

**TUZ STRESİNİN BEZELYEDE (*Pisum sativum* L.)
FENOLİK BİLEŞİKLER ÜZERİNE ETKİSİ**

İbrahim TETİKTABANLAR

**Yüksek Lisans Tezi
Biyoloji Anabilim Dalı
Doç. Dr. Lokman ÖZTÜRK
2011
Her hakkı saklıdır**

T.C.
GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TUZ STRESİNİN BEZELYEDE (*Pisum sativum L.*) FENOLİK
BİLEŞİKLER ÜZERİNE ETKİSİ

İbrahim TETİKTABANLAR

TOKAT
2011

Her hakkı saklıdır

Doç.Dr lokman ÖZTÜRK danışmanlığında, İbrahim TETİKTABANLAR tarafından hazırlanan bu çalışma 25/01/2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Doç. Dr. Necmettin YILMAZ

Üye : Doç. Dr. Lokman ÖZTÜRK

Üye : Doç. Dr. Mahfuz ELMASTAŞ

İmza :

İmza:

İmza :

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Doç. Dr. Naim ÇAĞMAN

Enstitü Müdürü

10/6/2011

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.

İbrahim TETİKTABANLAR

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TUZ STRESİNİN BEZELYEDE (*Pisum sativum* L.) FENOLİK BİLEŞİKLER ÜZERİNE ETKİSİ

İbrahim TETİKTABANLAR

Gaziosmanpaşa Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilimdalı

Danışman: Doç. Dr. Lokman ÖZTÜRK

Bu çalışmada, iki bezelye çeşidine (Utrillo, Sprinter) 10 gün süre ile 50 mM ve 100 mM NaCl uygulandı. Bitkilerin yapraklarında malondialdehit, hidrojen peroksit, total fenolik bileşik, antosiyanin ve sinapoil ester miktarları araştırıldı. Tuz stresi her iki çeşitte malondialdehit miktarını hafifçe azaltmıştır. Hidrojen peroksit miktarı artan tuz miktarına bağlı olarak sprinterde önemli oranda artarken, utrilloda fazla değişmemiştir. Bezelye çeşitlerinde tuz stresi konsantrasyona bağlı olarak toplam fenolik madde miktarını önemli oranda artırmıştır. Bezelye çeşitlerinde, fenolik bileşik olan antosiyanin ve sinapoil ester miktarları tuz uygulaması sonucu değişmemiştir.

2011, 53 sayfa

Anahtar Kelimeler: Bezelye, Hidrojen peroksit, Fenolik bileşik, Tuz stresi, Antosiyanin, Sinapoil esterler.

ABSTRACT

Ms Thesis

EFFECT OF SALT STRESS ON PHENOLIC COMPOUNDS IN PEA (*Pisum sativum* L.)

İbrahim TETİKTABANLAR

Gaziosmanpaşa University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supercisor: Assoc. Prof. Dr. Lokman ÖZTÜRK

In this study, 50 mM and 100 mM of NaCl were applied to two different types of pea (Utrillo, Sprinter) during ten days. Quantities of malondialdehyde (MDA), hydrogen peroxide (H₂O₂), total phenolic compound, anthocyanin and sinapoyl esters in leaves of plants were investigated. Salt stress slightly decreased malondialdehyde content in both pea cultivars. The amount of hydrogen peroxide increased remarkably with the increased salt concentration in sprinter cultivar whereas it was not considerably changed in Utrillo cultivar. Salt stress depending on salt concentration significantly elevated total phenolic compound in pea cultivars. The amounts of anthocyanin and sinapoyl ester, that are phenolic compound, did not change as a result of salt treatment in both pea varieties.

2011, 53 pages

Keywords: Pea, Hydrogen peroxide, Phenolic compounds, Salt stress, Anthocyanin, Sinapoyl esters.

ÖNSÖZ

Tez konusunun seçiminde ve çalışmalarım esnasında her türlü desteğini, yardımını ve ilgisini esirgemeyen değerli danışman hocam Doç. Dr. Lokman ÖZTÜRK'e; deneyler sırasında desteklerini esirgemeyen birlikte çalıştığım arkadaşlarım Dursun KISA, Nusret GENÇ ve Bülent AKGÜL'e, bütün çalışmalarım da bana destek olan, sevgi ve ilgilerini eksik etmeyen nişanlım Nimet'e, anneme, babama ve kardeşlerime, Emre YAZICI'ya tüm içtenliğimle teşekkürlerimi sunarım.

İbrahim TETİKTABANLAR

Haziran 2011

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
TEZ BEYANI	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ve LİTERATÜR ÖZETLERİ	5
2.1. Toprakta Tuzluluğun Nedenleri	5
2.2. Tuz Stresinin Bitkide Oluşturduğu Zararlar	6
2.3. Tuz Stresine Karşı Geliştirilen Adaptasyonlar	7
2.4. Bitkilerde Tuz Stresinin Algılanması ve Sinyal İletim Yolları	8
2.5. Tuz Stresinde Osmotik Dengeyi Sağlamaya Yönelik Mekanizmalar	11
2.6. Serbest Oksijen Radikalleri ve Hücreden Temizlenmesi	12
2.7. Fenolik Bileşikler	14
2.7.1. Fenolik Bileşiklerin Bitkilerdeki Roller	17
2.8. Antosiyaninler	20
2.9. Sinapoil Esterler	24
2.10. Önceki Çalışmalar	25
3. MATERYAL METOT	28
3.1. Materyal	28
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	28
3.1.2. Kullanılan Cihaz ve Aletler	28
3.1.3. Kullanılan Çözeltiler	29
3.1.3.1. Hidrojen Peroksit Miktarının Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler	29
3.1.3.2. Malondialdehit Miktarının Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler	29
3.1.3.3. Total Fenolik Madde İçeriğinin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler	29
3.1.3.4. Antosiyanin ve Sinapoil İçeriğinin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler	29
3.2. Metot	30
3.2.1. Bitkilerin Yetiştirilmesi	30
3.2.2. Malondialdehit Tayini	30

3.2.3.	Hidrojen Peroksit Miktarının Belirlenmesi	31
3.2.4.	Total Fenolik Madde Miktarının Belirlenmesi	31
3.2.5.	Antosiyanin ve Sinapoil Esterlerin Belirlenmesi	32
3.2.6.	İstatistik Analiz	33
4.	ARAŞTIRMA SONUÇLARI	34
4.1.	Malondialdehit Miktarının Sonuçları	34
4.2.	Hidrojen Peroksit Miktarının Belirlenmesinde Kullanılan Standart Grafik	34
4.3.	Hidrojen Peroksit Miktarı Sonuçları	35
4.4.	Total Fenolik Bileşiklerin Miktar Tayininde Kullanılan Standart Grafik	36
4.5.	Total Fenolik Bileşik Miktarı Sonuçları	37
4.6.	Antosiyanin Miktarının Belirlenmesinde Kullanılan Standart Grafik	38
4.7.	Antosiyanin Miktarı Sonuçları	39
4.8.	Sinapoil Ester Miktarı Tayininde Kullanılan Standart Grafik	40
4.9.	Sinapoil Ester Miktarı Sonuçları	41
5.	TARTIŞMA ve SONUÇ	43
6.	KAYNAKLAR	47

ŞEKİLLER DİZİNİ

		<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1.	Tuz ve kuraklık sinyal yollarının fonksiyonel ayrımı	8
Şekil 2.2.	Tuz stresi altında iyon homeostasisinin düzenlenmesinde SOS yolu	10
Şekil 2.3.	Askorbat-glutasyon döngüsü	14
Şekil 2.4.	Fenol halkası ve kuarsetin	15
Şekil 2.5.	Hidrojen peroksitin vakuol, kloroplast ve sitosolde temizlenmesi	17
Şekil 2.6.	Fenolik bileşiklerin reaktif oksijen türlerini temizlenme mekanizması	18
Şekil 2.7.	Antosiyanidin genel formülü	21
Şekil 2.8.	Antosiyaninlerin biyosentezi	22
Şekil 2.9.	Antosiyaninlerin antioksidan etkinliklerde rol alan yan grupları	24
Şekil 2.10.	Sinapoil ester metabolizması	25
Şekil 4.1.	Tuz stresinin bezelye çeşitlerinde malondialdehit miktarları üzerine etkisi	34
Şekil 4.2.	Hidrojen peroksit miktarının belirlenmesinde kullanılan standart grafik	35
Şekil 4.3.	Tuz stresinin bezelye çeşitlerinde hidrojen peroksit miktarları üzerine etkisi	36
Şekil 4.4.	Total fenolik madde miktarının belirlenmesinde kullanılan standart grafik	37
Şekil 4.5.	Tuz stresinin bezelye çeşitlerinde total fenolik bileşik miktarları üzerine etkisi	38
Şekil 4.6.	Antosiyanin miktarının belirlenmesinde kullanılan standart grafik	39
Şekil 4.7.	Tuz stresinin bezelye çeşitlerinde antosiyanin miktarları üzerine etkisi	40
Şekil 4.8.	Sinapoil ester miktarının belirlenmesinde kullanılan standart grafik	41
Şekil 4.9.	Tuz stresinin bezelye çeşitlerinde sinapoil miktarları üzerine etkisi	42

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. Türkiye’de sorunlu arazilerin dağılımı	5
Çizelge 2.2. Fenolik ve polifenolik bileşiklerin temel yapıları	16

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
Cl	Klor
CO ₂	Karbondioksit
Cu	Bakır
Fe	Demir
FlavOH	Flavonoid bileşiği
FlavO [·]	Flavonoid fenoksi radikali
H	Hidrojen
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HO ₂ [·]	Perhidroksil radikali
K	Potasyum
KI	Potasyum iyodür
Na	Sodyum
NaCl	Sodyum klorür
NaClO	Sodyum hipoklorit
Na ₂ CO ₃	Sodyum karbonat
O ₂	Oksijen
¹ O ₂	Singlet oksijen
O ₂ ^{·-}	Süperoksit radikali
OH [·]	Hidroksil radikali
PhOH	Fenolik bileşik
PhO [·]	Fenoksi radikali

Kısaltmalar	Açıklama
AsA	Askorbik asit
Cy	Siyanidin
DHA	Dehidroaskorbat

DNA	Deoksiribonükleik asit
Dp	Delfinidin
g	Gram
GSH	İndirgenmiş glutatyon
GSSG	Yükseltgenmiş glutatyon
IAA	İndol-3-asetik asit
LEA	Geç embriyogenez proteinleri
MAPK	Mitogen-aktive edici kinazlar
MAPKK	Mitogen-aktive edici kinaz kinaz
MAPKKK	Mitogen-aktive edici kinaz kinaz kinaz
MDA	Malondialdehit
MDHA	Monodehidroaskorbat
mg	Miligram
SOD	Süperoksit dismutaz

1. GİRİŞ

Bitkiler açısından stres terimi abiyotik (tuzluluk, ağır metal birikimi, radyasyon, kuraklık, düşük ve yüksek sıcaklık gibi) ve biyotik (hastalık yapan mantarlar, bakteriler, virüsler vb. zararlılar) faktörler tarafından bitkilerin büyümesine, gelişmesine ve verimine etki eden şartlar olarak tanımlanabilir.

Topraktaki tuzluluk problemi insanların zirai faaliyetlere başlamasından önceki zamanlarda da mevcuttu. 6000 yıllık tarihsel kayıtlarda, doğal kaynakları tahrip eden tuzluluğun insan yerleşimini etkilediğine dair kanıtlara rastlanmıştır. Toprağın işlenmesiyle oluşan tuzluluğun etkisi daha kısa zamanda ortaya çıkarken işlenmemiş topraklarda tuzluluk yüzyılları aşkın bir süre sonunda hissedilmiştir. Günümüzde dünyadaki tuzlu toprakların alanı düzenli olarak artmaya devam etmekte ve tahıl üretiminde tuzluluk önemli bir problem olmayı sürdürmektedir. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO, 2008) verilerine göre dünyadaki arazilerin % 6'sı tuzluluktan etkilenmektedir. Bu bilgiye ek olarak sulama yapılan 45 milyon hektarlık alan, yerine göre değişen şiddetlerde tuzluluğun etkisi altındadır (Athar ve Ashraf, 2009). Türkiye'deki 1,5 milyon hektarlık alan tuzlulukla karşı karşıyadır. Bu alanların % 60'ı tuzlu, % 19,6'sı orta derece tuzlu, % 0,4'ü orta derece alkali, % 12'si hafif tuzlu alkali, % 8'i orta derece tuzlu alkali olarak sınıflandırılmaktadır (Kuşvuran, 2010).

Toprak tuzluluğu, toprağın saturasyon ekstraktının elektrik iletkenliği ile (EC: Electrical conductivity) ifade edilir. Suyun tuz yoğunluğu ne kadar fazla ise elektrik iletkenliği o kadar yüksektir ve ozmotik potansiyeli de o oranda düşüktür. Tuzlu toprakların saturasyon ekstraktlarının elektrik iletkenliği 4 dS/m'den daha yüksektir. Toprak tuzluluğu problemi; sulamak için kullanılan suların mineral içeriği, kanalla sulanan zirai ekosistemlerde hatalı drenaj, sahil kesimlerine deniz suyunun kasırgalarla girmesi, kurak ve yarı kurak bölgelerde yüksek evaporasyonun neden olduğu kök bölgesinde tuz birikimi ve yağmur sularının bu tuzları yıkamada yetersiz kalması nedeniyle artmaktadır (Akman ve ark., 2001; Hirt ve Shinozaki, 2004).

Bitkilerdeki fizyolojik ve biyokimyasal olaylar tuz stresinden etkilenmektedir. Tuzluluğun etkisi ile bitkilerin filiz ve kök gelişimi yavaşlar, yapraklar küçük kalır, tomurcuk oluşumu azalır. Ayrıca klorofil, protein, sitokinin miktarlarında ve fotosentez oranında azalmaların olduğu kaydedilirken absisik asit ile etilen miktarlarında artışların meydana geldiği belirtilmektedir (Ekmekçi ve ark., 2005; Frary ve ark., 2010).

Tuz stresinin hücrede iyon zehirlenmesine ve osmotik stres sonucu iyon dengesizliğine yol açtığı bilinmektedir. Bitkilerde tuzun ayırt edici üç etkisi mevcuttur:

1. Osmotik etki: Rizosferde osmotik potansiyeli azalttığı için bitkinin su alımını zorlaştırmaktadır.
2. Toksik etki: Hücre fonksiyonları açısından gerekli olan bağlanma bölgeleri için sodyumun (Na^+) potasyumla (K^+) yarışma yeteneğinden kaynaklanır.
3. Besin etkisi: Bir taraftan Na^+ ile gerekli diğer katyonların diğer taraftan klor (Cl^-) ile gerekli diğer anyonların arasındaki rekabetten dolayı besin alımını ve taşınması sınırlanır (Xue ve Liu, 2008; Oueslati ve ark., 2010).

Tuz stresi bitki dokularında reaktif oksijen türleriyle ortaya çıkan oksidatif stresi oluşturur. Reaktif oksijen türleri hücre içerisinde kloroplastlarda, mitokondride, sitozolde, peroksizomlarda meydana gelir. Reaktif oksijen türleri bir ya da daha fazla sayıda eşlenmemiş elektrona sahiptirler ve bu elektronlarını eşlemek için kararlı halde bulunan bileşiklere saldırırlar (Oueslati ve ark., 2010; Polesskaya ve ark., 2006). Hücrede bulunan DNA, protein, lipid gibi makromoleküller bu saldırıların hedefi olabilirler. Sonuçta bu moleküllerin yapı ve fonksiyonlarında önemli değişiklikler meydana gelebilir.

Reaktif oksijen türlerinin kararlı duruma geçmeye çalışmaları hücre içerisinde herhangi koruyucu mekanizmanın olmaması durumunda oldukça zarar verici olabilir. Hücreler reaktif oksijen türlerinin oluşturduğu hasarları antioksidan sistemleri ile en aza indirmeye çalışırlar. Bu antioksidan sistemlerin içerisinde flavonlar, antosiyaninler, α - tokoferol, askorbat, glutatyon ve polifenolik bileşikler ile antioksidan enzimlerden süperoksit dismutaz, katalaz, askorbat peroksidaz, peroksidaz gibi çok sayıda enzim bulunur (Hichem ve ark., 2009; Akgül, 2010).

Reaktif oksijen türleri membran lipitlerine saldırarak lipid peroksidasyonunun başlamasına yol açar. Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan ürünlerden biri olan malondialdehit (MDA) hücrenin serbest radikal seviyesi hakkında bilgi edinmek için kullanılmaktadır. Stres durumunda hücredeki malondialdehit (MDA) miktarı lipit peroksidasyonundaki artış ile orantılı bir şekilde artar (Meloni, 2003; Xue ve Liu, 2008).

Farklı çevresel faktörler ve stres durumlarında fenilpropanoid metabolizmasının daha aktif çalışmasından ötürü fenolik bileşik miktarlarında artışların olduğu görülmüştür. Bazı flavonoidler ve isoflavonlar bitki yaralandığı ya da enfeksiyon kapıtığında daha fazla miktarda sentezlenmektedir (Michalak, 2006). Stres şartlarında fenilpropanoid ya da şikimat yollarıyla sentezlenen çözünür fenolik bileşikler bitki dokularındaki güçlü antioksidanlardır. Fenolik bileşiklerin diğer antioksidant metabolitlerden daha yüksek aktiviteye sahip olması fenolik bileşiklerin çok iyi hidrojen verebilmelerine ve radikalleri kararlı duruma getirebilmelerine bağlanmaktadır (Ashraf ve ark., 2010).

Flavonoidler arasında yer alan antosiyaninler şikimat yoluyla flavonoid öncüllerinden türetilen pigmentlerdir. Suda çok iyi derecede çözünürler ve vakuolde depolanırlar. Antosiyaninlerin bitkideki üretimi, senesens sırasında yaprakları oksidatif hasardan koruması ve ultraviyole-B (UV-B) ışınlarını absorbe ederek fotosentetik sistemdeki hasarı azaltması bakımından yararlıdır. Antosiyaninler osmotik olarak aktif oldukları için sentezlerindeki artış osmotik kontrol artışını sağlayarak dayanıklılığı artırabilir (Wahid ve Ghazanfar, 2006). Ayrıca antosiyaninlerin antioksidan özelliklerinin askorbattan daha iyi olduğu ve sinapoil esterlerin de antioksidan özellikte olduğu bilinmektedir (Posmyk ve ark., 2009).

Bezelye *Leguminosae* familyasının *Papilionoideae* alt familyasındaki *Pisum* cinsine ait bir türdür. Bezelye tohumları neolitik çağdan beri gıda maddesi olarak tüketilmektedir. Kültür sebzeleri arasında protein ve vitamin bakımından zengin olan bezelye ılıman bölgelerde yetiştirilebilmektedir. Ülkemizin daha çok sırası ile Marmara, Ege, Karadeniz, Akdeniz bölgelerinde yetiştirilmektedir (Özdemir, 2002). Bezelye bitkisi diğer baklagiller gibi tuza hassastır ve ılımlı tuz stresi verim kaybına neden olur (Noreen ve ark., 2007).

Bu çalışmada farklı tuz konsantrasyonlarında büyütülen utrillo ve sprinter bezelye çeşitlerinin yapraklarında malondialdehit, hidrojen peroksit, total fenolik bileşik, antosiyanin, sinapoil ester miktarındaki değişmeler incelenmiştir.

2. KAYNAK ve LİTERATÜR ÖZETLERİ

2.1. Toprak Tuzluluğunun Nedenleri

Tuzlulaşmaya neden olan faktörlerin başında arazide drenajın zayıf olması gelmektedir. Toprağın su geçirgenliği az veya taban suyu düzeyi yüksek olduğunda toprakta tuzlar birikir. Drenaj yolları iyi oluşmamış kapalı havzalarda etraftaki yüksek araziden sızan sular, arazinin alçak yerlerinde toplanmakta ve taban suyunu yükseltmektedir. Böyle koşullar altında tuzlu taban suyunun yukarıya doğru hareketi veya yüzey suyunun buharlaşması, tuzlu toprakların oluşumuna yol açmaktadır. Tuzluluğun olmadığı topraklarda elverişsiz sulama sularının kullanılması, uygun olmayan sulama sistemleri ya da yetersiz drenaj gibi faktörler kısa sürede toprağın çoraklaşmasına yol açabilir (Ekmekçi ve ark., 2005; Yakupoğlu ve Özdemir, 2007).

