



**KURAKLIK STRESİNDE FENİLALANİN UYGULAMASININ REYHAN  
(*Ocimum basilicum* L.) BİTKİSİNDE FENOLİK BİLEŞİKLER, ANTİOKSİDAN  
AKTİVİTE ve STRES PARAMETRELERİNE ETKİSİ**

**MUSTAFA AVŞAR**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI  
Prof. Dr. Lokman ÖZTÜRK  
Ocak - 2018  
Her hakkı saklıdır**

**T.C.  
GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**KURAKLIK STRESİNDE FENİLALANİN UYGULAMASININ REYHAN  
(*Ocimum basilicum* L.) BİTKİSİNDE FENOLİK BİLEŞİKLER, ANTİOKSİDAN  
AKTİVİTE ve STRES PARAMETRELERİNE ETKİSİ**

**Mustafa AVŞAR**

**TOKAT  
Ocak - 2018**

Her hakkı saklıdır



**Bu tez çalışması;**

Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından 2015/134 nolu proje ile desteklenmiştir.

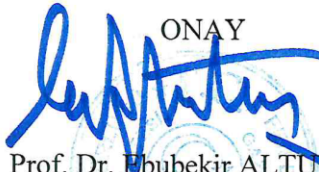
**Mustafa AVŞAR** tarafından hazırlanan “**Kuraklık Stresinde Fenilalanin Uygulamasının Reyhan (*Ocimum basilicum* L.) Bitkisinde Fenolik Bileşikler, Antioksidan Aktivite ve Stres Parametrelerine Etkisi**” adlı tez çalışmasının savunma sınavı **5 OCAK 2018** tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen Jüri tarafından Oy Birliği ile Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI** 'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman  
Prof. Dr. Lokman ÖZTÜRK  
Gaziosmanpaşa Üniversitesi  
Üye  
Doç. Dr. Sezer ŞAHİN  
Gaziosmanpaşa Üniversitesi  
Üye  
Yrd. Doç. Dr. Dursun KISA  
Bartın Üniversitesi



ONAY  
  
Prof. Dr. Ebubekir ALTUNTAŞ  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü  
09.02/2018

## **TEZ BEYANI**

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

**MUSTAFA AVŞAR**

**5 Ocak 2018**

## ÖZET

### YÜKSEK LİSANS TEZİ

#### KURAKLIK STRESİNDE FENİLALANİN UYGULAMASININ REYHAN (*Ocimum basilicum* L.) BİTKİSİNDE FENOLİK BİLEŞİKLER, ANTİOKSİDAN AKTİVİTE ve STRES PARAMETRELERİNE ETKİSİ

MUSTAFA AVŞAR

GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI: Prof. Dr. Lokman ÖZTÜRK)

Kuraklık, bitki büyüme ve gelişmesini sınırlandıran en önemli çevresel faktörlerden birisidir. Bu çalışmada, sera ortamında yetiştirilen yeşil ve mor reyhan genotiplerine %75 ve %50 kuraklık, kuraklık + 1mM ve 10 mM fenilalanin uygulaması yapılmıştır. Yeşil ve mor reyhan yapraklarında kuraklık ve fenilalanin uygulamalarının bazı fizyolojik parametreler ve antioksidan aktivite üzerine etkileri araştırılmıştır. Kuraklığa bağlı olarak yeşil ve mor reyhan genotiplerinde yaş ve kuru ağırlıkta azalma, protein içeriğinde kayıplar meydana gelmiştir. Kuraklık reyhan genotiplerinde total klorofil, klorofil a, klorofil b ve karotenoid miktarlarını önemli oranda azaltmıştır. Kuraklık uygulaması yeşil ve mor reyhan yapraklarında lipid peroksidasyon ve hidrojen peroksit içeriğini azaltmıştır. Reyhan genotiplerinde kuraklık stresi süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesini önemli oranda artırmasına rağmen peroksidaz (POD) aktivitesini azaltmıştır. Kuraklık yeşil reyhan genotiplerinde total fenolik bileşik miktarını azaltırken mor reyhan genotipinde artırmıştır. Şiddetli kuraklık yeşil reyhanda DPPH• radikal giderme aktivitesini artırırken mor reyhanda indirgeme gücü (FRAP) ve süperoksit anyon giderme aktivitesini artırmıştır. Kuraklık ve fenilalanin uygulaması toplam ve bireysel fenolik bileşik miktarlarını değiştirmesine bağlı olarak yeşil ve mor reyhan genotiplerinde antioksidan aktivite farklılık göstermiştir.

2018, 78 Sayfa

**ANAHTAR KELİMELELER:** Antioksidan aktivite, fenolik bileşikler, fotosentetik pigmentler, kuraklık, reyhan, stres parametreleri.

## **ABSTRACT**

### **MASTER THESIS**

#### **EFFECTS OF PHENYLALANINE APPLICATION ON PHENOLIC COMPOUNDS, ANTIOXIDANT ACTIVITY AND STRESS PARAMETERS IN BASIL (*Ocimum basilicum* L.) DURING DROUGHT STRESS**

**MUSTAFA AVŞAR**

**GAZIOSMANPASA UNIVERSITY  
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES**

**DEPARTMENT OF BIOLOGY**

**SUPERVISOR: Prof. Dr. Lokman ÖZTÜRK**

Drought is one of the most important environmental factors limiting plant growth and development. In this study, 75% and 50% drought, drought + 1 mM and 10 mM phenylalanine to the green and purple basil genotypes grown in the greenhouse were applied. The effects of drought and phenylalanine application on some physiological parameters and antioxidant activity in green and purple basil leaves were investigated. Depending on the drought, a decrease in wet and dry weight as well as loss of protein content in the green and purple basil genotypes has occurred. Drought stress significantly decreased total chlorophyll, chlorophyll a, chlorophyll b and carotenoid amounts in all basil genotypes. The application of drought reduced the content of lipid peroxidation and hydrogen peroxide in green and purple basil leaves. In basil genotypes, drought stress reduced peroxidase (POD) activity, although it significantly increased superoxide dismutase (SOD) activity. Drought reduced the total amount of phenolic compounds in the green basil genotypes but increased it in the purple basil genotypes. Severe drought increased DPPH<sup>•</sup> radical scavenging activity in the green basil, similarly it increased the reducing power (FRAP) and superoxide anion removal activity in the purple basil.

Antioxidant activity in the green and purple basil genotypes varied depending on the changing of total and individual phenolic compound amounts due to the applications of drought and phenylalanine.

2018, 78 Page

**KEYWORDS:** Antioxidant activity, basil, drought, phenolic compounds, photosynthetic pigment, stress parameters

## ÖNSÖZ

Yüksek lisans tez çalışmam konusunda bilgi birikimi veengin tecrübeleriyle benden yardımını esirgemeyen, bilimsel çalışmalarda ve akademik hayatıyla bana örnek olan Sayın Prof. Dr. Lokman ÖZTÜRK'e, bilgi ve tecrübesini her zaman tatlı bir dille aktaran Sayın Prof. Dr Mahfuz ELMASTAŞ'a, bitki yetiştirme ve sera kullanımında yardımlarından dolayı Sayın Doç. Dr. Sezer ŞAHİN'e, laboratuvar çalışmalarımda her türlü sorun ve problemde bıkmadan usanmadan yardımcı olan Sayın Yrd. Doç. Dr. Dursun KISA'ya, antioksidan ve fenolik analizlerde yardımcı olan Uzm. Dr. Nusret GENÇ ve Uzm. Ömer KAYIR'a, sera ve laboratuvar çalışmalarımda beni yalnız bırakmayan arkadaşlarım Saliha SOLMAZ ve Anıl GÜNGÖR'e teşekkür eder. Her koşulda yanımda olan maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

**MUSTAFA AVŞAR**

**5 Ocak 2018**

## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

### İçindekiler

|                                                    |      |
|----------------------------------------------------|------|
| ÖZET .....                                         | i    |
| ABSTRACT.....                                      | ii   |
| ÖNSÖZ .....                                        | iii  |
| İÇİNDEKİLER .....                                  | iv   |
| KISALTMALAR .....                                  | vii  |
| ŞEKİL LİSTESİ.....                                 | viii |
| ÇİZELGE LİSTESİ.....                               | x    |
| 1. GİRİŞ .....                                     | 1    |
| 2. GENEL BİLGİLER.....                             | 3    |
| 2.1 Bitkilerde Kuraklık.....                       | 4    |
| 2.1.1 Ağır Kuraklık.....                           | 5    |
| 2.1.2 Kronik Kuraklık.....                         | 5    |
| 2.1.3 Fizyolojik Kuraklık .....                    | 6    |
| 2.2 Bitkilerde Kuraklık Stresinin Etkileri: .....  | 6    |
| 2.2.1 Kuraklığın Morfolojik Etkileri: .....        | 6    |
| 2.2.2 Kuraklığın Metabolik Etkileri .....          | 7    |
| 2.2.3 Kuraklığın Fotosentez Üzerine Etkileri ..... | 7    |
| 2.2.4 Kuraklığın Oksidatif Etkileri .....          | 8    |
| 2.3 Serbest Radikaller .....                       | 9    |

|            |                                                            |           |
|------------|------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.3.1      | Reaktif Oksijen Türleri (ROT) .....                        | 10        |
| 2.3.2      | Serbest Radikallerin Etkileri.....                         | 13        |
| <b>2.4</b> | <b>Antioksidanlar .....</b>                                | <b>14</b> |
| 2.4.1      | Enzimatik Antioksidanlar .....                             | 15        |
| 2.4.2      | Enzimatik Olmayan Antioksidanlar .....                     | 16        |
| <b>2.5</b> | <b>Fenolik Bileşikler ve Sınıflandırma .....</b>           | <b>17</b> |
| 2.5.1      | Basit Fenoller.....                                        | 17        |
| 2.5.2      | Fenolik Asit ve Aldehitler .....                           | 17        |
| 2.5.3      | Asetofenonlar ve Fenillaktik Asit.....                     | 18        |
| 2.5.4      | Sinamik Asitler .....                                      | 18        |
| 2.5.5      | Kumarinler.....                                            | 19        |
| 2.5.6      | Flavonoidler.....                                          | 19        |
| <b>2.6</b> | <b>Fenolik Asitler ve Reyhan .....</b>                     | <b>19</b> |
| <b>2.7</b> | <b>Fenilalanin ve Biyosentezi .....</b>                    | <b>21</b> |
| <b>3.</b>  | <b>MATERYAL VE YÖNTEM.....</b>                             | <b>22</b> |
| <b>3.1</b> | <b>MATERYAL .....</b>                                      | <b>22</b> |
| 3.1.1      | Bitkisel Materyal .....                                    | 22        |
| 3.1.2      | Kullanılan Kimyasal Maddeler.....                          | 22        |
| 3.1.3      | Kullanılan Cihaz ve Aletler .....                          | 23        |
| <b>3.2</b> | <b>YÖNTEM.....</b>                                         | <b>23</b> |
| 3.2.1      | Tohumların Çimlendirilmesi ve Büyütülmesi .....            | 23        |
| 3.2.2      | Yaş ve Kuru Ağırlıkların Belirlenmesi.....                 | 24        |
| 3.2.3      | Stresle İlgili İncelenen Parametreler.....                 | 25        |
| 3.2.4      | Antioksidan Enzim Aktivitesi .....                         | 27        |
| 3.2.5      | Antioksidan Aktivitesi .....                               | 28        |
| 3.2.6      | Fenolik Bileşiklerin Tayini .....                          | 30        |
| 3.2.7      | İstatistiksel Analizler .....                              | 31        |
| <b>4.</b>  | <b>BULGULAR.....</b>                                       | <b>32</b> |
| <b>4.1</b> | <b>Yaş ve Kuru Madde Miktarı.....</b>                      | <b>32</b> |
| <b>4.2</b> | <b>Klorofil ve Karotenoid Sonuçları .....</b>              | <b>33</b> |
| <b>4.3</b> | <b>Protein Sonuçları.....</b>                              | <b>34</b> |
| <b>4.4</b> | <b>Prolin Sonuçları.....</b>                               | <b>35</b> |
| <b>4.5</b> | <b>Malondialdehit Sonuçları .....</b>                      | <b>37</b> |
| <b>4.6</b> | <b>Hidrojen Peroksit Miktarı Sonuçları .....</b>           | <b>38</b> |
| <b>4.7</b> | <b>Antioksidan Enzim Aktiviteleri .....</b>                | <b>39</b> |
| 4.7.1      | Süperoksit Dismutaz Aktivite Sonuçları .....               | 39        |
| 4.7.2      | Askorbat Peroksidaz Aktivite Sonuçları.....                | 40        |
| 4.7.3      | Peroksidaz Aktivite Sonuçları .....                        | 41        |
| <b>4.8</b> | <b>Antioksidan Aktivite Testleri .....</b>                 | <b>42</b> |
| 4.8.1      | Serbest Radikal Giderim Aktivitesi (DPPH') Sonuçları ..... | 42        |

|            |                                                    |           |
|------------|----------------------------------------------------|-----------|
| 4.8.2      | İndirgeme Gücü Aktivite Sonuçları.....             | 43        |
| 4.8.3      | Süperoksit Anyonu Giderim Aktivite Sonuçları ..... | 44        |
| <b>4.9</b> | <b>Fenolik Bileşiklerin Belirlenmesi.....</b>      | <b>45</b> |
| 4.9.1      | Total Fenolik Bileşik Sonuçları.....               | 45        |
| 4.9.2      | Bireysel Fenolik Bileşiklerin Sonuçları.....       | 47        |
| <b>5.</b>  | <b>TARTIŞMA VE SONUÇ.....</b>                      | <b>56</b> |
| <b>6.</b>  | <b>KAYNAKLAR .....</b>                             | <b>60</b> |
| <b>7.</b>  | <b>EKLER.....</b>                                  | <b>63</b> |
| <b>8.</b>  | <b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>                               | <b>78</b> |



## KISALTMALAR

| Kısaltmalar                   | Açıklama                                               |
|-------------------------------|--------------------------------------------------------|
| APX                           | Askorbat Peroksidaz                                    |
| BHA                           | Butillenmiş Hidroksianisol                             |
| BHT                           | Butillenmiş Hidroksitoluen                             |
| CAT                           | Katalaz                                                |
| DPPH                          | 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl                          |
| DPPH•                         | 1,1-Difenil 2-pikril hidrazil radikali                 |
| FRAP                          | Demir(III) İndirgeme Kapasitesi                        |
| GA                            | Gallik Asit                                            |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Hidrojen Peroksit                                      |
| MDA                           | Malondialdehid                                         |
| POD                           | Peroksidaz                                             |
| SOD                           | Süperoksit Dismutaz                                    |
| HPLC                          | Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi                |
| Trolox                        | 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkromal-2-karboksilik asit |
| ROT                           | Reaktif Oksijen Türleri                                |
| Phe                           | Fenilalanin                                            |

## ŞEKİL LİSTESİ

| <b><u>Şekil</u></b>                                                                                                                            | <b><u>Sayfa</u></b> |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| Şekil 2. 1. Serbest radikallerin hücresel hedefleri .....                                                                                      | 13                  |
| Şekil 2. 2. Hidroksibenzoik asit. ....                                                                                                         | 18                  |
| Şekil 2. 3. Sinamik asitler. ....                                                                                                              | 18                  |
| Şekil 2. 4. Fenilalaninin yapısı.....                                                                                                          | 21                  |
| Şekil 4. 1. Yeşil reyhanda kuraklık ve fenilalanin uygulamalarının klorofil ve karotenoid miktarı üzerine etkisi .....                         | 33                  |
| Şekil 4. 2. Mor reyhanda kuraklık ve fenilalanin uygulamalarının klorofil ve karotenoid miktarı üzerine etkisi. ....                           | 34                  |
| Şekil 4. 3. Protein standart grafiği. ....                                                                                                     | 34                  |
| Şekil 4. 4. Kuraklık ve fenilalanin uygulamalarının mor ve yeşil reyhan yapraklarında protein miktarı üzerine etkisi. ....                     | 35                  |
| Şekil 4. 5. Prolin standart grafiği. ....                                                                                                      | 36                  |
| Şekil 4. 6. Kuraklık ve fenilalanin uygulamalarının yeşil ve mor reyhan genotiplerinde prolin miktarı üzerine etkisi. ....                     | 37                  |
| Şekil 4. 7. Kuraklık ve fenilalanin uygulamalarının mor ve yeşil reyhan yapraklarında lipit peroksidasyonuna etkisi.....                       | 38                  |
| Şekil 4. 8. Hidrojen peroksit standart grafiği. ....                                                                                           | 38                  |
| Şekil 4. 9. Mor ve yeşil reyhan yapraklarında kuraklık ve fenilalanin uygulamasının hidrojen peroksit miktarı üzerine etkisi. ....             | 39                  |
| Şekil 4. 10. Kuraklık ve fenilalanin uygulamalarının mor ve yeşil reyhan yapraklarında SOD aktivitesi üzerine etkileri. ....                   | 40                  |
| Şekil 4. 11. Kuraklık ve fenilalanin uygulamalarının yeşil ve mor reyhan yapraklarında APX aktivitesi üzerine etkisi. ....                     | 41                  |
| Şekil 4. 12. Kuraklık ve fenilalanin uygulamalarının yeşil ve mor reyhanda POD aktivitesi üzerine etkisi. ....                                 | 42                  |
| Şekil 4. 13. Kuraklık ve fenilalanin uygulamalarının yeşil ve mor reyhan yapraklarında serbest radikal giderim aktivitesi üzerine etkisi. .... | 42                  |

|                                                                                                                                                |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 4. 14. İndirgeme gücü yöntemi uygulanarak elde edilen Troloxun kalibrasyon grafiği. ....                                                 | 43 |
| Şekil 4. 15. Kuraklık ve fenilalanin uygulamalarının mor ve yeşil reyhan genotiplerinde indirgeme gücü aktivitesi üzerine etkileri.....        | 44 |
| Şekil 4. 16. Kuraklık ve fenilalanin uygulamasının yeşil ve mor reyhan yapraklarında süperoksit anyon giderim aktivitesi üzerine etkileri..... | 45 |
| Şekil 4. 17. Gallik asit kalibrasyon eğrisi grafiği. ....                                                                                      | 46 |
| Şekil 4. 18. Kuraklık ve fenilalanin uygulamasının mor ve yeşil reyhan yapraklarında toplam fenolik bileşik miktarları üzerine etkisi. ....    | 47 |
| Şekil 4. 19. Kuraklık ve fenilalanin uygulamasının mor ve yeşil reyhan yapraklarında gallik asit miktarları üzerine etkisi.....                | 48 |
| Şekil 4. 20. Kuraklık ve fenilalanin uygulamasının mor ve yeşil reyhan yapraklarında 4-hidroksibenzoik asit miktarları üzerine etkisi.....     | 49 |
| Şekil 4. 21. Kuraklık ve fenilalanin uygulamasının mor ve yeşil reyhan yapraklarında valinik asit miktarları üzerine etkisi.....               | 50 |
| Şekil 4. 22. Kuraklık ve fenilalanin uygulamasının mor ve yeşil reyhan yapraklarında kafeik asit miktarları üzerine etkisi.....                | 51 |
| Şekil 4. 23. Kuraklık ve fenilalanin uygulamasının mor ve yeşil reyhan yapraklarında ferulik asit miktarları üzerine etkisi. ....              | 51 |
| Şekil 4. 24. Kuraklık ve fenilalanin uygulamasının mor ve yeşil reyhan yapraklarında rutin miktarları üzerine etkisi.....                      | 52 |
| Şekil 4. 25. Kuraklık ve fenilalanin uygulamasının mor ve yeşil reyhan yapraklarında sisorik asit miktarları üzerine etkisi. ....              | 52 |
| Şekil 4. 26. Kuraklık ve fenilalanin uygulamasının mor ve yeşil reyhan yapraklarında rozmarinik asit miktarları üzerine etkisi. ....           | 53 |
| Şekil 4. 27. Kuraklık ve fenilalanin uygulamasının mor ve yeşil reyhan yapraklarında kuarsetin miktarları üzerine etkisi.....                  | 54 |
| Şekil 4. 28. Kuraklık ve fenilalanin uygulamasının mor ve yeşil reyhan yapraklarında gentisik asit miktarları üzerine etkisi. ....             | 55 |

## ÇİZELGE LİSTESİ

### Çizelge

### Sayfa

|                                                                                                                                                     |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Çizelge 2. 1. Reyhanın taksonomik sınıflandırılması. ....                                                                                           | 3  |
| Çizelge 2. 2. Bazı serbest radikal ve aktif oksijen türleri .....                                                                                   | 10 |
| Çizelge 2. 3. Organizmalarda bulunan temel antioksidan savunma sistemleri                                                                           | 15 |
| Çizelge 2. 4. Reyhan türlerinde bulunan bazı fenolik asitler. ....                                                                                  | 20 |
| Çizelge 4. 1. Sulama ve fenialanın uygulamalarının mor ve yeşil reyhan bitkisinin toprak üstü aksamının yaş ve kuru ağırlıkları üzerine etkisi..... | 32 |

## 1. GİRİŞ

Canlıların önemli bölümünü bitkiler oluşturur. Bitkiler doğanın vazgeçilmez öğelerindendir. Besin piramidinin en altında yer aldıkları için, ekosistemde primer üreticiler konumundadırlar. Primer üretici organizmalar, yaşadıkları ortamdan aldıkları ham maddeleri (azot, fosfor, potasyum, kalsiyum v.b. besin elementleri ile karbondioksit) kullanarak kendileri ve diğer canlıların yaşamları için gerekli olan besinleri sentezlerler. Yeşil bitkilerin önemi, sadece primer üretici olmaları değil aynı zamanda ekosistemin oksijen ve karbondioksit dengesinin korunması ve buna bağlı olarak yeryüzündeki sıcaklık kontrolünün sağlanması gibi fonksiyonlardır. Bitkiler ayrıca erozyonu önler ve toprağa organik madde kazandırır. Canlılara barınma ve beslenme ortamı sağlayarak ekosisteme devamlılık sağlar. Bunların dışında bitkilerin tarımda, mobilyacılıkta, tekstilde, ilaç endüstrisi, kimya sanayinde ve peyzaj düzenlemelerinde de önemli işlevleri bulunmaktadır. Üstlendikleri tüm bu görevlerden, dolayı doğanın vazgeçilmez unsurlarıdır. Fakat canlı yaşamı için bu kadar önemli olan bitki gelişimi ve verimliliği, çeşitli çevre faktörlerinden olumsuz etkilenir. Bitkilerden maksimum oranda faydalanılması, bitki türünün kendine özgü optimum çevre isteklerinin karşılanması ile mümkündür. Bu optimum isteklerde meydana gelen her türlü artış veya azalış bitki için stres kaynağıdır. Yani, bitkide büyüme ve gelişmeyi etkileyen veya engelleyen, sebepler “stres” olarak kabul edilir. Uygun olmayan çevre faktörüne karşı bitkinin hayatta kalabilme yeteneğine “stres direnci” denilmektedir.

Herhangi bir stres faktörüne maruz kalan bitkinin bütün fonksiyonel düzeylerinde, değişimler ve tepkiler meydana gelir. Stresin ortadan kalkması veya strese karşı direnç sağlanması durumunda, stres geri dönüşümlü olabilir. Ancak stres olayı geçici olarak meydana gelmişse bile, bitki büyüme ve gelişmesinde olumsuz etki meydana getirebilir. Bitkiler yaşamları sürecinde birçok stres faktörü ile karşılaşmaktadır. Stres faktörleri değişik şekillerde sınıflandırılabilir. Stres “biyotik” ve “abiyotik” olarak iki grupta ele alındığında abiyotik stres; düşük sıcaklık, tuzluluk, kuraklık, su baskını, radyasyon, kimyasallar, kirletici maddeler (ağır metaller, pestisitler ve aerosoller), rüzgâr (rüzgârdaki tuz ve toz partikülleri) ve toprağın besin elementler bakımından fakir olması

gibi faktörleri kapsamaktadır. Biyotik stres faktörleri ise, patojenler (virüsler, bakteriler ve mantarlar), hayvanlar (böcekler, herbivorlar, kemirgenler), bitkiler (parazit bitkiler, allelopati) ve çeşitli antropogenik aktivitelerdir. Bütün bu stres faktörleri bitkiler için bir tehlikedir ve dünya çapında ürün verimliliğini kısıtlamaktadır.

Dünya üzerindeki kullanılabilir alanlar stres faktörlerine göre sınıflandırıldığında, doğal bir stres faktörü olan kuraklık stresi % 26'lık payıyla en büyük dilimi içermektedir. Bunu % 20 ile mineral stresi ve % 15 ile soğuk ve don stresi takip etmektedir. Bunların dışında kalan diğer tüm stresler % 29'luk bir pay alırken, yalnızca % 10'luk bir alan herhangi bir stres faktörüne maruz kalmamaktadır (Blum, 1986).

Bu çalışmada, kuraklık stresinde fenilalanin uygulamalarının yeşil ve mor reyhan genotiplerinde fizyolojik ve biyokimyasal stres parametrelerine etkisi araştırılmıştır. Bu kapsamda; yaş ve kuru ağırlık, stresle ilgili parametreler (protein, klorofil, prolin, MDA ve  $H_2O_2$ ), antioksidan enzim aktiviteleri (APX, POD ve SOD), antioksidan aktivite (DPPH•, FRAP ve süperoksit anyon giderimi) ve fenolik bileşik (total fenolik ve bireysel fenolik bileşik) miktarındaki değişimler incelenmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

Reyhanın tek yıllık ve çok yıllık türleri Asya, Afrika ve Orta Amerika’da doğal yayılım göstermektedir (Darrah, 1980). Reyhan Lamiaceae familyasından *Ocimum* cinsine ait bitki türüdür.

Çizelge 2. 1. Reyhanın taksonomik sınıflandırılması.

|         |                     |
|---------|---------------------|
| Alem    | Plantae             |
| Bölüm   | Magnoliophyta       |
| Sınıf   | Magnoliopsida       |
| Takım   | Lamiales            |
| Familya | Lamiaceae           |
| Cins    | <i>Ocimum</i>       |
| Tür     | <i>O. basilicum</i> |

Boyları genellikle 60 cm den uzun, tek yıllık bir bitkidir. Güneş ışığının bol olduğu ve sulak alanlarda büyüme oranı yüksektir. Mutfaklarda taze, kuru veya dondurulmuş halde kullanılmaktadır ve tıbbi açıdan çok önemli bir bitkidir (Loughrin ve Kasperbauer, 2001). Uyarıcı, gaz giderici, terletici ve balgam sökücü özelliklere sahiptir. Kökleri, çocuklarda, kronik dizanteri, ishal gibi hastalıkların tedavilerinde ve karın ağrısını gidermek için, yaprakları ise ringworm enfeksiyonunun kullanılmaktadır (Riaz, 1999).

Reyhan Türkiye’de doğal olarak yayılım göstermemekte, sadece kültür formlarının tarımı yapılmaktadır. Türkiye’de çoğunlukla *O. basilicum* reyhan, *O. minimum* ise fesleğen olarak adlandırılmaktadır. *Ocimum* türleri içinde *O. basilicum* en fazla ekonomik öneme sahip olanıdır. Tıbbi bitkilerde bulunan ve insan sağlığı açısından önemli bileşikler olan sekonder metabolitlerin (uçucu yağlar, flavonoidler, antosiyaninler, fenolik asitler vb.) reyhanda da bulunması bu bitkinin önemini artırmıştır.

*Ocimum basilicum* bitkisi gerek fenolik asitler gerekse flavanoid grubu çok sayıda fenolik bileşik içermektedir. Bunların birçoğu tıp, gıda ve eczacılık sektöründe kullanıldığı pek çok çalışmada belirtilmektedir. Ancak bu çalışmalar incelendiğinde, bu bileşiklerin kuraklık stresine maruz kalan bitkilerdeki miktarlarının değişimi ile ilgili çalışma yok denecek kadar azdır. Bu çalışmada 10 tane fenolik asitin kuraklık stresine maruz kalan reyhan bitkisindeki miktarlarındaki değişim araştırıldı. Fenolik bileşiklerin sentezlendiği fenilalaninin kuraklık stresi sırasında reyhan bitkisine uygulanması söz konusu metabolitleri nasıl etkilediği ve bunlarla birlikte kuraklık stresine karşı bitki hücrelerinde gelişen antioksidan savunma sistemi ve stres parametreleri incelendi.

Son yıllarda, ekonomik öneme sahip bitkilerin toplanması, karakterizasyonu ve kimyasal içeriklerinin belirlenmesine önem verilmiştir. Bu nedenle üstün özelliğe sahip olanların seçilebilmesi ve belirlenmesi bu araştırmalarla mümkün olabilir. Türkiye'deki reyhan (*Ocimum spp.*) yerel genotipleri toplanarak verim ve uçucu yağ kompozisyonu üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmada, kuraklık stresi uygulanan reyhan yapraklarında, kuarsetin, rutin rozmarinik, sisorik, gentisik, ferulik, kafeik, vanilik, 4 hidroksibenzoik, gallik asit gibi fenolik bileşiklerin miktarları yüksek basınçlı sıvı kromatografisiyle (HPLC) belirlenmiştir.

## 2.1 Bitkilerde Kuraklık

Çölleşme Sözleşmesi'ndeki (UNCCD, 1995) tanımlamalara göre, kuraklık, yağışın normal düzeyinin çok altında olduğu koşullarda ortaya çıkan, üretim sistemlerini olumsuz yönde etkileyerek, ciddi hidrolojik dengesizliklere yol açan, doğal oluşumlu bir olaydır (Türkeş 1998 ve 1999)'e göre, kuraklık; iklimsel değişimlerin neden olduğu geçici bir özelliktir; kurak ve yarı kurak bölgelerin yanı sıra, orta enlemlerin nemli denizel iklimleri ile diğer iklim bölgelerinde de oluşabilir. Genel olarak kuraklık terimi, topraktaki su içeriğinin, bitkilerin su azlığından sıkıntı çektiği miktara düşünceye kadar, belirgin yağışın olmadığı bir periyodu ifade etmektedir (Özcan ve ark., 2004). Yağışsız dönemin kuraklık oluşturmada, toprağın su tutma kapasitesi ve bitkiler tarafından gerçekleştirilen evapo-transpirasyon hızına bağlı olarak gerçekleşmektedir. Kuraklığın yol açtığı stres, birdenbire oluşmaz; yavaşça gelişir ve daha uzun süren bir yoğunlukla

artma gösterir. Bu nedenle zaman boyutu, kuraklık stresine karşı hayatta kalabilmede önemli bir role sahiptir (Jones, 1992; Kozlowski ve ark., 1997). Kuraklığı, genel olarak, ağır (ivegen, akut) kuraklık, sürekli (kronik) kuraklık ve fizyolojik kuraklık şeklinde üçe ayırmak mümkündür (Eriş, 1990).

