çeltik bitkileri.



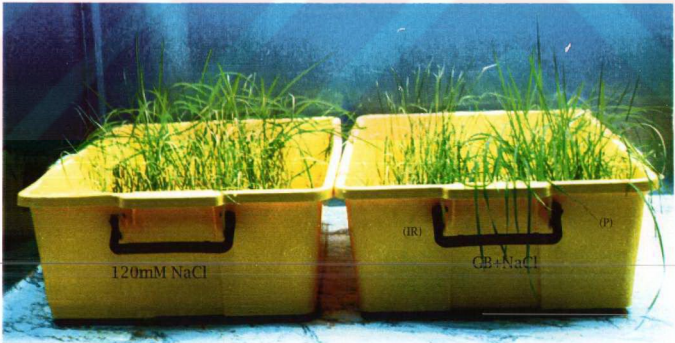
Şekil 2. 2: Tuz uygulamasından önce (0. gün), GB uygulanmamış kontrol grubundaki çeltik bitkileri.

(P) : Pokkali

(IR) : IR-28



+
Şekil 2. 3: Tuz uygulamasının 7. gününde, GB ve NaCl uygulanmamış kontrol grubundaki (sağdaki havuz) ve 120mM NaCl uygulanmış fakat GB uygulanmamış gruptaki (soldaki havuzlar) çeltik bitkileri. (P):Pokkali, (IR):IR-28.



Şekil 2. 4: Tuz uygulamasından önce GB uygulanmış (sağdaki havuz) ve GB uygulanmamış (soldaki havuz) çeltik kültürlerinin tuz stresinden sonraki (7. gün) görünüşleri. (P):Pokkali, (IR):IR-28.



Şekil 2. 5: Tuz uygulamasından sonra (7. gün), GB ve NaCl uygulanmamış kontrol grubundaki (sağdaki havuz) ve 120mM NaCl uygulanmış fakat GB uygulanmamış gruptaki (soldaki havuz) çeltik bitkileri. (P):Pokkali, (IR):IR-28.



Şekil 2. 6: Tuz uygulamasından sonra (7. gün), GB ve 120mM NaCl uygulanmış gruptaki (sağdaki havuz) ve sadece GB uygulanmış kontrol grubundaki (soldaki havuz) çeltik bitkileri. (P):Pokkali, (IR):IR-28.

3. SONUÇLAR

3.1 Büyüme Parametrelerinin Sonuçları

24. günlük çeltik bitkilerine uygulanan 15 mM glisinbetainin uygulamadan 4 gün sonra (28. günde) ve 28. günden itibaren 120 mM NaCl uygulamasını takiben 7. günün sonunda bitkilerin kök ve gövde uzunluğunda meydana gelen değişimler toplu olarak Çizelge 3.1'de gösterilmiştir. 24.günden itibaren GB uygulamasına bağlı olarak her iki çeltik kültürünün 0. gündeki gövde uzunluklarında kontrol grubuna göre daha fazla artış gözlenmiştir. Bu artış Pokkali'nin gövdesinde % 4 iken, IR-28'de % 2 olmuştur. Kök uzunluğu GB uygulamasıyla, Pokkali'de 0. günde % 7 artış gösterirken, IR-28'de % 5 azalma göstermiştir.

Tuz stresinden 1 hafta sonra, GB ön muamelesi yapılmamış olan her iki kültürün gerek gövde gerekse kök uzunluklarında tuz stresine bağlı olarak azalma görülmüştür. Bu azalma Pokkali'nin ve IR-28'in gövdesinde sırasıyla % 4, ve % 7 olmuştur. Tuz stresıyla Pokkali'nin köklerinde meydana gelen azalma % 13 iken, IR-28'in köklerinde oluşan azalma % 18'dir. Tuz stresinden önce 4 gün boyunca 15 mM GB uygulanmış grupların (GB kontrol grupları) gövde uzunlukları her iki kültürde önemli bir değişim göstermezken, kök uzunluklarında Pokkali'de % 13 oranında , IR-28'de ise % 3 oranında azalma görülmüştür.

GB uygulandıktan sonra tuz stresine maruz bırakılmış olan her iki kültüvare ait çeltik bitkilerinin kök ve gövde uzunluklarında, tuz stresi altındaki gruba göre daha az azalma meydana gelmiştir. Bu iyileşme, Pokkali'nin gövdesinde sadece tuz stresi uygulanmış olan gruba göre % 2; IR-28'in gövdesinde ise % 1 oranında iken, IR-28'in kök uzunluğunda % 12 olmuş, Pokkali'nin kök uzunluğunda ise büyük bir farklılık göstermemiştir.

Çizelge 3.1: İki farklı çeltik (*Oryza sativa* L.) kùltivarının (Pokkali ve IR-28), glisinbetain (15 mM) uygulamasından sonra tuz stresine (120mM NaCl) maruz bırakılmalarını takiben 0. ve 7. günlerde gövde ve kök uzunluklarında (cm) gözlenen değışimler.

Gruplar		Pokkali		IR-28	
		0. GÜN	7. GÜN	0. GÜN	7. GÜN
Kontrol	Gövde	30,99±3,29	38,15±2,23	22,41±1,60	23,32±0,63
	Kök	08,49±0,93	12,98±2,21	14,63±1,89	15,20±1,55
15 mM GB	Gövde	32,06±3,45	37,97±1,71	22,76±1,17	23,43±1,37
	Kök	09,11±1,25	11,28±2,11	13,97±2,99	14,79±1,95
120 mM NaCl	Gövde		36,58±3,76		21,80±1,86
	Kök		11,25±1,74		12,54±1,56
GB+NaCl	Gövde		37,39±2,13		22,02±4,46
	Kök		11,27±1,58		14,24±1,64

Çizelge 3.2 ve 3.3'te sırasıyla, gövde ve köke ait yaş ve kuru ağırlık değeri verilmiştir. Tuz uygulamasının 0. gününde her iki kùltivarın gövde yaş ağırlığında GB uygulamasına bağı bir azalma görülmüştür. Bu azalma Pokkali'nin gövdesinde % 3, IR-28'in gövdesinde ise % 21 olmuştur. 0. günde her iki kùltivarın gövde kuru ağırlığında da GB uygulamasına bağı bir azalma gözlenmiştir. 0. günde gövde kuru ağırlığında oluşan azalmanın oranı Pokkali gövdesinde % 5, IR-28 gövdesinde ise % 12 civarında olmuştur. 7. günde Pokkali'nin gövde yaş ağırlığı tuz stresıyla % 30 azalma gösterirken, IR-28'de bu azalma yaklaşık % 47 oranında olmuştur. Fakat Pokkali'nin GB uygulanmış tuz stresli gruplarında bu azalma kontrol grubuna göre % 18, IR-28'de ise aynı uygulama grubunda % 49 olmuştur. Yani, GB uygulaması Pokkali'nin gövde yaş ağırlığında yaklaşık % 18'lik bir iyileşme sağlarken, IR-28'de bu iyileşme görülmemiş hatta yaş ağırlıkta % 5 daha fazla kayıp gözlenmiştir.

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

Çizelge 3.2: İki farklı çeltik (*Oryza sativa* L.) kültürünün (Pokkali ve IR-28), glisinbetain (15 mM) uygulamasından sonra tuz stresine (120mM NaCl) maruz bırakılmalarını takiben 0. ve 7. günlerde gövde yaş (YA.)ve kuru ağırlığında (KA.) (g) gözlenen değişimler.

Gruplar		Pokkali		IR-28	
		0. GÜN	7. GÜN	0. GÜN	7. GÜN
Kontrol	YA.	0,1463±0,0035	0,2510±0,0126	0,1022±0,0038	0,1160±0,0052
	KA.	0,0211±0,0004	0,0365±0,0013	0,0167±0,0007	0,0210±0,0021
15 mM GB	YA.	0,1423±0,0077	0,2260±0,0078	0,0806±0,0019	0,1050±0,0075
	KA.	0,0201±0,0004	0,0330±0,0028	0,0147±0,0005	0,0200±0,0007
120mM NaCl	YA.		0,1750±0,0063		0,0620±0,0037
	KA.		0,0335±0,0005		0,0180±0,0004
GB + NaCl	YA.		0,2060±0,0045		0,0590±0,0013
	KA.		0,0330±0,0007		0,0198±0,0007

GB uygulamasının iki kültürün gövde kuru ağırlığı üzerindeki etkisi farklı olmuştur. 7. günde Pokkali'nin gövde kuru ağırlığında tuz etkisiyle % 8 azalma meydana gelmiştir. Pokkali'de, GB ile muamele edilmiş tuz stresli grupların gövde kuru ağırlığı, sadece GB ile muamele edilmiş grupla yaklaşık aynı düzeyde fakat tuz uygulanmış gruptan % 2 oranında daha düşük olarak bulunmuştur. IR-28'de ise tuz stresi 7. günde gövde kuru ağırlığında % 14 oranında azalmaya neden olurken; GB uygulanmış tuz stresli gruplarda bu azalma % 6 olmuştur. Yani, IR-28'in gövde kuru ağırlığında tuzun etkisiyle oluşan azalmada, GB uygulamasıyla yaklaşık % 10 iyileşme sağlanmıştır.

Tuz stresinin 0. gününde her iki kültürün kök yaş ağırlığında GB uygulamasına bağlı bir artış görülmüştür (Çizelge 3.3). Bu artış Pokkali'de % 31, IR-28'de ise yaklaşık % 15 olmuştur. GB uygulaması sonucu, Pokkali'nin kök

kuru ağırlığı 0. günde % 19 artmasına karşın, IR-28'in kök kuru ağırlığı % 10 azalmıştır.

Çizelge 3.3: İki farklı çeltik (*Oryza sativa* L.) kùltivarının (Pokkali ve IR-28), glisinbetain (15 mM) uygulamasından sonra tuz stresine (120mM NaCl) maruz bırakılmalarını takiben 0. ve 7. günlerde kök yaş (YA.)ve kuru ağırlığında (KA.) (g) gözlenen değışimler.

Gruplar		Pokkali		IR-28	
		0. GÜN	7. GÜN	0. GÜN	7. GÜN
Kontrol	YA.	0,0122±0,0018	0,0820±0,0028	0,0230±0,0010	0,0490±0,0038
	KA.	0,0026±0,0001	0,0035±0,0004	0,0031±0,0001	0,0035±0,0004
15 mM GB	YA.	0,0160±0,0010	0,0540±0,0041	0,0264±0,0006	0,0330±0,0026
	KA.	0,0031±0,0004	0,0037±0,0001	0,0028±0,0001	0,0031±0,0003
120 mM NaCl	YA.		0,0530±0,0048		0,0280±0,0016
	KA.		0,0033±0,0002		0,0027±0,0002
GB + NaCl	YA.		0,0400±0,0035		0,0260±0,0014
	KA.		0,0037±0,0001		0,0030±0,0002

Tuz uygulamasının 7. gününde her iki kùltivarın kök yaş ağırlığında tuz stresine bağı bir azalma gözlenmiştir. Bu azalma Pokkali'de % 35, IR-28'de ise % 43 olmuştur. Her iki kùltivarın GB uygulamasından sonra tuz stresine maruz bırakılan gruplarının kök yaş ağırlığında, sadece tuz uygulanmış gruplara göre daha fazla azalma gözlenmiştir. Bu azalma kontrollere göre Pokkali'de % 51, IR-28'de ise % 47'dir. Dolayısıyla GB ön muamelesi her iki kùltivarın tuz stresi altındaki köklerinde, sadece tuz stresi uygulanmış (GB ile ön muamele edilmemiş) gruba göre daha fazla su kaybına neden olmuştur.

Tuz stresinin 7. gününde Pokkali ve IR-28'in kök kuru ağırlığı sırasıyla % 6 ve % 23 azalmıştır. Fakat GB ön muamelesi sayesinde bu azalma büyük ölçüde

önlenmiştir. Örneğin GB ile ön muamele edilmiş Pokkali ve IR-28'in tuz stresi altındaki köklerinin kuru ağırlığı, sadece tuz stresli gruba göre sırasıyla yaklaşık % 12 ve % 11 artış göstermiştir. GB ön uygulamasının tuz stresi altındaki bitkilerin kök kuru ağırlık miktarını her iki kültürde da arttırdığı görülmektedir.