Tuzlar yağışlı bölgelerde yağmur suları ile yıkanarak yer altı sularına karışır ve sonra da akarsularla denizlere ulaşır. Bu yüzden tuzlulaşma pratik olarak yağışlı bölgelerde oluşmaz. Toprakların deniz suyu etkisinde kaldıkları nehir deltaları ve denize yakın alçak yerlerde tuzlulaşma görülebilir (Kaçar ve ark., 2006).

Tuzlar, evaporasyon ve transpirasyondan kalan kalıntılar olarak bitki bünyesinde birikebilmektedir. Bitkilerin yaprak ve diğer kısımlarının ölererek yere düşmelerinden sonra tuzlar yağışlarla toprağa tekrar geri dönebilir. Kurak bölgelerde toprak tuzluluğu evaporasyonun yıl boyunca toprağa geçen yağış miktarından fazla olması yüzünden artar (Yediyıldız, 2008). Türkiye'deki toprakların durumu Çizelge 2.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Türkiye'de sorunlu arazilerin dağılımı (Sönmez, 2004)

Sorunun Niteliği	Alan (ha)	Sorunlu Alanlara Göre %
Hafif Tuzlu	614 617	41
Tuzlu	505 603	33
Alkali	8641	0,5
Hafif Tuzlu-Alkali	125 863	8
Tuzlu-Alkali	264 958	17,5
Toplam	1 518 722	100

2.2. Tuz Stresinin Bitkide Oluşturduğu Zararlar

Tuzluluk bitkide, büyümei engelleyecek ve ileri aşamada ölüme yol açabilecek osmotik stres, iyon zehirlenmesi, mineral alımında dengesizlik gibi sorunlara neden olur. Bitkilerde tuz stresi pek çok fizyolojik ve biyokimyasal değişikliğe yol açar. Tuz stresi bitkilerin stoma sayısını, kök, gövde ve sürgün uzunluğunu, yaprak alanı ve sayısını, klorofil miktarını, çimlenme, mutlak ve bağlı büyüme oranlarını azaltarak verimi düşürür. Meyve ve tatta bozulmalara neden olur (Hernández ve Almansa, 2002; Eryılmaz, 2003; Ashraf ve Harris, 2004).

Yüksek konsantrasyonlu tuz çözeltilerinde su osmotik olarak tutulduğu için tuzlu koşullarda bitkilerin su alımı zorlaşmaktadır. Tuz stresi su alımını azaltarak ortamda sodyum kationunun, buna bağlı Cl^- ve SO_4^{2-} anyonlarının artmasını sağlayarak protoplazmada iyon dengesinin ($K^+ + Ca^{2+}/Na^+$) bozulmasına neden olur. Sonuçta enzim aktivitesi azalırken, protein sentezi geriler, zar geçirgenliği azalır ve diğer önemli hücrenel yapılar da zarar görür. İyonik denge bozulduğunda tuzu oluşturan iyonlarla bitki için gerekli besin elementleri arasında rekabet oluşur ve bitkiler kendileri için gerekli olan besin elementlerini yeterli miktarda alamazlar (Kaçar ve ark., 2006).

Tuz stresi solunuma ait zincirlerde fotofosforilizasyon ve fosforilizasyon ile çok az enerji üretilmesine, azot asimilasyonunun bozulmasına, protein metabolizmasında karışıklıkların oluşmasına, putresin, kadaverin gibi diaminlerin ve poliaminlerin birikmesine yol açar. Tuzluluk sadece stomaların kapanmasına neden olarak fotosentezin azalmasını sağlamaz; kloroplastlar üzerine elektron taşınmasını ve sekonder olayları etkileyerek de fotosentezin bozulmasına neden olabilir. Solunumla ilgili glikoliz ve trikarboksilik asit döngülerinin enzim sistemleri tuzluluğa karşı hassastır. Tuzluluktan etkilenen faktörden biri de bitkinin hormonal dengesidir. Sitokinin miktarında azalma ve absisik asit, etilen miktarlarında artış gözlenmektedir (Kaçar ve ark., 2006; Shahid ve ark., 2008).

2.3. Tuz Stresine Karşı Geliştirilen Adaptasyonlar

Tuzluluğa maruz kalan bitkiler, tuzun zararlı etkilerinden kaçınamayabilirler. Bu nedenle tuzlu topraklarda yetişen bitkiler en azından bir miktar tuza dayanıklılık göstermek zorunda kalırlar. Tuzlulukla karşı karşıya kalan bitkilerde büyüme ve metabolizmanın korunabilme derecesine 'tuza dayanıklılık' denir. Bitkiler yüksek tuz konsantrasyonlarına dayanıklılıkları bakımından, halofitler (tuzcul bitkiler) ve glikofitler (tuza hassas bitkiler) olmak üzere iki gruba ayrılırlar (Taiz ve Zeiger, 2008). Halofitler yüksek tuz konsantrasyonlu topraklarda yaşarken tuz düzeyi düşük topraklarda yaşayamazlar. Tuzlu habitatlarda yaşayan obligat halofitlerde büyüme, tuzun ılımlı miktarda alımıyla gerçekleşebilir. Ancak bitkinin tuz alımı yüksek seviyelere ulaşırsa büyüme bozulur, antosiyanin üretimi ya da klorofil parçalanması gibi stres sinyalleri meydana gelir. Glikofitler tuzluluğa hassas bitkilerdir ve yüksek tuz konsantrasyonlarında yaşamlarını devam ettiremezler. Bitkilerde tuza dayanıklılık; protoplazmadaki aşırı tuz miktarının düzenlenmesi, artan iyon konsantrasyonu ile bir araya gelen toksik ve ozmotik etkilerin tolere edilme yeteneği ile sağlanmaktadır (Akman ve ark., 2001; Gürel ve Avcıoğlu, 2004). Sürgünlerden, meristemlerden, fotosentez yapan yapraklardan tuz dışarı atılarak bitkideki hasarlar en aza indirilmeye çalışılır. Tuza hassas bitkiler topraktaki orta derece tuzluluğu, zararlı iyonları kökten sürgüne göndererek tolere ederler. Tuza dirençli bazı bitkiler iyonları köklerinden dışarı atamazlar. Bu bitkilerin yaprak yüzeylerinde tuz bezleri bulunur. Bu bezlere taşınan iyonlar kristalleştirilerek zararsız hale getirilir (Taiz ve Zeiger, 2008).

Tuz stresine karşı biyokimyasal stratejileri Parida ve Das (2005) şöyle sıralamışlardır:

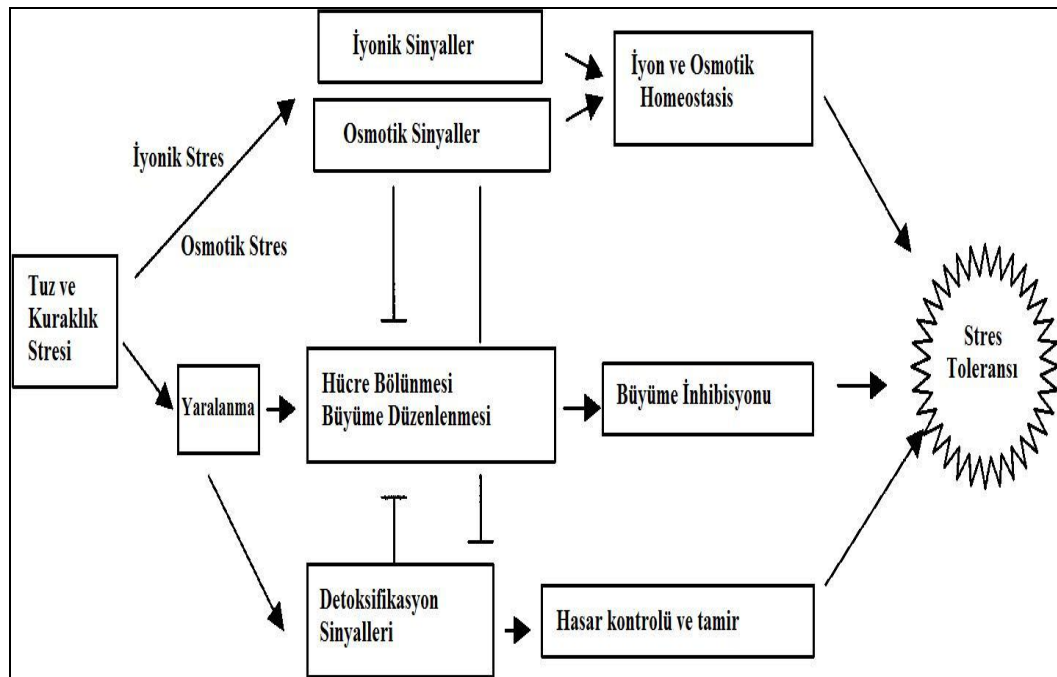
1. Seçici iyon birikimi veya dışarı atılması.
2. Köklerden iyon alımının ve yapraklara taşınımının kontrolü.
3. Hücrede ve tüm bitkide iyonların belirli bölgelerde tutulması.
4. Uygun solusyonların sentezi.
5. Fotosentetik yolda değişiklikler.
6. Membran yapısında değişiklik.
7. Antioksidan enzimlerin indüksiyonu.
8. Bitki hormonlarının indüksiyonu.

Zehirleyici düzeydeki Na^+ iyonuna karşı bitkiler dört farklı mekanizma ile tepki vermektedir. Bitkide tuzlulukla artan Na^+ iyonları, Na^+ pompaları ile köklerden uzaklaştırılarak tolere edilebilir seviyede tutulur. Na^+ vakuolde biriktirilerek bitkilerdeki

tuz zararı azaltılabilir. Na^+ ve K^+ iyonlarının hücre zarından geçişinin engellenmesi için hücre zarının geçirgenliğinin değişmesi de tuza karşı korunma mekanizmalarından birisidir. Bitkilerin tuzdan korunmak için kullandıkları bir diğer mekanizmada hızlı büyüme göstererek birim hacimde alınan tuzun bünyede seyreltilmesidir (Kuşvuran, 2010).

2.4. Bitkilerde Tuz Stresinin Algılanması ve Sinyal İletim Yolları

Tuz ve kuraklık stres sinyalleri fonksiyonel olarak 3 şekilde sınıflandırılabilirler. Birincisi stres sonucu bozulan homeostasisin tekrar sağlanabilmesi için ozmotik ve iyonik stres sinyalleridir. İkincisi stres hasarlarını kontrol ve tamir eden detoksifiye sinyalleridir. Üçüncüsü belirli stres koşullarında hücre bölünme ve uzamasını düzenleyen sinyallerdir. Homeostasis ve detoksifikasyon sinyalleri strese tolerans sağlar (Şekil 2.1), (Zhu, 2002).



Şekil 2.1. Tuz ve kuraklık sinyal yollarının fonksiyonel ayrımı (Zhu, 2002)

Tuz stresi hücrenin osmotik ve iyon homeostasislerini etkilemektedir. Na^+ ve Cl^- iyonlarının hücreye fazla miktarda girişi proteinlerin yapılarında biçimsel değişikliklere ya da plazma membranında elektriksel değişimlere yol açar. Osmotik ve iyonik sinyal

yolları için başlangıç iyonik (Na^+ fazlalığı), osmotik (örneğin turgor) değişikliklerdir (Akman ve ark., 2001; Zhu, 2002).

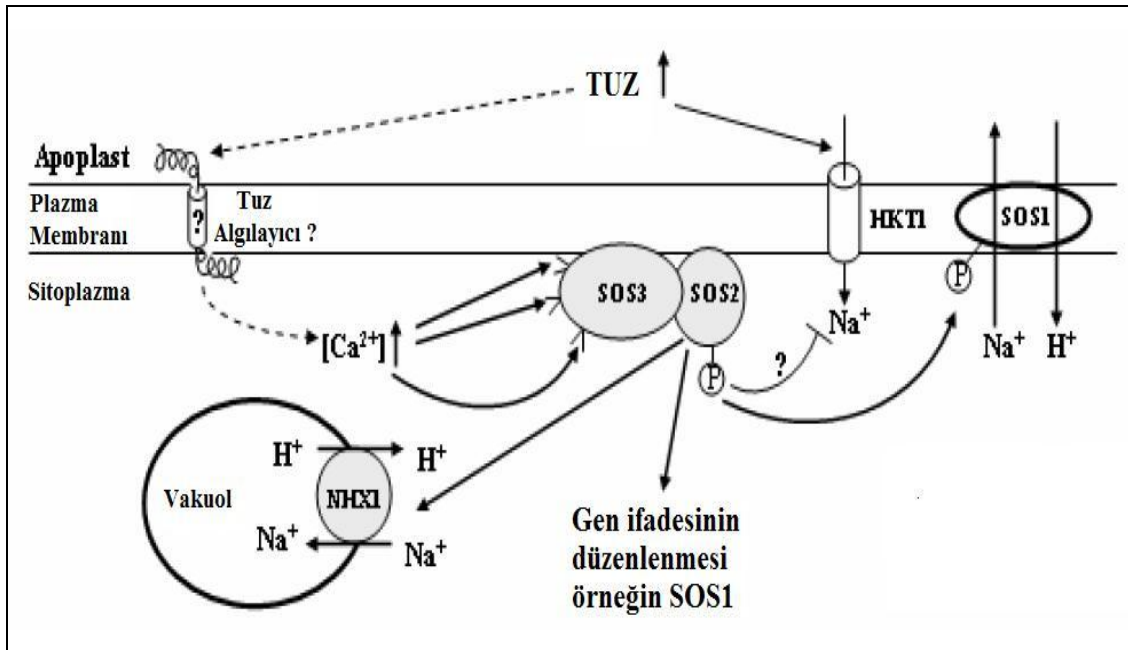
Yüksek tuz konsantrasyonlarında Na^+ hücreye spesifik olmayan kanallarla girerek membran depolarizasyonuna neden olur. Membran polarizasyonundaki değişiklikler kalsiyum kanallarını aktive ederek tuz stres sinyallerini oluşturur (Sanders ve ark., 1999).

Osmotik stresin neden olduğu turgor kaybı hücre hacminde değişime yol açar ve hücre duvarından plazma membranı içeri çekilir. Hücre duvarından membran içeri çekilmesi hücre duvarı ile temas halinde olan membrana bağlı reseptör kinazların, iyon kanallarının, iyon taşıyıcılarının biçimsel olarak değişime ya da birlikte kümelenmesine yol açar. Proteinlerdeki bu değişimler osmotik stresin algılanmasını sağlar. İyonların geçişi ve osmotik stresle ortaya çıkan turgor değişiklikleri tuz stres sinyali için başlangıç görevi görür. İyon kanalları, iyon taşıyıcıları, hücre içi ya da plazma membranı üzerindeki iyon bağlı proteinler iyonik stresin ilk algılayıcılarıdır (Hirt ve Shinozaki, 2004).

Ya hücre içi depolardan ya da hücre dışından kalsiyum alınmasıyla meydana gelen sitozolik kalsiyum artışı kuraklık, soğuk ve tuz streslerinde ikinci mesajcı olarak işlev görmektedir. Bitki hücrelerindeki kalsiyum salınımı stres çeşidine, stresin gelişme derecesine, önceden strese maruz kalıp-kalmadığına ve doku çeşidine bağlı olarak değişir. Tuz stresinde kalsiyum salınımının çok kısa zamanda meydana gelmesi ve 1-10 dakika devam etmesi tuz sinyalinin oluşturulmasında başlangıç olaylarından biri olduğu düşünülmektedir (Hirt ve Shinozaki, 2004).

Tuz stresi ile oluşan kalsiyum sinyali kalsiyum bağlı protein kinazlar (CPDK) tarafından algılanır. Kalsiyum bağlı protein kinazlar kalsiyum sinyalini fosfoproteinlere aktarırlar. Protein fosforilasyonu enzimatik aktiviteyi etkileyen ve geç embriyogenez (LEA: late embryogenesis abundant) proteinlerini şifreleyen genlerinde aralarında bulunduğu genlerin ifadeleri değişerek sinyale karşı hücrel cevapların oluşması sağlanır. CPDK osmotik ve iyonik stres süresince osmoregülasyonda çok önemli rol oynayan taşıyıcı proteinleri (aquaporinler, iyon kanalları, H^+ -ATPaz) düzenler (Xiong ve ark., 2002; Hirt ve Shinozaki, 2004; Mehlmer ve ark., 2010).

Tuz stresinde iyonik sinyal bakımından SOS (Salt Overly Sensitive) genlerini temel alan bir sinyal yolunun bulunduğu kanıtlanmıştır. SOS sinyal yolunun muhtemelen başlangıcı, Ca^{2+} sinyalini tetikleyen hücre içi ya da hücre dışı Na^+ fazlalığıdır. Bu yolda tuz stresi sonucu ortaya çıkan sitosolik Ca^{2+} sinyali, Ca^{2+} bağlayan SOS3 proteini tarafından algılanır. Ca^{2+} bağlı SOS3 proteini bir serin/treonin kinaz olan SOS2 ile etkileşerek SOS2'yi aktive eder ve SOS3-SOS2 kompleksini oluşturur. Aktifleşen SOS2 kinaz daha sonra sodyumu sitozolden pompalayacak olan Na^+/H^+ taşıyıcısı SOS1'i fosforiller. SOS3-SOS2 kinaz kompleksi SOS1 ve diğer genlerin transkripsiyon seviyesini düzenler. Ayrıca SOS3-SOS2 kinaz kompleksi NHX1 aktive ederek sodyumun vakuolde tutulmasını sağlayabilir ve plazma membranında sodyum taşıyıcısı HKT1 aktivitesini inhibe ederek sodyumun hücre içersine girmesini sınırlayabilir (Şekil 2.2), (Zhu, 2002; Hirt ve Shinozaki, 2004).



Şekil 2.2. Tuz stresi altında iyon homeostasisinin düzenlenmesinde SOS yolu (Hirt ve Shinozaki, 2004)

Oluşan kalsiyum sinyalinin algılayıcılarından bir tanesi de osmotik ve oksidatif stresle düzenlenen mitogen-aktive edici kinaz (MAPK) sinyal yoludur. Bu sinyal yolu ile MAPK birimleri strese karşı osmolit ve antioksidanların üretilmesine katkıda bulunabilir. Basit olarak bir MAPK kaskadı yukarı yöndeki reseptörlere ve aşağı kısımdaki hedef moleküllere çeşitli yollarla bağlantılı olan MAPKKK, MAPKK, MAPK birimlerinden oluşur. MAPK kaskatının aktifleşmesi stresle ilgili genleri aktive

eder ve osmolit sentezi ile birikimi meydana gelir (Nakagami ve ark., 2005). Bitkide MAPK yolu hücre bölünmesiyle, sinyalin gelişimiyle, hormonlarla, abiyotik ve biyotik stresle ilişkilidir. Tuz stresi hızlı bir şekilde MAPK yolunu aktive eder. Yapılan çalışmalar tuz stresi altında reaktif oksijen türleri aracılıklı sinyallerin MAPK yoluyla meydana geldiğini ortaya çıkarmıştır. Osmotik stres altında değişmiş MAPK sinyali hücre döngüsünün düzenlenmesine ve büyümenin engellenmesine katkıda bulunabilir (Xiong ve ark., 2002; Hirt ve Shinozaki, 2004).

2.5. Tuz Stresinde Osmotik Dengeyi Sağlamaya Yönelik Mekanizmalar

Stres ortamında bulunan bitkiler, hücrelerinin içerisindeki osmotik dengeyi sağlayabilmek için sitoplazma ve organellerinde çeşitli çözünebilir maddeleri biriktirirler. Bu maddeler membran bütünlüğünü sağlayarak ve enzimlerin daha iyi çalışmasına yardım ederek stres koşullarındaki bitkinin osmotik düzenleme yapmasında rol oynarlar. Strese tolerans ile glisinbetain, prolin gibi organik maddelerin sentezlenmesi arasında pozitif bir ilişkinin olduğu pek çok çalışmada gösterilmiştir (Ashraf ve Foolad, 2007). Tuz stresiyle başa çıkmak için çözünebilir maddelerden biri olan mannitol, kerevizde mannoz-6-fosfat redüktazın aktivasyonu yoluyla sentezlenmektedir (Parida ve Das, 2005).