### **2.1.1 Ağır Kuraklık**

Sıcaklıkta artış veya nemde hızlı düşüş, bitkilerde ağır kuraklığa neden olur. Ayrıca, hareket eden kuru hava kütlesi de neden olur. Böyle atmosferik değişiklikler, yaprak ve çevresini saran hava arasında buhar basıncı gradiyentinde önemli bir artışa yol açar. Böyle durumlarda susuzluk kendini şiddetle gösterir; özellikle genç bitkiler ve tohumlar kurur. Yaşlı bitkiler asimilasyon yetersizliğinden dolayı solar, kurur, verimleri azalır ve kalitesizleşir. Kuraklığın en erken belirtisi solgunluktur. Solgunluk noktası aşılmadığı sürece, bu durumdaki bitkiye su verildikçe solgunluk geçer, aksi halde bitki ölür.

### **2.1.2 Kronik Kuraklık**

Kronik kuraklık ise toprakta taban suyunun düşmesi sonucu görülür. Böyle bölgelerde bulunan bitkiler zayıf düşerler. Sürekli kuraklık etkisinde kalan bitkilerde önce solgunluk, daha sonra ise ağaçların tepelerinden başlayarak aşağıya doğru inen kuruma hali görülür. Bitkilerde kuruma, metabolizma ve hücre yapısının tamamen bozulmasına ve sonunda enzimle katalizlenen reaksiyonların durmasına neden olabilecek aşırı miktardaki su kaybı olarak ifade edilmektedir (Eriş, 1990; Smirnoff, 1993).

### **2.1.3 Fizyolojik Kuraklık**

Toprakta yeterli su varlığına karşın, çeşitli nedenlerle bitkinin bu sudan yararlanamaması durumudur. Başka bir deyişle, toprağın yeterli miktarda su içermesi durumunda bile, toprağın su tutma kapasitesinin bitkinin emme kuvvetinden fazla olması nedeniyle, bitkilerin suyu alamadığı topraklar bitki için kurak sayılırlar. Kış aylarında, toprak soğuk ve donmuş durumda iken hava sıcaklığı yükseldiğinde, toprak üstü organlarıyla transpirasyon yapan bitkiler kaybettikleri suyu kökleriyle topraktan alamaz; çünkü toprak suyunun viskozitesi artmıştır. Diğer yandan, toprakta meydana gelen tuzluluk, toprak çözeltisinin ozmotik değerini artırarak, toprak suyunun bitkiler tarafından alınımını güçleştirir. Bazen de bitkiler toprak altındaki geçirimsiz sert bir tabakadan ötürü normal su alımlarını gerçekleştiremezler (Çırak ve ark., 2006).

## **2.2 Bitkilerde Kuraklık Stresinin Etkileri:**

### **2.2.1 Kuraklığın Morfolojik Etkileri:**

Yaprak alanının küçülmesi, nemli toprak tabakalarına doğru derinlemesine kök gelişimi ve stomaların kapanması, kuraklığa karşı savunmanın ilk adımları olarak bitkide görülen değişimlerdir. Kurak koşullarda yapraklarda meydana gelen morfolojik değişimler, genelde transpirasyonla kaybedilen su miktarını azaltmaya, köklerde oluşan morfolojik değişimler ise topraktaki suyu daha yüksek bir kuvvetle absorbe etmeye yöneliktir (Çırak ve ark., 2006). Bitkilerde, kuraklık stresine karşı yaprak büyümesinin engellendiği ve yeni yaprak oluşumunun sınırlandırıldığı görülmektedir. Kuraklık stresine tepki olarak, bazı bitkilerde yaprak yüzeylerinin sık tüylerle kaplanması şeklinde morfolojik değişimler görülür. Bu tüyler, alttaki hücrelerin sıcaklığını 1-2°C düşürerek, transpirasyon hızını azaltır.

### 2.2.2 Kuraklığın Metabolik Etkileri

Hücre içeriğinin büyük bir kısmını oluşturan su, taşıyıcı olması, hücresel reaksiyonlar ve çözücü rolü oynaması gibi fonksiyonel özelliklerinden dolayı bitkiler için çok önemlidir. Su kaybı hücrede metabolizma bozulmasına sebep olur. Su kaybına bağlı olarak gerçekleşen iyon-birikimi, membran bütünlüğünün ve proteinlerin yapısının bozulmasına yol açar.

### 2.2.3 Kuraklığın Fotosentez Üzerine Etkileri

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

#### Stomatal Sınırlamalar

Kuraklığa karşı oluşturulan en erken tepkilerden biri, kloroplastlara CO<sub>2</sub> difüzyonunu kısıtlayan stoma kapanması olayıdır. Kuraklık sırasında bitkilerin stomalarını kapatmalarına neden olan iki temel etken, hidrolik sinyaller (yaprak su potansiyeli, hücre turgoru) ve kimyasal sinyaller (absisik asit)'dir. Köklerde sentezlenen ve transpirasyon akıntısıyla bekçi hücrelerine taşınan absisik asit (ABA), bekçi hücrelerindeki ABA reseptörüne bağlanarak, kuraklık stresi koşulları altında stomaların kapanmasını sağlar (Kalefetoğlu ve Ekmekçi, 2005).

## **Stomatal Olmayan Sınırlamalar**

Kuraklık kloroplastların fotosentetik elektron transport ve fosforilasyon kapasitelerini azaltarak fotosentez miktarını sınırlandırmaktadır. Fotosentetik elektron zincir reaksiyonlarının inhibisyonu fotoindirgeyici ya da fotooksidatif hasara sebep olacak aktif oksijen türlerinin oluşumuna sebep olabilir. İzole edilen kloroplastlardaki çalışmalarda her iki fotosistemin özellikle PSII'nin kuraklık stresi ile etkilendiği gösterilmiştir (Kalefetoğlu ve Ekmekçi, 2005).

### **2.2.4 Kuraklığın Oksidatif Etkileri**

Kuraklık stresinde, bitki su kaybetmemek için, genelde, stomalarını kapatır. Bu durumda CO<sub>2</sub>'in alımı kısıtlanır. Bu durumda dolaylı olarak NADP<sup>+</sup> kısıtlı hale gelir ve ferredoksin NADP<sup>+</sup> yerine oksijeni redükler; böylece, fotosistem I'in elektronları O<sub>2</sub>'ye transferi sonucunda reaktif O<sub>2</sub><sup>-</sup> radikali üretilir (Mehler reaksiyonu). Birçok türde kuraklık stresi altında artan O<sub>2</sub><sup>-</sup> oluşumu hızı; lipid peroksidasyonuna, yağ asidi doygunluğuna ve sonuçta membranların bütünüyle zarar görmesine neden olur. Süperoksitin kendisi fazla reaktif değildir ve daha çok H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve daha sonra OH<sup>-</sup> oluşturmak suretiyle etkili olur.

Süperoksit ve hidrojen peroksitin OH<sup>-</sup> radikalini oluşturmak üzere tepkimesi sırasında (Haber-Weiss reaksiyonu), artan demir ya da bakır gibi diğer geçiş metalleri, bu reaksiyonları hızlandırmak suretiyle oksidatif hasarı daha da arttırabilir (Fenton reaksiyonu). Bunların yanı sıra, fotosistem II'deki suyu parçalayan bölgede de serbest radikal oluşabilir.

Bitkilerde, oksidatif zararın yol açtığı yıkıcı etkilerle mücadele etmek için; yağda çözünen ve membrana bağlı antioksidanlar, suda çözünen antioksidanlar ve enzimatik antioksidanlardan oluşan karmaşık bir antioksidan koruyucu sistemine sahiplerdir. Kuraklık stresine maruz kalan bitkiler antioksidan savunma sistemlerinin bazılarının ya da tamamının aktivasyonu ile oksidatif stresin üstesinden gelebilirler (Jung, 2004).

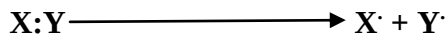
Uzun süreli ve akut hatta bazen kısa süreli stres durumunda bile, savunma mekanizmalarının kapasiteleri aşılar ve bu durum, gözle görülür zararlara ve hatta bitki ölümüne neden olabilir (Alexieva ve ark., 2003).

### 2.3 Serbest Radikaller

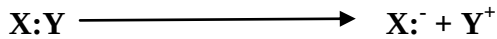
Atom veya moleküllerdeki elektronlar çekirdeğin etrafında orbital olarak tanımlanan bölgelerde hareket ederler. Her yörüngede birbirine zıt yönde hareket eden en fazla iki elektron bulunur. Bir atom veya molekül dış orbitallerin de bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron bulunduruyorsa “serbest radikal olarak tanımlanır. Bu tip moleküller, ortaklanmamış elektronlarından dolayı oldukça reaktiftirler. Serbest radikallerde eşleşmemiş elektron, atom veya molekülün üst kısmına konulan bir nokta ile belirtilir.

Çeşitli fiziksel etkenler ve kimyasal olaylar nedeniyle çevrede ve hücrel koşullarda devamlı bir radikal yapımı vardır. Serbest radikaller üç temel yolla oluşur (Akkuş, 1995).

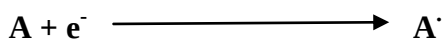
a) Kovalent bağın kopması sırasında bağ yapısındaki iki elektronun her biri ayrı ayrı atomlar üzerinde kalması ile.



b) Bir molekülden bir elektronun ayrılması ya da bir moleküldeki kovalent bağın heterolitik olarak parçalanması ile serbest radikaller oluşur.



c) Radikal özelliği taşımayan bir moleküle tek elektron transferi ile dış orbitalinde eşleşmemiş elektron oluşuyorsa bu tür indirgenme radikal oluşumuna sebep olabilir.



Örneğin, moleküler oksijenin tek elektron ile indirgenmesi, radikal formu olan süperoksidi oluşturur (  $O_2 + e^- \longrightarrow O_2\cdot^-$  )

Çizelge 2. 2. Bazı serbest radikal ve aktif oksijen türleri

| ADI                | FORMÜLÜ              | TANIMI                                                                                                    |
|--------------------|----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Hidrojen atomu     | $H\cdot$             | En basit serbest radikal                                                                                  |
| Süperoksit         | $O_2^{\cdot-}$       | Oksijen merkezli radikal, seçimli reaktif                                                                 |
| Hidroksil          | $\cdot OH$           | En fazla reaktif oksijen radikali                                                                         |
| Triklorometil      | $CCl_3\cdot$         | C merkezli radikal, $CCl_4$ metabolizması sonucu üretilir ve genellikle $O_2$ ile hızlı reaksiyona girer. |
| Tiyil              | $RS\cdot$            | Kükürt üzerinde eşleşmemiş elektron bulunduran türlerin genel adı.                                        |
| Peroksil, alkoksil | $RO_2\cdot, RO\cdot$ | Organik peroksitlerin yıkımı sırasında oluşan oksijen merkezli radikallerdir.                             |
| Nitrik oksit       | $NO\cdot$            | L-arginin amino asidin den <i>in vivo</i> koşullarda üretilir                                             |
| Azotdioksit        | $NO_2\cdot$          | $NO\cdot$ nun $O_2$ ile reaksiyonu ile oluşur. Kirli hava, sigara dumanında vb. bulunur                   |
| Hidrojen peroksit  | $H_2O_2$             | Reaktivitesi en düşük, moleküler hasar yeteneği düşük.                                                    |
| Singlet oksijen    | $^1O_2$              | Oksijenin güçlü oksidatif formu.                                                                          |

### 2.3.1 Reaktif Oksijen Türleri (ROT)

Oksijen bulunan bir ortamda fiziksel ve kimyasal etkenlerle, zorunlu metabolik reaksiyonlar sonucu oksijen radikalleri üretilir. Oksijen radikalleri biyolojik sistemlerde bulunan en önemli serbest radikallerdir. Bunlar arasında süperoksit radikali ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroksil radikali ( $\cdot OH$ ) ve radikal olmayan hidrojen peroksitin ( $H_2O_2$ ) özel yerleri vardır.

## **Süperoksit radikali ( $O_2^{\bullet-}$ )**

Hemen hemen tüm aerobik hücrelerde oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu süperoksit radikali oluşur. Süperoksit radikalinin önemi  $H_2O_2$  kaynağı olması ve geçiş metal iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır. Ayrıca hücresel koşullarda üretilen süperoksit hem oksitleyici hem de indirgeyici olarak davranabilir. Süperoksit radikali düşük pH değerlerinde daha reaktiftir. Süperoksit radikali başlıca şu yollarla üretilmektedir.

1. Hidrokinonlar, redükte flavinler, tiyoller gibi biyolojik moleküllerin aerobik ortamda otooksidasyonu sonucu süperoksit oluşur.
2. Aktive olmuş fagositik hücreler (nötrofiller, monositler, makrofajlar, eozinofiller), virüs veya bakteriyi inaktive etmek için bol miktarda süperoksit üretirler.
3. Mitokondriyal enerji metabolizması sırasında oluşan elektron sızıntısı sonucu kullanılan oksijenin %1-3'ü süperoksit radikali yapımı ile sonlanır.
4. İndirgenmiş geçiş metallerinin otooksidasyonu süperoksidi meydana getirebilir.

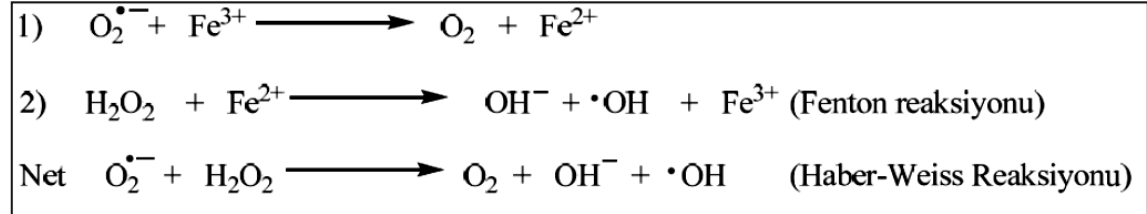
## **Hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ )**

Moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması veya süperoksidin bir elektron alması sonucu  $H_2O_2$  oluşur.

Yapısında paylaşılmamış elektron içermediği için radikal değildir, ancak biyolojik membranları geçerek hücrelerin arasına veya içine kolayca difüze olabilir ve uzun ömürlü bir oksidandır. Biyolojik sistemlerde  $H_2O_2$ 'nin asıl üretimi süperoksidin nonenzimatik veya SOD katalizli dismutasyon reaksiyonu ile  $H_2O_2$ 'ye dönüşmesiyle olur.

$H_2O_2$  bir radikal olmadığı halde, ROT içine girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli rol oynar. Çünkü geçiş metal iyonları varlığında Fenton reaksiyonu sonucu; süperoksit radikali varlığında Haber-Weiss reaksiyonu sonucu en reaktif ve daha çok hasar verici olan hidroksil radikaline dönüşür. Haber-Weiss reaksiyonu süperoksidin

direkt olarak  $\text{H}_2\text{O}_2$  ile reaksiyonudur, katalizörsüz reaksiyon oldukça yavaş ilerler. Demirle katalizlenen ikinci şekli ise çok hızlıdır. Bu reaksiyonda önce ferri demir ( $\text{Fe}^{3+}$ ) süperoksit tarafından ferro demire ( $\text{Fe}^{2+}$ ) indirgenir. Sonra fenton reaksiyonu ile  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'den  $\bullet\text{OH}$  ve  $\text{OH}^-$  üretilir.

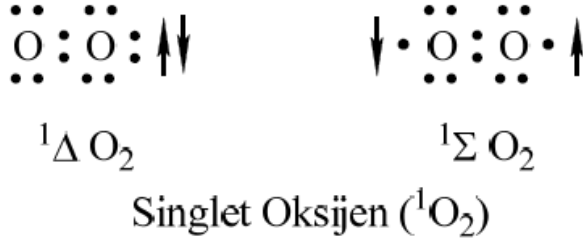


### Hidroksil radikali ( $\bullet\text{OH}$ )

Hidroksil radikali geçiş metalleri varlığında  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'nin indirgenmesiyle (Fenton reaksiyonu) oluşur. Suyun yüksek enerjili iyonlaştırıcı radyasyona maruz kalması sonucu da oluşur. Biyolojik sistemlerdeki en reaktif ve hasar verici radikal türüdür. Yarılanma ömrü çok kısa olmasına rağmen ortamda rastladığı her biyomolekülle tepkimeye girer ve oluştuğu yerde büyük hasara sebep olmaktadır. Her tür biyolojik molekülle reaksiyona girebilse de özellikle elektronca zengin bileşikler hedefleridir.

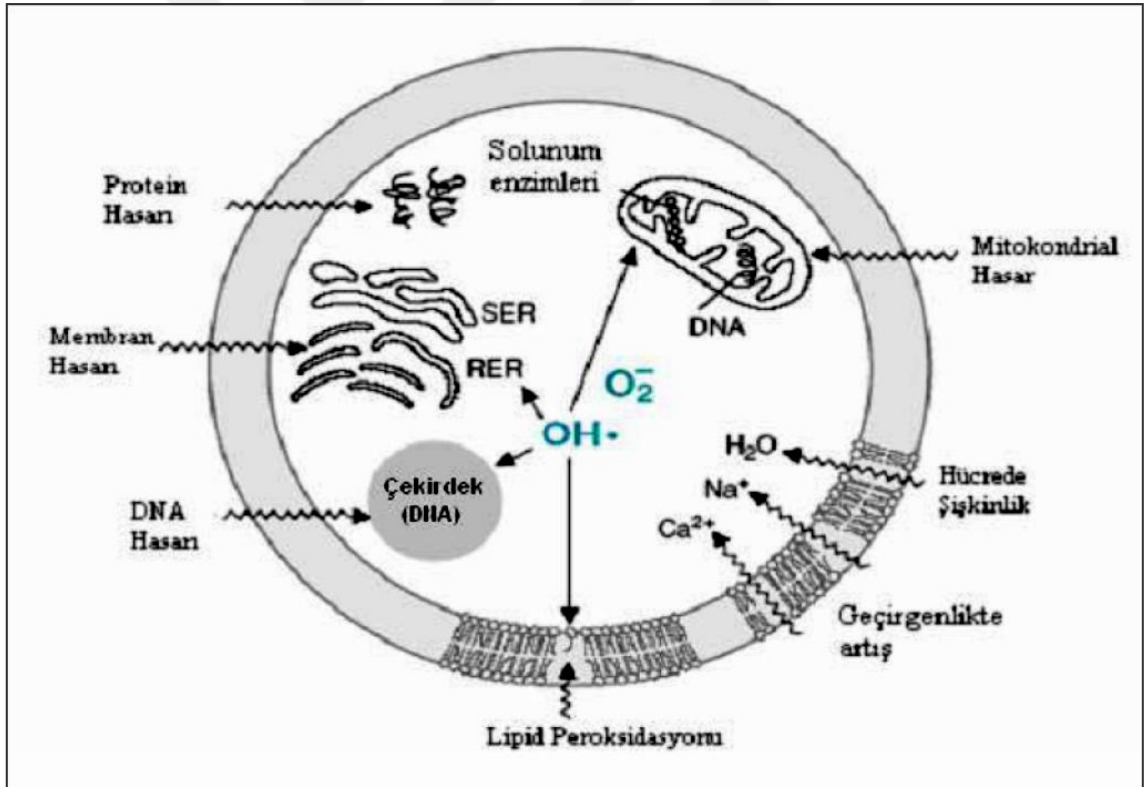
### Singlet oksijen ( $^1\text{O}_2$ )

Moleküler oksijenin elektronlarından birinin enerji alarak kendi spininin ters yönünde olan başka bir orbitale yer değiştirmesiyle singlet oksijen oluşur. Singlet oksijen ortaklanmamış elektronu olmadığı için radikal değildir. Oksijenin ortaklanmamış elektronları paralel spinli olduğundan oksijendeki spin kısıtlaması singlet oksijende yoktur ve oldukça reaktif bir oksijen bileşiğidir. Delta ve sigma olmak üzere iki şekli vardır. Delta şekli daha düşük enerjili (92 kJ) olduğundan sigma şekline (155 kJ) göre daha uzun yarı ömürlüdür.



### 2.3.2 Serbest Radikallerin Etkileri

Güçlü reaktif özelliğe sahip olan serbest radikaller tüm hücre bileşenleriyle kolayca etkileşebilirler. Hücrenin savunma mekanizmaları ile ortadan kaldırılmazlarsa, biyolojik moleküllerle reaksiyona girerek yeni serbest radikallerin olduğu zincirleme bir reaksiyon başlatır.



Şekil 2. 1. Serbest radikallerin hücresel hedefleri

### **Serbest radikallerin lipidlere etkileri**

Serbest radikallerin etkilerine en hassas olan biyomoleküller lipidlendir. Çoklu doymamış yağ asitlerinin serbest radikaller etkisi ile oksidatif yıkımı **lipid peroksidasyonu** olarak bilinir. Lipid peroksidasyonu organizmada oluşan serbest radikallerin özellikle  $\bullet\text{OH}$ 'in, membran yapısında bulunan çoklu doymamış yağ asitlerindeki konjuge çift bağlardan bir H atomu çıkarmasıyla başlar. Bunun sonucunda yağ asidi zinciri lipid radikali ( $\text{L}\bullet$ ) niteliği kazanır. Daha sonra lipid peroksil radikalleri ( $\text{LOO}\bullet$ ) oluşur.  $\text{LOO}\bullet$  oluşumu önemlidir, çünkü yeni lipid radikali ( $\text{L}\bullet$ ) oluşumuna sebep olmaktadır.

### **Serbest radikallerin proteinlere etkileri**

Proteinler serbest radikallere karşı lipitlere göre daha az hassastır, fakat proteinin amino asit içeriğine göre hasar oranı değişmektedir. Triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin gibi doymamış bağ içeren ve metiyonin, sistein gibi kükürt bulunduran amino asitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenir. Bunun sonucunda karbon merkezli organik radikaller ve sülfür radikalleri oluşur.

### **Serbest radikallerin nükleik asitlere ve DNA'ya etkileri**

DNA'da serbest radikallerden kolayca etkilenen hedef moleküllerdir. Aktif oksijen türleri delesyon, mutasyon ve öldürücü genetik etkileri olan çok sayıda DNA lezyonlarına neden olabilir. DNA'nın yapısındaki şeker ve bazlar oksidasyona karşı hassastırlar. Kısa ömürlü hidroksil radikalleri DNA'nın yapısındaki şeker ve bazları oksitleyerek DNA' zincirinin kırılmasına neden olabilir. DNA hasarı onarılmazsa hücre ölümüne yol açabilir.

## **2.4 Antioksidanlar**

Antioksidanlar serbest radikalleri nötralize etmek için karşılıklı etkileşim halinde olan çeşitli bileşiklerdir. Bu bileşikler gıda kökenli antioksidanlar (C vitamini, E vitamini, karotenoidler, lipoik asit gibi), antioksidan enzimler (SOD, POD, APX, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz gibi), metal bağlayıcı proteinler (ferritin, albümin gibi) şeklindedir. Antioksidanlar enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar şeklinde iki gruba ayrılmaktadır.

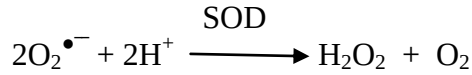
**Çizelge 2. 3.** Organizmalarda bulunan temel antioksidan savunma sistemleri

| Suda Çözünen           | Radikal Tutucular |              | Suda Çözünen       |
|------------------------|-------------------|--------------|--------------------|
|                        | Yağda Çözünen     | Suda Çözünen |                    |
| Süperoksit dismutaz    | E vitamini        | C vitamini   | Ferritin (Fe)      |
| Katalaz                | Bilirubin         | Glutasyon    | Transferrin (Fe)   |
| Glutasyon redüktaz     | Ubikinon          | Ürik asit    | Laktoferrin (Fe)   |
| Glutasyon peroksidaz   | β-karoten         | Sistein      | Albümin (Cu)       |
| Glutasyon S transferaz | Flavonoidler      | Mannitol     | Seruloplazmin (Cu) |

#### 2.4.1 Enzimatik Antioksidanlar

##### Süperoksit Dismutaz

Serbest radikallere karşı organizmadaki ilk savunma süperoksit dismutaz enzimiyle gerçekleşmektedir. Süperoksit dismutaz, süperoksit radikalının daha az toksik olan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve O<sub>2</sub> 'ye dönüşümünü katalizler.



Bitki hücrelerinde sitozol (Cu/Zn-SOD), kloroplast (Fe-SOD ve Cu/Zn-SOD) ve mitokondride (Mn-SOD) süperoksit dismutazın farklı izoenzimleri bulunur.

##### Peroksidaz Enzimi

Bitkilerde peroksidazlar yaygın olarak bulunmaktadır. Hücre çeperinde, vakoulde ve sitoplâzmada bulunan antioksidan enzimlerdir. Hidrojen verici olarak birçok substratı kullanarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin ortamdan temizlenmesini sağlar. Kullandığı substrata göre isimlendirilir. Örneğin, guaiakol peroksidaz (GPX) guaiakole olan yüksek ilgisine rağmen farklı birçok substratı elektron vericisi olarak kullanmaktadır.



### Askorbat Peroksidaz Enzimi

Askorbat peroksidaz sitoplazma, kloroplast, mitokondri ve peroksizomlarda izoformları bulunur.  $H_2O_2$ 'in detoksifikasyonunda görev almaktadır. Askorbat peroksidaz, askorbik asidin hidrojen peroksit tarafından oksidasyonunu katalizler. Sonuçta monodehidroaskorbatı oluşturmaktadır. Monodehidroaskorbat (MDHA) monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR) tarafından ya da enzim olmadan askorbat-glutasyon döngüsü ile askorbata tekrar dönüştürülmektedir (Torun 2012).



### 2.4.2 Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

#### Askorbik Asit (Vitamin C)

Bitkilerde ROT kaynaklı hasarları en aza indirir ve oluşabilecek hasarları önlemekte görevli hücrelerde yüksek miktarda bulunabilen en güçlü antioksidanlardan biridir. Oksidatif strese tolerans sağlamada ve süperoksit ile hidroksil radikallerinin temizlenmesinde rol oynamaktadır. Bitkilerde özellikle fotosentetik hücrelerde fazla miktarda bulunurken stres koşullarında bitki hücrelerinde miktarı artmaktadır.

#### Fenolik Bileşikler

Bitkilerde en yaygın olarak bulunan antioksidan aktiviteye sahip, serbest radikal sonlandırıcı ve metal şelatlama etkisi gösteren, stres faktörlerine karşı önemli etkilere sahip sekonder metabolitlerdir. Çevresel faktörlerde ve stres durumlarında fenolik bileşiklerin miktarının arttığı bilinmektedir. Fenolik bileşikler serbest radikallere hidrojen vererek zararlı etkilerini ortadan kaldırmayı sağlamaktadırlar.

## 2.5 Fenolik Bileşikler ve Sınıflandırma

Bir aromatik halka ve bir ya da daha fazla hidroksi grubuna sahip olan bileşiklerdir. Fenol bütün grupların ortak yapısıdır. Aromatik halkası benzendir. Fenolik hidroksilin hidrojeni kararsız olduğundan dolayı zayıf asitlerdir. Birden fazla benzen halkasına bağlı olan birden çok fenolik hidroksi grubu olan bileşiklere polifenol denir. Bitkilerde ayırt edici özelliğe sahiptirler. Çok geniş ve çok farklı kimyasal grupları içeren bileşiklerdir. Bu bileşikler belli yollarla sınıflandırılabilir. Harborne ve Simmonds (1964) bu bileşikleri moleküldeki karbon sayısına bağlı gruplara göre sınıflandırdılar. Bir alternatif sınıflandırma da Swain ve Bate-Smith tarafından kullanılmıştır. Onlar fenollerini yaygın ve az yaygın kategorilerde sınıflandırmışlardır. Ribereau- Gayon ise fenollerini aşağıdaki gibi üç familyada gruplandırmıştır.

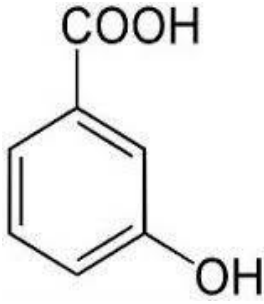
1. Büyük oranda yaygın fenoller; bütün bitkilerde yaygın olarak bulunanlar ya da spesifik bir bitkide önemli olanlar.
2. Daha az yaygın olarak bulunan fenoller; bilinen ve sınırlı olarak bulunan bileşikler.
3. Polimer olarak var olan fenolik bileşenler.

### 2.5.1 Basit Fenoller

Basit fenoller, fenollerin yerine de geçmektedir. Orto, meta ve para isimlendirmeleri, fonksiyonel gruplarından birinin hidroksi olduğu benzen halkasında sırasıyla 1,2-, 1,3- ve 1,4- değişimi anlamına gelir.

### 2.5.2 Fenolik Asit ve Aldehitler

Hidroksibenzoik asitler fenol üzerindeki karboksil gruplarının varlığı ile karakterize edilmektedir. *p*-hidroksibenzoik asit, gallik asit, protokateşuik asit, salisilik asit ve vanilik asit örnek olarak verilebilir. Vanilin gibi hidroksibenzoik aldehitler ise karboksil grubunun yanında aldehit grubu içermektedirler.



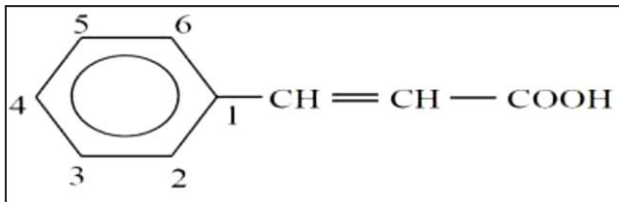
Şekil 2. 2. Hidroksibenzoik asit.