Çizelge 3.3'ten de görüleceği gibi, gerek Pokkali gerekse IR-28'in GB ön uygulaması yapılmış tuz stresli gruplarındaki 7. gün kök kuru ağırlık değerleri, yaklaşık olarak sadece GB ile muamele edilmiş (GB kontrol) gruptaki kök kuru ağırlık değerine yakındır.

3.2 Bağlı Su İçeriği Sonuçları

Bağlı su içeriğine (%) ait sonuçlar Çizelge 3.4'te verilmiştir. Bu sonuçlara göre her iki kültürün yaprak bağlı nem içeriği tuz stresine bağlı olarak azalmıştır. Bu azalma Pokkali'de % 16 iken, IR-28'de % 26 oranındadır. Fakat GB ile muamele edilmiş grubun yaprak bağlı nem içeriğinin, sadece tuz stresi uygulanmış gruptan daha yüksek olduğu görülmüştür. Bağlı nemde görülen bu iyileşme Pokkali'nin yapraklarında, tuz stresli gruba göre % 8 oranında, IR-28'in yapraklarında ise % 21 oranında olmuştur. GB ön muamelesinin yaprağın bağlı nem içeriğini tuz stresinden koruduğu görülmüştür.

Çizelge 3.4: İki farklı çeltik (*Oryza sativa* L.) kültürünün (Pokkali ve IR-28), glisinbetain (15 mM) uygulamasından sonra tuz stresine (120mM NaCl) maruz bırakılmalarını takiben 0. ve 7. günlerde yaprak bağlı neminde (%) gözlenen değişimler.

Gruplar	Pokkali		IR-28	
	0. GÜN	7. GÜN	0. GÜN	7. GÜN
<i>Kontrol</i>	78,04±0,53	84,50±4,84	79,98±3,27	56,48±3,97
<i>15 mM GB</i>	77,17±1,02	76,37±1,12	77,97±1,79	48,94±2,81
<i>120 mM NaCl</i>		71,23±2,66		41,90±3,71
<i>GB+NaCl</i>		76,89±2,25		50,73±3,05

3.3 Klorofil Flüoresans Ölçüm sonuçları

Pokkali'nin ve IR-28'in fotosentetik verimine ait değerler sırasıyla 3.5 ve 3.6 nolu Çizelgelerde gösterilmiştir.

Klorofil flüoresansı tuz stresinin başlatıldığı günden (0. gün) itibaren her gün izlenmiş ve F_v/F_m oranından yararlanılarak fotosentetik verim belirlenmiştir. Pokkali'de tuz stresi süresine bağlı olarak F_v/F_m oranında ilk günlerde genel bir azalma fakat 6. ve 7. günlerde bir artış gözlenmiştir. Fakat GB uygulanmış olan stres altındaki (GB+NaCl grubu) bitkilerin her ölçümde, GB uygulanmamış tuz stresli gruba göre daha yüksek bir F_v/F_m oranını koruduğu görülmüştür, yani GB bitkilerin fotosentetik verimini korumuştur.

IR-28'in 120mM NaCl stresi altındaki gruba ait F_v/F_m oranında uygulamanın 2. gününde bir miktar artış görülse de diğer günlerde kontrol grubuna göre düşüş eğilimi gözlenmiştir. Bu kültürde GB ön uygulaması yapılmış olan grubun (GB+NaCl grubu) F_v/F_m değerleri her ölçümde tuz stresi altındaki grubun değerlerine göre daha yüksek oranda bulunmuştur.

Fotosentetik verimle ilgili olarak yapılan flüoresans ölçümleri, GB ile yapılan ön muamelenin bitkilerin F_v/F_m değerlerini her iki kültürde da koruduğunu göstermektedir.

Çizelge 3.5: Tuza toleranslı çeltik (*Oryza sativa* L.) kùltivarının (Pokkali), glisinbetain (15 mM) uygulamasından sonra tuz stresine (120mM NaCl) maruz bırakılmasını takiben 7 gün boyunca fotosentetik veriminde (F_v/F_M) meydana gelen değışimler.

	POKKALI			
Günler	Kontrol	GB	NaCl	GB+NaCl
0	0,820±0,0089	0,819±0,0118		
1	0,837±0,0038	0,840±0,0006	0,826±0,0045	0,830±0,0041
2	0,808±0,0149	0,801±0,0067	0,828±0,0081	0,828±0,0033
3	0,822±0,0040	0,820±0,0052	0,818±0,0071	0,820±0,0074
4	0,822±0,0088	0,817±0,0160	0,815±0,0041	0,824±0,0085
5	0,825±0,0013	0,816±0,0178	0,795±0,0375	0,811±0,0146
6	0,819±0,0164	0,817±0,0137	0,821±0,0055	0,829±0,0066
7	0,823±0,0023	0,836±0,0020	0,827±0,0060	0,832±0,0093

Çizelge 3.6: Tuza duyarlı çeltik (*Oryza sativa* L.) kùltivarının (IR-28), glisinbetain (15 mM) uygulamasından sonra tuz stresine (120mM NaCl) maruz bırakılmasını takiben 7 gün boyunca fotosentetik veriminde (F_v/F_M) meydana gelen değışimler.

	IR-28			
Günler	Kontrol	GB	NaCl	GB+NaCl
0	0,829±0,0069	0,834±0,0051		
1	0,830±0,0037	0,831±0,0050	0,819±0,0054	0,831±0,0067
2	0,810±0,0271	0,826±0,0036	0,819±0,0077	0,823±0,0035
3	0,822±0,0032	0,830±0,0065	0,762±0,0291	0,814±0,0088
4	0,812±0,0161	0,790±0,0373	0,795±0,0461	0,811±0,0203
5	0,831±0,0049	0,825±0,0036	0,779±0,0318	0,786±0,0274
6	0,835±0,0010	0,832±0,0023	0,668±0,0099	0,707±0,0170
7	0,824±0,0006	0,830±0,0032	0,736±0,0261	0,745±0,0350

3.4 Fotosentetik Pigment İçeriği Sonuçları

Klorofil a (Chl-a), klorofil b (Chl-b) ve karotenoid miktarlarına ait veriler sırasıyla 3.7, 3.8 ve 3.9 nolu çizelgelerde gösterilmiştir. Tuz uygulamasının 0. gününde GB ile muamele edilmiş olan her iki kültürde pigment miktarları kontrol grubundan daha yüksek bulunmuştur. Chl-a miktarı 7. günde Pokkali'nin stres altındaki grubunda yaklaşık % 8, IR-28'de ise % 22 azalmıştır. Fakat GB uygulaması sonucu tuz stresli gruplarda Chl-a miktarı GB uygulanmamış NaCl stresli gruba göre Pokkali'de % 100 oranında artış gösterirken, IR-28'de bu iyileşmenin oranı yaklaşık % 47 olmuştur.

NaCl uygulamasının 0. gününde her iki kültürün GB uygulanmış grubundaki Chl-b miktarının kontrollere göre yüksek olduğu görülmüştür. 7. günde NaCl'ün etkisiyle Pokkali ve IR-28'in Chl-b miktarında sırasıyla % 14 ve % 49 azalma gözlenmiştir. GB ön muamelesi, Chl-a'da olduğu gibi, her iki

kültivarda NaCl'ye bağılı Chl-b miktarında oluşan azalmayı önlemiştir. Buna göre Pokkali'de % 13, IR-28'de de % 20 oranında iyileşme görülmüştür.

0. gündeki karotenoid miktarı, Chl-a ve Chl-b'de gözleendiğı gibi her iki kültürarda GB uygulanmış grupta kontrollere göre artış göstermiştir. 7. günde Pokkali'nin karotenoid konsantrasyonu tuz stresıyla % 2 azalma gösterirken, bu azalma IR-28'de yaklaşık % 51 olmuştur. Diğer pigmentlerde de gözleendiğı gibi, GB uygulaması tuz stresine bağılı karotenoid miktarlarında oluşan azalmayı önlemiştir. Bu iyileşme Pokkali'de NaCl gruplarına göre yaklaşık % 51, IR-28'de ise yaklaşık % 40'tır.

Çizelge 3.7: İki farklı çeltik (*Oryza sativa* L.) kültürünün (Pokkali ve IR-28), glisinbetain (15 mM) uygulamasından sonra tuz stresine (120mM NaCl) maruz bırakılmalarını takiben 0. ve 7. günlerde klorofil a miktarında (mg g^{-1} yaş ağırlık) gözlenen değişimler.

Gruplar	Pokkali		IR-28	
	0. GÜN	7. GÜN	0. GÜN	7. GÜN
Kontrol	09,77±2,57	07,90±2,13	09,49±0,76	05,82±0,42
15 mM GB	12,78±0,47	14,20±2,72	15,52±1,91	10,72±4,14
120 mM NaCl		07,26±3,74		04,56±0,99
GB + NaCl		14,48±4,86		06,68±0,58

Çizelge 3.8: İki farklı çeltik (*Oryza sativa* L.) kültürünün (Pokkali ve IR-28), glisinbetain (15 mM) uygulamasından sonra tuz stresine (120mM NaCl) maruz bırakılmalarını takiben 0. ve 7. günlerde klorofil b miktarında (mg g^{-1} yaş ağırlık) gözlenen değişimler.

Gruplar	Pokkali		IR-28	
	0. GÜN	7. GÜN	0. GÜN	7. GÜN
<i>Kontrol</i>	3,64±0,96	5,60±1,23	3,65±0,26	4,28±1,15
<i>15 mM GB</i>	5,98±1,18	5,97±0,83	6,78±0,90	3,10±1,26
<i>120 mM NaCl</i>		4,83±2,67		2,20±0,11
<i>GB + NaCl</i>		5,47±1,33		2,63±0,38

Çizelge 3.9: İki farklı çeltik (*Oryza sativa* L.) kùltivarının (Pokkali ve IR-28), glisinbetain (15 mM) uygulamasından sonra tuz stresine (120mM NaCl) maruz bırakılmalarını takiben 0. ve 7. günlerde karotenoid miktarında (mg g^{-1} yaş ağırlık) gözlenen değışimler.

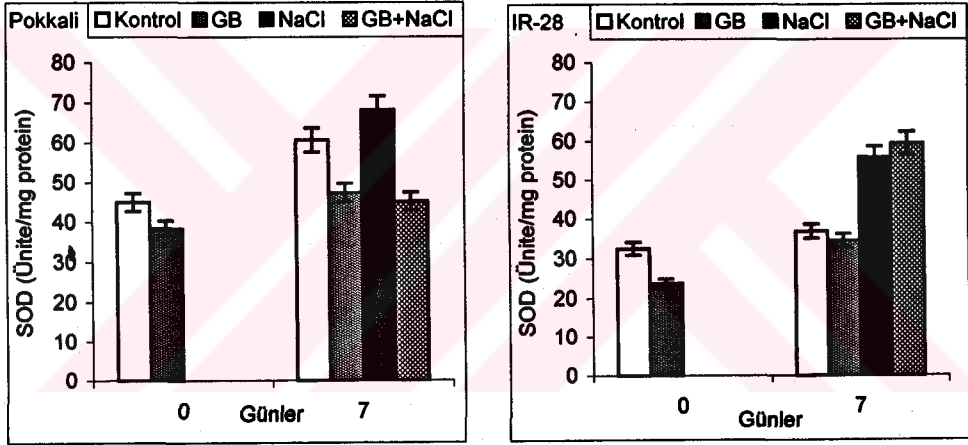
Gruplar	Pokkali		IR-28	
	0. GÜN	7. GÜN	0. GÜN	7. GÜN
<i>Kontrol</i>	0,56±0,13	0,62±0,12	0,59±0,04	0,61±0,17
<i>15 mM GB</i>	0,81±0,12	0,86±0,14	1,02±0,10	0,54±0,20
<i>120 mM NaCl</i>		0,61±0,26		0,30±0,01
<i>GB + NaCl</i>		0,92±0,17		0,42±0,06

3.5 Antioksidant Enzim Aktivitelerinin Sonuçları

3.5.1 Süperoksit dismutaz enzim aktivite sonuçları

Süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesiyle ilgili her iki kùltivara ait veriler Şekil 3.1’de gösterilmiştir. Tuz stresinin 0. gününde her iki kùltivarın GB ön muamelesi yapılmış gruplarının SOD aktivitesinde, kontrollere göre bir azalma oluşmuştur. Bu azalma Pokkali’de % 15, IR-28’de % 27 oranında gerçekleşmiştir.