Bitkiye direnç yeteneği sağlayan prolin genellikle stres koşullarında miktarı artan suda çözünebilir bir aminoasittir. Bitkide prolin birikimi bitki hücresinin stresten etkilendiği anlamını taşımaktadır. Prolin organizmada glutamattan, glutamat γ -semialdehit'ten sentezlenmektedir. Osmolit olarak görev yapmasının yanı sıra prolin hücrelerin osmotik dengede olmasını, sitozolik pH'nın ayarlanmasını ve hidroksil radikallerinin düzenlenmesini sağlamaktadır (Matysik ve ark., 2002). Prolinin koruyucu rollerinden birisi de proteinlerin çözünürlüğünü artırmasıdır (Ulus, 2007).

Fruktanlar, trehaloslar, ononitoller ve ektoinler gibi osmolitler hücrede oluşan oksidatif hasarı gidermeye çalışmaktadırlar. Bu osmolitler reaktif oksijen türlerinin temizlenmesinde de aktif rol oynarlar (Zhu, 2001).

2.6. Serbest Oksijen Radikalleri ve Hücreden Temizlenmesi

Bitkilerde reaktif oksijen türlerinin normal şartlarda üretimi ve yıkımı dengede seyretmektedir. Ancak çevresel stresler altında reaktif oksijen türlerinin üretimi ve antioksidan sistemin baskılama aktivitesi arasındaki denge bozulmaktadır (Harinasut ve ark., 2003). Tuz stresi mitokondri ve kloroplastlardaki oksijene elektronların kaçışını artırma yoluyla reaktif oksijen türlerinin miktarını artırır (Ahmad ve ark., 2008). Tuz stresi stomaların kapanmasına yol açmaktadır. Stomaların kapanması bitki hücrelerindeki CO₂/O₂ oranını düşürür ve yüksek miktardaki oksijen, aktif oksijen türlerinin oluşmasına neden olur (Frary ve ark., 2010).

Kloroplastlarda fotosistem I ve fotosistem II'deki oksijenin indirgenmesi ile oluşan ilk aktifleşmiş oksijen molekülü süperoksit radikalidir. Süperoksit radikali süperoksit dismutaz enziminin katalizlediği dismutasyonla hidrojen peroksit (H₂O₂) dönüştürülmektedir. Ayrıca mitokondri ve peroksizomlarda süperoksit radikalinin potansiyel kaynağıdır. Bu organellerde süperoksit, elektron taşınması sırasında ve enzimatik reaksiyonlarla üretilmektedir (Reza ve ark., 2006). Süperoksit indirgenmiş nükleotidleri, bazı amino asitleri antioksidan bileşikleri oksitler (Kılınç ve Kılınç, 2002). Süperoksit anyonu düşük pH'da proton alarak lipid peroksidasyonunu başlatabilme özelliğine sahip perhidroksil radikalini (HO₂[·]) oluşturur (Eryılmaz, 2007).

Enzimatik olarak oksijenin iki elektron almasıyla ya da süperoksitlerin (O₂^{·-}) enzimatik ve enzimatik olmayan dismutasyonları ile meydana gelebilen hidrojen peroksit diğer reaktif oksijen türlerine nazaran daha karardır. Fakat hidrojen peroksitin hücre membranlarından geçerek diğer hücrelere de yayılabilmesi onu tehlikeli yapmaktadır (Kılınç ve Kılınç, 2002; Michalak, 2006). Hidrojen peroksit ortamda demir (Fe²⁺), bakır (Cu⁺) gibi metallerin varlığında süperoksit radikali ile reaksiyon vererek daha aktif hidroksil radikalini (OH[·]) oluşturabilmektedir (Hichem ve ark., 2009).



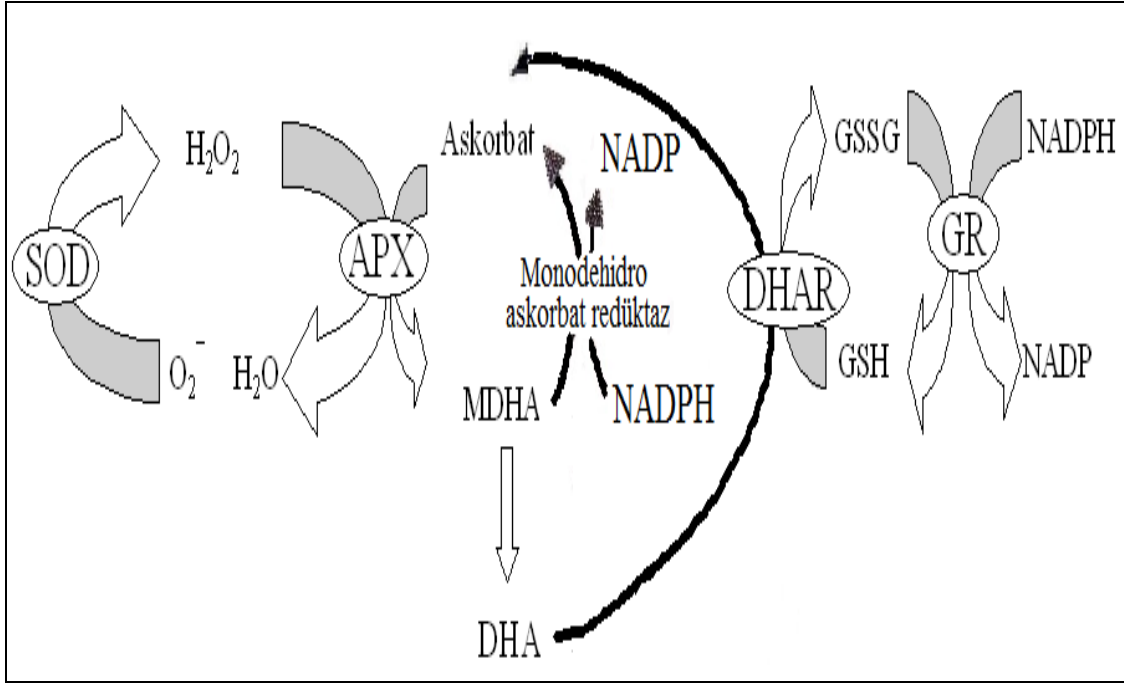
Hidrojen peroksite hücrelerden temizlenmesi katalaz ve peroksidaz enzimleri yoluyla olmaktadır (Ahmad ve ark., 2008).

Biyolojik sistemlerde üretilen hidroksil radikalının önemli bir kısmı canlılarda hidrojen peroksite eksik indirgenmesi sonucu oluşmaktadır. Elektronca zengin moleküllere saldıran hidroksil radikali nükleik asitler, proteinler ve lipidlerle tepkimeye girerek binlerce farklı ara ürün oluşturabilmektedir. DNA ile tepkimeleri sonucunda baz modifikasyonları, baz delesyonları ve zincir kırılmaları meydana gelir (Eryılmaz, 2007; Diken, 2008). Hidroksil radikalının verdiği hasarlardan en iyi bilineni serbest radikal zincir reaksiyonu olarak da bilinen lipid peroksidasyonudur. Lipid peroksidasyonu membranın yapısına, bütünlüğüne, seçici geçirgenliğine zarar vererek hücrenin ölümüne kadar varabilen olaylara sebep olabilmektedir (Kısa, 2010).

Bitkiler serbest oksijen türlerinin başlattığı oksidatif hasarı azalmak için gelişmiş bir antioksidan savunma sistemine sahiptirler (Neto ve ark., 2006). Antioksidan savunma sistemi antioksidan bileşik ve antioksidan enzimlerden oluşur. Antioksidan bileşikler glutatyon, hidrokinonlar, askorbat (Vitamin C), vitamin E (α - tokoferol), flavonoidler, karotenoid pigmentler, alkaloidler ve fenilpropanoid yolunun bazı ikincil metabolitlerinden oluşur (Oueslati ve ark., 2010, Kuşvuran, 2010). Antioksidan enzimler süperoksit dismutaz, katalaz, askorbat peroksidaz, peroksidaz ile askorbat glutatyon döngüsünün çok önemli enzimleri olan glutatyon redüktaz, monodehidroaskorbat redüktaz, dehidroaskorbat redüktaz, guaiakol peroksidazlardır (Esfandiari ve ark., 2007).

Bitkide stres sonucu oluşan süperoksitin giderilmesini sağlayan süperoksit dismutaz enzimatik yolla süperoksit radikalini hidrojen peroksit ve oksijene dönüştürür. Süperoksit dismutazın katalizlediği tepkimeyle oluşan hidrojen peroksit; katalaz veya askorbat-glutatyon döngüsü ile temizlenerek hücredeki birikimi önlenir. Peroksizomlarda, sitozolde, mitokondride bulunan katalaz hidrojen peroksite su ve oksijene dönüşümünü katalizler. Askorbat peroksidaz askorbat-glutatyon döngüsünün başlangıcında askorbatı indirgeyici olarak kullanır. Askorbat peroksidaz hidrojen peroksite hem sitozolde hemde kloroplastta zehirsizleştirilmesini sağlar (Michalak, 2006). Askorbat peroksidaz hidrojen peroksiti suya indirgerken elektron verici olarak kullandığı askorbatı, monodehidroaskorbata (MDHA) dönüştürür. Askorbat okside

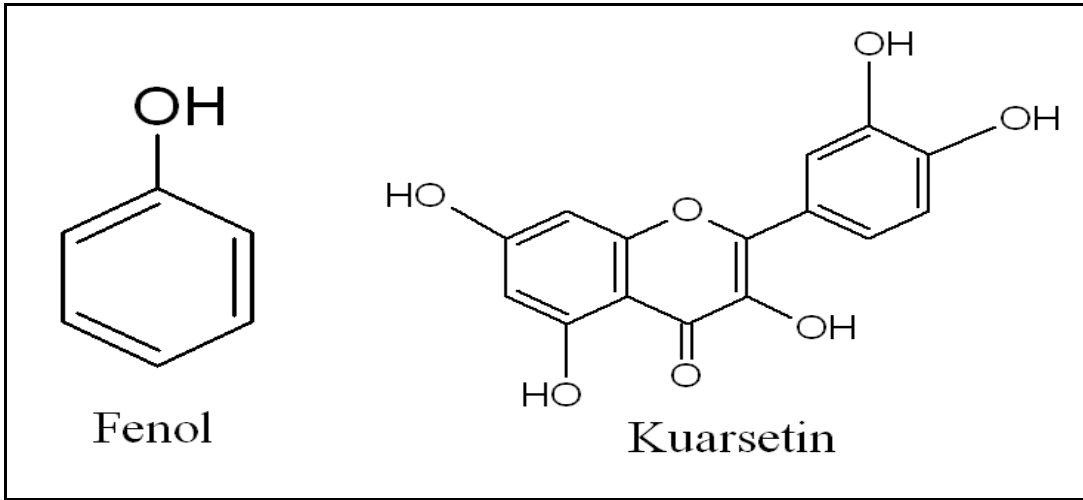
olduğunda monodehidroaskorbattan dehidroaskorbat (DHA) meydana gelir. Dehidroaskorbat glutasyonu (GSH) substrat olarak kullanan dehidroaskorbat redüktazın aktifleşmesi ile askorbata indirgenir. Bu reaksiyon sonucu oluşan okside glutasyon (GSSG) NADPH tarafından tekrar glutatyona dönüştürülür (Reza ve ark., 2006; Koç ve Üstün, 2008), (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Askorbat-glutasyon döngüsü

2.7. Fenolik Bileşikler

Fenolik bileşikler en az bir aromatik halka ve bu halkaya bağlı bir ya da daha fazla sayıda hidroksil grubu içerirler (Şekil 2.4). Aromatik halka benzen halkasıdır. Fenolik hidroksil grupları mevcut aromatik halkadan etkilenmektedir. Aromatik halka yüzünden fenolik hidroksillerin hidrojenleri kararsızdır ve bu yüzden fenoller zayıf asidik özellik gösterirler (Vermerris ve Nicholson, 2006).



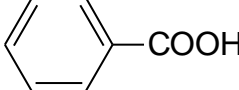
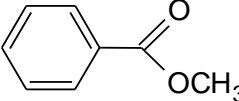
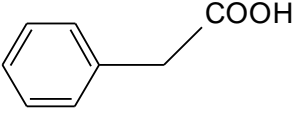
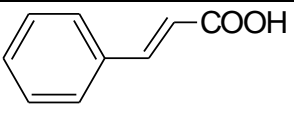
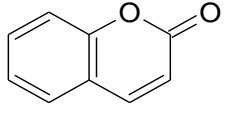
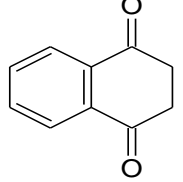
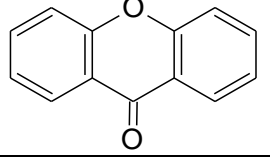
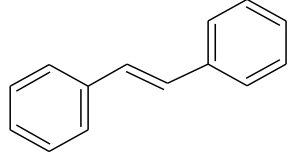
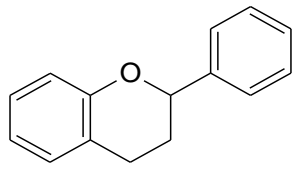
Şekil 2.4. Fenol halkası ve kuarsetin

Bitkilerde yaygın bir şekilde bulunan fenolik bileşikler sekonder metabolizma ürünlerindedir ve ekolojik, fizyolojik olaylarda görev alırlar (Ruiz ve ark., 2003; Nizamlıoğlu ve Nas, 2010).

Fenolik bileşikler bitkinin meyve, tohum, gövde, dal, yaprak ve çiçek gibi organlarında bulunurlar. Hücre içerisinde ise sitoplâzma, hücre duvarı, vakuolde yer alırlar (Ellialtıoğlu, 1999; Nizamlıoğlu ve Nas, 2010).

Bitkisel fenolik bileşikler yaklaşık 10000 çeşit bileşiğin yer aldığı kimyasal olarak heterojen bir gruptur. Bazıları sadece organik çözücülerde çözünürken, diğerleri karboksilik asit ve glikozitleri sayesinde suda çözünürler. Son grup ise büyük, çözünmez polimerlerdir (Taiz ve Zeiger, 2008). Fenolik bileşikler karbon sayısına ve karbon atomunun düzenlenmesine göre sınıflandırılabilir (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2. Fenolik ve polifenolik bileşiklerin temel yapıları (Goldberg, 2003)

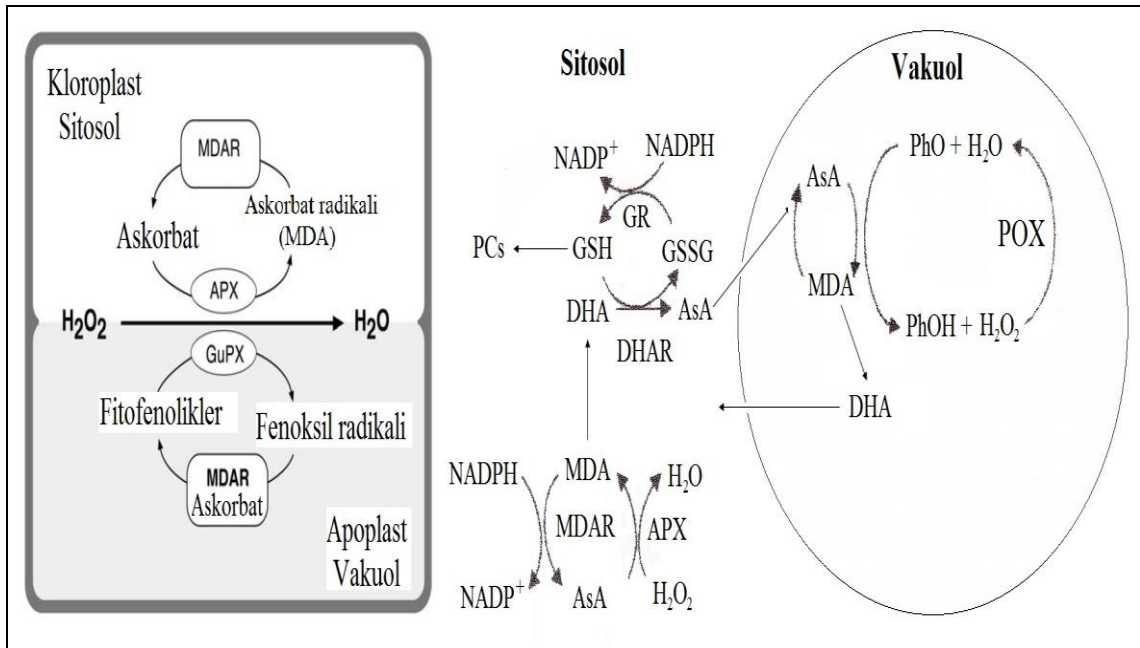
Karbon Sayısı	Yapı iskeleti	Sınıflandırma	Örnek	Genel Formülü
7	C ₆ -C ₁	Fenolik asitler	Gallik asit	
8	C ₆ -C ₂	Asetofenonlar	Xanthoxilin	
8	C ₆ -C ₂	Fenilasetik asit	p-hidroksifenil-asetik asit	
9	C ₆ -C ₃	Hidroksi sinnamik asitler	Kafeik asit	
9	C ₆ -C ₃	Kumarinler	Eskuletin	
10	C ₆ -C ₄	Naftokinonlar	Juglon	
13	C ₆ -C ₁ -C ₆	Xanthones	Gentisin	
14	C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbenler	Resveratrol	
15	C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoidler	Kuarsetin	

2.7.1. Fenolik Bileşiklerin Bitkideki Rollerini

Fenolik bileşiklerin halka yapılarında oluşan oksidasyon, glikosilasyon, metilasyon ve hidroksilasyonlar bu bileşiklerin bitkide pek çok biyolojik fonksiyonda rol almalarını sağlamaktadır (Eryılmaz, 2007).

Bitkide fenolik bileşiklerin en önemli özelliklerinden birisi antioksidan aktivite göstermeleridir. Hücrelerde metabolizma olayları sonucu reaktif oksijen türleri oluşur (Şekil 2.5). Fenolik bileşiklerin antioksidan aktiviteleri, oksidasyon sonucu oluşan serbest radikallere hidrojen vererek onları söndürmesinden ileri gelmektedir (Es-Safi ve ark., 2007).

