

**TUZ STRESİ ALTINDA GELİŞEN MARUL
(*Lactuca sativa* L.) FİDELERİNDE BAZI FİZYOLOJİK,
BİYOKİMYASAL PARAMETRELER VE FENOLİK
BİLEŞİKLERİN ÜRETİMİ İLE İLİŞKİLİ GENLERİN
İFADESİ ÜZERİNE NİTRİK OKSİTİN ETKİSİ**

Raziye AKAR

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji Bilim Dalı

Doç. Dr. Özkan AKSAKAL

2015

Her hakkı saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TUZ STRESİ ALTINDA GELİŞEN MARUL (*Lactuca sativa* L.)
FİDELERİNDE BAZI FİZYOLOJİK, BİYOKİMYASAL
PARAMETRELER VE FENOLİK BİLEŞİKLERİN ÜRETİMİ İLE
İLİŞKİLİ GENLERİN İFADESİ ÜZERİNE NİTRİK OKSİTİN
ETKİSİ

Raziye AKAR

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
Moleküler Biyoloji Bilim Dalı

ERZURUM
2015

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

TUZ STRESİ ALTINDA GELİŞEN MARUL (*Lactuca sativa* L.) FİDELERİNDE BAZI FİZYOLOJİK, BİYOKİMYASAL PARAMETRELER VE FENOLİK BİLEŞİKLERİN ÜRETİMİ İLE İLİŞKİLİ GENLERİN İFADESİ ÜZERİNE NİTRİK OKSİTİN ETKİSİ

Doç. Dr. Özkan AKSAKAL danışmanlığında, Raziye AKAR tarafından hazırlanan bu çalışma 03/02/2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı – Moleküler Biyoloji Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Yusuf KAYA

İmza :

Üye : Doç. Dr. Özkan AKSAKAL

İmza :

Üye : Doç. Dr. Arzu GÖRMEZ

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 19/02/2015 tarih ve 07/312 nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ertan YILDIRIM
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TUZ STRESİ ALTINDA GELİŞEN MARUL (*Lactuca sativa* L.) FİDELERİNDE BAZI FİZYOLOJİK, BİYOKİMYASAL PARAMETRELER VE FENOLİK BİLEŞİKLERİN ÜRETİMİ İLE İLİŞKİLİ GENLERİN İFADESİ ÜZERİNE NİTRİK OKSİTİN ETKİSİ

Raziye AKAR

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Özkan AKSAKAL

Nitrik oksit, bitki büyüme ve gelişmesinde, bitkinin strese karşı yanıtının düzenlenmesinde önemli rol oynayan sinyal moleküldür. Bu çalışmada, marul fidelerinin yapraklarına 50 µM ve 100 µM sodyum nitro prussid (SNP, nitrik oksid donorü) uygulandıktan 48 saat sonra fidelere 50 mM ve 150 mM NaCl uygulanmış ve yapraklara uygulanan SNP'nin tuz stresinin etkilerini azaltmasının fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler mekanizmaları araştırılmıştır. Kontrol ile mukayese edildiğinde tuz uygulamasının marul yapraklarında gibberellik asit (GA), indol asetik asit (IAA), salisilik asit (SA) ve bazı amino asitlerin konsantrasyonlarını önemli oranda azalttığı, malondialdehit (MDA), hidrojen peroksit (H₂O₂), absisik asit (ABA), toplam fenolik madde konsantrasyonlarını, askorbat peroksidaz (APX), katalaz (CAT), peroksidaz (POD) ve süperoksit dismutaz (SOD) aktivitelerini, çözünebilir şekerlerin (glukoz, fruktoz, maltoz ve sükroz) ve bazı organik asitlerin miktarlarını ve antioksidan kapasiteyi artırdığı belirlenmiştir.

Öte yandan, marul fidelerine tuz uygulamasından 48 saat önce yapraklara uygulanan SNP'nin MDA, H₂O₂, ABA konsantrasyonlarını azaltmak, GA, IAA, SA ve bazı amino asitlerin konsantrasyonlarını artırmak, antioksidan enzimlerin (APX, CAT, POD ve SOD) aktivitelerini, toplam fenolik madde miktarı ve antioksidan kapasiteyi daha fazla artırmak yoluyla tuz stresine toleransı önemli oranda teşvik ettiği belirlenmiştir. Buna ilaveten, fenolik bileşikler ve E vitamininin sentezinde yer alan fenilalanin amonyak liyaz (PAL) ve γ-tokoferol metiltransferaz (γ-TMT) genlerinin ifadelerinin tuz stresine bağlı olarak arttığı, SNP uygulaması ile birlikte bu genlerin ifadelerinin daha fazla artış gösterdiği tespit edilmiştir. Elde edilen bulgular doğrultusunda, SNP'nin tuz stresinin neden olduğu reaktif oksijen türlerinin miktarını azaltmak, fenolik madde miktarı, antioksidan enzim aktiviteleri ve anahtar genlerin ifadelerini artırmak yoluyla tuz stresinin neden olduğu hasardan marul fidelerini etkili bir biçimde koruduğu ortaya konmuştur.

2015, 74 sayfa

Anahtar Kelimeler: Absisik asit, Antioksidan enzim, Gibberellik asit, Hidrojen peroksit, Indol asetik asit, *Lactuca sativa*, Malondialdehit, Nitrik oksit, PAL, Salisilik asit, Tuz Stresi, γ-TMT

ABSTRACT

Master Thesis

EFFECTS OF EXOGENOUS NITRIC OXIDE ON SOME PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL PARAMETERS AND GENE EXPRESSION RELATED TO THE PRODUCTION OF PHENOLIC COMPOUNDS IN LETTUCE (*Lactuca sativa* L.) SEEDLINGS GROWN UNDER SALT STRESS

Raziye AKAR

AtaturkUniversity
Graduate School of Natural and Applied Science
Department of Biology
Department of Molecular Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Özkan AKSAKAL

Nitric oxide is regarded as an important signaling molecule that plays an important role in regulating stress responses, plant growth and development. To investigate the physiological, biochemical and molecular mechanisms of salt stress mitigated by exogenous sodium nitro prusside (SNP, a nitric oxide donor), foliar application of 50 μ M and 100 μ M SNP were done to lettuce (*Lactuca sativa* L) seedlings for 2 days and then they were subjected to 50 mM and 150 mM NaCl. Our results showed that NaCl treatment significantly decreased the concentration of gibberellic acid (GA), indol acetic acid (IAA), salicylic acid and some amino acids, enhanced the concentration of malondialdehyde (MDA), hydrogen peroxide (H_2O_2), the activity of ascorbat peroxidase (APX), catalase (CAT), peroxidase (POD) and superoxide dismutase (SOD), the concentration of abscisic acid (ABA), the content of soluble sugars (glucose, fructose, maltose and sucrose) and some organic acids, the concentration of total phenolics and antioxidant capacity in lettuce seedlings when compared with the control.

However, treatments with exogenous SNP for 2 days significantly enhanced salt stress tolerance in lettuce seedlings by decreasing the concentration of MDA, H_2O_2 , ABA and increasing the concentration of GA, IAA, SA, some amino acids, and further increasing the concentration of antioxidant enzyme (APX, CAT, POD and, SOD), total phenolics and antioxidant capacity.

Moreover, phenylalanine ammonia lyase (PAL) and γ -tocopherol methyltransferase (γ -TMT) genes, involved in the biosynthesis of phenolic compounds and vitamin E, respectively, were activated in the response to salt stress and further activated by SNP treatment. The obtained results suggest that SNP could effectively protect lettuce seedlings from salt stress damage by enhancing activities of key genes and antioxidant enzymes and the concentrations of phenolics to reduce the excessive reactive oxygen species caused by salt stress.

2015, 74 pages

Keywords: Absciscic acid, Antioxidant enzymes, Gibberellic acid, Hydrogen peroxide, Indol acetic acid, *Lactuca sativa*, MDA, Nitric oxide, PAL, Salicylic acid, Salt stress, γ -TMT

TEŞEKKÜR

Araştırmanın yürütülmesi ve değerlendirilmesinde her türlü desteği sağlayan danışmanım, Sayın Doç. Dr. Özkan AKSAKAL'a, Biyoloji Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Ökkeş ATICI'ya teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamız esnasında yardımlarını esirgemeyen Sayın Arş. Gör. Feyza AKSAKAL'a, Dilruba TABAY'a ve ayrıca Biyoloji Bölümü Bitki Fizyolojisi laboratuvarındaki hocalarıma ve çalışma arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca ve yüksek lisans öğrenimimin her safhasında manevi desteklerini esirgemeyen canım aileme teşekkürü bir borç bilirim.

Raziye AKAR

Ocak, 2015

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	7
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	14
3.1. Yararlanılan Alet ve Cihazlar.....	14
3.2. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanmaları.....	15
3.3. Yöntemler.....	17
3.3.1. Bitkilerin büyütülmesi	17
3.3.2. Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) miktarının belirlenmesi	20
3.3.3. Malondialdehit (MDA) aktivitesinin belirlenmesi	21
3.3.4. Antioksidan enzim ekstraksiyonu	22
3.3.4.a. Askorbat peroksidaz aktivitesinin belirlenmesi.....	22
3.3.4.b. Süperoksit dismutaz aktivitesinin belirlenmesi	22
3.3.4.c. Peroksidaz aktivitesinin belirlenmesi	23
3.3.4.d. Katalaz aktivitesinin belirlenmesi	23
3.3.5. Toplam fenolik madde miktarının belirlenmesi	24
3.3.6. Antioksidan kapasite	25
3.3.7. Gen ekspresyonu çalışmaları.....	25
3.3.7.a. RNA'nın kantitatif tayini.....	26
3.3.7.b. cDNA sentezi	27
3.3.7.c. Real Time PCR uygulamaları.....	27
3.3.8. Gen ekspresyonu hesaplamaları.....	28
3.3.9. Hormonların ekstraksiyon, saflaştırma ve analiz işlemleri	28
3.3.9.a. Ekstraksiyon ve saflaştırma işlemleri	28

3.3.9.b. Şartlandırma işlemi.....	29
3.3.9.c. Hormonların analizi.....	29
3.3.10. Glukoz, fruktoz, maltoz ve sükroz miktarının belirlenmesi.....	31
3.3.11. Organik asit miktarlarının belirlenmesi.....	31
3.3.12. Amino asit miktarının belirlenmesi.....	32
3.3.13. İstatistiksel analiz	32
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	33
4.1. Malondialdehit (MDA) ve Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂) Miktarı	33
4.2. Antioksidan Enzim Aktiviteleri.....	35
4.3. Antioksidan Kapasite ve Toplam Fenolik Madde İçeriği	39
4.4. Marul Yapraklarına Ait Dokulardan Elde Edilen RNA'lara Ait Konsantrasyon ve 260/280 Oranları.....	40
4.5. PAL ve γ -TMT mRNA Seviyesi	42
4.6. Bazı Bitkisel Hormonların Miktarı.....	44
4.7. Çözünebilir Şeker ve Organik Asit Miktarları	48
4.8. Amino Asit Miktarları	52
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	55
KAYNAKLAR	64
ÖZGEÇMİŞ	75

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
ABA	Absisik Asit
APX	Askorbat peroksidaz
CAT	Katalaz
cDNA	Komplementer DNA
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleosid trifosfat
E.U.	Enzim ünitesi
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
EtBr	Etidyum bromür
GA	Gibberellik asit
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
IAA	İndol Asetik Asit
LPO	Lipid peroksidasyon
MDA	Malondialdehit
mg	Miligram
mM	Milimolar
NBT	Nitroblue tetrazolium klorür
nmol	Nanomol
NO	Nitrik Oksit
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
POD	Peroksidaz
PVP	Polivinilpirrolidon
RNA	Ribonükleik asit
ROT	Reaktif oksijen türleri
rpm	Devir/dakika
SA	Salisilik Asit
SNP	Sodyum nitro prussid

SOD	Süperoksit dismutaz
TBA	Tiobarbutirik asit
TBARS	Tiobarbitürat reaktif maddeler
TCA	Trikloroasetik asit
TEAA	Trietil Amonyum Asetat
x g	Yerçekimi ivmesinin katı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Bitkilerin abiyotik strese toleransında nitrik oksit aracılı sinyal yolu için geliştirilmiş model	2
Şekil 3.1. Uygulama gruplarının fotoğrafları.....	19
Şekil 3.2. Uygulama gruplarının karşılaştırmalı fotoğrafı	20
Şekil 3.3. Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) miktarını belirlemede kullanılan standart grafik	21
Şekil 3.4. Katalaz aktivitesi ölçümünde kullanılan standart grafik	24
Şekil 3.5. Hormonlara ait HPLC kromatogramı	30
Şekil 4.1. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan SNP ve tuzun marul yapraklarındaki MDA içeriği üzerine etkisi.....	34
Şekil 4.2. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan SNP ve tuzun marul yapraklarındaki H ₂ O ₂ konsantrasyonu üzerine etkisi	35
Şekil 4.3. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan SNP ve tuzun marul yapraklarındaki SOD enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	36
Şekil 4.4. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan SNP ve tuzun marul yapraklarındaki CAT enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	37
Şekil 4.5. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan SNP ve tuzun marul yapraklarındaki POD enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	38
Şekil 4.6. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan SNP ve tuzun marul yapraklarındaki APX enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	38
Şekil 4.7. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan SNP ve tuzun marul yapraklarındaki toplam fenolik madde içeriği üzerine etkisi.....	39
Şekil 4.8. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan SNP ve tuzun marul yapraklarındaki toplam antioksidan kapasite üzerine etkisi.....	40
Şekil 4.9. Örnek pik grafiği	42
Şekil 4.10. Örnek primer etkinliği grafiği.....	42
Şekil 4.11. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan SNP ve tuzun marul yapraklarına ait dokulardaki PAL mRNA seviyesi üzerine etkisi	43

Şekil 4.12. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan SNP ve tuzun marul yapraklarına ait dokulardaki γ -TMT mRNA seviyesi üzerine etkisi	44
Şekil 4.13. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan SNP ve tuzun marul yapraklarındaki ABA miktarı üzerine etkisi	45
Şekil 4.14. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan SNP ve tuzun marul yapraklarındaki GA miktarı üzerine etkisi	46
Şekil 4.15. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan SNP ve tuzun marul yapraklarındaki IAA miktarı üzerine etkisi.....	47
Şekil 4.16. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan SNP ve tuzun marul yapraklarındaki SA miktarı üzerine etkisi.....	48
Şekil 4.17. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan SNP ve tuzun marul yapraklarındaki sükroz ve glukoz miktarı üzerine etkisi	49
Şekil 4.18. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan SNP ve tuzun marul yapraklarındaki fruktoz ve maltoz miktarı üzerine etkisi.....	49
Şekil 4.19. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan SNP tuzun marul yapraklarındaki organik asit miktarı üzerine etkisi	50
Şekil 4.20. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan SNP ve tuzun marul yapraklarındaki organik asit miktarı üzerine etkisi	51

ÇİZELGELER DİZİNİ

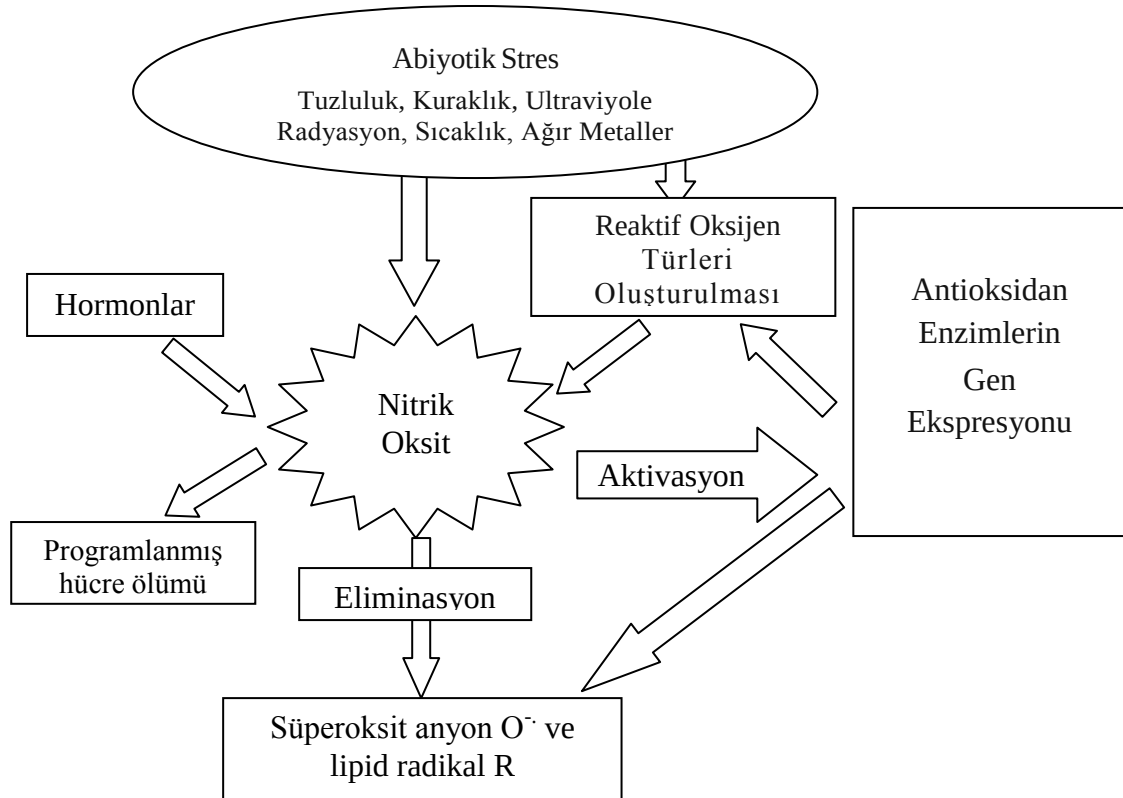
Çizelge 3.1. RT-PCR için kullanılacak spesifik primerler	27
Çizelge 4.1. RNA konsantrasyon ve 260/280 oranları	41
Çizelge 4.2. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan SNP ve tuzun marul yapraklarındaki çözünebilir amino asit miktarı üzerine etkisi	53
Çizelge 4.3. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan SNP ve tuzun marul yapraklarındaki çözünebilir amino asit miktarı üzerine etkisi	54

1. GİRİŞ

Memelilerde önemli sinyal moleküllerden biri olarak keşfedildiğinden beri nitrik monoksit veya nitrik oksit (NO) üzerindeki araştırmalar son on yılda dikkate değer bir biçimde artmıştır. Bu molekülün memelilerde vazodilatasyon, nörotransmisyon, düz kas kasılması ve gevşemesi, doğuştan immün yanıt, yumurta fertilizasyonu, mikro organizmalara karşı patojenik savunma ve apoptozis gibi çeşitli fonksiyonları olduğu belirlenmiştir (Schmidt and Walter 1994; Stamler 1994; Jeffrey and Snyder 1995; Lloyd-Jones and Bloch 1996; Wink and Mitchell 1998; Ignarro 2000; Hess *et al.* 2005). Diğer taraftan yirmi yıl kadar önce, bitki biyologları NO'nin bir hava kirleticisi ve bitkilerin büyüme inhibitörü olarak davrandığını düşünmüşlerdir. Birçok araştırmada, yüksek seviyedeki NO'nin membranlara zarar verme ve DNA'yı parçalama kapasitesine sahip olduğu (Pedroso *et al.* 2000; Yamasaki 2000; Romero-Puertas *et al.* 2004) yulaf ve yoncada fotosentezi (Hill and Bennett 1970), havuç hücre süspansiyonunda solunumu azalttığı belirlenmiştir (Zottini *et al.* 2002). NO'nin yüksek konsantrasyonlarının ($NO > 100 \mu M$) yaprak genişlemesini engellediği, tilakoid viskozitesini değiştirdiği, filiz ve kök gelişimini, fotosentetik elektron transportunu inhibe ettiği ve DNA'da hasar oluşturarak hücre ölümüne neden olduğu bildirilmiştir (Leshem *et al.* 1997, 1998; Pedroso *et al.* 2000). Bununla birlikte, 1990'dan sonra, NADPH ve L-arjinin ile NO üreten enzimlerin keşfedilmesi, sadece hava kirleticiden esansiyel sinyal molekülüne kadar NO üzerine yeni bir model oluşturmuştur (Yamasaki 2005; Cueto *et al.* 1996). 1992 yılında, bilim dünyası NO'nin biyolojik öneminin farkına varmış ve serbest radikal NO “Yılın Molekülü” olarak adlandırılmıştır (Koshland 1992). Nitrik oksitin düşük konsantrasyonlarının bitkilerde tohum dormansisinin azaltılması, tohum çimlenmesinin teşviki (Beligni and Lamattina 2000; Bethke *et al.* 2006, 2007; Libourel *et al.* 2006; Zheng *et al.* 2009), bitki metabolizması ve senesensin düzenlenmesi (Leshem *et al.* 1998; Guo and Crawford 2005), hücre ölümünün teşviki (Pedroso and Durzan 2000), stoma hareketlerinin düzenlenmesi (García-Mata and Lamattina 2001; Guo *et al.* 2003; Neill *et al.* 2003; Sakihama *et al.* 2003; Bright *et al.* 2006; García-Mata and Lamattina 2007), fotosentezin düzenlenmesi (Takahashi and Yamasaki 2002), mitokondri fonksiyonları (Zottini *et al.* 2002), yerçekimi (Hu *et al.*

2005) ve çiçeklenmenin düzenlenmesi (He *et al.* 2004) gibi çeşitli fizyolojik fonksiyonlarda hayati rol oynadığı bildirilmiştir. Nitrik oksitin çeşitli biyotik ve abiyotik stres faktörlerine karşı bitki yanıtlarının düzenlenmesine katkıda bulunduğu, oksidatif stres tarafından oluşturulan hasarı azalttığı da ifade edilmiştir.

Nitrik oksitin hücrede reaktif oksijen türevlerinin oluşumu ve parçalanması, temel metabolizma, taşıma, hücre ölümü ve savunma, sinyal iletimi gibi farklı fonksiyonel işlevlerde yer alan genlerin tanımlanmasına izin veren transkripsiyonel değişiklikleri indüklediği belirtilmiştir (Karplus *et al.* 1991). Nitrik oksit molekülünün kendisi de antioksidan özelliğe sahip olmasına rağmen, nitrik oksitin hücrel redoks dengesi için genel mekanizmaları düzenlediği (Şekil 1.1), O_2^- nin H_2O_2 ve O_2 ye dönüşümünü teşvik ettiği ve H_2O_2 süpürücü enzimlerin aktivitelerini artırmak yoluyla bitkilerdeki oksidatif hasarı inhibe ettiği rapor edilmiştir (Lamattina *et al.* 2003; Shi *et al.* 2007; Zheng *et al.* 2009).



Şekil 1.1. Bitkilerin abiyotik strese toleransında nitrik oksit aracılı sinyal yolu için geliştirilmiş model

Nitrik oksit, enzim aktivitesini düzenleyen doğrudan veya dolaylı biyokimyasal sinyaller oluşturmak için proteinler, tioller, hem grupları ve oksijen türevleri ile reaksiyona girmektedir. Nitrik oksitin etkisi dozuna ve bölgeye bağlı olarak değişmektedir. Nitrik oksitin yüksek seviyeleri oksidatif ve nitroztatif hasara neden olmakta ve hücreyi öldürebilmektedir. Nitrik oksit yapısal ve fonksiyonel adaptif plastisiteye ve bitkilerin habitatlarına uyumuna katkıda bulunmaktadır. Biyotik ve abiyotik streslere bitkilerin cevap oluşturması, bitki büyüme ve gelişimi, çimlenme, çiçeklenme, meyvelerin olgunlaşması, senesens gibi çok sayıda fizyolojik olayda nitrik oksitin önemli rolü daha önce Bolwell (1999), Beligni and Lamattina (1999a, b), Beligni and Lamattina (2001), García-Mata and Lamattina (2001), Stöhr and Ullrich (2002), Lamattina *et al.* (2003), Neill *et al.* (2003), Bethke *et al.* (2004), Romero-Puertas *et al.* (2004), Wendehenne *et al.* (2004), Yamasaki (2005), Arasimowicz and Floryszak-Wieczorek (2007), Besson-Bard *et al.* (2008) tarafından detaylı bir biçimde incelenmiştir.

Bitkiler günlük ve mevsimlik değişiklikler karşısında büyümelerini devam ettirebilmelerine karşın, beklenmedik bir koşula sürekli maruz kaldıklarında gelişimleri yavaşlamakta ve hayatta kalmalarını etkileyecek hastalıklar, hasarlar veya fizyolojik değişimler meydana gelebilmektedir (Shaoa *et al.* 2008). Bu elverişsiz şartlara sebep olan faktörlere “stres” denilmektedir. Bitkileri etkileyen stres faktörleri biyotik (bitkiler, mikroorganizmalar, hayvanlar ve antropojenik etkiler) ve abiyotik stres faktörleri (tuzluluk, kuraklık, UV radyasyonu, sıcaklık, ağır metaller vb.) olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Abiyotik stres faktörleri reaktif oksijen türevlerini (ROT) üretebilir ya da oksidatif strese neden olan hücrel redoks dengesini bozabilir. Oksidatif stres sırasında, bitki hücrelerinin farklı bölgelerinde (mitokondri, kloroplast, peroksizom ve nukleus) ROT oluşumu hasara ve hücre ölümüne neden olmaktadır (Mano 2002). ROT hücre içi redoks sinyalinde ve antioksidan direnç mekanizmalarının aktivasyonunda önemli rol oynamaktadır. Düşük miktarlarda bulunduğu, ROT savunma yanıtlarının aktivasyonu için sinyal olarak davranır. Ancak, kontrolsüz koşullar altında yüksek konsantrasyonlarda ROT oluşumu bitkilerde ciddi hasarlara neden olur. Asıl hasarın ROT tarafından oluşturulduğu bir sistemde NO zincir kırıcı gibi davranabilir ve hasarı

sınırlandırabilir. NO mitokondride iki respirasyon elektron transport yolunda rol almaktadır. NO burada ROT'un modülasyonunu gerçekleştirir ve çeşitli abiyotik streslere maruz kalan bitkilerde antioksidan savunma sistemlerini geliştirir. Dışardan NO uygulamak süperoksit dismutaz (SOD) başta olmak üzere antioksidan enzim aktivitelerini aktive eder ve lipid radikal ($R^\cdot$) ve süper oksit anyonunu ($O_2^{\cdot-}$) elemine etmek yoluyla da bitkileri oksidatif hasara karşı korur. Birçok araştırmada, NO'nin zincir kırıcı antioksidan olarak lipid peroksidatif reaksiyonlarını durdurucu etkisi olduğuna ve antioksidan enzimlerin gen ekspresyonunu aktive ettiğine dair kanıtlar vardır (Nunoshiba *et al.* 1993; Ramamurthi and Lewis 1997). NO'nin hücre koruyucu proteinlerin, CAT, SOD, glutatyon, s-transferaz'ın sentezini ve alternatif oksidazın teşvik edilmesini sağlayarak, arpa eleurone hücrelerinde gibberellin teşvikli programlı hücre ölümünün içsel bir düzenleyicisi olduğu belirtilmiştir (Beligni *et al.* 2002; Huang *et al.* 2002; Polverari *et al.* 2003). NO'nin sitokinin-teşvikli programlı hücre ölüm sürecine aracılık ettiği (Neill *et al.* 2003) ve ABA teşvikli stoma kapanmasında bezelye bekçi hücrelerinde NO sentezinin arttığı da bildirilmiştir (Neill *et al.* 2002). Yine oksinin salatalık köklerinde NO sentezini stimüle ettiği tespit edilmiştir (Pagnussat *et al.* 2002, 2003). Bitki dokularının olgunlaşması ve senesensinde NO ile etilen arasındaki etkileşim, bitki gelişiminin bu safhaları sırasında her iki gazın antagonistik etkisini ortaya çıkarmıştır (Leshem *et al.* 1998; Lamattina *et al.* 2003; del Río *et al.* 2004). Orozco-Cardenas and Ryan (2002) nitrik oksitin domates yapraklarında jasmonik asit oluşumunu teşvik ettiği ve böylece H_2O_2 üretimini bloke ettiğini rapor etmişlerdir.

Nitrik oksitin serbest radikal olma, küçük boyut, yüksüz olması, kısa ömrü ve biyolojik membranlardan yüksek oranda difüze olması gibi özellikleri onu çevresel koşullara cevap oluşturmada çok iyi bir sinyal molekül yapmaktadır.