### 2.5.3 Asetofenonlar ve Fenillaktik Asit

Doğada nadiren bulunan  $C_6-C_2$  yapısındaki bileşiklerdir. 2-hidroksiasetofenon ve 2-hidroksifenil asetik asit örnek olarak verilebilir.

### 2.5.4 Sinamik Asitler

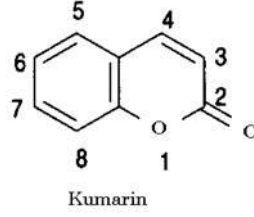
$C_6-C_3$  iskeletine sahip altı yaygın sinamik asit vardır. Genellikle bütün bitkilerde bunların en az üçünü içermektedir. Örnek olarak sinamik asit, *p*-kumarik asit, kafeik asit, ferulik asit, 5-hidroksiferulik asit ve sinapik asit verilebilir.



Şekil 2. 3. Sinamik asitler.

### 2.5.5 Kumarinler

Kumarinler de  $C_6-C_3$  iskelet yapısına sahiptir fakat onlar  $C_3$  kısmının bir parçası olarak heterosiklik oksijene sahiptirler. Pek çok kumarin vardır, bunların çoğu UV-toleransının yanında hastalıklarda da rol oynar.



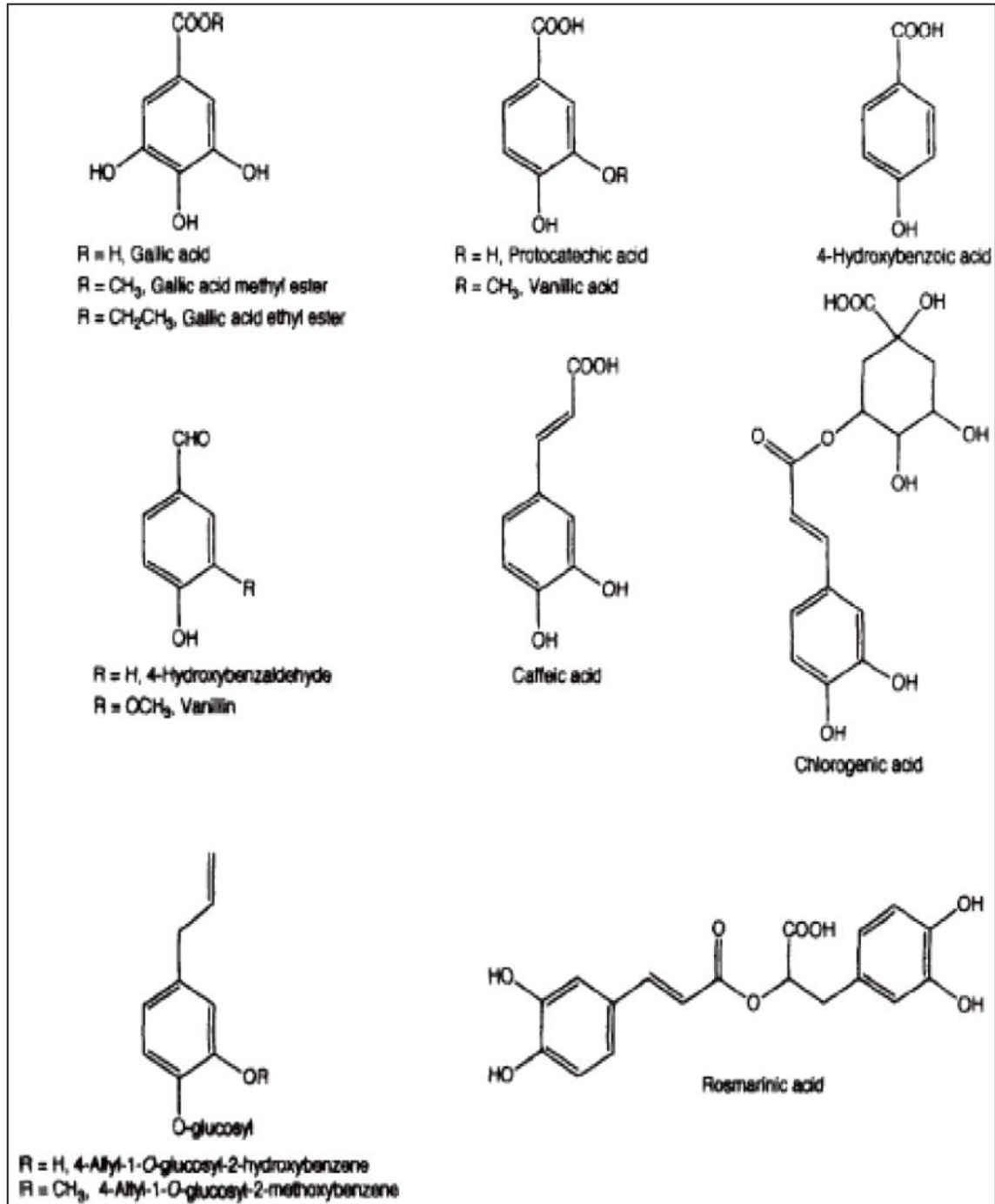
### 2.5.6 Flavonoidler

Flavonoidler  $C_6-C_3-C_6$  yapısına sahip bileşikleridir. Flavonoidler genel yapılarına dayalı olarak üç büyük sınıfta gruplandırılabilirler. Her bir durumda iki benzen halkası üç karbon grubu ile birbirine bağlıdır. Bileşiklerin nasıl sınıflandırıldığını belirleyen  $C_3$  gurubudur.

## 2.6 Fenolik Asitler ve Reyhan

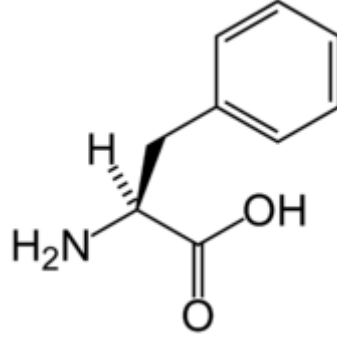
Literatür çalışmaları incelendiğinde de, rozmarinik asidin yüksek miktarda olduğu tespit edilmiştir. Rozmarinik asit daha çok Lamiaceae familyası türlerinde bulunan önemli bir antioksidan kaynağıdır. Literatürde reyhan türlerinde rozmarinik asit miktarındaki değişim sınırları oldukça geniş olduğu görülmüştür. Bu değişim, çevresel faktörler , genetik yapı ve yetiştirme yöntemlerine göre değişiklik göstermektedir. Reyhanda rozmarinik asit dışında gallik asit, kafeik asit, protokateşuik asit, 4-hidroksibenzoik asit tanımlanan diğer fenolik asitlerdir (Hiltunen, 1999). Son yıllarda yapılan çalışmalarda *Ocimum* türleri için yeni fenolik asitler tanımlanmaktadır. Lee ve Scagel (2009) yaptıkları çalışmada; rozmarinik asitten sonra en fazla bulunan fenolik asidin sisorik asit olduğu belirlenmiştir. Reyhan da bulunan bazı fenolik bileşikler Şekil 2.3. 'te verilmiştir.

Çizelge 2. 4. Reyhan türlerinde bulunan bazı fenolik asitler.



## 2.7 Fenilalanin ve Biyosentezi

Fenilalanin bir alfa-amino asittir. Molekül ağırlığı 165.19 g/mol'dür. Sistemik adı 2-Amino-3-fenil-propanoik asittir. Fenilalanin, anne sütünde, bazı bitkilerde ve mikroorganizmalarda bulunur. Üretilen formları yiyecek ve içecek ürünlerinde kullanılır ve besin takviyesi olarak ağrı kesicilerde ve antidepresanlarda kullanılır. Esansiyal bir aminoasittir. Beyaz, toz halinde bir katıdır. L-fenilalanin elektriksel olarak nötr bir aminoasittir. Protein yapısındaki 20 temel aminoasitten biridir.



Şekil 2. 4. Fenilalaninin yapısı.

Fenilalanin birçok bitkisel fenolik bileşiğin biyosentezinde ara üründür. Bitkilerde en sık rastlanan sekonder fenolik bileşik grupları fenilalaninden türevlenmektedir. Bitkilerde şikimat yolu ve fenilpropanoid yolu ile üretilebilirler. Glikoz ve pentoz fosfat yolu ile üretilen fosfofenolpirüvat ve eritroz 4-fosfat bir dizi işlemde geçerek korizmat sentezi ile korizmata dönüşür. Korizmat aromatik amino asitlerin biyosentezinin dallanma noktasıdır. Fenilalaninden amonyum molekülünün uzaklaşmasıyla sinnamik asit oluşur. Bu tepkimeyi katalizleyen fenilalanin amonyum liyaz bitkisel sekonder metabolizmada çalışılan enzimdir. fenilalanin amonyum liyaz, primer ve sekonder metabolizmanın tam ayrılma noktasında bulunduğundan, birçok fenolik bileşiğin oluşumunda önemli bir düzenleyici basamağı katalizler.

### **3. MATERİYAL VE YÖNTEM**

#### **3.1 MATERİYAL**

##### **3.1.1 Bitkisel Materyal**

Reyhan tohumları Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Toprak Bölümü Öğretim Üyesi Doç. Dr. Sezer Şahin aracılığı ile Ordu Üniversitesinden getirilmiştir. Kuraklık denemesi Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi seralarında yapılmıştır.

##### **3.1.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler**

Çalışmamızda kullanılan kimyasallar; Potasyum dihidrojen fosfat, hidrojen peroksit, sodyum hidroksit,  $\alpha$ -tokoferol, sodyum karbonat, Etilendiamin tetra asetik asit, Potasyum ferrisiyanid, Demir (III) klorür, Demir (II) klorür, Nitro Blue Tetrazolium Chloride, Potasyum iyodür, Bütillenmiş Hidroksil Anisol, Bütillenmiş Hidroksil Toluen, Tiyobarbütirik asit, Triklorasetik asit, 2,2-difenil-1-pikril hidrazil (DPPH $\cdot$ ), Etanol, Metanol, Coomassie brilliant blue G-250, Riboflavin, Metiyonin, Guaiacol, Askorbik asit, Sülfosalisilik asit, Ninhidrin, Glasiyel asetik asit, Toluen, Prolin, Aseton, Fosforik Asit, Kloroform, Folin & Ciocalteu, Ferrozin, Trolox, sodyum klorür ve Fenilalanin'dır.

### 3.1.3 Kullanılan Cihaz ve Aletler

Hassas terazi: Vibra

Manyetik karıştırıcı: Velp Scientifica

Mikro Pipetler: Eppendorf (Almanya)

Etüv: Memmert

UV Spektrofotometre: VARIAN Cary 50 Bio

Soğutmalı santrifüj: Hettich R22 (Almanya)

pH metre: Hanna Instruments (Romanya)

Vorteks: Velp Scientifica

HPLC kolonu: C18 4,6x150mm, 3µm

Su Banyosu: Termal Lab.

Buz Dolabı: Regal (Türkiye)

## 3.2 YÖNTEM

### 3.2.1 Tohumların Çimlendirilmesi ve Büyütülmesi

Reyhan tohumları %70 torf ve %30 perlit karışımı ihtiva eden viyoller içerisinde her gözeneğe bir tohum ekilerek çimlendirilmiştir. Viyollerde reyhan fideleri 5-6 yapraklı hale geldiklerinde tarla kapasiteleri hesaplanmış perlit-torf-cocopit karışımı içeren 4kg'lık saksılara aktarılmıştır. Saksılara aktarılan fideler yaklaşık 42 gün Hoagland besi çözeltisi ve su verilerek büyütülmüştür.

Deneme için saksıların tarla kapasitelerinin %100 (kontrol), %75 ve %50' si olacak şekilde su verilerek üç adet sulama grubu oluşturulmuştur. Uygulamayı takiben saksılara 1, 6, 10, 14 ve 20. günlerde toprak kapasiteleri hesaplanarak sulama yapılmıştır. 20. Gün sonunda bitkiler hasat edilerek deney materyali olarak kullanılmıştır. Her uygulama grubu dört saksı, her bir saksı altı bitki içerecek şekilde dokuz grup oluşturulmuştur.

1. Grup: Kontrol (%100 tarla kapasitesi)
2. Grup: %100 tarla kapasitesi + 1 mM fenilalanin
3. Grup: %100 tarla kapasitesi + 10 mM fenilalanin
4. Grup: % 75 tarla kapasitesi
5. Grup: % 75 tarla kapasitesi + 1 mM fenilalanin
6. Grup: % 75 tarla kapasitesi + 10 mM fenilalanin
7. Grup: % 50 tarla kapasitesi
8. Grup: % 50 tarla kapasitesi + 1 mM fenilalanin
9. Grup: % 50 tarla kapasitesi + 10 mM fenilalanin

Su stresi denemelerinde her sulamada saksılara verilecek sulama suyu miktarları aşağıdaki eşitlik yardımıyla hesaplanmıştır.

$$AW = (W_{fc} - W_a) \times P$$

Eşitlikte AW, her sulamada uygulanacak su miktarını (litre);  $W_{fc}$  saksıların tarla kapasitesi ağırlıklarını (kg),  $W_a$  sulama öncesi saksı ağırlığını ve P ise su uygulama katsayısını (sulama konuları için su uygulama katsayıları sırasıyla 1.0, 0.75 ve 0.50) göstermektedir. Toprağın yerçekimine karşı tutabildiği en yüksek nem yüzdesini ifade eden tarla kapasitesi her bir saksı için deneme başlangıcında belirlenmiştir. Kontrol ve uygulama yapılan bitkilerin fotoğrafları sayfa 74’de Ekler bölümünde verilmiştir.

### 3.2.2 Yaş ve Kuru Ağırlıkların Belirlenmesi

Stres uygulamaları sonucunda hasat edilen bitkiler terazide tartılarak yaş ağırlıkları belirlenmiştir. Yaş ağırlıkları belirlenen bitkiler 65 °C etüvde 48 saat süreyle kurutulmuştur. Kurutulan bitkiler tekrar terazi ile tartılarak kuru ağırlıkları belirlenmiştir.

### 3.2.3 Stresle İlgili İncelenen Parametreler

#### Klorofil ve Karotenoid Tayini

Yaprak dokularında bulunan toplam klorofil ve karotenoid miktarlarını belirlemek amacıyla 0.25 g yaprak % 80'lik (w/v) 5 mL aseton içinde homojenize edilmiştir. Homojenat 3000xg 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı alınarak absorbansları 663, 645 ve 450 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçülmüştür. Elde edilen absorbans değerlerine bağlı olarak klorofil miktarı Arnon (1949) ve karotenoid miktarı ise Jaspars (1965) yöntemiyle hesaplanmıştır.

$$\text{Klorofil a} = 12.7 \times A_{663} - 2.69 \times A_{645}$$

$$\text{Klorofil b} = 22.9 \times A_{645} - 4.68 \times A_{663}$$

$$\text{Total klorofil} = 20.2 \times A_{645} + 8.02 \times A_{663}$$

$$\text{Karotenoid} = 4.07 \times A_{450} - (0.0435 \times \text{kla miktarı} + 0.3367 \times \text{klb miktarı})$$

#### Protein Miktarı Tayini

0.30 g yaprak dokusu 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH=7.5) tamponu içerisinde homojenize edilmiştir. Homojenat 4°C ve 15000xg'de 20 dakika santrifüj edilir. 50 µL alınır 2.5 mL Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi bulunduran tüplere ilave edilmiş ve tüpler vortekslenmiştir. 10 dakikalık bir inkübasyon süresinden sonra numunelerin absorbansları 595 nm'de okutulmuştur. Sığır serum albümininden hazırlanan standart grafik yardımıyla numunelerde bulunan protein miktarı belirlenmiştir (Bradford, 1976).

Standart grafik için 1mg/1mL protein içeren sığır serum albumin çözeltisi hazırlanarak stok çözelti oluşturulmuştur. Stok çözeltiden 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50 ve 60 µL tüm tüplere pipetleme yapılmıştır. Saf su ile son hacim 100 µL'ye tamamlanmıştır. Her tüpe 2.5 mL Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi ilave edilerek vortekslenmiştir. Vorteklendikten sonra 10 dakikalık inkübasyon süresinden sonra numunelerin absorbansları 595 nm'de ölçülmüştür.

### **Prolin Tayini**

0.3 g yaprak sülfosalisilik asitle homojenize edilir. Homojenat filtre kâğıdından süzölmüştür. 1 mL numune üzerine 1 mL %96'lık glasiyel asetik asit ve 1 mL asit ninhidrin ilave edilmiş, 100<sup>0</sup>C'de 1 saat inkübe edildikten sonra tüpler buz banyosuna alınarak reaksiyon durdurulmuştur. Daha sonra her bir tüpün üzerine 2'şer ml tolüen ilave edilmiş ve tüplerin üst kısmında oluşan pembe renkli fazın absorbansı 520 nm'de ölçölmüştür. Yapraklardaki prolin miktarı standart grafikten faydalanılarak hesaplanmıştır (Bates ve ark., 1973).

Standart grafik için 10 mg saf prolin 50 mL distile suda çözölerek hazırlanan stok çözeltisinden 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µL tüplere sırasıyla pipetleme yapılmıştır. Tüplerde son hacim saf su ile 1 mL'ye tamamlandıktan sonra 1mL %96'lık glasiyel asetik asit ve 1 mL nihidrin eklenmiştir. Tüm pipetlemeler yapıldıktan sonra tüpler 1 saat 100<sup>0</sup>C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında tüm tüplere 2 mL tolüen ilave edilip vortekslenmiştir. Vortekslemeden sonra 5 dakika bekletilerek bütün tüplerin üst kısmında oluşan pembe fazın absorbansı 520 nm'de ölçölmüştür.

### **Malondialdehid (MDA) Tayini**

Kontrol ve uygulama gruplarının yaprak dokusundan alınan 0.4 g numune, 4 mL %0.1 lik (w/v) TCA ile homojenize edilir daha sonra 10000xg'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Oluşan süpernatantdan 0.5 mL alınarak üzerine 1 mL % 0.5 TBA içeren TCA ilave edilmiştir, 95 <sup>0</sup>C'de 30 dakika inkübe edildikten daha sonra buz banyosunda soğütularak reaksiyon durdurulmuştur. Ekstrakt 15 dakika 10000xg'de tekrar santrifüj edilerek spektrofotometrede 532 nm'de absorbansları ölçölmüş ve sonuçlar kaydedilmiştir. Non-spesifik absorbsiyonlar için her bir numunenin 600 nm'deki absorbansı alınarak absorbanstan düşölmüştür. Malondialdehit konsantrasyonu 155mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> ekstinksiyon katsayısı kullanılarak hesaplanmıştır (Velikova ve ark., 2000).

### **Hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) Tayini**

0.25 g yaprak dokusu alınan 2.5 mL % 0.1'lik (w/v) TCA içerisinde parçalanarak oluşturulan homojenat 12000xg'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. 0.5 mL süpernatanttan alınarak üzerine 0.5 mL 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tamponu (pH=7) ve 1 mL 1 M KI eklenir. Hazırlanan karışım 390 nm'deki absorbansı köre karşı ölçülmüştür. Kör olarak 1 mL 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tamponu ve 1 mL KI kullanılmıştır. Daha sonra Hidrojen peroksitten hazırlanan standart grafikten yararlanılmıştır. (Velikova ve ark. 2000).

Standart grafik için 163 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stok çözeltisinden sırasıyla 50, 100, 200, 300, 400, 500 ve 700 µl pipetlenmiştir. Her bir tüpe 1mL 1 M KI ilave eklenmiştir. Son hacim 10 mM fosfat tamponu ile 2 mL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan tüplerin absorbanları 390 nm'de okutularak kaydedilmiştir. Kör için 1 mL KI ve 1 mL fosfat tamponu kullanılmıştır.

### **3.2.4 Antioksidan Enzim Aktivitesi**

#### **Peroksidaz Aktivite (POD) Tayini**

Peroksidaz aktivite ölçümünde 3 ml 90 mM fosfat tamponu (pH:6), 1ml 22.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 1 ml 45 mM guaiacol ve 100 µl enzim ekstraktı içerir. En son süpernatant eklenmesiyle reaksiyon başlatılır ve 3 dakika 470 nm'de optik dansitesi kaydedildi. Bir enzim ünitesi bir dakikada 1 µmol guaiacol'u katalizleyen enzim miktarı olarak hesaplanır (Angelini ve ark., 1990). Tetraquaiacol'ün ekstinksiyon katsayısı 26.6 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>dir. Enzim miktarı gram yaprak başına enzim ünitesi (EÜ/mg protein) cinsinden ifade edilmiştir.

#### **Askorbat Peroksidaz Aktivite (APX) Tayini**

Reaksiyon ortamındaki askorbik asidin oksidasyonunun 290 nm'de ölçülmesiyle spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Reaksiyon karışımı 1.7 ml 70 mM potasyum fosfat tamponu (pH=6.5), 1 ml 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0.25ml 2.5 mM askorbat asit, 100 µl

enzim ekstraktı ihtiva eder. Askorbatın 290 nm'deki ekstinksiyon katsayısı ( $2.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  290 nm) kullanılarak enzim ünitesi hesaplanmıştır. Sonuçlar gram taze yaprak başına enzim ünitesi cinsinden (EU/g yaprak) hesaplanmıştır (Noriega ve ark., 2004).

### **Süperoksit Dismutaz Aktivite (SOD) Tayini**

SOD aktivite tayini süperoksit anyonları ile nitroblue tetrazoliumun formazon oluşturulur ve bu bileşiğin 560 nm'de absorbansı ölçülerek belirlenir. Reaksiyon karışımına; 50 mM fosfat tamponu (pH=7.8), 13 mM metiyonin, 60  $\mu\text{M}$  nitroblue tetrazolium, 0.1 mM EDTA, ve 1  $\mu\text{L}$  enzim ekstraktı konulmuştur. Reaksiyon çözeltisine son olarak 2  $\mu\text{M}$  riboflavin ilave edilmiş ve 30 dakika ışıktta (4000-4500 lux) bekletilmiştir. Işık kapatılarak reaksiyon durdurulup çözeltinin 560 nm'deki absorbansı ölçülmüştür. Absorbans artışını %50 inhibe eden enzim miktarı bir enzim ünitesi olarak kabul edilmiştir. Sonuçlar gram yaprak başına enzim ünitesi (EÜ/mg protein) cinsinden hesaplanmıştır (Hodges and Forney, 2000).

### **3.2.5 Antioksidan Aktivitesi**

Antioksidan aktivite testleri için kontrol ve uygulama gruplarından 0.2 g bitki dokusu 10 mg/mL doku olacak şekilde metanol-kloroform (4:1) ile homojenize edilerek vortekslendikten sonra 30 dk sonikatör de bekletilerek ekstraktlar hazırlanmıştır.

### **Serbest Radikal Giderim Aktivitesi (DPPH)**

Serbest radikal (DPPH $\cdot$ ) giderme aktivitesi Liyana-Pothirano (2005) metoduna göre yapılmıştır (Lıyana-Pathirana ve Shaihidi, 2005). Yaprak ekstreleri hazırlanarak değişik konsantrasyonlarda (100-800  $\mu\text{g/mL}$ ) 1 mL 0.26 mM DPPH $\cdot$  (2,2-difenil-1-pikril hidrazil) ihtiva eden etanol çözeltisine ilave edilmiştir. Son hacim etanolle 4 mL'ye tamamlanmıştır. Negatif kontrol için 3 mL etanol + 1 mL DPPH karışımı ve kör olarakta etanol kullanılmıştır. Tüpler karanlıkta 30 dk bekletilerek spektrofotometrede

517 nm’de absorbansları ölçülmüştür. Örneklerin serbest radikal giderme aktiviteleri sonuçları IC<sub>50</sub> (mg/mL) değerleri hesaplanarak verilmiştir.

### **İndirgeme Gücü (FRAP) Aktivitesi**

Oyaizu (1986) metoduna göre indirgeme gücü aktivite tayini yapılmıştır. Örnek eksrelerinden 80 µL alınarak fosfat tamponu (0.2 M, pH: 6.6) ile 1.25 mL’ye tamamlandı. Üzerine 1.25 mL %1’lik potasyum ferrisiyanid (K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>) eklenmiştir. 50°C de 20 dakika inkubasyondan sonra 1.25 mL % 10’lük TCA çözeltisi ilave edilmiştir. Daha sonra çözelti üzerine 0.25 mL % 0,1’lik FeCl<sub>3</sub> eklenmiştir. Karışım iyice vortekslelendikten sonra 700 nm’ deki absorbans spektrofotometrede ölçülmüştür. Yaprak ekstraktlarının indirgeme gücü aktivitesi trolox eşdeğeri µmol/g kuru doku olarak hesaplanmıştır.

### **Süperoksit Anyon Giderme Aktivitesi**

Antioksidan aktivite tesleri için hazırlanan stok çözeltilerden 50 µL, 100 µL, ve 200 µL alınarak tüplere aktarılmıştır. Her tüpe 0.05 M, 1 mL metiyonin, 1.5x10<sup>-5</sup> M, 1 mL riboflavin ilave edilmiştir. Tüpler tampon ile 4 mL’ye tamamlanmış ve 5x10<sup>-4</sup> M 1 mL NBT eklenmiştir. Işık kabiniinde 25 dakika bekletilmiştir. Numunelerin absorbansı 560 nm’de ölçülmüştür. Deneyin esası süperoksit radikali giderme aktivitesi olan bileşiklerin varlığında düşük absorbans değerleri elde edilmektedir (Liu ve ark.,1997). Sonuçların IC<sub>50</sub> (mg/mL) değerleri hesaplanarak verilmiştir. Aşağıdaki formüle göre süperoksit anyonu giderme aktivitesi hesaplanmıştır.

$$O_2^- \text{ giderme aktivitesi (\%)} = (1 - A_s / A_c) \times 100$$

A<sub>c</sub> : kontrolün absorbansı

A<sub>s</sub> : örneklerin absorbansı

### 3.2.6 Fenolik Bileşiklerin Tayini

#### Total Fenolik Bileşik Tayini

Toplam fenolikbileşik tayini spektrofotometrik olarak belirlenmiştir (Kumaran ve Karunakaran, 2006). Antioksidan aktivite testlerinde kullanılan ekstratlar tüplere 100 µL konuldu ve son hacim saf su ile 4.5 mL'ye tamamlandı. 100 µl Folin–Ciocalteu reaktifi eklenerek 3 dk bekletildi ve üzerine 300 µL % 2'lik Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ilave edilmiştir. Karışım 2 saatlik bir inkübasyondan sonra spektrofotometrede absorbansı 415 nm'de ölçülmüştür. Numunelerdeki toplam fenolik miktarı Gallik asit ile hazırlanan standart grafiğe göre hesaplanmıştır.

Standart grafik için 0.1 mg/mL Gallik asit çözeltisinden 100, 200, 300, 400 ve 500 µL tüplere alınarak son hacim saf su ile 4.5 mL tamamlanır. Sonra her tüpe 100 µL Folin–Ciocalteu reaktifi eklenerek 3 dk bekletildi ve üzerine 300 µL % 2'lik Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ilave edilmiştir. Karışım 2 saat ortam koşullarında bekletildikten sonra spektrofotometrede absorbansı 415 nm'de ölçülmüştür.

#### Fenolik Grubu Bileşiklerin HPLC-DAD Cihazı ile Tayini

HPLC cihazı ile reyhan bitkisinde 10 tane fenolik bileşiğin (Gallik asit, Gentisik asit, 4-Hidroksi benzoik asit, Kafeik asit, Rutin, Sisorik asit, Ferulik asit, Rosmarinik asit, Kuersitin, Vanilik asit) analizi yapılmıştır. Reyhan yaprakları sıvı azot ile havanda öğütüldükten sonra metanol/diklorometan karışımında homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenat antioksidan aktivite testlerinde ve fenolik bileşik analizinde kullanılmıştır. Ekstrakt çözeltileri 1:20 oranında seyreltilip, 0.45 mikronluk filtrelerden şırınga yardımıyla süzülerek viallere konulmuş ve HPLC-DAD'a verilmiştir. 10 adet fenolik standartın 100, 50, 25, 10, 5, 2.5, 1.25 ppm'lik karışım çözeltileri hazırlanarak HPLC-DAD a verilmiştir. Her bir fenolik bileşiğin alıkonma süreleri belirlenerek kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur. Kalibrasyon eğrilerinden yararlanılarak cihaza verilen örneklerdeki fenolik bileşiklerin miktarları mg / kg kuru reyhan olarak hesaplanmıştır.

### 3.2.7 İstatistiksel Analizler

Kontrol ve uygulama grupları arasındaki farklılıklar Duncan çoklu aralık testine göre  $p<0,05$  önemlilik değeriinde yapılmıştır. Her grup üç tekrarlı yapılmıştır. İstatistiksel analizler SPSS for Windows 20 Standart Versiyon paket programı ile yapılmıştır. Kontrol ve uygulama gruplarındaki farklılıkların belirlenmesinde tek yönlü varyant analizi (one-way ANOVA) kullanılmıştır (Duncan, 1955).