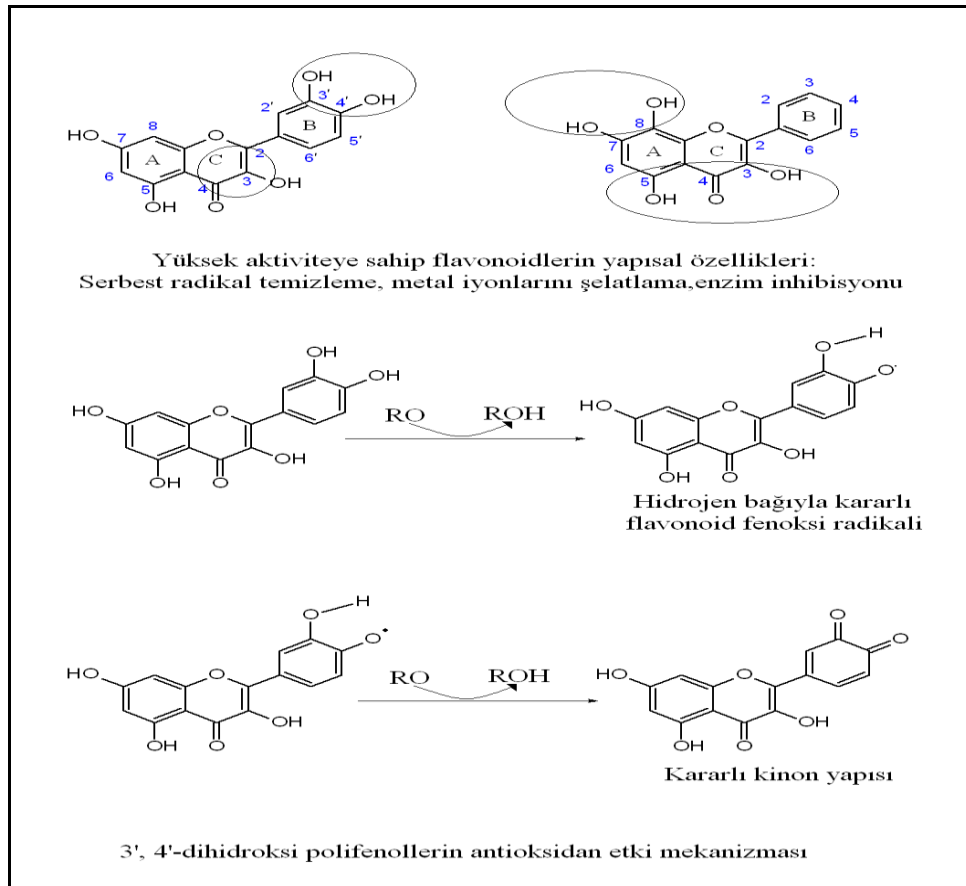
Fenolik bileşikler metalleri şelatlama eğilimindedirler. Hidroksil ve karboksil gruplara sahip fenolik bileşikler demiri şelatlayarak etkisizleştirir ve Fenton reaksiyonlarını baskırlar. Fenolik bileşiklerin şelatlama yetenekleri muhtemelen aromatik halkanın yüksek nükleofilik yeteneği ile ilişkilidir (Michalak, 2006).



Şekil 2.5. Hidrojen peroksitin vakuol, kloroplast ve sitosolde temizlenmesi POX, peroksidaz; PhOH, fenolik bileşikler; PhO, fenoksil radikalleri; AsA, askorbat; APX, askorbat peroksidaz; GuPX, guaiakol peroksidaz; MDA, monodehidroaskorbat; MDAR, monodehidroaskorbat redüktaz; DHA, dehidroaskorbat; DHAR, dehidroaskorbat redüktaz; GSH, indirgenmiş glutatyon; GSSG, oksitlenmiş glutatyon; GR, glutatyon redüktaz; PSc, fitoşelatinler (Eryılmaz, 2007)

Metal iyonları oksijen-oksijen bağlarının homolitik parçalanmasıyla lipid hidroperoksitleri yıkar ve lipid alkoksil radikallerini oluşturur. Fenolik bileşikler lipid alkoksil radikallerini yakalayarak lipid peroksidasyonunu inhibe eder (Michalak, 2006). Flavonoidlerin içerdikleri yapısal ve elektrokimyasal özellikleri lipid peroksidasyonunu baskıladığı, lipid oksidasyonunu indirgeyerek membran yapısını koruyan antioksidan etkinliklerde rol oynadığı ileri sürülmektedir (Eryılmaz, 2007). Lipid peroksidasyonunun indirgenmesi flavonoidler tarafından reaktif oksijen türlerinin temizlenmesinden ve lipid peroksidasyonu süresince üretilen lipid radikallerinin azaltılmasından kaynaklanmaktadır. Antioksidan aktivite fenolik çeşitlerinde bulunan hidroksil grupların sayısı, konumu ve molekülün yapısına bağlı olarak gerçekleşmektedir (Milić ve ark., 1998; Takahama ve Oniki, 2000).

Fenolik bileşikler içerisinde yer alan flavonoidler reaktif oksijen türlerini temizleyebilirler. Polifenoller reaktif oksijen türlerini temizlemek için ideal kimyasal yapıya sahiptir (Şekil 2.6), (Rice-Evans ve ark., 1997).

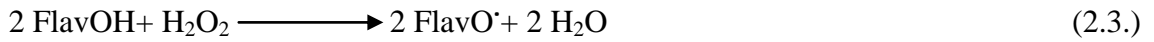


Şekil 2.6. Fenolik bileşiklerin reaktif oksijen türlerini temizleme mekanizması (Anonim, 2008).

Flavonoidlerin antioksidan özelliklerini belirlemede önemli olan üç yapısal özellik;

1. B halkasındaki 3',4'-dihidroksil yapısı (kateşin, kuarsetin vb.).
2. C halkasındaki 4-okso grubuyla bitişik 2,3 çift bağları.
3. C halkasında bulunan 3-OH grubu ve A halkasında bulunan 5-OH grubu (Michalak, 2006).

Reaktif oksijen türlerinden olan hidrojen peroksit askorbik asit, fenolikler ve peroksidazların iş birliği ile temizlenir (Eryılmaz, 2007).



Hidrojen peroksiti etkisizleştirmek için flavonoidler guaiakol peroksidazlara elektron vermekte ve flavonoid fenoksi radikali (FlavO[•]) oluşmaktadır. Oluşan flavonoid fenoksi radikali (FlavO[•]) askorbik asit (AsA) tarafından indirgenir ve monodehidroaskorbik asit radikali (MDA[•]) oluşur.



Oluşan monodehidroaskorbik asit radikali (MDA[•]) kendiliğinden askorbik asite (AsA) ve dehidroaskorbik asite (DHA) dönüşürken; oluşan dehidroaskorbik asit (DHA) sitozolik dehidroaskorbat redüktaz enzimi ile tekrar askorbik asiti (AsA) meydana getirmektedir (Yamasaki ve ark., 1997; Eryılmaz, 2007).

Hücrede metabolizma olayları ile oluşan radikaller de fitofenolikler ve flavonoidler tarafından temizlenebilir. Reaksiyon esnasında oluşan fenoksi radikalleri (PhO[•]) ise askorbat tarafından indirgenmektedir (Eryılmaz, 2007).



İnsanda hastalıklara sebep olan serbest radikallere karşı da fenolik bileşikler koruyucu etki göstermekte ve yaşlanmayı geciktirmektedir. Fenolik bileşiklerin anti-karsinojen, anti-atherojen, anti-ülser, anti-inflamator, anti-mikrobiyal etkileri olduğu

belirtilmektedir (Ksouri ve ark., 2007). Epidemiyolojik çalışmalarda diyetteki fenolik bileşiklerin düzeyi arttıkça koroner kalp hastalıklarından ölüm oranının azaldığı görülmüştür (Uylaşer ve İnce, 2008).

Fenolik bileşikler bitkinin yaralanması halinde kimyasal bir bariyer oluşturarak bitkiyi hastalıklara ve çürümelere karşı korumaktadır. Fenolik bileşiklerin bitki hastalıklarında etkin rol oynama sebeplerinden bir tanesi de oksidasyon ürünlerinin yüksek toksik etkiye sahip olmasıdır. Bitki hastalandığı zaman fenolik bileşiklerin sentezlerinde ve aktivitelerinde artışlar meydana gelmektedir. Bu özellikleri ile fenolik bileşikler bitkilerin hastalığa karşı dayanıklılığını artırmaktadır (Baydar, 2010).

Fenollerin polifenol oksidazlarla oksitlenmesi meyvelerde önemli kayıplara neden olan doku kararmasını meydana getirir. Fenolik bileşikler polifenol oksidazlar ve peroksidazlar tarafından kinonlara parçalanmaktadır (Ruiz ve ark., 2003). Fenollerin okside olmasıyla oluşan kinonlar yüksek düzeyde reaktif maddeler olup hızla polimerize olabildikleri gibi, ortamda protein olması halinde kovalent bağları biçiminde onlara bağlanabilmektedir (Ellialtıoğlu, 1999).

Ayrıca fenolik bileşikler bitkiye ve bitkinin oluşturduğu ürünlere renk verme, polinasyon için hayvansal taşıyıcıların cezbedilmesi, tohum yayılması, azot fiksasyonu için *Rhizobium* bakterilerinin uyarılması, polen tüpü gelişimi, bitki yapılarına destek sağlama gibi fonksiyonlara sahiptir (Gould ve Lister, 2006; Vermerris ve Nicholson, 2006).

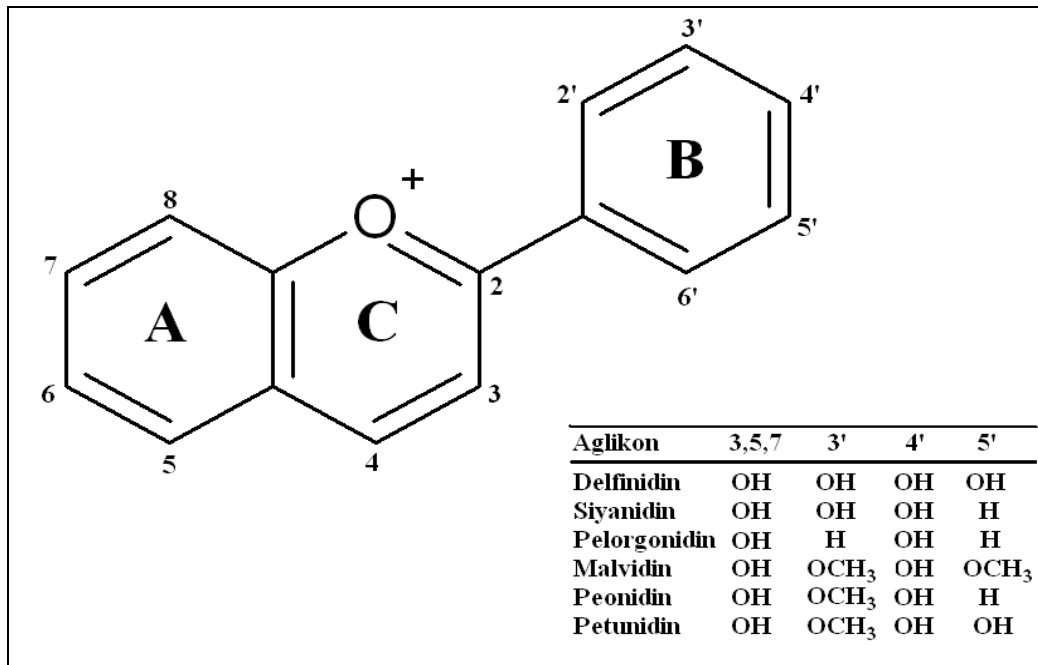
2.8. Antosiyaninler

Antosiyaninler (Latince *anthos* = çiçek ve *kyanos* = mavi) ilk kez 1835'te Marquant tarafından tanımlanmıştır. İnsan gözüyle görülebilen bitkisel pigmentlerden olan antosiyaninler fenolik bileşiklerin flavonoidler sınıfına dâhildir. Bitkilerde özellikle mavi, kırmızı ve mor renklerden sorumlu olan bu pigmentler kök, gövde, yaprak, çiçek, meyve gibi bütün bitki organlarında bulunabilmektedir (Castañeda-Ovando ve ark., 2009; Tahkokorpi, 2010).

Renkleri ve kararlılıkları pH derecesine göre değişen antosiyaninler ortam asidik olduğunda kırmızı, nötr durumda mor, bazik ortamlarda ise mavi renk almaktadırlar (Li, 2009).

Flavonoid biyosentez yolu sonunda sentezlenen antosiyaninler aktif taşıma ile vakuole taşınır ve ergastik depo maddesi olarak biriktirilirler. Suda çözünebilir bir yapıda, hücre sitoplazması içerisinde glikozit formda da bulunabilirler (Marrs ve ark., 1995, Eryılmaz, 2007).

Antosiyaninlerin ana yapısını antosiyanidinler oluşturur. Antosiyanidinler oksijen içeren heterosiklik bir halka (C) ile birbirine bağlanmış çift karbon bağları bulduran iki aromatik halkadan (A ve B) meydana gelmektedir. Antosiyanidin molekülüne şekerler bağlandığında antosiyaninler oluşur. Antosiyaninlere şekerlerden başka bazen organik ve fenolik asitlerde bağlanabilmektedir. Antosiyanin molekülüne bağlanan şekerler genelde ramnoz, galaktoz, ksiloz ve arabinozdur. Şekerler genelde üçüncü karbon atomundaki hidroksil grubundan bağlanmaktadır (Şekil 2.7), (MacDougall, 2002, Castañeda-Ovando ve ark., 2009).

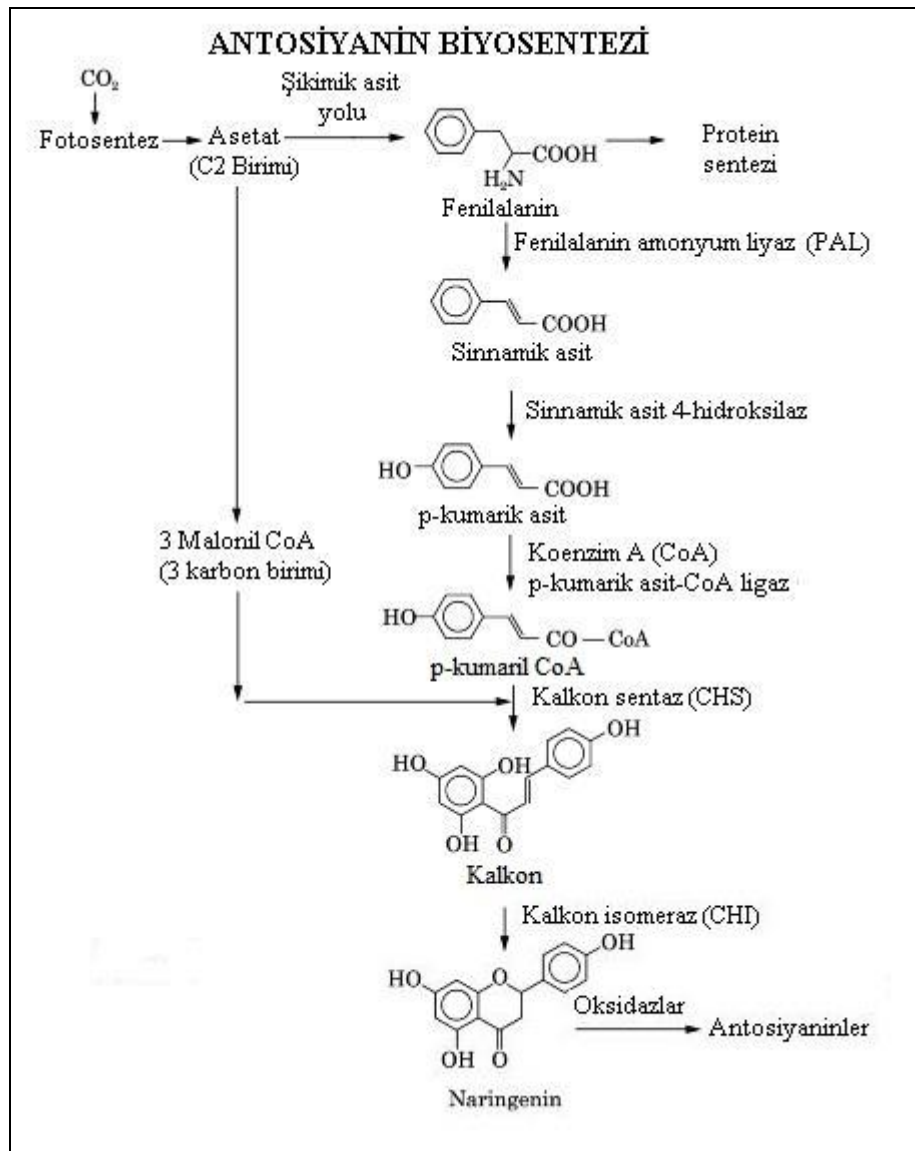


Şekil 2.7. Antosiyanidin genel formülü (Koca ve ark., 2006)

Doğada olağanüstü çeşitlilikte antosiyaninler mevcuttur. Antosiyanin çeşitlerinin bu kadar çok olma nedeni molekül yapılarındaki hidroksil grupları sayısının farklı

olmasından, yapılarındaki şeker bağlarının sayısı ve konumundaki farklılıklardan, moleküldeki şekerlere bağlanmış alifatik ya da aromatik karboksilatlardan ve bu bağların konumundan kaynaklanmaktadır. Bitkilerde en yaygın olan antosiyanin çeşitleri pelargonidin (Pg), siyanidin (Cy), peonidin (Pn), malvidin (Mv), petunidin (Pt) ve delphinidin (Dp)'dir (Castañeda-Ovando ve ark., 2009).

Flavonoid biyosentezinin ilk adımında 4-kumarat CoA ile 3 molekül malonil CoA birleşir. Bu reaksiyonu kalkon sentetaz enzimi katalizler ve reaksiyon sonucunda 2', 4', 6', 4-tetrahidroksilkalkon meydana gelir. Daha sonra kalkon naringenine izomerize olur. Naringeninde çeşitli antosiyaninlere dönüşür (Şekil 2.8), (Holton ve Cornish, 1995).



Şekil 2.8. Antosiyaninlerin biyosentezi (Sullivan, 1998).

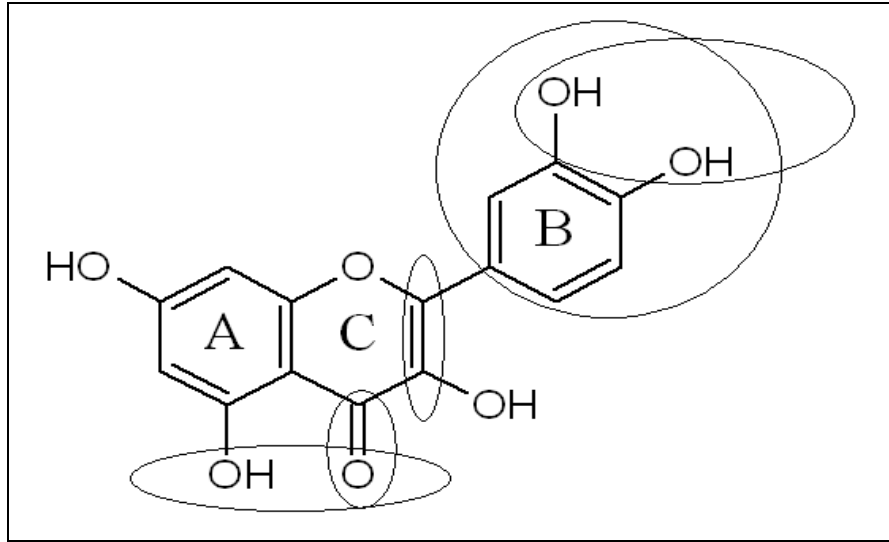
Antosiyaninler bitkiye ve bitkinin oluşturmuş olduğu ürünlere renk vermenin yanı sıra tozlaşmada hayvanların cezbedilmesinde ve tohumların yayılmasında da görev yaparlar. Antioksidan ve antibakteriyel etkenler olarak işlev görebilirler. Antosiyaninler diğeri flavonoidlerle birlikte bitkilerin böcek saldırılarına karşı direnç göstermesinde önemli bir rol oynayabilmektedir (Kong ve ark., 2003; Jordheim, 2007). Gelişim evrelerinde olan genç yaprakların, sürgün uçlarının ve sonbaharda senesense uğrayan yaprakların sahip olduğu kırmızı renk fotooksidan zararlara karşı sentezlenen antosiyaninlerden kaynaklanır (Eryılmaz, 2007).

Bitkide antosiyaninler çevresel stres faktörlerine karşı dayanıklılığın artırılmasına katkıda bulunur (Chalker-Scott, 1999). Antosiyaninlerin sentezi ışık, sıcaklık, besin durumu, hastalık, kuraklık gibi çeşitli çevresel faktörlerden etkilenmektedir (Hara ve ark., 2003; Song ve ark., 2005). Antosiyaninler fotoinhibisyon ve ultraviyole radyasyonuna karşı çeşitli bitki dokularının korunmasını sağlamaktadır (Gould ve Lister, 2006).

En yaygın ve bol bulunan üç flavonoid sınıfından; antosiyaninler fotosentezde aktif bölgedeki ışınları absorblarken, flavonollar daha kısa dalga boylu ışınları, flavonlar ise en kısa dalga boyundaki ışınları absorbe ederler (Sheahan, 1996).