Tuz Stresine Toleransta NO'nun Fonksiyonu

Tuz stresi, bitkilerin büyümesini ve gelişmesini osmotik ve iyon stresine neden olarak engellemektedir (Parida and Das 2005). Kök rizosferinde tuz miktarının artmasıyla birlikte ilk olarak osmotik stres oluşmaktadır. Oluşan bu dışsal osmotik stres,

kullanılabilir su miktarının da azalmasına sebep olmakta ve bu olay “fizyolojik kuraklık” olarak adlandırılmaktadır (Tuteja 2007). Kullanılabilir su miktarının azalması, hücre genişlemesinin azalmasına ve sürgün gelişiminin yavaşlamasına sebep olmaktadır. Osmotik stresin devamında ortaya çıkan iyon stresi evresinde, ortamda artan Na ve Cl iyonlarının K^+ , Ca^{+2} ve N gibi gerekli besin elementleri ile rekabete girmesiyle bitkilerde, besin eksikliği veya besin dengesizliği meydana gelmektedir. Yüksek tuz konsantrasyonunun bazı anahtar metabolik süreçleri etkilemek yoluyla bitki büyümesini ve gelişimini sınırlandırdığı bildirilmiştir (Hasegawa *et al.* 2000; Marschner 2002; Siddiqui *et al.* 2008, 2009a; Khan *et al.* 2010). Tuzluluk, bitkilerde nitrat ve sülfat asimilasyonunda yer alan birçok enzimin aktivitesini değiştirmekte, bitkilerin enerji durumunu azaltmakta, azot ve sülfür ihtiyacını arttırmaktadır (Siddiqui *et al.* 2009b). Tuz stresi tarafından oluşturulan hücre seviyesindeki hasarın çoğu, reaktif oksijen türevlerinin oluşturduğu oksidatif hasarla ilgilidir. Bitkiler, oksidatif hasardan korunmak için çok sayıda savunma stratejisi geliştirmişlerdir. Ancak, bitkilerin tuz stresine toleransında NO rolü hakkında detaylı bilgi azdır. Bir NO donorü olan eksojen sodyum nitroprusside (SNP), tuzluluğun oksidatif hasarını pirinç tohumlarında (Uchida *et al.* 2002), acı bakla (Kopyra and Gwozdz 2003) ve salatalıkta (Fan *et al.* 2007; Yu-qing *et al.* 2007) önemli ölçüde azaltmış, tuz stresi altında tohumların büyümesini geliştirmiş (Song *et al.* 2009), mısır ve *Kosteletzkya virginica*’nın kuru ağırlığını arttırmıştır (Zhang *et al.* 2006; Guo *et al.* 2009). Tuz stresi altındaki bitkilerde SNP ön muamelesi, endopeptidaz ve karboksipeptidaz aktivitelerini, çözünebilir protein miktarını arttırmak yoluyla karbon ve azot metabolizması arasındaki dengenin daha iyi olmasına etkin şekilde katkıda bulunmuştur. Tuz stresi altındaki bitkilerde eksojen SNP’nin, plazma membranı (PM) H^+ -ATPaz ekspresyonunu teşvik ettiği de bildirilmiştir (Zheng *et al.* 2010). Zhao *et al.* (2004) *Phragmites communis*’te ve Zhang *et al.* (2007) *Populus euphratica*’da, nitrik oksitin tuz stresi altındaki kalluslarda K^+/Na^+ oranını artırmak yoluyla tuza toleransı teşvik ettiğini ve bu olayda H_2O_2 bağımlı H^+ -ATPaz aktivitesinin arttığını rapor etmişlerdir. Sitoplazmada düşük Na^+ konsantrasyonu sağlamak için H^+ -ATPaz ve tonoplast boyunca yer alan Na^+ kontrolü, tuz stresine karşı hücresel adaptasyonun anahtar faktörüdür (Rausch *et al.* 1996). Liu *et al.* (2007) glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enziminin, NR bağımlı NO üretiminde ve kırmızı fasulye köklerinde tuza karşı toleransın oluşturulmasında önemli rol oynadığını

göstermişlerdir. Nitrik oksitin tuz stresi altında bitkilerde hücre içi CO₂ konsantrasyonunu, H₂O₂, MDA, ROT üretim oranını ve membran geçirgenliğini azalttığı, katalaz, peroksidaz, süperoksit dismutaz ve askorbat peroksidaz gibi ROT süpüren enzimlerin aktivitelerini ve prolin birikimini artırdığı rapor edilmiştir (Kopyra and Gwózdź 2003; Fan *et al.* 2007; Shi *et al.* 2007; Yu-qing *et al.* 2007; López-Carrión *et al.* 2008; Sheokand *et al.* 2008; Guo *et al.* 2009). NO'nin sadece ROT süpürücü enzimlerinin aktivitesini artırmadığı aynı zamanda stresle ilgili genlerin ifadesini artırdığı, EC'nin belirlenmediği sukroz fosfat sentaz ve Δ'-pyrroline-5-karboksilat sentaz için traskriptlerin ifadesini artırdığı bildirilmiştir (Uchida *et al.* 2002). NO'nin tuz stresi altında fotosentez pigmentlerini teşvik ederek fotosentezin (Ruan *et al.* 2002; Fan *et al.* 2007), ATP sentezinin ve mitokondrideki iki solunum elektron transport yolunun artırılmasında rol aldığı da ifade edilmiştir (Yamasaki *et al.* 2001; Zottini *et al.* 2002).

Literatürde tuz stresinin bitkiler üzerine olumsuz etkilerini gösteren ve bitkilerin tuzluluğa toleransının artırılmasında çeşitli kimyasalların kullanımı ile ilgili araştırmalar bulunmakla birlikte, bir nitrik oksit donörü olan SNP'nin sebzelerin tuzluluğa toleransında oynadığı rol hakkında detaylı bilgi mevcut değildir. Bu nedenle bu tezde marul (*Lactuca sativa*) bitkisi kullanılarak, sebzelerde tuzluluğa toleransın artırılmasında SNP'nin rolü fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler parametreler kullanılarak araştırılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Aytamka (2005) soya fasulyesinde tuz stresi ve nitrik oksit (NO) arasındaki ilişkiyi incelemek amacıyla 6 günlük soya fidelerini NO vericisi olarak kullanılan değişik konsantrasyonlardaki sodyum nitro prussid (SNP) ve NO tutucusu olan c-PTIO ile 2 gün ön muamele ettikten sonra ½ Hoagland besin çözeltisi ile hazırlanan 100 mM NaCl içeren hidroponik kültürde yetiştirmiştir. Çalışmada 19 günlük soya fidelerinde oransal su içeriği, klorofil, karotinoid ve total çözünebilir protein miktarı, peroksidaz enzim aktivitesi ve prolin birikimi tayin edilmiştir. Kontrol grubu ile 100 mM NaCl stresine maruz kalan bitkiler karşılaştırıldığında, tuzun fidelerde büyümenin gerilemesine, yapraklarda sararmaya ve epinastik hareketlere neden olduğu belirlenmiştir. SNP uygulanan fidelerde tuza karşı toleransın arttığı saptanmıştır. Araştırmada tuz stresi altında soya fidelerinde oransal su içeriği, total klorofil, karotinoid miktarlarının değişimi üzerine en etkin SNP konsantrasyonunun 0.01 μ M olduğu tespit edilmiştir. Total çözünebilir protein miktarı ve peroksidaz enzim aktivitesinin tuz stresi etkisi ile artış gösterdiği belirlenmiştir. En önemli tuzluluk parametrelerinden biri olan prolin birikiminin ise kontrole göre 100 mM NaCl ve artan SNP konsantrasyonlarında belirgin bir artış gösterdiği tespit edilmiştir. NO tutucusu 1 μ M c- PTIO, 1 μ M SNP ile birlikte uygulandığında NO tarafından oluşturulan tuza karşı toleransın azaldığı saptanmıştır.

Shi *et al.* (2007) 100 mM NaCl uygulanmış salatalık fidelerinde hem mitokondrideki ROT metabolizması hem de tonoplast ve plazma zarı (PM) fonksiyonları üzerine dışardan uygulanan sodyum nitro prusidin etkisini (SNP) araştırmışlardır. Çalışmada tuz uygulamasının mitokondride ciddi lipid peroksidasyonuna yol açtığı ve önemli ölçüde H₂O₂ birikimine neden olduğu, 50 μ M SNP uygulamasının ROT süpürücü enzimlerin aktivitesini teşvik ettiği, biber fidelerinin köklerinin mitokondrilerinde tuzun neden olduğu H₂O₂ birikimini azalttığı belirlenmiştir. Sonuç olarak mitokondrideki lipid peroksidasyonunun azaldığı tespit edilmiştir. Ayrıca SNP uygulamasının tuzun neden olduğu tonoplast ve plazma zarındaki PM H⁺-ATPaz ve H⁺-PPaz enzimlerinin inhibisyonunu ortadan kaldırdığı saptanmıştır.

Aksoy (2008) abiyotik stres altında mercimekteki antioksidan mekanizmaları belirlemek için 14 günlük mercimek (*Lens culinaris* Medik cv. Sultan-1) fidelerini 6, 12, 24 saat ve 3, 5, 7 gün boyunca kuraklık (20% PEG) ve tuzluluk (150mM NaCl) streslerine maruz bırakmış ve Mn SOD, Cu/Zn SOD, kloroplastik/mitokondriyal GR, CAT ve kloroplast/stromal APX antioksidan enzimleri için uygun polimeraz zincir reaksiyonu koşullarını optimize ettikten sonra strese maruz bırakılmış ve bırakılmamış bitki kök ve gövdelerinden toplam RNA'yı izole etmiştir. Strese maruz bırakılan ve bırakılmayan fidelerde kuraklık ve tuzluluk uygulamalarının Mn SOD ve Cu/Zn SOD'un gen ifade düzeyleri üzerine etkileri yarı-kantatif ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyon tekniği (RT-PZR) kullanılarak karşılaştırılmalı bir biçimde incelenmiştir. Araştırmada kuraklık uygulamasının gövde ve kökte nispi Mn-SOD gen ifadesi seviyelerinde herhangi anlamlı bir fark oluşturmadığı, tuz stresi altında her iki dokudaki nispi gen ifadesi seviyelerinin azaldığı tespit edilmiştir. Nispi Mn-SOD ifade seviyelerinin tuz ve kuraklık uygulamalarının 5. gününde hem kök, hem de gövdede arttığı, nispi Cu/Zn SOD ifade seviyelerinin, kuraklık uygulamasının 5. gününden sonra, köklerde ise uygulamanın 1. ve 7. günlerinde arttığı belirlenmiştir. Ayrıca Cu/Zn SOD ifade seviyelerinin tuz uygulamasının 3. ve 5. günlerinde arttığı saptanmıştır.

Stres koşullarında, bitkilerde moleküler düzeyde gözlenen tepkilerin belirlenmesinde RNA izolasyonu ilk ve önemli aşamalardan biridir. RNA izolasyonunun yapılması ile Poly(A)+RNA, Northern Blot Hibridizasyonu, cDNA analizleri ile stres koşullarında üretilen proteinlerin özelliklerinin belirlenmesi mümkün olmaktadır. Bu çalışmalar ile bitkinin stres koşullarına adaptasyon ve tolerans mekanizması ile strese dayanıklılığı sağlayabilecek genler ortaya konabilir, yapısal özellikleri belirlenen stres proteinleri dışarıdan bitkilere uygulanarak stres koşullarına uyumun sağlanması ile ilgili araştırmalara zemin oluşturulabilir. Pektez (2009) domates bitkisinde tuz stresi altında total RNA miktarında meydana gelen değişimi araştırmıştır. Çalışmada iki farklı domates çeşidine 50 ve 100 mM NaCl 15 gün boyunca uygulanmıştır. Araştırma sonucunda 100 mM tuz uygulanan domates fidelerinde total RNA miktarının kontrol grubuna göre önemli ölçüde arttığı tespit edilmiştir.

Esim (2011) yaptığı çalışmada düşük sıcaklığa hassas olan mısır yapraklarında donma hasarı, buz nükleasyon aktivitesi, hidrojen peroksit (H_2O_2) ile süperoksit ($O_2^{\cdot-}$) miktarı, lipid peroksidasyon seviyesi, apoplastik ve hücrel antioksidan enzimlerin (katalaz, peroksidaz ve süperoksit dismutaz) aktivitesi, nitrat redüktaz (NR) aktivitesi, içsel nitrik oksit (NO) miktarı, absisik asit (ABA) hormonu seviyesi ile apoplastik ve hücrel protein profilleri üzerine düşük sıcaklık ve NO'nin etkilerini araştırmıştır. Çalışmada bitki yapraklarına 10. gün 0.0, 0.1, 1 ve 100 μM sodyum nitro prussid (SNP) (bir NO vericisi) püskürtülmüş ve bitkiler kesim günlerinden (14, 21 ve 28) 2 gün önce düşük sıcaklığa (10/7 °C) transfer edilmiştir. Araştırma sonucunda mısır yapraklarında donma hasarının düşük sıcaklık ile arttığı, düşük sıcaklığa maruz bırakılan yapraklarda SNP uygulamalarının genellikle donma hasarını düşürdüğü belirlenmiştir. Donma hasarının azaltılmasında en etkili SNP konsantrasyonunun 100 μM olduğu, düşük sıcaklığın H_2O_2 ile $O_2^{\cdot-}$ miktarını, lipid peroksidasyon seviyesini apoplastik ve hücrel antioksidan enzimlerin aktivitelerini, NR aktivitesini, içsel NO ve ABA miktarını tüm günlerde kontrol bitkilerine oranla artırdığı saptanmıştır. 0.1, 1 ve 100 μM 'lık SNP uygulamalarının H_2O_2 ile $O_2^{\cdot-}$ miktarlarını ve lipid peroksidasyon seviyesini düşürdüğü antioksidan enzimlerin aktivitelerini artırdığı tespit edilmiştir.

Domates tohumlarında tuz stresine karşı nitrik oksitin koruyucu rolü Hayat *et al.* (2012) tarafından araştırılmıştır. Çalışmada domates tohumlarının yüzey sterilizasyonu yapıldıktan sonra farklı konsantrasyonlarda (50, 100, 150 mM) NaCl 8 saat süreyle tohumlara uygulanmıştır. Ayrıca NaCl ile ıslatılan bazı tohumlar 8 saat 10^{-5} M SNP solüsyonuna transfer edilmiş ve bitkilerde nitrat redüktaz aktivitesi, protein içeriği, antioksidan enzimlerin aktivitesi ölçülmüştür. Araştırma sonucunda tuz uygulamasını takiben uygulanan SNP'nin bitkinin tuza toleransını teşvik ettiği, antioksidan enzim aktivitesi ve prolin miktarlarını artırdığı tespit edilmiştir. Araştırmada nitrik oksitin tuz stresi ile kontamine olmuş topraklarda yetiştirilen bitkilerde stres önleyici olarak kullanılabileceği önerilmiştir.

Khan *et al.* (2012), hardal yapraklarının tuz stresine toleransında kalsiyum klorür ($CaCl_2$) ve nitrik oksit donörü olan SNP'in rolünü araştırmışlardır. Tuz stresine maruz

bırakılmış yapraklara SNP ve CaCl_2 uygulanmasından 24 saat sonra karbonik anhidraz ve nitrat redüktaz aktivitesi, yapraktaki klorofil içeriği, yaprağın bağıl su içeriği ve yapraktaki iyon konsantrasyonu ölçülmüş ve yalnız tuz uygulanan yapraklar ile mukayese edilmiştir. Çalışmada tuz stresinin H_2O_2 içeriğini artırdığı, elektrolit kaçağı ve TBARS miktarını artırmak yoluyla membranlarda hasar oluşturduğu tespit edilmiştir. Tuz stresinin oluşturduğu bu etkilerin 0.2 mM'lık SNP tarafından bloke edildiği, tuz stresine karşı uygulanan CaCl_2 ve SNP'nin SOD, CAT, POX, APX, GR gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerini artırdığı, prolin miktarı ve glisinbetain birikimini artırdığı, H_2O_2 içeriğini düşürdüğü, elektrolit kaçağı ve TBARS miktarını azaltarak bitkinin tuza toleransını teşvik ettiği belirlenmiştir. SNP ile birlikte uygulanan CaCl_2 'nin hardal yapraklarında tuz stresinin oluşturduğu zararlı etkileri daha fazla oranda azalttığı saptanmıştır.

Lin *et al.* (2012) 100 mM NaCl stresi altında yetiştirilen salatalık hipokotil ve radikulasında antioksidan kapasite ve büyüme üzerine SNP'nin etkisini araştırmışlardır. NaCl uygulamasının salatalık hipokotil ve radikulasında H_2O_2 ve tiyobarbiturik asit reaktif maddelerinin önemli ölçüde birikmesine neden olduğu, 100 μM SNP uygulamasının ROT-süpürücü enzimlerin aktivitesini uyardığı, DPPH süpürücü aktiviteyi, demir iyonlarının şelatlama aktivitesini, $\text{OH}^\cdot$ radikali süpürme aktivitesini artırdığı, tuz stresinin neden olduğu lipid peroksidasyonunu azalttığı belirlenmiştir. Çalışmada tuz stresinin kök hücrelerinin mitokondri ve hücre duvarının yapısını bozduğu, SNP uygulamasının tuz stresinin neden olduğu zararı ortadan kaldırdığı tespit edilmiştir.

Kara (2013) lokal endemik *Thermopsis turcica*'nın büyüme parametreleri, lipid peroksidasyonu (MDA), prolin ve klorofil içerikleri üzerine tuz stresinin etkisini araştırmıştır. Çalışmada fidelerin büyüme parametreleri, yaprak nisbi su içeriği (RWC), fotosentetik verimi, lipid peroksidasyon seviyesi, prolin ve klorofil içerikleri incelenmiştir. Bu amaçla 50 günlük *T. turcica* fideleri 7 ve 14 gün boyunca 0, 100 ve 200 mM NaCl'ye maruz bırakılmıştır. Çalışma sonucunda kök-gövde uzunluğu yaş-kuru ağırlık ve RWC'nin tuz stresi uygulamaları ile azaldığı görülmüştür. 100 ve 200

mM NaCl'nin, fidelerin fotosentetik verimleri üzerine önemli bir etki göstermediği belirlenmiştir. Öte yandan sürgünlerin MDA içeriklerinin tuz konsantrasyonundaki artışa paralel olarak artış gösterdiği, en yüksek MDA artışının 14 gün süresince 200 mM NaCl uygulanan gruplarda olduğu gözlenmiştir. Tuz stresine bağlı olarak sürgünlerin prolin içeriklerinin önemli oranda artış gösterdiği, hem 7 hem de 14 gün süresince 200 mM NaCl uygulanan gruplarda en yüksek prolin artışının olduğu belirlenmiştir. Fidelerin klorofil a, klorofil b ve karotenoid içeriklerinin 7 günlük tuz stresi uygulaması ile değişmediği, 14 günlük uygulamada ise önemli oranda azaldığı tespit edilmiştir.

Neocleous *et al.* (2013) farklı NaCl solusyonlarına (0, 5, 10 ve 20 mM) iki marul (*Lactuca sativa L.*) çeşidinin (yeşil “Paris Island” ve kırmızı “Songuine”) vermiş olduğu tepkileri araştırmışlardır. Çalışmada bitki mineral kompozisyonu (N, P, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn, Cu, B, Cl ve Na) ve besin kalitesi (nitratlar, askorbik asit, fenolikler, flavonoidler ve antioksidan aktivitesi) belirlenmiştir. Tuzluluğun, her iki çeşidin yapraklarında Zn, Cu, Fe, Mn ve B konsantrasyonunu artırdığı, potasyum ve kalsiyum konsantrasyonunu azalttığı belirlenmiştir. Öte yandan, tuzluluğun bazı sağlığa yararlı fenolik bileşiklerin miktarını artırdığı kaydedilmiştir.

Kausar *et al.* (2013) buğdayda tuz stresinin olumsuz etkilerinin giderilmesinde yapraklara uygulanan nitrik oksitin etkisini değerlendirmişlerdir. Çalışmada dört farklı konsantrasyonda (kontrol, 0.05, 0.1 ve 0.15 mM) SNP tuzlu (150 mM NaCl) ve tuzsuz şartlar altında yetiştirilen buğday fidelerinin yapraklarına uygulanmıştır. Araştırmada büyüme, verim, klorofil içeriği antioksidan aktivite, mineral besin konsantrasyonu ölçülmüş, köke uygulanan tuzluluğun kök-gövde kuru ağırlığını, sürgün büyümesini, ürün verimini azalttığı, antioksidanlar, prolin birikimi, kök ve gövdedeki Na ve Cl miktarını artırdığı belirlenmiştir. Öte yandan tuz uygulanmış veya uygulanmamış tüm buğday fidelerinde yapraklara uygulanan nitrik oksitin antioksidan enzim (SOD, CAT, POD) aktivitelerini, prolin ve toplam çözünabilir protein birikimini artırdığı tespit edilmiştir. Çalışmada yapraklara dışardan uygulanan nitrik oksitin tuz stresinin oluşturduğu oksidatif hasara karşı antioksidan enzimleri artırmak yoluyla koruyucu role sahip olduğu rapor edilmiştir.

Tuz stresi altında çimlenen salatalık tohumlarında çimlenme ve antioksidan enzimler üzerine dışardan uygulanan nitrik oksitin etkisi Fan *et al.* (2013) tarafından araştırılmıştır. Çalışmada salatalık tohumlarına çimlenme esnasında SNP'nin varlığı veya yokluğunda NaCl veya saf su verilmiştir. 50 mM NaCl uygulanmış tohumlarda kısa sürede çimlenme hızı ve çimlenme oranının düştüğü, tuz konsantrasyonu artışına bağlı olarak çimlenme hızı ve oranının giderek azaldığı saptanmıştır. Dışardan uygulanan (optimum 50 μ M) SNP'nin tuz stresinin etkilerini azalttığı, çimlenme hızı ve oranını artırdığı belirlenmiştir. 150 mM tuz ile birlikte uygulanan 50 μ M SNP'nin SOD ve CAT enzimlerinin aktivitelerini, prolin miktarını artırdığı, MDA içeriğini düşürdüğü, APX ve POD enzim aktivitelerini ise önemli ölçüde değiştirmediği tespit edilmiştir. Dışardan uygulanan NO'nun SOD ve CAT izoenzim ifadesini artırdığı belirlenmiştir. Araştırma sonucunda nitrik oksitin antioksidan enzimlerin aktivitesini, prolin miktarını artırmak ve MDA içeriğini düşürmek yoluyla tuz stresine karşı bitkinin direncini artırdığı rapor edilmiştir.

Tuz stresine maruz bırakılan pirinç (*Oryza sativa* L.) fidelerinde nitrik oksitin iyileştirici etkisi bazı anahtar fizyolojik parametreler kullanılarak çalışılmıştır. Araştırmada dört pirinç çeşidi, iki tuz ve üç NO konsantrasyonu kullanılmıştır. Yapılan analizler sonucunda uygulanan tuzun dört pirinç çeşidinin tamamında klorofil miktarını, fotosentez hızını, transpirasyon oranını, stoma iletkenliğini ve içsel CO₂ konsantrasyonunu önemli oranda azalttığı, buna karşın önceden bitkilere uygulanan nitrik oksitin klorofil içeriğini, gaz değişimini önemli oranda artırdığı belirlenmiştir (Habib *et al.* 2013).

Fan *et al.* (2014) soğuk stresi altındaki Çin lahanası fidelerinin gelişimi ve yapraklarındaki antioksidan enzim aktiviteleri üzerine nitrik oksit vericisi olarak dışardan uygulanan SNP'nin etkisini araştırmıştır. Soğuk stresinin lahanası fidelerinin gelişimini önemli ölçüde inhibe ettiği, sürgünlere dışardan uygulanan SNP'nin soğuk stresinin bu etkisini ortadan kaldırdığı belirlenmiştir. Soğuk stresine maruz kalan fidelede, bitki boyu, kök uzunluğu, yaş ve kuru ağırlığın, CAT aktivitesi haricindeki antioksidan enzim aktivitelerinin ve membran geçirgenliğinin arttığı tespit edilmiştir.

Soğuk stresinin yapraklarda MDA ve protein birikimine neden olduğu ve klorofil miktarını azalttığı da saptanmıştır. SNP uygulamasıyla birlikte antioksidan enzim aktivitelerinin, klorofil ve protein miktarının daha da arttığı, MDA ve membran geçirgenliğinin ise azaldığı rapor edilmiştir.

Chen *et al.* (2014) mangrove ağaçlarından *Aegiceras corniculatum* türünün yapraklarında tuzun sebep olduğu oksidatif stresinin hafifletilmesinde nitrik oksidin rolünü değerlendirmek için *Aegiceras corniculatum* fidelerini 350 mM tuza maruz bırakmış ve yapraklara NO donörü olarak farklı konsantrasyonlarda SNP uygulamıştır. Biyokimyasal ve enzim analizleri kullanılarak fidelede düşük moleküler ağırlıklı antioksidanların içeriği ve antioksidan aktivite araştırılmıştır. Çalışmada nitrik oksitin MDA içeriği ve hidrojen peroksit miktarını azaltıp, azalan glutatyon ve polifenol içeriğini artırarak tuz stresinin neden olduğu hasarı azalttığı ifade edilmiştir. Araştırmada NO'nin guikagol peroksidaz aktivitesini artırıp polifenol oksidaz aktivitesini azalttığı tespit edilmiş, sonuç olarak NO'nin mangrove ağaçlarında tuzun oluşturduğu stresin etkilerini azalttığı saptanmıştır.

Nitrik oksit, yüksek bitkilerde birçok fizyolojik olay ve strese cevap oluşturmada rol almaktadır. Domates, dünyadaki en önemli sebze bitkilerinden biridir ve tuzluluğun neden olduğu oksidatif stresin domatesta redoks ve NO dengesini etkilediği önceden rapor edilmiştir. Manai *et al.* (2014) 120 mM NaCl'ye maruz bırakılan domates fidelerini kullanarak, dışardan domates fidelerine uygulanan NO'nin tuzluluğun neden olduğu olumsuz etkileri iyileştirme potansiyelini araştırmışlardır. Çalışmada nitrik oksitin SOD, CAT, POD ve GR gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerini önemli ölçüde artırdığı, nitrit ve nitrat redüktaz gibi azot metabolizmasında yer alan bazı enzimlerin aktivitelerini de artırdığı ifade edilmiştir. Yine NO uygulanan domates fidelerinde yüksek prolin, askorbat ve düşük H₂O₂ miktarı saptanmıştır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Yararlanılan Alet ve Cihazlar

İklim dolabı	: Sanyo, Japonya ve Jenotech, Kore
Masa santrifüjü	: Hettich EBA 21
Soğutmalı santrifüj	: Hettich Micro 22 R
Spektrofotometre	: Shimadzu UVmini-1240
HPLC	: Agilent Technologies-1200
pH metre	: WTW unilab pH metre
Hassas terazi	: Shimadzu AY220
Hassas terazi	: Denver Instrument
Buzdolabı	: Arçelik
Derin dondurucu (-20°C)	: Arçelik
Derin dondurucu (-80°C)	: Nuaire N4 9483E
Karıştırıcı	: Fisons Whirlmixer
Karıştırıcı	: WiseStir
PCR Cihazı	: Qiagen Rotor Gene Q
Nanodrop	: Thermo Scientific Multiskan Go
Elektroforez Jel Yürütme Cihazı	: Bio-Rad PowerPac Basic
Elektroforez Jel Görüntüleme Cihazı	: Fusion FX Vilber Lourma
Mikrodalga	: Arçelik
Hot Surface	: Thermo Multi Blok Heater
Otomatik pipetler	: Brand, Axypet ve Eppendorf
Otoklav	: Hirayama HMC
Saf su cihazı	: GFL
Soğuk su banyosu	: Huber Polystat CC1
Su banyosu	: WiseBath
Homojenizatör	: Wiggen Hauser D- 500
Çalkalayıcı	: Gallenkamp
Vakum pompası	: Edwards, İngiltere

Vakum pompası	: Milipore
Elektroforez	: Owl Separation Systems P10DS

3.2. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanmaları

Çalışmada kullanılan çözeltilerin kullanıldığı yerler ve hazırlanış şekilleri aşağıda belirtilmiştir. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler Sigma, Merck ve Fluka şirketlerinden temin edilmiştir.