## 4. BULGULAR

### 4.1 Yaş ve Kuru Madde Miktarı

Reyhan bitkisinin gelişiminde farklı sulama seviyeleri (%100, 75 ve 50) ve fenilalanin uygulamalarının (1 mM ve 10 mM) bitki yaş ve kuru ağırlıkları üzerine etkileri Çizelge 4.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 4. 1. Sulama ve fenialanin uygulamalarının mor ve yeşil reyhan bitkisinin toprak üstü aksamının yaş ve kuru ağırlıkları üzerine etkisi

| Uygulamalar        | Yaş ağırlık (g/bitki) |               | Kuru ağırlık (g/bitki) |               |
|--------------------|-----------------------|---------------|------------------------|---------------|
|                    | Mor                   | Yeşil         | Mor                    | Yeşil         |
| Kontrol            | 23.1                  | 15.2          | 1.32                   | 1.23          |
| % 100 Su 1 mM Phe  | 24.5                  | 14.5          | 1.22                   | 1.16          |
| % 100 Su 10 mM Phe | 21.2                  | 15.5          | 1.26                   | 1.24          |
| % 75 Su            | 20.4                  | 16.1          | 1.56                   | 1.14          |
| % 75 Su 1 mM Phe   | 14.9                  | 18.1          | 1.47                   | 1.13          |
| % 75 Su 10 mM Phe  | 23.5                  | 17.5          | 1.74                   | 1.24          |
| % 50 Su            | 20.2                  | 17.2          | 1.65                   | 1.16          |
| % 50 Su 1 mM Phe   | 19.3                  | 16.3          | 1.58                   | 1.20          |
| % 50 Su 10 mM Phe  | 19.5                  | 15.5          | 1.45                   | 1.13          |
| <b>Ort.</b>        | <b>20.7 a</b>         | <b>16.2 b</b> | <b>1.47 a</b>          | <b>1.18 b</b> |

\*\*P<0,01; \*P<0,05 önemlidir, Yaş ağırlıkları; Çeşitler \*, Uygulamalar \*, Ç X Uy.\*; Kuru ağırlıklar; Çeşitler \*, Uygulamalar \*, Ç x Uy.\*

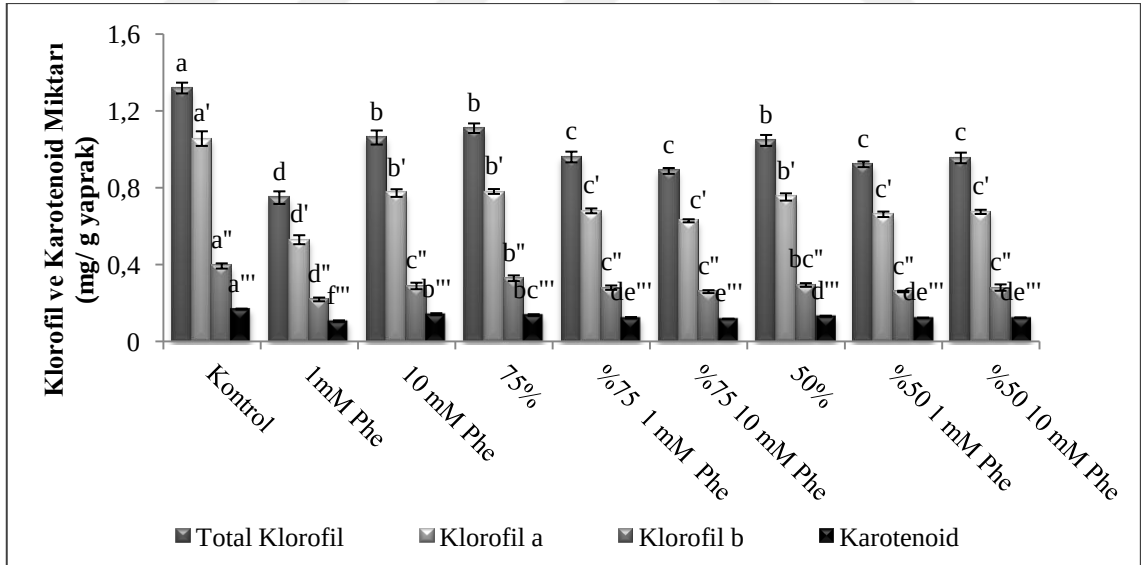
Bu çalışmada reyhan genotiplerinin uygulamalara göstermiş olduğu performans istatistiksel olarak farklı sonuçlar vermiştir. Yeşil reyhan genotipinde ortalama yaş ağırlık 16.2 g/bitki iken mor reyhan da ortalama 20.7 g/bitki olmuştur. Çalışmada en yüksek yaş ağırlık yeşil reyhanda %75 su + 1 mM Phe uygulamasında olurken mor reyhanda ise %100 su + 1 mM Phe uygulamasında görülmüştür. Kuraklık uygulaması mor reyhanda yaş ağırlıkta azalmaya sebep olurken yeşil reyhanda artmaya sebep olmuştur.

Phe uygulamaları mor ve yeşil reyhanda farklı tepkiler göstermiştir. Kuru ağırlık ortalamaları yeşil reyhanda 1.18 g/bitki iken mor reyhanda 1.47 g/bitkidir. Kuraklık mor reyhanda kuru ağırlığı azaltırken yeşil reyhanda kuru ağırlıkları yaşı artırmıştır.

#### 4.2 Klorofil ve Karotenoid Sonuçları

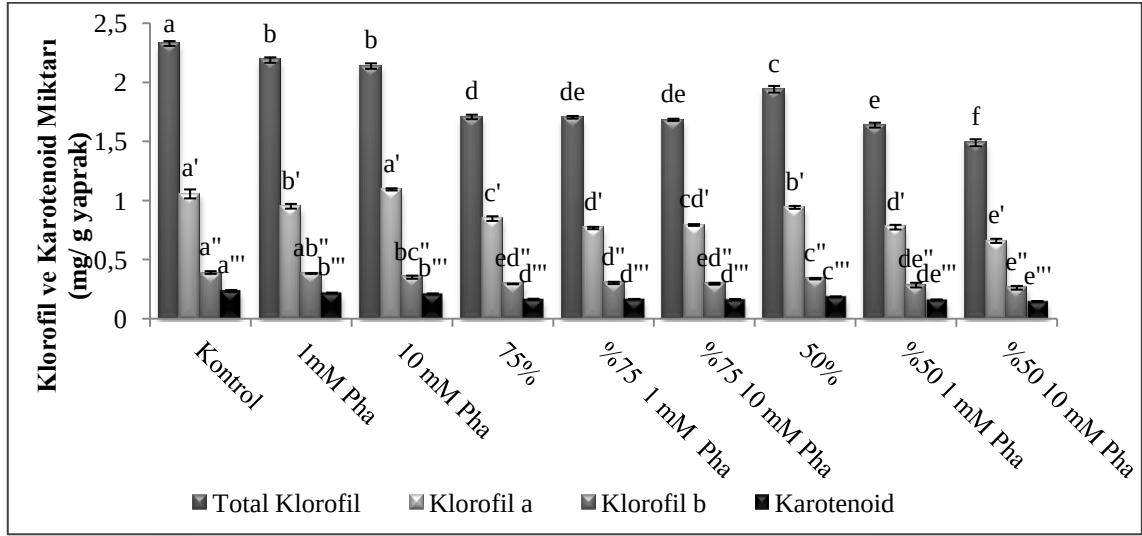
Yeşil ve mor reyhan genotiplerinin kuraklık stresi ve fenilalanin uygulamaları sonucu toplam klorofil, klorofil a, klorofil b ve karotenoid içeriği değişimi Şekil 4.1 ve Şekil 4.2' de gösterilmiştir. Yeşil reyhan yapraklarında kuraklık stresi sonucu total klorofil, K<sub>la</sub>, K<sub>lb</sub> ve karotenoid miktarlarını önemli oranda azaltmıştır. Fenilalanin yalnız ve kuraklıkla birlikte uygulandığında total klorofil, k<sub>la</sub>, k<sub>lb</sub> ve karotenoid miktarlarının önemli oranda azalmasına neden olmuştur ( $P < 0,05$ ).

Fenilalanin uygulamasının fotosentetik pigmentler üzerinde herhangi bir koruyucu etkisi görülmemiştir.



Şekil 4. 1. Yeşil reyhanda kuraklık ve fenilalanin uygulamalarının klorofil ve karotenoid miktarı üzerine etkisi

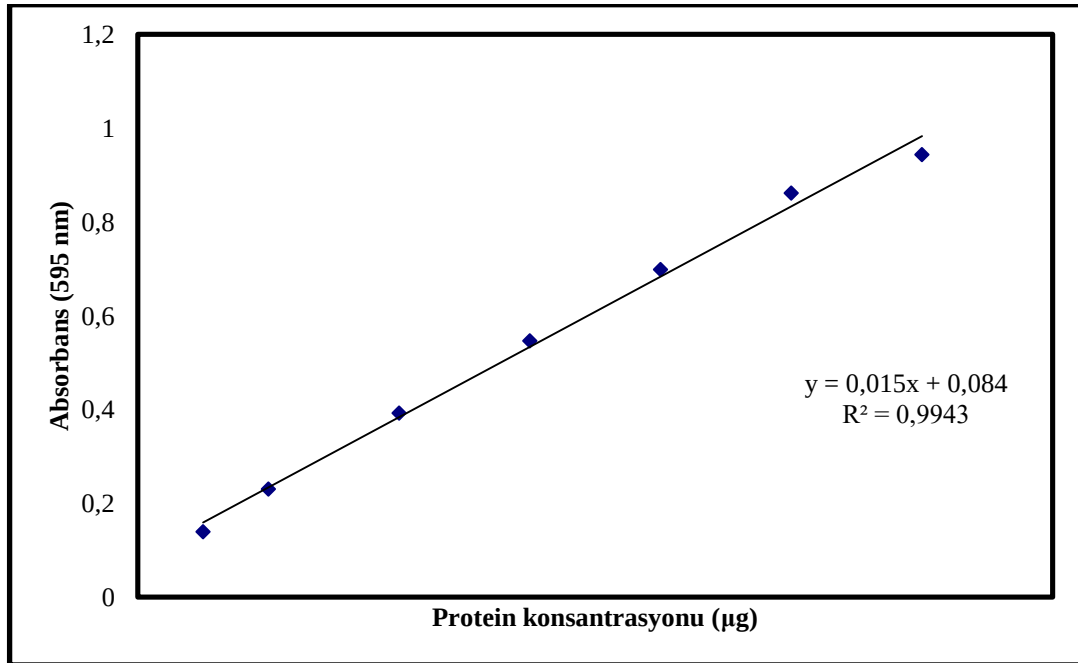
Kuraklık stresi mor reyhan yapraklarında total klorofil, k<sub>la</sub>, k<sub>lb</sub> ve karotenoid miktarlarını önemli oranda azaltmıştır. Fenilalanin uygulaması yalnız ve kuraklıkla birlikte uygulandığında mor reyhan yapraklarında fotosentetik pigmentleri önemli oranda azaltmıştır ( $P < 0,05$ ). Kuraklık ve fenilalanin uygulaması yeşil ve mor reyhan genotiplerinde fotosentetik pigmentler üzerinde benzer etkiler göstermiştir.



Şekil 4. 2. Mor reyhanda kuraklık ve fenilalanin uygulamalarının klorofil ve karotenoid miktarı üzerine etkisi.

#### 4.3 Protein Sonuçları

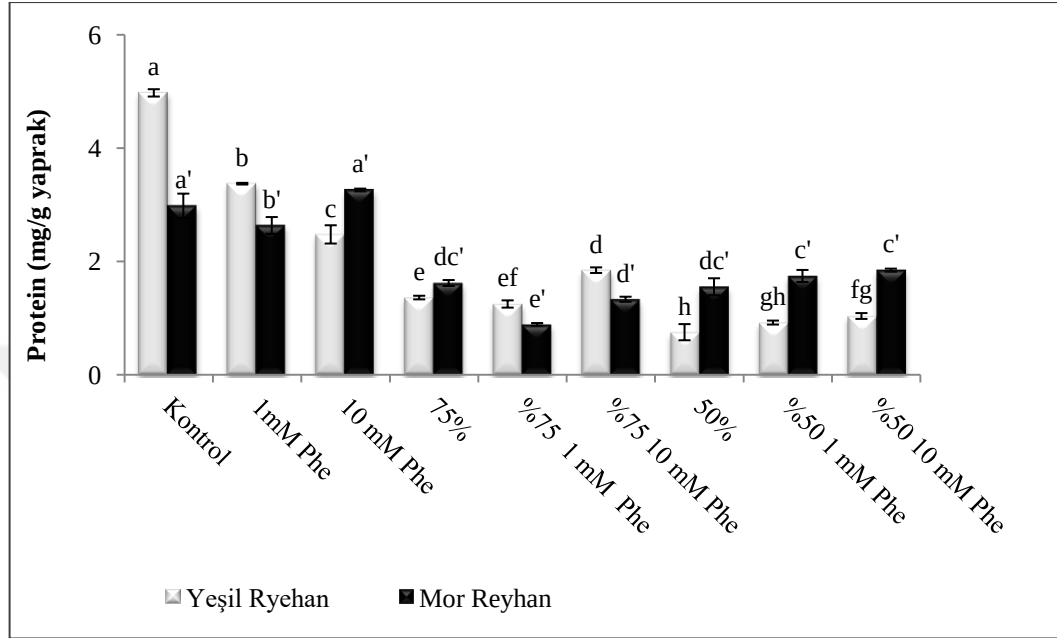
Kontrol ve uygulama gruplarının protein miktarları Şekil 4.3'de gösterilen standart grafikten yararlanılarak hesaplanmıştır.



Şekil 4. 3. Protein standart grafiği.

Yeşil ve mor reyhan yapraklarında protein miktarları farklılık göstermektedir (Şekil 4.4). Kuraklık stresi yeşil ve mor reyhan yapraklarında protein miktarının önemli oranda

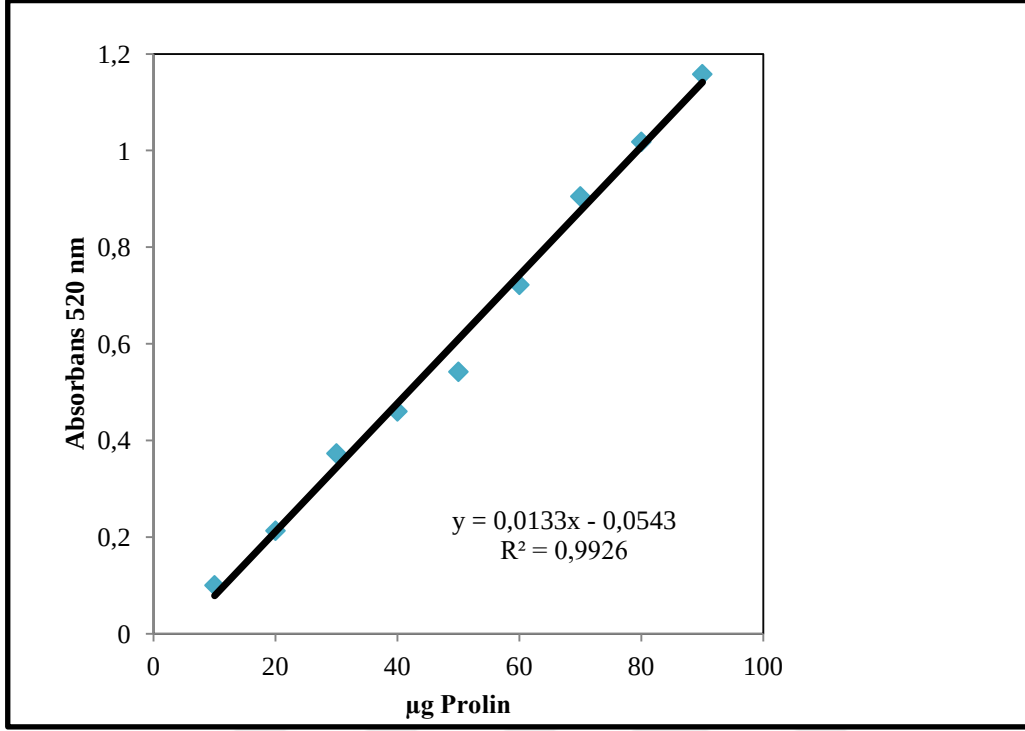
azalmasına neden olmuştur. %50 kuraklık + 10mM Phe uygulaması yeşil ve mor reyhan yapraklarında kuraklığın neden olduğu protein kaybını azaltmıştır. 10 mM Phe uygulaması mor reyhanda protein miktarını artırmıştır ( $P<0.05$ ).



Şekil 4. 4. Kuraklık ve fenilalanin uygulamalarının mor ve yeşil reyhan yapraklarında protein miktarı üzerine etkisi.

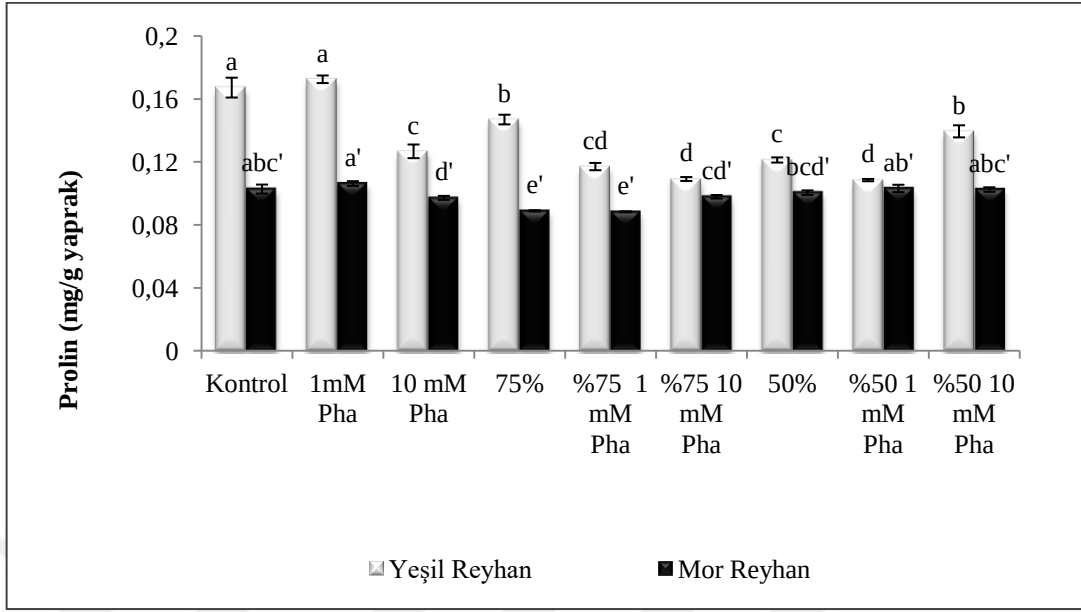
#### 4.4 Prolin Sonuçları

Kontrol ve uygulama gruplarının prolin miktarları Şekil 4.5’de ki standart grafikten yararlanılarak hesaplanmıştır.



Şekil 4. 5. Prolin standart grafiği.

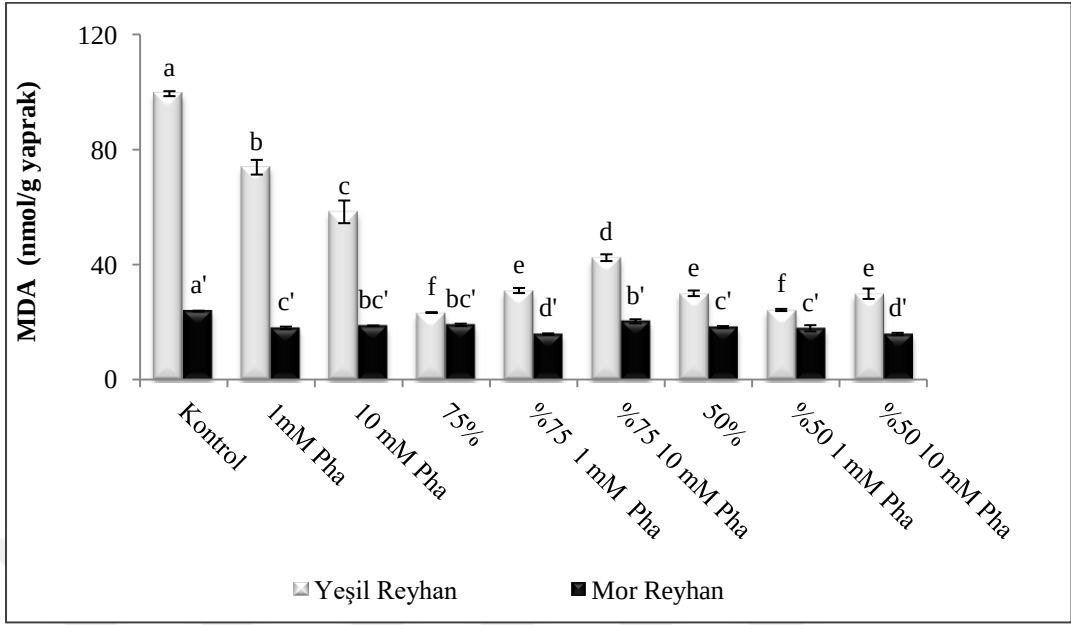
Kuraklık uygulaması yeşil ve mor reyhanda prolin miktarlarını kontrol grubuna göre önemli oranda azaltmıştır. Ancak kuraklık stresi yeşil reyhanda mor reyhana göre prolin miktarını daha fazla azaltmıştır (Şekil 4.6). %50'lik kuraklık+10 mM'lık fenilalanin uygulaması kuraklık stresine göre yeşil reyhan da prolin miktarını kısmi oranda artırırken mor reyhan genotiplerinde önemli artışa neden olmuştur ( $P<0.05$ ).



Şekil 4. 6. Kuraklık ve fenilalanin uygulamalarının yeşil ve mor reyhan genotiplerinde prolin miktarı üzerine etkisi.

#### 4.5 Malondialdehit Sonuçları

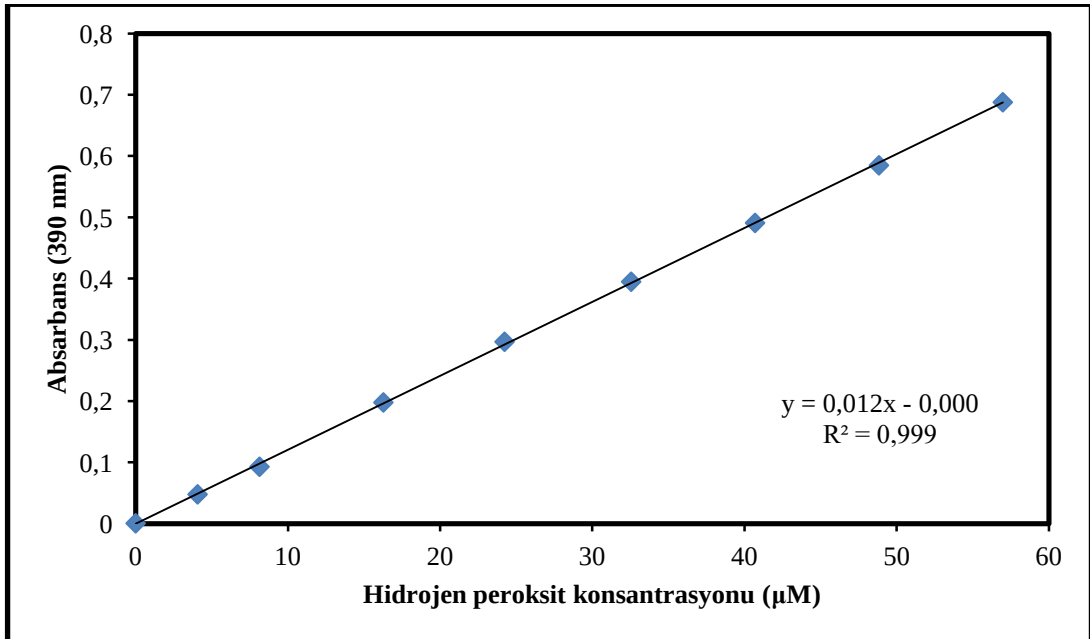
Kuraklık ve fenilalanin uygulamalarının yeşil ve mor reyhan genotiplerinde lipid peroksidasyonu üzerine etkileri Şekil 4.7’de gösterilmiştir. Malondialdehit miktarının mor reyhanda yeşil reyhana oranla oldukça fazla olduğu gözlenmektedir. Kuraklık stresi yeşil ve mor reyhan genotiplerinin yapraklarında lipid peroksidasyonunu azaltmıştır. Fenilalanin uygulamaları yeşil ve mor reyhan yapraklarında kontrole göre MDA miktarını azaltmıştır ( $P < 0.05$ ).



Şekil 4. 7. Kuraklık ve fenilalanin uygulamalarının mor ve yeşil reyhan yapraklarında lipid peroksidasyonuna etkisi.

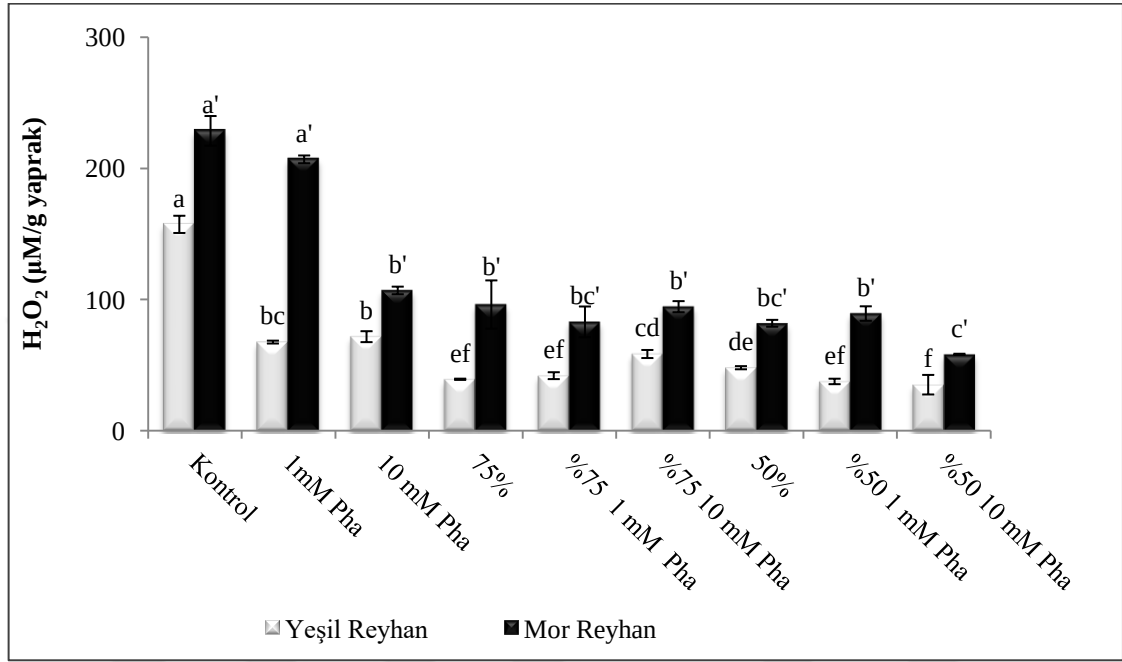
#### 4.6 Hidrojen Peroksit Miktarı Sonuçları

Kontrol ve uygulama gruplarının hidrojen peroksit miktarları Şekil 4,8’da gösterilen standart grafikten yararlanılarak hesaplanmıştır.



Şekil 4. 8. Hidrojen peroksit standart grafiği.

Mor reyhan yapraklarında hidrojen peroksit miktarı yeşil reyhan yapraklarına göre daha fazla olduğu gözlenmiştir (Şekil 4. 9). Kuraklık uygulaması her iki reyhanda da hidrojen peroksit miktarını önemli oranda azaltmıştır. Fenilalanin uygulaması kontrole göre hidrojen peroksit miktarının düşmesine sebep olmuştur ( $P<0.05$ ).

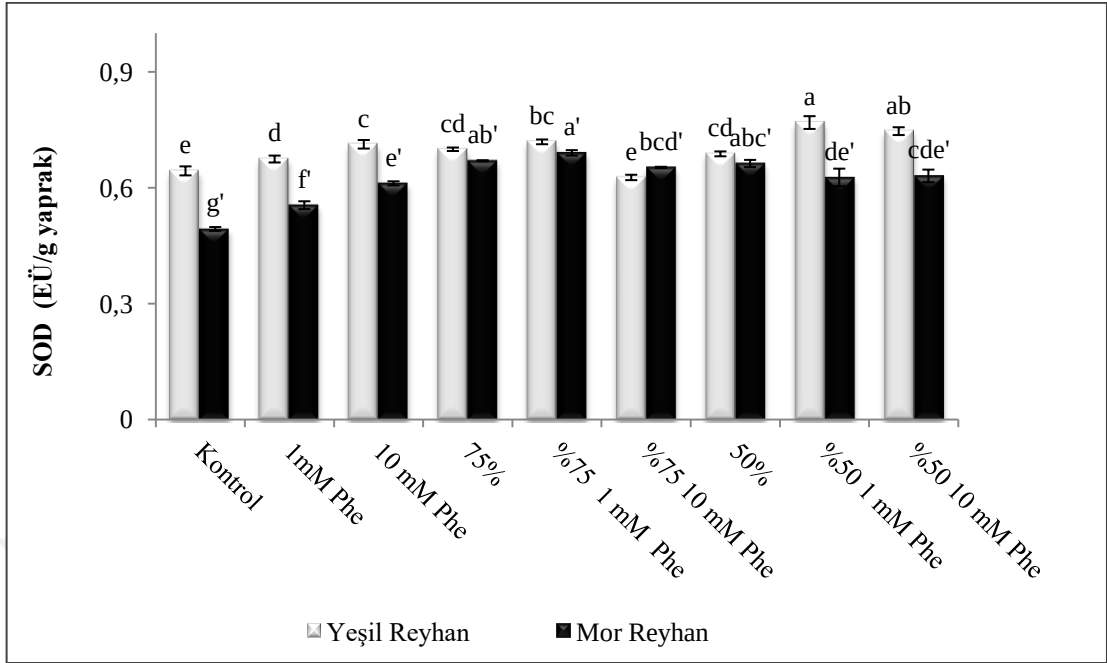


Şekil 4. 9. Mor ve yeşil reyhan yapraklarında kuraklık ve fenilalanin uygulamasının hidrojen peroksit miktarı üzerine etkisi.