Tuz stresinin 7. gününde her iki kültivarın GB kontrol gruplarında, 0. günde de gözlendiği gibi kontrollere göre SOD aktivite düzeylerinde bir azalma görülmüştür. 7. günde her iki kültivarın yapraklarındaki SOD aktivitesinde tuz stresine bağlı bir artış gözlenmiştir. Bu artış Pokkali ve IR-28’de sırasıyla % 12 ve % 49 olmuştur. GB uygulanmış ve tuz stresine maruz bırakılmış Pokkali grubunda SOD aktivitesinin düzeyi, sadece NaCl uygulanmış gruptan % 34 daha düşük, fakat yaklaşık olarak GB kontrol grubuna yakın olduğu bulunmuştur. Ayrıca Pokkali’nin aynı grubundaki SOD aktivitesi 7. günde kontrol grubundan da % 26 daha düşüktür.



şekil 3.1: İki farklı  eltik (*Oryza sativa* L.) kültivarının (Pokkali ve IR-28), glisinbetain (15 mM) uygulamasından sonra tuz stresine (120mM NaCl) maruz bırakılmalarını takiben 0. ve 7. günlerde total SOD aktivitesinde ( n te / mg protein) gözlenen değişimler.

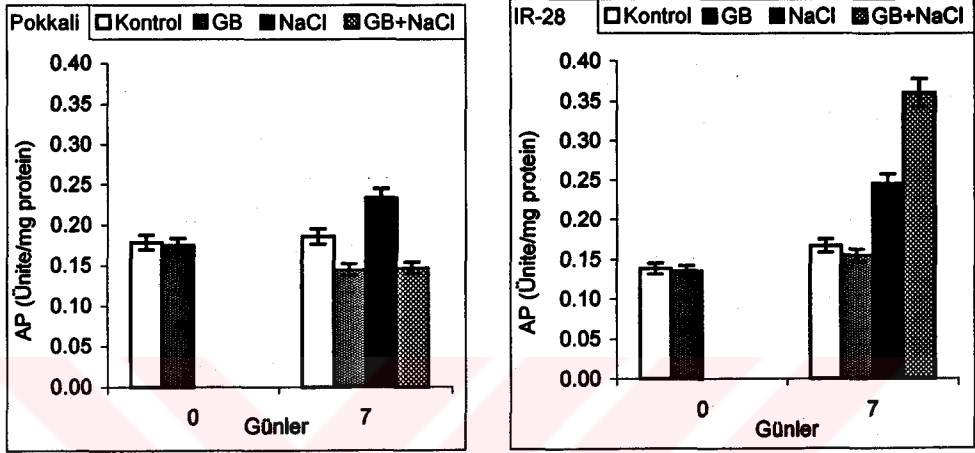
7.günde IR-28’in GB  n muamelesi yapılmış olan NaCl stresli grubundaki (GB+NaCl grubu) SOD aktivitesi, GB uygulanmamış tuz stresi altındaki grubun (NaCl grubu) SOD aktivitesinden % 6, kontrol grubununkinden ise yaklaşık % 61

daha yüksek bulunmuştur. IR-28'de tuz stresine bağlı enzim aktivitesinde görülen artış Pokkali'den daha yüksek olmasına karşın, Pokkali'de temel SOD aktivite düzeylerinin daha yüksek olduğu saptanmıştır. Bu durum, Pokkali'nin IR-28'e göre tuz stresinden daha az etkilendiğinin göstergesi olabilir. GB ön uygulaması kültürleri farklı şekillerde etkileyerek, Pokkali'de tuz stresi altında SOD aktivitesinin düşmesini sağlarken, IR-28'de SOD aktivitesinin artmasına neden olmuştur.

3.5.2 Askorbat peroksidaz enzim aktivite sonuçları

Askorbat peroksidaz (AP) enzim aktivitesiyle ilgili her iki kültüvare ait veriler Şekil 3.2'de gösterilmiştir. Tuz stresinin 0. gününde her iki kültürün GB ön muamelesi yapılmış gruplarının AP aktivitesinde, kontrollere göre azalma belirlenmiştir. Bu azalma gerek Pokkali'de gerekse IR-28'de yaklaşık % 2 olmuştur. Tuz stresinin 7. gününde her iki kültürün GB kontrol gruplarında, 0. günde de olduğu gibi kontrollere (GB ve NaCl uygulanmamış) göre AP aktivitesinde bir azalma görülmüştür, bu azalma Pokkali'de % 22, IR-28'de ise % 7 oranındadır. Her iki kültürün yapraklarındaki AP aktivitesinde 7. günde tuz stresine bağlı bir artış gözlenmiştir. Pokkali'nin yapraklarındaki AP aktivitesinde tuz stresiyle meydana gelen artış % 25, IR-28'de ise % 47 olmuştur. Pokkali'nin GB uygulanmış olan tuz stresli grubunda ise (GB+NaCl grubu) AP'ın aktivite düzeyi, NaCl stresi altındaki gruptan % 37 oranında daha düşük, fakat yaklaşık olarak GB kontrol grubuna yakın bir seviyede bulunmuştur. 7.günde Pokkali'nin bu grubunda gözlenen AP aktivitesi kontrollere göre ise % 21 daha düşük bulunmuştur. IR-28'in GB ön muamelesi yapılmış olan NaCl stresli grubundaki AP aktivitesinin, tuz stresi altındaki grubun AP aktivitesinden % 46, kontrolden ise yaklaşık % 116 daha yüksek olduğu bulunmuştur. 7.günde, IR-28'de gerek tuz (sadece NaCl), gerekse GB ve tuz (GB+NaCl) uygulamalarının teşvik ettiği AP

enzim düzeyinin, Pokkali'nin aynı gruplarından daha yüksek olduğu saptanmış olmasına karşın, 0. ve 7. günlerde temel AP seviyesi Pokkali'de daha yüksektir (Şekil 3.2).



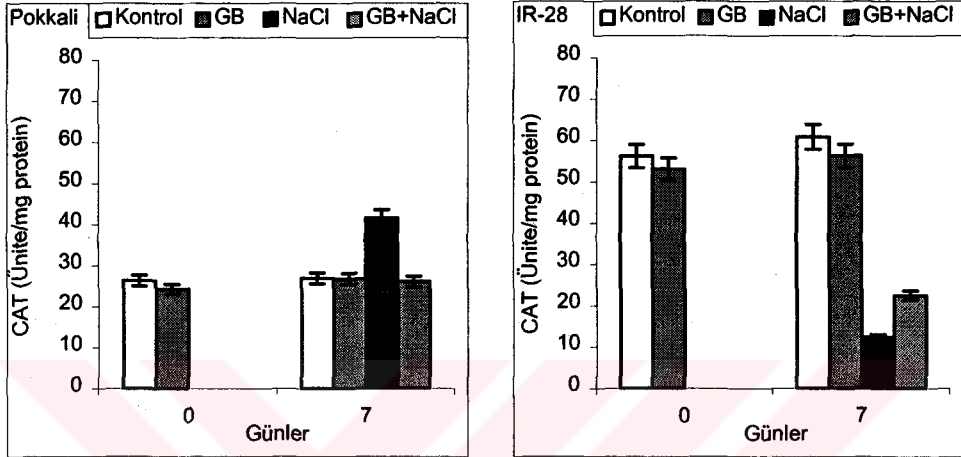
Şekil 3.2: İki farklı çeltik (*Oryza sativa* L.) kültivarının (Pokkali ve IR-28), glisinbetain (15 mM) uygulamasından sonra tuz stresine (120mM NaCl) maruz bırakılmalarını takiben 0. ve 7. günlerde AP aktivitesinde (ünite / mg protein) gözlenen değişimler.

Dolayısıyla gerek GB ön uygulaması, gerekse NaCl ve de GB + NaCl uygulamaları kültivarları farklı şekillerde etkilemiş; GB ön muamelesi Pokkali'de tuz stresi altında AP aktivitesinin düşmesini sağlarken, IR-28'de AP aktivitesinin önemli derecede artmasına neden olmuştur. Ayrıca bu sonuçlardan, AP enzim aktivitesinin, SOD'a benzer bir eğilimle kültivarları etkilediği de görülmektedir.

3.5.3 Katalaz enzim aktivite sonuçları

Katalaz (CAT) enzim aktivitesiyle ilgili her iki kültivara ait veriler Şekil 3.3'de gösterilmiştir. Tuz stresinin 0. gününde her iki kültivarın GB ön

muamelesi yapılmış gruplarının CAT aktivitesinde, kontrollere göre azalma belirlenmiştir. Bu azalma Pokkali’de yaklaşık % 8, IR-28’de % 6 olmuştur.



Şekil 3.3: İki farklı çeltik (*Oryza sativa* L.) kültivarının (Pokkali ve IR-28), glisinbetain (15 mM) uygulamasından sonra tuz stresine (120mM NaCl) maruz bırakılmalarını takiben 0. ve 7. günlerde CAT aktivitesinde (ünite / mg protein) gözlenen değişimler.

Tuz stresinin 7. gününde her iki kültivarın GB kontrol gruplarında, 0. günde de olduğu gibi kontrollere göre CAT aktivitesinde bir azalma görülmüştür. Bu azalma Pokkali’de % 0,4; IR-28’de ise % 8’dir. Pokkali’nin yapraklarındaki CAT aktivitesinde 7. günde tuz stresine bağlı bir artış gözlenirken, IR-28’de bir azalma meydana gelmiştir. Pokkali’nin yapraklarındaki CAT aktivitesinde tuz uygulamasına bağlı artış % 54 iken, IR-28’in yapraklarındaki tuz stresine bağlı azalma % 80 oranındadır. Pokkali’nin GB uygulanmış olan tuz stresli grubunda ise CAT’ın aktivitesi, AP’deki gibi, NaCl uygulanmış gruptan % 37 daha düşük olmasına karşın, yaklaşık olarak GB kontrol grubuna yakın bir seviyededir.

7.günde Pokkali'nin bu grubunda gözlenen CAT aktivitesinin kontrollere (GB ve NaCl uygulanmamış) göre ise % 3 daha düşük olduğu bulunmuştur.

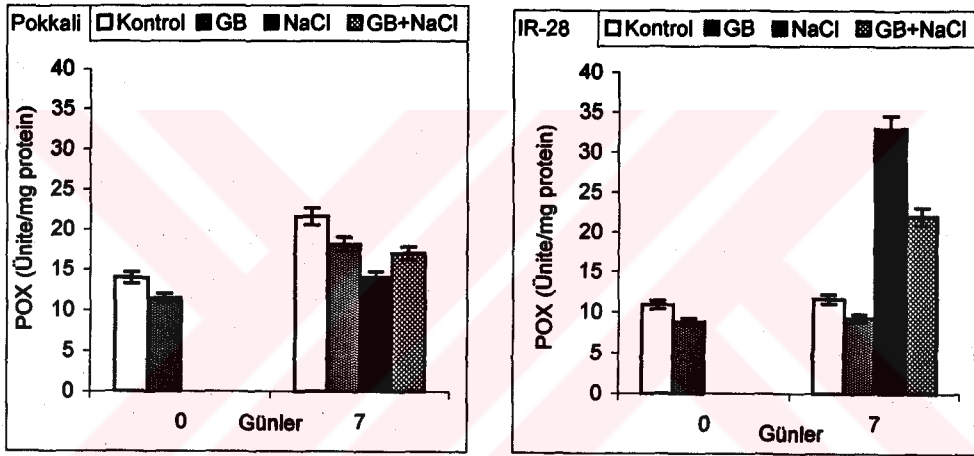
IR-28'in GB ön muamelesi yapıldıktan sonra NaCl stresine maruz bırakılmış grubundaki CAT aktivitesinin, tuz stresi altındaki grubun CAT aktivitesinden % 82 daha yüksek, kontrolden ise yaklaşık % 63 oranında daha düşük olduğu görülmüştür. Dolayısıyla GB ön muamelesi IR-28'in CAT aktivitesinde tuz stresıyla oluşan azalmayı iyileştirmiştir. IR-28'in bütün gruplarında, uygulamalarla (GB ve GB + NaCl) teşvik edilen enzim aktiviteleri ve yine bütün uygulama gruplarındaki temel enzim aktivite düzeylerinin Pokkali'den daha yüksek olduğu görülmüştür. Sonuçlardan da görüldüğü gibi, gerek GB ön uygulaması, gerekse NaCl ve de GB+NaCl uygulamaları kültürleri farklı şekillerde etkilemiş; GB ön muamelesi Pokkali'de tuz stresi altında CAT aktivitesinin düşmesini sağlarken, IR-28'de CAT aktivitesinin önemli derecede artmasına neden olmuştur.

