T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ENDEMİK *CENTAUREA TUZGOLUENSIS* AYTAÇ & H. DUMAN VE *CENTAUREA LYCAONICA* BOISS. & HELDR.'NIN FİZYOLOJİK VE BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ ÜZERİNE TUZ STRESİNİN ETKİLERİ

Evren YILDIZTUGAY
DOKTORA TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Mayıs-2011
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

DOKTORA TEZİ

ENDEMİK *CENTAUREA TUZGOLUENSIS* AYTAÇ & H. DUMAN VE *CENTAUREA LYCAONICA* BOISS. & HELDR.'NIN FİZYOLOJİK VE BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ ÜZERİNE TUZ STRESİNİN ETKİLERİ

Evren YILDIZTUGAY

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mustafa KÜÇÜKÖDÜK
İkinci Danışman: Prof. Dr. İsmail TÜRKAN

2011, X + 115 Sayfa

Jüri
Prof. Dr. Mustafa KÜÇÜKÖDÜK
Prof. Dr. İsmail TÜRKAN
Prof. Dr. Mehmet BABAOĞLU
Prof. Dr. Hüseyin DURAL
Doç. Dr. Osman TUGAY

Bu çalışmanın amacı, endemik *Centaurea tuzgoluensis* ve *Centaurea lycaonica*'nın fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri üzerine tuz stresinin etkilerini belirlemektir. Fizyolojik parametreler, yaprak nisbi su içerikleri (RWC), fotosentetik verimleri, iyon konsantrasyonları, lipid peroksidasyon seviyeleri, hidroksil ($OH^{\bullet}$) radikali süpürülme aktiviteleri, prolin içerikleri ve antioksidan sistem [süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), peroksidaz (POX), askorbat peroksidaz (APX) ve glutasyon redüktaz (GR)] araştırılmıştır. 60 günlük *C. tuzgoluensis* ve *C. lycaonica* fideleri 7 ve 14 gün süresince 0, 150 ve 300 mM NaCl'ye maruz bırakılmıştır. *C. lycaonica*'nın kök-sürgün uzunluğu ve yaş-kuru ağırlığının azalma miktarları *C. tuzgoluensis*'ten daha fazladır. *C. lycaonica*'nın nisbi sürgün gelişim oranı (RGR) 7 ve 14 gün süresince 150 ve 300 mM NaCl'de azalırken, *C. tuzgoluensis*'de 150 mM NaCl'de değişmemiş, 300 mM NaCl'de ise azalmıştır. Her iki türün yaprak nisbi su içerikleri (RWC) tuz stresine bağlı olarak azalmış, en fazla azalma *C. lycaonica*'da tespit edilmiştir. Her iki türün klorofil fluoresansı tuz stresinden etkilenmemiştir. Sürgünlerin Na^{+} ve Cl^{-} içerikleri tuz stresine bağlı olarak her iki türde de artış göstermiş, en fazla artış *C. lycaonica*'da tespit edilmiştir. *C. tuzgoluensis*'in Ca^{+2} ve K^{+} iyon içerikleri, 7 ve 14 gün süresince tuz stresiyle değişmemiş veya artmasına rağmen, *C. lycaonica*'da tuz stresine bağlı olarak miktarları azalmıştır. 7 gün süresince 150 mM ve 300 mM tuz stresi altındaki *C. tuzgoluensis*'in malondialdehit (MDA) içerikleri, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli bir farklılık gözlenmemiştir. Fakat *C. lycaonica*'nın MDA seviyeleri, 150 ve 300 mM tuz stresi altında sırasıyla % 49.6 ve % 148.7 artmıştır. *C. tuzgoluensis*'in SOD, CAT, POX, APX ve GR enzimlerinin aktiviteleri ve onların izozimleri (özellikle Fe-SOD) artmıştır. *C. lycaonica*'da POX enzimi hariç tüm enzimlerin aktiviteleri azalmıştır. *C. tuzgoluensis*'in $OH^{\bullet}$ radikali süpürülmesi aktivitesi 7 gün süresince tuz stresine bağlı olarak artarken, *C. lycaonica*'da ise azalmıştır. Prolin içerikleri tuz stresine bağlı olarak her iki türde de artmıştır. Tüm bu sonuçlarla, *C. tuzgoluensis*'in kısa (7 gün) ve uzun süreli (14 gün) tuz uygulamaları arasında farklı antioksidan mekanizmalara sahip olduğunu ve tuzlu şartlar altında *C. tuzgoluensis*'in tuz toleransında, reaktif oksijen türlerinin (ROS) süpürülmesinde antioksidan sistemin artan kapasitesi ve prolin birikiminin yakından ilişkili olabileceğini ileri sürebiliriz.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan enzimler, *Centaurea lycaonica*, *Centaurea tuzgoluensis*, halofitler, iyon değişimi, lipid peroksidasyonu, prolin, tuz stresi.