- 1. Armon ve Hogland besi çözeltisi:** 1,02 g KNO_3 , 0,492 g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,23 g $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 0,49 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2,86 g H_3BO_3 , 1,81 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,08 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,22 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,6 mg FeSO_4 , 0,6 mg tartarik asit saf su içerisinde çözülerek hacmi 1 litreye tamamlanmıştır.
- 2. 50 μM SNP çözeltisi:** 0,0149 g SNP 900 mL saf suda çözülmüş, 1 N NaOH ile pH: 7,5'e kadar titre edilmiş ve son hacim saf su ile 1 L'ye tamamlanmıştır.
- 3. 100 μM SNP çözeltisi:** 0,0298 g SNP 900 mL saf suda çözülmüş, 1 N NaOH ile pH: 7,5'e kadar titre edilmiş ve son hacim saf su ile 1 L'ye tamamlanmıştır.
- 4. 50 mM NaCl çözeltisi:** 2,9221 g NaCl 500 mL saf suda çözülmüş, son hacim saf su ile 1 L'ye tamamlanmıştır.
- 5. 150 mM NaCl çözeltisi:** 8,7663 g NaCl 500 mL saf suda çözülmüş, son hacim saf su ile 1 L'ye tamamlanmıştır.
- 6. %5'lik TCA** (trikloroasetik asit) (Lipid peroksidasyon aktivitesi homojenat çözeltisi): 100 mL saf su içerisine 5 g TCA ilave edilmiş, TCA tam olarak çözünene kadar karıştırılarak hazırlanmıştır.
- 7. %0,5'lik TBA** (tiobarbutirik asit) (Lipid peroksidasyon aktivitesi reaksiyon çözeltisi): 100 mL saf su içine 20 gram TCA çözülmüş ve içerisine 0,5 g TBA ilave edilerek ve iyice karıştırılarak hazırlanmıştır.
- 8. %5'lik $\text{Ti}(\text{SO}_4)_2$** (titanyum disülfat çözeltisi) (H_2O_2 miktarının belirlenmesinde kullanılır): 1 gram $\text{Ti}(\text{SO}_4)_2$ 20 mL saf suda çözülerek hazırlanmıştır.
- 9. %19'luk NH_4OH** (H_2O_2 miktarının belirlenmesinde kullanılır): 4,16 mL NH_3 20 mL saf suda çözülmesiyle hazırlanmıştır.

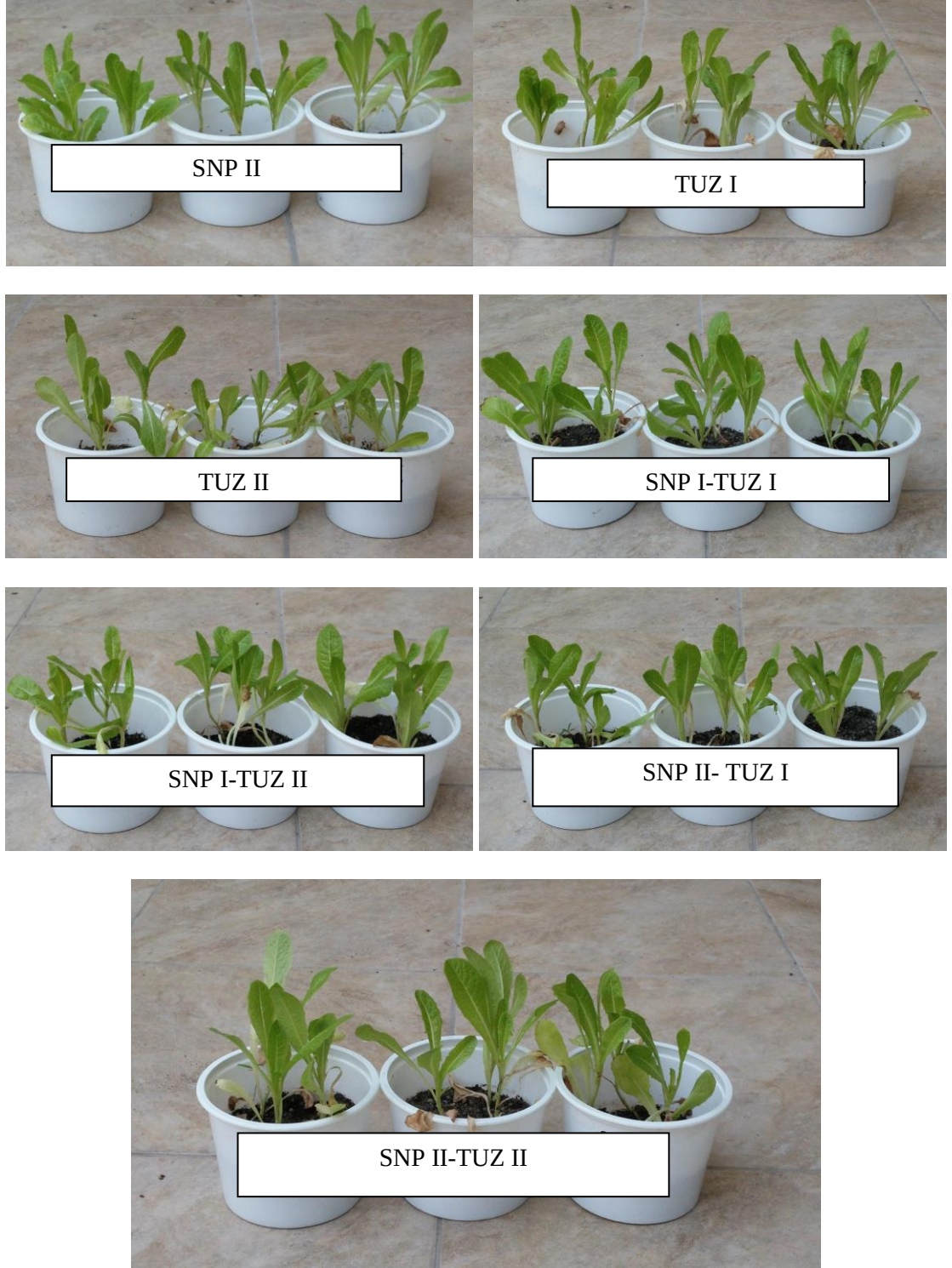
- 10. 2 M'lık H_2SO_4** (H_2O_2 miktarının belirlenmesinde kullanılır): 40 mL %98'lik H_2SO_4 alınmış 160 mL saf su içerisine ilave edildikten sonra 200 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
- 11. 0,1 M KH_2PO_4** (pH: 7,0), %1 PVP, 1mM EDTA (Hücrel antioksidan enzimlerin homojenizasyon tamponu): 2,72 g KH_2PO_4 180 mL saf suda çözülmüş, 1 N NaOH ile pH: 7,0'ye kadar titre edildikten sonra saf su ile 200 mL'ye tamamlanmış ve 0,5 g PVP ve 0,04 g EDTA ilave edilerek hazırlanmıştır.
- 12. 65 mM K_2HPO_4 , pH: 7,8** (Süperoksit anyonu miktarının belirlenmesinde kullanılan tampon): 1,132 g K_2HPO_4 70 mL saf su da çözülmüş pH: 7,8'e ayarlandıktan sonra saf su ile 100 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
- 13. 103,5 mM KH_2PO_4 , pH: 7,5** (Katalaz aktivitesi ölçümünde kullanılan tampon): 1,4 g KH_2PO_4 , 80 mL saf suda çözülmüş, 1 N NaOH ile pH: 7,5'e kadar titre edilmiş ve son hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.
- 14. 40 mM H_2O_2 çözeltisi** (Katalaz aktivitesi ölçümünde kullanılan substrat çözeltisi): 408 μ L % 30'luk H_2O_2 hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
- 15. 5 mM H_2O_2 çözeltisi** (Katalaz aktivitesi ölçümünde standart grafik hazırlamak için kullanılan): 41 μ L %30'luk H_2O_2 hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
- 16. 0,1 M Na_2HPO_4 , pH: 5,5** (Peroksidazın aktivitesi ölçümünde kullanılan tampon çözeltisi): 3,55 g Na_2HPO_4 alınarak 200 mL saf suda çözülmüş ve pH: 5,5'e ayarlandıktan sonra toplam hacim 250 mL'ye tamamlanmıştır.
- 17. Peroksidaz aktivitesi ölçümünde kullanılan substrat çözeltisi:** 54 μ L quairol ve 15 μ L H_2O_2 'dan ($d=1,13$ g/mol) 5 mM olacak şekilde 100 mL 0,1 M fosfat tamponu (pH: 5,5) içinde çözülerek hazırlanmıştır.
- 18. 50 mM KH_2PO_4** (pH: 7,8) (SOD için tampon çözelti): 1,7 g KH_2PO_4 200 mL saf suda çözülmüş, pH: 7,8'e ayarlandıktan sonra ve hacim saf su ile 250 mL'ye tamamlanmıştır.
- 19. 13 mM metiyonin çözeltisi** (SOD reaksiyon karışımı için): 0,586 g metiyonin alınmış, 18. maddede hazırlanmış olan 250 mL 50 mM KH_2PO_4 tamponu içerisine ilave edilerek çözülmüştür.

- 20. 63 μ M NBT-Nitroblue Tetrazolium Klorür** (SOD reaksiyon karışımı için): 0,0128 g NBT alınmış, 18. maddede hazırlanmış olan 250 mL 50mM KH_2PO_4 tamponu içerisine ilave edilerek çözülmüştür.
- 21. 0,1 mM EDTA-Etilen Diamin Tetra Asetik asit** (SOD reaksiyon karışımı için): 0,073 g EDTA alınmış, 18. maddede hazırlanmış olan 250 mL 50 mM KH_2PO_4 tamponu içerisine ilave edilerek çözülmüştür.
- 22. 13 μ M riboflavin** (SOD aktivitesi için 2. çözelti): 0,019 g riboflavin, 500 mL saf suda çözülmüş, 3 mL'lik reaksiyon karışımının 13 μ M riboflavin içermesi için 390 μ L riboflavin alınmıştır.
- 23. 1x MOPS solüsyonu** (Agaroz jel elektroforez için): 10 ml 20×MOPS alınıp üzerine 190 ml saf su eklenmiş ve oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.
- 24. Agaroz jel elektroforez:** 4,34 ml 20×MOPS, 66,5 ml dH_2O , 0,7 g agaroz, içinde partikül kalmayacak şekilde üç dakika mikrodalgada kaynatılmıştır. Agarozun tam çözündüğünden emin olunduktan sonra soğuk su altında erlen soğutulup içine 15,6 μ L formamid, 12,8 μ L etidium bromür konulup yavaşça karıştırılmıştır. Daha sonra tarak yerleştirilmiş yükleme tankına dökülüp donması beklenmiştir. Donan jele RNA'lar yüklenip 1×MOPS küvet solüsyonu ile tank doldurulmuş, jel , 90V, 90MA'da 30dk yürütülmüştür.

3.3. Yöntemler

3.3.1. Bitkilerin büyütülmesi

Araştırmamızda kullanılan marul (*Lactuca sativa* L.) tohumları Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümünden temin edilmiştir. Marul tohumları, ekimden önce etanol (%96) ile kısa süreli yıkandıktan sonra %5'lik sodyum hipoklorit içerisinde 5 dakika yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuştur. Daha sonra tohumlar 5 defa saf su ile yıkanmıştır. Tohumlar önce 5 kez su sonra 1 N HCl son olarak saf su ile yıkanmış, kum içeren 1 litrelik saksılara 10'ar adet ekilmiştir. Saksılar iklim dolabına (28/20°C, 14/10 ışık karanlık periyonunda ve %60 nem) konularak bitkiler 30 gün boyunca büyütülmüştür. İlk 10 gün bitkiler çeşme suyu ile sonraki 20 gün Hoagland



Şekil 3.1. Uygulama gruplarının fotoğrafları

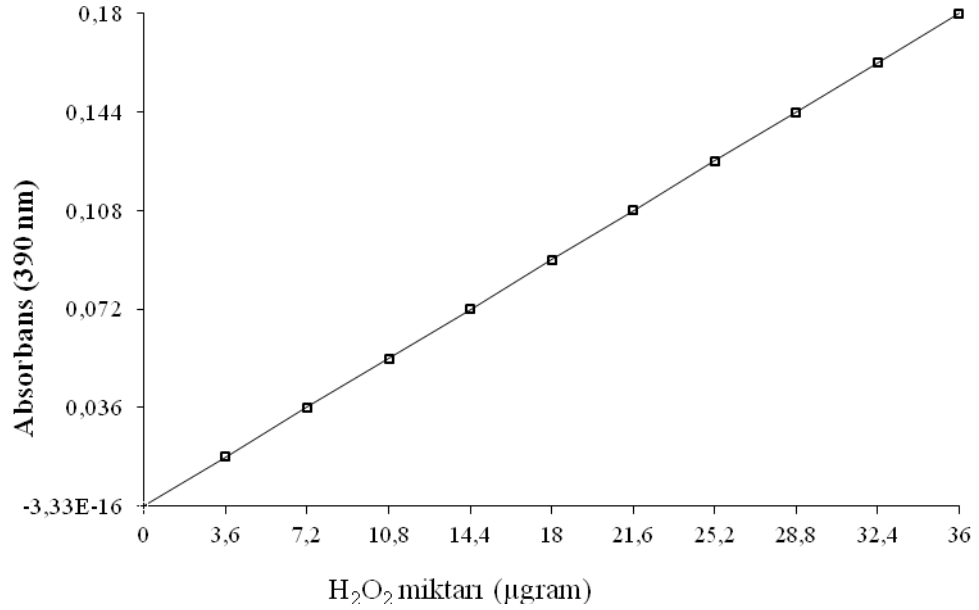


Şekil 3.2. Uygulama gruplarının karşılaştırmalı fotoğrafı

3.3.2. Hidrojen peroksit (H_2O_2) miktarının belirlenmesi

Hidrojen peroksit (H_2O_2) miktarının belirlenmesi için; 0,5 gram yaprak alınarak 5 mL soğuk %0,1 TCA içinde homojenize edildikten sonra homojenat $10.000 \times g$ 'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra elde edilen süpernatantın 0,5 mL'si, sırasıyla 0,5 mL 10 mM KH_2PO_4 (pH: 7,0) tamponundan ve 1 mL KI eklenmiştir. Absorbans değeri 390 nm'de ölçülüp kaydedilmiştir. Sonuçlar standart grafiklerle oranlanarak g doku başına düşen H_2O_2 miktarı ($\mu mol g^{-1}$ doku) olarak hesaplanmıştır (Velikova *et al.* 2000).

Standart grafiği hazırlamak için H_2O_2 çözeltisinden eppendorf tüplerine sırasıyla 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 ve 18 mikrogram H_2O_2 olacak şekilde hesaplanarak konulmuştur. Tüpün hacmi 1 mL olacak şekilde 10 mM KH_2PO_4 (pH: 7,0) tamponu ile tamamlanmıştır. Daha sonra her tüpe 1 mL KI ilave edilmiştir. Absorbans değerleri 390 nm'de köre karşı okunmuştur. Absorbans değerlerine karşılık gelen mikrogram H_2O_2 değerleri kullanarak standart grafik elde edilmiştir.



Şekil 3.3. Hidrojen peroksit (H₂O₂) miktarını belirlemede kullanılan standart grafik

3.3.3. Malondialdehit (MDA) aktivitesinin belirlenmesi

Lipid peroksidasyonu için 0,5 g yaprak alınarak 5 mL %5'lik TCA içinde homojenize edildikten sonra elde edilen homojenat 10.000 x g'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Tüpün süpernatant kısmından 4 mL alınarak üzerine 1 mL %0,5'lik TBA çözeltisi ilave edilmiştir. Reaksiyon karışımı kaynar suda 30 dakika inkübe edilir ve reaksiyon, tüplerin buz banyosuna alınmasıyla durdurulmuştur. Örnekler tekrar 10000 x g'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısmı alınarak absorbansı 532 nm de okunmuş ve daha sonra 600 nm deki non-spesifik absorbsiyon için absorbans değeri belirlenmiştir.

Lipid peroksidasyonun hesaplanması için; 532 nm'de ölçülen absorbans değerinden 600 nm'de belirlenen değeri çıkarılmış ve 1 mL çözeltideki MDA (nmol/g): $[(A_{532} - A_{600})/155000] \times 10^6$ formülüyle hesaplanmıştır. Sonuçlar MDA (nmol/gram doku) şeklinde verilmiştir (Ananieva *et al.* 2002).

3.3.4. Antioksidan enzim ekstraksiyonu

Enzimlerin ekstraksiyonu için, taze bitki yapraklarından 0,5 g alınarak havan içine konulup üzerine sıvı azot ilave edilerek toz haline gelinceye kadar öğütülmüştür. Sonra üzerine 5 ml soğuk homojenat tamponu (%1 PVP ve 1 mM EDTA ihtiva eden 0,1 M KH_2PO_4 pH: 7,0) ilave edilmiş ve karışım bir santrifüj tüpüne aktararak 15000 x g ve +4°C'de 15 dk. santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonucunda elde edilen süpernatant antioksidan enzimlerin aktivite ölçümleri için kaynak olarak kullanılmıştır (Angelini and Federico 1989; Angelini *et al.* 1990).

3.3.4.a. Askorbat peroksidaz aktivitesinin belirlenmesi

Askorbat peroksidaz aktivitesi, 290 nm'de absorbansdaki azalışa bağlı olarak belirlenmektedir (Nakano and Asada; 1981). Enzim aktivitesi, 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH: 7,0), 250 μM askorbik asit (ASC), 5 mM H_2O_2 ve 20 μL enzim ekstraktı içeren 1 mL'lik reaksiyon karışımının ölçülmesiyle belirlenmiştir. Askorbat peroksidaz aktivitesi 290 nm'de ASC için $2,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ epsilon katsayısının kullanılmasıyla hesaplanmıştır.

3.3.4.b. Süperoksid dismutaz aktivitesinin belirlenmesi

Süperoksid dismutaz (SOD) aktivitesi, nitro blue tetrazoliumun (NBT) süperoksit radikalleri ile mavi renkli formazona fotokimyasal indirgenmesi reaksiyonunun SOD enzimi tarafından engellenmesinin spektrofotometrik olarak belirleme esasına dayanmaktadır. Reaksiyon karışımı (3 mL); 50 mM KH_2PO_4 (pH: 7,8), 13 mM metiyonin, 63 μM NBT, 13 μM riboflavin ve 0,1 mM EDTA içermektedir. Aktivite ölçümü için 3 mL spektrofotometre küvetine yukarıdaki riboflavin içermeyen reaksiyon karışımından 2,58 mL alınmış ve üzerine 30 μL enzim ekstraktı pipetlenmiştir. Reaksiyon, tüp üzerine 13 μM 'lık riboflavin çözeltisinden 390 μL pipetlenip karıştırıldıktan hemen sonra, beyaz bir ışık kaynağı önüne yerleştirmek suretiyle başlatılmıştır. Tüp, ışık kaynağının karşısında 15 dk. tutulmuş ve reaksiyon ışık

kaynağının kapatılmasıyla durdurulmuştur. 15 dk. içerisinde NBT'nin renk açılma yoğunluğu 560 nm'de köre karşı okunmuştur. Kör; aynı işlemin enzimsiz örneğinden oluşmaktadır. SOD aktivitesinin 1 ünitesi, 560 nm'de gözlenen NBT indirgenmesinin %50 inhibisyonuna neden olan enzim miktarı, 1 enzim ünitesi olarak kabul edilmiş ve değerler EU/g yaprak olarak sunulmuştur (Agarwal and Pandey 2004).

3.3.4.c. Peroksidaz aktivitesinin belirlenmesi

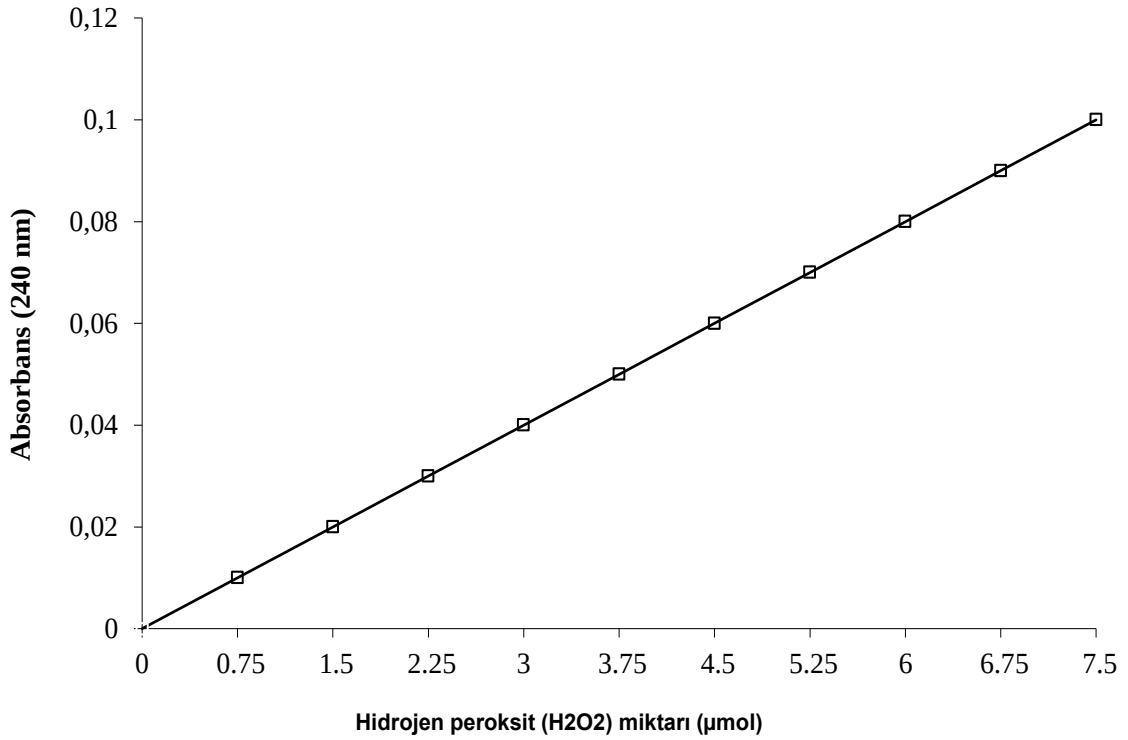
Peroksidaz (POD) aktivite tayini, guaikol ve H_2O_2 'nin substrat olduğu reaksiyonun ürünü olan renkli bileşiğin meydana getirdiği absorbans artışının 470 nm'de izlenmesi esasına dayanmaktadır. Aktivite ölçümü için spektrofotometre küvetine; 100 mL 0.1 M NaH_2PO_4 (pH: 5.5) ve 5 mM guaikol ve 5mM H_2O_2 içeren substrat çözeltisinden 3 mL konulduktan sonra, üzerine 10 μ L enzim ekstraktı ilave edilmiştir. 470 nm'de 5 dakika boyunca absorbans artışı 1 dakika aralıklarla kaydedilmiş ve absorbansın doğrusal olarak arttığı kısımdaki absorbans artışı 1 dakikaya oranlanmıştır. 25°C'de 1 dakikada, absorbansı 0.01 abs artıran enzim miktarı 1 enzim ünitesi olarak kabul edilmiş ve sonuçlar g yaprak başına düşen enzim ünitesi (EU/g yaprak) olarak sunulmuştur (Yee *et al.* 2002).

3.3.4.d. Katalaz aktivitesinin belirlenmesi

Katalazın (CAT) aktivite tayini için Gong *et al.* (2001) uyguladığı metot kullanılmıştır. Bu metot, katalazın ortamdaki H_2O_2 'nin oksijen ve suya dönüşümünü sağlarken meydana gelen absorbans değişiminin 240 nm'de izlenmesi esasına dayanmaktadır.

Önce reaksiyonda azalan H_2O_2 miktarını belirlemek için standart grafik hazırlanmıştır. Standart grafik hazırlamak için, 5 mM H_2O_2 çözeltisinden 3 mL'lik spektrofotometre tüplerine sırasıyla; 0,15, 0,3, 0,45, 0,6, 0,75, 0,9, 1,05, 1,2, 1,35 ve 1,5 mL konulmuş, tüplerin hacimleri saf su ile 1.5 mL'ye tamamlanmış ve her tüpe 1,47 mL 103,5 mM KH_2PO_4 ve 30 μ L su ilave edilmiştir. Spektrofotometrede 240 nm'de absorbans köre karşı okunmuş ve absorbans değerlerine karşılık gelen μ M H_2O_2 değerleri kullanarak

standart grafik elde edilmiştir. Aktivite ölçümü için 3 mL'lik spektrofotometre küvetine, 103,5 mM KH_2PO_4 tamponundan 1,475 mL ve 40 mM'lık H_2O_2 substrat çözeltisinden 1,5 mL konulduktan sonra, 25 μL enzim ekstraktı ilave edilmiştir. Spektrofotometrede 240 nm'de 3 dakika boyunca 1 dakika aralıklarla köre karşı absorbansı okunmuş ve absorbansın doğrusal olarak azaldığı aralıktan dakika başına absorbans azalması hesaplanmıştır. Bu ortalama absorbans değerleri, standart grafik yardımıyla μmol cinsinden H_2O_2 miktarına dönüştürülmüştür. 25°C'de, 1 dakika içinde, absorbansı 1 μmol azaltan enzim miktarı 1 enzim ünitesi olarak kabul edilmiş ve sonuçlar g yaprak başına düşen enzim ünitesi (EU/g yaprak) olarak sunulmuştur.



Şekil 3.4. Katalaz aktivitesi ölçümünde kullanılan standart grafik

3.3.5. Toplam fenolik madde miktarının belirlenmesi

Marul yapraklarındaki toplam fenolik madde konsantrasyonu Folin-Ciocalteu ayırıcı kullanılarak belirlenmiştir. Yöntem kısaca şöyledir. Yaklaşık 0.2 g yaprak örneği alınarak sıvı azotta dondurulup 3 ml %80'lik asetonla ekstre edilmiş ve 4°C'de 12 saat

karanlıkta inkübe edilmiştir. Daha sonra ekstre 905 x g'de 2 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant alınmıştır. Yaklaşık 50 µl ekstre üzerine 135 µl safsu, 750 µl %10'luk folin-ciocalteu ve 600 µl %7.5'lik Na₂CO₃ eklenerek 10 saniye vorteksledikten sonra karışım 45°C'lik su banyosunda 15 dakika bekletilmiştir. Karışım oda sıcaklığına kadar soğuduktan sonra 765 nm dalga boyunda spektrofotometre kullanılarak absorbansı ölçülmüştür. Gallik asit çözeltisi aynı akım şemasına göre hazırlanmış ve standart eğriler oluşturulmuştur.

3.3.6. Antioksidan kapasite

Marul yapraklarının antioksidan kapasitesi ABTS (aminobenzotriazole; 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonic acid) diammonium salt) metodu kullanılarak ölçülmüştür. Yöntem kısaca şöyledir. Yaklaşık 0.2 g yaprak örneği alınarak sıvı azotta dondurulup 3 ml %80'lik asetonda ekstre edilmiş ve -20°C'de 24 saat karanlıkta inkübe edilmiştir. Daha sonra ekstre 905 x g'de 2 dakika santrifüj edilerek ve süpernatant alınmıştır. Yaklaşık 0.4 gr MnO₂ 20 ml ABTS stok çözeltisine ilave edilmiş ve ABTS radikal katyon (ABTS *) oluşturmak üzere 30 dakika için karıştırılmıştır. Daha sonra, ABTS çözeltisi fazla MnO₂'yi ortadan kaldırmak için bir filtre kağıdından süzölmüştür. ABTS çözeltisi bir su banyosu içinde 30°C'de inkübe edilmiş ve 5 mmol L⁻¹ fosfat-tamponu kullanılarak 730 nm'de 0.7±0.02'lik bir absorbansta seyreltilmiştir. 1ml ABTS ve 100 µl ekstre karıştırılıp 1 dakika vorteksledikten sonra karışımın absorbans değeri okunmuştur.

3.3.7. Gen ekspresyonu çalışmaları

Real Time PCR'da kalıp olarak kullanılacak cDNA örneklerini elde etmek için yapraklardan RNA izolasyonu yapılmıştır. RNA izolasyonu için RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Almanya) kullanılmıştır.

Sıvı azot içerisinde ezilen yaprak örnekleri (yaklaşık 100 mg) ependorf tüpüne aktarılmış ve sıvı azotun uçması beklenmiştir. Örnekler erimedenden 450 µL RLT tamponu

eklenmiş (5 µL merkaptotanol ilave edilmiş) ve vorteks yapılarak, örnekler 56°C’de 3 dakika su banyosunda inkübe edilmiştir. Elde edilen karışım lila kolon bulunduran toplama tüpüne aktarılmış ve 2 dakika 15.000 x g’de santrifüj edilmiştir.

Oluşan süpernatant çökeltiye (pellet) dokunulmadan yeni bir ependorfa alınmış, içerisine kendi hacminin yarısı kadar %96’lık etanol eklenmiş ve hemen pipetaj yapılmıştır. Beklenmeden numune (yaklaşık 650 µL) pembe renkli kolon barındıran toplama tüpüne aktarılmış, 15 saniye 12.000 x g’de santrifüj edilmiş, alttaki sıvı atılmıştır. Bu aşamadan sonra DNA kirliliğinden kurtulmak için On-column DNase Digestion kiti (Sigma, Almanya) uygulanmıştır.