#### 4.7 Antioksidan Enzim Aktiviteleri

##### 4.7.1 Süperoksit Dismutaz Aktivite Sonuçları

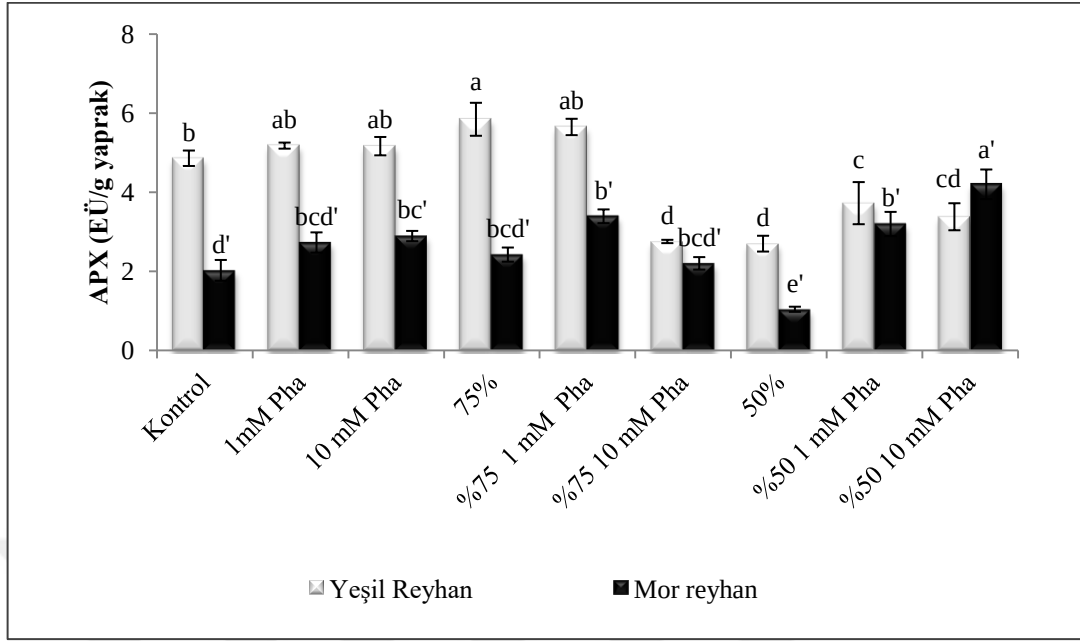
Kuraklık ve fenilalanin uygulaması mor ve yeşil reyhan genotiplerinde SOD aktivitesini kontrole göre artırmıştır (Şekil 4.10). %50'lik kuraklık+fenilalanin uygulaması yeşil reyhan yapraklarında SOD aktivitesini kuraklık uygulamasına göre önemli oranda artırırken mor reyhan yapraklarında azaltmıştır ( $P<0.05$ ).



Şekil 4. 10. Kuraklık ve fenilalanin uygulamalarının mor ve yeşil reyhan yapraklarında SOD aktivitesi üzerine etkileri.

#### 4.7.2 Askorbat Peroksidaz Aktivite Sonuçları

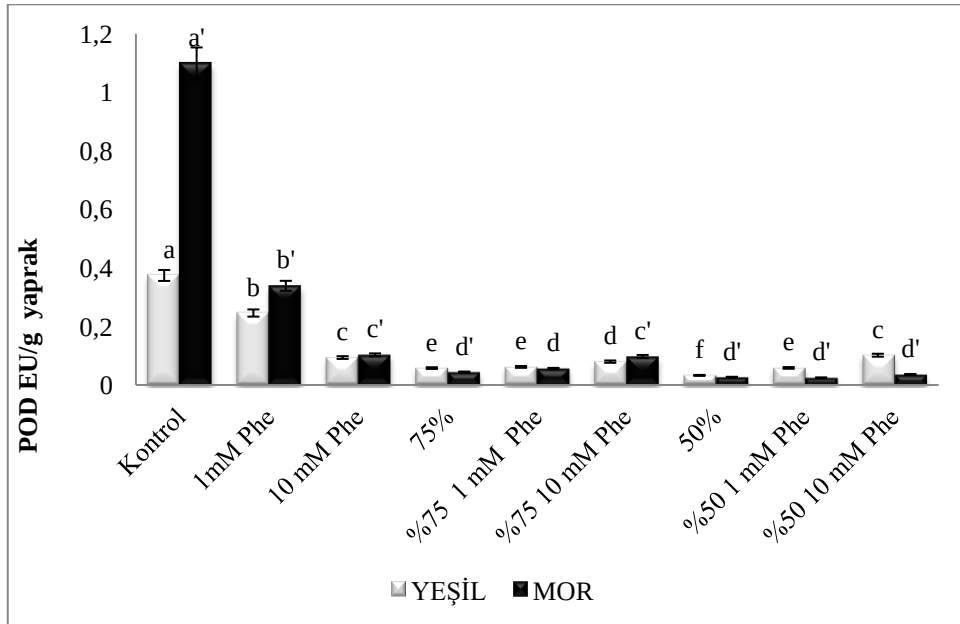
Düşük kuraklık stresi yeşil ve mor reyhan genotiplerinde askorbat peroksidaz aktivitesini kontrol grubuna göre artırmıştır (Şekil 4.11). Fakat kuraklık stresi daha da arttığında APX aktivitesinde azalma görülmüştür. Yalnız başına fenilalanin uygulamaları yeşil ve mor reyhan yapraklarında APX aktivitesini artırdığı görülmüştür ( $P<0,05$ ).



Şekil 4. 11. Kuraklık ve fenilalanin uygulamalarının yeşil ve mor reyhan yapraklarında APX aktivitesi üzerine etkisi.

#### 4.7.3 Peroksidaz Aktivite Sonuçları

Kuraklık ve fenilalanin uygulamalarının yeşil ve mor reyhan yapraklarında peroksidaz aktivite sonuçları üzerine etkisi Şekil 4.12' de gösterilmiştir. Kuraklık ve fenilalanin uygulamaları yeşil ve mor reyhan yapraklarında peroksidaz aktivitesinin kontrole göre önemli oranda azalmasına sebep olmuştur ( $P < 0,05$ ).

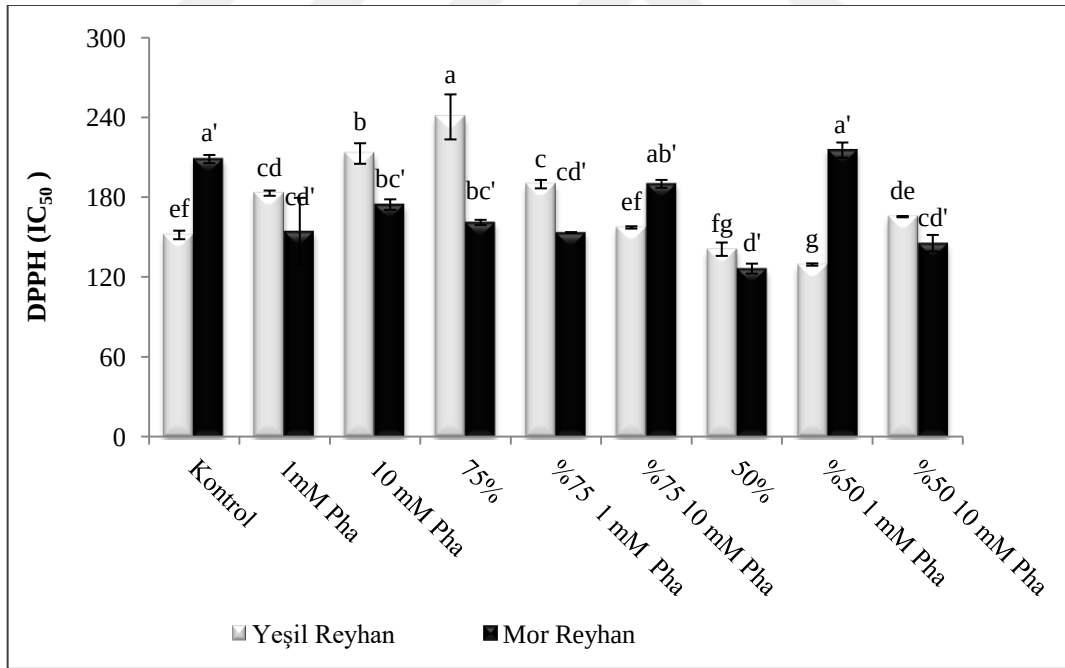


Şekil 4. 12. Kuraklık ve fenilalanin uygulamalarının yeşil ve mor reyhanda POD aktivitesi üzerine etkisi.

#### 4.8 Antioksidan Aktivite Testleri

##### 4.8.1 Serbest Radikal Giderim Aktivitesi (DPPH<sup>•</sup>) Sonuçları

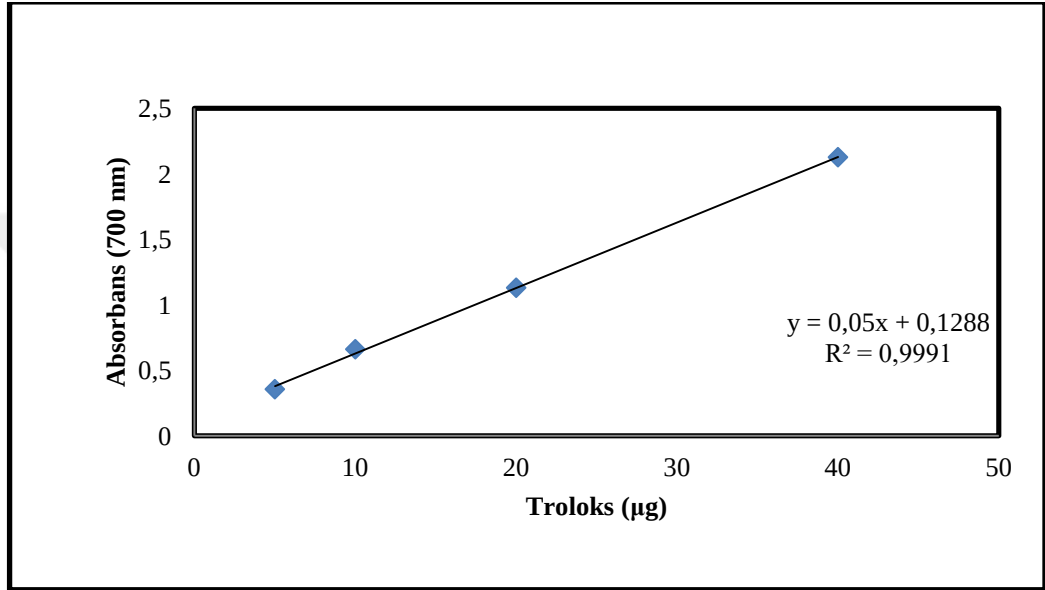
Yeşil reyhan yapraklarında fenilalanin ve %75'lik kuraklık uygulamaları IC<sub>50</sub> değerini önemli oranda artırdığından dolayı serbest radikal giderim aktivitesini azaltmıştır. Fakat %50'lik kuraklık uygulaması IC<sub>50</sub> değerini kontrole göre kısmi oranda azalttığından dolayı DPPH<sup>•</sup> radikal giderme aktivitesini artırmıştır (Şekil 4.13). Mor reyhan genotipinde fenilalanin ve kuraklık uygulamaları IC<sub>50</sub> değerini azalttığından dolayı DPPH radikal giderme aktivitesini artırdığı görülmüştür (P<0,05).



Şekil 4. 13. Kuraklık ve fenilalanin uygulamalarının yeşil ve mor reyhan yapraklarında serbest radikal giderim aktivitesi üzerine etkisi.

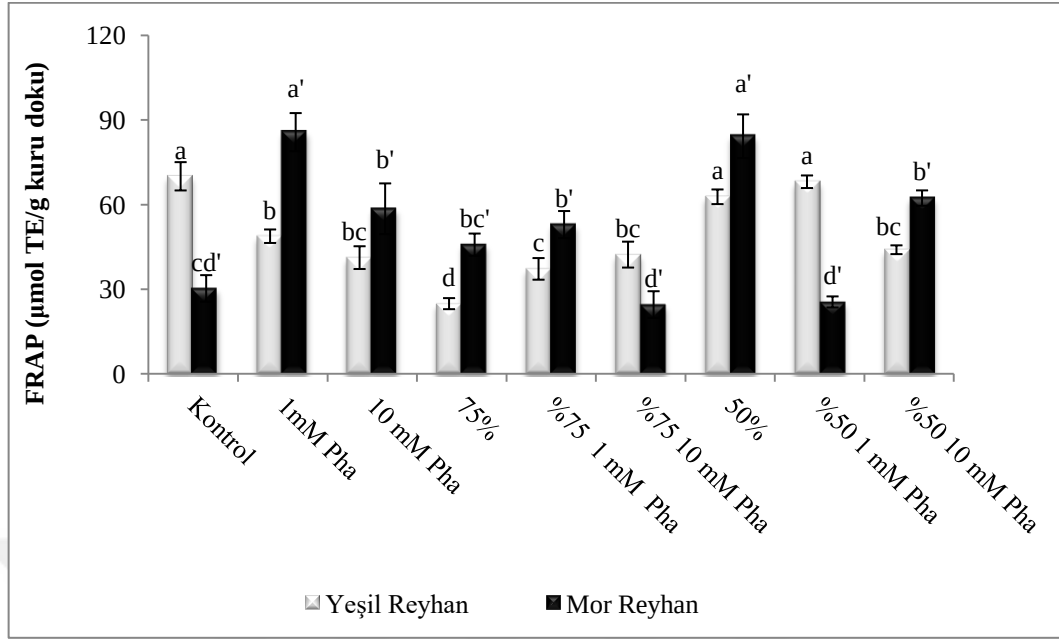
#### 4.8.2 İndirgeme Gücü Aktivite Sonuçları

Antioksidan indirgeme kapasitesi ölçümü Oyaizu (1986)' a göre yapıldı ve  $Fe^{+3}-Fe^{+2}$ 'ye değişimi sonucu oluşan metal kompleksinin konsantrasyona bağlı olarak absorbans değerleri Trolox ile oluşturulan standart grafiğe göre hesaplanmıştır (Şekil 4.14).



Şekil 4. 14. İndirgeme gücü yöntemi uygulanarak elde edilen Troloxun kalibrasyon grafiği.

Yeşil reyhanda kuraklık stresi ve fenilalanin uygulamaları indirgeme gücü aktivitesini azaltmıştır. İndirgeme gücü aktivitesindeki azalma fenilalanin uygulamaları ve %75'lik kuraklık uygulamasında istatistikî açıdan önemlidir. Mor reyhan genotiplerin de fenilalanin ve kuraklık uygulamaları indirgeme gücü aktivitesini önemli oranda artırmıştır. Kuraklık stresindeki artışla birlikte mor reyhanda indirgeme gücü aktivitesi de önemli oranda artmıştır (Şekil 4.14) ( $P < 0,05$ ).

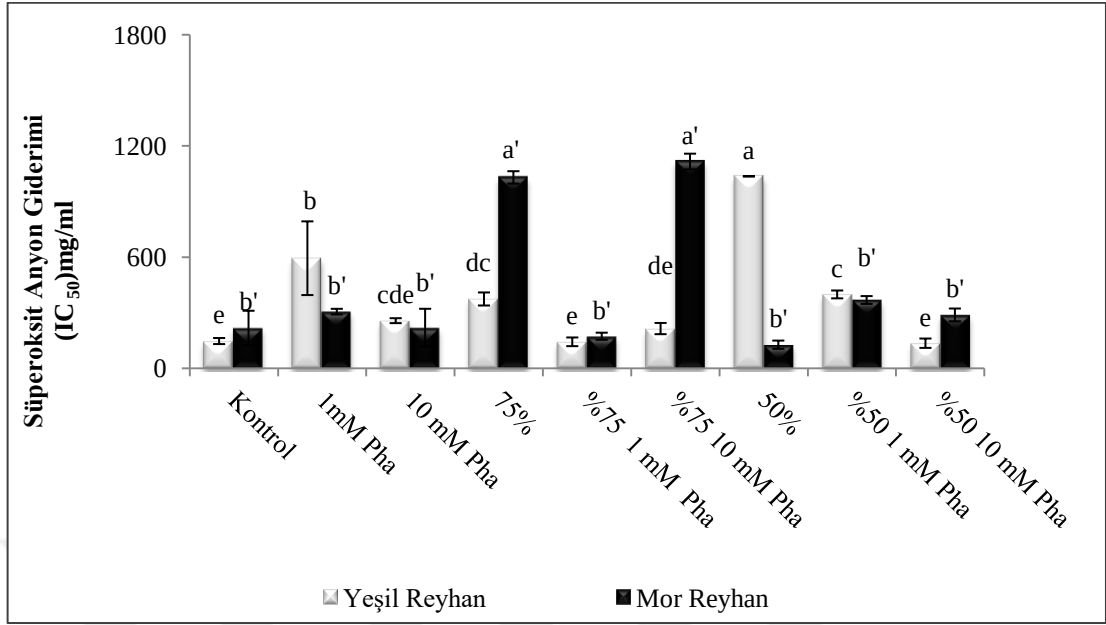


Şekil 4. 15. Kuraklık ve fenilalanin uygulamalarının mor ve yeşil reyhan genotiplerinde indirgeme gücü aktivitesi üzerine etkileri.

#### 4.8.3 Süperoksit Anyonu Giderim Aktivite Sonuçları

Süperoksit radikali giderme aktivitesi *in vitro* koşullarda riboflavin/metiyonin sistemi ile üretilen süperoksit radikalının NBT'yi indirgeme reaksiyonuna dayanmaktadır. Reaksiyon karışımının 560 nm'deki absorbansının azalması süperoksit anyonlarının giderildiğini ve antioksidan aktiviteyi göstermektedir. Süperoksit radikali giderme aktivitesi her bir absorbans değerinin IC<sub>50</sub> değeri hesaplanarak bulunmuştur.

Kuraklık stresi ve fenilalanin uygulamaları yeşil reyhan genotipinde IC<sub>50</sub> değerini artırdığından dolayı süperoksit anyonu giderim aktivitesini azaltmıştır. Mor reyhan yapraklarında fenilalanin uygulamaları sonucu IC<sub>50</sub> değeri arttığından dolayı süperoksit anyon giderme aktivitesi azalmıştır. Fakat mor reyhan genotipinde düşük kuraklık stresi (%75) IC<sub>50</sub> değerini artırırken yüksek kuraklık stresi (%50) IC<sub>50</sub> değerini azaltmıştır. Bu yüzden mor reyhan genotipinde düşük kuraklık stresi süperoksit anyon giderme aktivitesini azaltırken yüksek kuraklık stresi artırmıştır (P<0.05) (Şekil 4.16).

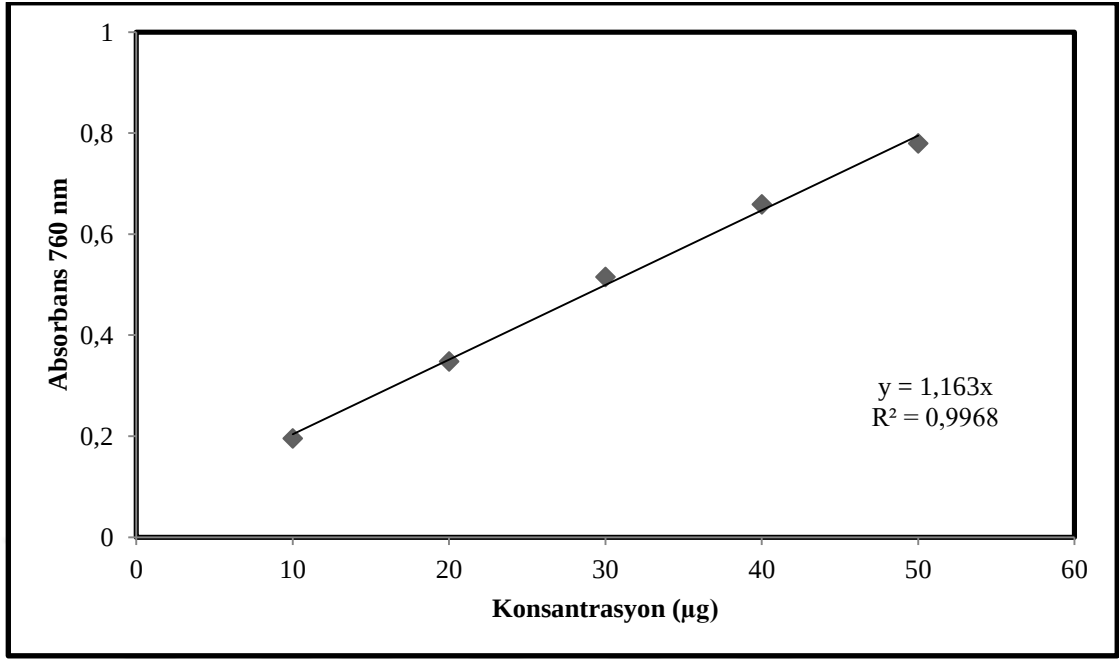


Şekil 4. 16. Kuraklık ve fenilalanin uygulamasının yeşil ve mor reyhan yapraklarında süperoksit anyon giderim aktivitesi üzerine etkileri.

#### 4.9 Fenolik Bileşiklerin Belirlenmesi

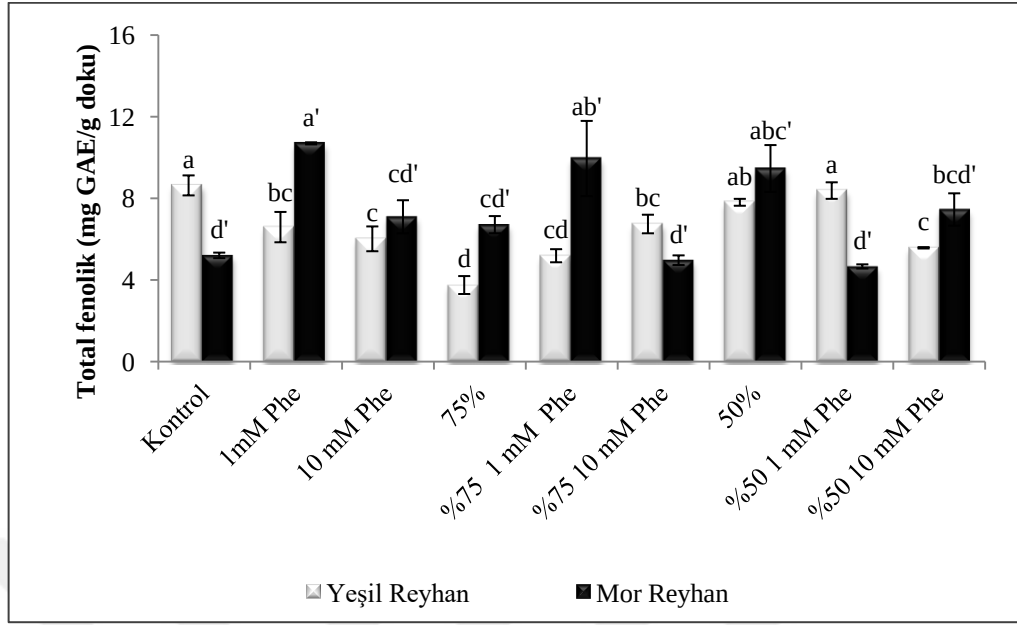
##### 4.9.1 Total Fenolik Bileşik Sonuçları

Fenolik bileşikler yapılarında bulunan fonksiyonel gruplar vasıtası ile elektron ve hidrojen verebilirler. Bu nedenle radikal ve oksitleyici ajanların zararını önlerler. Fenolik gruplar hidroksil grubu bakımından zengin olup OH'ler moleküle polar özellik kazandırır ve molekülün antioksidan kapasitesini artırır (Özenç, 2011). Kontrol ve uygulama gruplarındaki toplam fenolik bileşik miktarı gallik asitten hazırlanan kalibrasyon grafiğinden yararlanılarak gallik aside eşdeğer olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.17).



Şekil 4. 17.Gallik asit kalibrasyon eğrisi grafiği.

Kuraklık ve fenilalanin uygulamalarının yeşil ve mor reyhan genotiplerinde toplam fenolik bileşik miktarları üzerine etkisi Şekil. 18’de gösterilmiştir. Yeşil ve mor reyhan genotiplerinin total fenolik bileşik miktarları arasında önemli fark bulunmaktadır. Yeşil reyhan yapraklarının total fenolik miktarı mor reyhandan daha fazladır. Kuraklık stresi ve fenilalanin uygulaması yeşil reyhanın toplam fenolik bileşik miktarını önemli oranda azaltırken mor reyhanda artışa neden olmuştur ( $P<0.05$ ). Yeşil reyhan genotiplerinde kuraklık+fenilalanin uygulamaları kuraklık uygulamalarına göre toplam fenolik bileşik miktarını önemli oranda artırmıştır. Mor reyhan yapraklarında kuraklık+fenilalanin uygulamaları kuraklık şiddetine ve fenilalanin dozuna bağlı olarak toplam fenolik miktarını farklı şekilde etkilemiştir.



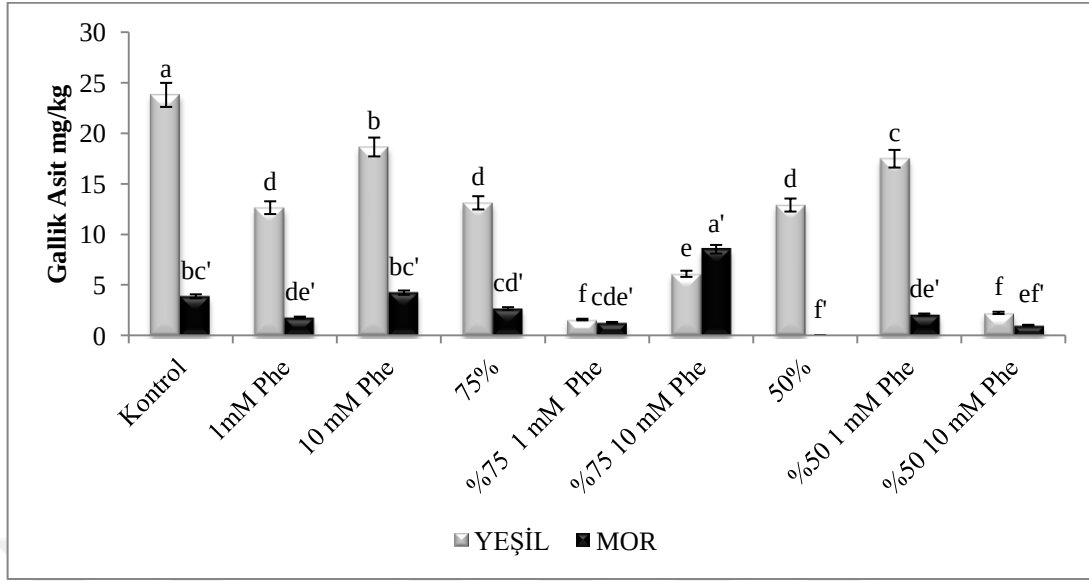
Şekil 4. 18. Kuraklık ve fenilalanin uygulamasının mor ve yeşil reyhan yapraklarında toplam fenolik bileşik miktarları üzerine etkisi.

#### 4.9.2 Bireysel Fenolik Bileşiklerin Sonuçları

Yeşil ve mor reyhan genotiplerinin kontrol ve uygulama gruplarında bireysel fenoliklerin miktarları (Gallik asit, gentisik asit, 4- Hidroksibenzoik asit, kafeik asit, rutin, sisorik asit, ferulik asit, rozmarinik asit, kuersetin ve vanilik asit) HPLC-DAD cihazı ile yapılmıştır.

##### Gallik Asit

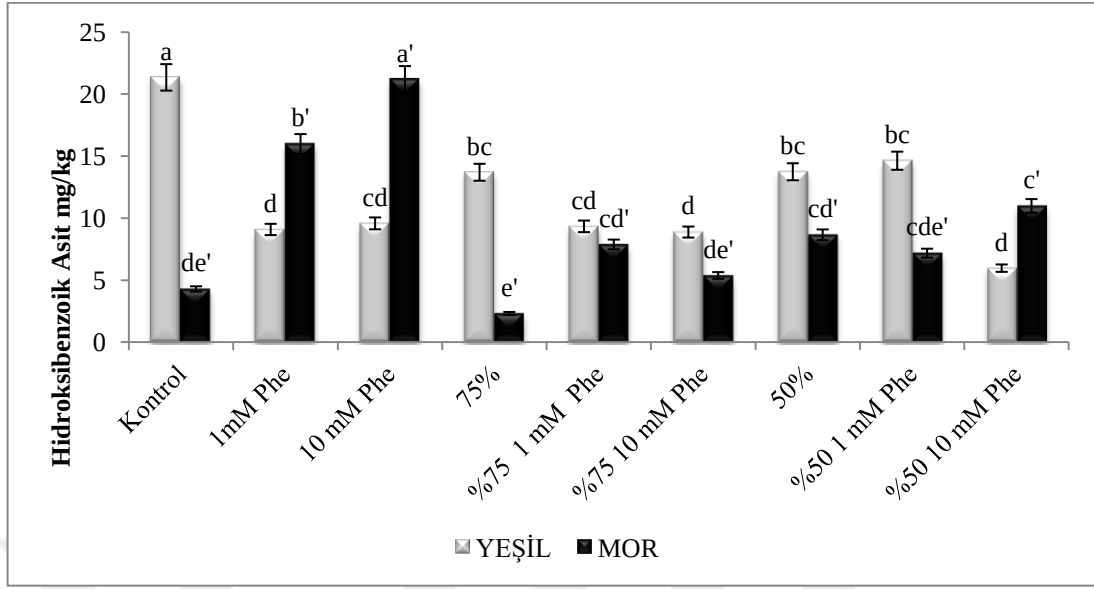
Mor ve yeşil reyhan yapraklarında gallik asit miktarı, yeşil reyhanda mor reyhana göre yaklaşık beş kat daha fazla bulunmaktadır (Şekil 4.19). Kuraklık uygulaması sonucu her iki reyhan genotiplerinde gallik asit miktarının azaldığı görülmüştür. fenilalanin uygulaması her iki reyhanda de farklı sonuçlar vermiştir.



Şekil 4. 19. Kuraklık ve fenilalanin uygulamasının mor ve yeşil reyhan yapraklarında gallik asit miktarları üzerine etkisi.