ABSTRACT

Ph.D THESIS

EFFECTS OF SALT STRESS ON PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF ENDEMIC *CENTAUREA TUZGOLUENSIS* AYTAÇ & H. DUMAN AND *CENTAUREA LYCAONICA* BOISS. & HELDR.

Evren YILDIZTUGAY

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF SELÇUK UNIVERSITY
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY IN BIOLOGY

Advisor: Prof. Dr. Mustafa KÜÇÜKÖDÜK
Second Advisor: Prof. Dr. İsmail TÜRKAN

2011, X + 115 Pages

Jury
Prof. Dr. Mustafa KÜÇÜKÖDÜK
Prof. Dr. İsmail TÜRKAN
Prof. Dr. Mehmet BABAOĞLU
Prof. Dr. Hüseyin DURAL
Assoc. Prof. Dr. Osman TUGAY

The aim of the present study was to determine effects of salt stress on physiological and biochemical characteristics of endemic *Centaurea tuzgoluensis* Aytaç & H.Duman and *Centaurea lycaonica* Boiss. & Heldr. Physiological parameters, leaf relative water contents (RWC), photosynthetic efficiencies, ion concentrations, lipid peroxidation levels, hydroxyl ($OH^{\bullet}$) radical scavenging activities, proline contents and antioxidant systems [superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POX), ascorbate peroxidase (APX) and glutathione reductase (GR)] were investigated. The 60 days old *C. tuzgoluensis* and *C. lycaonica* seedlings were subjected to 0, 150 and 300 mM NaCl for 7 d and 14 d. The amounts of reduction in root-shoot length and wet-dry weight of *C. lycaonica* were more than *C. tuzgoluensis*. While relative shoot growth rate (RGR) of *C. lycaonica* is decreasing at 150 and 300 mM NaCl, RGR of *C. tuzgoluensis* is unchanged at concentration of 150 mM NaCl, but decreased at 300 mM NaCl for 7d and 14d. 150 and 300 mM NaCl reduced leaf relative water contents (RWC) of both species, the maximum reduction have been determined in *C. lycaonica*. Chlorophyll fluorescences were not affected by salt stress in both species. Na^{+} and Cl^{-} contents of shoots increased due to salt stress in both species, the highest increase have been determined in *C. lycaonica*. Although Ca^{+2} and K^{+} ion contents of *C. tuzgoluensis* unchanged or increased by salt stress, in *C. lycaonica* amount of these ions were decreased depending on salt stress for 7d and 14d. When malondialdehyde (MDA) contents of *C. tuzgoluensis* under salt stress at 150 and 300 mM NaCl were compared with the control group, significant differences have not been observed for 7d. But MDA levels of *C. lycaonica* under salt stress at 150 and 300 mM NaCl increased 49.6 % and 148.7 %, respectively. SOD, CAT, POX, APX and GR enzyme activities and their isoenzymes (especially Fe-SOD) of *C. tuzgoluensis* have increased. All enzyme activities except POX enzyme of *C. lycaonica* have decreased. While $OH^{\bullet}$ radical scavenging activity of *C. tuzgoluensis* increased depending on salt stress, scavenging activity of *C. lycaonica* decreased for 7d. Proline contents increased in both species depending on salt stress. All these results suggest that *C. tuzgoluensis* has different antioxidant metabolisms between short (7 d) and long-term (14 d) salt treatments and salinity tolerance of *C. tuzgoluensis* might be closely related to increased capacity of antioxidative system to scavenge reactive oxygen species (ROS) and accumulation of proline under salinity conditions.