Elimizdeki pembe renkli kolona 350 µL RW1 tamponu eklenmiş ve 15 sn 12.000 x g’de santrifüj edilip, alttaki sıvı atılarak kolon dikkatlice yerine yerleştirilmiştir. 10 µL DNase I, 70 µL RDD tamponundan oluşan 80 µL’lik DNase stok solüsyonu kolona eklenmiş ve 20–30°C’de 15 dakika inkübe edilmiştir. Ardından 350 µL RW1 tamponu eklenerek 15 sn 12000 x g’de santrifüj edilmiş, alttaki sıvı atılarak kolon dikkatlice yerine yerleştirilmiştir. Bu aşamadan sonra protokole geri dönmüştür. Kolona 500 µL RPE tamponu eklenerek ve 15 sn 12.000 x g’de santrifüj edilmiştir. Kolon yeni bir toplama tüpüne geçirilerek 15.000 x g’de 1 dakika santrifüj edilmiş, etanolden uzaklaştırma işleminden sonra kolon 1.5 mL’lik yeni bir toplama tüpüne dikkatlice yerleştirilerek, 30 µL RNaz’lardan arındırılmış su, tam kolonun zarına gelecek şekilde eklenerek ve 5 dakika inkübe edildikten sonra 12.000 x g’de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Total RNA’nın saflığı ve yoğunluğu agaroz jel elektroforezi yapılmasından sonra 260/280 nm de absorbansı ölçülerek belirlenmiş ve örnekler -80°C’de saklanmıştır.

3.3.7.a. RNA’nın kantitatif tayini

Total RNA’nın kantitatif tayini için nanodrop spektrofotometre (Thermo Scientific Multiskan Go) kullanılmıştır. Örnekler ^µDropTM plate (Cat No:12391)’e 2 µL yükleme yapılarak okunmuştur.

3.3.7.b. cDNA sentezi

cDNA örneklerini elde etmek için RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas Katalog No: K1622) kullanılmıştır. cDNA sentezi için hesaplanan RNA PCR tüpüne konulup üzerine 1 µL oligo (dT) primer eklenmiştir. Toplam hacim 12 µL olana kadar ise nükleaz-free su eklenmiştir. Hafif bir santrifüjden sonra PCR cihazında cDNA programında 65°C’de 5 dakika bekletilmiştir. Daha sonra her tüp içine 4 µL 5× reaction buffer, 1 µL ribolock RNase inhibitör (20U/µL), 2 µL 10 mM dNTP mix, 1µL revertaid M-MuLV RT (200 U/µL) eklenerek toplam hacim 20 µL’ye tamamlanmıştır. Tüpler cihaza yerleştirilerek 42°C’de 60 dakika, 70°C’de ise 5 dakika tutulmuştur. Elde edilen cDNA örnekleri çalışılncaya kadar -20°C’de stoklanmıştır.

3.3.7.c. Real Time PCR uygulamaları

cDNA elde edildikten sonra ilgili genlerin kantitatif tayininde Real-time PCR kullanılmıştır. Bu amaçla Quantitect SYBR Green kit kullanılarak üretici firma tarafından önerilen protokol doğrultusunda RT-PCR reaksiyonları yapılmıştır (PCR döngüsü: 95°C 10 dakika, 40 döngü olacak şekilde (95°C 10 saniye, 52°C 15 saniye, 72°C 20 saniye ve 72°C 5 dakika). RT-PCR reaksiyonları için gene spesifik primerler (Çizelge 3.1) SYBR Green ile işaretleme yapılarak gen ekspresyonu kantitatif olarak belirlenmiştir. Referans gen olarak aktin geni kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. RT-PCR için kullanılacak spesifik primerler

GEN	Forward	Reverse
PAL	ACGAAATGGACCGTTACAG	TTCCCTCTCGATCATTTTGG
γ-TMT	TGTTGACGCAATACCACCAC	GCCATTGTCATCGGAGGAAC
Aktin	AGCAACTGGGATGACATGGA	GGGTTGAGAGGTGCCTCAGT

3.3.8. Gen ekspresyonu hesaplamaları

Genlerin mRNA seviyeleri her bir örnek için β -aktin ile standardize edilerek $2^{-\Delta\Delta Ct}$ matematiksel modeline göre hesaplanmıştır (Livak 2001).

$$\Delta\Delta Ct = (\text{Hedef Gen Ct} - \beta\text{-aktin Ct})_{\text{Muamele}} - (\text{Hedef Gen Ct} - \beta\text{-aktin Ct})_{\text{Kontrol}}$$

3.3.9. Hormonların ekstraksiyon, saflaştırma ve analiz işlemleri

3.3.9.a. Ekstraksiyon ve saflaştırma işlemleri

Ekstraksiyon ve saflaştırma işlemleri Kuraishi *et al.* (1991) ve Battal ve Tileklioğlu (2001) metotlarına göre ve üç tekrarlı olarak yapılmıştır. Derin dondurucudan çıkarılan küçük parçalar halindeki örnekler sıvı azot içerisinde bir havan yardımıyla toz haline getirilmiştir. Toz haline getirilen örnekler üzerine -40°C 'de bekletilen %80'lik metanol ilave edilerek (Davies 1995) 10 dk ultra doku parçalayıcıda (Ultrasonic Processor, Jencons LTD.) homojenize edildikten sonra, $+4^{\circ}\text{C}$ 'de ve karanlıkta 24 saat homojenize işlemine devam edilmiştir. Örnekler Whatman No:1 filtre kâğıdından süzölmüş ve süpernatant alındıktan sonra kalan parçalar tekrar aynı işlemlere tabi tutulmuş ve sonra her iki süpernatant birleştirilmiştir. Birleştirilen süpernatantlar tekrar 0,45 μml 'lik PTFE filtrelerinden (Cutting 1991) geçirilmiş ve bir evaporator pompası yardımıyla 35°C 'de kurutulmuştur. Kurutulan ekstraktlar 0,1 M KH_2PO_4 (pH 8) tamponunda tekrar çözülmüştür. Çözünen ekstraktlarda bulunan yağ asitlerini ayırmak için örnekler 1 saat 4°C 'de 5.000 rpm'de sanrifüj (Hermle Z 320 K) edilmiştir (Palni *et al.* 1983). Supernatant otomatik pipetle tüplerden alınmış ve bir beher içerisine bırakılmıştır. Fenolik bileşikleri ve renk maddelerini ayırmak için (Chen 1991; Kovac and Zel 1994; Qamaruddin 1996), her örneğe ait 1 gramlık çözünmeyen Polivinilpolipirilidon (PVPP, Sigma) hazırlanmış ve süpernatantın bulunduğu beher içerisine bırakılarak, iyice karıştırılmıştır (Money and Staden 1984; Hernandez-Minea 1991).

PVPP (Polivinilpolipirrolidon)’nin hazırlanması: 1 gram çözünmeyen PVPP bir beher içerisine bırakılmış ve üzerine 30 mM asetik asit konarak süspansiyon şeklinde iyice karıştırıldıktan sonra süzölmüştür. Tekrar üç kat hacimdeki asetik asitle yıkanıp süzöldükten sonra kullanılmıştır.

PVPP ile karıştırılan süpernatant Whatman No:1 filtre kâğıdından süzölerek PVPP’den ayrılmıştır. Ekstrakt alınarak ya hemen kullanılmış ya da daha sonra kullanılmak üzere -40°C’de saklanmıştır (Cheikh and Jonmes 1994). Daha spesifik ayırma yapabilmek için Sep-Pak C18 (Waters) kartüjleri kullanılmıştır (Machackova *et al.* 1993). Kartüjler kullanılmadan önce aşağıdaki açıklandığı şekilde şartlandırılmıştır.

3.3.9.b. Şartlandırma işlemi

Kartüjler önce 5 ml %80’lik metanolden geçirildikten sonra, 5 ml saf suyla yıkanmak suretiyle kullanıma hazırlanmıştır. Süpernatantlar (dondurulmuşsa çözünmesi beklendikten sonra) 5 mililitrelik şırıngalarla şartlandırılmış Sep-Pak C18 kartüjlerinden (1 ml/dak) geçirilmiştir.

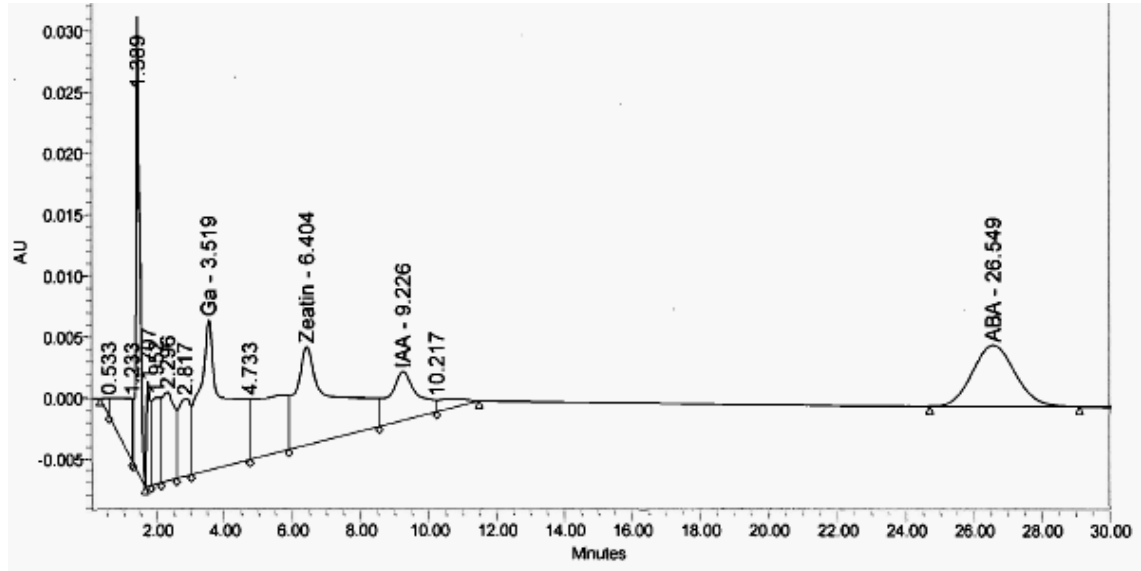
Kartüjler tarafından adsorbe edilen hormonlar %80’lik metanolde (1 g taze örnek için 3 ml) çözünmek suretiyle küçük şişelere alınmıştır. Küçük şişelere alınan numuneler HPLC analizleri için kullanılmıştır (Qamaruddin *et al.* 1996).

3.3.9.c. Hormonların analizi

Hormon analiz yönteminde Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) yöntemi kullanılmıştır (Horgan and Kramers 1979; Koshimizo and Iwamura 1986; Morris *et al.* 1990). HPLC analizleri aşağıdaki sistemler kullanılarak yapılmıştır (Şekil 3.1).

Pompa: Araştırmamızda basıncı 20.000 psi’ye kadar çıkabilen Waters marka (Waters 1525) pompa kullanılmıştır (Robyt and White 1990).

Dedektör: Çalışmamızda Waters marka ve 4020 model UV dedektörü kullanılmıştır (Roberts and Hooley 1988; Horgan 1988). Dedektörün en uygun dalga boyunun ise 245 nm olduğu tespit edilmiştir (Featonby-Smith and Van Staden 1984; Banowetz 1994).



Şekil 3.5. Hormonlara ait HPLC kromatogramı

*Alıkonma zamanları: Ga 3.519 dk., Zeatin 6.404 dk. IAA 9.226 dk. ABA 26.594 dk. Kolon: Waters Bondapak C18; Dedektör: UV Waters 2487 Dual λ Absorbans Dedector; Dalga boyu 245 nm; Mobil faz: %11'lik asetonitril (pH: 4,91); Akış hızı: 2.0 ml/dk

Kolon: Çalışmamızda Bondapak C18 (Waters; 30x0,2 cm) kolon kullanılmıştır (Horgan and Kramer 1979; Bremner 1981; Palni *et al.* 1983; Hernandez–Miana 1991; Chen 1991).

İzokratik Sistem: Bu sistemde, sabit konsantrasyondaki mobil fazın dakikadaki akış hızı ile beraber maddelerin kolonlardaki alıkonma zamanına bağlı olarak birbirlerinden ayrılabilmesi temeline dayanmaktadır. Çalışmamızda izokratik sistem kullanılmıştır (Turnbull and Hanke 1985; Taylor *et al.* 1990).

Kaydedici: (İntegratör): Dedektörün gönderdiği uyarılar Waters marka ve Breeze Software tarafından kaydedilmiştir.

Mobil Faz: Çalışmamızda %11'lik asetonitril (HPLC'ye özgü, Merck) tampon olarak 40 mM trietil amonyum asetat (TEAA) ilave edilmiş ve pH'sı 4,91'e ayarlanan mobil faz kullanılmıştır (Hansen *et al.* 1984; Soejima *et al.* 1992; Kovac and Zel 1994; Chamberlain 1995).

TEAA'nın Hazırlanması: Belli bir miktarda trietilamilin (Merck) alınarak bir mezür içerisine bırakılmış, üzerine trietilamilin miktarından biraz daha az olacak şekilde asetik asit yavaş yavaş ilave edilmiştir. Daha sonra elde edilen çözelti buzdolabına bırakılmış soğuduktan sonra kullanılmıştır.

Degaze İşlemi: Millipore marka vakum pompası kullanılarak pH'sı ayarlanan mobil fazda oluşan gazlar uzaklaştırılmıştır.

3.3.10. Glukoz, fruktoz, maltoz ve sükroz miktarının belirlenmesi

0,5 gr kuru yaprak örneği santrifüj tüpüne konulup, 5ml petrol eterinde yıkandıktan sonra %80'lik etanolde ekstre edilmiştir. Ekstre üzerine HPLC-grade su eklendikten sonra 65°C'de alkol uçurulmuş ve şekerler çözülmüştür. Solüsyonu dekolarize etmek için çözeltiye kömür eklenmiş ve karıştırılmıştır. Çözelti 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra supernatant alınarak HPLC'de analiz edilmiştir.

3.3.11. Organik asit miktarlarının belirlenmesi

Organik asitlerin analitik ölçümünde 0,5 gr yaprak örnek alınarak 10 ml saf su içerisinde homojenize edilmiştir. Homojenize edilen örnekler 0,45 µl'lik filtrelerden geçirilerek viallere aktarılmış, viallere aktarılan örnekler, mobil faz olarak 1ml/dk akış hızında potasyum dihidrojen fosfatın HPLC'de yürütülmesi ile belirlenmiştir.

3.3.12. Amino asit miktarının belirlenmesi

Marul yapraklarının serbest amino asit kompozisyonunun belirlenmesinde Aristoy and Toldra (1991) ve Antoine *et al.* (2002) tarafından kullanılan yöntemler (HPLC yöntemi) esas alınmıştır. Örneklerin serbest amino asit kompozisyonunun belirlenmesinde tek dedektörlü (UV) ve Zorbax Eclipse-AAA 4.6 x 150 mm, 3,5 µm (Agilent PN 963400-902) kolonlu Agilent 1200 model HPLC kullanılmıştır. Amino asitler için türevlendirme reagenti olarak OPA (ortho-phthalaldehyde) ile Fmoc (9- fluorenylmethyl chloroformate), tampon çözelti olarak ise 0,4 N Borate (Agilent PN 5061-3339) (pH'sı 10,2) kullanılmıştır. Kromatografi sisteminde mobil faz olarak; mobil faz A: 40 mM NaH₂P0₄ (pH 7,8) ve mobil faz B: Asetonitril (ACN): Metanol (MeOH) : Su /45:45:10 v/v/v çözeltileri yürütülmüştür. Sistemde yürütülen mobil faz akış oranı 2 ml/dk ve kolon sıcaklığı 40°C'dir. UV dedektörde; Sistin, Valin, Hidroksiprolin, Aspartik asit, Glutamik asit, Asparagin, Serin, Glutamin, Histidin, Glisin, Tionin, Arginin, Alanin, Tirosin, Metionin, Triptofan, Fenilalanin, İzolösin, Lösin, Lisin, Prolin amino asitleri belirlenmiştir.

3.3.13. İstatistiksel analiz

Sonuçlar, her bir uygulamadan üç örnek (3 paralel) ve her bir örnekten 3 tekerrür yapıldıktan sonra elde edilen 9 değer in ortalamasıdır. Sonuçların hesaplamasında, SPSS 20.0 paket programı kullanılmış ve tek yönlü varyans analizi (ANOVA) yapılmıştır. İstatistik anlamlar, $p < 0.05$ hata seviyesinde Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma Testi kullanılarak belirlenmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Araştırmamızda tuzluluğa toleransı fazla olmayan marul (*Lactuca sativa* L.) kullanılmıştır. Marul tohumları iklim kabininde 30 gün boyunca çimlendirilip/yetiştirildikten sonra yapraklara 2 farklı konsantrasyonda SNP (SNP I=50µM ve SNP II=100 µM) püskürtülmüştür. Uygulamadan 48 saat sonra ise saksılara 2 farklı konsantrasyonda NaCl (Tuz I=50mM ve Tuz II=150 mM) ilave edilmiştir. Uygulmadan 7 gün sonra genç ve sağlam olan yapraklar alınarak fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler analizler yapılmıştır.

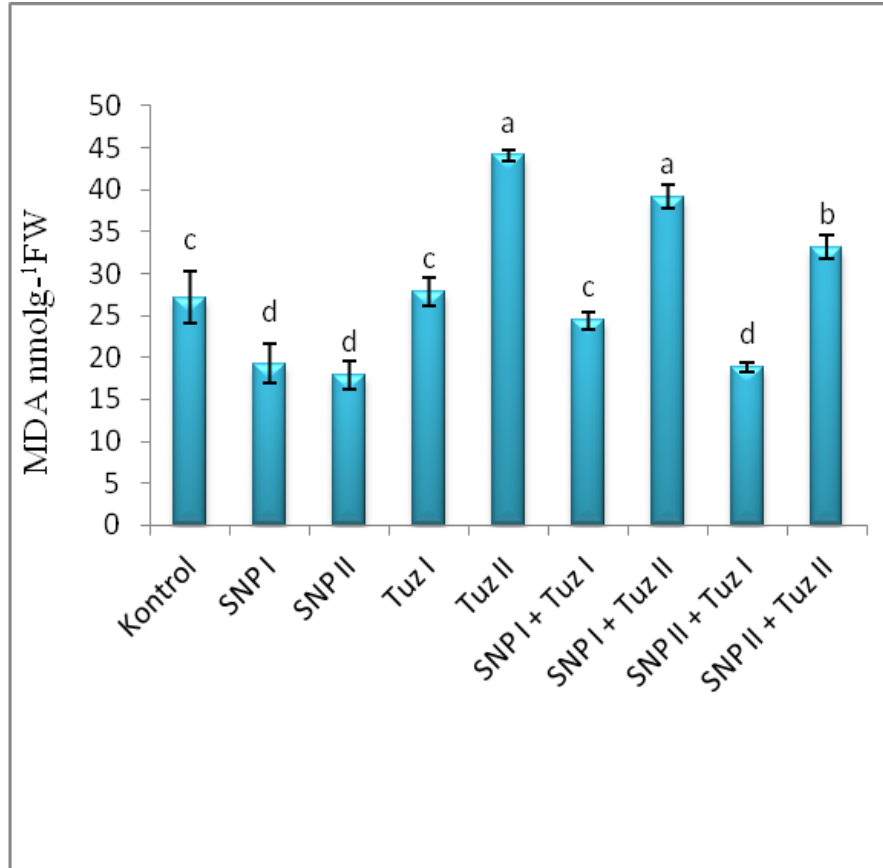
Kontrol grubu bitkiler ile 50-150 mM NaCl stresine maruz kalan bitkiler karşılaştırıldığında, tuzun marul fidelerinin büyümesinde gerileme, yapraklarda sararmaya ve epinastik hareketlere neden olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.1). Buna karşın SNP ile ön işlem uygulandıktan sonra tuz stresine maruz kalan bitkilerde tuza karşı toleransın arttığı ve yalnız tuz uygulanan gruplara oranla büyümenin daha fazla olduğu, yapraklardaki sararmanın azaldığı görülmüştür.

4.1. Malondialdehit (MDA) ve Hidrojen Peroksit (H₂O₂) Miktarı

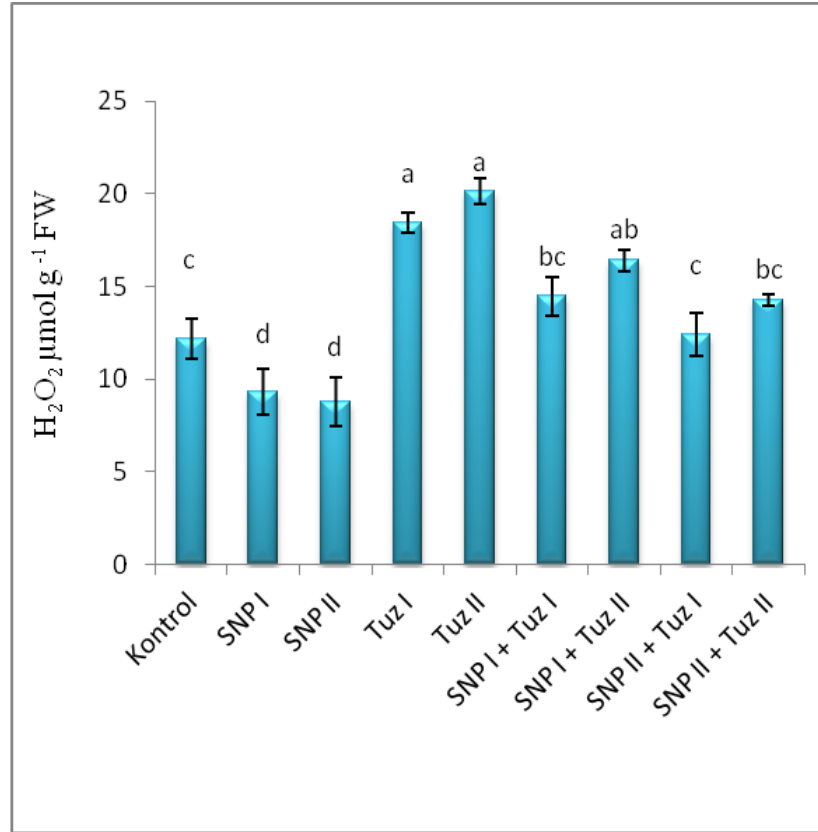
MDA, oksidatif stres sonucu oluşan lipid peroksidasyonu göstermek için kullanılır. Marul yapraklarına farklı konsantrasyonlarda uygulanan SNP ve tuzun yapraklardaki MDA içeriği üzerine etkisi Şekil 4.1’de verilmiştir. Kontrol ile mukayese edildiğinde yalnız SNP uygulanan marul yapraklarında MDA miktarı önemli oranda azalmıştır ($p<0,05$). Marul yapraklarına uygulanan 150 mM NaCl ise MDA miktarında önemli ölçüde artışa yol açmıştır. Tuz ile birlikte SNP (özellikle SNP II) uygulanması marul yapraklarındaki MDA içeriğini önemli oranda azalmıştır.

Marul yapraklarındaki H₂O₂ konsantrasyonu hem tuz uygulamalarından hem de SNP uygulamalarından önemli ölçüde etkilenmiştir. Kontrol ile kıyaslandığında bir nitrik oksit donörü olan SNP marul yapraklarındaki H₂O₂ miktarını önemli ölçüde azaltmıştır.

(Şekil 4.2). Yalnız tuz uygulanan yapraklarda H_2O_2 miktarı kontrole göre oldukça artmıştır. Yalnız tuz uygulanan gruplar ile kıyaslandığı zaman, tuz uygulamasından 48 saat önce yapraklara uygulanan SNP H_2O_2 miktarını önemli oranda azalmıştır (Şekil 4.2).



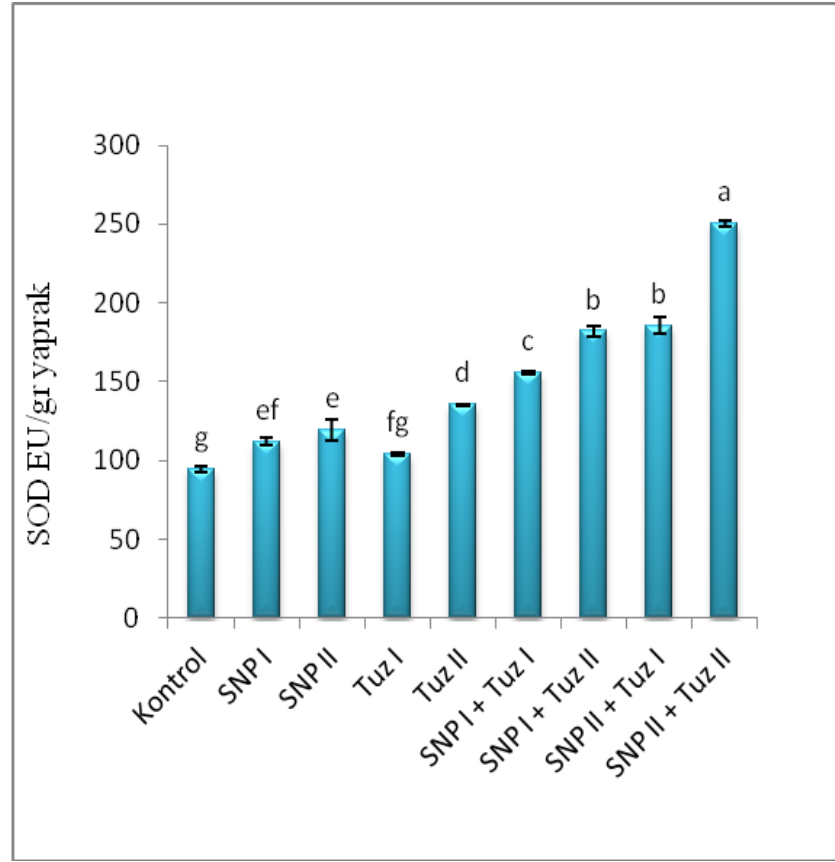
Şekil 4.1. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan SNP ve tuzun marul yapraklarındaki MDA içeriği üzerine etkisi



Şekil 4.2. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan SNP ve tuzun marul yapraklarındaki H₂O₂ konsantrasyonu üzerine etkisi

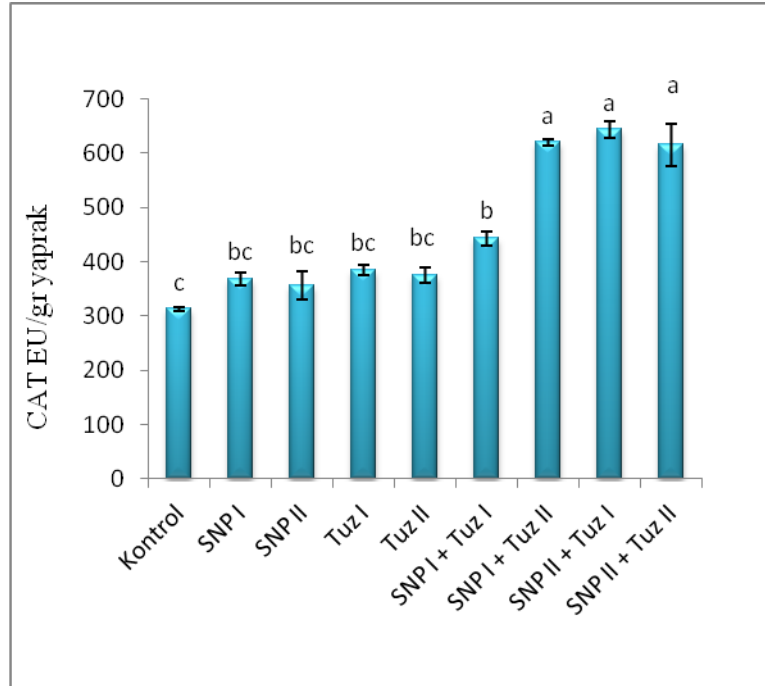
4.2. Antioksidan Enzim Aktiviteleri

SOD enzim aktivitesi hem yapraklara uygulanan SNP hem de SNP+NaCl uygulamasından önemli derecede etkilenmiştir (Şekil 4.3). Yapraklara uygulanan 50 μM ve 100 μM SNP SOD enzim aktivitesini kontrole göre artırmıştır. Yine saksılara tek başına uygulanan NaCl kontrole göre bu enzimin aktivitesinde artışa yol açmıştır. Marul yapraklarına SNP uygulandıktan 48 saat sonra uygulanan tuz ise SOD aktivitesini kontrole göre önemli oranda artırmıştır ($p < 0.05$). Kontrol için ölçülen SOD aktivitesi 94,40 EU g⁻¹ iken, SNP I+Tuz II için bu değer 181,94 EU g⁻¹, SNP II+Tuz II için 250,35 EU g⁻¹ olarak ölçülmüştür.