Antosiyaninlerin bitkilere ve bu bitkilerden yararlanan insanlara faydalı biyolojik etkileri vardır. Senesenste bitkinin besin dağılımının denetimi, alüminyum toksine karşı bitkinin korunması, polen veriminin artırılması, oksinin polar taşınımının kontrolü gibi olaylarda antosiyaninler rol oynamaktadır. İnsanlarda antioksidan özellikleri ile antosiyaninlerin sinirsel hastalıkları, kalp-damar hastalıklarını, kanseri ve diabeti önlemede önemli bir rol oynadığı belirtilmiştir (Eryılmaz, 2003; Castañeda-Ovando ve ark., 2009).

Antosiyaninler serbest oksijen ve azotun hemen hemen bütün çeşitlerini temizlemede askorbik asit ve α -tokoferolden dört kat daha etkili olan güçlü antioksidanlardır. Antosiyaninler demir ve bakırı şelatlayarak, kloroplast üzerine düşen ışık yoğunluğunu azaltarak, serbest oksijen türlerinin temizlenmesini sağlayarak oksidatif hasarı azaltırlar (Gould ve Lister, 2006), (Şekil 2.9).

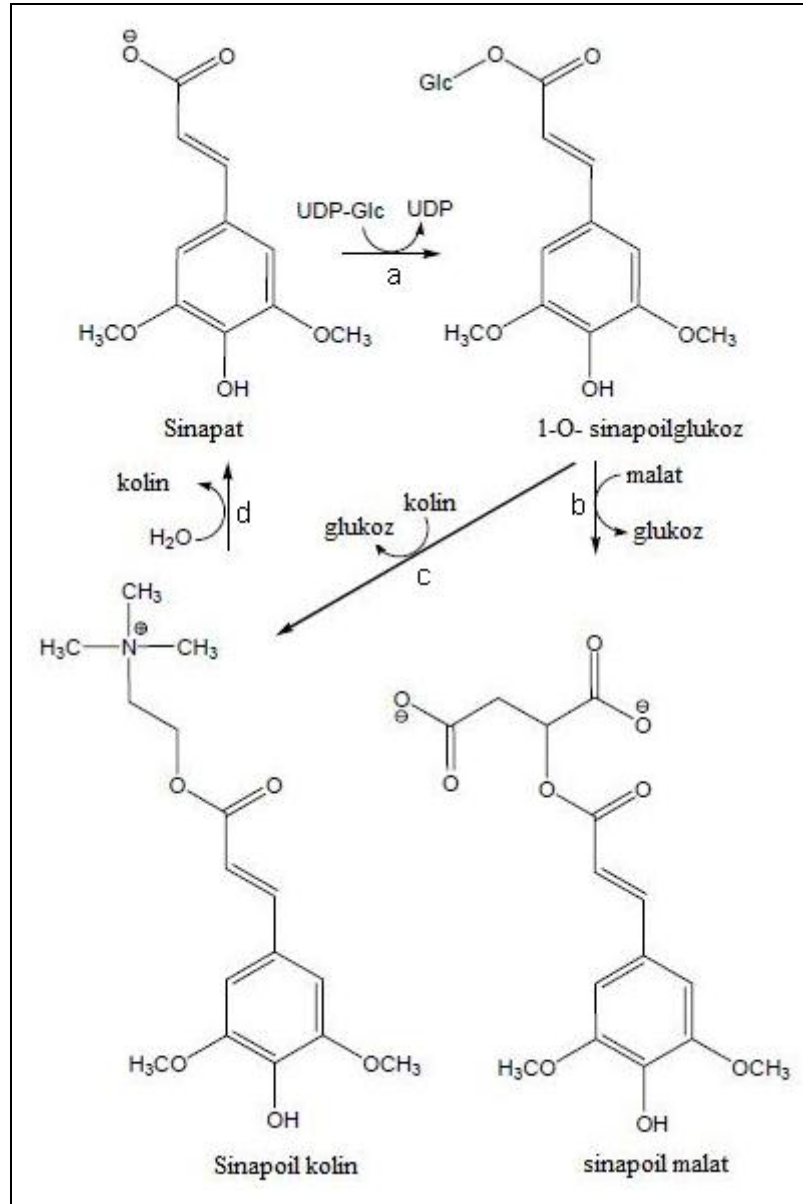


Şekil 2.9. Antosiyaninlerin antioksidan etkinliklerde rol alan yan grupları (daire içerisinde gösterilmiştir), (Eryılmaz, 2007)

2.9. Sinapoil Esterler

Sinapoil esterler fenolik bileşikler içerisinde yer almaktadır ve sinapoil malatla, sinapoil kolin yaygın olarak bulunan sinapoil esterlerdir. Sinapoil malat bitkilerin yapraklarında birikirken sinapoil kolin tohumlarda birikir. Sinapoil malat bitkileri UV radyasyonuna karşı korurken; sinapoil kolin tohumda kolinin depo formu olarak kullanılabilir. Sinapoil kolin tohum gelişimi sırasında sentezlenirken çimlenme sırasında sinapik asiti üretmek için yıkılır (Lim ve ark., 2001; Li ve ark., 2010).

Sinapoil malat ve sinapoil kolinin öncülü sinapattır. Sinapat, aldehit dehidrogenaz enzimi vasıtasıyla sinapaldehitin oksidasyonu ile sentezlenir. Sinapaldehit fenilpropanoid yolu aracılığıyla fenilalanin amino asitinden türevlenir. Sinapattan sinapoil esterlerinin biyosentezindeki ilk basamak sinapik asitin glikosilasyonudur. Reaksiyon sinapik asit glukosiltransferaz tarafından katalizlenir ve 1-O-sinapoilglukoz meydana gelir. Yapraklarda sinapoil glukoz, malat sinapoiltransferazla sinapoil malata dönüştürülür. Tohumlarda sinapoilglukoz kolin sinapoiltransferazla sinapoilkolini oluşturur. Sinapoilkolin sinapoilkolinesterazla tekrar sinapata dönüşebilir (Şekil 2.10), (Vermerris ve Nicholson, 2006).



Şekil 2.10. Sinapoyl ester metabolizması (a) UDP-glukoz: sinapik asit glukosiltransferaz, (b) sinapoylglukoz: malat sinapoyltransferaz, (c) sinapoylglukoz: kolin sinapoyltransferaz, (d) sinapoylkolinesteraz (Vermerris ve Nicholson, 2006)

2.10. Önceki Çalışmalar

Hernández ve ark. (1995) tuza hassasiyetleri farklı iki bezelye çeşidinde 14 günlük 30-300 mM tuz uygulamasının kloroplastlar üzerine etkisini araştırmışlar ve tuz stresinin oksidatif hasarı artırdığını belirtmişlerdir. Tuza hassas türlerde oksidatif hasar daha fazladır.

Uzun dönem tuz uygulamasının tuza hassas ve tuza dayanıklı bezelye çeşitlerinde antioksidan savunma sistemi üzerinde etkisi araştırılmış ve tuza dayanıklı çeşitlerde çok sayıda antioksidan enzimin daha fazla ifade olduğu gözlenmiştir (Hernández ve ark. 2000). Diğer bir çalışmada, 70 mM'lar NaCl uygulanmış bezelye yapraklarında 0, 8, 24, 48 saat sonra yaprak su ilişkileri ve antioksidant sistem araştırılmıştır. İlave olarak tuz stresi uygulamasından sonra normal ortama alınan bitkilerin iyileşme özellikleri de incelenmiştir. Kısa dönem tuz stresinin büyüme, yaprak su ilişkileri, superoksit dismutaz ve askorbat peroksidaz aktivitelerinde tersinir bir etki meydana getirdiği gözlenmiştir (Hernández ve Almansa, 2002).

Farklı konsantrasyonlarda tuz uygulanan (50, 100, 150, 200 mM NaCl) bezelyede bazı fizyolojik ve biyokimyasal özellikler araştırılmıştır. Yüksek tuz konsantrasyonunda kök ve yaprakların kuru ve taze ağırlıkları önemli oranda azalmıştır. Prolin gibi bazı osmolitlerin miktarları artmıştır. Yapraklarda klorofil miktarı ile nitrat redüktaz aktivitesinin azaldığı tespit edilmiştir (Ahmad ve Jhon, 2005).

Najafi ve ark. (2006) 10 günlük bezelye fidelerine tuz stresi uygulamışlardır. Yüksek tuz konsantrasyonunda (150 mM) bitkilerin tuza hassasiyet gösterip öldüklerini belirtmişlerdir.

Tuza toleransı artırmak için 11 yerel bezelye çeşidine 5 farklı konsantrasyonda 15 gün süreyle tuz stresi uygulanmış (60, 120, 180, 240 mM NaCl) ve tohumlarda çimlenme yüzdesi, çimlenme hızı ölçülmüştür. Tuz stresinde artışa bağlı olarak tohumların çimlenme oranlarında ve çimlenme hızlarında azalmalar görülmüştür. Ayrıca tuz stresi kök ve fidelerin kuru, yaş ağırlıklarını da azaltmıştır (Noreen ve ark., 2007).

Ahmad ve ark. (2008) EC 33866 ve puget bezelye çeşitlerinin yapraklarında tuz stresinin prolin, lipid peroksidasyonu ve antioksidan enzim aktiviteleri üzerine etkilerini araştırarak iki bezelye çeşidinde biyokimyasal parametreleri karşılaştırmışlardır. Tuz stresi iki bezelye çeşidinde lipit peroksidasyonunu artırmıştır.

Noreen ve Ashraf (2009) genetik olarak farklı 9 bezelye çeşidine değişik oranda tuz stresi (40, 80, 120 mM NaCl) uygulayarak antioksidan enzim aktivitelerinde ve antioksidan bileşik miktarındaki değişikliklerin tuza toleransta önemli parametre olarak değerlendirilip-değerlendirilemeyeceğini belirlemek için bir çalışma yapmışlardır. Tuz

uygulaması 2001-20 (tuza ılımlı toleranslı) çeşidi hariç diğer bütün çeşitlerde total fenolik bileşik miktarını artırmıştır. Bezelye çeşitlerinde tuz uygulaması sonucu hidrojen peroksit miktarında önemli değişiklik gözlenmemiştir. Tuza dayanıklı, ılımlı ve duyarlı bezelye çeşitlerinde tuz stresi farklı derecelerde lipid peroksidasyonuna neden olmuştur. Bu çalışmada lipid peroksidasyon miktarının tuza toleransta önemli bir parametre olmadığı rapor edilmiştir.

Kültürü yapılan çok sayıda bitkide tuz stresinin fizyolojik ve biyokimyasal etkileri ile ilgili pek çok çalışma yapılmıştır (Eryılmaz, 2003; Posmyk ve ark., 2009; Kısa, 2010; Neves ve ark., 2010).

Tuz stresi çoğunlukla bitkilerde fenolik bileşik miktarını artırmaktadır. Fenolik bileşikler reaktif oksijen türlerini temizleyerek veya söndürerek antioksidan rol oynarlar (Daneshmand ve ark., 2010). Antosiyaninler ve sinapoil esterleri önemli fenolik bileşiklerdir. Domates ve kırmızı lahanada bitkilerinde tuz stresi antosiyanin miktarını artırmıştır (Eryılmaz, 2003). Tuz stresi mısır çeşitlerinden tuza dayanıklı olan Arper'da antosiyanin miktarını tuza hassas olan Aristodan daha fazla artırmıştır (Hichem ve ark., 2009). Arper çeşidinde polifenollerin, flavonoidlerin, antosiyaninlerin ve proantosiyanidinlerin daha fazla birikimi tuza dayanıklılıkta önemli bir özellik olduğu belirtilmektedir.

Bakır stresi uygulanmış kırmızı lahanada antosiyanin ve sinapoil ester miktarı artmıştır (Posmyk ve ark., 2009).

Bu çalışmada utrillo ve sprinter bezelye çeşitlerinde tuz stresinin neden olduğu lipid peroksidasyonu ve hidrojen peroksit miktarı belirlendi. Tuz stresinin zararlı etkilerini tolere edebilecek total fenolik bileşik, antosiyanin ve sinapoil ester miktarındaki değişiklikler araştırıldı.

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Materyal

Bu tez çalışmasında bezelye (*Pisum sativum* L.) bitkisinin utrillo ve sprinter çeşitleri deney materyali olarak kullanılmıştır. Bezelye tohumlarından sprinter çeşidi tohum Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsünden, utrillo çeşidi tohum ise yerel tohumculardan alınarak laboratuvar şartlarında kontrollü bir şekilde yetiştirilmiştir.

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Araştırmamızda kullanılan kimyasallar; sodyum hipoklorit (NaClO), triklor asetik asit (TCA, CCl_3COOH), potasyum iyodür (KI), hidrojen peroksit (H_2O_2), potasyum di-hidrojen fosfat (KH_2PO_4), sodyum hidroksit (NaOH), metanol (CH_3OH), kloroform ($CHCl_3$), sodyum karbonat (Na_2CO_3), thiobarbütirik asit (TBA, $C_4H_4N_2O_2S$), folin-ciocalteu, gallik asit ($C_7H_6O_5$), hidroklorik asit (HCl), siyanidin-3-glikozit ($C_{15}H_{11}O_6^+$), klorojenik asit ($C_{16}H_{18}O_9$), sodyum klorür (NaCl)'dür.

3.1.2. Kullanılan Cihaz ve Aletler

Manyetik karıştırıcı	: Heidolph (Almanya)
Etüv	: Nüve (Ankara, Türkiye)
UV spektrofotometre	: Jasco530 V-UV/VIS Spectrophotometer
Soğutmalı mikrosantrifüj	: Hettich R22 (Almanya)
Buzdolabı	: Regal (Türkiye)
Otomatik pipetler	: Eppendorf (Almanya)
pH metre	: Hanna (Romanya)
Santrifüj	: Nüve (Ankara, Türkiye)
Hassas/Analitik terazi	: Shimadzu (Osaka, Japonya)
Evaporatör	: Enviromental shaker ES – 20 Biosan

3.1.3. Kullanılan Çözeltiler

3.1.3.1. Hidrojen Peroksit Miktarının Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler

1. % 0,1 (w/v) Triklor asetik asit (TCA)
2. 1 M Potasyum iyodür (KI)
3. 10 mM KH_2PO_4 (pH=7)

3.1.3.2. Malondialdehit Miktarının Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler

1. % 0,1 (w/v) Triklor asetik asit (TCA)
2. % 0,5'lik Thiobarbütirik asit (TBA)

3.1.3.3. Total Fenolik Madde İçeriğinin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler

1. Folin-ciocalteu (1/10 seyreltme): Merck folin-ciocalteus reagent kullanıldı.
2. % 7,5'luk Sodyum karbonat çözeltisi (Na_2CO_3)
3. Methanol (% 99 MeOH)
4. Kloroform (% 99 CHCl_3)

3.1.3.4. Antosiyanin ve Sinapoil Ester İçeriğinin Belirlenmesinde Kullanılan Çözeltiler

1. % 1'lik Hidroklorik asit (% 37 HCl) içeren Metanol (%99 MeOH) çözeltisi

3.2. Metot

3.2.1. Bitkilerin Yetiştirilmesi

4 mm'lik elek yardımıyla ayrı ayrı elenen torf ve bahçe toprağı 1/1 oranında homojen bir şekilde karıştırılarak saksılara konuldu. Saksılara ortam sıcaklığına uygun şekilde 2-3 gün aralıklarla tarla kapasitesinin biraz üzerindeki miktarda (45 ml) su verildi. Utrillo ve sprinter çeşidi bezelye tohumları % 5'lik sodyum hipoklorit (NaClO) ile 10 dakika yüzey sterilizasyonuna tabi tutuldu. Daha sonra 30 dakika boyunca saf suda bekletilerek sodyum hipokloritten (NaClO) arındırıldı. Tohumlar, kurutma kâğıdı yerleştirilen petrilere çimlendirildi. Çimlenen tohumlar her saksıda 5 adet çimlenmiş tohum olacak şekilde saksılara yerleştirildi. Kontrol ve tuz uygulama (50, 100 mM NaCl) gruplarının her biri için 5 adet saksı kullanıldı. Bezelyeler 12/12 gündüz/gece periyodunda ($25 \pm 3^{\circ}\text{C}$, $19 \pm 3^{\circ}\text{C}$) yetiştirildi. 17 günlük fidelere saksılarının üst kısımlarından toplam 150 ml 50 mM ve 100 mM'lık sodyum klorür çözeltisi verildi; kontrol grubu bitkilere ise 150 ml su verildi. Tuz bezelye fidelerine eşit hacimlerde ve üçer gün arayla verildi ve 10. günde bezelye yaprakları hasat edilerek alüminyum folyo ile sarılarak gerekli analizler yapılncaya kadar -20°C 'de derin dondurucuda saklandı.

3.2.2. Malondialdehit Tayini

Kontrol, 50 mM ve 100 mM tuz uygulama gruplarından alınan 0,4 g yaprak dokusu 4 ml % 0,1 (w/v) TCA ile homojenize edilerek eppendorf tüplere konuldu ve $10000\times g$ 'de 20 dakika santrifüj edildi. 0,5 ml süpernatant üzerine 1 ml % 0,5 TBA içeren TCA ilave edilerek 95°C 'de 30 dakika inkübe edildikten sonra buz banyosunda soğutulmak suretiyle reaksiyon durduruldu. Karışım 10 dakika $10000\times g$ 'de tekrar santrifüj edildikten sonra spektrofotometrede 532 nm 'de ölçüm yapılarak absorbanlar kaydedildi. Non-spesifik absorpsiyonlar için her bir numunenin 600 nm 'deki absorbanı da ölçülerek absorbanstan düşüldü. Malondialdehit konsantrasyonu $155\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ekstinksiyon katsayısı kullanılarak hesaplandı (Sreenivasulu ve ark., 1999).

3.2.3. Hidrojen Peroksit Miktarının Belirlenmesi

Kontrol ve tuz uygulamalarından 0,25 g yaprak alınarak, 2,5 ml % 1'lik (w/v) TCA ile havanda ezilerek homojenize edildi. Homojenat 12000xg'de 15 dakika santrifüj edildi. 0,5 ml süpernatant üzerine 1ml, 10 mM (pH=7) fosfat tamponu ve 1ml, 1 M KI ilave edildi. Karışımın absorbansı 390 nm'de ölçüldü. Daha sonra hidrojen peroksitten hazırlanan standart grafikten yararlanılarak kontrol ve uygulama gruplarında hidrojen peroksit miktarı belirlendi (Velikova ve ark., 2000).

Standart grafik için 163 μM H_2O_2 stok çözeltisinden sırasıyla 50, 100, 200, 300, 400, 500 μl pipetlendi. Her bir tüpe 1 ml 1 M KI ilave edilerek son hacimler 10 mM fosfat tamponu ile 2 ml'ye tamamlandı. Tüplerdeki karışımın absorbansı 390 nm'de ölçüldü. Absorbans değerlerine karşılık gelen mikromol hidrojen peroksit değerleri standart grafik halinde verildi (Ulus, 2007).

3.2.4. Total Fenolik Madde Miktarının Belirlenmesi

Total fenolik madde miktarı Folin-Ciocaltaeu yöntemine göre yapıldı. Kontrol ve tuz uygulanan (50, 100 mM NaCl) bezelye bitkilerinin yapraklarından 1 g alınıp havan içerisinde 21 ml metanol-kloroform karışımı (2:1) ile homojenize edildi. Homojenat erlene alındı ve manyetik karıştırıcıda 1 saat boyunca karıştırıldı. Karışım bir huniye konulan kurutma kâğıdı yardımıyla süzüldü. Elde edilen süzüntü tekrardan erlene alınarak üzerine (2:1) 21 ml metanol, kloroform karışımı ilave edildi ve tekrar 1 saat boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Bu işlem çözeltiler renksizleşinceye kadar tekrarlandı. Süzüntüler etrafı alüminyum folyo ile sarılan erlende toplanarak ağzı kapatılıp bir gece -20 °C derecede buzdolabında saklandı. Daha sonra süzüntü darası alınmış cam balonlara konularak çözücüler rotary evaporatörde uçuruldu. Cam balonlar tekrar tartıldı ve cam balondaki madde miktarı mg/ml olacak şekilde metanol ilave edilerek kuru maddeler çözüldü. Karışım deney tüplerine aktararak buzdolabında ölçümler yapılmaya kadar saklandı.