#### 4-Hidroksibenzoik Asit

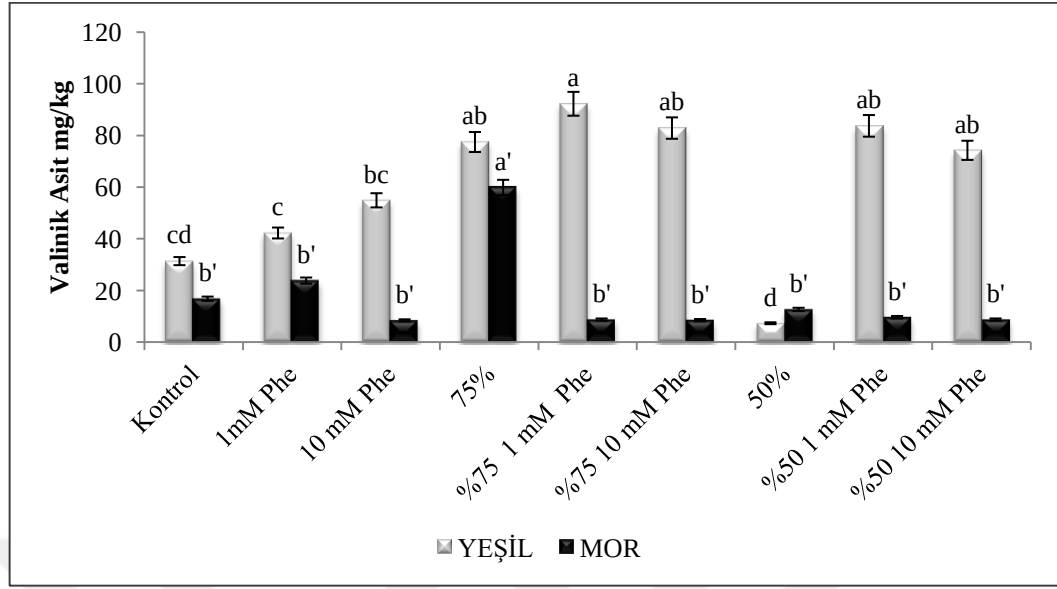
Kuraklık uygulaması yeşil reyhan genotiplerinde 4-hidroksibenzoik asit miktarının azalmasına sebep olurken mor reyhanda %75 kuraklık azalmaya %50 kuraklık uygulaması 4-hidroksibenzoik asit miktarında artmaya sebep olmuştur (Şekil 4. 20). Fenilalanin tek başına uygulandığında yeşil reyhan genotiplerinde 4-hidroksibenzoik asit miktarında azalmaya sebep olurken mor reyhan genotiplerinde artmaya sebep olmuştur.



Şekil 4. 20. Kuraklık ve fenilalanin uygulamasının mor ve yeşil reyhan yapraklarında 4-hidroksibenzoik asit miktarları üzerine etkisi.

### Valinik Asit

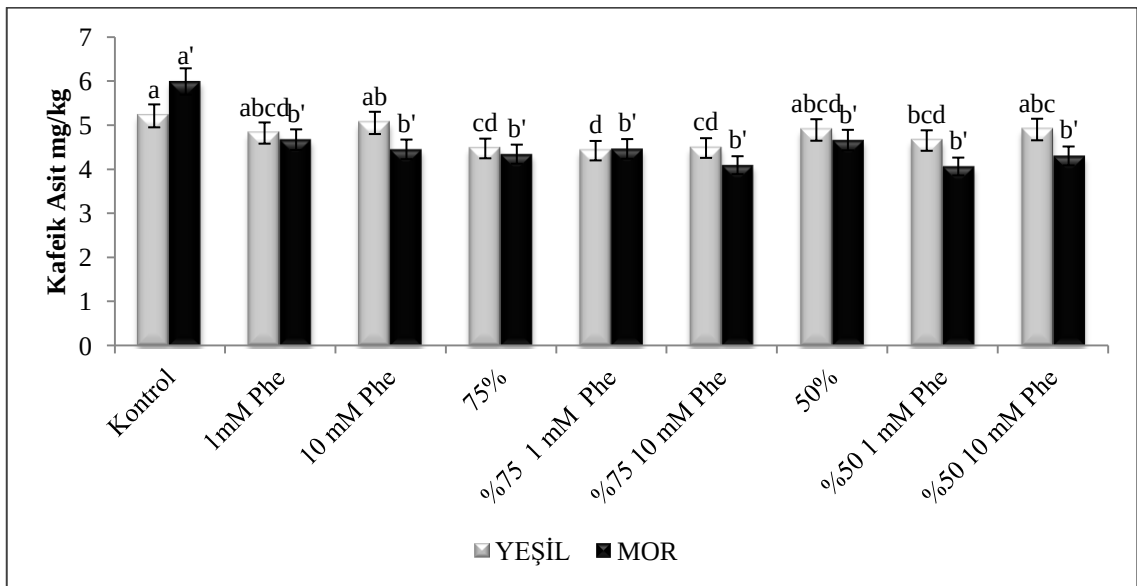
%75 kuraklık uygulaması her iki reyhan genotiplerinde valinik asit miktarını önemli oranda artırırken %50 kuraklık uygulaması valinik asit miktarında azalmaya sebep olmuştur (Şekil 4.21). Fenilalanin uygulamaları yeşil reyhan genotiplerinde valinik asit miktarını önemli oranda artırırken mor reyhan genotipinde düşük dozda artışa yüksek dozda is azalış neden olmuştur.



Şekil 4. 21. Kuraklık ve fenilalanin uygulamasının mor ve yeşil reyhan yapraklarında valinik asit miktarları üzerine etkisi.

#### Kafeik Asit

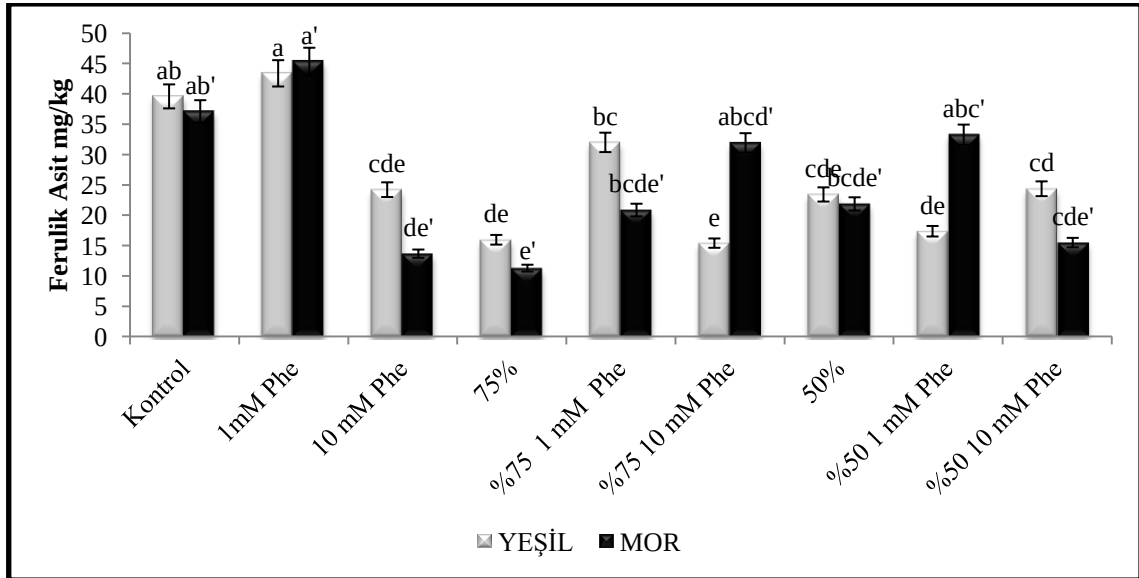
Mor ve yeşil reyhan genotiplerinde en az bulunan fenolik bileşiklerden biridir. (Şekil 4.22). Kuraklık ve fenilalanin uygulamaları mor ve yeşil reyhan genotiplerinde kafeik asit miktarının kontrole göre azalmasına sebep olmuştur.



Şekil 4. 22. Kuraklık ve fenilalanin uygulamasının mor ve yeşil reyhan yapraklarında kafeik asit miktarları üzerine etkisi.

### Ferulik Asit

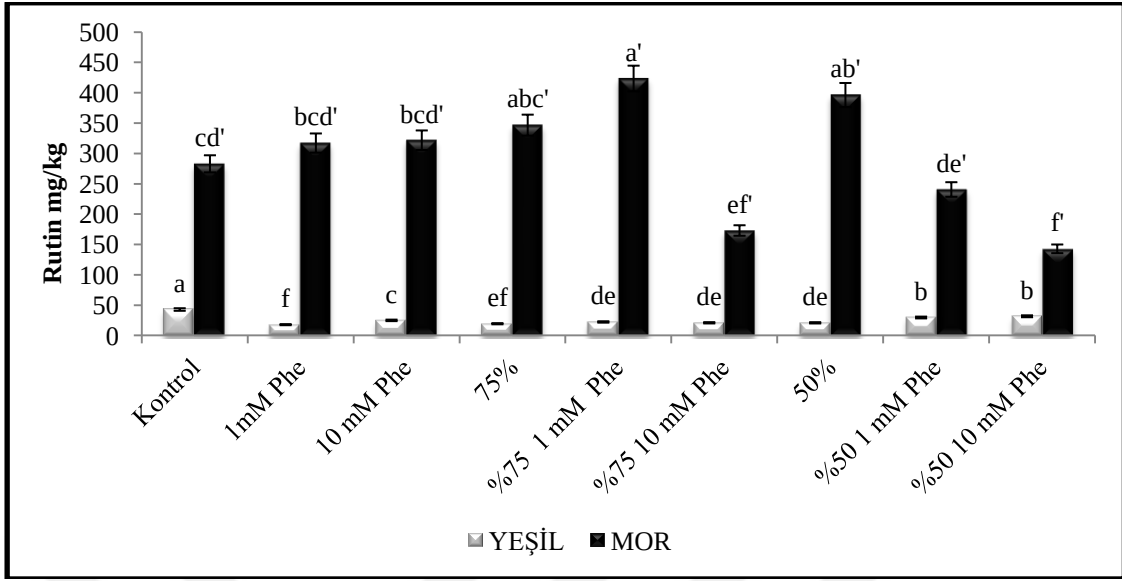
Kuraklık uygulamaları her iki reyhan genotipinde ferulik asit miktarını kontrole göre azaltmıştır (Şekil 4.23). Fenilalanin uygulamaları her iki reyhan genotipinde farklı sonuçlar vermiştir. Ferulik asit miktarı her iki reyhan genotipinde de 1 mM Phe uygulamasında arttığı tespit edilmiştir.



Şekil 4. 23. Kuraklık ve fenilalanin uygulamasının mor ve yeşil reyhan yapraklarında ferulik asit miktarları üzerine etkisi.

### Rutin

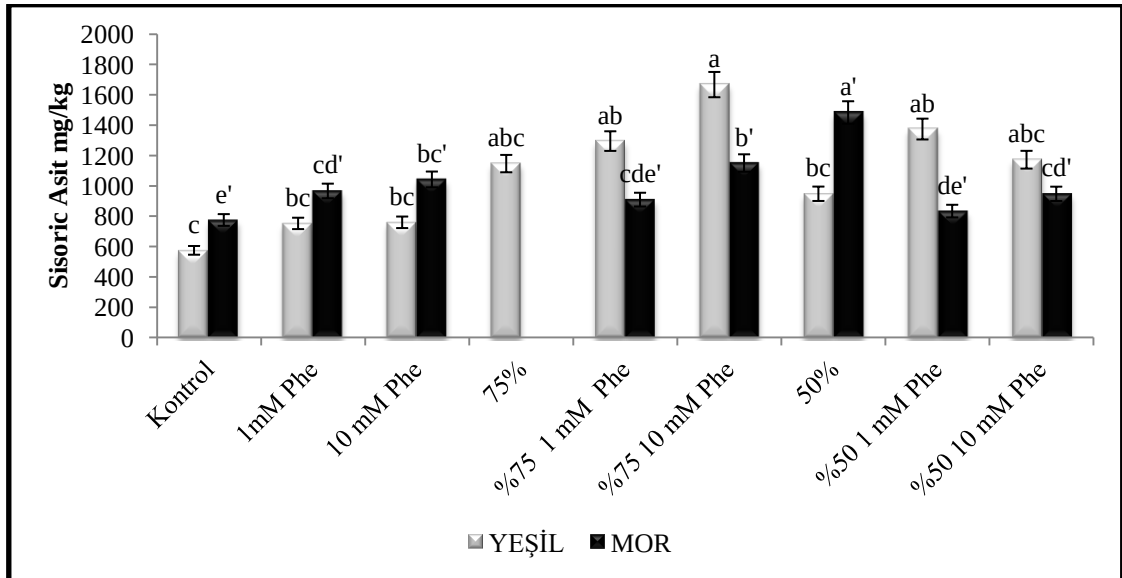
Mor ve yeşil reyhan genotiplerinde en fazla bulunan üçüncü fenolik bileşiktir (Şekil4. 24). Mor reyhanda yeşil reyhana göre oldukça fazla oranda tespit edilmiştir. Kuraklık uygulaması yeşil reyhan genotipinde rutin miktarını önemli oranda azaltırken mor reyhan genotipinde artırmıştır. Tek başına fenilalanin uygulaması yeşil reyhanda rutin miktarında azalmaya sebep olurken mor reyhanda artışa sebep olmuştur.



Şekil 4. 24. Kuraklık ve fenilalanin uygulamasının mor ve yeşil reyhan yapraklarında rutin miktarları üzerine etkisi.

#### Sisorik Asit

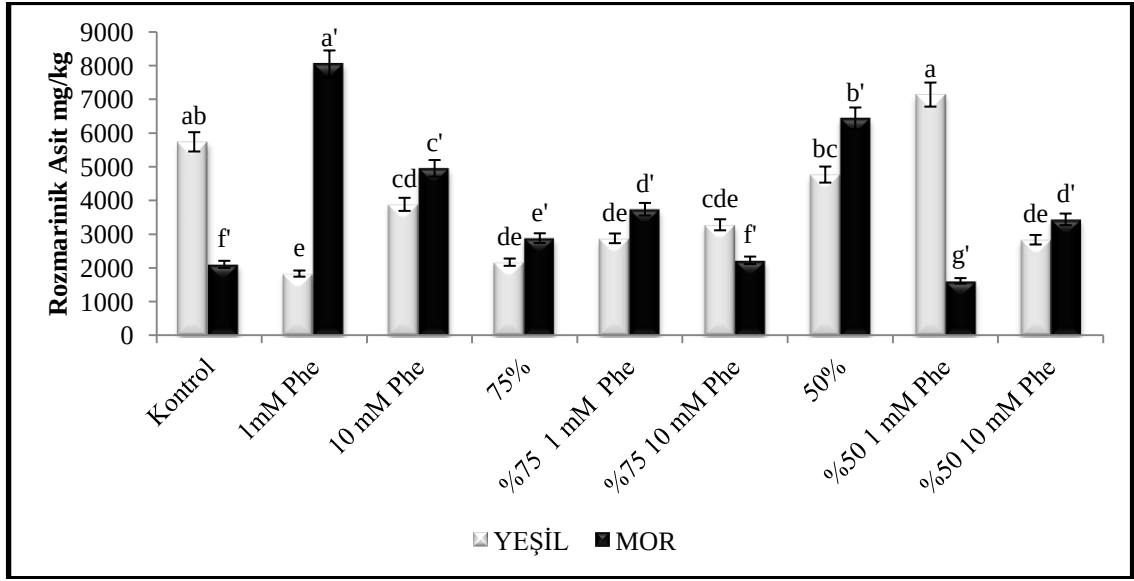
Mor ve yeşil reyhanda en fazla bulunan ikinci fenolik bileşiktir (Şekil 4. 25). Kuraklık ve fenilalanin uygulamaları her iki reyhan genotipinde de sisorik asit miktarının kontrole göre artmasına sebep olmuştur.



Şekil 4. 25. Kuraklık ve fenilalanin uygulamasının mor ve yeşil reyhan yapraklarında sisorik asit miktarları üzerine etkisi.

## Rozmarinik Asit

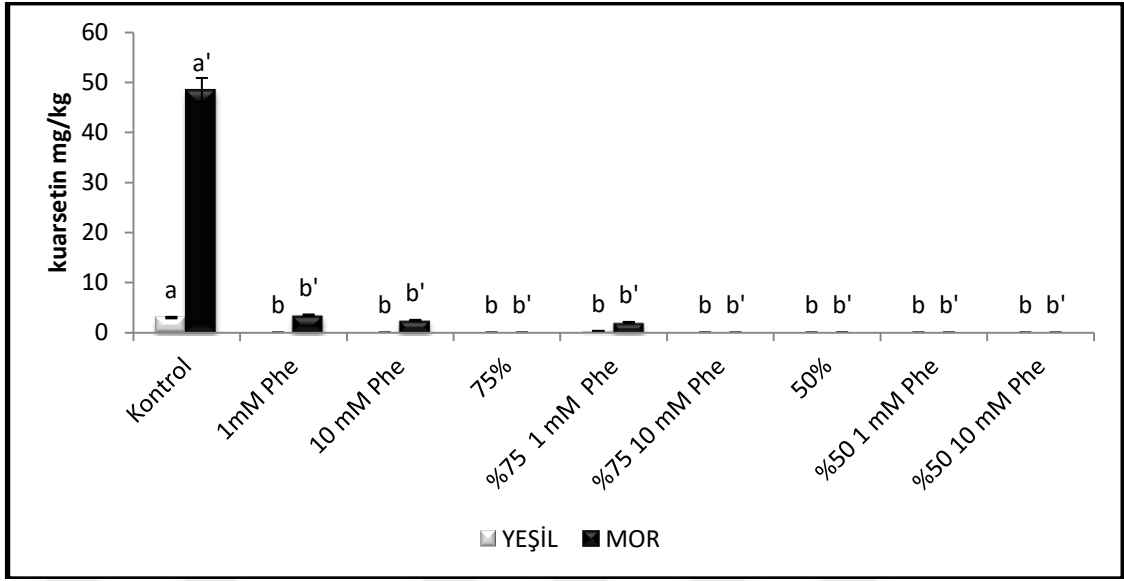
Mor ve yeşil reyhan genotiplerinde en fazla bulunan fenolik bileşik rozmarinik asittir (Şekil 4. 26). Kuraklık uygulamaları yeşil reyhan genotiplerinde rozmarinik asit miktarını azaltırken mor reyhanda artırmıştır. 1 mM fenilalanin uygulaması mor reyhanda rozmarinik asit miktarını en fazla artırırken yeşil reyhanda da en fazla azaltmıştır.



Şekil 4. 26. Kuraklık ve fenilalanin uygulamasının mor ve yeşil reyhan yapraklarında rozmarinik asit miktarları üzerine etkisi.

## Kuarsetin

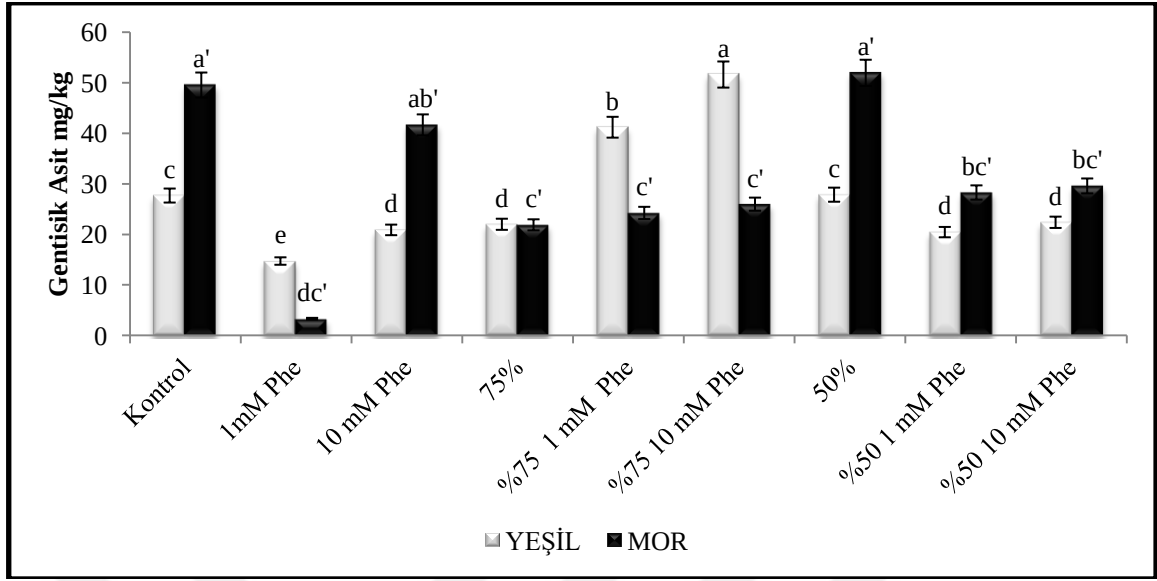
Yeşil reyhan genotipinde kontrol ve %75 kuraklık+1mMPhe grubunda kuarsetin tespit edilirken diğer gruplarda miktarı tespit edilememiştir. Mor reyhanda ise kontrol, fenilalanin ve %75'lik kuraklık uygulanan gruplarda kuarsetinin miktarı belirlenmiştir (Şekil 4. 27).



Şekil 4. 27. Kuraklık ve fenilalanin uygulamasının mor ve yeşil reyhan yapraklarında kuarsetin miktarları üzerine etkisi.

#### Gentisik Asit

Mor ve yeşil reyhan genotiplerinde %75 kuraklık uygulaması kontrole göre gentisik asit miktarını önemli oranda azaltırken %50 kuraklık uygulaması kısmi artışa sebep olmuştur. Fenilalanin uygulamaları yeşil ve mor reyhanda gentisik asit miktarını azaltmıştır (Şekil 4. 28).



Şekil 4. 28. Kuraklık ve fenilalanin uygulamasının mor ve yeşil reyhan yapraklarında gentisik asit miktarları üzerine etkisi.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kuraklık, bitki büyüme ve gelişmesini sınırlandıran en önemli çevresel faktörlerden birisidir. Kuraklık sonucu bitkilerin topraktan su ve mineral alımı yetersiz olduğundan pek çok fizyolojik ve biyokimyasal olaylar olumsuz etkilenir. Kuraklığa bağlı olarak bitkilerde büyümede yavaşlama yaş ve kuru ağırlıkta azalma, protein içeriğinde kayıplar meydana gelir.

Kuraklık uygulamasında mor reyhanda yaş ağırlık azalırken kuru ağırlık artmıştır. Kuraklık stresi yeşil reyhanda yaş ağırlığı artırırken kuru ağırlığı azaltmıştır. Kordi ve ark. (2013) kuraklık stresi reyhan bitkisinde bitki boyunu yaş ve kuru ağırlığı azalttığını rapor etmişlerdir.

Kuraklık bitkilerde fotosentetik pigment miktarı üzerinde olumsuz etkiye sahiptir. Bu çalışmada kuraklık uygulaması yeşil ve mor reyhan genotiplerinde total klorofil, klorofil a, klorofil b ve karotenoid miktarlarını önemli oranda azaltmıştır. Fenilalanin kuraklıkla birlikte uygulandığında kuraklığın neden olduğu kayıpları engelleyememiştir. Kuraklık ve fenilalanin uygulaması yeşil ve mor reyhan genotiplerinde fotosentetik pigment miktarını azaltarak benzer etki göstermiştir. Kuraklığın tatlı fesleğende klorofil a, klorofil b miktarını azalttığı belirtilmiştir (Kordi ve ark., 2013). Aynı makalede klorofil miktarının pamuk ve *Catharanthus roseus*'ta kuraklık stresi sonucu azaldığı rapor edilmiştir. Fotosentetik pigment miktarındaki azalma protein komplekslerinin dayanıksızlığı ve klorofili parçalayan enzimlerin aktivitesinde ki artışla ilgili olabileceği ifade edilmektedir.

Yeşil ve mor reyhan genotiplerinde kuraklık stresi protein miktarını önemli oranda azaltmıştır. Yeşil reyhan yapraklarında protein miktarında ki azalma artan kuraklık uygulamasına paralel olarak artış göstermiştir. Kuraklık uygulaması bezelye ve susam bitkilerinde protein miktarını azalttığı ifade edilmektedir. (Öztürk ve ark., 2012). Protein miktarındaki azalma bitki dokularında stres sonucu aktif reaktif oksijen

türlerinin üretimindeki artışa bağlı olarak protein sentezinin engellenmesi ve protein denatürasyonundan kaynaklanmış olabilir.

Abiyotik stres sonucu bitki dokularında yaygın olarak prolin miktarında artış görülmektedir. Prolin ozmoregulator, enzim, membran ve hücresel yapıların stabilizasyonunda rol oynayan bir iminoasittir. Bu çalışmada, yeşil reyhan genotiplerinde artan kuraklık stresine bağlı olarak prolin miktarında önemli oranda azalma meydana gelmiştir. Fakat mor reyhan yapraklarında %75'lik kuraklık uygulaması prolin miktarını önemli oranda azaltırken %50'lik kuraklık stresi kısmi oranda azalmıştır. Kordi ve ark., (2013) kuraklık uygulamasının (tarla kapasitesi %60, %30) reyhanda prolin miktarının artan kuraklık miktarına bağlı olarak artırdığını belirtmişlerdir. Bu sonuçlar bizim sonuçlarımızla uyumlu değildir. Bizim sonuçlarımız dikkatlice incelendiğinde kuraklık stresi sırasında yeşil reyhan ile mor reyhan yapraklarında prolin miktarındaki azalma reyhan genotiplerine bağlı olarak değişiklik göstermiştir. Yukarıda bahsedilen çalışma sonuçları bizim verilerimiz arasındaki farklılık; reyhan genotipleri, kuraklık şiddeti ve kuraklık süresi farklılığından kaynaklanabilir.

Bitki hücrelerinde enzimatik ve enzimatik olmayan pek çok reaksiyonla reaktif oksijen türleri üretilir.  $H_2O_2$  radikalik özelliği olmamasına rağmen ortamda bulunan geçiş metalleri ve süperoksit anyonuyla etkileşerek çok reaktif hidroksil radikaline dönüşebilir. ROS'lar lipid peroksidasyonu, protein denatürasyonu, DNA mutasyonu gibi hücrelerde oksidatif hasara neden olmaktadır. Bu çalışmada, kuraklık ve fenilalanin uygulamaları yeşil ve mor reyhanda hidrojen peroksit içeriğini azaltmıştır. Malvia-36 ve Pant-12 pirinç çeşitleri 10 ve 20 gün ılımlı (-0.5 MPa) ve şiddetli (-2.0 MPa) kuraklığa maruz bırakılmış, sürgünlerde kuraklığın etkisiyle hidrojen peroksit miktarının azaldığı görülmüştür (Sharma and Dubey, 2005). Diğer bir çalışmada, Terzi ve ark., (2010) kuraklık stresinin kuru fasulye çeşitlerinde  $H_2O_2$  miktarının kontrol gruplarına göre azalttığını belirtmişlerdir.

Kuraklık sırasında yeşil ve mor reyhan yapraklarında lipid peroksidasyon miktarının azaldığı görülmektedir. Bu çalışmada, kuraklığın yeşil ve mor reyhan çeşitlerinde lipid

peroksidasyon miktarını azaltması; hidrojen peroksit miktarının azalması, SOD aktivitesinin ve süperoksit anyon giderim aktivitesinin artışından kaynaklanabilir.

Antioksidan enzimler stres sırasında pek çok biyokimyasal olayı kontrol ederler. Özellikle aktif oksijen türlerinin uzaklaştırılmasında önemli rolleri vardır. SOD süperoksitlerin su ve oksijene katalizini gerçekleştirir ve sitoplazma, mitokondri ve kloroplastlarda farklı izoenzimleri bulunur. Bu çalışmada, fenilalanin ve kuraklık uygulaması yeşil ve mor reyhan yapraklarında SOD aktivitesini önemli oranda artırmıştır. Kuraklık pirincin Malviya-36 ve Pant-12 çeşitlerinde uygulama süresine ve kuraklık şiddetine bağlı olarak SOD aktivitesini önemli oranda artırmıştır (Sharma and Dubey, 2005). Kıran ve ark. (2015) kuraklık stresine dayanım seviyelerini belirlemek üzere seçtikleri dörder adet domates, patlıcan ve kavun genotiplerinde kuraklık stresi sonucu SOD miktarında artış tespit etmişlerdir. Reyhan genotiplerinde kuraklık sonucu meydana gelen SOD aktivitesinde meydana gelen artma, süperoksit üretimindeki artış ve oksidatif hasarı önlemek için ortaya konulan bir tedbir kaynaklı olabilir.

Askorbat peroksidaz hidrojen peroksidin askorbat varlığında suya indirgenmesini sağlayan askorbat/glutasyon döngüsünde önemli bir enzimdir (Gill and Tuteja, 2010). Yeşil ve mor reyhan yapraklarında ılımlı kuraklıkta APX aktivitesi artarken şiddetli kuraklıkta önemli oranda azalma göstermiştir. Kuraklık buğday çeşitlerinde APX aktivitesi üzerine farklı şekilde etki göstermiştir. Ballada çeşidinde kuraklığın 3. gününde APX aktivitesi kontrole göre artarken ilerleyen kuraklık döneminde azalmıştır. Fakat Beltskaya çeşidinde APX aktivitesi kuraklık periyodu boyunca kontrole göre daha düşük olduğu gözlenmiştir (Nikolaeva ve ark., 2010). Çimlenme sırasında kuraklığın yonca filizlerinde APX aktivitesini artırdığı gözlenmiştir (Wang ve ark., 2009). Kuraklığa ve tuza toleranslı domates, şeker pancarı ve pirinçte daha yüksek APX aktivitesi lipid peroksidasyonunun düşük miktarıyla ilgili olabileceği belirtilmektedir (Wang ve ark., 2009). APX aktivitesi kuraklık şiddetine, süresine ve bitki türüne bağlı olarak değişmektedir.

Peroksidazlar hidrojen peroksitin süpürülmesi, bitki büyüme ve gelişmesi, ligninleşme, suberinleşme ve hücre çeperinin dayanıklılığının artması gibi pek çok fizyolojik ve biyokimyasal olaylarda rol oynamaktadır (Wang ve ark., 2009). Kuraklık stresi yeşil ve

mor reyhan yapraklarında peroksidaz aktivitesini önemli oranda azaltmıştır. Yonca çeşitlerinde kuraklık uygulaması POD aktivitesini azaltmıştır (Wang ve ark., 2009).

Yüksek yapılı bitkilerde çok sayıda fenolik bileşik vardır ve fenolik bileşiklerin çeşit ve miktarları; çevresel streslerin çeşidine, şiddetine, etki süresine ve bitki çeşidine bağlı olarak değişmektedir. Bu çalışmada kuraklık stresine maruz bırakılan yeşil reyhan genotipinin toplam fenolik bileşik miktarları mor reyhandan daha fazladır. Fenilalanin, kuraklık ve Phe+kuraklık uygulamaları yeşil reyhanda toplam fenolik miktarını azaltmıştır. Ancak kuraklık stresi mor reyhan genotipinde artan kuraklığa bağlı olarak toplam fenolik bileşik miktarını önemli oranda artırmıştır.