Şekil 4.3. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan SNP ve tuzun marul yapraklarındaki SOD enzim aktivitesi üzerine etkisi

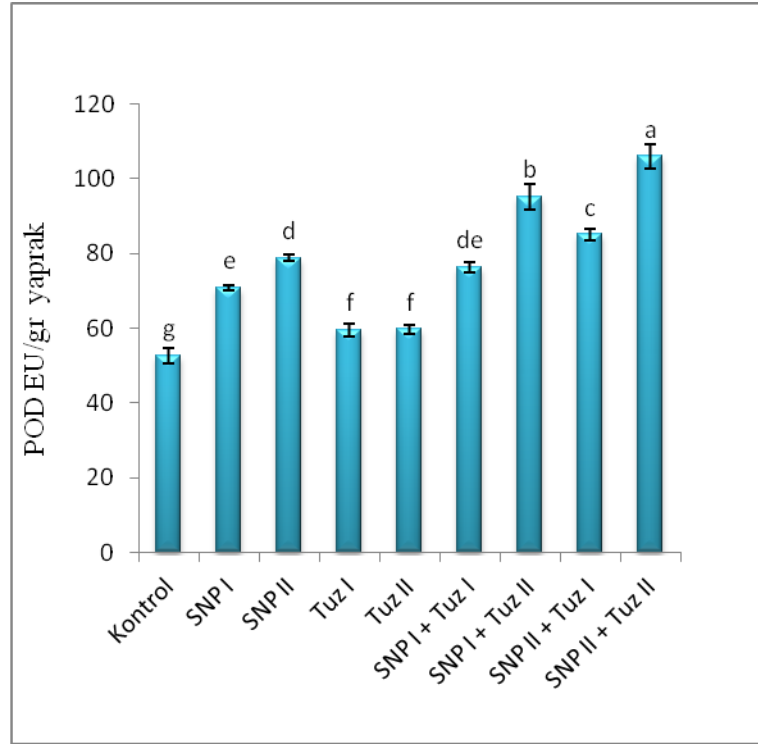
Kontrol ile mukayese edildiğinde katalaz enzim aktivitesi hem yapraklara uygulanan SNP hem de saksıya uygulanan NaCl ile birlikte artmıştır (Şekil 4.4). Öte yandan yalnız SNP uygulanan ve yalnız NaCl uygulanan yapraklarda katalaz enzim aktivitesi bakımından fark ortaya çıkmamıştır ($p < 0.05$). Tuz ve SNP birlikte uygulandığında ise yapraklardaki katalaz aktivitesi hem kontrole göre hem de bu maddelerin tek tek uygulanmalarına göre önemli ölçüde artış göstermiştir. Örneğin yalnız Tuz II uygulanan yapraklarda katalaz enzim aktivitesi $312,78 \text{ EU g}^{-1}$ olarak ölçülmüşken SNP II+Tuz II uygulamasında bu enzimin aktivitesinde yaklaşık %98'luk bir artış kaydedilmiştir.



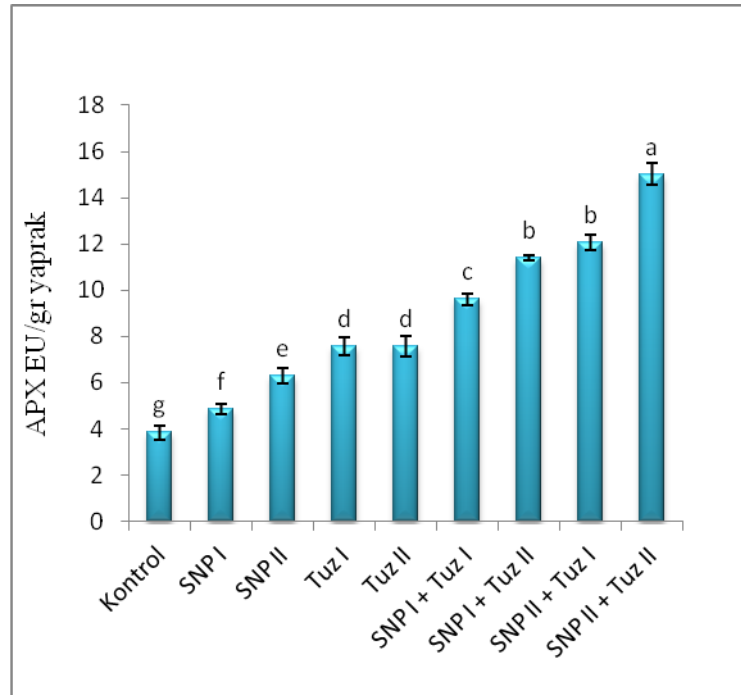
Şekil 4.4. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan SNP ve tuzun marul yapraklarındaki CAT enzim aktivitesi üzerine etkisi

Marul yapraklarında peroksidaz enzim aktivitesi SNP uygulaması ile birlikte önemli oranda artmıştır (Şekil 4.5). Kontrol ile kıyaslandığında tuz uygulaması peroksidaz aktivitesinde artışa neden olmuştur. Öte yandan yalnız SNP uygulanan marul yapraklarındaki peroksidaz aktivitesi, yalnız tuz uygulanan yapraklardan daha yüksek olarak ölçülmüştür. Tuz ile birlikte yapraklara uygulanan SNP peroksidaz enzim aktivitesini kontrole oranla önemli ölçüde artırmıştır. Kontrol yapraklarında peroksidaz aktivitesi $52,58 \text{ EU g}^{-1}$ olarak ölçülmüş iken, SNP I+Tuz I uygulanan yapraklarda bu enzimin aktivitesi $76,25 \text{ EU g}^{-1}$, SNP II+Tuz II uygulanan yapraklarda $105,93 \text{ EU g}^{-1}$ ölçülmüştür.

Askorbat peroksidaz aktivitesi kontrole göre bütün uygulama gruplarında artış göstermiştir (Şekil 4.6). Tuz uygulaması hem kontrole hem de yalnız SNP uygulamasına göre bu enzimin aktivitesini önemli oranda artırmıştır ($p < 0.05$). Yine fidelere birlikte uygulanan tuz ve SNP, APX aktivitesinde önemli artışa neden olmuştur. Kontrol ile kıyaslandığında SNP II+Tuz II APX aktivitesinde 4 kat bir artış meydana getirmiştir.



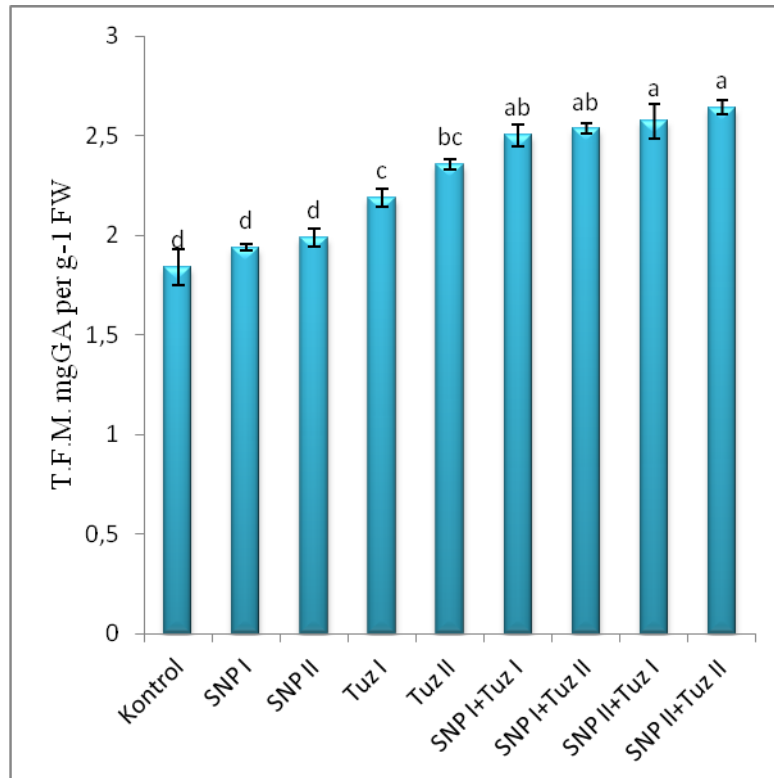
Şekil 4.5. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan SNP ve tuzun marul yapraklarındaki POD enzim aktivitesi üzerine etkisi



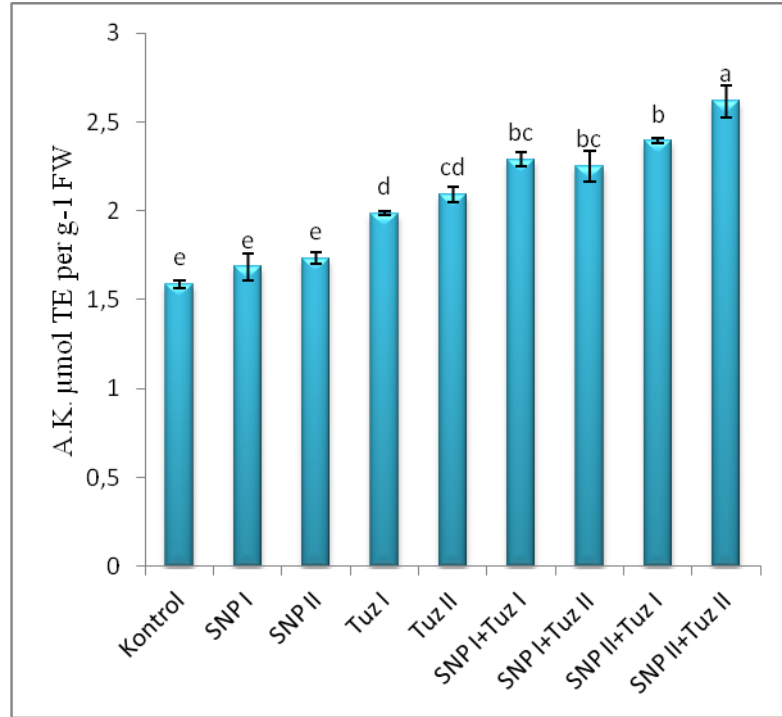
Şekil 4.6. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan SNP ve tuzun marul yapraklarındaki APX enzim aktivitesi üzerine etkisi

4.3. Antioksidan Kapasite ve Toplam Fenolik Madde İçeriği

SNP ve tuz uygulamasından 7 gün sonra marul yapraklarında ölçülen antioksidan kapasite ve toplam fenolik madde içeriği Şekil 4.7 ve Şekil 4.8’de sunulmuştur. Kontrol ile kıyaslandığında hem antioksidan kapasite hem de toplam fenolik madde içeriği SNP, NaCl ve SNP+NaCl uygulamalarında artış göstermiştir. SNP ve NaCl’nin birlikte uygulanması, bu maddelerin tek tek uygulanmasından daha fazla antioksidan kapasiteyi ve toplam fenolik madde miktarını artırmıştır. Kontrolde ölçülen antioksidan kapasite $1,58 \mu\text{mol TE g}^{-1} \text{FW}$ iken, SNP II+Tuz II uygulamasında antioksidan kapasite $2,61 \text{ TE g}^{-1} \text{FW}$ olarak ölçülmüştür. Yine kontrol grubunda toplam fenolik madde miktarı $1,83 \text{ mgGA g}^{-1} \text{FW}$ olarak belirlenmiş iken SNP II+Tuz II uygulanan marul yapraklarında toplam fenolik madde miktarı $2,64 \text{ mgGA g}^{-1} \text{FW}$ olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.7. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan SNP ve tuzun marul yapraklarındaki toplam fenolik madde içeriği üzerine etkisi



Şekil 4.8. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan SNP ve tuzun marul yapraklarındaki toplam antioksidan kapasite üzerine etkisi

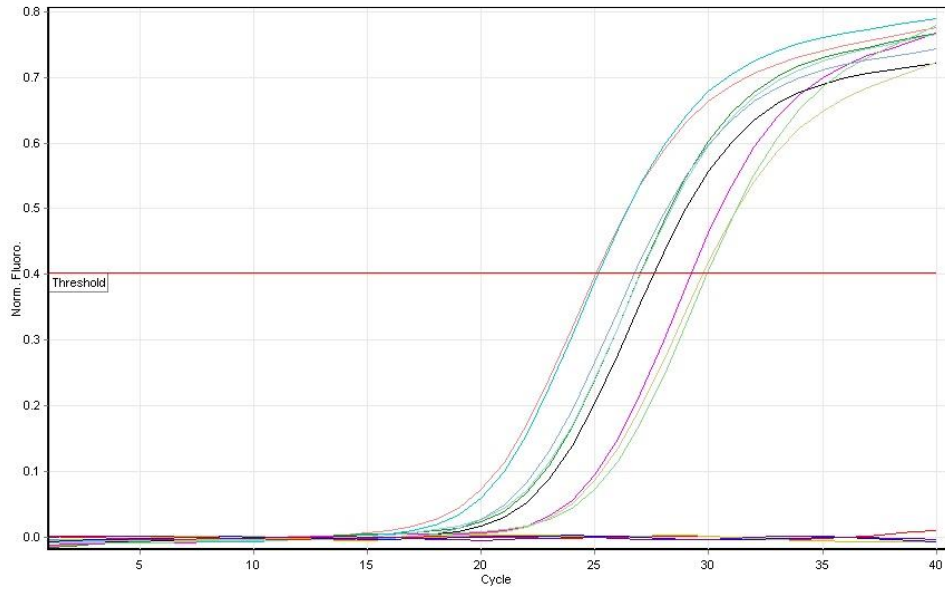
4.4. Marul Yapraklarına Ait Dokulardan Elde Edilen RNA'lara Ait Konsantrasyon ve 260/280 Oranları

İzole edilen total RNA'ların saflığı 260 ve 280 nm'de ölçülen absorbansların oranıyla (A_{260}/A_{280}) belirlenebilmektedir. Absorbansların oranları ekstraksiyon katsayısı ve bazların doğasına bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Saf bir RNA'nın 260/280 oranı 2,0'a yakındır. Çalışmada nanodrop spektrofotometre ile ölçülen A_{260}/A_{280} 'nin 2,0'a yakın olması RNA izolasyonunun başarılı olduğu anlamına gelmektedir. RNA'lara ait konsantrasyonlar cDNA kütüphanesine koyulması gereken uygun total RNA'yı içermektedir (Çizelge 4.1).

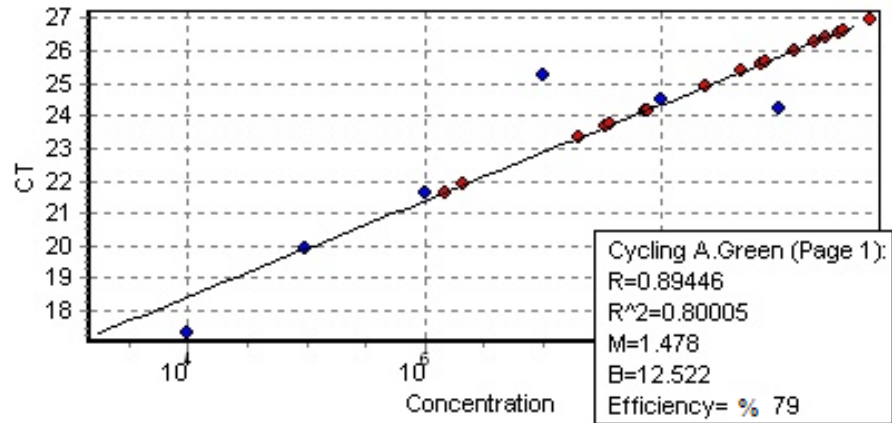
Çizelge 4.1. RNA konsantrasyon ve 260/280 oranları

	Konsantrasyon (ng/μl)	260/280
Kontrol	176,462	1,953
SNP I	807,077	1,930
SNP II	332,077	2,076
TUZ I	624,231	1,895
TUZ II	71,538	1,989
SNP I-TUZ I	178,385	1,985
SNP I-TUZ II	160,077	1,946
SNP II -TUZ I	206,692	1,981
SNP II -TUZ II	320,115	2,029

Araştırma kapsamında PAL ve γ -TMT miktarının belirlenmesinde Rotorgene 3000 Real-time PCR kullanılarak amplifikasyon görüntüleri elde edilmiştir. Oluşan piklerin treshhold çizgisini kestiği yerler ilk anlamlı artışın olduğu nokta olup pikler yukarı çıkıp 40. döngüden sonra tekrar paralel bir düzlemde birleşmiştir (Şekil 4.9). Genlere ait etkinlik oranı Şekil 4.10'da verilmiştir. Real-time PCR'da amplifiye edilen DNA'nın kopya sayıları primer etkinlik oranına bağlı olarak değişmektedir.



Şekil 4.9. Örnek pik grafiği

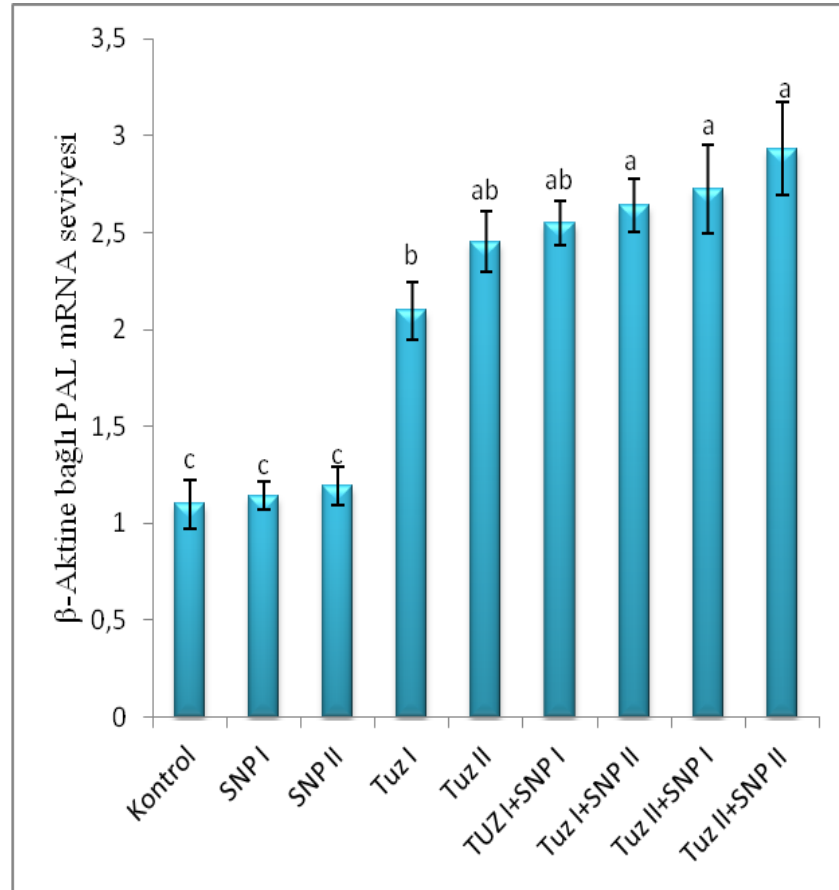


Şekil 4.10. Örnek primer etkinliği grafiği

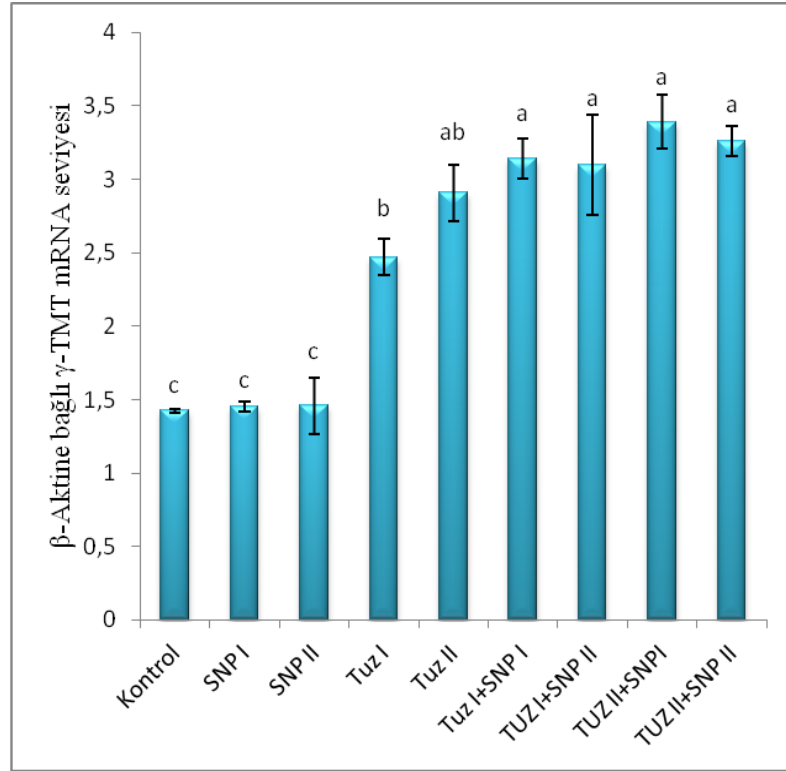
4.5. PAL ve γ -TMT mRNA Seviyesi

Tuz stresine marul fidelerinin yanıt oluşturmada fenolik maddelerin ve α -tokoferolün biyosentezinde yer alan PAL ve γ -TMT genlerinin ifadesini ölçmek için kantitatif Real-time PCR analizleri yapılmıştır. Analiz sonuçlarına göre tuz uygulanan gruplarda PAL ve γ -TMT mRNA seviyelerinde kontrole göre önemli oranda artış belirlenmiştir ($p < 0.05$) (Şekil 4.11 ve Şekil 4.12). Marul yapraklarına tek başına uygulanan SNP

kontrole kıyasla bu iki genin mRNA seviyesinde önemli bir değişime neden olmamıştır. Ancak tek başına tuz uygulaması ile kıyaslandığında tuz ile birlikte yapraklara uygulanan SNP hem PAL hem de γ -TMT mRNA seviyesinde artışa yol açmıştır.



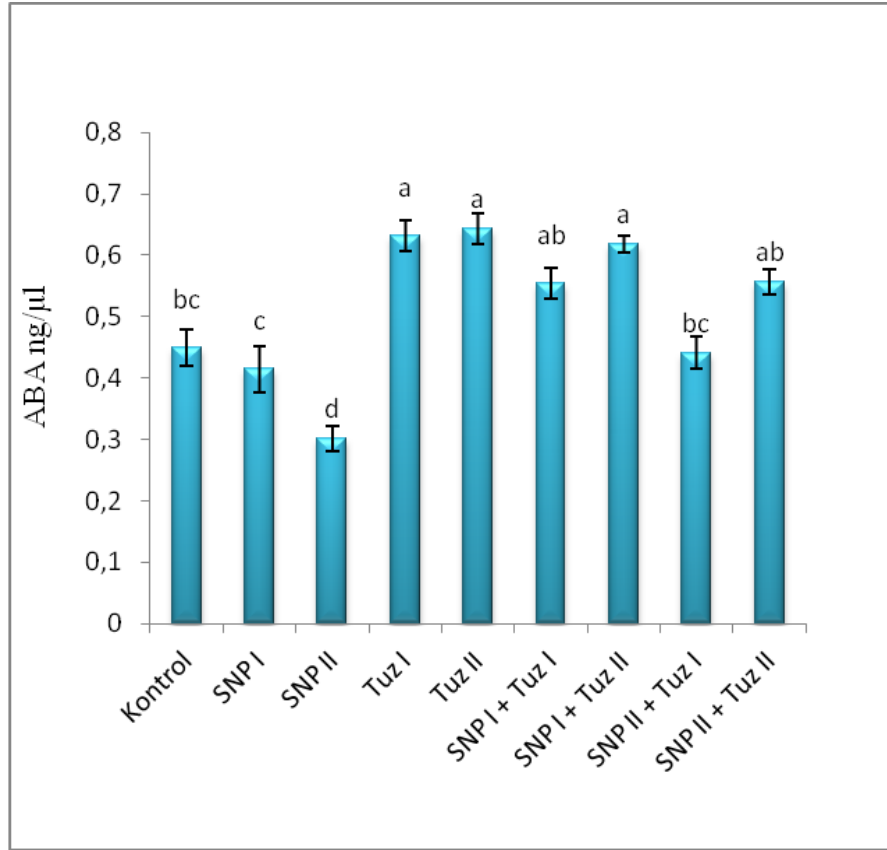
Şekil 4.11. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan SNP ve tuzun marul yapraklarına ait dokulardaki PAL mRNA seviyesi üzerine etkisi



Şekil 4.12. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan SNP ve tuzun marul yapraklarına ait dokulardaki γ -TMT mRNA seviyesi üzerine etkisi

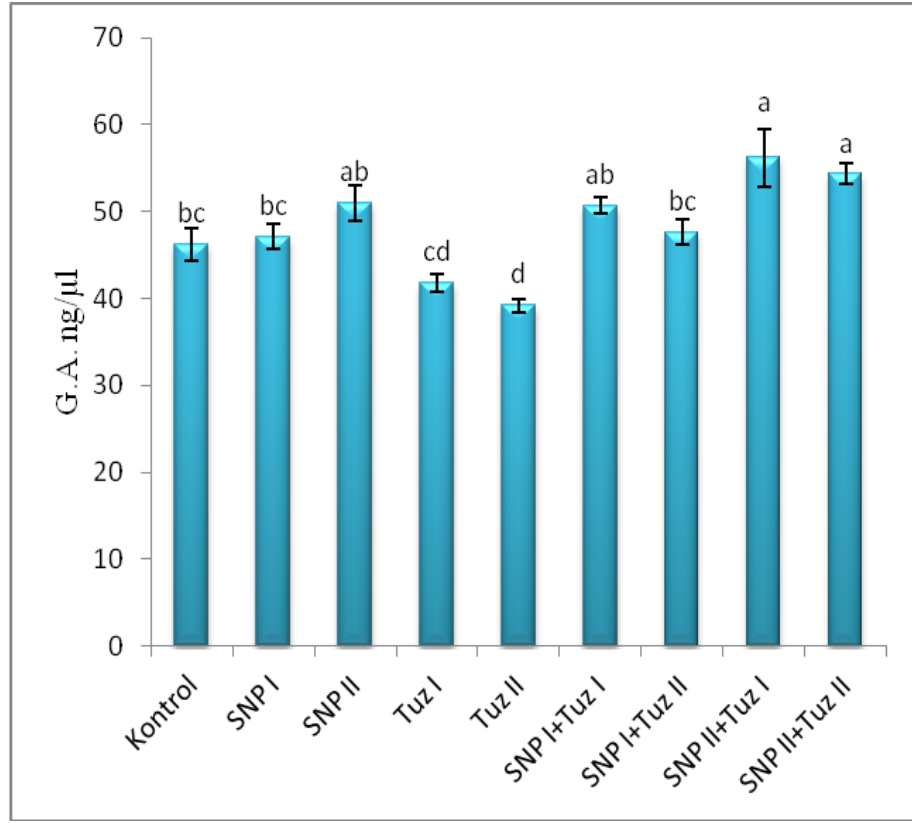
4.6. Bazı Bitkisel Hormonların Miktarı

Tuz uygulamasından 7 gün sonra hasat edilen marul yapraklarında bitki hormonlarından absisik asit, indol asetik asit, gibberellik asit ve salisilik asit miktarı ölçülmüştür. Şekil 4.13’da marul yapraklarında SNP ve tuz uygulamasına bağlı olarak ABA miktarında görülen değişim verilmiştir. 7 gün tuz stresine maruz kalan marul yapraklarında ABA konsantrasyonu kontrole göre önemli oranda artmıştır ($p < 0.05$). Öte yandan yapraklara tek başına uygulanan SNP (Özellikle 100 μ M) ABA miktarını kontrole göre önemli ölçüde düşürmüştür ($p < 0.05$). Tek başına tuz uygulaması ile karşılaştırıldığında tuz uygulaması öncesi marul yapraklarına uygulanan SNP’nin ABA konsantrasyonunu düşürdüğü belirlenmiştir (Şekil 4.13). Kontrol ile kıyaslandığında SNP+Tuz uygulanan yapraklarda ABA seviyesi daha yüksek bulunmuştur (SNP II+Tuz I hariç).