Fenolik madde tayini için her tüpe 200 µl karışım çözeltisi, 300 µl su, 2,5 ml Folin-Ciocaltaeu, 2 ml % 7,5 (w/v) Na₂CO₃ ilave edildi. Karışım 10 saniye vortekslendikten sonra 45 °C'de 15 dakika su banyosunda bekletildi. Her 5 dakikada bir su banyosundaki tüpler çalkalandı. Tüplerdeki karışımın absorbansları 765 nm'de ölçülerek standart grafik yardımıyla kontrol ve uygulama gruplarındaki total fenolik madde miktarı belirlendi.

Total fenolik bileşik miktarı gallik asitten hazırlanan standart grafik yardımıyla belirlendi. Standart grafik için 1 ml'sinde 1 mg gallik asit bulunan stok çözelti hazırlandı. Stok çözülden 100 µl, 200 µl, 300 µl, 400 µl ve 500 µl tüplere pipetlendi ve üzerleri 500 µl'ye destile su ile tamamlandı. Daha sonra her tüpe 2,5 ml Folin-Ciocaltaeu, 2 ml % 7,5 (w/v) Na₂CO₃ ilave edildi. Absorbanslar 765 nm'de ölçülerek gallik asit konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbanslar yardımıyla standart grafik hazırlandı (Pennycooke ve ark., 2005).

3.2.5. Antosiyanin ve Sinapoil Esterlerin Belirlenmesi

Kontrol, 50 mM ve 100 mM NaCl uygulanan gruplarda antosiyanin ve sinapoil ester miktarı Posmyk ve arkadaşlarının metoduna (2009) göre tayin edildi. Kontrol ve muamele gruplarından 0,7 g yaprak % 1 oranında asitlendirilmiş 30 ml metanol ile havanda ekstrakte edildi ve alüminyum folyo ile tamamen kapatılan beherlere konularak ağızları kapalı şekilde bir gece buzdolabında saklandı. Ekstrakt antosiyanin ve sinapoil ester miktarını belirlemek için kullanıldı.

Antosiyanin tayini için ekstraktların absorbansı 525 nm'de ölçüldü. Numunelerdeki antosiyanin miktarı standart grafikten yararlanılarak hesaplandı. Standart grafik için 2,06, 4,13, 10,33, 20,66, 41,32 µmol/ml siyanidin-3-glikozit kullanılarak absorbansa karşılık konsantrasyon grafiği çizildi.

Sinapoil ester tayininde ekstraktların absorbansı 328 nm'de ölçüldü. Kontrol ve uygulama gruplarındaki sinapoil ester miktarı hazırlanan standart grafik yardımıyla belirlendi. Standart grafik için 5,6, 11,2, 22,5, 45,1, 90,3, 180,6 µmol/ml klorojenik asit kullanılarak absorbansa karşılık konsantrasyon grafiği çizildi.

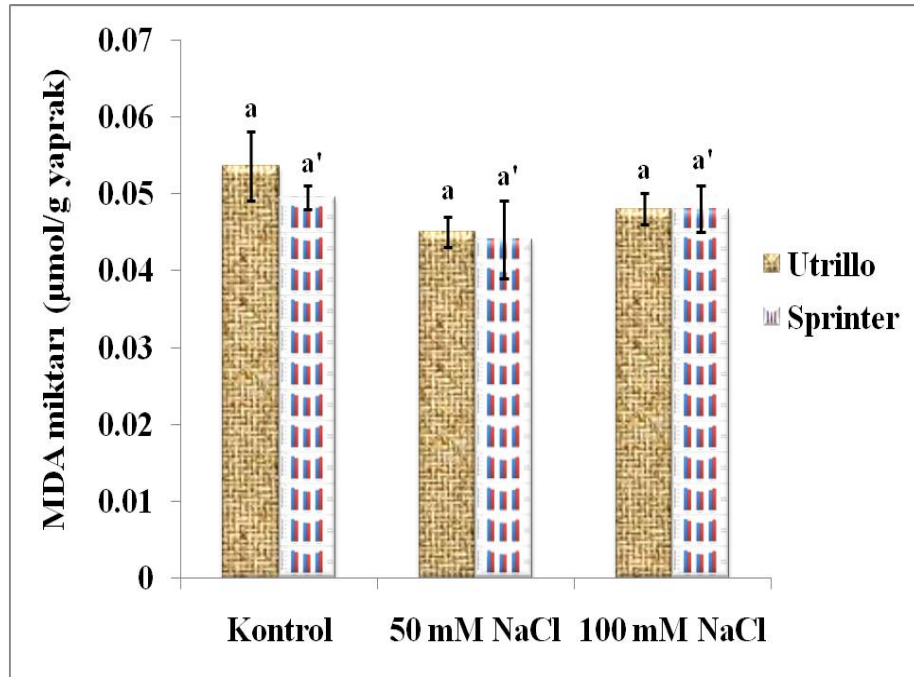
3.2.6. İstatistik Analiz

Kontrol ve uygulama gruplarındaki farklılıklar Duncan çoklu aralık testine göre $p < 0,05$ önemlilik değerinde yapılmıştır. Çalışmada her grup için 3 tekerrür yapılmıştır ($n=3$). İstatistikî analizler SPSS for Windows 11.5 Standart version paket programı kullanılarak kontrol ve uygulama grupları arasındaki farklılıklar tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) ile yapıldı (Duncan, 1955).

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI

4.1. Malondialdehit Miktarının Sonuçları

Tuz stresinin bezelye yapraklarında lipid peroksidasyonu üzerine olan etkisi, yıkım ürünlerinden birisi olan malondialdehit miktarı ölçülerek tespit edildi. Kontrol ve uygulama grupları arasındaki malondialdehit miktarındaki değişimler Şekil 4.1.'de gösterilmiştir. Tuz stresi bezelye çeşitlerinin yapraklarında malondialdehit miktarını çok az miktarda azaltmıştır. 50 mM NaCl uygulaması utrillo ve sprinter çeşitlerinde lipid peroksidasyon miktarını sırasıyla % 15,8 ve % 11,2 oranında azaltmıştır ($p>0,05$).

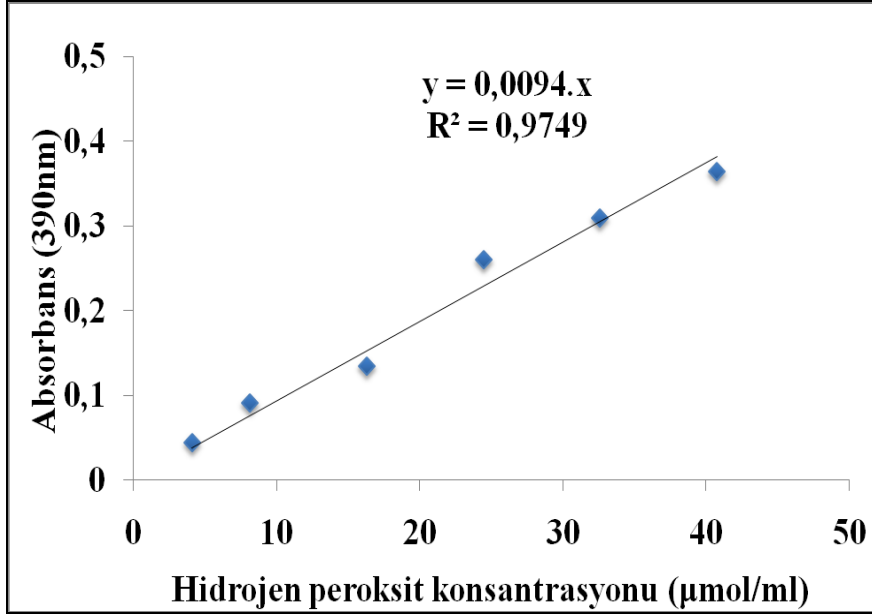


Şekil 4.1. Tuz stresinin bezelye çeşitlerinde malondialdehit miktarları üzerine etkisi ($p>0,05$)

4.2. Hidrojen Peroksit Miktarının Belirlenmesinde Kullanılan Standart Grafik

Hidrojen peroksit miktarının belirlenmesinde kullanılacak olan standart grafik Bölüm 3.2.3.'te anlatıldığı gibi hazırlandı. Kontrol ve tuz uygulanan bezelye çeşitlerinde

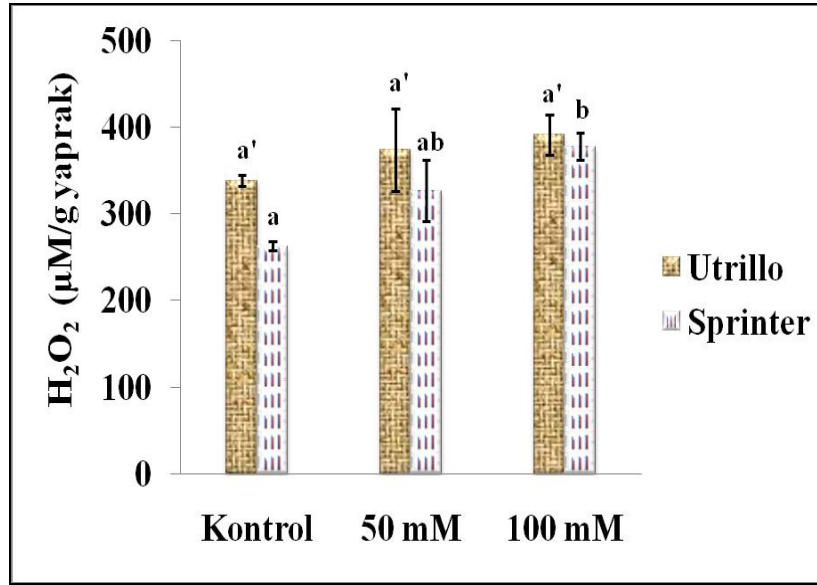
hidrojen peroksit miktarı standart grafikten yararlanılarak hesaplanmıştır. Standart çözeltilerin μM hidrojen peroksit karşılık gelen absorban değerleri Şekil 4.2.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. Hidrojen peroksit miktarının belirlenmesinde kullanılan standart grafik

4.3. Hidrojen Peroksit Miktarı Sonuçları

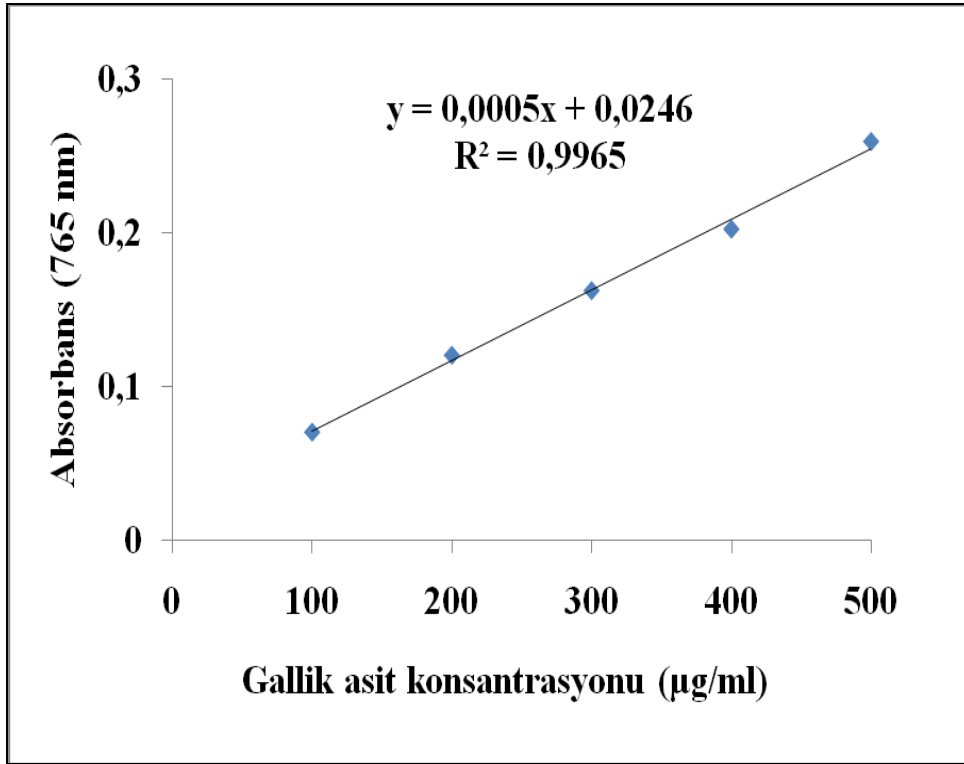
Kontrol ve tuz uygulanan utrillo ve sprinter bezelye çeşitlerindeki hidrojen peroksit miktarları Şekil 4.3.'de gösterilmiştir. Bezelye çeşitlerinde tuz uygulaması konsantrasyonuna bağlı olarak hidrojen peroksit miktarını artırmıştır ($p < 0,05$). Bu artış utrilloda kısmi iken sprinterde önemlidir.



Şekil 4.3. Tuz stresinin bezelye çeşitlerinde hidrojen peroksit miktarları üzerine etkisi ($p < 0,05$)

4.4. Total Fenolik Bileşiklerin Miktarının Tayininde Kullanılan Standart Grafik

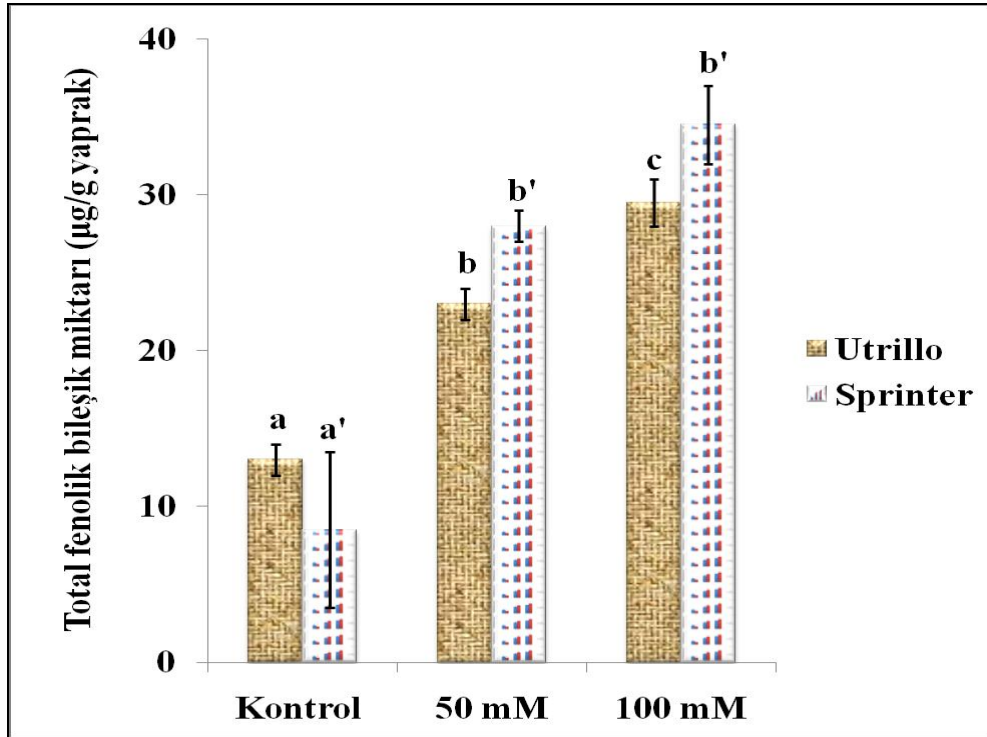
Standart grafik Bölüm 3.2.4'de belirtildiği gibi hazırlandı. Kontrol ve uygulama gruplarında total fenolik bileşik miktarları hazırlanan standart grafikten yararlanarak hesaplandı. Standart çözeltilerin μg gallik asite karşılık gelen absorbans değerleri Şekil 4.4.'de gösterildi.



Şekil 4.4. Total fenolik madde miktarının belirlenmesinde kullanılan standart grafik

4.5. Total Fenolik Bileşik Miktarı Sonuçları

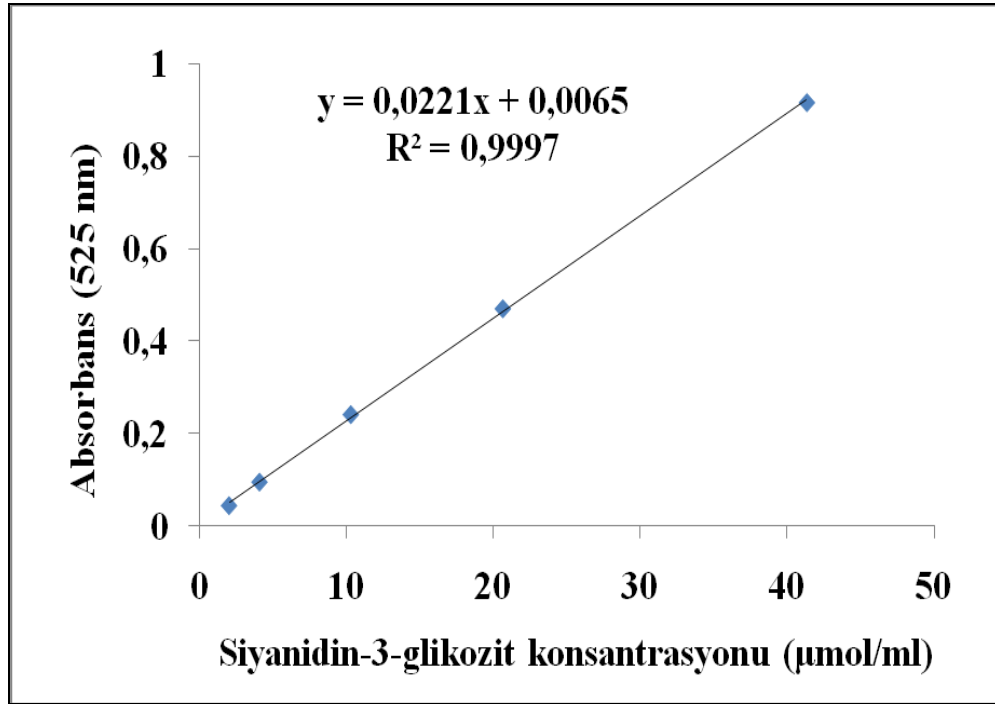
Kontrol ve uygulama gruplarındaki total fenolik bileşik miktarları Şekil 4.5.'de gösterildi. Tuz stresi sprinter ve utrillo bezelye çeşitlerinde total fenolik madde miktarlarını artan tuz konsantrasyonuna paralel olarak önemli oranlarda artırmıştır ($p < 0,05$). Tuz uygulaması sprinter çeşidinde total fenolik madde miktarını utrillo çeşidine kıyasla daha fazla artırmıştır.