Yeşil reyhanda ılımlı kuraklık stresi DPPH aktivitesini azaltırken şiddetli kuraklık DPPH aktivitesini artırmıştır. Fenilalanin uygulamaları yalnız ve kuraklıkla birlikte genelde DPPH aktivitesini azaltmıştır. Kuraklık stresi kekikte DPPH aktivitesini azaltmıştır (Khosh-Khui ve ark., 2012). Diğer bir çalışmada ise kuraklık üzüm bitkisinin yaprak ve köklerinde DPPH aktivitesini ve indirgeme gücünü azaltmıştır (Król ve ark., 2014). Fakat mor reyhan yapraklarında artan kuraklığa bağlı olarak DPPH aktivitesi ve indirgeme gücünü artırmıştır.

Daha önce yapılan çalışma sonuçları ve bu çalışmadaki bulgularımızdan hareketle kuraklık stresinin enzimatik olmayan antioksidan aktivite üzerine etkisi total fenolik bileşik miktarının artmasının yanında bireysel fenolik bileşik miktarlarındaki değişikliklerden kaynaklanabileceği varsayılmaktadır.

## 6. KAYNAKLAR

- Akkuş, İ.**, 1995. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri, Mimoza Yayınları, Konya.
- Alexieva, V.**, Ivanov S., Sergiev I. and Karanov E., 2003, “ Interaction between stresses”, *Bulg. J. Plant Physiol.*, Special Issue, 1-17.
- Angelini R.**, Manes F. and Federico R. 1990. Spatial and functional correlation between diamine-oxidase and peroxidase activities and their dependence upon de-etiolation and wounding in chickpea stems. *Planta* 182: 89–96
- Arnon, D.I.**, 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, 24, 1–15.
- Bates, L.S.**, Waldren R.P., Teare I.D., 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil*, 39, 205–207.
- Swain, T.** and Bate-Smith, E. C., 1962. Flavonoid Compounds. In, Florkin, M. and Mason, H. S., Eds., *Comparative Biochemistry III. Constituents of Life. Part A*, Academic Press, New York, 755–809.
- Blum, A.**, 1986, Breeding crop varieties for stress environments. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2, 199-237.
- Bradford, M. M.**, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–255.
- Çırak, C.** ve Esendal E., 2006. Soyada Kuraklık Stresi. *OMÜ Zir. Fak. Dergisi*, 21(2). 231-237.
- Darrah, H. H.**, 1980. *The cultivated basil*; Buckeye Printing, Independence, MO.
- Duncan, B.D.**, 1955. Multiple range and multiple F-tests. *Biometrics. International Biometric Society.*, 1- 42.
- Eriş, A.**, 1990. Bahçe Bitkileri Fizyolojisi, Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi. Yayınları. Ders Notları No: 11, Bursa.
- Gill, S.S.** and Tuteja N., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants, *Plant Physiol Biochem.* 48 (12), 8-16.
- Harborne, J. B.** ve Simmonds N. W., 1964. *Biochemistry of Phenolic Compounds*, Academic Press, 101, London.
- Hiltunen, R.**, Holm Y., 1999. *The Genus Ocimum.*, Harwood Akademik., 167
- Hodges, D.M** and Forney F.C., 2000. The effect of ethylene, depressed oxygen and elevated carbon dioxide on antioxidant profiles of senescing spinach leaves, *Journal of Experimental Botany*, 51(344), 645-655.
- Jaspars, E.M.J.**, 1965. Pigmentation of Tobacco Crown-Gall Tissues Cultured *in vitro* in Dependence of the Composition of the Medium. *Physiologia Plantarum*, 90, 293- 298.
- Jones, H.G.**, 1992. *Plants and Micro climate*, Cambridge University Press, Cambridge.
- Jung, S.**, 2004. Variation in antioxidant metabolism of young and mature leaves of *Arabidopsis thaliana* subjected to drought, *Plant Sci.*, 166, 459-466.
- Kalefetoğlu, T.**, Ekmekçi Y., 2005. The Effects of Drought on Plants and Tolerance Mechanisms. *G. Ü. Fen Bilimleri Dergisi*, 18(4), 723-740.

- Khosh- Khui**, M., Ashiri F. and Saharkhiz MJ., 2012. Effects of Irrigation Regimes on Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of Thyme (*Thymus vulgaris* L.). Medicinal & Aromatic Plants, 1,114.
- Kıran**, S. ve Kuşvuran Ş., 2015. Domates, Patlıcan ve Kavun Genotiplerinin Kuraklığa Dayanım Durumlarını Belirlemeye Yönelik Olarak İncelenen Özellikler Arasındaki İlişkiler. Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi 4 (2), 9-25.
- Kordi**, S., Saidi M., Ghanbari F., 2013. Induction of Drought Tolerance in Sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.) by Salicylic Acid. International Journal of Agricultural and Food Research, 2 (2), 18-26.
- Kozłowski**, T.T. and Pallardy S.G., 1997. Physiology of Woody Plants. Academic Press, San Diego.
- Kumaran**, A. Karunakaran R.J., 2006. Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of Coleus aromaticus. Food Chemistry 97, 109 – 114
- Krol**, A., Amarowicz R. and Weidner S., 2014. Changes in the composition of phenolic compounds and antioxidant properties of grapevine roots and leaves under continuous of long-term drought stres. Acta Physiol Plant 36, 1491-1499
- Lee**, J., Scagel C. F., 2009. Chicoric Acid Found in Basil (*Ocimum basilicum* L.) Leaves. Food Chemistry, 115, 650 – 656.
- Liu** F, Ooi VEC, Chang ST., 1997. Free Radical Scavenging Activity of Mushroom Polysaccharide Extracts. Life Sci 60. 763–771.
- Liyana-Pathirana** C, Shahidi F., 2005. Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. Food Chem, 93, 47–56.
- Loughrin**, J. H. ve Kasperbauer M. J., 2001. Light reflected from colored mulches affects aroma and phenolic content of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) leaves. J. Agric. Food Chem., 49, 1331-1335.
- Nikolaeva**, M. K., Maevskaya S. N., Shugaev A.G. and Bukhov N.G, 2010. Published in Fiziologiya Rastenii, Vol. 57, No. 1, pp. 94-102.
- Noriega**, O. G., Balestrasse B. K., Batlle A., Tomaro L. M., 2004. Heme oxygenase exerts a protective role against oxidative stress in soybean leaves, Biochemical and Biophysical Research Communications, 323, 1003-1008
- Oyaizu**, M., 1986. Studies on products of browning reaction-antioxidative activitiesproducts browning reaction prepared from glucosamine. Japanese Journal of Nutrition, 44, 307-315.
- Özcan** S., Babaoğlu M. ve Gürel E., 2004. Bitki Biyoteknolojisi Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları, S.Ü. Vakfı Yayınları, Konya.
- Özenç**, B., 2011. *Fumaria officinalis*'un Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi. (Yüksek Lisans Tezi), Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya
- Öztürk**, L., Demir Y., Ünlükara A., Karataş İ., Kurunç A., Düzdemi O., 2012. Effects of long-term salt stress on antioxidant system, chlorophyll and proline contents in pea leaves. Romanian Biotechnological Letters Journal, 17, 7227–7236.
- Riaz**, M., Qamar S. ve Choudhary, F.M., 1999. Pak. J. Sci. Ind. Res., 6, 332.
- Ribereau-Gayon**, P., 1982. Anthocyanins as Food Colors, P. Makakis, Academic Press, 209-243.
- Sharma**, P. ve Dubey R. S., 2005. Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings, Plant Growth Regulation. 46, 209-221.

- Smirnoff**, N., 1993. The Role of Active Oxygen in the Response of Plants to Water Deficit and Desiccation, *New Phytol.*, 125, 27-58.
- Teiz**, L. and Zeiger S.C.E., 1998. *Plant Physiology*, University of California, Los Angeles Sinauer Associates, Inc., Publisher, 726-735.
- Terzi** , R., Sağlam A., Kutlu N., Nar H. and Kadioğlu A., 2010. Impact of soil drought stress on photochemical efficiency of photosystem II and antioxidant enzyme activities of *Phaseolus vulgaris* cultivars. *Türk J Bot* 34,1-10.
- Torun**, H. 2012. Tuz Stresine Maruz Bırakılan arpa (L.) Çeşitlerinde Salisilik Asit Muamelesinin İçsel Fitohormonlar Düzeyinde Fizyolojik ve Biyokimyasal Etkilerinin Araştırılması.(Yüksek Lisans Tezi), Karadeniz Teknik Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Türkeş**, M., 1998. İklimsel Değişebilirlik Açısından Türkiye’de Çölleşmeye Eğilimli Alanlar. DMİ/İTÜ II. Hidrometeoroloji Sempozyumu Bildiri Kitabı, 45-57, Devlet Meteoroloji İşleri Genel Müdürlüğü, Ankara.
- Türkeş**, M., 1999. Vulnerability of Turkey to desertification with respect to precipitation and aridity conditions. *Tr. J. of Engineering and Environmental Science*, 23, 363-380.
- Velikova**, V, Yordanov 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**, WB., Kim YH., Lee HS., Kim KY., Deng XP., Kwak SS., 2009. Analysis of antioxidant enzyme activity during germination of alfalfa under salt and drought stresses, *Plant Physiology & Biochemistry* 47, 570-577

## **7. EKLER**

- Ek 1.** Kuraklık stresinde fenil alanin uygulamalarının yeşil reyhan genotipinde fenolik bileşik miktarı üzerine etkisi
- Ek 2.** Kuraklık stresinde fenil alanin uygulamalarının mor reyhan genotipinde fenolik bileşik miktarı üzerine etkisi
- Ek 3.** Kontrol grubuna ait mor reyhan kromatogram
- Ek 4.** Kontrol grubuna ait yeşil reyhan kromatogram
- Ek 5.** 1 mM Phe grubuna ait mor reyhan kromatogram
- Ek 6.** 1 mM Phe grubuna ait yeşil reyhan kromatogram
- Ek 7.** 10 mM Phe grubuna ait mor reyhan kromatogram
- Ek 8.** 10 mM Phe grubuna ait yeşil reyhan kromatogram
- Ek 9.** %75 kuraklık grubuna ait mor reyhan kromatogram
- Ek 10.** %75 kuraklık grubuna ait yeşil reyhan kromatogram
- Ek 11.** %75 kuraklık + 1mM Phe grubuna ait mor reyhan kromatogram
- Ek 12.** %75 kuraklık + 1mM Phe grubuna ait yeşil reyhan kromatogram
- Ek 13.** %75 kuraklık + 10mM Phe grubuna ait mor reyhan kromatogram
- Ek 14.** %75 kuraklık + 10mM Phe grubuna ait yeşil reyhan kromatogram
- Ek 15.** %50 kuraklık grubuna ait mor reyhan kromatogram
- Ek 16.** %50 kuraklık grubuna ait yeşil reyhan kromatogram
- Ek 17.** %50 kuraklık + 1mM Phe grubuna ait mor reyhan kromatogram
- Ek 18.** %50 kuraklık + 1mM Phe grubuna ait yeşil reyhan kromatogram
- Ek 19.** %50 kuraklık + 10mM Phe grubuna ait mor reyhan kromatogram
- Ek 20.** %50 kuraklık + 10mM Phe grubuna ait yeşil reyhan kromatogram
- Ek 21.** Bitki fotoğrafları

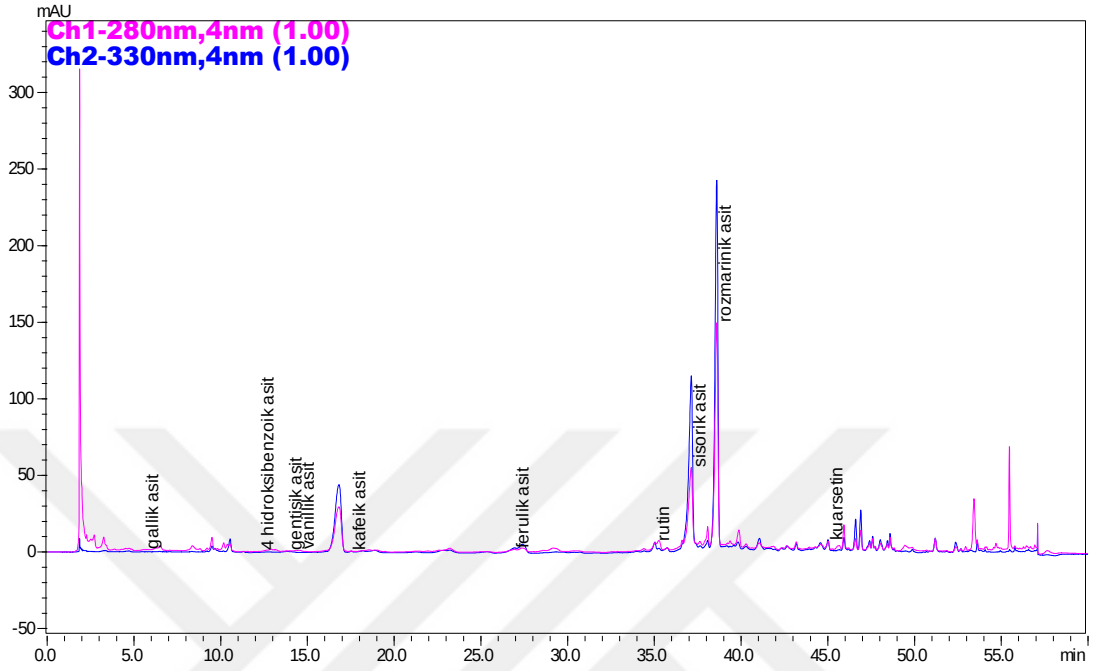
**Ek 1.** Kuraklık stresinde fenil alanin uygulamalarının yeşil reyhan genotipinde fenolik bileşik miktarı üzerine etkisi

| mg Fenolik Bileşik/ kg Kuru Reyhan |               |                           |               |                |                |               |                 |                    |             |                  |
|------------------------------------|---------------|---------------------------|---------------|----------------|----------------|---------------|-----------------|--------------------|-------------|------------------|
| YEŞİL                              | Gallik asit   | Hidroksiben-<br>zoik asit | Valinik asit  | Kafeik asit    | Ferulik asit   | Rutin         | Sisorik asit    | Rozmarinik<br>asit | Kuarsetin   | Gentisik<br>asit |
| Kontro<br>l                        | 23,79±0,32 a  | 21,35±0,07 a              | 31,38±24,22cd | 5,21±0,12 a    | 39,59±2,67ab   | 42,86±0,56 a  | 574,14±19,33 c  | 5734,93±97,71ab    | 3,01±0,67 a | 27,68±0,09 c     |
| 1mM<br>Pha                         | 12,64±0,38 d  | 9,09±2,15 d               | 42,26±0,29 c  | 4,82±0,12 abcd | 43,39±1,84 a   | 17,91±0,53 f  | 751,77±24,35 bc | 1827,04±1528,09 e  | 0,0±0,0 b   | 14,73±2,96 e     |
| 10 mM<br>Pha                       | 18,64±0,09 b  | 9,58 ±2,06 cd             | 54,91±3,4 bc  | 5,05±0,11 ab   | 24,22±3,01 cde | 24,96±0,76 c  | 759,07±15,02 bc | 3880,8±92,52 cd    | 0,0±0,0 b   | 20,89±0,17 d     |
| 75%                                | 13,12±0,49 d  | 13,7±2,23 bc              | 77,47±0,90 ab | 4,47±0,11 cd   | 15,96±0,56 de  | 19,44±1,07 ef | 1145,97±34,5abc | 2165,31±71,82 de   | 0,0±0,0 b   | 22±0,01d         |
| %75 1<br>mM<br>Pha                 | 1,58±0,01 f   | 9,34±0,41 cd              | 92,26±5,18 a  | 4,42±0,03 d    | 32,01±2,36 bc  | 22,39±0,23 d  | 1294,27±15,80ab | 2872,99±20,48 de   | 0,35±0,00 b | 41,19±0,48 b     |
| %75<br>10 mM<br>Pha                | 6,1±0,06 e    | 8,88±0,17 d               | 82,86±0,63 ab | 4,48±0,15 cd   | 15,41±0,26 e   | 20,98±0,02 de | 1666,79 ±8,57 a | 3275,11± 5,94 cde  | 0,0±0,0 b   | 51,61±0,62 a     |
| 50%                                | 12,9 ±0,57 d  | 13,74±0,99 bc             | 7,34±0,0 d    | 4,89±0,12 abcd | 23,43±3,53 cde | 20,94±1,17 de | 947,05±526,93bc | 4763,97±4,92 bc    | 0,0±0,0 b   | 27,85±0,9 c      |
| %50 1<br>mM<br>Pha                 | 17,48 ±0,08 c | 14,63±0,19 b              | 83,72±0,51 ab | 4,65±0,25 bcd  | 17,37±2,11 de  | 29,69±0,85 b  | 1373,66±23,01ab | 7136,62±222,87 a   | 0,0±0,0 b   | 20,45±0,13 d     |
| %50<br>10 mM<br>Pha                | 2,24 ±0,21 f  | 5,97±1,01 d               | 74,25±7,05 ab | 4,90±0,10 abc  | 24,37±4 cd     | 31,73±0,99 b  | 1171,59±59,0abc | 2831,45±85,57 de   | 0,0±0,0 b   | 22,39±3,46 d     |

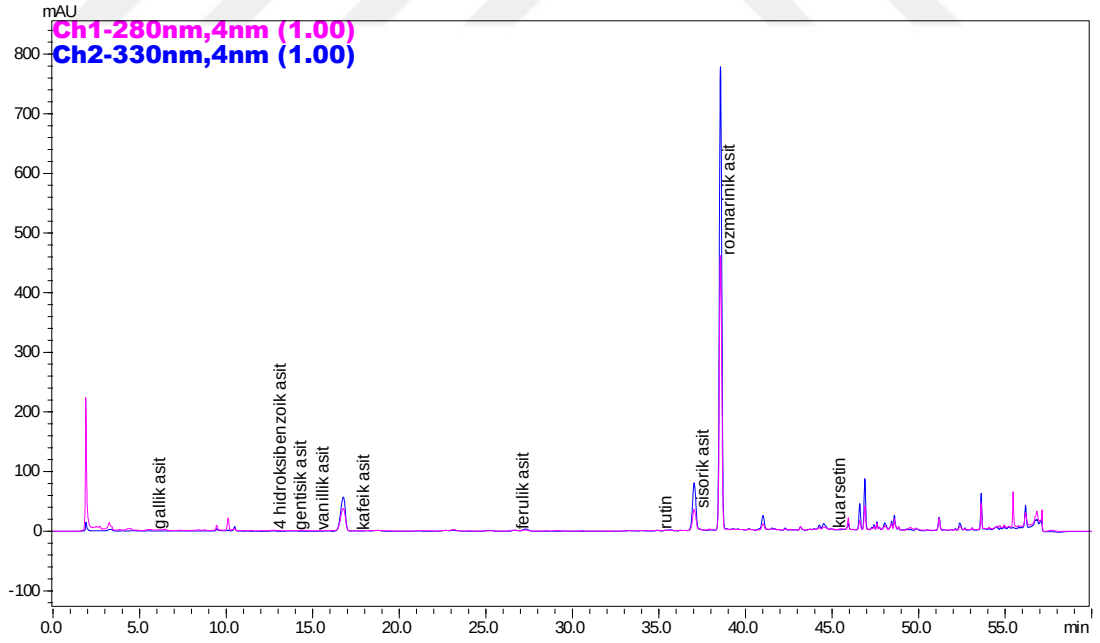
**Ek 2.** Kuraklık stresinde fenil alanin uygulamalarının mor reyhan genotipinde fenolik bileşik miktarı üzerine etkisi

| mg Fenolik Bileşik/ kg Kuru Reyhan |               |                           |               |             |                |                  |                  |                  |               |                  |
|------------------------------------|---------------|---------------------------|---------------|-------------|----------------|------------------|------------------|------------------|---------------|------------------|
| MOR                                | Gallik asit   | Hidroksiben-<br>zoik asit | Valinik asit  | Kafeik asit | Ferulik asit   | Rutin            | Sisorik asit     | Rozmarinik asit  | kuarsetin     | Gentisik<br>asit |
| Kontrol                            | 3,85±0,60 bc  | 4,29±0,64 de              | 16,81±8,89 b  | 5,99±0,52 a | 37,11±9,9 ab   | 282,9±51,01 cd   | 774,25±123,06 e  | 2101,06±79,23 f  | 48,47±14,27 a | 49,53 ±9,19 a    |
| 1mM Pha                            | 1,78±0,66 de  | 15,98±1,13 b              | 23,84±17,21 b | 4,67±0,0 b  | 45,34±2,99 a   | 317,15±18,8 bcd  | 965,62±27,42 cd  | 8043,78±18,71 a  | 3,46±3,46 b   | 30,33 ± 1,8bc    |
| 10 mM<br>Pha                       | 4,24±0,21 b   | 21,20±1,21 a              | 8,43±0,03 b   | 4,45±0,06 b | 13,67±2,86 de  | 321,86±22,13 bcd | 1041,63±20,06 bc | 4948,97±91,58 c  | 2,44±1,45 b   | 41,65±2,79ab     |
| 75%                                | 2,67±0,10 cd  | 2,32±2,32 e               | 59,85±1,78 a  | 4,34±0,02 b | 11,29±3,08 e   | 346,65±7,73 abc  | or               | 2879,17±7,73 e   | 0,0±0,0 b     | 21,89±5,99 c     |
| %75 1<br>mM Pha                    | 1,28±0,09 cde | 7,88±0,22 cd              | 8,75±1,66 b   | 4,46±0,02 b | 20,86±11,2bcd  | 423,53±13,07 a   | 908,43±58,45 cde | 3736,96±267,48 d | 2,05±0,02 b   | 24,24±2,73 c     |
| %75 10<br>mM Pha                   | 8,53±0,03 a   | 5,38±2,54 de              | 8,54±0,65 b   | 4,09±0,00 b | 31,93±0,2abcd  | 173,04±10,46 ef  | 1149,75±29,57b   | 2220,48±18,24 f  | 0,0±0,0 b     | 25,97±0,88 c     |
| 50%                                | 0,0±0,0 f     | 8,65±0,17 cd              | 12,69±0,22 b  | 4,66±0,02 b | 21,87±1,74bcde | 396,35±22,27 ab  | 1482,89±16,28 a  | 6432,62±26,35 b  | 0,01±0,01 b   | 51,94±0,83a      |
| %50 1<br>mM Pha                    | 2,07±0,08 de  | 7,18±0,68 cde             | 9,67±0,78 b   | 4,06±0,04 b | 33,28±0,78 abc | 240,62±17,52 de  | 832,88±7,48de    | 1613,35±43,92 g  | 0,0±0,0 b     | 28,28±1,01bc     |
| %50 10<br>mM Pha                   | 1,01±1,01 ef  | 10,99±1,93 c              | 8,76±1,03 b   | 4,3±0,06 b  | 15,5±0,43 cde  | 142,86±23,05 f   | 946,68±8,28 cd   | 3435,87±10,64 d  | 0,0±0,0 b     | 29,58±1,36bc     |

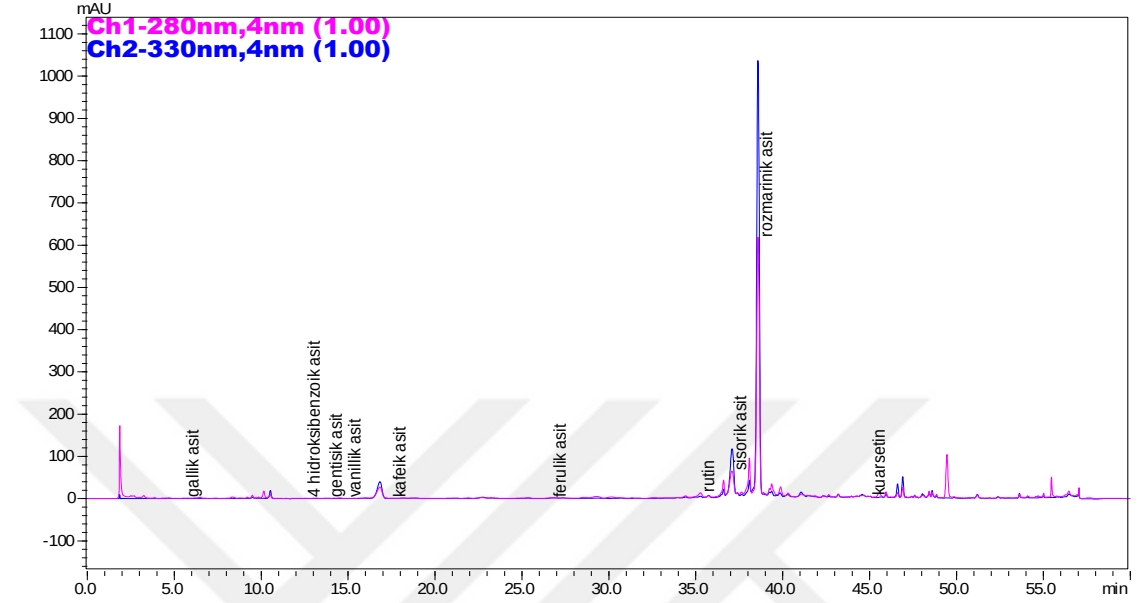
Ek 3. Kontrol grubuna ait Mor Reyhan kromatogram



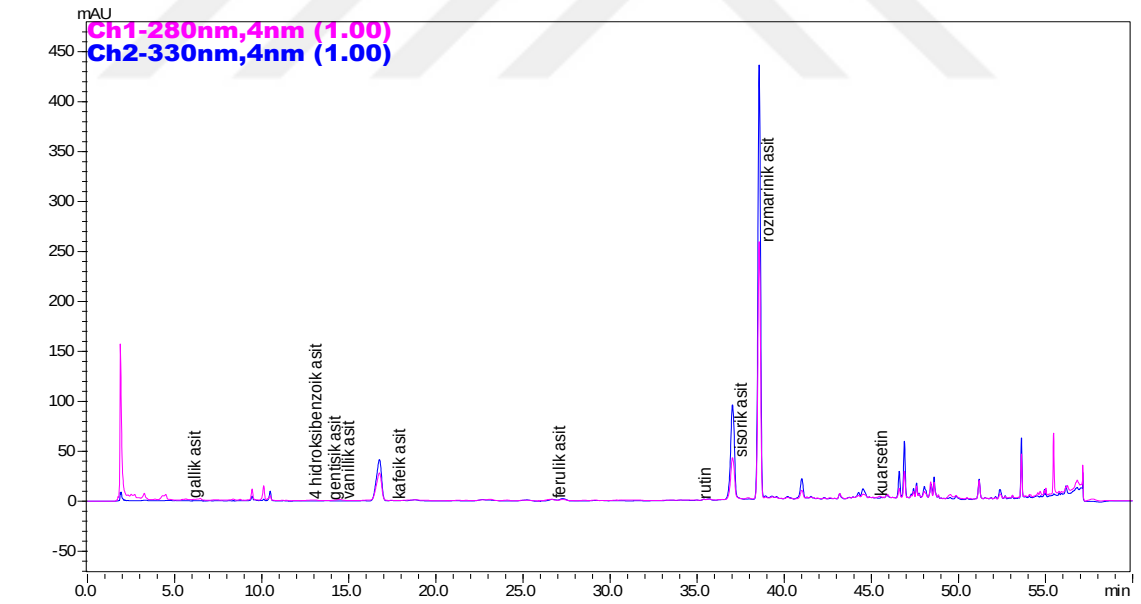
Ek 4. Kontrol grubuna ait Yeşil Reyhan kromatogram



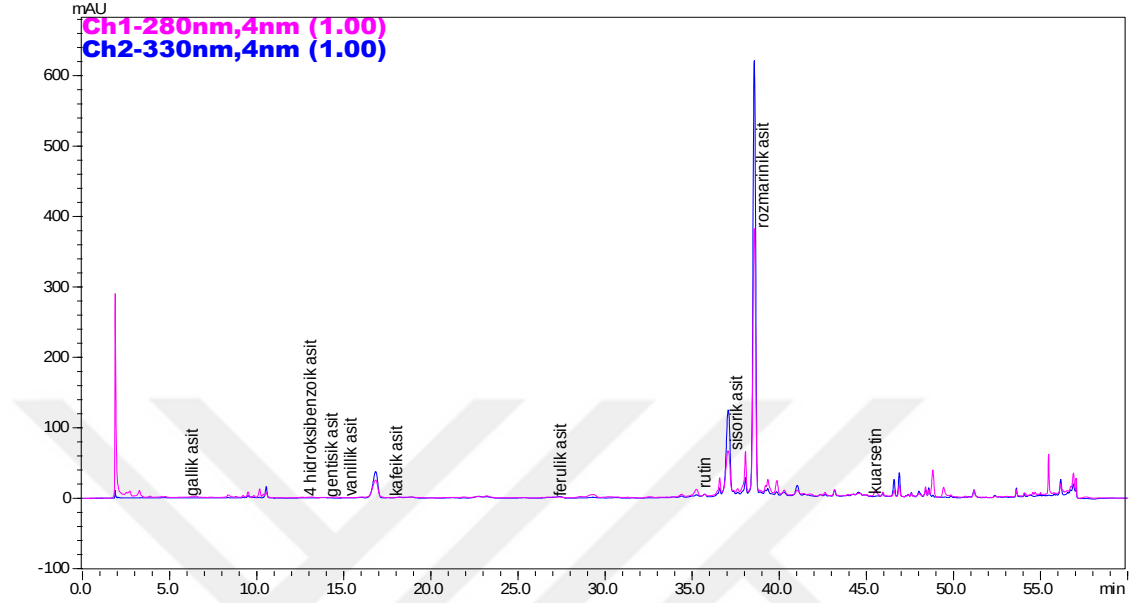
**Ek 5.** 1 mM Phe grubuna ait Mor Reyhan kromatogram