3.5.4 Peroksidaz enzim aktivite sonuçları

Peroksidaz (POX) enzim aktivitesiyle ilgili her iki kültüvare ait veriler Şekil 3.4'de gösterilmiştir. Tuz stresinin 0. gününde her iki kültürün GB ön muamelesi yapılmış gruplarının POX aktivitesinde, kontrollere göre azalma belirlenmiştir. Bu azalma Pokkali'de yaklaşık % 18, IR-28'de ise % 19 oranında olmuştur.

Tuz stresinin 7. gününde her iki kültürün GB kontrol gruplarında, 0. günde de olduğu gibi kontrollere göre POX aktivitesinde bir azalma görülmüştür, bu azalma Pokkali'de % 16; IR-28'de ise % 20 oranındadır. 7. günde Pokkali'nin yapraklarındaki POX aktivitesinde tuz stresi nedeniyle kontrollere göre bir azalma gözlenirken, IR-28'in yapraklarındaki POX aktivitesinde bir artış meydana gelmiştir. Pokkali'nin yapraklarındaki POX aktivitesinde NaCl etkisiyle

oluşan bu azalma % 35 olmuştur. Buna karşın, IR-28'in yapraklarındaki POX aktivitesinde tuz stresiyile oluşan artış ise % 183 oranındadır. Pokkali'nin GB uygulanmış olan tuz stresli grubunda POX'ın aktivite düzeyi, NaCl stresi altındaki gruptan % 21 daha yüksek olmasına karşın yaklaşık olarak GB kontrol grubuna yakın bir seviyede bulunmuştur. 7.günde Pokkali'nin bu grubunda gözlenen POX aktivitesinin kontrol grubundan ise % 21 daha düşük olduğu bulunmuştur.



Şekil 3.4: İki farklı çeltik (*Oryza sativa* L.) kültivarının (Pokkali ve IR-28), glisinbetain (15 mM) uygulamasından sonra tuz stresine (120mM NaCl) maruz bırakılmalarını takiben 0. ve 7. günlerde POX aktivitesinde (ünite / mg protein) gözlenen değişimler.

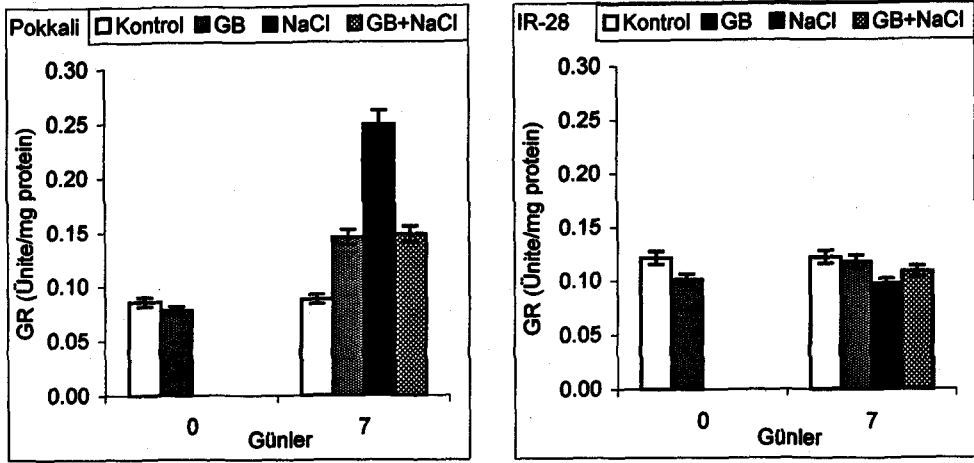
IR-28'in GB ön muamelesi yapılmış olan NaCl stresli grubundaki POX aktivitesinin, tuz stresi altındaki grubun POX aktivitesinden % 33 daha düşük, kontrolden ise yaklaşık % 89 oranında daha yüksek olduğu görülmüştür. Dolayısıyla GB ön muamelesi IR-28'in POX aktivitesinde tuz stresiyile oluşan artışı önlemiştir. Pokkali'de ise GB ön muamelesi, POX aktivitesinde NaCl stresiyile oluşan azalmayı az da olsa engellemiştir. Elde edilen sonuçlardan,

Pokkali'nin kontrol ve GB kontrol gruplarındaki temel enzim aktivite düzeylerinin IR-28'den daha yüksek oranda olduğu görülmüştür. Sonuç olarak, gerek GB ön uygulaması, gerekse NaCl ve de GB + NaCl uygulamalarının kültürleri farklı şekillerde etkilediği gözlenmiştir.

3.5.5 Glutasyon redüktaz enzim aktivite sonuçları

Glutasyon redüktaz (GR) enzim aktivitesiyle ilgili her iki kültüvare ait veriler Şekil 3.5'de gösterilmiştir. Tuz stresinin 0. gününde her iki kültürün GB ön muamelesi yapılmış gruplarının GR aktivitesinde, kontrollere göre azalma belirlenmiştir. Bu azalma Pokkali'de yaklaşık % 9, IR-28'de ise % 17'dir.

Tuz stresinin 7. gününde Pokkali'nin GB kontrol grubundaki GR aktivitesinde, % 65 artış görülmesine karşın; IR-28'in GB kontrol grubunda % 4 oranında bir azalma meydana gelmiştir. 7. günde Pokkali'nin yapraklarındaki GR aktivitesinde, NaCl stresine bağlı bir artış gözlenirken, IR-28'in yapraklarındaki GR aktivitesinde bir azalma meydana gelmiştir. Pokkali'nin yapraklarındaki GR aktivitesinde tuz stresine oluşan bu artış yaklaşık % 183 iken, IR-28'in yapraklarındaki GR aktivitesinde tuz stresine oluşan azalma % 21'dir. Pokkali'nin GB uygulanmış olan tuz stresli grubunda GR'nin aktivite düzeyi, NaCl stresi altındaki gruptan % 41 daha düşük oranda fakat yaklaşık olarak GB kontrol grubuna yakın bir seviyede bulunmuştur. 7.günde Pokkali'nin yine bu grubunda gözlenen GR aktivitesinin kontrol grubundan % 67 oranında daha yüksek olduğu bulunmuştur. IR-28'in GB ön muamelesi yapıldıktan sonra NaCl stresine maruz bırakılmış grubundaki GR aktivitesinin, tuz stresine altındaki grubun GR aktivitesinden % 11 yüksek, kontrolden (GB ve NaCl uygulanmamış) ise yaklaşık % 12 düşük olduğu görülmüştür.



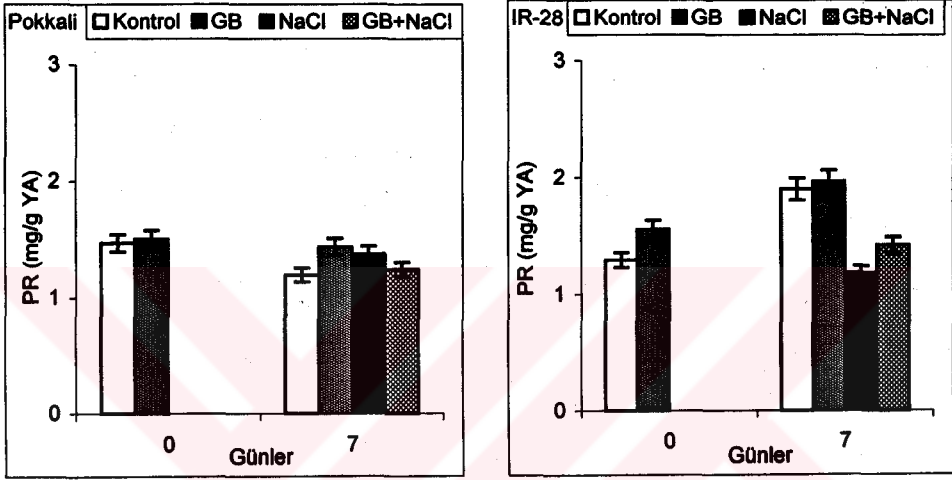
Şekil 3.5: İki farklı çeltik (*Oryza sativa* L.) kültürünün (Pokkali ve IR-28), glisinbetain (15 mM) uygulamasından sonra tuz stresine (120mM NaCl) maruz bırakılmalarını takiben 0. ve 7. günlerde GR aktivitesinde (ünite / mg protein) gözlenen değişimler.

Dolayısıyla GB ön muamelesi IR-28'in GR aktivitesinde tuz stresıyla oluşan azalmayı önleyerek enzimin aktivitesinin az da olsa korunmasını sağlamıştır. Pokkali'de ise GB ön muamelesi, GR aktivitesinde NaCl stresıyla oluşan artışı önemli oranda engellemiştir. Elde edilen sonuçlardan, gerek GB ön uygulaması, gerekse NaCl ve de GB + NaCl uygulamalarının kültürleri farklı şekillerde etkilediği gözlenmiştir.

3.6 Total Protein Miktarı Sonuçları

Total protein (PR) miktarıyla ilgili her iki kültüvare ait veriler Şekil 3.6'da gösterilmiştir. Tuz stresinin 0. gününde her iki kültürün GB ön muamelesi yapılmış gruplarının PR miktarında, kontrollere göre bir artış belirlenmiştir. Bu azalma Pokkali'de yaklaşık % 2, IR-28'de ise % 20 olmuştur.

Tuz stresinin 7. gününde Pokkali'nin GB kontrol grubundaki PR miktarı, % 20 artış gösterirken; IR-28'in GB kontrol grubundaki PR miktarı % 3 artmıştır. 7. günde Pokkali'nin yapraklarındaki PR miktarı, NaCl stresine bağlı olarak % 15 artış gösterirken, IR-28'in yapraklarındaki PR miktarında % 37 azalma meydana gelmiştir.

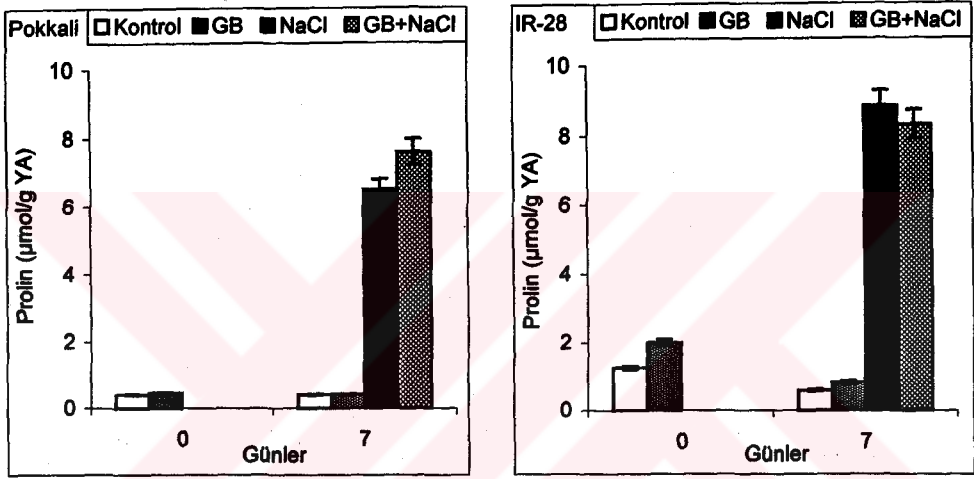


Şekil 3.6: İki farklı çeltik (*Oryza sativa* L.) kültivarının (Pokkali ve IR-28), glisinbetain (15 mM) uygulamasından sonra tuz stresine (120mM NaCl) maruz bırakılmalarını takiben 0. ve 7. günlerde PR miktarında (mg/ g yaş ağırlık) gözlenen değişimler.