Şekil 4.5. Tuz stresinin bezelye çeşitlerinde total fenolik bileşik miktarları üzerine etkisi ($p < 0,05$)

4.6. Antosiyanin Miktarının Belirlenmesinde Kullanılan Standart Grafik

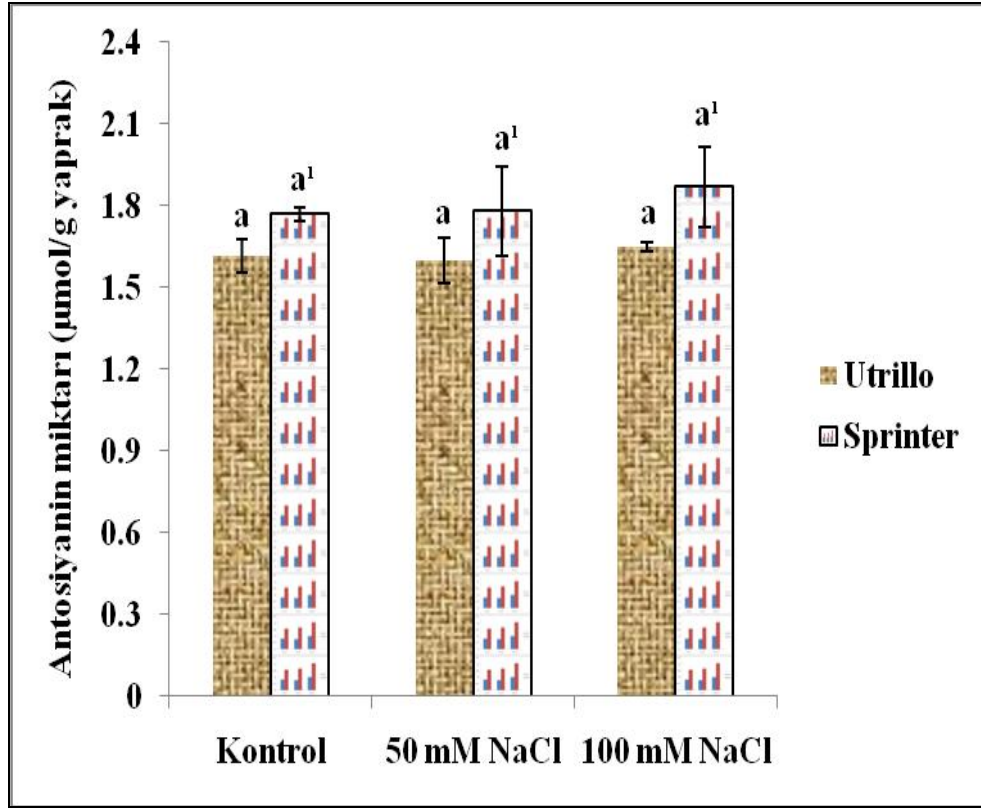
Antosiyanin miktarının belirlenmesinde kullanılan standart grafik Bölüm 3.2.5.'te anlatılan şekilde hazırlandı. Kontrol ve tuz stresi uygulanan utrillo ve sprinter bezelye çeşitlerindeki antosiyanin miktarları siyanidin-3-glikozit ile hazırlanan standart grafik yardımıyla belirlendi. Standart çözeltilerin μmol siyanidin-3-glikozite karşılık gelen absorbanları Şekil 4.6.'da gösterildi.



Şekil 4.6. Antosiyanin miktarının belirlenmesinde kullanılan standart grafik

4.7. Antosiyanin Miktarı Sonuçları

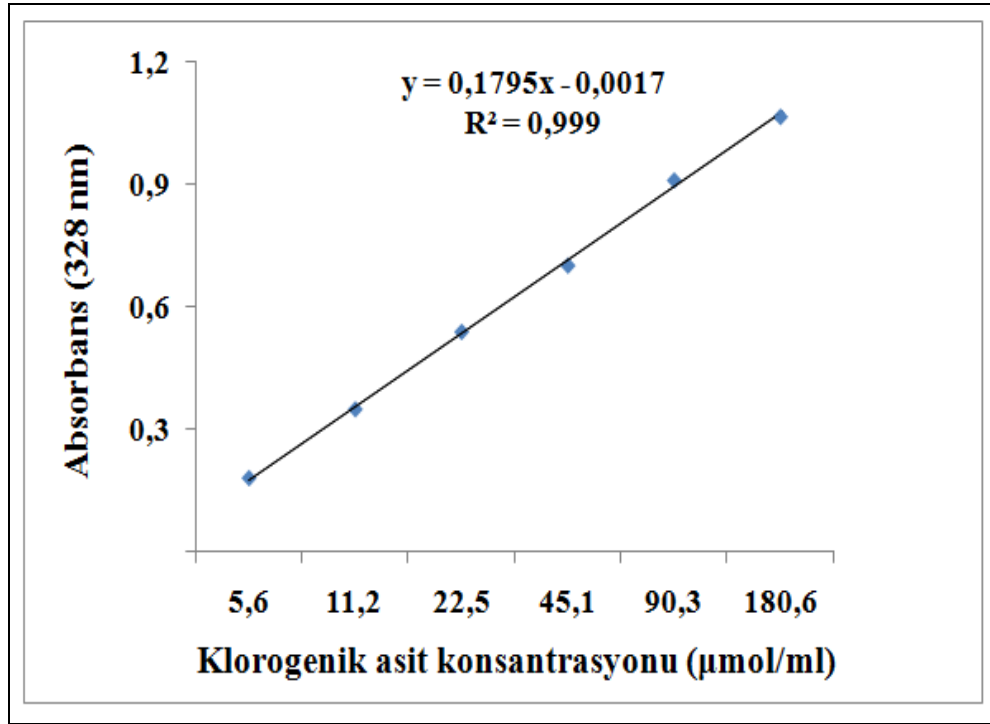
Kontrol ve NaCl uygulanan utrillo ve sprinter bezelye çeşitlerinin antosiyanin miktarları Şekil 4.7.'de gösterilmiştir. Sprinter çeşidinde antosiyanin miktarı utrillodan kısmi olarak daha fazladır. Tuz stresi utrillo ve sprinter çeşitlerinde antosiyanin miktarını kısmi olarak artırmıştır ($p > 0,05$).



Şekil 4.7. Tuz stresinin bezelye çeşitlerinde antosiyanin miktarları üzerine etkisi (p>0,05)

4.8. Sinapoil Ester Miktar Tayininde Kullanılan Standart Grafik

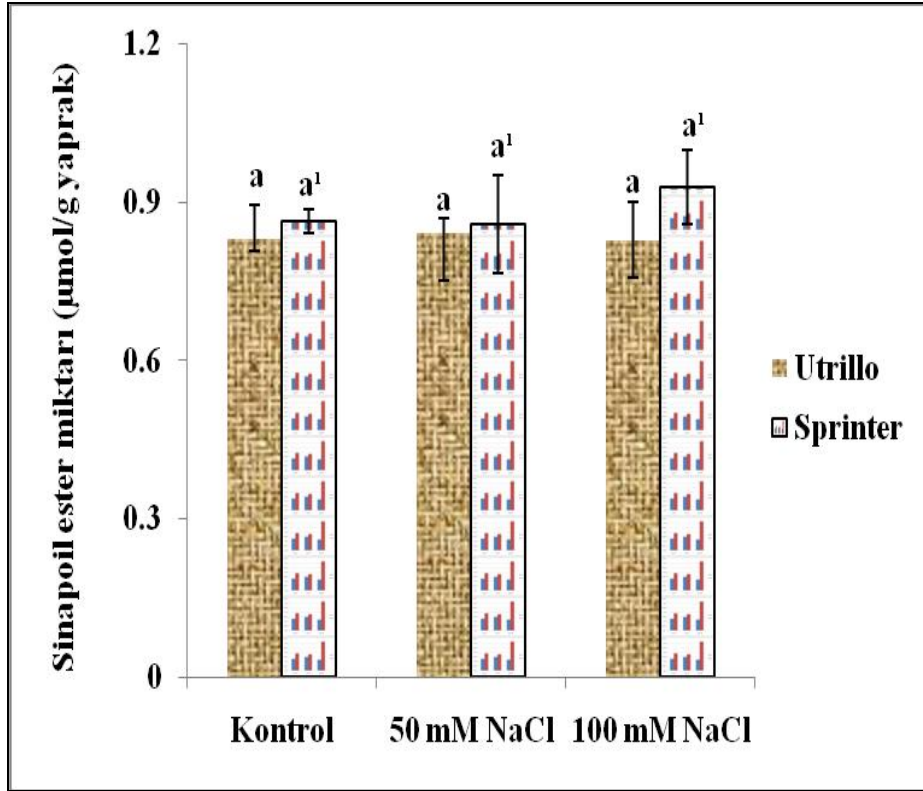
Sinapoil miktarını belirlemek için kullanılan standart grafik Bölüm 3.2.5.'te bahsedilen şekilde hazırlanmıştır. Belirli konsantrasyonlardaki klorojenik asite karşılık gelen absorbanlar Şekil 4.8.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.8. Sinapoil ester miktarının belirlenmesinde kullanılan standart grafik

4.9. Sinapoil Ester Miktarı Sonuçları

Sprinter ve utrillo bezelye çeşitlerinde kontrol ve tuz stresi uygulanan gruplarda sinapoil ester miktarındaki farklılıklar Şekil 4.8.'de gösterilmiştir. Tuz uygulamaları her iki bezelye çeşidinde de sinapoil ester miktarlarını değiştirmemiştir ($p > 0,05$).



Şekil 4.9. Tuz stresinin bezelye çeşitlerinde sinapoyl miktarları üzerine etkisi ($p>0,05$)

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Dünyanın çoğu bölgesi tuzluluk problemi ile karşı karşıyadır. Tuzluluk bitkilerde pek çok fizyolojik ve biyokimyasal parametreleri etkilemektedir. Tuz stresi altında bitkiler düşük su potansiyeli ve iyon toksitesi ile mücadele etmek zorundadırlar. Tuz stresi üzerine yapılan çok sayıda çalışma olmasına rağmen bitkilerin tuza tolerans mekanizmaları tam olarak anlaşılamamıştır. Osmotik stres ve iyon toksitesine neden olduğu bilinen tuz stresi ayrıca oksidatif strese de yol açmaktadır (Hernández ve ark., 2000; Xue ve Lui, 2008). Tüm bu faktörler tuz stresinin zararlarını artırmaktadır.

Tuzluluk bitkilerin osmotik potansiyelini, yaprak su potansiyelini, transpirasyon, yaprak sıcaklığı ve fotosentetik aktivitede rol oynayan enzim, klorofil ve karotenoid miktarlarını etkiler (Shahid ve ark., 2008; Flowers, 2004). İyonik stresle bitki yapraklarında biriken toksik iyonlar yaprak senesensi ile uzaklaştırılmaya çalışılır. Tuzluluğun neden olduğu fotosentetik aktivite kaybı; yaprak senesensi, klorofil miktarının azalması ve stomaların kapanmasıyla ilişkilidir. Fotosentezin azalması elektron zincirinin aşırı indirgenmesine ve foton enerjisinin süperoksit, hidrojen peroksit, hidroksil radikalleri gibi reaktif oksijen türlerinin oluşumuna dolaylı olarak katkı sağlar (Demiral ve Türkan, 2005; Hichem ve ark., 2009). Oluşan aktif oksijen türleri hücrede bulunan DNA, protein, yağ, fotosentetik pigmentler gibi makro moleküllere ve lipid peroksidasyonu ile membranlara zarar verir (Sairam ve ark., 2005). Tuzlu koşullarda bitkiler hayatta kalabilmek için tuz stresinin zararlarını antioksidant sistemleri ile azaltırlar (Mohamed ve Aly, 2008).

Yağ asitlerinin doymamışlığı su ve tuz stresinden olumsuz etkilenirler. Olefinik bağların hidrojen atomları oksidatif saldırıların hedefidir. Oksidatif reaksiyonlar enzimlerle kontrol edilemezse lipid peroksidasyonu meydana gelir ve pek çok reaktif ürün oluşur. Bu ürünler protein ve DNA gibi makromoleküllerin yapılarının bozulmasına neden olur (Parida ve Das, 2005; Eraslan ve ark., 2007).

Tuza toleranslı ve hassas bezelye çeşitlerinin kloroplastlarında yapılan bir çalışmada tuz stresi hassas türlerin kloroplastlarında lipid peroksidasyonunu artırmıştır (Hernandez ve ark., 1995). Bu çalışmada, tuz stresi utrillo ve sprinter çeşitlerinde lipid

peroksidasyonunu artırmamıştır. Diğer bir çalışmada farklı genotiplere sahip bezelye çeşitlerinde tuz stresinin etkisi çalışılmıştır. Tuza duyarlı bir çeşitte lipid peroksidasyonu artarken diğer çeşitte azalma görülmüştür. Aynı çalışmada tuza dirençli bir türde lipid peroksidasyonu tuz konsantrasyonu ile azalırken diğerinde artış göstermiştir. Lipid peroksidasyon miktarı çeşitler arasında değişebilmekte ve çeşitlerin tuza toleransıyla lipid peroksidasyonu arasında bir ilişki olmadığı ifade edilmektedir (Noreen ve Ashraf, 2009).

Tuz stresinin bazı bitkilerde lipid peroksidasyonunu artırmadığı hatta azalttığı literatürlerde ifade edilmektedir. Bitkilerdeki malondialdehit miktarı stresin büyüklüğüne ve doku tipine bağlı olarak değişebilmektedir. Çalışmamızdaki malondialdehit azalmasının muhtemel nedenleri süperoksit dismutaz, askorbat peroksidaz, glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerindeki artışlar sonucunda meydana gelebileceği gibi fenolik bileşiklerin reaktif oksijen türlerini temizleyerek lipid peroksidasyonunu azaltmasından da kaynaklanabilir. Ashraf ve ark. (2010) yapraklardaki malondialdehit miktarının fenolik bileşik içeriği ile negatif ilişkili olduğunu tespit etmişlerdir. Bu negatif ilişkinin fenolik bileşiklerin antioksidan özellikleri ile reaktif oksijen türlerini temizlemesine dayandığı ve malondialdehit miktarının bu yüzden azaldığı ifade edilmiştir. Fenolik bileşiklerin lipid oksidasyonunu geciktirmelerinin ve inhibe etmelerinin radikal giderici özelliklerinden kaynaklandığı çeşitli çalışmalarda belirtilmiştir (Ksouri ve ark., 2007; Daneshmand ve ark., 2010).

Metal iyonlarının yokluğunda stabil bir reaktif oksijen türü olan hidrojen peroksit savunma ve gelişme olaylarında rol oynamaktadır. Hidrojen peroksit üretildiği yerden diğer hücrelere ve hücre içindeki çeşitli organellere difüze olarak sekonder mesajcı işlevide görmektedir. Yüksek konsantrasyonlarda hidrojen peroksit Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonlarıyla hidroksil radikaline dönüşerek lipid peroksidasyonunun artmasına, nükleik asit, lipit ve protein gibi hücrel moleküllerde oksidatif zarara yol açar (Michalak, 2006; Hichem ve ark., 2009). Yapraklarda hidrojen peroksit miktarının 10 μM 'lar artması fotosentezin % 50 azalmasına neden olur (Öztürk, 2002).

Tuz stresi sonucu pek çok bitkide hidrojen peroksit miktarının artmasıyla ilgili raporlar mevcuttur (Sairam ve ark., 2005; Radic ve ark., 2006). Ancak tuz uygulaması sonucu bazı bitkilerde hidrojen peroksit miktarının değişmediği veya azaldığı ifade

edilmektedir (Radic ve ark., 2006; Noreen ve Ashraf, 2009). Farklı genotiplere sahip bezelye çeşitlerine uygulanan tuz stresi sonucu hidrojen peroksit miktarında önemli bir değişiklik olmamıştır. Tuza dirençli bir çeşitte diğer çeşitlerden daha fazla hidrojen peroksit miktarı olduğu gözlenmiştir (Noreen ve Ashraf, 2009). Bu çalışmada tuz uygulaması utrillo ve sprinter çeşitlerinde hidrojen peroksit miktarını artırmıştır. Hidrojen peroksit miktarı sprinter çeşidinde artan tuz miktarıyla orantılı olarak artmıştır ($p<0,05$).

Hidrojen peroksit süperoksit radikallerinin enzimatik ve enzimatik olmayan reaksiyonlarıyla üretilebilir. Ayrıca yağ asitlerinin β -oksidasyonu ve fotorespirasyonla oluşabilir (Esfandiari ve ark., 2007). Hücrelerde hidrojen peroksit miktarı çok sayıda antioksidan enzim vasıtasıyla kontrol edilir (Hernandez ve Almansa, 2002; Parida ve Das, 2005).

Bitkiler tuz stresinden kaynaklanan oksidatif hasarı azaltmak için farklı adaptasyon mekanizmalarına sahiptir. Fenolik asitler, flavonoidler, proantosiyeninler, antosiyeninler gibi fenolik bileşikler serbest radikallerin temizlenmesinde önemli rol oynarlar. Tuzluluk gibi abiyotik ya da biyotik streslere karşı cevap olarak bitkilerde sentezleri artmaktadır (Ksouri ve ark., 2007; Neves ve ark., 2010). Bu çalışmada tuz stresi konsantrasyona bağlı olarak utrillo ve sprinter bezelye çeşitlerinde total fenolik bileşik miktarını önemli oranda artırmıştır ($p<0,05$). Sprinter çeşidindeki fenolik bileşik miktarındaki artış daha fazladır.

Noreen ve Ashraf (2009) yaptıkları çalışmada farklı tuz stresi uygulaması sonucu tuza hassas, az dirençli ve dirençli bezelye çeşitlerinde total fenolik bileşiklerin miktarında artış olduğunu ifade etmişlerdir. Tuz stresi soya fasülyesinin köklerindeki total fenolik bileşik ve lignin miktarını konsantrasyona bağlı olarak artırmıştır (Neves ve ark., 2010).

Fenolik bileşiklerin flavonoid grubuna giren antosiyeninler ve fenilpropanoid metabolizması ürünü sinapoil esterlerin antioksidan özellikte olduğu kaydedilmiştir (Ruegger ve Chapple, 2001; Michalak, 2006; Hichem ve ark., 2009; Posmyk ve ark., 2009). Üç yabancı patates türünde yapılan çalışmada bitki gelişme ortamına farklı konsantrasyonlarda NaCl uygulanmış *Solanum stoloniferum*, *Solanum bulbosum*'da fenolik bileşik, flavonoid, antosiyenin miktarlarında azalma meydana gelmiştir. Ancak

Solanum acaule'deki fenolik bileşiklerde bir artış olmuştur. Bu türde düşük konsantrasyondaki tuz miktarı flavonoid miktarını artırmıştır (Daneshmand ve ark., 2010). *Grevilea* türlerinde tuz stresi altında antosiyanin miktarında artış olduğu ifade edilmektedir (Parida ve Das, 2005). Yukardaki literatürlerde tuz stresinin şiddet, süre ve bitki türüne bağlı olarak bitkilerde antosiyanin ve diğer fenolik bileşiklerin miktarlarında artış-azalma olduğu görülmektedir. Bu çalışmada tuz stresi utrillo ve sprinter çeşitlerinde antosiyanin, sinapoil ester miktarını değiştirmemiştir. Sprinterde kısmi olarak antosiyanin miktarı daha fazladır. Diğer bir çok çevresel stresin etkisiyle bitkilerde fenolik bileşikler, antosiyanin, sinapoil ester miktarlarında değişiklikler olmaktadır (Posmyk ve ark., 2009).

Fenolik bileşikler hidroksil ve karboksil gruplarıyla ağır metalleri şelatlayabilme özelliğine sahiptir. Lipid alkoksi radikallerini yakalayarak lipid peroksidasyonunu önleyebilirler (Michalak, 2006). Bazı türlerde antosiyanin miktarındaki artışın lipid peroksidasyonundaki azalma ile ilişkili olduğu belirtilmektedir (Posmyk ve ark., 2009).

Sonuç olarak; tuz stresi utrillo ve sprinter bezelye çeşitlerinde total fenolik bileşik miktarını artırırken antosiyanin ve sinapoil ester miktarını değiştirmemiştir. Stres süresince fenolik bileşik miktarındaki artışla birlikte antosiyanin ve sinapoil ester miktarının muhafaza edilmesi muhtemelen lipid peroksidasyonunu engellemiş olabilir. Utrillo ve sprinter lipid peroksidasyonu dikkate alındığında tuza hassasiyet açısından birbirine benzer özellik göstermişlerdir.