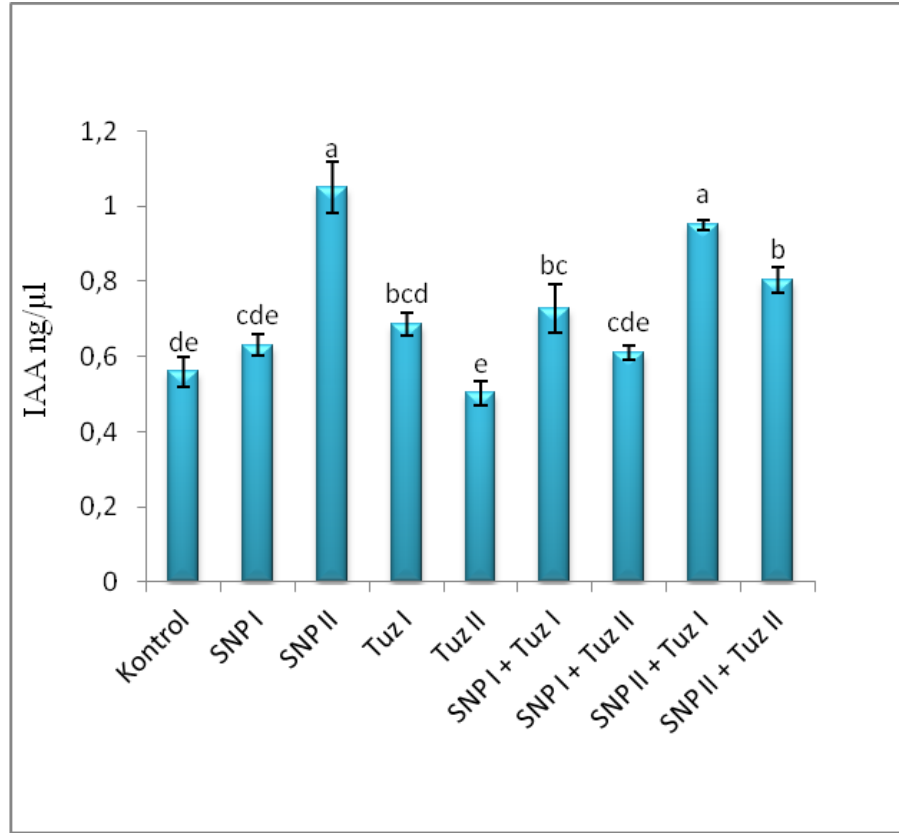
Şekil 4.13. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan SNP ve tuzun marul yapraklarındaki ABA miktarı üzerine etkisi

Marul yapraklarındaki gibberellik asit miktarı tuz uygulaması ile birlikte düşmüştür (Şekil 4.14). Kontrolde 46,20 ng/μl olarak ölçülen GA miktarı 150 mM tuz uygulaması ile 39,18 ng/μl'ye düşmüştür. Yapraklara tek başına uygulanan SNP yapraklardaki GA konsantrasyonunu artırmıştır. Yine tuz uygulaması öncesi yapraklara uygulanan SNP bu hormonun seviyesinde artışa neden olmuştur. 150 mM NaCl uygulaması ile düşen GA miktarı 100 μM SNP+150 mM tuz uygulama grubunda 54,31'e çıkmıştır.



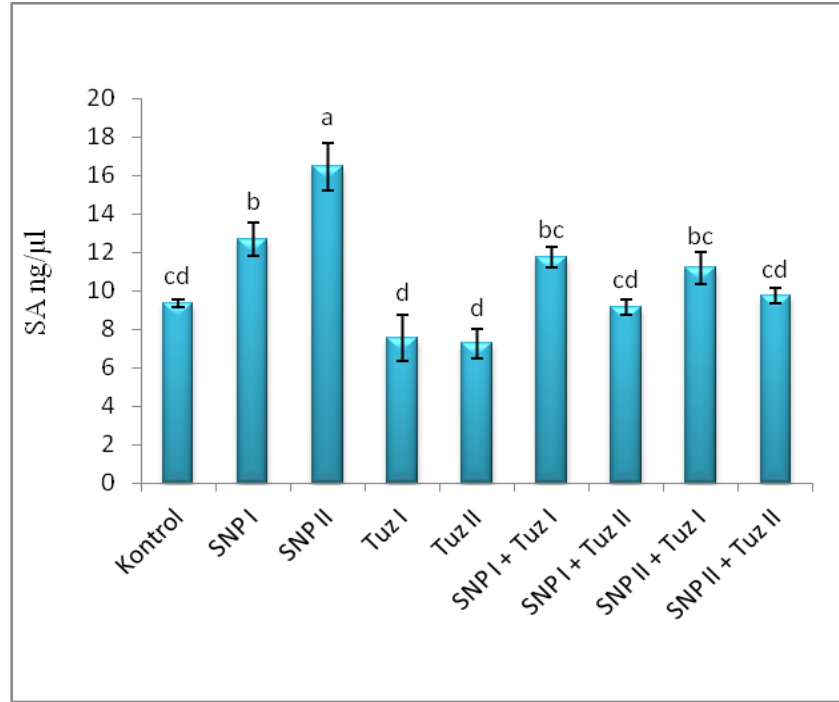
Şekil 4.14. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan SNP ve tuzun marul yapraklarındaki GA miktarı üzerine etkisi

IAA miktarı özellikle 100 μ M SNP ve 150 mM NaCl uygulamalarından etkilenmiştir. GA gibi IAA miktarı da 150 mM NaCl uygulamasına bağlı olarak önemli ölçüde azalmıştır (Şekil 4.15). Kontrol ile kıyaslandığında 100 μ M SNP uygulanan marul yapraklarındaki IAA miktarı önemli oranda artmıştır ($p < 0.05$). Tuz uygulamasından önce yapraklara uygulanan SNP, yalnız tuz uygulanan gruplara göre IAA miktarını artırmıştır.



Şekil 4.15. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan SNP ve tuzun marul yapraklarındaki IAA miktarı üzerine etkisi

Kontrol ile kıyaslandığında tuz konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak marul yapraklarındaki salisilik asit seviyesi önemli oranda azalmıştır. Yine kontrol ile kıyaslandığında yapraklara uygulanan SNP'nin SA miktarında önemli oranda artışa neden olduğu belirlenmiştir ($p < 0.05$). Yalnız tuz uygulaması ile karşılaştırıldığında SNP+Tuz uygulaması yapraklarda SA konsantrasyonunu artırmıştır (Şekil 4.16).



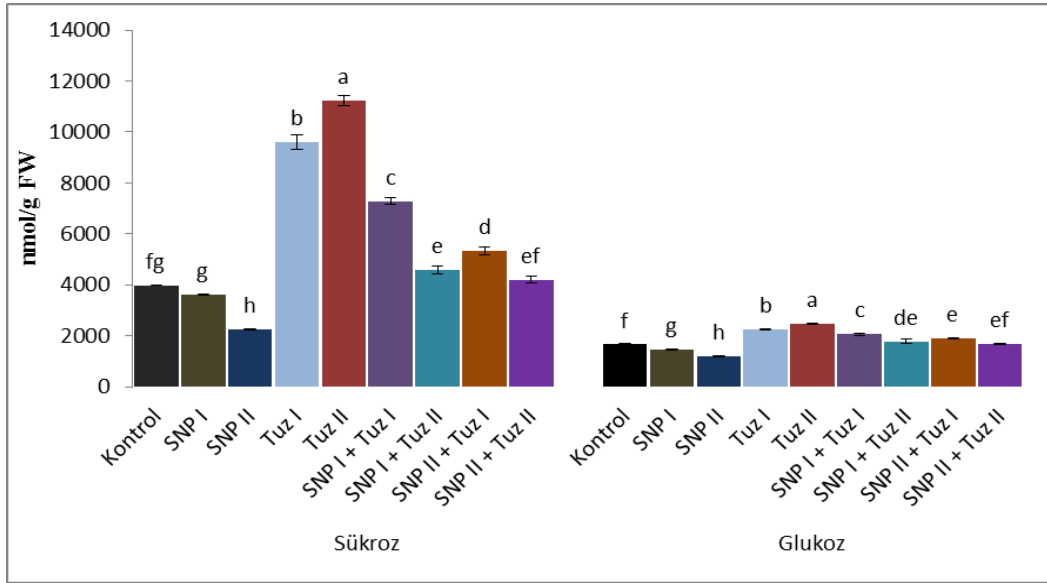
Şekil 4.16. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan SNP ve tuzun marul yapraklarındaki SA miktarı üzerine etkisi

4.7. Çözünabilir Şeker ve Organik Asit Miktarları

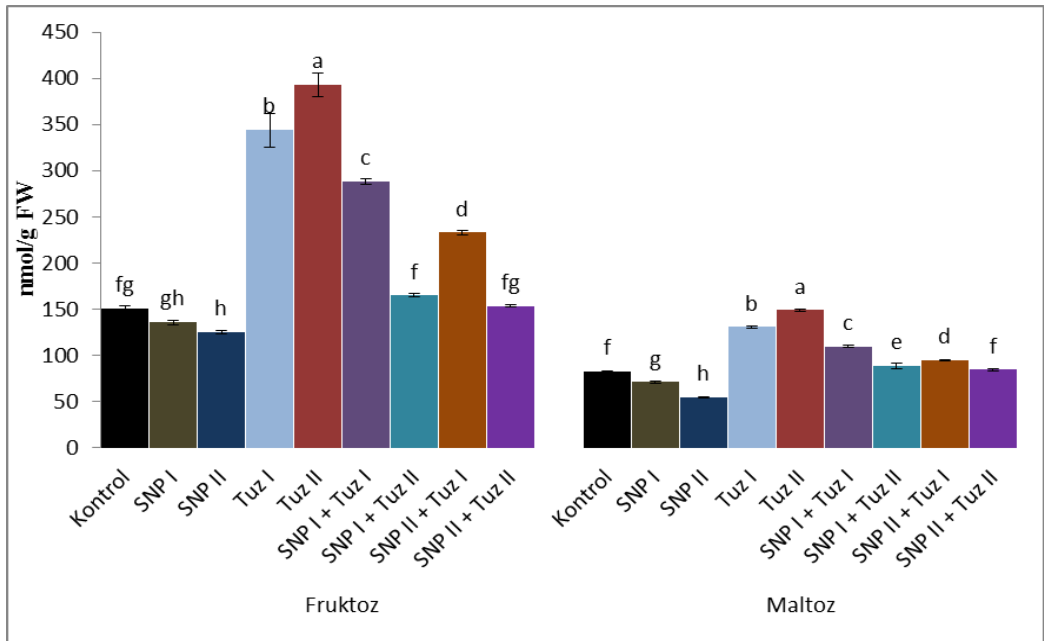
Marul fidelerine uygulanan SNP, tuz ve SNP+tuz konsantrasyonuna bağlı olarak yapraklarda ölçülen çözünabilir şeker içerikleri Şekil 4.17 ve Şekil 4.18’de verilmiştir. Kontrol ile mukayese edildiğinde yapraklara uygulanan SNP süktroz ve onun öncülleri glukoz ve fruktoz miktarında azalmaya neden olmuştur. Yine maltoz miktarıda SNP konsantrasyonuna bağlı olarak azalmıştır. Marul fidelerine uygulanan tuz çözünabilir şekerlerin konsantrasyonlarında önemli oranda artışa neden olmuştur. Yalnız tuz uygulanan gruplar ile kıyaslandığında SNP+tuz uygulanan gruplarda çözünabilir şeker konsantrasyonları azalmıştır.

Laktik asit, süksinik asit, malonik asit, bütirik asit ve sitrik asit marul yapraklarında yüksek konsantrasyonda bulunan önemli organik asitlerdir (Şekil 4.19 ve Şekil 4.20). Bu organik asitlerin konsantrasyonları SNP, NaCl ve SNP+NaCl uygulamalarında kontrole kıyasla artmıştır. Ancak bu artış SNP ya da tuzun konsantrasyon artışına bağlı

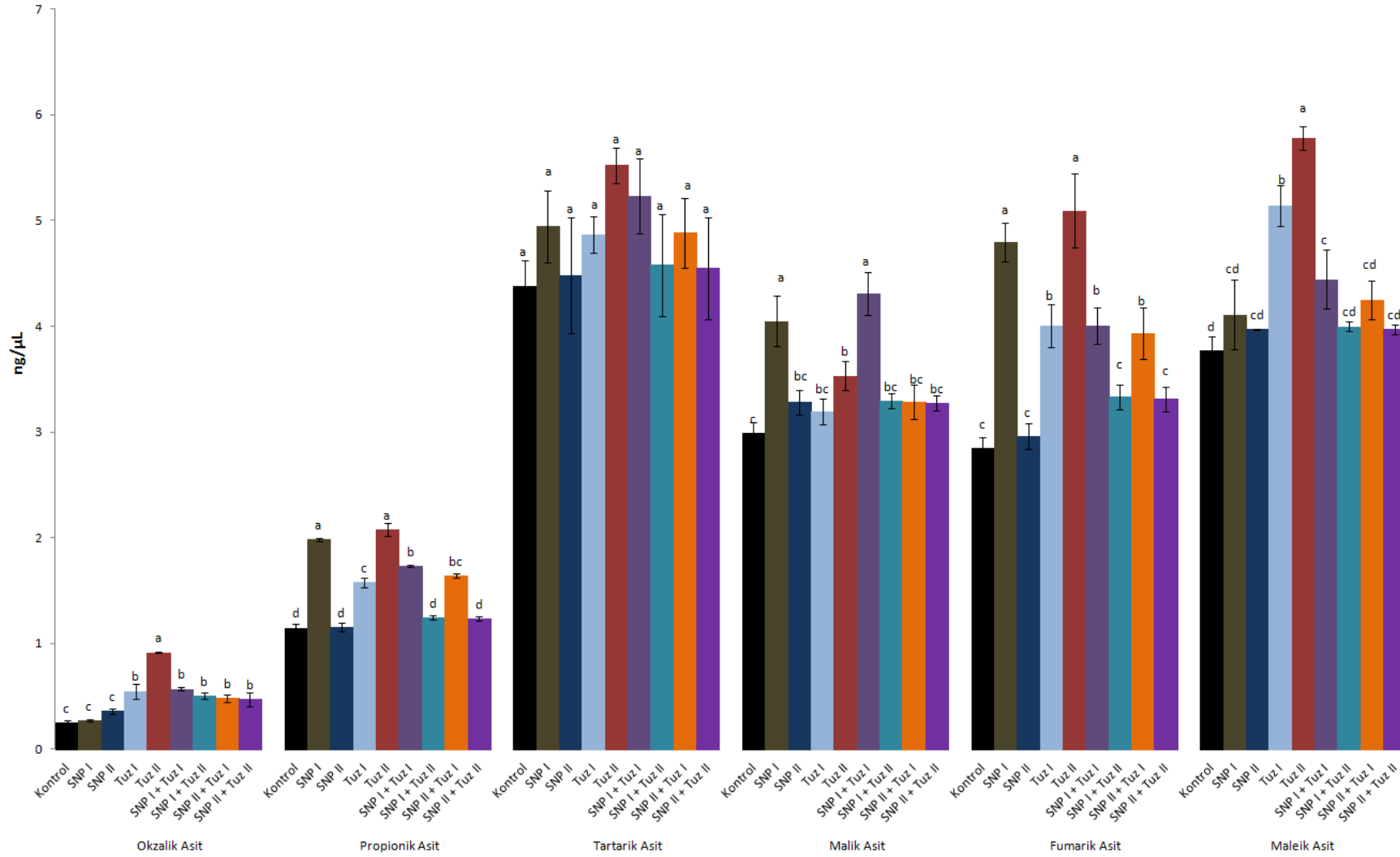
değildir. Kontrole kıyasla diğer organik asitlerin de konsantrasyonlarında uygulanan SNP veya tuza bağlı olarak artış kaydedilmiştir. Ancak bu organik asitlerin konsantrasyonundaki artış da doza bağlı değildir.



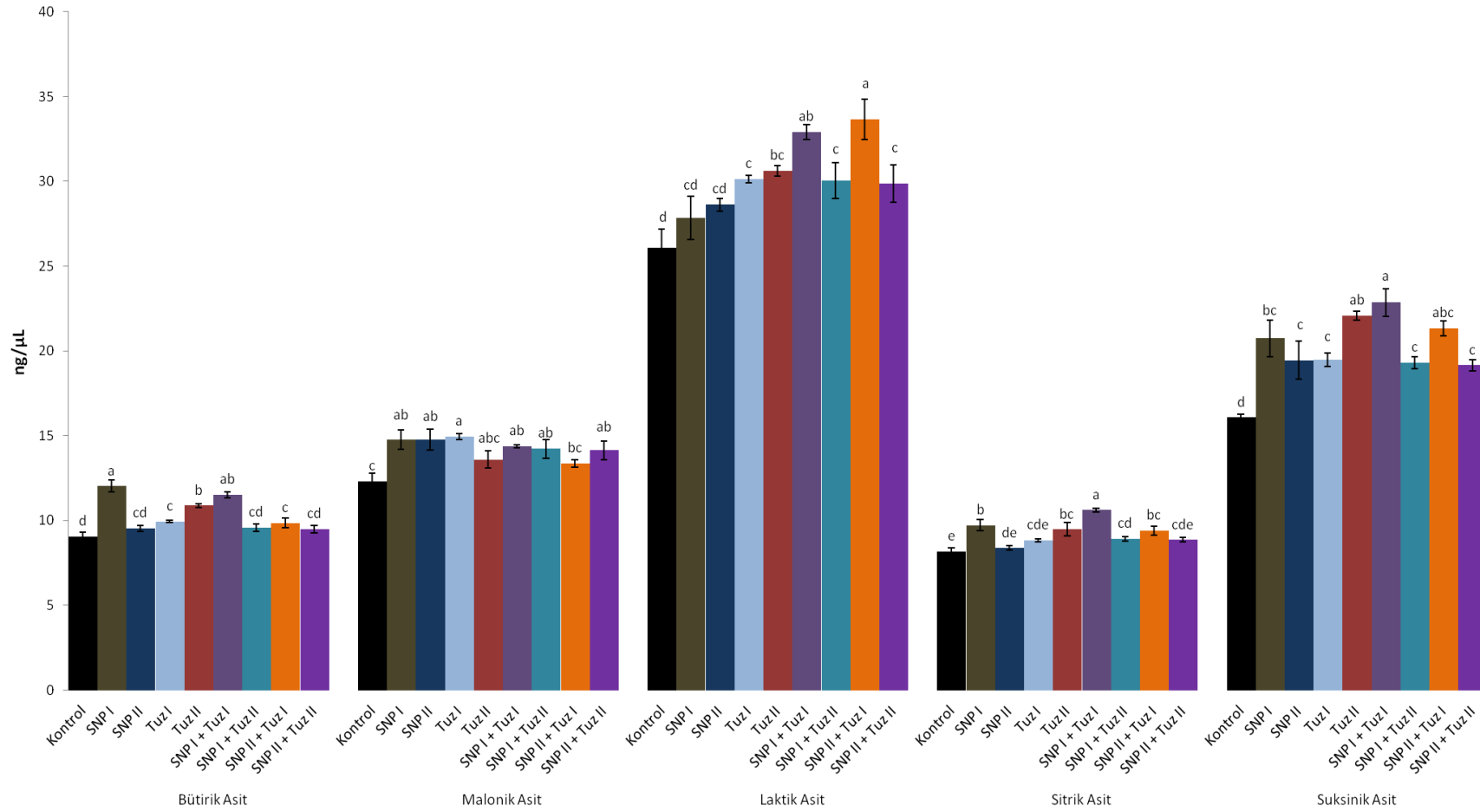
Şekil 4.17. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan SNP ve tuzun marul yapraklarındaki sükröz ve glukoz miktarı üzerine etkisi



Şekil 4.18. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan SNP ve tuzun marul yapraklarındaki fruktoz ve maltoz miktarı üzerine etkisi



Şekil 4.19. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan SNP tuzun marul yapraklarındaki organik asit miktarı üzerine etkisi



Şekil 4.20. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan SNP ve tuzun marul yapraklarındaki organik asit miktarı üzerine etkisi

4.8. Amino Asit Miktarları

Marul yapraklarında en fazla bulunan amino asitler serin, asparagin, arginin, glutamin, alanin, treonin olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.3). Kontrol ile kıyaslandığında bu amino asitlerin konsantrasyonları yalnız SNP uygulaması ile düşmüş, yalnız tuz ve SNP+tuz uygulamaları ile yükselmiştir. Diğer amino asitler uygulamalardan farklı derecelerde etkilenmiştir. Ancak amino asitlerin miktarındaki artış ya da azalış uygulanan SNP veya tuz konsantrasyonu ile paralellik göstermemiştir.

Çizelge 4.2. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan SNP ve tuzun marul yapraklarındaki çözünebilir amino asit miktarı üzerine etkisi

pmol/μl	Kontrol	SNP I	SNP II	TUZ I	TUZ II	SNP I+ TUZ I	SNP I+ TUZ II	SNP II+ TUZ I	SNP II+ TUZII
Prolin	107,23± 0,39 ^f	108,94± 1,63 ^f	105,01± 0,43 ^f	292,66± 9,41 ^b	347,22± 2,73 ^a	226,24± 5,94 ^c	209,08± 2,66 ^d	197,72± 2,56 ^{de}	190,95± 4,36 ^e
Alanin	6550,70± 294,87 ^{de}	5296,70± 164,86 ^e	5347,43± 279,85 ^e	8474,46± 123,83 ^b	6999,46± 381,95 ^{cd}	8167,65± 610,71 ^{bc}	9917,98± 529,14 ^a	6209,47± 498,21 ^{de}	10033,63± 618,87 ^a
Arginin	7953,92± 461,41 ^{cd}	6485,00± 190,94 ^e	6505,65± 195,54 ^e	9589,64± 224,50 ^b	8419,12± 137,68 ^{bc}	9226,08± 726,55 ^{bc}	12094,04± 271,64 ^a	6668,23± 298,92 ^{de}	12091,75± 873,01 ^a
Asparagin	9348,58± 511,36 ^{de}	8070,32± 472,41 ^{ef}	7001,05± 105,10 ^f	9895,09± 139,31 ^d	15099,62± 191,11 ^c	10493,35± 461,44 ^d	19577,00± 1143,52 ^a	16788,15± 475,82 ^b	14346,93± 145,47 ^c
Aspartat	4199,4± 163,70 ^{de}	3417,28± 36,49 ^{ef}	3073,61± 65,21 ^f	4757,51± 52,76 ^d	6954,86± 355,98 ^c	4388,97± 145,79 ^{de}	10960,65± 716,06 ^a	3529,63± 92,94 ^{ef}	8393,18± 542,94 ^{cd}
Fenilalanin	3340,03± 97,02 ^{cd}	2391,83± 81,09 ^e	3274,49± 153,81 ^d	3181,96± 72,20 ^d	3771,59± 86,79 ^b	3649,23± 123,09 ^{bc}	4370,02± 174,87 ^a	3169,38± 130,15 ^d	2963,75± 93,83 ^d
Glisin	2689,21± 131,65 ^d	1906,47± 44,01 ^d	2161,91± 70,05 ^d	2166,83± 27,76 ^d	2857,72± 132,87 ^c	2782,43± 119,70 ^c	4171,11± 176,73 ^b	2248,29± 94,40 ^d	4644,42± 86,64 ^a
Glutamat	4852,53± 307,13 ^a	3435,98± 199,34 ^f	3244,96± 209,53 ^f	5704,02± 173,49 ^{cd}	9143,32± 634,17 ^b	5888,51± 263,05 ^{cd}	12627,8± 802,97 ^a	4340,68± 193,02 ^{ef}	6596,26± 261,64 ^c
Glutamin	7429,18± 61,85 ^{cd}	6657,02± 91,73 ^d	7743,83± 66,61 ^{cd}	8700,39± 153,73 ^c	11120,34± 99,96 ^{bc}	8131,36± 413,89 ^{cd}	15805,04± 295,35 ^a	8078,89± 407,70 ^{cd}	16891,75± 1320,93 ^a
Hidroksiprolin	3217,40± 76,20 ^c	1600,85± 3,05 ^d	2001,05± 72,54 ^d	5535,09± 53,01 ^a	5157,84± 427,11 ^a	3641,98± 84,67 ^{bc}	5316,35± 59,93 ^a	3763,17± 93,27 ^b	1861,39± 55,10 ^d
Histidin	2365,11± 110,34 ^b	2305,67± 42,37 ^b	2170,30± 96,23 ^b	2694,63± 161,18 ^b	4143,96± 360,37 ^a	2686,20± 164,00 ^b	4352,06± 358,16 ^a	2053,89± 74,75 ^b	4548,74± 209,10 ^a

Çizelge 4.3. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan SNP ve tuzun marul yapraklarındaki çözünebilir amino asit miktarı üzerine etkisi

pmol/μl	Kontrol	SNP I	SNP II	TUZ I	TUZ II	SNP I+ TUZ I	SNP I+ TUZ II	SNP II+ TUZ I	SNP II+ TUZII
İzolösin	2114,44± 74,51 ^{bcd}	1814,19± 81,49 ^{ef}	1783,19± 58,78 ^{fg}	2065,83± 27,81 ^{cd}	2276,79± 92,93 ^b	2255,29± 71,62 ^{bc}	2614,65± 36,92 ^a	1992,42± 26,94 ^{de}	1561,46± 56,65 ^g
Lizin	3350,13± 192,43 ^c	2369,70± 78,01 ^d	2753,12± 126,84 ^d	3705,25± 101,97 ^{bc}	4071,59± 94,02 ^b	3358,43± 217,05 ^c	4655,81± 180,07 ^a	3467,32± 69,09 ^c	2483,36± 94,86 ^d
Lösin	3149,33± 113,52 ^{cd}	2058,87± 65,76 ^g	2624,20± 96,43 ^{ef}	3550,07± 60,32 ^{bc}	3907,86± 96,63 ^b	3898,24± 61,03 ^b	4507,18± 317,15 ^a	2981,58± 308,12 ^{de}	2414,03± 75,97 ^{fg}
Metionin	1540,41± 52,96 ^{bc}	1310,54± 18,08 ^c	1553,61± 45,23 ^{bc}	1887,90± 59,61 ^b	2578,89± 244,52 ^a	1784,05± 192,54 ^b	2278,11± 173,12 ^a	1351,13± 37,71 ^c	1522,05± 83,54 ^{bc}
Sarkozin	5508,35± 156,29 ^{cde}	4793,76± 218,18 ^f	5198,62± 83,88 ^{def}	5892,97± 35,52 ^c	6355,42± 113,10 ^b	5594,07± 84,66 ^{cd}	7246,13± 203,33 ^a	5114,40± 118,60 ^{ef}	4985,40± 77,09 ^f
Serin	17846,79± 493,41 ^d	16199,87± 443,60 ^d	12523,13± 361,94 ^e	20742,06± 90,98 ^c	30578,93± 716,09 ^a	18706,9± 1023,51 ^{cd}	32903,35± 1436,92 ^a	15904,92± 81,11 ^d	27848,27± 1785,60 ^b
Sistin	2209,24± 114,13 ^c	1254,23± 64,83 ^e	1359,93± 26,07 ^e	2259,74± 155,03 ^c	2244,80± 61,33 ^c	2790,05± 153,44 ^b	3266,14± 112,18 ^a	1820,15± 224,41 ^d	1386,24± 147,19 ^e
Tionin	6258,90± 208,1 ^d	5126,94± 444,73 ^e	6261,89± 450,84 ^d	6814,21± 159,01 ^{cd}	7231,16± 119,10 ^{cd}	6962,43± 230,46 ^{cd}	9986,39± 494,73 ^b	7485,87± 54,20 ^c	12382,28± 225,79 ^a
Tirozin	1351,43± 41,15 ^c	890,35± 45,45 ^f	1066,96± 40,30 ^e	1180,08± 9,91 ^{de}	1251,26± 3,21 ^{cd}	1385,07± 46,67 ^c	1853,76± 68,97 ^b	1102,80± 19,87 ^{de}	2036,04± 112,92 ^a
Triptofan	1805,62± 88,48 ^c	1034,38± 20,20 ^f	1241,44± 25,90 ^e	2070,72± 6,51 ^b	2214,09± 58,44 ^b	1431,99± 48,94 ^d	2508,81± 99,77 ^a	1165,12± 24,24 ^{ef}	1311,85± 56,01 ^{de}
Valin	707,58± 26,55 ^c	526,92± 15,67 ^f	612,94± 37,13 ^{de}	670,27± 19,34 ^{cd}	835,79± 18,86 ^b	807,01± 46,14 ^b	942,43± 26,43 ^a	571,72± 24,31 ^{ef}	620,09± 11,81 ^{de}

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Tuzluluk bitkilerde ürün verimliliğini etkileyen en önemli abiyotik streslerden biridir. Diğer abiyotik faktörlerin aksine, tuzluluk stresi ozmotik stres, belirli iyon etkisi, besin eksikliğini de içeren karmaşık bir olgudur. Tuzluluk stresi bitki büyüme ve gelişimi ile ilgili çeşitli fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler mekanizmaları etkilemektedir. Bitkiler tuzluluk stresinin zararlı etkileri ile başa çıkmak için çeşitli savunma mekanizmaları geliştirmişlerdir.