Pokkali'nin GB uygulandıktan sonra tuz stresine maruz bırakılmış grubunda PR miktarının, NaCl stresi altındaki gruptan % 10, GB kontrol grubundan ise % 14 daha düşük olduğu bulunmuştur. 7. günde Pokkali'nin yine bu grubunda gözlenen PR miktarının kontrol grubundan % 4 oranında daha yüksek olduğu bulunmuştur. IR-28'in GB ön muamelesi yapılmış olan NaCl stresli grubundaki PR miktarının, GB uygulanmamış tuz stresli altındaki gruptan % 20 daha yüksek, kontrolden ise yaklaşık % 25 daha düşük olduğu görülmüştür.

3.7 Prolin Miktarı Sonuçları

Prolin miktarıyla ilgili her iki kültüvara ait veriler Şekil 3.7’de gösterilmiştir. Tuz stresinin 0. gününde her iki kültürün GB ön muamelesi yapılmış gruplarındaki prolin miktarında, kontrollere göre bir artış belirlenmiştir. Bu artış Pokkali’de yaklaşık % 13, IR-28’de ise % 61’dir.



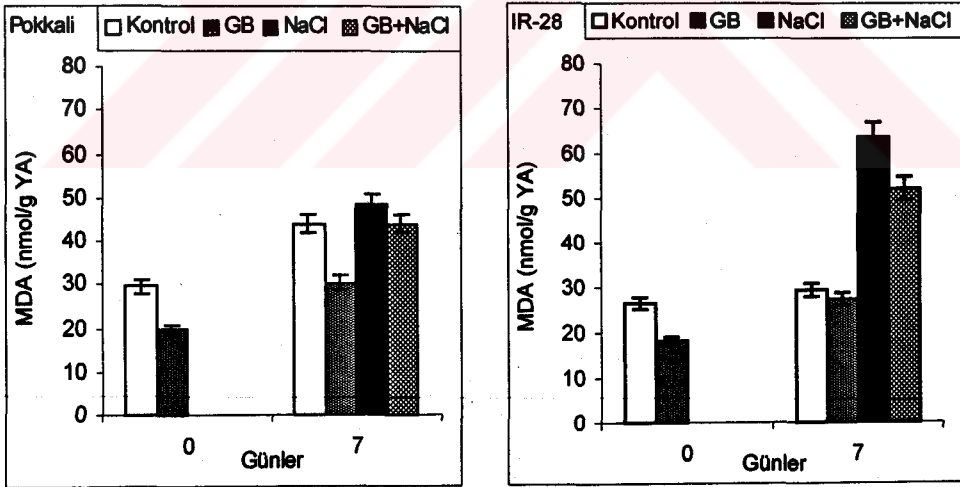
Şekil 3.7: İki farklı çeltik (*Oryza sativa* L.) kültürünün (Pokkali ve IR-28), glisinbetain (15 mM) uygulamasından sonra tuz stresine (120mM NaCl) maruz bırakılmalarını takiben 0. ve 7. günlerde prolin miktarında (µmol/g yaş ağırlık) gözlenen değişimler.

Tuz stresinin 7. gününde Pokkali ve IR-28’in GB kontrol gruplarındaki prolin seviyesi, kontrollere göre sırasıyla % 5 ve % 42 artmıştır. 7. günde Pokkali’nin ve IR-28’in yapraklarındaki prolin miktarı NaCl etkisiyle, sırasıyla kontrol grubunun 16 katına ve 15 katına çıkmıştır. Pokkali’nin GB uygulanmış olan tuz stresli grubunda prolin miktarı, sadece NaCl uygulanmış gruptan % 17, GB kontrol grubundan ise 18 kat daha yüksektir. 7. günde Pokkali’nin yine bu

grubunda gözlenen prolin miktarının, kontrol grubunun 19 katı kadar daha yüksek oranda olduğu bulunmuştur. IR-28'in GB ön muamelesi yapılmış olan NaCl stresli grubundaki prolin miktarı, sadece NaCl uygulanmış gruptan % 6 daha düşük, kontrolden ise yaklaşık 14 kat daha yüksektir. Bu sonuçlardan da görüldüğü gibi, GB ön uygulaması Pokkali'de tuz stresine bağlı prolin miktarındaki artışı, IR-28'e göre daha fazla teşvik etmiştir.

3.8 Lipid Peroksidasyonu Sonuçları

Lipid peroksidasyonu oranları, malondialdehit (MDA) miktarında meydana gelen değişimlere göre belirlenmiş ve Şekil 3.8'de gösterilmiştir. Tuz stresinin 0. gününde her iki kültürün GB ön muamelesi yapılmış gruplarının MDA miktarında, kontrollere göre bir düşüş görülmüştür. Bu düşüş Pokkali'de yaklaşık % 32, IR-28'de ise % 31 olmuştur.



Şekil 3.8: İki farklı çeltik (*Oryza sativa* L.) kültürünün (Pokkali ve IR-28), glisinbetain (15 mM) uygulamasından sonra tuz stresine (120mM NaCl) maruz

bırakılmalarını takiben 0. ve 7. günlerde malondialdehit miktarında (nmol/g yaş ağırlık) gözlenen değişimler.

Tuz stresinin 7. gününde Pokkali ve IR-28'in GB kontrol grubundaki MDA miktarı, kontrollere göre sırasıyla % 31 ve % 7 azalmıştır. 7. günde NaCl uygulaması, Pokkali'nin yapraklarındaki MDA miktarını kontrollere göre % 11, IR-28'de ise % 117 oranında arttırmıştır.

Pokkali'nin GB uygulanmış olan tuz stresli grubunda MDA miktarı, NaCl stresi altındaki gruptan yaklaşık % 10 daha düşük, GB kontrol grubundan ise % 45 daha yüksektir. 7.günde Pokkali'nin yine bu grubunda gözlenen MDA miktarının kontrol grubuyla hemen hemen aynı düzeyde olduğu bulunmuştur. IR-28'in GB ön muamelesi yapılmış olan NaCl stresli grubundaki MDA miktarının, tuz stresi altındaki gruptan % 18 daha düşük, kontrolden ise yaklaşık % 77 oranında daha yüksek olduğu görülmüştür. Sonuç olarak, GB ön muamelesinin, tuz stresiyle oluşan lipid peroksidasyonunu her iki kültürde da engellediği görülmüştür. Hatta, GB kontrol grubundaki bitkilerin yapraklarında lipid peroksidasyonunun, normal kontrol grubundan daha düşük olduğu bulunmuştur.

4. TARTIŞMA

Tuzlu topraklar, global mahsul üretiminin önemli belirleyicilerinden birisini oluşturur. Tuzlaşma nedeniyle 2 milyon hektardan daha fazla miktarda tarımsal toprağın her yıl üretim değerini kaybettiği tahmin edilmektedir. Ortamdaki yüksek tuz, su kıtlığına (ozmotik stres), iyon toksisitesine ve besin eksikliğine neden olur. Doğal ve tarımsal habitatlardaki yüksek tuz konsantrasyonları bitkilerde, büyüme inhibisyonuna ve metabolik değişimlere neden olur. Bu metabolik değişimler arasında normal metabolik süreçlerin sürdürülmesi için bazı toksik olmayan bileşiklerin sentezlenmesi ve bazı antioksidant enzim aktivitelerinin teşvik edilmesi de bulunur.

Çeltik bitkisi tuz stresine oldukça duyarlı olan glikofit bir bitkidir. Çalışmamızda fidelerin gövde ve kök uzunluklarında tuz stresine bağlı olarak meydana gelen azalmaların, GB ön muamelesi sayesinde önlendiği görülmüştür. Lin ve Kao (2001), kök büyümesinde NaCl tarafından meydana getirilen azalmanın, H_2O_2 seviyesindeki artışla yakından ilişkili olduğunu ileri sürmüştür. Bu nedenle, GB ön muamelesi yapıldıktan sonra NaCl uygulanmış olan grupta, daha az miktarda H_2O_2 biriktiği ve böylece büyümenin, sadece NaCl uygulanmış gruba göre daha az inhibe edildiği düşünülmektedir. Tuz stresi nedeniyle kök ve gövdenin kuru ağırlığındaki azalmalar her iki kültürde de GB uygulaması sayesinde az da olsa iyileştirilmiştir. Bu sonuçlar, GB birikiminin kök ve gövde kuru ağırlık artışını engellemediğini ileri süren Kishitani ve ark. (2000)'ın transgenik çeltik bitkileriyle elde ettiği sonuçlarla da uyumaktadır. Ayrıca, Agboma ve ark. (1997) tütün fidelerinin yapraklarına 0,1 M GB uyguladıklarında, yaprakların yaş ve kuru ağırlığı ve yaprak alanında önemli artışlar meydana geldiğini bulmuştur.

Tuz ve kuraklık stresine gösterilen tepkilerden birisi de yaprak bağıl nem içeriğinde görülen azalmadır. Pokkali ve IR-28'in tuza bağıl olarak yaprak bağıl neminde görülen azalma GB ön muamelesi sayesinde önemli oranda önlenmiştir. Bu sonuçlar, fasulye bitkilerinde, tuz stresi nedeniyle yaprak bağıl neminde ve net fotosentez oranında oluşan azalmanın yapraklarına püskürtülen 10 mM GB sayesinde büyük ölçüde önlendiğini bulan Lopez ve ark. (2002)'ın sonuçlarıyla da uyusmaktadır.

Toksik olmayan glisinbetain ve diğer ozmotik koruyucu bileşikler, tuzluluk (Robinson ve Jones, 1986; Egan ve ark., 2001; Girija ve ark., 2002), kuraklık (Abernethy ve McManus, 1998), ve düşük sıcaklık (Naidu ve ark., 1991) gibi streslere tepki olarak çeşitli bitkiler ve bakteriler tarafından sentezlenerek biriktirilmektedir. Yüksek konsantrasyonlarda biriken prolin ve betain gibi uyumlu ve yardımcı bileşikler, fizyolojik işlevlerin sürdürülmesini sağlarlar. Örneğin, GB'in ozmotik düzenlemede oynadığı önemli rolün yanı sıra (Grumet ve Hanson, 1986), oksijen kullanan PS-II kompleksini NaCl inhibisyonuna karşı (Murata ve ark., 1992), ve PS-I ile PS-II elektron taşıma sistemini yüksek sıcaklık inaktivasyona karşı (Allakhverdiev ve ark., 1996; Allakhverdieva ve ark., 1999; Alakhverdieva ve ark., 2001) koruduğu da bilinmektedir. Yang ve ark. (1996) glisinbetain sentezleyen (*Bet1/Bet1*) mısır serisinin yüksek sıcaklık stresi altında F_V/F_M değerlerinin fazla etkilenmediğini fakat, glisinbetain sentezleyemeyen (*bet1/bet1*) homozigot mısır serilerinin F_V/F_M değerlerinde önemli bir düşüş olduğunu bulmuşlardır. PS-II'nin fotosentetik veriminde oluşan bu düşüşün yüksek sıcaklığın direkt etkisinden daha çok, elektrolit sızması ve bunun sonucunda Mg^{2+} gibi düzenleyici iyonların miktarında oluşan azalmadan kaynaklandığını düşünmüşlerdir (Yang ve ark., 1996). GB'in, ıspanaktan izole edilen Fotosistem-II partiküllerindeki oksijen kullanan kompleksten Mn iyonlarının ayrılmasını önleyerek, fotosentetik oksijen oluşumunun

inaktivasyonunu engellediği rapor edilmiştir (Mohanthy ve ark., 1993). Papageorgiou ve ark. (1991) glisinbetainin yüksek tuz konsantrasyonlarına bağlı oksijen oluşumunu engellemesine karşı PS-II'yi koruduğu fakat, 18 kDa ve 23 kDa'luk ekstrinsik proteinlerinden arındırılmış olan PS-II partiküllerini inaktivasyondan koruyamadığını göstermiştir. Mäkelä ve ark. (1999), kuraklık ve tuz stresine maruz bırakılan *Lycopersicon esculentum* Mill. ve *Brassica rapa* L. *oleifera* bitkilerinde strese bağlı olarak net fotosentez ve stomal iletkenliğindeki azalmanın, yapraklara uygulanan GB ile önlendiğini bulmuşlardır. Ayrıca tuzluluk veya kuraklık koşullarında yetişen bitkilerde fotorespirasyon artışını yapraklara GB uygulaması önemli oranda azaltmıştır (Mäkelä ve ark., 1999). Çalışmamızda tuz stresinin süresine bağlı olarak Pokkali'nin fotosentetik veriminde (F_v/F_m) önemli bir değişim gözlenmezken, IR-28'de 4. günden itibaren tuz uygulamasına bağlı önemli bir düşüş görülmüştür. Fakat GB uygulandıktan sonra tuz stresine maruz bırakılmış olan grubun F_v/F_m değerleri, Pokkali'de GB ve NaCl uygulanmamış olan kontrol grubuna yakın değerlerde iken, IR-28'de ise sadece NaCl uygulanmış gruba göre daha az düşüş göstermiştir. Bu durum GB uygulamasının fotosentetik verimi koruduğunu göstermektedir. Bu sonuca fotosentetik pigment miktarlarına bakıldığında da ulaşılabilir. Chl-a, Chl-b ve karotenoid miktarları her iki kültürde tuz stresine bağlı olarak önemli miktarda azalırken, GB ön uygulamasından sonra tuz stresi uygulanmış grupların pigment içeriklerinde artış gözlenmiştir. Bunun nedeni, kloroplast membranlarının kararlılığında GB uygulamasıyla bir artışın meydana gelmesi olabilir. Tuz stresine maruz bırakılan *Vicia faba* bitkilerinin klorofil miktarında oluşan kaybı ve yaprak bağıl neminde oluşan azalmayı, yapraklarına uygulanan prolin ve GB'in önlediği bulunmuştur (Gadallah, 1999).