Keywords: Antioxidant enzymes, *Centaurea lycaonica*, *Centaurea tuzgoluensis*, halophytes, ion exchange, lipid peroxidation, proline, salt stress.

ÖNSÖZ

Akademik yaşantım boyunca her zaman yanımda olan, engin bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, desteğini hiçbir zaman benden esirgemeyen, danışman hocam sayın Prof. Dr. Mustafa KÜÇÜKÖDÜK'e en içten teşekkürlerimi sunarım. Tez konumun belirlenmesinde, yürütülmesinde ve değerlendirilmesinde çok büyük yardımlarını gördüğüm, ikinci danışmanım sayın Prof. Dr. İsmail TÜRKAN hocama laboratuvarını bana açması ve beni İzmir ekibine dahil etmesinden dolayı teşekkürü bir borç bilirim. Çalışmamın her anında yanımda bulunan, bilgisi, deneyimi ile stres fizyolojisi alanında gelişmemde büyük emekleri olan, gece-gündüz demeden beraber çalıştığımız değerli hocam Yrd. Doç. Dr. A.Hediye SEKMEN-ESEN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmam boyunca her zaman yanımda olan ve beni yönlendiren değerli hocalarım sayın Prof. Dr. Hüseyin DURAL'a, Prof. Dr. Kuddisi ERTUĞRUL'a, tezde çalıştığım bitkilerin lokalitelerine beni götüren ve desteğini her zaman yanımda hissettiğim Doç. Dr. Osman TUGAY'a, *C. lycaonica*'nın deskripsiyonunun hazırlanmasında yardımlarını gördüğüm Doç. Dr. Tuna UYSAL'a ve tez izleme komitemde yer alan ve çalışmamdaki bazı yorumlarıyla katkıda bulunan Prof. Dr. Mehmet BABAOĞLU'na teşekkür ederim.

Çalışmalarım esnasında büyük yardımlarını gördüğüm Barış UZİLDAY'a, Ceyda ÖZFİDAN'a, Burcu SEÇKİN'e, Rengin ÖZGÜR'e ve tüm İzmir ekibine teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca değerli ağabeyim Mesut ESEN'e göstermiş olduğu sabır ve ilgiden dolayı teşekkür ederim. Maddi ve manevi her konuda çok büyük desteğini gördüğüm, büyük bir sabır ve özveri ile çalışmalarıma katkıda bulunan, değerli kardeşim Arş. Gör. Ahmet UYSAL'a teşekkürlerimi sunarım. Deneyimlerinden yararlandığım Yrd. Doç. Dr. Mehmet HAMURCU'ya, tezimin yazım aşamasında büyük katkıları bulunan Yrd. Doç. Dr. Haluk ÖZPARLAK'a, Arş. Gör. Erdoğan GÜNEŞ'e, Arş. Gör. Bayram ATASAGUN'a, yüksek lisans öğrencilerinden Nazife UYSAL'a, Ömer Faruk ÇOLAK'a, Betül KARA'ya, Meriç AKGÜN'e ve emeği geçen herkese teşekkürlerimi sunarım.

Beni bugünlere getiren, her zaman yanımda olan ve olmasını istediğim sevgili annem başta olmak üzere tüm aileme, bana göstermiş oldukları sabır ve destekten ötürü saygı ve sevgilerimi sunarım.

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde maddi destek sağlayan S.Ü. Bilimsel Araştırmalar Koordinatörlüğü'ne (BAP - 09101040 nolu proje) katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Evren YILDIZTUGAY

KONYA-2011

İÇİNDEKİLER

ÖZET……...iv

ABSTRACT……..v

ÖNSÖZ……..vi

İÇİNDEKİLER…….vii

SİMGELER VE KISALTMALAR……..…….....x

1. GİRİŞ 1

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....6

2.1. Tuz Stresinin Bitkiler Üzerine Zararlı Etkileri 7

2.2. Reaktif Oksijen Türlerinin Oluşumu..... 10
2.2.1. Süperoksit ($O_2^{\bullet -}$) radikali..... 12
2.2.2. Hidrojen peroksit (H_2O_2) 13
2.2.3. Hidroksil ($OH^{\bullet}$) radikali 13