6. KAYNAKLAR

- Ahmad, P., Jhon, R., 2005. Effect of salt stress on growth and biochemical parameters of *Pisum sativum* L. Archives of Agronomy and Soil Science, 51 (6), 665–672.
- Ahmad, P., Jhon, R., Sarwat, M., Umar, S., 2008. Responses of proline, lipid peroxidation and antioxidative enzymes in two varieties of *Pisum sativum* L. under salt stress. International Journal of Plant Production, 2 (4), 353–365.
- Akgül, B., 2010. Etiyole fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) fidelerinde antioksidan enzim aktivitelerinin ve total fenolik bileşiklerin incelenmesi. (Yüksek Lisans Tezi), Gaziosmanpaşa Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Tokat.
- Akman, Y., Küçüködük, M., Düzenli, S., 2001. Bitki fizyolojisi. PalmeYayın Dağıtım, 768, Ankara.
- Anonim, 2008. Structure-Property/Activity Modeling of Polyphenols. <http://www.mdpi.org/ijms/specialissues/spampolyphenols.htm>, (08.01.2011)
- Ashraf, M.A., Ashraf, M., ve Ali, Q., 2010. Response of two genetically diverse wheat cultivars to salt stress at different growth stages: leaf lipid peroxidation and phenolic contents. Pak. J. Bot., 42, 559–565.
- Ashraf, M. A., Foolad, M. R., 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. Environmental and Experimental Botany, 59 (2), 206–216.
- Ashraf, M. A., Harris, P. J. C., 2004. Potential indicators of salinity tolerance in plants. Plant Science, 166, 3–16.
- Athar, H. R., Ashraf, M., 2009. Salinity and water stress. Springer Science + Business Media B.V., 1–18, Germany.
- Baydar, K., 2010. Bazı limon çeşitlerinin (*Citrus lemon* (L.) Burm. f.) uçkurutan hastalığı (*Phoma tracheiphila* (Petri) Kanc. et. Ghik.)'na karşı dayanıklılık mekanizmasının fenolik bileşikler bazında değerlendirilmesi (Yüksek Lisans Tezi), Çukurova Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M. D. L., Paez- Hernández, M. E., Rodríguez, A. J., Galán-Vidal, A. C., 2009. Chemical studies of anthocyanins: A review. Food Chemistry, 113, 859–871.
- Chalker-Scott, L., 1999. Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. Photochemistry and Photobiology, 70 (1), 1–9.
- Daneshmand, F., Arvin, M. J., Kalantari, K. M., 2010. Physiological responses to NaCl stress in three wild species of potato in vitro. Acta Physiol. Plant, 32, 91–101.
- Demiral, T., ve Türkan, İ., 2005. Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. Environmental and Experimental Botany, 53, 247–257.
- Diken, Ö., 2008. Tuz ve kuraklık stresi etkisindeki arpa (*Hordeum vulgare* L.) bitkisinde moleküler analizler. (Yüksek Lisans Tezi), İstanbul Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Duncan, B.D., 1955. Multiple range and multiple F-tests. Biometrics. p. 1–42. International Biometric Society.
- Ekmekçi, E., Apan, M., Kara, T., 2005. Tuzluluğun bitkisel gelişime etkisi. OMÜ Ziraat Fakültesi Dergisi, 20 (3), 118-125.

- Elliältiođlu, Ő., 1999. Doku kültürü yoluyla vegetatif çoğaltmada doku kararması sorunu, nedenleri ve çözüm yolları. *Biyoteknoloji (Kkem) Dergisi*, 24 (1), 37–47.
- Eraslan, F., İnal, A., SavaŐtrk, O., ve GüneŐ, A., 2007. Changes in antioxidative system and membrane damage of lettuce in response to salinity and boron toxicity. *Scientia Horticulturae*, 114, 5–10.
- Eraslan, F., İnal, A., Pilbeam, J. D., GüneŐ, A., 2008. İnteractive effects of salicylic and silicon on oxidative damage and antioxidant activity in spinach (*Spinacia oleracea* L. Cv Matador) grown under boron toxicity and salinity. *Plant Growth Regul*, 55, 207–219.
- Eryılmaz, F., 2003. Yüksek bitkilerde tuz stresi ile antosiyanin içeriği arasındaki iliŐkiler (Yüksek Lisans Tezi), İstanbül Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbül.
- Eryılmaz, F., 2007. Bakır (Cu) uygulanmış mısır (*Zea mays* L.) fidelerindeki antioksidan aktivitelerin fizyolojik ve anatomik yönden incelenmesi. (Doktora Tezi), İstanbül Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbül.
- Esfandiari, E., Shekari, F., Shekari, F. ve Esfandiari, M., 2007. The effect of salt stress on antioxidant enzymes activity and lipid peroxidation on the wheat seedling. *Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj*, 1842–4309.
- Es-Safi, N. E., Kollman, A., Khelifi, S., Ducrot, P. H., 2007. Antioxidative effect of compounds isolated from *Globularia alypum* L. structure–activity relationship. *LWT*, 40, 1246–1252.
- Frary, A., Gl, D., KeleŐ, D., kmen, B., Pınar, H., Őıđva, H. ., Yemenicioğlu, A., Doğanlar, S., 2010. Salt tolerance in *Solanum pennellii*: antioxidant response and related QTL. *BMC Plant Biology*, 10: 58.
- Flowers, T. J. 2004. Improving crop salt tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 55, 307–319.
- Goldberg, G., 2003. *Plants: Diet and Health*. Blackwell Science, 368, UK.
- Gould, S.K., Lister, C., 2006. *Flavonoid Functions in Plants*. *Flavonoids : chemistry, biochemistry, and applications*, Edited by Andersen, M. ., Markham, R. K. Taylor & Francis Group, Boca Raton, 397–441.
- Grel, A., Avcıoğlu, R., 2004. Bitkilerde strese dayanıklılık fizyolojisi. *Bitki Biyoteknolojisi II: Genetik Mhendisliği ve Uygulamaları*, Editrler: zcan, S., Grel, E. ve M. Babaoğlu. Seluk Üniversitesi Vakfı Yayınları, Konya, 288–326.
- Hara, M., Oki, K., Hoshino, K., Kuboi, T., 2003. Enhancement of anthocyanin biosynthesis by sugar in radish (*Raphanus sativus*) hypocotyl. *Plant Science*, 164, 259–265.
- Harinasut, P., Poonsopa, D., Roengmongkol, K., Charoensataporn, 2003. Salinity effects on antioxidant enzymes in mulberry cultivar. *ScienceAsia*, 29, 109–113.
- Hernández, J. A., Olmos, E., Corpas, F. J., Sevilla, F., Río, D. L. A., 1995. Salt-induced oxidative stress in chloroplasts of pea plants. *Plant Science* 105, 151–167.
- Hernández, J. A., Jiménez, A., Mullineaux, P., Sevilla, F., 2000. Tolerans of pea (*Pisum sativum* L.) to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defences. *Plant, Cell and Environment*, 23, 853–862.

- Hernández, J. A., Almansa, M. S., 2002. Short-term effects of salt stress on antioxidant systems and leaf water relations of pea leaves. *Physiologia Plantarum*, 115, 251–257.
- Hichem, H., Denden, M., El Ayeb, N., 2009. Changes in fatty acids composition, hydrogen peroxide generation and lipid peroxidation of salt-stressed corn (*Zea mays* L.) roots. *Acta Physiol Plant* 31, 787–796.
- Hirt, H., Shinozaki, K., 2004. Plant responses to abiotic stress. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 297, Germany.
- Holton, A. T., Cornish, C. E., 1995. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *The Plant Cell*, 7, 1071–1083.
- Jordheim, M., 2007. Isolation, identification and properties of pyranoanthocyanins and anthocyanin forms. (Doktora Tezi), Bergen University, Department of Chemistry University of Bergen, Norway.
- Kaçar, B., Katkat, A. V., Öztürk, Ş., 2006. Bitki Fizyolojisi. Nobel Yayınları, 563, Türkiye.
- Kılınç, K., Kılınç, A., 2002. Oksijen toksitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 33 (2), 110–118.
- Kısa, D., 2010. Tuz stresinin börülce (*Vigna unguiculata* L.) yağ asiti içeriğine etkisinin araştırılması. (Yüksek Lisans Tezi), Gaziosmanpaşa Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Tokat.
- Koç, E., Üstün, A.S., 2008. Patojenlere karşı bitkilerde savunma ve antioksidanlar. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 24 (1–2), 82–100.
- Kong, J. M., Chia, S. L., Goh, N. K., Chia, T. F., Brouillard, R., 2003. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, 64, 923–933.
- Ksouri, R., Megdiche, W., Debez, A., Falleh, H., Grignon, C., Abdelly, C., 2007. Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritima*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45, 244–249.
- Kuşvuran, Ş., 2010. Kavunlarda kuraklık ve tuzluluğa toleransın fizyolojik mekanizmaları arasındaki bağlantılar. (Doktora Tezi), Çukurova Üniversitesi, Bahçe Bitkileri Ana Bilim Dalı, Adana.
- Li, J., 2009. Total anthocyanin content in blue corn cookies as affected by ingredients and oven types. (Doktora Tezi), Kansas State University, Department of Grain Science and Industry College of Agriculture, Kansas.
- Li, X., Bergelson, J., Chapple, C., 2010. The *Arabidopsis* accession Pna-10 is a naturally occurring *sng 1* deletion mutant. *Molecular Plant*, 3 (1), 91–100.
- Lim, K. E., Li, Y., Parr, A., Jackson, R., Ashford, D. A., Bowles, D. J., 2001. Identification of glucosyltransferase genes involved in sinapate metabolism and lignin synthesis in *Arabidopsis*. *The Journal of Biological Chemistry*, 276 (6), 4344–4349.
- MacDougall, D.B., 2002. Colour in food Improving quality. Woodhead Publishing Limited. Cambridge, England, 179–221.
- Marrs, K.A., Alfenito, M.R., Lloyd, A.M. ve Walbot, V., 1995. A glutathione-S-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene *Bronze-2*. *Nature*, 375, 397–400.
- Matysik, J., Bhalu, B. A., Mohanty, P., 2002. Molecular mechanism of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plant. *Current Science*, 82 (5), 525–532.

- Melhmer, N., Wurzinger, B., Stael, S., Hofmann-Rodrigues, D., Csaszar, E., Pfister, B., Bayer, R., Teige, M., 2010. The Ca²⁺-dependent protein kinase CPK3 is required for MAPK-independent salt stress acclimation in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 63, 484–498.
- Meloni, A. D., Oliva M. A., Martinez A. C., Cambraia, J., 2003. Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. *Environmental and Experimental Botany*, 49, 69–76.
- Michalak, A., 2006. Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Plants Growing under Heavy Metal Stress. *Polish J. of Environ. Stud.* Vol. 15, No. 4, 523–530.
- Milić., L. B., Dijilas, M. S., Čanadanović-Brunet, M. J., 1998. Antioxidative activity of phenolic compounds on the metal-ion breakdown of lipid peroxidation system. *Food Chemistry*, 61 (4), 443–447.
- Mohamed, A. A., Aly, A. A., 2008. Alterations of some secondary metabolites and enzymes activity by using exogenous antioxidant compound in onion plant grown under seawater salt stress. *American-Eurasian Journal of Scientific Research*, 3 (2), 139–146.
- Najafi, F., Khavari-Nejad, R. A., Rastgar-Jazii, F., Sticklen, M., 2006. Physiological changes in pea (*Pisum sativum* L. cv. Green Arrow) under NaCl salinity. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 9 (5), 974–978.
- Nakagami, H., Pitzschke, A., Hirt, H., 2005. Emerging MAP kinase pathways in plant stress signaling. *Trends Plant Sci.*, 10, 339–346.
- Neto, A.D.A., Prisco, J.T., Eneas-Filho, J., Abreu, C.E.B., ve Gomes-Filho, E., 2006. Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes. *Environmental and Experimental Botany*, 56, 87–94.
- Neves, G. Y. S., Marchiosi, R., Ferrarese, M. L. L., Siqueira-Soares, R.C., Ferrarese-Filho, O., 2010. Root growth inhibition and lignification induced by salt stress in soybean. *Blackwell Verlag GmbH*, 196, 467–473
- Nizamoglu, M. N., Nas, S., 2010. Meyve ve sebzelerde bulunan fenolik bileşikler; yapıları ve önemleri. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 20–35.
- Noreen, Z., Ashraf, M., Hassan-Ul, M., 2007. Inter-accessional variation for salt tolerance in pea (*Pisum sativum* L.) at germination and screening stage. *Pak. J. Bot.*, 39 (6), 2075-2085.
- Noreen, Z., Ashraf, M., 2009. Assessment of variation in antioxidative defense system in salt-treated pea (*Pisum sativum*) cultivars and its putative use as salinity tolerance markers. *Journal of Plant Physiology*, 166, 1764–1774.
- Oueslati, S., Karray, N., Attia, H., Attia, B., Rabhi, M., Ksouri, R., Lachal, M., (2010). Physiological and antioxidant responses of *mentha pulegium* (Pennyroyal) to salt stress. *Acta Physiol. Plant.*, 32, 289–296.
- Özdemir, S., 2002. *Yemelik Baklagiller*. Hasad yayıncılık, No: 975-8377-13-2, 142s, İstanbul.
- Öztürk, L., 2002. Normal şartlarda büyütülen ıspanak (*S. Oleracea* cv. Gladiatör) bitkisinde etafon ve poliamin uygulamalarının oksidatif enzimler üzerine in vivo ve in vitro etkilerinin incelenmesi. (Doktora Tezi), Atatürk Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Parida, A.K., Das, A.B., 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60, 324–349.

- Pennycooke, J.C., Cox, S., Stushnoff, C., 2005. Relationship of cold acclimation, total phenolic content and antioxidant capacity with chilling tolerance in petunia (*Petunia × hybrida*). *Environmental and Experimental Botany*, 53, 225–232.
- Polesskaya, O. G., Kashirina, E. I., Alekhina N. D., 2006. Effect of salt stress on antioxidant system of plants as related to nitrogen nutrition. *Russian Journal of Plant Physiology*, 53 (2), 186–192.
- Posmyk, M.M., Kontek, R., Janas, K.M. 2009. Antioxidant enzymes activity and phenolic compounds content in red cabbage seedlings exposed to copper stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72, 6–602.
- Radic, S., Radic-Stojkovic, M., ve Pevalek-Kozlina, B., 2006. Influence of NaCl and mannitol on peroxidase activity and lipid peroxidation in *Centaurea ragusina* L. roots and shoots. *Journal of Plant Physiology*, 163, 1284–1292.
- Reza, S., Heidari, R., Zare, S., Norastehnia, A., 2006. Antioxidant responses of two salt-stressed barley varieties in the presence or absence of exogenous proline. *Gen. Appl. Plant Physiology*, 32 (3-4), 233–251.
- Rice-Evans, A., Nicholas, J. M., Paganga, G., 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Elsevier Science*, 2, 4.
- Ruegger, M., Chapple, C., 2001. Mutation that reduce sinapoylmalate accumulation in *Arabidopsis thaliana* define loci with diverse roles in phenylpropanoid metabolism. *Genetics*, 159, 1741–1749.
- Ruiz, M. J., Rivero, M. R., Lo´pez-Cantarero, I., Romero, R., 2003. Role of Ca²⁺ in the metabolism of phenolic compounds in tobacco leaves (*Nicotiana tabacum* L.). *Plant Growth Regulation*, 41, 173–177.
- Sairam, R. K., Srivastava, G. C., Agarwal, S., Meena, R. C., 2005. Differences in antioxidant activity in response to salinity stress in tolerant and susceptible wheat genotypes. *Biologia Plantarum*, 49 (1), 85–91.
- Sanders, D., Brownlee, C., Harper, J. F., 1999. Communicating with calcium. *The Plant Cell*, 11, 691–706.
- Shahid, M. A., Pervez, M. A., Ballal, R. M., Azhar, N., Shahzad, J., Ubaidullah, J., 2008. Physiological responses of pea (*Pisum sativum* cv. Meteor) to irrigation salinity, *Pak. J. Agri. Sci.*, 45 (3).
- Sheahan, J. J., 1996. Sinapate esters provide greater UV-B attenuation than flavonoids in *Arabidopsis thaliana* (*Brassicaceae*). *American Journal of Botany*, 83 (6), 679–686.
- Song, J-Y., Kim, T-Y., Hong, J-H., 2005. Effects of abscisic acid and temperature on the anthocyanin accumulation in seedlings of *Arabidopsis thaliana*. *Journey of Environmental Sciences*, 1093–1102.
- Sönmez, B., 2004. Türkiye’de çorak ıslahı araştırmaları ve tuzlu toprakların yönetimi. Sulanan alanlarda tuzluluk Yönetimi Sempozyum Bildiriler Kitabı, 20-21 Mayıs, Ankara, 157–162
- Sreenivasulu, N., Ramanjulu, S., Ramachandra- Kini, K., Prakash, H.S., Shekar-Shety, H., savithri, H.S., ve Sudhakar, C., 1999. Total peroxidase activity and peroxidase isoforms as modified by salt stress in two cultivars of fox-tail millet with differential salt tolerance. *Plant Science*, 141, 1–9.
- Sullivan, J., 1998. Anthocyanin. *Science*, 1, 1–3.
- Taiz, L. ve Zeiger, E. 2008. Stress fizyolojisi. *Bitki Fizyolojisi, Üçüncü baskıdan çeviri*. Editör: Prof. Dr. İsmail Türkan. Palme Yayıncılık, Ankara, s. 591–602.

- Takahama, U., Oniki, T., 2000. Flavonoids and some other phenolic as substrates of peroxidase: Physiological significance of the redox reactions. *J. Plant Res.*, 113, 301–309.
- Tahkokorpi, M., 2010. Anthocyanins under drought and drought-related stresses in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.). *Acta Univ. Oul.*, 556, 1–31.
- Ulusu, Y., 2007. Farklı dozlarda kadmiyumun maydanoz (*Petroselinum hotense* Hoffm) bitkisinde fotosentetik pigmentler ve oksidatif enzim aktivitelerine etkisi. (Yüksek Lisans Tezi), Gaziosmanpaşa Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Tokat.
- Uylaşer, V., İnce, K., 2008. Şaraptaki antioksidanlar ve fenolik bileşikler. Türkiye 10. Gıda Kongresi, Erzurum.
- Velikova, P., Yordanov, I., ve Edreva, A., 2000. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. Protective role of exogenous polyamines. *Plant Science*, 15, 59–66.
- Vermerris, W., Nicholson R., 2006. Phenolic compounds biochemistry, 207 p, Netherlans.
- Wahid, A., Ghazanfar, A., 2006. Possible involvement of secondary metabolites in salt tolerance of sugarcane. *Journal of Plant Physiology*, 163, 723–730.
- Xiong, L., Schumaker, S. K., Zhu, K. J., 2002. Cell signaling during cold, drought, and salt stres. *American Society of Plant Biologists*, 165–183.
- Xue, Y. F., Liu, P. Zh., 2008. Antioxidant enzymes and physiological characteristics in two jerusalem artichoke cultivars under salt stres. *Russian Journal of Plant Physiology*, 55 (6), 776–781.
- Yakupoğlu, T., Özdemir, N., 2007. Tuzluluk ve alkaliliğin toprağın bazı fiziksel özellikleri üzerine etkileri. *O.M.Ü. Zir. Fak. Dergisi*, 22 (1), 132–138.
- Yamasaki, H., Sakihama, Y., Ikehara, N., 1997. Flavonoid peroxidase reaction as a detoxification mechanism of plant cells aganist H₂O₂. *Plant Physiol.*, 115, 1405– 1412.
- Yediyıldız, A. G., 2008. Kuraklık ve tuz stresi uygulanan buğday (*Triticum aestivum* L.) çeşitlerinde antioksidant enzim aktivitesindeki değişimlerin belirlenmesi. (Yüksek Lisans Tezi), Erciyes Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı, Kayseri.
- Zhu, K. J., 2001. Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science*, 6, 2.
- Zhu, J.K., 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 53, 247–273.

ÖZGEÇMİŞ**Kişisel Bilgiler:**

Adı Soyadı : İbrahim TETİKTABANLAR
Doğum Tarihi ve Yer : 09/05/1984 - Merkez/ SİVAS
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce
Telefon : 0 506 907 09 63
e-mail : itetiktabanlar@yahoo.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	GOÜ Fen Bilimleri Enstitüsü	2011
Lisans	19 Mayıs Üni. Eğt.Fak. Biyoloji Öğretmenliği	2008
Lise	Sivas Lisesi	2001