Çeltik bitkilerinin köklerinden verilen GB'in iletim sistemi boyunca taşınarak yapraklarda birikmesi (Harinasut ve ark., 1996), fotosentetik verim üzerinde

olumlu etkiler oluşturmıştır. Bu etki olasılıkla, tuz stresi altında normalde kapanması gereken stomaların açık kalmasını ve böylece, daha etkili bir gaz değişiminin gerçekleşmesini sağlamıştır (Mäkelä ve ark., 1999). Çünkü GB hücrel yapılaraya bağılı su oranını arttırdığından, stomanın bekçi hücrelerinin turgor basıncını arttırarak stomaların açık kalmasını ve böylece fotorespirasyonun da azalmasını sağlamaktadır (Mäkelä ve ark., 1999). Stres altındaki bitkinin stomaları açık kaldığı sürece de bitki CO₂ almaya devam ederek fotosentezi sürdürebilir. Ayrıca *in vitro*'da yapılan çalışmalar GB'in, *Aphanothece halophytica*'da RuBisCO'nun aktivitesini KCl stresine karşı koruduğunu göstermiştir (Incharoensakdi ve ark., 1996). Rajasekaran ve ark. (1997), *in vivo*'da buğdaya GB ile yapılan ön muamelenin, fotosentezin NaCl teşvikli stomal veya stomal olmayan inhibisyonunu önlediğini ve GB'in RuBisCo aktivitesini NaCl inhibisyonundan koruduğunu göstermiştir. Bu nedenle, GB'in yüksek tuz bulunan hücrelerde, RuBisCo'nun konformasyonunu kararlı halde tutarak enzimin aktivitesini koruması daha olası görünmektedir (Sakamoto ve Murata, 2002). Belki de GB, stres altındaki yapraklara CO₂ girişini arttırdığı için, substrat miktarındaki artışa bağılı olarak RuBisCO'nun aktivitesini de arttırmaktadır.

Abiotik streslere bağılı olarak oluşan serbest radikallerin, hücre membranlarının lipit bileşenlerini peroksidasyona uğratması, hücre seviyesinde meydana gelen stres teşvikli hasarın göstergesi ve bir anlamda da ölçüsüdür (Heath ve Packer, 1968; Lin ve Kao, 2000). Tuz stresi altında Pokkali'nin yapraklarındaki MDA seviyesinde, IR-28'e göre çok daha az artış olması, bu kùltivarın oksidatif stresten daha iyi korunduğunu göstermektedir. Literatürde, oksidatif zararın giderilmesi ve tuz stresini de içeren çevresel streslere karşı direncin arttırılmasının, daha etkili bir antioksidant sistemle gerçekleştirilebildiğini ileri süren bir çok çalışma rapor edilmiştir (Çakmak ve

ark., 1993; Scandalios, 1993; Chang ve Kao, 1998; Acar ve ark., 2001; Bor ve ark., 2003). Çalışmamızda kullanılan iki çeltik çeşidi tuz stresinden farklı şekillerde etkilenmiştir. Pokkali'de tuza bağlı olarak SOD, AP, CAT ve GR aktivitelerinde artış, POX aktivitesinde azalma görülürken; IR-28'in SOD, AP, ve POX aktivitelerinde artış, CAT ve GR aktivitelerinde ise azalma görülmüştür. SOD ve AP aktiviteleri IR-28'de daha fazla teşvik edilmiş olmasına rağmen bu enzimlerin temel aktivite düzeyleri Pokkali'de daha yüksektir. Dolayısıyla Pokkali'nin enzim düzeyini daha fazla arttırmaya gerek duymaksızın oksidatif strese karşı koyabildiği ortaya çıkmaktadır. Scandalios (1993)'a göre özellikle SOD ve CAT, hücrel zarar önlemede rol alan en etkili antioksidant enzimlerdir. Pokkali'de yüksek seviyelerde bulunan SOD ve tuz stresine bağlı olarak önemli seviyede teşvik edilen CAT enzimleri sırasıyla, süperoksit ($O_2^{\cdot-}$) ve H_2O_2 (hidrojen peroksit) oluşumunu engelleyerek oksidatif stresten etkili bir şekilde korunma sağlamaktadır. Bu sonuçlar, tütün yapraklarının senesensi esnasında, SOD ve CAT aktivitelerinde oluşan azalma ile lipid peroksidasyonu ve madde sızıntısında oluşan artış arasında bir bağlantı olduğunu bulan Dhindsa ve ark. (1981)'nin sonuçlarıyla da uyumaktadır. Lin ve Kao (1998)'nin, çeltikten uzaklaştırılan yapraklara H_2O_2 uygulamasının, lipid peroksidasyonuna neden olduğunu bulması, IR-28'de tuza bağlı olarak azalan CAT aktivitesi nedeniyle H_2O_2 miktarının artmasına ve böylece MDA seviyesinde artışa neden olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca, IR-28'de H_2O_2 birikimi, Haber-Weiss reaksiyonuyla $\cdot OH$ radikalini oluşturabilir ve bu radikale karşı bitki koruyucu bir enzime sahip olmadığından, lipid peroksidasyonunu daha çok arttırmış olabilir. Bir başka çalışmada da, *Vigna* ve *Oryza* fidelerinin tuz stresi altında yapraklarında meydana gelen H_2O_2 birikiminin, CAT aktivitesindeki azalmadan kaynaklandığı ileri sürülmüştür (Singha ve Choundri, 1990). H_2O_2 'in bir diğer uzaklaştırıcı enzimi olan AP'in aktivitesi IR-28'de artmış olsa da, GR aktivitesinde görülen azalma,

askorbat-glutasyon döngüsünün IR-28'de çok etkili bir şekilde işlemediğini göstermektedir. Fakat IR-28'de SOD ve AP'nin oksidatif stresi uzaklaştırmada etkili olarak görev aldığına işaret etmektedir. Bu sonuç, tuz stresi altında IR-28'in yapraklarındaki SOD aktivitesinin düştüğünü ileri süren Dionisio-Sese ve Tobita'nın (1998) sonuçlarıyla uyuşmamaktadır.

Peroksidazlar sadece kloroplastlarda üretilen H_2O_2 'in uzaklaştırılmasında değil, aynı zamanda büyüme ve gelişimle ilgili bazı süreçlerde de görev almaktadırlar (Dionisio-Sese ve Tobita, 1998). Mittal ve Dubey (1991), farklı tuz toleransına sahip iki seri çeltik kültürüyle yaptıkları çalışmada, POX aktivitesi ile çeltik kültürlerinin tuz toleransı arasında negatif bir ilişki olduğunu bulmuşlardır. Bu sonuç, Pokkali'de tuz stresiyle POX aktivitesinde meydana gelen azalma ve IR-28'de meydana gelen artış göz önüne alındığında çalışmamızın sonuçlarıyla uyum göstermektedir.

GB ön muamelesinden sonra tuz stresine maruz bırakılan Pokkali'de, tuza bağlı olarak artan SOD, AP, CAT ve GR aktivitelerinin azaldığı ve tuz stresiyle azalan POX'ın arttığı görülmüştür. Buna karşın IR-28'de NaCl stresiyle SOD ve AP'nin artan aktivitelerinin daha çok teşvik edildiği, CAT ve GR'da oluşan azalmanın önlenmediği ve hatta az da olsa -NaCl stresi altındaki gruba göre- arttığı, POX'daki artışın ise azaldığı görülmüştür. Dolayısıyla GB ön muamelesinin her iki kültürdeki antioksidant enzim aktivitelerini farklı şekillerde etkilediği görülmektedir. Bunun bir nedeni, köklerden alınan GB'in ortamdan NaCl iyonlarının alınımını azaltmış olması olabilir (Satoh ve Murata, 1998; Kishitani ve ark., 2000). Yapılan bir çalışmada, artan tuz konsantrasyonu ile IR-28'in yapraklarında yüksek oranda Na^+ biriktirdiği fakat Pokkali'nin en düşük miktarda Na^+ içerdiği görülmüştür (Dionisio-Sese ve Tobita, 1998). Buna göre zaten indirgenmiş düzeyde Na^+ alınımı gerçekleştiren Pokkali, GB sayesinde bu oranı daha alt seviyelere indirmiş ve bu nedenle NaCl tarafından oluşturulan oksidatif

stresten daha az etkilenmiştir. Bu durum antioksidant enzimlerin, sadece NaCl uygulanmış bitkilerde olduğu kadar yüksek düzeylere çıkmasını gerektirmemiştir. IR-28'de de iyonların alınımını azaltan GB, antioksidant enzimlerin kararlılığını sağlayarak azalan aktivitelerinin artmasına, hatta zaten artmış fakat yetersiz olan aktivitelerinin daha çok teşvik edilmesine neden olmuştur. POX aktivitesinin GB ön uygulamasıyla Pokkali'de artış, IR-28'de ise düşüş göstermesi, az önce tartışılan hipotezi doğrular niteliktedir. Ayrıca GB, protein sentezini sağlayan sistemi tuz stresine karşı koruyarak, onarma süreçlerinin, hasar verme süreçlerinden daha hızlı bir şekilde meydana geldiği koşulları oluşturmuş (Chen ve Murata, 2002) ve bu şekilde çeltik kültürlerini oksidatif strese karşı korumuş olabilir. Bununla beraber, her ne kadar GB'in bir $\cdot\text{OH}$ radikali uzaklaştırıcısı olmadığı bildirilmiş olsa da (Rhodes and Hanson, 1993), $\text{O}_2^{\cdot-}$ ve H_2O_2 radikalleri üzerindeki etkisine ilişkin bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle konunun araştırılması gereği doğmuştur. Her iki kültürde 0. ve 7. günlerde GB kontrol grubundaki enzim aktivitelerinin -Pokkali'nin 7. gün GB kontrol grubundaki GR aktivitesi dışında- GB ve NaCl uygulanmamış kontrol grubuna göre daha düşük olduğu görülmüştür. Bu durum GB uygulamasına bağlı olarak, ya bitkinin normalde oluşan oksijen radikallerinin miktarında azalma meydana gelmiş olabileceğini, ya da GB'in hücre membranlarında, protein sentezleyen sistemlerde ve proteinlerin yapısında oluşturduğu kararlılık sayesinde, özellikle fotosentetik sistemden kaynaklanan elektron sızıntılarının önüne geçmiş ya da bunu azaltmış olabileceğini düşündürmektedir.

Her iki kültürün GB kontrol grubundaki protein miktarının arttığı görülmüştür. NaCl stresiyle PR miktarı Pokkali'de az da olsa artmış, IR-28'de önemli miktarda azalmış, fakat GB ön uygulaması yapıldıktan sonra tuz stresine maruz bırakılmış gruptaki PR miktarının kültürlerde farklı düzeyde olduğu görülmüştür. GB ön uygulaması sayesinde IR-28'de NaCl stresiyle azalan PR

miktarı artış göstermiş, Pokkali'de strese bağlı artan PR miktarı kontrol grubuna yakın bir değere inmiştir. GB ön uygulamasının PR miktarını da iyileştirdiği görülmektedir.