2.3. Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) Üretim Yerleri 14
2.3.1. Kloroplastlarda ROS oluşumu 14
2.3.2. Mitokondrilerde ROS oluşumu..... 14
2.3.3. Peroksizomlarda ROS oluşumu 15
2.3.4. Bitkilerdeki diğer ROS üretim kaynakları 15

2.4. Reaktif Oksijen Türlerinin Lipid Peroksidasyonu Üzerine Etkileri 15

2.5. Tuz Tolerans Mekanizmaları..... 17
2.5.1. İyonların düzenlenmesi ve bölmelendirilmesi 17
2.5.2. Yapraklardaki tuz bezleri aracılığıyla tuzun uzaklaştırılması 18
2.5.3. Bitkilerin reaktif oksijen türlerinden korunmada antioksidan savunma mekanizmaları..... 20
2.5.3.1. Reaktif oksijen türlerine karşı enzimatik antioksidanlar..... 20
2.5.3.1.1. Süperoksit dismutaz (SOD; EC 1.15.1.1)..... 21
2.5.3.1.2. Katalaz (CAT: EC 1.11.1.6) 22
2.5.3.1.3. Peroksidaz (POX: EC 1.11.1.7) 23
2.5.3.1.4. Glutasyon peroksidaz (GPX: EC 1.11.1.9)..... 23
2.5.3.1.5. Askorbat peroksidaz (APX: EC 1.11.1.11)..... 24
2.5.3.1.6. Glutasyon redüktaz (GR: EC 1.6.4.2) 25
2.5.3.1.7. Monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR: EC 1.6.5.4)..... 25
2.5.3.1.8. Dehidroaskorbat redüktaz (DHAR: EC 1.8.5.1) 26
2.5.3.1.9. Glutasyon -S- transferaz (GST: EC 2.5.1.18) 26
2.5.3.2. Reaktif oksijen türlerine karşı enzimatik olmayan antioksidanlar..... 26
2.5.3.2.1. Askorbik asit (Vitamin C) 27
2.5.3.2.2. Glutasyon (GSH) 27
2.5.3.2.3. α-Tokoferoller (E Vitamini) 28
2.5.3.2.4. Karotenoidler..... 28
2.5.3.2.5. Flavonoidler..... 28
2.5.4. Ozmolitlerin sentezi 28
2.5.4.1. Karbonhidratlar 30
2.5.4.2. Polioller 30
2.5.4.3. Aminoasitler ve amidler 30

2.5.4.4. Kuaterner amonyum bileşikleri 32
2.5.4.5. Poliaminler 32

3. MATERYAL VE YÖNTEM 33

3.1. Bitki Materyallerinin Genel Özellikleri 33
3.1.1. *Centaurea tuzgoluensis* Aytaç & H. Duman 33
3.1.2. *Centaurea lycaonica* Boiss. & Heldr 36

3.2. Bitki Materyallerinin Yetiştirilmesi 38
3.2.1. Büyüme parametreleri 38
3.2.1.1. Bağıl sürgün büyüme oranı (RGR) 39
3.2.1.2. Yaprakların bağıl su içerikleri (RWC) 39
3.2.1.3. Yapraklardaki klorofil fluoresans ölçümleri 39
3.2.2. Bitki sürgünlerindeki iyon konsantrasyonlarının belirlenmesi 40
3.2.3. Protein miktarının belirlenmesi 40
3.2.4. Yapraklardaki lipid peroksidasyon seviyelerinin belirlenmesi 40
3.2.5. Yapraklardaki prolin miktarının belirlenmesi 41
3.2.6. Yaprakların hidroksil ($OH^{\bullet}$) radikali süpürülme aktivitelerinin belirlenmesi 41