Çeşitli fizyolojik fonksiyonları ile bir sinyal molekül olarak hareket eden nitrik oksit biyoaktif lipofilik serbest radikaldır. Nitrik oksitin çimlenmeden başlayıp, çiçeklenme sonu, meyve olgunlaşması ve organ senesensine kadar geçen vejetasyon süresi boyunca bitki gelişimi ve büyümesinde rol aldığı bilinmektedir (Floryszak-Wieczorek *et al.* 2006). Hem biyotik hem de abiyotik çevresel stres koşulları altında bitkinin çeşitli organlarındaki nitrik oksit seviyesinin yükseldiği tespit edilmiştir (Wilson *et al.* 2008; Palavan-Unsal and Arisan 2009). Yine son yıllarda yapılan çok sayıda araştırmada bir nitrik oksit donörü olan SNP'nin bitkilerde çevresel stresin neden olduğu hasarın iyileştirilmesinde rol aldığı rapor edilmiştir (Siddiqui *et al.* 2011). Bu tezde tuz stresinin marul fidelerinde oluşturduğu fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler değişimler ve tuz stresine toleransta eksojen SNP'nin rolü araştırılmıştır. Tuz stresi altında marul fidelerinin büyümesinin yavaşladığı, yapraklara uygulanan SNP'nin bu yavaşlamayı azalttığı belirlenmiştir.

Diğer abiyotik stresler gibi tuz stresi de ROT üretimini artırarak oksidatif strese neden olmaktadır. ROT, membranlarda tuzun neden olduğu hasarın bir göstergesi olarak MDA birikimini artırmaktadır. Reaktif oksijen türevlerinin neden olduğu membran lipidlerindeki peroksidasyonun hücresel seviyede stresin neden olduğu hasarı yansıttığı iyi bilinmektedir. Bu yüzden stresin neden olduğu hasarın değerlendirilmesinin bir kriteri olarak MDA konsantrasyonunun ölçümü yaygın bir biçimde kullanılmaktadır. Düşük miktarda bitkilere uygulanan SNP'nin koruyucu rolü, ROT'un eliminasyonu üzerine etkisi ile ilişkili olabileceğinden mevcut araştırmamızda H₂O₂ ve MDA ölçümü

yapılmıştır. Elde edilen bulgulara göre tuz stresi altındaki marul yapraklarında H_2O_2 ve MDA miktarı kontrole göre artmıştır. Öte yandan yapraklara uygulanan SNP hem H_2O_2 hem de MDA konsantrasyonunu düşürmüştür. Yine yapraklara tuz uygulamasından 48 saat önce uygulanan SNP'nin yalnız tuz uygulanan fide yapraklarına göre H_2O_2 ve MDA içeriğini azalttığı belirlenmiştir. Tuz stresi altındaki fidelerde SNP'nin radikal süpürmede önemli bir rol oynadığı ve ROT tarafından oluşturulan lipid peroksidasyonun birikimini önlediği söylenebilir. Nitrik oksit süperoksit radikalini direkt olarak detoksifiye edebilir veya bir sinyal molekül olarak hücrel antioksidan sistemi aktive edebilir. Bitki fidelerinde ve tohumlarda koruyucu antioksidan olarak nitrik oksitin rolü pamuk fidelerinde tespit edilmiştir (Liu *et al.* 2014). Benzer şekilde eksojen nitrik oksitin oksidatif stres üzerine etkisi tuz stresi altındaki salatalık ve hardal fidelerinde de gösterilmiştir (Wang *et al.* 2007; Zeng *et al.* 2011; Shi *et al.* 2012; Dong *et al.* 2014).

Hücrel hasarı önlemek ve reaktif oksijen türevlerini detoksifiye etmek için, antioksidan enzimler ve antioksidan bileşiklerden oluşan antioksidan savunma sistemi arasında bir denge kurulması gerekir. Kontrol grubu ile kıyaslandığında hem tuz uygulanan yapraklarda hem de tuz ile birlikte SNP uygulanan yapraklarda antioksidan enzim (APX, SOD, CAT ve POD) aktiviteleri artmıştır. Yalnız tuz uygulanan yapraklara göre, SNP ile birlikte tuz uygulanan yapraklarda bu enzimlerin aktiviteleri daha fazla artış göstermiştir. Oksidatif hasarın etkilerinin azaltılmasında SOD ve diğer antioksidan enzimlerin birlikte hareketi önemlidir. SOD oksidatif stres altında artan süper oksit radikalının H_2O_2 ve O_2 'ye dönüşümünü katalizler. Bitkilerde H_2O_2 'yi süpüren enzimler ise APX, CAT ve POD'dir. Çalışmamızda elde edilen bulgulara göre marul yapraklarına uygulanan tuz, H_2O_2 oluşumunu arttırmıştır. Yapraklara tuz ile birlikte verilen SNP, H_2O_2 konsantrasyonunu düşürmüştür. SNP marul yapraklarında APX, CAT ve POD aktivitelerinde artışa neden olarak H_2O_2 miktarını azaltmıştır. Mısır yapraklarına uygulanan nitrik oksitin APX, CAT aktivitesini arttırdığı Zhang *et al.* (2007) tarafından rapor edilmiştir. Tanou *et al.* (2009) limon yapraklarına uygulanan SNP ve SNP+NaCl nin yapraklardaki APX, CAT, POD ve GR aktivitesini arttırdığını belirtmişlerdir. Dong *et al.* (2013) tuz stresinin pamuk fidelerinde SOD aktivitesini

önemli miktarda artırdığını, tuz uygulamadan önce yapraklara uygulanan SNP'nin bu enzimin aktivitesini daha da fazla artırdığını belirlemiştir. Zeng *et al.* (2011) tuz stresinin hardal yapraklarında SOD, POD ve APX aktivitesini artırdığını, bitkiye dışarıdan uygulanan SNP'nin tuz ile birlikte bu enzimlerin aktivitelerini daha fazla artırdığını rapor etmişlerdir. Arpa fidelerine tek başına uygulanan 50 μ M SNP ve 50 mM NaCl'nin yapraklarındaki SOD, APX ve CAT aktivitesi kontrole göre önemli oranda artırdığı, 50 mM NaCl+50 μ M SNP nin bu enzimlerin aktivitelerini daha da yükselttiği Li *et al.* (2008) tarafından bildirilmiştir.

Fenolik bileşikler özellikle singlet oksijeni temizlemek için potansiyel antioksidan metabolit gibi hareket ederek bitki korumasında önemli rol oynarlar. Bitkilerdeki fenolik bileşiklerin miktarı bitki türünün tuzluluğa hassasiyetine bağlı olarak önemli ölçüde değişmektedir. Bizim bulgularımıza göre de marul yapraklarına tek başına uygulanan SNP toplam fenolik madde konsantrasyonu ve toplam antioksidan kapasiteyi artırmıştır. Genç marul fideleri fenolik bileşikler ve antioksidanlar bakımından zengindir (Oh *et al.* 2009). Ancak toplam fenolik bileşikler ve antioksidan kapasite hasat zamanında oldukça hızlı bir biçimde düşmektedir. Çeşitli biyotik ve abiyotik stres koşulları altında genç fidelede antioksidanların ve sekonder metabolitlerin birikimi bitkinin zorlu koşullara adaptasyonuna yardım eder. Öte yandan fenolik bileşikler ve antosiyaninler gibi bazı sekonder metabolitler bitki dokularındaki antioksidan kapasiteyi oldukça etkilemektedirler. Marul yaprakları tuz stresine maruz kaldıklarında toplam fenolik madde konsantrasyonu ve buna paralel olarak da antioksidan kapasite artmıştır. Yine yapraklara tuz uygulamasından 48 saat önce uygulanan SNP toplam fenolik madde ve antioksidan kapasiteyi daha fazla artırmıştır. Soğuk, yüksek ışık, sıcak şoku gibi çeşitli stres faktörleri altında marul yapraklarında fenolik madde miktarı ve antioksidan kapasite artışı rapor edilmiştir (Oh *et al.* 2010, 2011). Tuz stresi altında farklı bitkilerde toplam fenolik madde ve antioksidan kapasitede artış olduğu da belirtilmiştir (Akram *et al.* 2010; Neocleous *et al.* 2013).

Çeşitli abiyotik stres koşullarında bitkiler bir savunma mekanizması olarak fenolik bileşiklerin birikimini ve antioksidan kapasitelerini artırır. Yine çeşitli abiyotik stres

faktörleri fenilpropanoidlerin sentez yolunda yer alan ve bitkilerde fenolik maddelerin birikimine yol açan PAL ve antioksidanların biyosentezinde yer alan γ -TMT genlerini aktive etmektedir. Bizim çalışmamızda olduğu gibi, benzer biçimde çok sayıda ki çalışmada da stres koşullarına maruz kalan bitkilerde katalaz ve süperoksit dismutaz gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerinin arttığı belirlenmiştir. Yine elde ettiğimiz bulgulara benzer biçimde (Şekil 4.11 ve Şekil 4.12) birçok çalışmada kuraklık, UV, tuz, düşük sıcaklık gibi stres faktörleri ile ilişkili olarak fenilpropanoidlerin de içinde bulunduğu antioksidanların birikimine neden olan metabolik yolların ve sekonder metabolitlerin aktivasyonu ile ilgili genlerin (PAL ve γ -TMT) ifadelerinde artış olduğu rapor edilmiştir (Oh *et al.* 2009, 2010).

Yapılan kantitatif PCR analiz sonuçlarına göre marul yapraklarındaki PAL ve γ -TMT genlerinin ifadesi, kontrol ile kıyaslandığında tuz ve SNP+tuz gruplarında önemli oranda artmıştır. Tuz ve tuz ile birlikte yapraklara uygulanan SNP fitokimyasalların biyosentezinde yer alan anahtar genleri aktive etmiştir. Oh *et al.* (2009, 2010, 2011), soğuk, sıcak, kuraklık gibi abiyotik stres faktörlerinin marulda antioksidan kapasite, fenolik bileşiklerin miktarı, PAL ve γ -TMT genlerinin ifadesini artırdığını rapor etmiştir. Yusuf *et al.* (2010) 100-200 mM tuz stresi altında *Brassica juncea* bitkisinde γ -TMT gen ifadesinin arttığını bildirmiştir. Çalışmamızdan elde edilen sonuçlara göre marulda tuz stresine karşı artırılan antioksidanların ve fitokimyasalların birikimi hem genetik hem de biyosentetik yolların fizyolojik ve biyokimyasal olarak kontrol altında olduğu söylenebilir.

Abiyotik stres faktörleri bitki büyüme hormonlarının miktarında değişime ve bitki büyümesinde yavaşlamaya neden olmaktadır (Morgan 1990). Bitki hormonları, bitkilerde stres kontrol mekanizmasının tamamlayıcı bir parçasını oluşturmaktadır (Zeevaart and Creelman 1988; Parthier 1991). Bitki büyüme hormonları bitkilerin strese cevaplarının düzenlenmesinde kritik rol oynamaktadır. Özellikle absisik asit (ABA) ve jasmonik asit (JA) tuz stresi altında bitkinin strese cevabını artırmak ya da baskılamak yoluyla stresin düzenleyicisi olarak hareket edebilirler. Tuz stresine cevap olarak bitkilerde salisilik asit ve indol asetik asit miktarının azaldığı buna karşın ABA ve JA

miktarının artığı iyi bilinmektedir (Wang *et al.* 2001; Kim *et al.* 2009). ABA, strese tolerans için gerekli ve yüksek tuzluluk, kuraklık gibi abiyotik streslere bitkinin cevabında yer alan bir hormondur. Çalışmamızda marul yapraklarındaki ABA miktarı tuz stresi ile birlikte artmıştır. Yapraklara uygulanan nitrik oksit ABA miktarını düşürmüştür. Tuz stresi altında ABA birikimi reaktif oksijen türevlerinin üretimini artırmış; uygulanan SNP antioksidan savunma sistemini harekete geçirerek ABA birikimini ve ROT oluşumunu inhibe etmiştir.

Gibberellinler (GA) ve indol asetik asit (IAA) bitki gelişimini, büyümesini, gövde uzamasını, çiçeklenmeyi ve yaprak gelişimini kontrol eden fitohormonlardır. Tuz stresi altında genellikle bitki büyümesi yavaşlamaktadır. Bitki büyümesindeki bu yavaşlama hormonal dengedeki bozulma ve GA ve IAA konsantrasyonundaki düşüşle ilişkilidir. Çalışmamızda tuz stresi altında GA ve IAA konsantrasyonu düşmüştür. Öte yandan tuz ile birlikte uygulanan SNP bu hormonların miktarını artırmıştır. SNP bitki büyüme ve gelişmesini düzenleyici özelliğe sahiptir ve bu yüzden bu hormonların miktarında artışa neden olmuştur. Tuz stresi altında GA ve IAA miktarında düşüş *Iris hexagona* bitkisinde Wang *et al.* (2001) ve soya fasülyesinde Hamayun *et al.* (2010) tarafından da rapor edilmiştir.

Salisilik asit (SA) birçok biyotik (virüsler, bakteriler ve mantarlar) ve abiyotik (sıcak, soğuk, kuraklık) strese karşı bitki toleransını arttırmaktadır. Salisilik asit strese tolerans mekanizmaları ile ilişkili biyokimyasal yolların aktivasyonunda düzenleyici role sahiptir (Sticher *et al.* 1997). Çalışmamızda tuz stresi altında SA miktarının azaldığı, marul yapraklarına SNP uygulamasının SA miktarını artırdığı belirlenmiştir. Bulgularımıza paralel olarak Wang *et al.* (2001) ve Hamayun *et al.* (2010) tuz stresi altında bitkilerde SA konsantrasyonunun düştüğünü belirlemişlerdir.

Çözünebilir şekerlerin osmoprotektan olarak, turgorun devamlılığını sağlayarak ve hücre membranlarını stabilize ederek bitki metabolizmasında esansiyel rol oynadığı bilinmektedir. Savunma, depolama fonksiyonları ve metabolik süreçlerde yer alan genlerin ifadesini doğrudan veya dolaylı düzenleyebilen ve ozmotik ayarlama için katkı

yapan çözünebilir şeker konsantrasyonu ve şeker metabolizması tuzluluğa maruz kalmış bitkilerde değişmektedir (Dubey 1997; Hayashi *et al.* 1997; Hebers and Sannevald 1998). Stoop and Pharr (1994), olumsuz çevre koşulları altında bazal metabolizmanın sürdürülmesi için karbon talebindeki düşüşten dolayı sükröz, glukoz ve fruktoz seviyelerinin arttığını belirtmişlerdir. Kontrol ile kıyaslandığında yapraklara uygulanan SNP çözünebilir şekerlerin (glukoz, fruktoz, sükröz ve maltoz) miktarını düşürmüştür. Öte yandan tuz stresi altında yapraklarda çözünebilir şeker konsantrasyonları kontrole göre önemli ölçüde artmıştır. Tuz uygulamasından 48 saat önce yapraklara uygulanan SNP, yalnız tuz uygulanan yapraklara göre çözünebilir şeker konsantrasyonlarını düşürmüştür. Çeşitli abiyotik stres koşulları altında çözünebilir şeker birikimi, vakuoller ve hücrenin dış ortamı ile sitozolün osmotik gücünü dengeleyerek bitki hücrelerini korumaktadır (Gadallah 1999; Zhang *et al.* 2013). Buna ilaveten çözünebilir şekerler ve diğer sitozolik osmotik maddeler, makro moleküllerin yapısını ve fonksiyonunu stabilize etmek için, enzimler gibi hücresel makro moleküllerle etkileşime girebilir. Çözünebilir şeker miktarındaki artış kısmen antioksidan enzim aktivitelerinin devamlılığını da sağlamaktadır. Sonuçlarımıza paralel olarak tuz stresi altındaki *Cassia obtusifolia* yapraklarında çözünebilir şeker konsantrasyonunun arttığı Zhang *et al.* (2013) tarafından bildirilmiştir.

Organik asitler bitki hücrelerinin temel bileşenlerinden biridir ve metabolizmada temel metabolik yollarda görev alırlar. Örneğin süksinik asit, fumarik asit, malik asit ve sitrik asit krebs döngüsü gibi hücrede enerji üreten temel metabolik yollarda yer alırlar. Yine malik asit, okzalik asit gibi bazı organik asitler ise hücrelerde detoksifikasyon proseslerinde görev alırlar. Organik asitler bitkinin farklı dokularında farklı tip stres koşullarında farklı rol oynayabilirler. Bu nedenle çalışmamızda SNP ve tuzun marul yapraklarındaki organik asitler üzerine etkisini de araştırdık. Elde edilen bulgulara göre, kontrol ile kıyasladığında tuz uygulanan marul fidelerinin yapraklarında malonik asit hariç organik asit miktarları artmıştır. Yine yapraklara tek başına uygulanan SNP organik asit miktarlarında artışa neden olurken, SNP ile birlikte uygulanan tuz organik asit miktarlarını düşürmüştür. Bu durum tuz ile SNP'nin antagonistik ilişkisinden kaynaklanabilmektedir. Tuz stresi altında marul fidelerinin yapraklarında organik asit

birikimi hücre içi iyonik dengenin de sürdürülmesinde merkezi bir adaptasyon mekanizması olabilir. Chen *et al.* (2009) tuz stresi altında yabani iğde bitkisinin yapraklarında organik asit birikiminin arttığını belirtmiştir. Tuz stresi altında organik asit birikimi bakımından halofitler ve diğer bitkiler arasında farklılıklar da kaydedilmiştir (Yang *et al.* 2007).

Bilindiği gibi proteinlerin ve enzimlerin yapısal elemanı olan amino asitler, insan ve diğer canlıların sağlığında önemli rol oynarlar. İnsan ve hayvanlar esansiyel amino asitlerin çoğunu yeterince sentezleyemediğinden bitkilerden temin etmektedirler. Bitkilerde serbest amino asitlerin üretimi ve dağılımı çevresel faktörler tarafından etkilenir. Mevcut araştırmamızda marul yapraklarındaki amino asit konsantrasyonunun tuz tarafından önemli ölçüde etkilendiği, yapraklara tek başına uygulanan tuzun yapraklardaki amino asitlerin konsantrasyonlarını artırdığı, buna karşın tuz ile birlikte uygulanan nitrik oksidin amino asit konsantrasyonlarını düşürdüğü tespit edilmiştir. Stres koşulları altında stoma açılması, tehlikeli bileşiklerin detoksifikasyonu, iyon taşınımının düzenlenmesi için amino asit birikimi artmaktadır. Sonuçlarımıza paralel olarak yüksek miktardaki ışığın hardal yapraklarında amino asit konsantrasyonunu artırdığı da saptanmıştır (Li *et al.* 2013). Hücre hasarının önlenmesi ve reaktif oksijen türevlerinin birikiminin engellenmesinde anahtar rol oynayan amino asitlerin birikimi abiyotik stres koşullarında bitkinin korunmasında önemli olduğu Gregan *et al.* (2012) ve Keller and Torres-Martinez (2004) tarafından da belirtilmiştir.

Sonuçlar:

SNP uygulaması marulda tuz stresinin sebep olduğu hasarını düşürerek bitkinin tuz stresine toleransını artırmıştır.

Tuz uygulamasıyla artan PAL ve γ -TMT genlerinin ifadesi SNP uygulamasıyla daha fazla artmıştır. SNP'in genlerin ifadesini artırmak yoluyla antioksidan moleküllerin miktarında artışa neden olduğu, böylece reaktif oksijen türevlerinin azaltılmasına katkıda bulunduğu söylenebilir.

Çalışmamızda tuz uygulamaları ile birlikte toplam fenolik madde miktarı ve buna paralel olarak antioksidan kapasite artmıştır. Yine yapraklara uygulanan SNP hem toplam fenolik madde miktarını hem de antioksidan kapasiteyi daha fazla artırarak bitkinin stres koşullarına direncini artırmıştır.

Zararlı reaktif oksijen türlerinden olan ve genelde stres şartlarında miktarı artan H_2O_2 'nin tuz etkisiyle oranı artmıştır. SNP uygulamasıyla bu reaktif oksijen türünün miktarı azalmıştır. Bu durum bitkinin tuz stresine toleransında SNP'nin koruyucu rolüne atfedilebilir.

Tüm streslerde miktarı artan ve stresin bir ölçütü olarak kullanılan lipid peroksidasyonun (LPO) tuz uygulamasıyla artması ve SNP uygulamalarında ise miktarının düşmesi SNP'nin tuz stresinin yıkıcı etkisini düşürerek bitkinin bu şartlara uyumunda etkili olduğu tezini desteklemektedir.

Tuz uygulamasıyla birlikte marul yapraklarındaki antioksidan enzim aktiviteleri azalırken SNP uygulaması ile bu enzimlerin aktiviteleri artırmıştır. Bu sonuç yapraklara dışardan uygulanan SNP'nin antioksidan enzimlerin artışını teşvik ederek oksidatif hasarın engellendiğini göstermesi açısından önemlidir.

Tuz uygulaması bitkisel hormonlardan ABA miktarını artırırken GA, SA ve IAA miktarını düşürmüştür. Yapraklara püskürtülen SNP yapraklardaki GA, SA ve IAA miktarını artırmıştır. Bir bitki büyüme düzenleyicisi olan SNP içsel hormon miktarlarının düzenlenmesine yardım ederek bitkinin olumsuz şartlarda hayatta kalmasına yardımcı olmaktadır.

Tuz uygulaması ile birlikte çözünebilir şekerlerin miktarı artmış, SNP uygulaması bu şekerlerin konsantrasyonlarını düşürmüştür. Stres koşullarında membranların stabilizasyonu ve turgorun devamlılığı için bitkiler çözünebilir şeker konsantrasyonlarını artırmaktadır. SNP hücrenin dış ortamı ile sitozolün osmotik gücünü dengeleyerek şeker miktarını düşürmektedir.

Marul fidelerine SNP, tuz ve SNP+tuz uygulaması bir çok temel metabolik yolda görev alan organik asitlerin ve amino asitlerin konsantrasyonlarında da değişime yol açmıştır.

Sonuç olarak, NO uygulaması ile marul fidelerinde tuzun olumsuz etkileri azalmış, bitki normal süreçte göstermesi gereken gelişimine paralel olarak büyümesini devam ettirmiştir.

KAYNAKLAR

- Agarwal, S. and Pandey, V., 2004. Antioxidant enzyme responses to NaCl stress in *Cassia angustifolia*. *Biologia Plantarum*, 48: 555-560.
- Akram, N.A., Ashraf, M., Arteca, R.N. and Foolad, M.R., 2010. The Physiological, Biochemical and Molecular Roles of Brassinosteroids and Salicylic Acid in Plant Processes and Salt Tolerance. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 29: 162–190.
- Aksoy, E., 2008. Kuraklık ve Tuz Streslerinin Mercimek (*Lens Culinaris* M.) Fidelerinde Antioksidant Enzimlerin Gen İfadeleri Üzerine Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Ankara.
- Ananieva, E.A., Alexieva, V.S., Popova, L.P., 2002. Treatment with salicylic acid decreases the effects of paraquat on photosynthesis. *Journal of Plant Physiology*, 159: 685-693.
- Angelini, R. and Federico, R., 1989. Histochemical evidence of polyamine oxidation and generation of hydrogen peroxide in the cell Wall. *Journal of Plant Physiology*, 135: 212-217.
- Angelini, R., Manes, F., Federico, R., 1990. Spatial and functional correlation between diamine oxidase and peroxidase and their dependence upon deetiolation and wounding in chick-pea stems. *Planta*, 182: 89-96.
- Antoine, F.R., Wei, C., Otwell, W.S., Sims, C.A., Littell, R.C., Hogle, A.D., Marshall, M.R., 2002. Gas chromatographic analysis of histamine in Mahi-mahi (*Coryphaena hippurus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 4754-4759.
- Arasimowicz, M. and Floryszak-Wieczorek, J., 2007. Nitric oxide as a bioactive signaling molecule in plant stress responses. *Plant Sci*, 172: 876-887.
- Aristory, M.C. and Toldra, F., 1991. Deproteinization techniques for HPLC amino acid analysis in fresh pork muscle and dry-cured ham. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39: 1792-1795.
- Aytamka, E., 2005. *Glycine max* L. Bitkisinde Tuz Stresi İle Nitrik Oksit Arasındaki İlişki. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul Üniversitesi, İstanbul.
- Banowitz, G.M., 1994. Immunoanalysis of Cytokinins. Cytokinins. (Editors: Mok, D. W. S., Mok, M. C.) CRC Press, 305-315 p, London, England.
- Battal, P. ve Tileklioglu, B., 2001. The Effects of Different Mineral Nutrients on the levels of Cytokinins in Maize (*Zea mays* L.) *Turkish Journal of Botany*, 25: 123-130.
- Beligni, M.V. and Lamattina, L. 1999a. Nitric oxide counteracts cytotoxic processes mediated by reactive oxygen species in plant tissues. *Planta*, 208: 337-344.
- Beligni, M.V. and Lamattina, L., 1999b. Is nitric oxide toxic or protective. *Trends Plant Science*, 4: 299-300.
- Beligni, M.V. and Lamattina, L., 2000. Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants. *Planta*, 210: 215-221.

- Beligni, M.V. and Lamattina, L., 2001. Nitric oxide in plants: the history is just beginning. *Plant Cell Environ*, 24: 267-278.
- Beligni, M.V., Fath, A., Bethke, P.C., Lamattina, L., Jones, R.L., 2002. Nitric oxide acts as an antioxidant and delays programmed cell death in barley aleurone layers. *Plant Physiology*, 129: 1642-1650.
- Besson-Bard, A., Pugin, A., Wendehenne, D., 2008. New insights into nitric oxide signaling in plants. *Annu Rev Plant Biology*, 59: 21-39.
- Bethke, P.C., Badger, M.R., Jones, R.L., 2004. Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues. *Plant Cell*, 16: 332-341.
- Bethke, P.C., Libourel, I.G.L., Jones, R.L., 2006. Nitric oxide reduces seed dormancy in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* 57: 517-526.
- Bethke, P.C., Libourel, I.G.L., Aoyama, N., Chung, Y., Still, D.W., Jones, R.L., 2007. The *Arabidopsis thaliana* aleurone layer responds to nitric oxide, gibberellin, and abscisic acid and is sufficient and necessary for seed dormancy. *Plant Physiology*, 143: 1173-1188.
- Bolwell, G.P., 1999. Role of reactive oxygen species and NO in plant defence responses. *Curr Opin Plant Biology*, 2: 287-294.
- Bremner, J.M., 1981. Total nitrogen in: *Methods of soil analysis part 2*. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, 1145-1178.
- Bright, J., Desikan, R., Hancock, J.T., Weir, I.S., Neill, S.J., 2006. ABA induced NO generation and stomatal closure in *Arabidopsis* are dependent on H₂O₂ synthesis. *Plant Journal*, 45: 113-122.
- Chamberlain, J., 1995. *The Analysis of Drugs in Biological Fluids (Second Edition)*. CRC Press, 139-145, New York, USA .
- Cheikh, N. and Jones, R., 1994. Disruption of Maize Kernel Growth and Development by Heat Stress (Role of Cytokinin/Absciscic Acid Balance). *Plant Physiology*, 106: 45-51.
- Chen, J., Xia, Q., Wang, C., Wang, W.H., Wu, F.H., Chen, J., He, B.Y., Zhu, Z., Ru, Q.M., Zhang, L.L., Zheng, H.L., 2014. Nitric oxide alleviates oxidative stress caused by salt in leaves of mangrove species, *Aegiceras corniculatum*. *Aquatic Botany*, 117: 41-47.
- Chen, W.S., 1991. Changes in cytokinins before and during early flower bud differentiation in lychee (*Litchi chinensis* Sonn). *Plant Physiology*, 96: 1203-1206.
- Chen, X., Cui, P., Sun, H., Guo, W., Yang, C., Jin, H., Fan, B., Shi, D., 2009. Comparative effects of salt and alkali stresses on organic acid accumulation and ionic balance of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.). *Industrial Crops and Products*, 30: 351-358
- Cueto, M., Hernandez-Perera, O., Martin, R., Bentura, M.L., Rodrigo, J., Lamas, S., Golvano, M.P., 1996. Presence of nitric oxide synthase activity in roots and nodules of *Lupinus albus*. *FEBS Lett*, 398: 159-164.
- Cutting, J.G.M., 1991. Determination of the cytokinin complement in healthy and witchesbroom malformed protease. *Journal of Plant Growth Regulation*, 10: 85-89.
- Davies, P.J., 1995. *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

- del Río, L.A., Corpas, F.J., Barroso, J.B., 2004. Nitric oxide and nitric oxide synthase activity in plants. *Phytochem*, 65:783–792.
- Dong, Y.J., Jinc, S.S., Liu, S., Xu, L.L., Kong, J., 2014. Effects of exogenous nitric oxide on growth of cotton seedlings under NaCl stress. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 14 (1): 1-13.
- Dong, Y.J., Liu, S., Xu, L.L., Kong, J., Bai, X.Y., 2013. Roles of exogenous nitric oxide in regulating ionic equilibrium and moderating oxidative stress in cotton seedlings during salt stress. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 13 (4): 929-941.
- Dubey, R.S., 1997. Photosynthesis in plants under stressful conditions.-In: Pessarakli, M. (ed.): *Handbook of Photosynthesis*. Pp. 859-875. Marcel Dekker, New York.
- Esim, N., 2011. Nitrik Oksitin Mısırdá (*Zea mays*) Düşük Sıcaklık Stresi Toleransı Üzerine Etkisi. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi, Erzurum.
- Fan, F.H., Du, C.X., Ding, L., 2013. Effects of nitric oxide on the germination of cucumber seeds and antioxidant enzymes under salinity stress. *Acta Physiol Plant*, 35: 2707-2719.
- Fan, H., Du, C., Xu, Y., Wu, X., 2014. Exogenous Nitric Oxide Improves Chilling Tolerance of Chinese Cabbage Seedlings by Affecting Antioksidant Enzymes in Leaves. *Horizontal Enviromental Biotechnology*, 55 (3): 159-164.
- Fan, H., Guo, S., Jiao, Y., Zhang, R., Li, J., 2007. Effects of exogenous nitric oxide on growth, active oxygen species metabolism, and photosynthetic characteristics in cucumber seedlings under NaCl stress. *Front Agri China*, 1: 308-314.
- Featonby-Smith, B.C., Van Staden, J., 1984. Identification and seasonal variation of endogenous cytokinins in *Ecklonia maxima* (Osbeck) Papenf. *Botanica Marina*, 27: 527-531.
- Floryszak-Wieczorek, J., Milczarek, G., Arasimowicz, M., Ciszewski, A., 2006. Do nitric oxide donors mimic an endogenous NO-related response in plant? *Planta* 224: 1363–1372.
- Gadallah, M.A.A., 1999. Effect of proline and glycine betaine on *Vicia faba* responses to salt stress. *Biology Plant*, 42: 247-249.
- García-Mata, C. and Lamattina, L., 2001. Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress. *Plant Physiology*, 126:1196–1204.
- García-Mata, C. and Lamattina, L., 2007. Absciscic acid (ABA) inhibits light-induced stomatal opening through calcium- and nitric oxide-mediated signaling pathways. *Nitric Oxide*, 17: 143-151.
- Gong, Y., Toivonen, P.M.A., Lau, O.L. and Wiersma, P.A., 2001. Antioxidant system level in ‘Braeburn’ apple in related to its browning disorder. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, 42: 259-264.
- Gregan, S.M., Wargent, J.J., Liu, L., Shinkle, J., Hofmann, R.W., Winefield, C., Trought, M., Jordan, B.J., 2012. Effects of solar ultraviolet radiation and canopy manipulation on the biochemical composition of Sauvignon Blanc grapes. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 18: 227-238.
- Guo, F.Q. and Crawford, N.M. 2005. Arabidopsis nitric oxide synthase1 is targeted to mitochondria and protects against oxidative damage and dark-induced senescence. *Plant Cell*, 17: 3436-3450.