Prolin, stres sonrası iyileşme ve büyüme için bir azot ve karbon kaynağı, zararlar ve bazı moleküllerin kararlılığını sağlayan bir ajan, serbest radikal uzaklaştırıcısı, ve hatta hücre içi pH düzenleyicisi olarak bilinen uyumlu bir ozmotik koruyucudur. Çalışmamızda, tuz stresine bağlı olarak Pokkali ve IR-28'in yapraklarında önemli miktarda prolin birikimi meydana gelmiştir. Venkatesan ve Chellapan (1998), artan tuz stresiyile *Ipomea pes-caprae*'de meydana gelen prolin ve glisinbetain birikiminin tuz stresini iyileştirmede rol alabileceğini ileri sürmüştür. Lin ve ark. (2002), çeltik bitkilerinden uzaklaştırılan yapraklarda artan tuz konsantrasyonuyla meydana gelen prolin birikiminin Na^+ ve Cl^- iyonlarının etkisinden kaynaklandığını ileri sürmüştür. Buna göre, IR-28'de Pokkali'den daha fazla prolin birikiminin meydana gelmesi bu kùltivarın ortamdanda daha fazla toksik iyon almış olabileceğini göstermektedir. Gzik (1996), kuraklık, su ve tuz stresleri altındaki şeker pancarı bitkilerinde önemli miktarda prolin birikiminin meydana geldiğini bulmuş ve prolinin stres koşulları altındaki bu bitkilerde ozmotik düzenlemeyi sağladığını ileri sürmüştür. Fakat Pérez-Alfocea ve ark. (1996), yüksek NaCl konsantrasyonlarıyla domates bitkilerinin farklı organlarında oluşan prolin birikiminin bir "hasar algılanması" olduğunu ileri sürmüştür. Bir başka çalışmada ise, çeltiğin tuz stresine maruz bırakılan kallus kùltüründe biriken prolinin ozmotik düzenlemedeki katkısının önemsiz olduğu ve bu kallus kùltürlerinin tuza toleransında önemli bir rol oynamadığını bulunmuştur (Lutts ve ark., 1996). Bu sonuçlardan da görüldüğü gibi, prolinin kuraklık ve tuz stresleri altında koruyucu bir ozmotik bileşen olarak oynadığı rol hala tartışmalıdır. Çalışmamızda, GB ön uygulaması Pokkali'nin tuz stresi

altındaki gruba göre prolin miktarında az da olsa bir artışa, IR-28'in prolin miktarında ise NaCl stresi altındaki gruba göre az bir azalmaya neden olmuştur.

Çalışmamızdan elde edilen sonuçlara göre tuza-toleranslı Pokkali ve -duyarlı IR-28, ölçülen parametreler bakımından NaCl stresine, farklı tepkiler göstermişlerdir. Beklendiği gibi Pokkali tuz stresine büyüme özellikleri ve antioksidant enzimler bakımından IR-28'e göre daha fazla tolerans göstermiştir. En çok çalışılan ve önemli ozmotik koruyucu bileşiklerden biri olan glisinbetainin (*N,N,N*-trimetilglisin), tuz stresinin her iki kültür üzerinde oluşturduğu olumsuz etkileri, gerek büyüme parametreleri ve fotosentetik aktivite gerekse antioksidant savunma sisteminde meydana getirdiği değişimler bakımından iyileştirdiği görülmüştür. Elde edilen sonuçlardan anlaşılabacağı üzere, GB uygulamasının her iki kültürü NaCl stresine karşı koruduğu anlaşılmaktadır. Bu nedenle ortaya konulan verilerin, glisinbetain uygulamasıyla veya GB sentezleyen genlerin pirinç bitkisine aktararak tuz toleransının artırılmasını hedefleyen bitki biyolojisi ve genetik mühendisliği alanlarında yapılacak çalışmalar için yol gösterici bir kaynak olacağı kanısındayız.

5. KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abernethy, G.A., and McManus, M.T., 1998, Biochemical responses to an imposed water deficit in mature leaf tissue of *Festuca arundinaceae*. *Environmental and Experimental Botany*, 40:17-28
- Acar, O., Türkan, I., and Özdemir, F., 2001, Superoxide dismutase and peroxidase activities in drought sensitive and resistant barley (*Hordeum vulgare* L.) varieties. *Acta Physiologiae Plantarum*, 23(3): 351-356
- Agboma, P.C., Sainio, P.P., Hinkkanen, R., and Pehu, E., 1997, Effect of foliar application of glycinebetaine on yield components of drought-stressed tobacco plants. *Experimental Agriculture*, 33: 345-352
- Alia, Kondo, Y., Sakamoto, A., Nonaka, H., Hayashi, H., Pardha Saradhi, P., Chen, T.H.H., Murata, N., 1999, Enhanced tolerance to light stress of transgenic *Arabidopsis* plants that express the *codA* gene for a bacterial choline oxidase. *Plant Molecular Biology*, 40: 279-288
- Allakhverdiev, S.I., Feyziev, Ya.M., Ahmed A., Hayashi H., Aliev, Ja.A., Klimov, V.V., Murata, N., Carpentier, R., 1996, Stabilization of oxygen evolution and primary electron transport reactions in photosystem II against heat stress with glycinebetaine and sucrose. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 34: 149-157
- Allakhverdieva, Y.M., Mamedov, M.D., Ferimazova, N., Papageorgiou, G.C., and Gasanov, R.A., 1999, Glycinebetaine stabilizes photosystem 1 and photosystem 2 electron transport in spinach thylacoid membranes against heat inactivation. *Photosynthetica*, 37(3): 423-432
- Allakhverdieva, Y.M., Mamedov, M.D., Gasanov, R.A., 2001, The effect of glycinebetaine on the heat stability of photosynthetic reactions in thylakoid membranes. *Turkish Journal of Botany*, 25: 11-17

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Arakawa, K., Katayama, M., and Takabe, T., 1990, Levels of betaine and Betaine aldehyde dehydrogenase activity in the green leaves, and etiolated leaves and roots of barley. *Plant Cell Physiology*, 31(6): 797-803
- Arnon, D.I., 1949, Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.*, 24: 1-10
- Asada, K., 1992, Ascorbate peroxidase-a hydrogen scavenging enzyme in plants. *Physiol. Plant.*, 85: 235-241
- Bagnasco, S., Balaban, R., Fales, H.M., Yang, Y.-M., Burg, M. 1986, Predominant osmotically active organic solutes in rat and rabbit renal medullas. *J. Biol. Chem.*, 261: 5872-5877
- Bates, L.S., Waldren, R.P., and Teare, I.D., 1973, Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39: 205-207
- Beauchamp, C., Fridovich, I., 1971, Superoxide dismutase: Improved assays and applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.*, 44: 276-287
- Bergmeyer, N., 1970, Methoden der enzymatischen Analyse. Vol.1, Akademie Verlag, Berlin, pp. 636-647
- Blunden, G., Yang, M., Janicsák, G., Máthé, I., and Carabot-Cuervo, A., 1999, Betaine distribution in the Amaranthaceae. *Biochemical Systematics and Ecology*, 27: 87-92
- Bor, M., Özdemir, F., and Türkan, İ., 2003, 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 Science*, 164: 77-84
- Bowler, C., Montagu, M.V., Inzé, D., 1992, Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 43: 83-116

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bradford, M.M.**, 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254
- Brouquisse, R., Weigel, P., Rhodes, D., Yocum, C.F., Hanson, A.D.**, 1989, Evidence for a ferredoxin-dependent choline monooxygenase from spinach chloroplast stroma. *Plant Physiol.* 90: 322-329
- Bum Lee, C., Hayashi, H., and Moon, B.Y.**, 1997, Stabilization by glycinebetaine of photosynthetic oxygen evolution by thylakoid membranes from *Synechococcus* PCC7002. *Mol. Cells*, 7(2): 296-299
- Cakmak, I., Strbac, D., and Marschner, H.**, 1993, Activities of hydrogen peroxide-scavenging enzymes in germinating wheat seeds. *Journal of Experimental Botany*, 44(258): 127-132
- Chang, C.J., and Kao, C.H.**, 1998, H₂O₂ metabolism during senescence of rice leaves: changes in enzyme activities in light and darkness. *Plant Growth Regulation*, 25: 11-15
- Chen, T.H.H., and Murata, N.**, 2002, Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. *Current Opinion in Plant Biology*, 5: 250-257
- Chern, M.-K., Pietruszko, R.**, 1995, Human aldehyde dehydrogenase E3 isozyme is a betaine aldehyde dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 213: 561-568
- Coughlan, S.J., and Heber, U.**, 1982, The role of glycinebetaine in the protection of spinach thylacoids against freezing stress. *Planta*, 156: 62-69
- Coughlan, S.J., and Wyn Jones, R.G.**, 1982, Glycinebetaine biosynthesis and its control in detached secondary leaves of spinach. *Planta*, 154: 6-17

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Dash, M., and Panda, S.K., 2001,** Salt stress induced changes in growth and enzyme activities in germinating *Phaseolus mungo* seeds. *Biologia Plantarum*, 44(4): 587-589
- Dhindsa, R.S., Plumb-Dhindsa, P., Thorpe, T.A., 1981,** Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *J. Exp. Bot.*, 32(126): 93-101
- Dionisio-Sese, M.L., and Tobita, S., 1998,** Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress. *Plant Science*, 135: 1-9
- Egan, T.P., Dewald, H.D., Ungar, I.A., 2001,** The effect of different salts of sodium and potassium on the accumulation of glycinebetaine in *Atriplex prostrata*. *Biologia Plantarum*, 44(4): 595-597
- Foyer, C.H., and Halliwell, B., 1976,** The presence of glutathione and Glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta*, 133: 21-25
- Fridowich, I., 1998,** Oxygen toxicity: a radical explanation. *The Journal of Experimental Biology*, 201: 1203-1209
- Gadallah, M.A.A., 1999,** Effects of proline and glycinebetaine on *Vicia faba* responses to salt stress. *Biologia Plantarum*, 42(2): 249-257
- Galinski E.A., Truper H.G., 1994,** Microbial behavior in salt-stressed ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews* 15: 95-108
- Girija, C., Smith, B.N., and Swamy, P.M., 2002,** Interactive effects of sodium chloride and calcium chloride on the accumulation of proline and glycinebetaine in peanut (*Arachis hypogea* L.). *Environmental and Experimental Botany*, 47: 1-10

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gorham, J., 1996, Glycinebetaine is a major nitrogen-containing solute in the Malvaceae. *Phytochemistry*, 43(2): 367-369
- Grieve, C.M., and Maas, E.V., 1984, Betaine accumulation in salt-stressed sorghum. *Physiologia Plantarum*, 61: 167-171
- Grumet, R., and Hanson, A.D., 1986, Genetic evidence for an osmoregulatory function of glycinebetaine accumulation in barley. *Aust. J. Plant Physiol.*, 13: 353-364
- Gzik, A., 1996, Accumulation of proline and pattern of α -amino acids in sugar beet plants in response to osmotic, water and salt stress. *Environmental and Experimental Botany*. 36(1): 29-38
- Harinasut, P., Tsutsui, K., Takabe, T., Nomura, M., Takabe, T., and Kishitani, S., 1996, Exogenous glycinebetaine accumulation and increased salt-tolerance in rice seedlings. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 60(2): 366-368
- Hasegawa, P.M., and Bressan, R.A., Zhu, J.K., and Bohnert, H.J., 2000, Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 51: 463-499
- Hayashi, H., Alia, Mustardy, L., Deshniun, P, Ida, M., Murata, N., 1997, Transformation of *Arabidopsis thaliana* with the *codA* gene for choline oxidase: accumulation of glycinebetaine and enhanced tolerance to salt and cold stress. *Plant J.*, 12: 133-142
- Heldt, H-W., 1997, Plant Biochemistry and Molecular Biology, Oxford University Press Inc., New York, 522p
- Heath, R.L., and Packer, L., 1968, Photoperoxidation in isolated chloroplasts I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125: 180-198