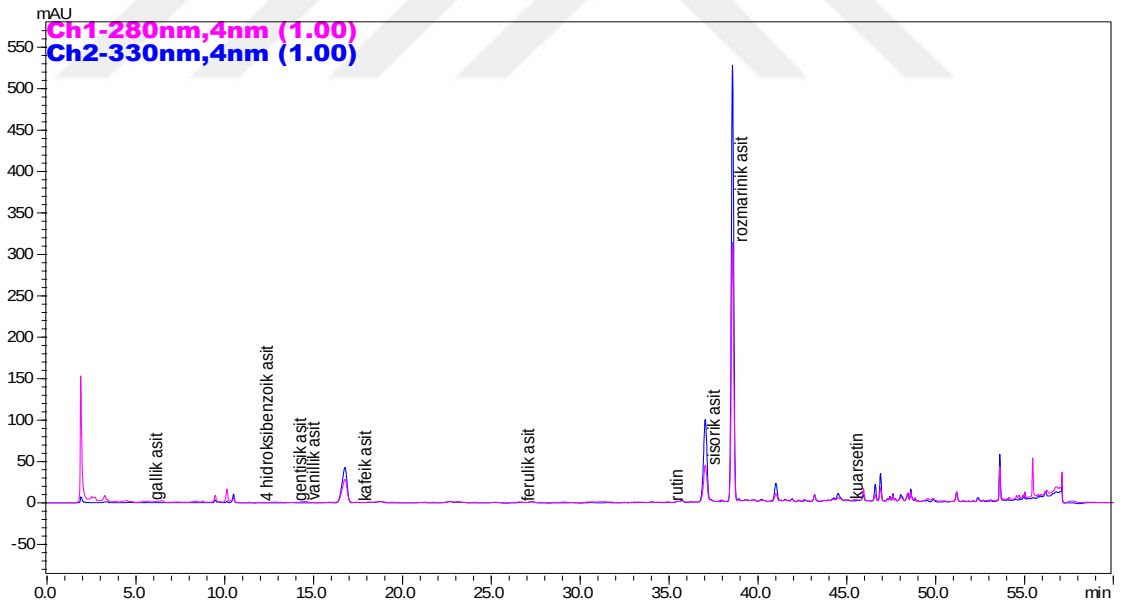
**Ek 6.** 1 mM Phe grubuna ait Yeşil Reyhan kromatogram



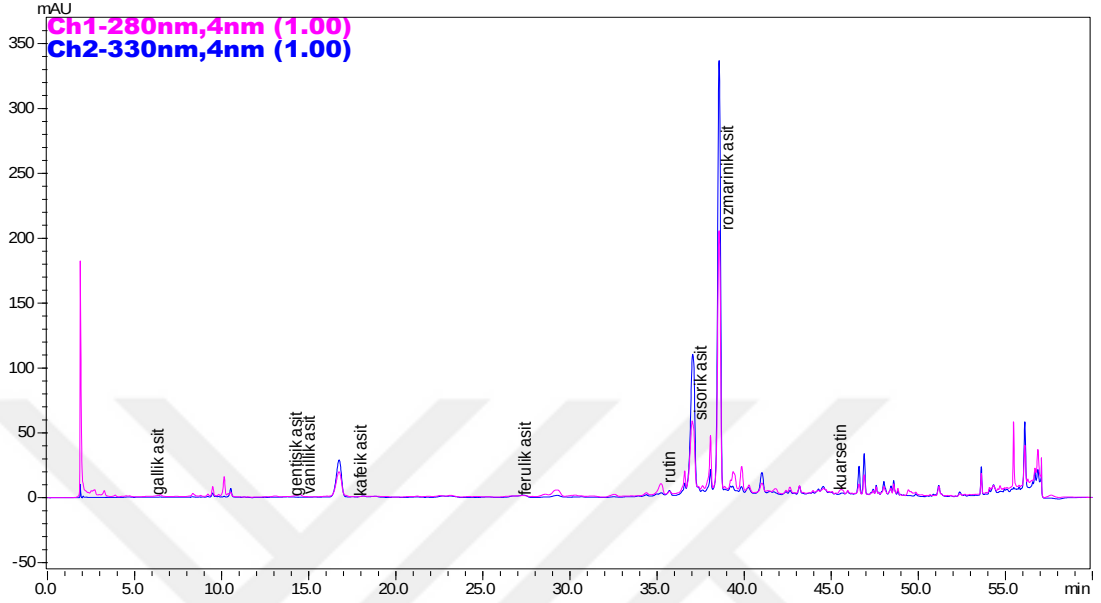
**Ek 7.** 10 mM Phe grubuna ait Mor Reyhan kromatogram



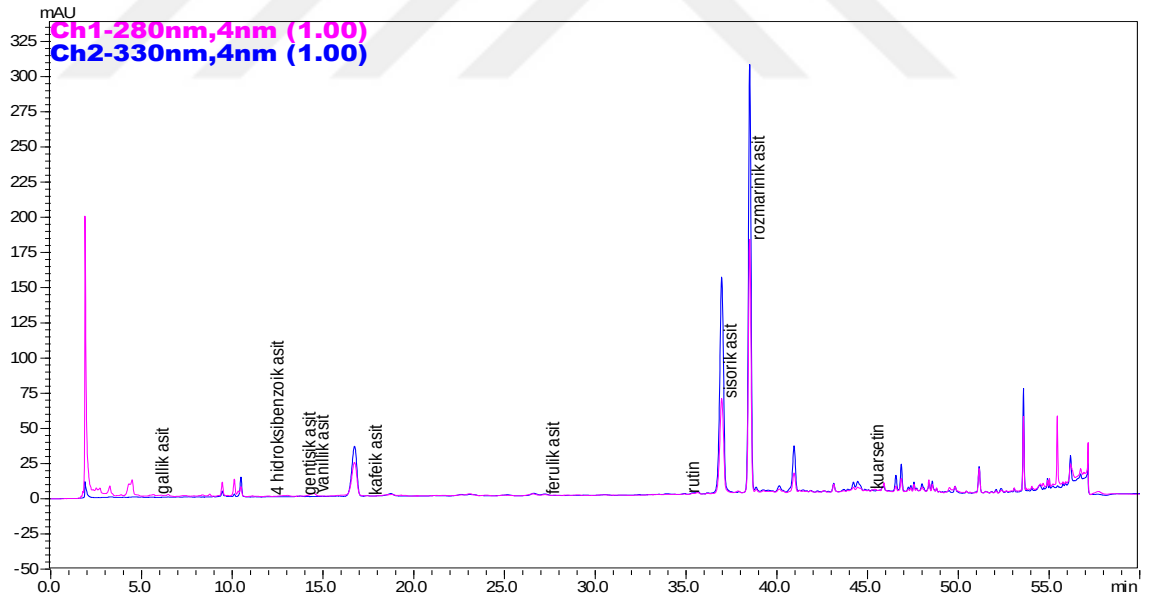
**Ek 8.** 10 mM Phe grubuna ait Yeşil Reyhan kromatogram



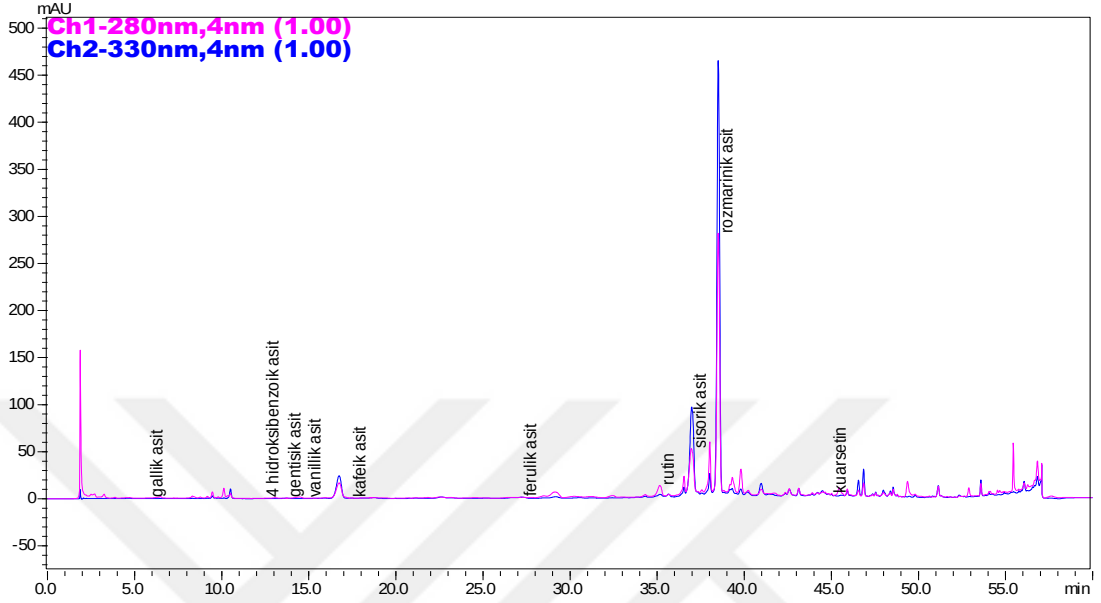
**Ek 9.** %75 kuraklık grubuna ait Mor Reyhan kromatogram



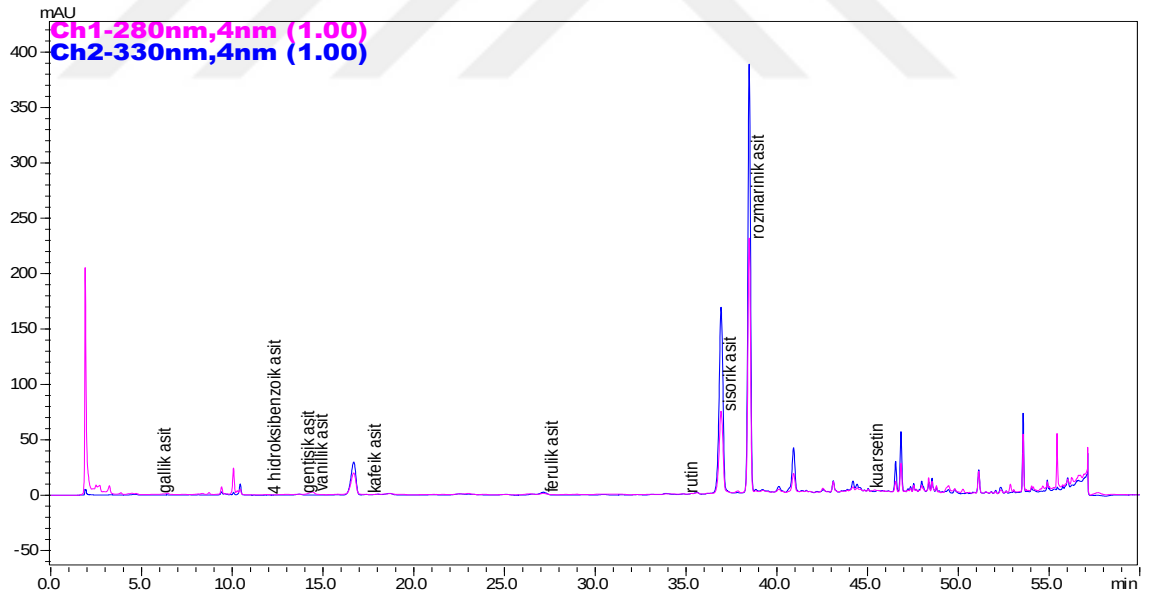
**Ek 10.** %75 kuraklık grubuna ait Yeşil Reyhan kromatogram



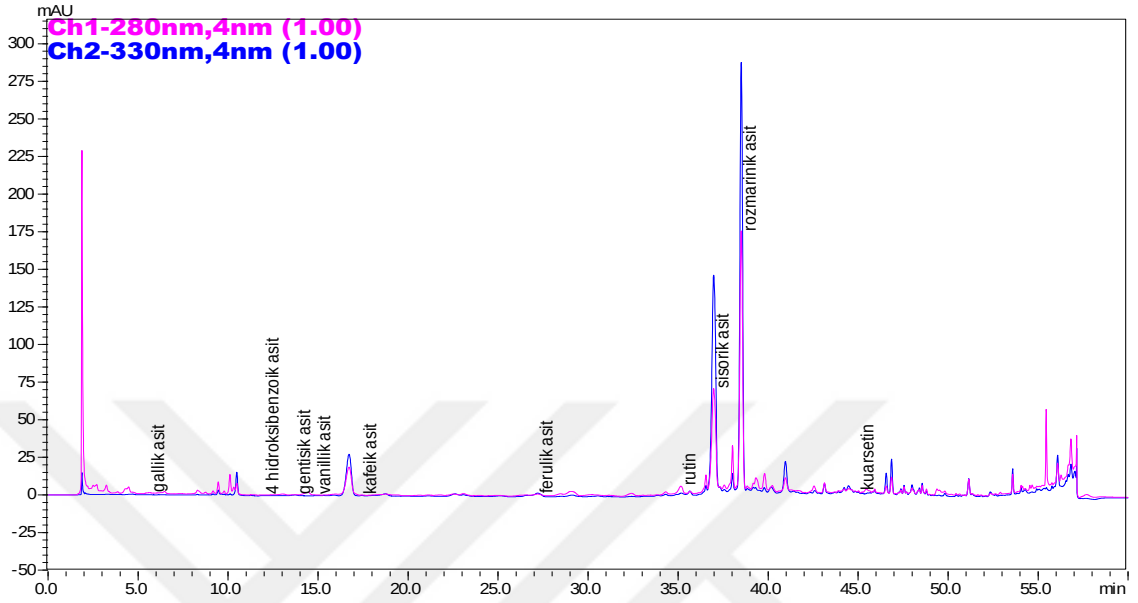
**Ek 11.** %75 kuraklık + 1mM Phe grubuna ait Mor Reyhan kromatogram



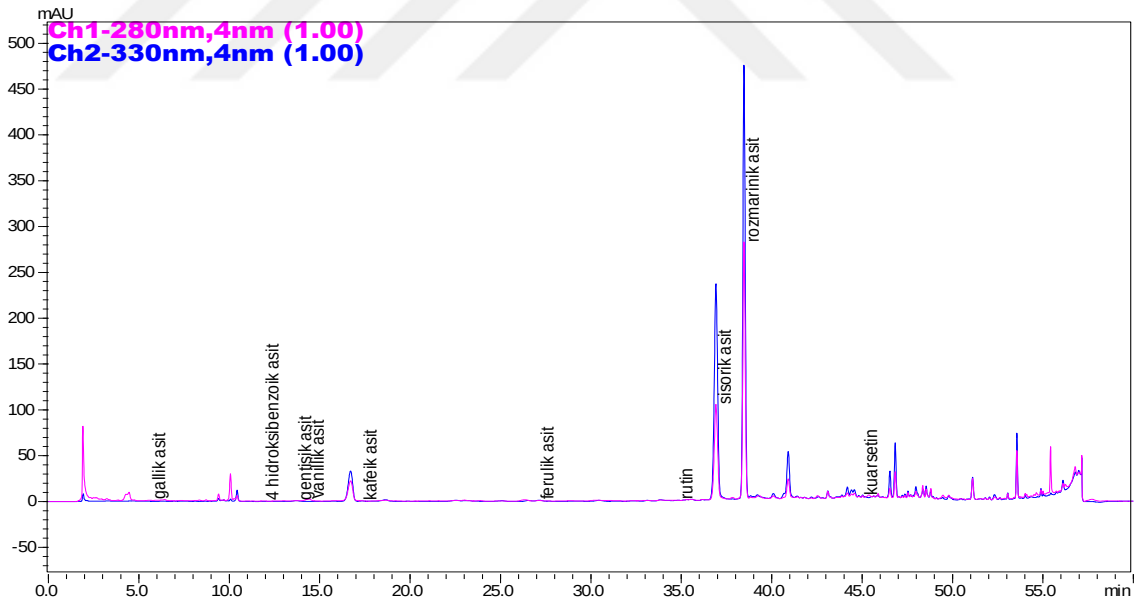
**Ek 12.** %75 kuraklık + 1mM Phe grubuna ait Yeşil Reyhan kromatogram



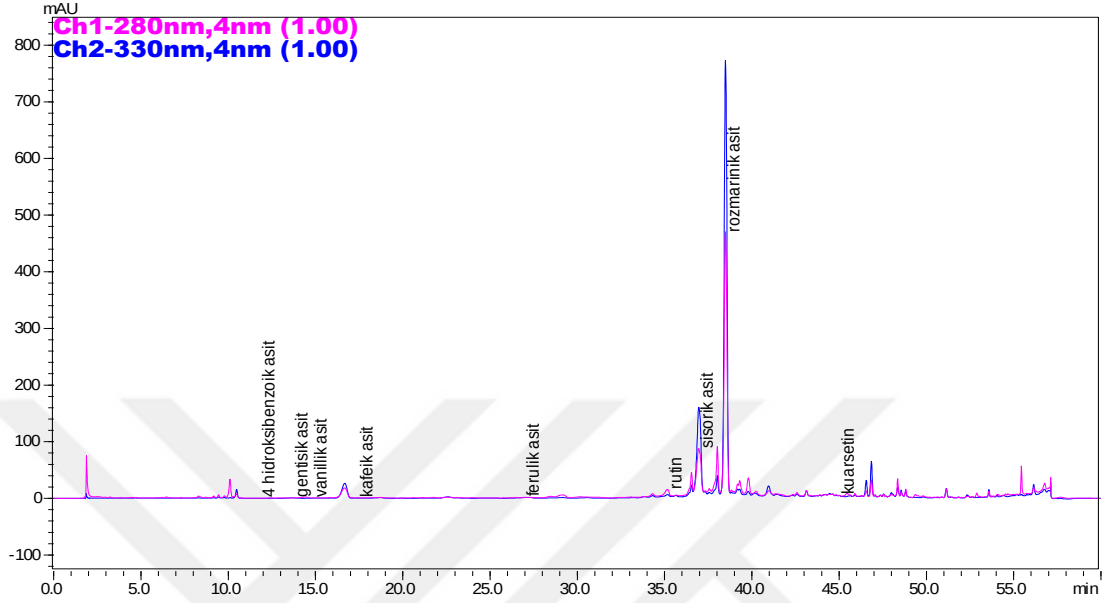
**Ek 13.** %75 kuraklık + 10mM Phe grubuna ait Mor Reyhan kromatogram



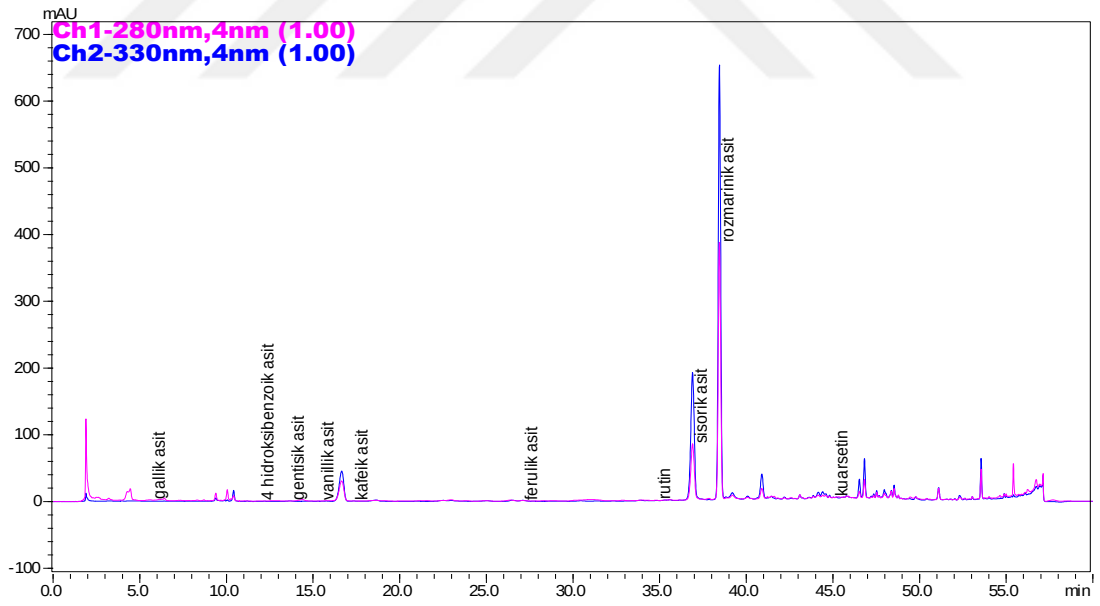
**Ek 14.** %75 kuraklık + 10mM Phe grubuna ait Yeşil Reyhan kromatogram



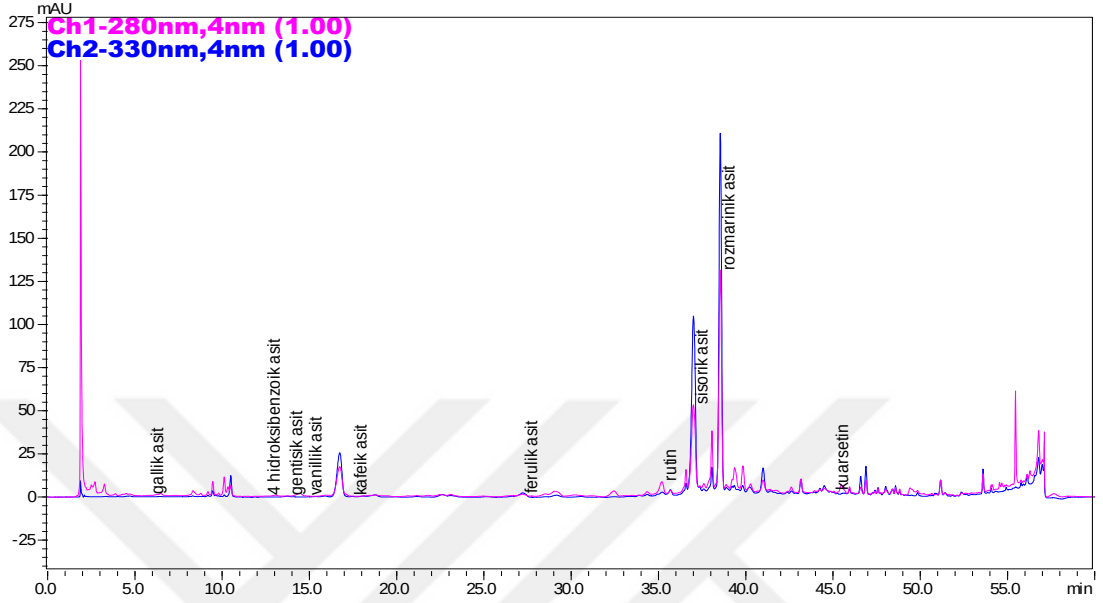
**Ek 15.** %50 kuraklık grubuna ait Mor Reyhan kromatogram



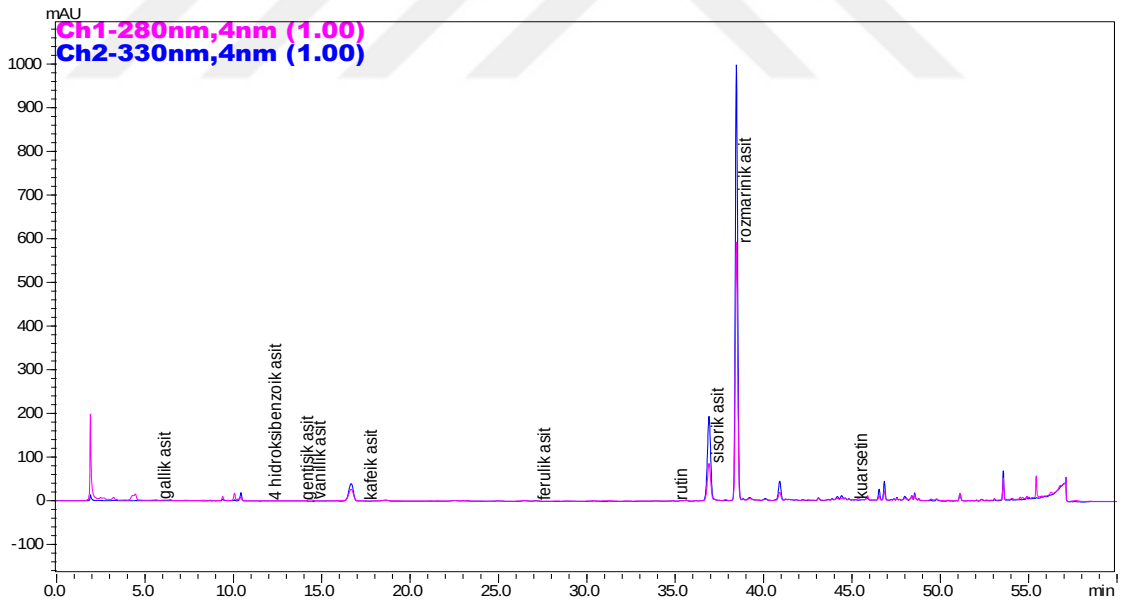
**Ek 16.** %50 kuraklık grubuna ait Yeşil Reyhan kromatogram



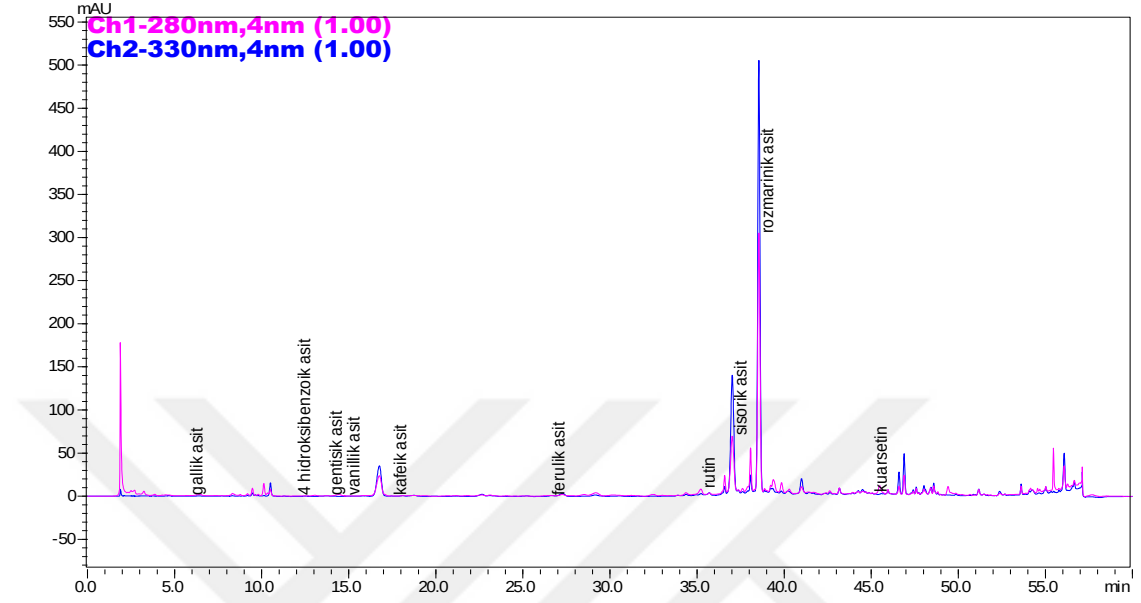
**Ek 17.** %50 kuraklık + 1mM Phe grubuna ait Mor Reyhan kromatogram



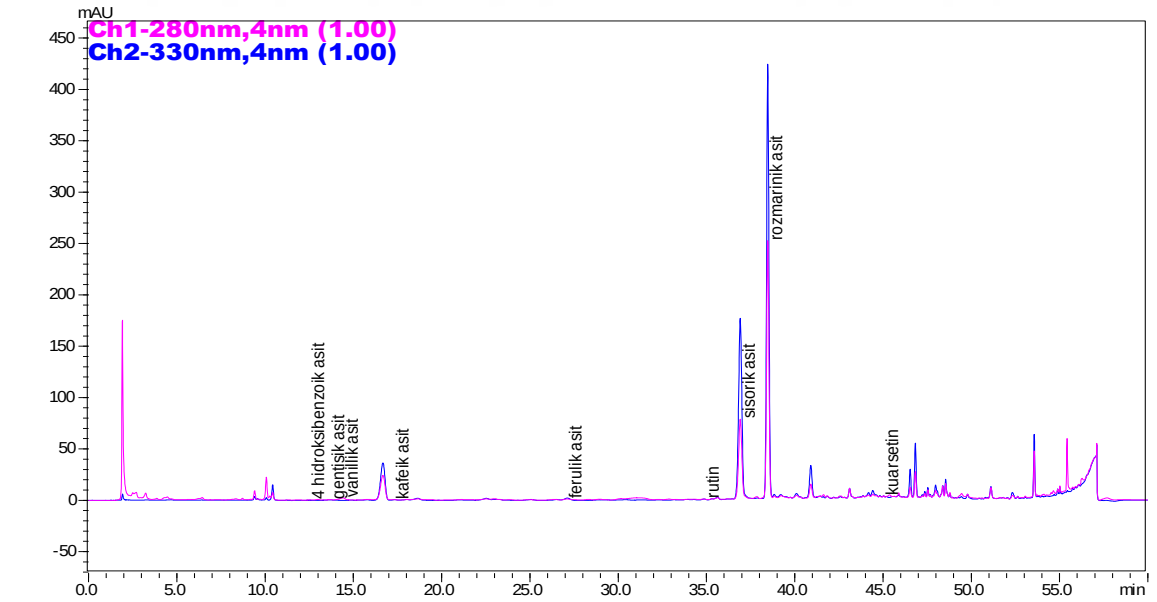
**Ek 18.** %50 kuraklık + 1mM Phe grubuna ait Yeşil Reyhan kromatogram



**Ek 19.** %50 kuraklık + 10mM Phe grubuna ait Mor Reyhan kromatogram



**Ek 20.** %50 kuraklık + 10mM Phe grubuna ait Yeşil Reyhan kromatogram



**Ek 21.** Bitki fotoğrafları







## 8. ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

**Adı Soyadı** : Mustafa AVŞAR  
**Uyruğu** :T.C.  
**Doğum Yeri ve Tarihi** :Tokat/ 15.07.1985  
**Telefon** :0(534) 7740430  
**e-mail** :mustafa\_avsar@yahoo.com.tr

### EĞİTİM

| Derece        | Adı, İlçe, İl                                      | Bitirme Yılı |
|---------------|----------------------------------------------------|--------------|
| Üniversite    | :Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Taşlı Çiftlik, Tokat  | 2014         |
| Yüksek Lisans | : Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Taşlı Çiftlik, Tokat | -            |