- Guo, F.Q., Okamoto, M., Crawford, N.M., 2003. Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. *Science*, 302: 100-103.
- Guo, Y., Tian, Z., Yan, D., Zhang, J., Qin, P., 2009. Effects of nitric oxide on salt stress tolerance in *Kosteletzkya virginica*. *Life Science Journal*, 6: 67-75.
- Habib, N., Ashraf, M., Shahbaz, M., 2013. Effect of exogenously applied nitric oxide on some key physiological attributes of rice (*Oryza sativa* L.) plants under salt stress. *Pakistan Journal of Botany*, 45(5): 1563-1569.
- Hamayun, M., Khan, S. A., Khan, A. L., Shinwari, Z.K., Hussain, J., Sohn, E.Y., Kang, S.M., Kim, Y.H., Khan, M. A. and Lee, In-Jung., 2010. Effect of Salt Stress on Growth Attributes and Endogenous Growth Hormones of Soybean Cultivar Hwangkeumkong. *Pakistan Journal of Botany*, 42 (5): 3103-3112.
- Hansen, C.E., Venzler, H., Meins, F., 1984. Concentration gradient of trans-zeatin riboside and trans-zeatin in the maize stem. *Plant Physiology*, 75: 959-963.
- Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.K., 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., Deshnum, P., Ida, M., Murata, N., 1997. Transformation of *Arabidopsis thaliana* with the codA gene for choline oxidase: accumulation of glycine betaine and enhanced tolerance to salt and cold stress. *Plant Journal*, 12: 133-142.
- Hayat, S. Yadav, S., Wani, A.S., Irfan, M., Alyemini, M.N., Ahmad, A., 2012. Impact of sodium nitroprusside on nitrate reductase, proline content, and antioxidant system in tomato under salinity stress. *Horticulture Environment and Biotechnology*, 53: 362-367.
- He, Y.K., Tang, R.H., Yi, H., Stevens, R.D., Cook, C.W., Ahn, S.M., Jing, L., Yang, Z., Chen, L., Guo, F., Fiorani, F., Jackson, R.B., Crawford, N.M., Pei, Z.M., 2004. Nitric oxide represses the *Arabidopsis* floral transition. *Science Journal*, 305:1968–1971.
- Hebers, K. and Sonnewald, V., 1998. Altered gene expression brought about by inter and pathogen interactions. *Journal Plant Research*, 111: 323-328.
- Hernandez-Minea, F.M., 1991. Identification of cytokinins and the changes in their endogenous levels in developing *Citrus sinensis* leaves. *Journal of Horticultural Science*, 66: 505-511.
- Hess, D.T., Matsumoto, A., Kim, S.O., Marshall, H.E., Stamler, J.S., 2005. Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nature Rev Mol Cell Biol* 6: 150-166.
- Hill, A.C. and Bennett, J.H., 1970. Inhibition of apparent photosynthesis by nitrogen oxides. *Atmos Environ*, 4: 341-348.
- Horgan, C.A., 1988.Recent Developments Concerning Saint-Venant's Principle: A Second Update. *Applied Mechanics Reviews*, 49: 101-111.
- Horgan, R. and Kramers, M.R., 1979. High-performance liquid chromatography of cytokinins. *Journal of Chromatography A*, 173: 263–270.
- Hu, X., Neill, S.J., Tang, Z., Cai, W., 2005. Nitric oxide mediates gravitropic bending in soybean roots. *Plant Physiology*, 137: 663-670.
- Huang, X., von Rad, U., Durner, J., 2002. Nitric oxide induces transcriptional activation of the nitric oxide-tolerant alternative oxidase in *Arabidopsis suspension* cells. *Planta*, 215: 914-923.
- Ignarro, L.J., 2000. Nitric oxide. *Biology and Pathobiology*, Academic, San Diego.

- Jeffrey, S.R. and Snyder, S.H., 1995. Nitric oxide: a Neural Messenger. *Annu Rev Cell Dev. Biol.* 11: 417-440.
- Kara, F.B., 2013. Lokal Endemik *Thermopsis Turcica* Kıt Tan, Vural & Küçüköyük'nın Büyüme Parametreleri, Lipid Peroksidasyonu, Prolin Ve Klorofil İçerikleri Üzerine Tuz Stresinin Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Selçuk Üniversitesi, Konya.
- Karplus, P.A., Daniels, M.J., Herriot, J.R., 1991. Atomic structure of ferredoxin-NadpC reductase, prototype for a structurally novel flavoenzyme family. *Science Journal*, 251:60-66
- Kausar, F., Shahbaz M., Ashraf, M., 2013. Protective role of foliar-applied nitric oxide in *Triticum aestivum* under saline stress. *Turkish Journal of Botany*, 37. 1155-1165.
- Keller, M. and Torres-Martinez, N., 2004. Does UV radiation affect Winegrape composition. *Acta. Horticulturae*, 64: 313-319.
- Khan, M.N., Siddiqui, H.M., Mohammad, F., Naeem, M., 2012. Interactive role of nitric oxide and calcium chloride in enhancing tolerance to salt stress. *Nitric Oxide*, 27: 210-218.
- Khan, M.N., Siddiqui, M.H., Mohammad, F., Naeem, M., Khan, M.M.A., 2010. Calcium chloride and gibberellic acid protect Linseed (*Linum usitatissimum* L.) from NaCl stress by inducing antioxidative defence system and osmoprotectant accumulation. *Acta Physiol Plant*, 32:121–132.
- Kim, S.K., Sohn, E.Y., Joo, G.J., Lee, I.J., 2009. Influence of jasmonic acid on endogenous gibberellin and abscisic acid in salt-stressed chard plant. *Journal of Environmental Biology*, 30 (3): 333-338.
- Kopyra, M. and Gwóźdz, E.A., 2003. Nitric oxide stimulates seed germination and counteracts the inhibitory effect of heavy metals and salinity on root growth of *Lupinus luteus*, *Plant Physiology Biochemical*, 41: 1011–1017.
- Koshimizo, K. and Iwamura, H., 1986. Cytokinins. *Chemistry of Plant Hormones*, (Ed. N.Takahashi), CRC Press Inc., Florida. 154-199.
- Koshland, D.E., 1992. The molecule of the year, *Science*, 258:1861.
- Kovac, M., Zel, J., 1994. The effect of aliminium on the cytokinins in the mycelia of *Lactarius piperatus*. *Planta Science*, 97: 137-142.
- Kuraishi, S., Tasaki, K., Sakurai, N., Sadatoku, K., 1991. Changes in levels of cytokinins in etiolated squash seedlings after illimination. *Plant Cell Phsiol.*, 32(5): 585-591.
- Lamattina, L., Garcia-Mata, C., Graziano, M., Pagnussat, G., 2003. Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. *Annu Rev Plant Biol*, 54: 109-136.
- Leshem, Y.Y., Haramaty, E., Iluz, D., Malik, Z., Sofer, Y., Roitman, L., 1997. Effect of stress nitric oxide (NO): interaction between chlorophyll fluorescence, galactolipid fluidity and lipoxygenese activity. *Plant Physiol Biochem*, 35: 573-579.
- Leshem, Y.Y., Wills, R.B.H., Ku, V.V.V., 1998. Evidence for the function of the free radical gas-nitric oxide (NO) as an endogenous maturation and senescence regulating factor in higher plants. *Plant Physiol Biochem*, 36: 825-833.
- Li, Q.-Y., Niud, H.-B., Yind, J., Wanga, M.-B., Shaob, H.-B., Dengd, D.-Z., Chend, X.-X. Rend, J.-P., Li, Y.-C., 2008. Protective role of exogenous nitric oxide against

- oxidative-stress induced by salt stress in barley (*Hordeum vulgare*). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 65: 220-225
- Li, X., Kim, Y.B., Uddin, M.R., Lee, S., Kim, S.-J., Park, S.U., 2013. Influence of light on the free amino acid synthesis in *Brassica juncea* seedlings. *Journal of Agricultural and food chemistry*, 61: 8624-8631.
- Libourel I.G.L., Van Bodegom P.M., Fricker M.D., Ratcliffe R.G., 2006. Nitrite reduces cytoplasmic acidosis under anoxia. *Plant Physiol*, 142: 1710-1717
- Lin, Y., Liu, Z., Shi, Q., Wang, X., Wei, M., Yang, F., 2012. Exogenous nitric oxide (NO) increased antioxidant capacity of cucumber hypocotyl and radicle under salt stress *Scientia Horticulturae*, 142: 118-127.
- Liu, S., Dong, Y., Xu, L., Kong, J., 2014. Effects of foliar applications of nitric oxide and salicylic acid on salt-induced changes in photosynthesis and antioxidative metabolism of cotton seedlings. *Plant Growth Regul*, 73: 67-78.
- Liu, Y., Wu, R., Wan, Q., Xie, G., Bi, Y., 2007. Glucose-6-phosphate dehydrogenase plays a pivotal role in nitric oxide-involved defense against oxidative stress under salt stress in red kidney bean roots. *Plant Cell Physiology*, 48: 511-522.
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, 25: 402-408.
- Lloyd-Jones, D.M. and Bloch, K.D., 1996. The vascular biology of nitric oxide and its role in atherogenesis. *Annu Rev Med.*, 47: 365-375.
- López-Carrión, A.I., Castellano, R., Rosales, M.A., Ruiz, J.M., Romero, L., 2008. Role of nitric oxide under saline stress: implications on proline metabolism. *Biol. Plant*, 52: 587-591.
- Machackova, I., Sukhova, L.S., Eder, J., Bibik, N.D., Korableva, N.P., 1993. Changes in the levels of free IAA and cytokinins in potato tubers during dormancy and sprouting. *Biologia Plantarum*, 35: 387-391.
- Manai, J., Kalai, T., Gouia, H., Corpas, F. J., 2014. Exogenous nitric oxide (NO) ameliorates salinity-induced oxidative stress in tomato (*Solanum lycopersicum*) plants. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 14 (2): 433-446.
- Mano, J., 2002. Early events in environmental stresses in plants, Induction mechanisms of oxidative stress, In: Inze D, van Montagu M (eds) *Oxidative stress in plants*. London, Taylor and Francis, 217-246
- Marschner, H., 2002. *Mineral nutrition of higher plants*. 2nd edn. Academic, London.
- Money, P.A., Staden, J.V., 1984. Seasonal changes in the levels of endogenous cytokinins in *Sargassum heterophyllum* (Phaeophyceae). *Botanica Marina*, 17: 437-442.
- Morgan, P.W., 1990. Effects of abiotic stresses on plant hormone systems. *Plant Biology*, 12: 113-146.
- Morris, J.W., Doumas, P., Morris, R.O. and Zaer, J.B. 1990. Cytokinins in vegetative and reproductive buds of *Pseudotsugam*. *Plant Physiology*, 9: 67-71.
- Nakano, Y., Asada, K., 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant & Cell Physiology*, 22: 867-880.
- Neill, S., Desikan, R., Hancock, J.T., 2003. Nitric oxide signalling in plants. *New Phytol*, 159: 11-35.

- Neill, S.J., Desikan, R., Clarke, A., Hancock, J.T., 2002, Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signalling in stomatal guard cells. *Plant Physiology*, 128: 13-16.
- Neocleous, D., Koukounaras, A., Siomos A.S., Vasilakakis, M., 2013. Assessing The Salinity Effects on Mineral Composition and Nutritional Quality of Green and Red “Baby” Lettuce. *Journal of Food Quality* , 1745-4557.
- Nunoshiba, T., de Rojas-Walker, T., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.R., Demple, B., 1993, Activation by nitric oxide of an oxidative stress response that defends *Escherichia coli* against activated macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90: 9993-9997.
- Oh, M.M., Carey, E. E., Rajashekar, C. B., 2010. Regulated water deficits improve phytochemical concentration in lettuce. *Society for Horticultural Science*, 135: 223-229.
- Oh, M.M., Carey, E. E., Rajashekar, C. B., 2011. Antioxidant phytochemicals in lettuce grown in high tunnels and open field. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 52 (2): 133-139.
- Oh, M.M., Trick, H., Rajashekar, C.B., 2009. Secondary metabolism and antioxidants are involved in environmental adaptation and stress tolerance in lettuce. *Journal of Plant Physiology*, 166: 180-191.
- Orozco-Cardenas, M., Ryan, C.A., 2002. Nitric oxide negatively modulates wound signaling in tomato plants. *Plant Physiol*, 130: 487–493.
- Pagnussat, G., Simontacchi, M., Puntarulo, S., Lamattina, L. 2002. Nitric oxide is required for root organogenesis. *Plant Physiol*, 129: 954-956.
- Pagnussat, G.C., Lanteri, M.L., Lamattina, L., 2003. Nitric oxide and cyclic GMP are messengers in the indole acetic acid-induced adventitious rooting process. *Plant Physiol*, 132: 1241-1248.
- Palavan-Unsal, N. and Arisan D., 2009. Nitric Oxide Signalling In Plants. *the Botanical Review Journal*, 75 (2): 203-229.
- Palni, L.M.S., Susmons, R.E., Letham, D.S., 1983. Mass spectro analysis of cytokinins in plant tissues. *Plant Physiology*, 7: 858-863.
- Parida, A.K. and Das, A.B., 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60 (3): 324-349.
- Parthier, B., 1991. Jasmonates, new regulators of plant growth and development: Many facts and few hypotheses on their actions. *Botanica Acta*, 104 (6): 446-454
- Pedroso M.C. and Durzan D.J., 2000. Effect of different gravity environments on DNA fragmentation and cell death in *Kalanchoe* leaves. *Annals Bot*, 86: 983-994.
- Pedroso, M.C., Magalhaes, J.R., Durzan, D., 2000. Nitric oxide induces cell death in *Taxus* cells. *Plant Science*, 157: 173-180.
- Pektez, A., 2009. Domates Bitkisinde Tuz Stresi Koşullarında Total RNA Miktarının Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ege Üniversitesi, İzmir.
- Polverari, A., Molesini, B., Pezzotti, M., Buonauro, R., Marte, M., Delledonne, M., 2003. Nitric oxide-mediated transcriptional changes in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant Microbe Interact*, 16: 1094-1105.
- Qamaruddin, M., Dormling, I., Eliasson, L., 1996. Increase in cytokinin levels in scots pine in relation to chilling and bud burst. *Physiologia Plantarum*, 79: 236-241.

- Ramamurthi, A. and Lewis, R.S., 1997. Measurement and modeling of nitric oxide release rates for nitric oxide donors. *Chem Res Toxicol*, 10: 408-413.
- Rausch, T., Kirsch, M., Löw, R., Lehr, A., Vierck, R., Zhigang, A., 1996. Salt stress response of higher plants: the role of proton pumps and Na⁺/H⁺ antiporters. *Journal Plant Physiology*, 148: 425-433.
- Roberts, J.A. and Hooley, R., 1988. Plant growth regulation. Faculty Agriculture Science University Nottingham, Sutton Bonnington, Loughborough, Leics. LE12 5RD, UK.
- Robyt, J.F. and White, B.J., 1990. Biochemical techniques: theory and practice. Waveland Press, Prospect Heights, IL, 329-331.
- Romero-Puertas, M.C., Perazzolli, M., Zago, E.D., Delledonne, M., 2004. Nitric oxide signalling functions in plant-pathogen interactions. *Cellu Microbiol*, 6: 795-803.
- Ruan, H., Shen, W., Ye, M., Xu, L., 2002. Protective effects of nitric oxide on salt stress-induced oxidative damage to wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. *Chin Sci Bull*, 47: 677-681.
- Sakihama, Y., Murakami, S., Yamasaki, H. 2003. Involvement of nitric oxide in the mechanism for stomatal opening in *Vicia faba* leaves. *Biol Plant*, 46: 117-119
- Schmidt H.H.H.W. and Walter U., 1994. NO at work. *Cell Press*, 78: 919-925.
- Shaoa, H.-B., Chuc, Li-ye, Shaoa, Ming-an, Jaleeld, C. A., Mi Hong-mei, 2008. Higher plant antioxidants and redox signaling under environmental stresses. *Comptes Rendus Biologies*, 331 (6): 433-441.
- Sheokand, S., Kumari, A., Sawhney, V., 2008. Effect of nitric oxide and putrescine on antioxidative responses under NaCl stress in chickpea plants. *Physiol Mol Biol Plants*, 14: 355-362.
- Shi, Q., Ding, F., Wang, X., Wei, M., 2007. Exogenous nitric oxide protect cucumber roots against oxidative stress induced by salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45: 542-550.
- Shi, Q., Lin, Y., Liu, Z., Shi, Q., Wang, X., Wei, M., Yang, F., 2012. Exogenous nitric oxide (NO) increased antioxidant capacity of cucumber hypocotyl and radicle under salt stress. *Scientia Horticulturae*, 142: 118-127.
- Siddiqui, M.H., Al-Whaibi, M.H., Basalah, M.O., 2011, Role of nitric oxide in tolerance of plants to abiotic stress. *Protoplasma*, 248: 447-455.
- Siddiqui, M.H., Khan, M.N., Mohammad, F., Khan, M.M.A., 2008. Role of nitrogen and gibberellic acid (GA3) in the regulation of enzyme activities and in osmoprotectant accumulation in *Brassica juncea* L. under salt stress. *J Agron Crop Science*, 194: 214-224.
- Siddiqui, M.H., Mohammad, F., Khan, M.N., 2009a. Morphological and physio-biochemical characterization of *Brassica juncea* L. Czern. & Coss. genotypes under salt stress. *J. Plant Interact.* 4: 67-80.
- Siddiqui, M.H., Mohammad, F., Khan, M.N., Naeem, M., Khan, M.M.A., 2009b. Differential response of salt-sensitive and salt-tolerant *Brassica juncea* genotypes to N application: enhancement of N metabolism and anti-oxidative properties in the salt-tolerant type. *Plant Stress*, 3: 55-63.
- Soejima, H., Sugiyama, T., Ishihara, K., 1992. Changes in cytokinin activities and mass spectrometric analysis of cytokinins in root exudates of rice plant (*Oryza sativa* L.). *Plant Physiology*, 94: 1724-1729.

- Song, J., Shi, G., Xing, S., Chen, M., Wang, B., 2009. Effects of nitric oxide and nitrogen on seedling emergence, ion accumulation, and seedling growth under salinity in the euhalophyte *Suaeda salsa*. *J. Plant Nutr. Soil Science*, 172: 544-549.
- Stamler, J.S., 1994. Redox signaling: Nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell Press*, 78: 931-936.
- Sticher L., Mauch-Mani B. and Métraux J.P., 1997. Systemic acquired resistance. *Annu Rev Plant Pathol*, 35: 235-270.
- Stoop, J.M.H. and Pharr, D.M. 1994. Growth substrate and nutrient salt environment alter mannitol-hexose partitioning in celery petioles. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 119: 237-242.
- Stöhr, C. and Ullrich, W.R., 2002. Generation and possible roles of NO in plant roots and their apoplastic space. *J. Exp. Bot.*, 53: 2293-2303.
- Takahashi, S. and Yamasaki, H., 2002. Reversible inhibition of photophosphorylation in chloroplasts by nitric oxide. *FEBS Lett*, 512: 145-148.
- Tanou, G., Molassiotis, A., Diamantidis, G., 2009. Hydrogenperoxide-andnitricoxide-induced systemic antioxidantprime-likeactivity under NaCl-stressandstress-freeconditions in citrusplants. *Journal of Plant Physiology*, 166: 1904-1913.
- Taylor, J.S., Thompson, B., Pate, S.J., Atkins, C.A., Pharis, R.P., 1990. Cytokinins in the phloem sap of white lupin (*Lupinus albus* L.). *Plant Physiology*, 94: 1714-1720.
- Turnbull C.G.N. and Hanke D.E., 1985.The control of bud dormancy in potato tubers. *Planta*, 165: 359-365.
- Tuteja, N., 2007. Mechanisms of High Salinity Tolerance in Plants. *Plant Molecular, Methods Enzymol.* 428: 419-438.
- Uchida, A., Jagendorf, A.T., Hibino, T., Takabe, T., 2002. Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice. *Plant Science*, 163: 515-523.
- Velikova, V., Yordanow, I., Edreva, A., 2000. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain treated bean plants protective role of exogenous polyamines. *Plant Science*, 151: 59-66.
- Wang, X., Shi, Q., Ding, F., Wei, M., 2007. Exogenous nitric oxide protect cucumber roots against oxidative stress induced by salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45: 542-550.
- Wang, Y., Mopper, S.,Hasenstein K. H., 2001, Effects of Salinity on Endogenous Aba, Iaa, Ja, and Sa in *Iris hexagona*. *Journal of Chemical Ecology*, 27 (2): 327-342.
- Wendehenne, D., Durner, J., Klessig, D.F., 2004. Nitric oxide: a new player in plant signalling and defence responses. *Curr Opin Plant Biol*, 7: 449-455.
- Wilson, I.A., Neill, S.J. and Hancock, J.T., 2008. Nitric oxide synthesis and signalling in plants. *Plant, Cell & Environment*, 31(5): 622-631.
- Wink, D.A., Mitchell, J.B., 1998. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med.*, 25: 434-456.
- Yamasaki, H., 2000. Nitrite-dependent nitric oxide production pathway: implications for involvement of active nitrogen species in photoinhibition in vivo. *Phil Trans R Soc Lond Biol Science*, 355: 1477-1488.

- Yamasaki, H., 2005. The NO world for plants: achieving balance in an open system. *Plant Cell Environ*, 28: 78–84.
- Yamasaki, H., Shimoji, H., Ohshiro, Y., Sakihama, Y., 2001. Inhibitory effects of nitric oxide on oxidative phosphorylation in plant mitochondria. *Nitric Oxide*, 5: 261–270.
- Yang, C.W., Chong, J.N., Kim, C.M., Li, C.Y., Shi, D.C., Wang, D.L., 2007. Osmotic adjustment and ion balance traits of an alkali resistant halophyte *Kochia sieversiana* during adaptation to salt and alkali conditions. *Plant Soil*, 294: 263–276.
- Yee, Y., Tam, N.F.Y., Wong, Y.S. and Lu, C.Y., 2002. Growth and physiological responses of two mangrove species (*Bruguira gymnorhiza* and *Kandelia candel*) to waterlogging. *Environ. Exp. Bot.*, 1–13.
- Yu-qing, W., Zhu-jun, Z., Yong, H.E., 2007. Alleviation of membrane lipid peroxidation by nitric oxide in cucumber leaves under salt stress. *J Zhejiang Uni Agricultural Life Science*, 33: 533–538.
- Yusuf, M. A., Kumar, D., Rajwanshi, R., Strasser, R. J., Tsimilli, M., Govindjee, M., Sarin, N.M., 2010. Overexpression of γ -tocopherol methyl transferase gene in transgenic *Brassica juncea* plants alleviates abiotic stress: Physiological and chlorophyll a fluorescence measurements. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1797: 1428–1438.
- Zeevaart J.A.D. and Creelman, R. A., 1988. Metabolism and Physiology of Absciscic Acid. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 39: 439–473.
- Zeng, C.L., Liu, L., Wang, B.R., Wu, X.M. and Zhou, Y., 2011. Physiological effects of exogenous nitric oxide on *Brassica juncea* seedlings under NaCl stress. *Biologia Plantarum* 55 (2): 345–348.
- Zhang, C.P., Li, Y.C., Yuan, F.G., Hu, S.J., Liu, H.Y. and He P., 2013. Role of 5-aminolevulinic acid in the salinity stress response of the seeds and seedlings of the medicinal plant *Cassia obtusifolia* L. *Botanical Studies*, 54: 18–31.
- Zhang, X., Takemiya, A., Kinoshita, T., Shimazaki, K., 2007. Nitric oxide inhibits blue light-specific stomatal opening via abscisic acid signaling pathways in *Vicia* guard cells. *Plant Cell Physiology*, 48: 715–723.
- Zhang, Y., Wang, L., Liu, Y., Zhang, Q., Wei, Q., Zhang, W., 2006. Nitric oxide enhances salt tolerance in maize seedlings through increasing activities of proton-pump and Na^+/H^+ antiport in the tonoplast. *Planta*, 224: 545–555.
- Zhao, L., Zhang, F., Guo, J., Yang, Y., Li, B., Zhang, L., 2004. Nitric oxide functions as a signal in salt resistance in the calluses from two ecotypes of reed. *Plant Physiology*, 134: 849–857.
- Zheng, C., Jiang, D., Dai, T., Jing, Q., Cao, W., 2010. Effects nitroprusside, a nitric oxide donor, on carbon and nitrogen metabolism and the activity of the antioxidation system in wheat seedlings under salt stress. *Acta Ecol Sinica*, 30: 1174–1183.
- Zheng, C., Jiang, D., Liu, F., Dai, T., Liu, W., Jing, Q., Cao, W., 2009. Exogenous nitric oxide improves seed germination in wheat against mitochondrial oxidative damage induced by high salinity. *Environmental Exp. Bot.*, 67: 222–227.

Zottini, M., Formentin, E., Scattolin, M., Carimi, F., Schiavo, F.L., Terzi, M., 2002. Nitric oxide affects plant mitochondrial functionality in vivo. *FEBS Lett.*, 515: 75–78.

ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Tokat ilinde doğdu. İlköğretimi Mehmet Emin Yurdakul İ.Ö.O., (Yenimahalle/Ankara) ortaöğretimi Özel Ankara Aziziye Lisesi'nde (Yenimahalle/Ankara) tamamladı. 2004 yılında girdiği Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2009 yılında mezun oldu. 2011 yılında Devlet Su İşleri 8. Bölge Müdürlüğü'ne Biyolog olarak atandı. 2012 yılında başladığı Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimine devam etmektedir.