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Herzog, V., Fahimi, H., 1973, Determination of the activity of peroxidase. *Anal. Biochem.*, 55: 554-562
- Holmström, K.O., Somersalo, S., Mandal, A., Palva, T.E., and Welin, B., 2000, Improved tolerance to salinity and low temperature in transgenic tobacco producing glycine betaine. *Journal of Experimental Botany*, 51(343): 177-185
- Incharoensakdi, A., Takabe, T., and Akazawa, T., 1986, Effect of betaine on enzyme activity and subunit interaction of Ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase from *Aphanothece halophytica*. *Plant Physiology*, 81: 1044-1049
- Incharoensakdi, A., and Wutipraditkul, N., 1999, Accumulation of glycinebetaine and its synthesis from radioactive precursors under salt-stress in the cyanobacterium *Aphanothece halophytica*. *Journal of Applied Phycology*, 11: 515-523
- Kang, H.M., Saltveit, M.E., 2002, Antioxidant enzymes and DPPH-radical scavenging activity in chilled and heat-shocked rice (*Oryza sativa* L.) seedlings radicles, *J. Agricultural Chem. and Food Chem.*, 50: 513-518
- Kishitani, S., Watanabe, K., Yasuda, S., Arakawa, K., and Takabe, T., 1994, Accumulation of glycinebetaine during cold acclimation and freezing tolerance in leaves of winter and spring barley plants. *Plant, Cell and Environment*, 17: 89-95
- Kishitani, S., Takanami, T., Suzuki, M., Oikawa, M., Yokoi, S., Ishitani, M., Nakase, A.M.A., Takabe, T., and Takabe, T., 2000, Compatibility of glycinebetaine in rice plants: evaluation using transgenic rice plants with a gene for peroxisomal betaine aldehyde dehydrogenase from barley. *Plant, Cell and Environment*, 23: 107-114

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Konishi, K., and Fujioka, M., 1987,** Chemical modification of a functional arginine residue of rat liver glycine methyltransferase. *Biochemistry*, 26: 8496-8502
- Lerma, C, Hanson, A.D., Rhodes, D., 1988,** Oxygen-18 and deuterium labeling studies of choline oxidation by spinach and sugar beet. *Plant Physiol.* 88: 695-702.
- Lin, C.C., Hsu, Y.T., Kao, C.H., 2002** The effect of NaCl on proline accumulation in rice leaves. *Plant Growth Regulation*, 36: 275-285
- Lin, C.C. and Kao, C.H., 2001,** Cell wall peroxidase activity, hydrogen peroxide level and NaCl-inhibited root growth of rice seedlings. *Plant and Soil*, 230: 135-143
- Lin, J.N., and Kao, C.H., 1998,** Effect of oxidative stress caused by hydrogen peroxide on senescence of rice leaves. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, 39: 161-165
- Lin, J.N., and Kao, C.H., 2000,** Involvement of lipid peroxidation in water stress-promoted senescence of detached rice leaves. *Biologia Plantarum*, 43(1): 141-145
- Lopez, C.M.L., Takahashi, H., and Yamazaki, S., 2002,** Plant-water relations of kidney bean plants treated with NaCl and foliarly applied glycinebetaine. *J. Agronomy & Crop Science*, 188: 73-80
- Lutts, S., Kinet, J.M., and Bouharmont, J., 1996,** Effects of various salts and of mannitol on ion and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in rice (*Oryza sativa* L.) callus cultures. *Journal of Plant Physiology*, 149: 186-195
- Madhava Rao, K.V., and Sresty, T.V.S., 2000,** Antioxidative parameters in the seedlings of pigeonpea (*Cajanus cajan* L. Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses. *Plant Science*, 157: 113-128

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Mäkelä, P., Kontturi, M., Pehu, E., and Somersalo, S., 1999,** Photosynthetic response of drought- and salt-stressed tomato and turnip rape plants to foliar-applied glycinebetaine. *Physiologia Plantarum*, 105: 45-50
- Mäkelä, P., Kärkkäinen, J., and Somersalo, S., 2000,** Effect of glycinebetaine on chloroplast ultrastructure, chlorophyll and protein content, and RuBPCO activities in tomato grown under drought or salinity. *Biologia Plantarum*, 43(3): 471-475
- Mansour, M.M.F., 1998,** Protection of plasma membrane of onion epidermal cells by glycinebetaine and proline against NaCl stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 36(10): 767-772
- Mohanty, P., Hayashi, H., Papageorgiou, G.C., and Murata, N., 1993,** Stabilization of the Mn-cluster of the oxygen-evolving complex by glycinebetaine. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1144: 92-96
- Murata, N., Mohanthy, P.S., Hayashi, H., and Papageorgiou, G.C., 1992,** Glycinebetaine stabilizes the association of extrinsic proteins with the photosynthetic oxygen-evolving PS-II complex against the inhibitory effects of NaCl. *FEBS Letters*, 296:187-189
- Nakamura, T., Yokota, S., Muramoto, Y., Tsutsui, K., Oguri, Y., Fukui, K., and Takabe, T., 1997.** Expression of a betaine aldehyde dehydrogenase gene in rice, a glycinebetaine nonaccumulator, and possible localization of its protein in peroxisomes. *Plant Journal*, 11: 1115-1120
- Naidu, B.P., Paleg, L.G., Aspinall, D., Jennings, A.C., and Jones, J.P., 1991,** Amino acid and glycine betaine accumulation in cold stressed wheat seedlings. *Phytochemistry*, 30(2): 407-409

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Nakano, Y., and Asada, K., 1981, Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 22(5): 867-880
- Nakamura, T., Yokota, S., Muramoto, Y., Tsutsui, K., Oguri, Y., Fukui, K., and Takabe, T., 1997, Expression of a betaine aldehyde dehydrogenase gene in rice, a glycinebetaine nonaccumulator, and possible localization of its protein in peroxisomes. *Plant Journal*, 11: 1115-1120
- Noctor, G., Foyer, C.H., 1998, Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 49: 249-279
- Papageorgiou, G.C., Fujimura, Y., and Murata, N., 1991, Protection of the oxygen-evolving Photosystem II complex by glycinebetaine. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1057: 361-366
- Pérez-Alfocea, F., Balibrea, M.E., Santa Cruz, A., Estañ, M.T., 1996, Agronomical and physiological characterization of salinity tolerance in a commercial tomato hybrid. *Plant and Soil*, 180: 251-257
- Pollard, A., and Wyn Jones, R.G., 1979, Enzyme activities in concentrated solutions of glycinebetaine and other solutes. *Planta*, 144: 291-298
- Prasad, K.V.S.K., Sharmila, P., Kumar, P.A., and Pardha Saradhi, P., 2000, Transformation of *Brassica juncea* (L.) Czern with bacterial *codA* gene enhances its tolerance to salt stress. *Molecular Breeding*, 6: 489-499
- Rajasekaran, L.R., Kriedemann, P.E., Aspinall, D., and Paleg, L.G., 1997, Physiological significance of proline and glycinebetaine: maintaining photosynthesis during NaCl stress in wheat. *Photosynthetica*, 34(3): 357-366

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Rathinasabapathi, B., Gage, D.A., Mackill, D.J. and Hanson, A.D., 1993,** Cultivated and wild rices do not accumulate glycinebetaine due to deficiencies in two biosynthetic steps. *Crop. Sci.*, 33: 534-538
- Rathinasabapathi, B., McCue, K.F., Gage, D.A., and Hanson, A.D., 1994,** Metabolic engineering of glycine betaine synthesis: plant betaine aldehyde dehydrogenases lacking typical transit peptides are targeted to tobacco chloroplasts where they confer betaine aldehyde resistance. *Planta*, 193: 155-162
- Rhodes, D., and Hanson, A.D., 1993,** Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44: 357-384
- Roberts, M.F., Lai, M-C., and Gunsalus, R.P., 1992,** Biosynthetic pathways of the osmolytes N-acetyl- β -lysine, β -glutamine, and betaine in *Methanohalophilus* strain FDF1 suggested by nuclear magnetic resonance analyses. *J. Bact.*, 174: 6688-6693
- Robinson, S.P., and Jones, G.P., 1986,** Accumulation of glycinebetaine in chloroplasts provides osmotic adjustment during salt stress. *Aust. J. Plant Physiol.*, 13: 659-668
- Rozwadowski, K.L., Khachatourians, G.G., and Selvaraj G., 1991,** Choline oxidase, a catabolic enzyme in *Arthrobacter pascens*, facilitates adaptation to osmotic stress in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 173: 472-478
- Sakamoto, A., Murata, A., and Murata, N., 1998,** Metabolic engineering of rice leading to biosynthesis of glycinebetaine and tolerance to salt and cold. *Plant Molecular Biology*, 38(6): 1011-1019

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sakamoto, A., and Murata, N., 2000,** Genetic engineering of glycinebetaine synthesis in plants: current status and implications for enhancement of stress tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 51(342): 81-88
- Sakamoto, A., and Murata, N., 2001,** The use of bacterial Choline oxidase, a glycinebetaine-synthesizing enzyme, to create stress-resistant transgenic plants. *Plant Physiology*. 125: 180-188
- Sakamoto, A., and Murata, N., 2002,** The role of glycine betaine in the protection of plants from stress: clues from transgenic plants. *Plant, Cell and Environment*, 25(2): 163-171
- Sato, Y., Murakami, T., Funatsuki, H., Matsuba, S., Saruyama, H., Tanida, M., 2001,** Heat shock-mediated APX gene expression and protection against chilling injury in rice seedlings. *J. Exp. Bot.*, 52(354): 145-151
- Satoh, K., and Murata, N., 1998,** Stress Responses of Photosynthetic Organisms; Molecular Mechanisms and Molecular Regulations. Elsevier Science B.V., The Netherlands, 260p.
- Scandalios, J.G., 1993,** Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiology*, 101: 7-12
- Singha, S., and Choundri, M.A., 1990,** Effect of salinity (NaCl) stress on H₂O₂ metabolism in *Vigna* and *Oryza* seedlings. *Biochem. Physiol. Pflanzen*, 186: 69-74
- Smart, R.E., and Bingham, G.E., 1974,** Rapid estimates of relative water content. *Plant Physiology*, 53: 258-260
- Venkatesan, A., Chellapan, K.P., 1998,** Accumulation of proline and glycine betaine in *Ipomea pes-caprae* induced by NaCl. *Biologia Plantarum*, 41(2): 271-276

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Weigel, P., Weretilnyk, E.A., Hanson, A.D., 1986,** Betaine aldehyde oxidation by spinach chloroplasts. *Plant Physiol.* 82: 753-759
- Wilkinson, R.E., 1994,** Plant-Environment Interactions. Marcel Dekker, Inc., New York, 599p.
- Yang, G., Rhodes, D., and Joly, R.J., 1996,** Effects of high temperature on membrane stability and chlorophyll fluorescence in glycinebetaine-deficient and glycinebetaine-containing maize lines. *Aust. J. Plant Physiol.*, 23: 437-43
- Zhao, Y., Aspinall, D., and Paleg, L.G., 1992,** Protection of membrane integrity in *Medicago sativa* L. by glycinebetaine against the effects of freezing. *Journal of Plant Physiology*, 140: 541-543

ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında Samsun'un Havza ilçesinde doğan Tijen DEMİRAL, ilk öğrenimini Karşıyaka İlkokulunda, orta öğrenimini 25 Mayıs ortatokulunda, lise öğrenimini Havza lisesinde tamamladı. 1994 yılında 19 Mayıs Üniversitesi Eğitim Fakültesi Biyoloji Bölümüne başladı ve 1998 yılında bölüm 2.si olarak mezun oldu. 1999 yılında Yüksek Öğretim Kurulunca (YÖK) Düzenlenen, "Üniversitelerde Araştırma Görevlisi Kadrosuna Atanmak Suretiyle Yurtiçinde Lisansüstü Eğitimi" (YLE) sınavını kazanarak Harran Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesinde Araştırma Görevlisi olarak göreve başladı. Bu bursla Nisan-Eylül 1999 tarihleri arasında ODTÜ'de yabancı dil (İngilizce) eğitimi aldı. 2000 yılında Ege Üniversitesinde Prof. Dr. İsmail TÜRKAN danışmanlığında yüksek lisansa başladı. İyi derecede ingilizce bilen Tijen DEMİRAL Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Genel Biyoloji A.B.D.'da çalışmalarına devam etmektedir.