3.3. Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi 42
3.3.1. Enzim ekstraktlarının hazırlanması 42
3.3.2. Süperoksit dismutaz (SOD; EC 1.15.1.1) aktivitesinin belirlenmesi 42
3.3.3. Katalaz (CAT; EC 1.11.1.6) aktivitesinin belirlenmesi 42
3.3.4. Peroksidaz (POX; EC 1.11.1.7) aktivitesinin belirlenmesi 43
3.3.5. Askorbat peroksidaz (APX; EC 1.11.1.11) aktivitesinin belirlenmesi 43
3.3.6. Glutasyon redüktaz (GR; EC 1.6.4.2) aktivitesinin belirlenmesi 43
3.3.7. İzozimlerin elektroforetik ayrımı 44
3.3.7.1. Süperoksit dismutaz (SOD) izozimlerinin elektroforetik ayrımı 44
3.3.7.2. Katalaz (CAT) izozimlerinin elektroforetik ayrımı 44
3.3.7.3. Peroksidaz (POX) izozimlerinin elektroforetik ayrımı 45
3.3.7.4. Askorbat peroksidaz (APX) izozimlerinin elektroforetik ayrımı 45

3.4. İstatistiksel Analizler 45

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA 46

4.1. Büyüme Parametreleri 46
4.1.1. Bitkilerin kök ve gövde uzunlukları 46
4.1.2. Bitkilerin kök yaş ve kuru ağırlıkları 52
4.1.3. Bitkilerin gövde yaş ve kuru ağırlıkları 54
4.1.4. Sürgün bağıl büyüme oranı (RGR) 57
4.1.5. Yaprakların bağıl su içerikleri (RWC) 59
4.1.6. Yapraklardaki klorofil fluoresans ölçümleri 60
4.2. Bitki Sürgünlerindeki İyon Konsantrasyonları 62
4.2.1. Yaprakların sodyum (Na^{+}) ve klor (Cl^{-}) içeriklerindeki değişiklikler 62
4.2.2. Yaprakların kalsiyum (Ca^{+2}) içeriklerindeki değişiklikler 64
4.2.3. Yaprakların potasyum (K^{+}) içeriklerindeki değişiklikler 65
4.3. Yapraklardaki Lipid Peroksidasyon Seviyeleri 66
4.4. Yapraklardaki Prolin Seviyeleri 68
4.5. Yaprakların Hidroksil ($OH^{\bullet}$) Radikali Süpürülme Aktiviteleri 69
4.6. Antioksidan Enzim Aktivite Sonuçları 71
4.6.1. Süperoksit dismutaz (SOD) aktivite sonuçları 71
4.6.2. Katalaz (CAT) aktivite sonuçları 78
4.6.3. Peroksidaz (POX) aktivite sonuçları 81
4.6.4. Askorbat peroksidaz aktivite (APX) sonuçları 85
4.6.5. Glutasyon redüktaz (GR) aktivite sonuçları 88

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....90

5.1. Sonuçlar..... 90

5.2. Öneriler..... 92

6. KAYNAKLAR.....93

7. ÖZGEÇMİŞ.....113

SİMGELER VE KISALTMALAR

Kısaltmalar

AA: Askorbik asit

APX: Askorbat peroksidaz

BSA: Bovin serum albümin

CAT: Katalaz

DW: Kuru ağırlık

EDTA: Etilendiamintetraasetikasit

GR: Glutasyon redüktaz

GSH: Glutasyon

GSSG: Okside glutasyon

H_2O_2: Hidrojen peroksit

K.A.: Kuru ağırlık

MDA: Malondialdehit

NADP: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat

NBT: Nitro blue tetrazolium

$O_2^{\bullet-}$: Süperoksit radikali

$OH^{\bullet}$: Hidroksil radikali

PAGE: Poliakrilamit jel elektroforezi

POX: Peroksidaz

PS: Fotosistem

RGR: Bağıl büyüme oranı

ROS: Reaktif oksijen türleri

RWC: Nisbi su içeriği

SOD: Süperoksit dismutaz

Y.A.: Yaş ağırlık

1. GİRİŞ

Stres, çevresel ve biyolojik faktörlerin, ayrı ayrı ya da birlikte, bitkilerin fizyolojik olaylarında belirgin değişimler meydana getirmesidir (Kadıoğlu, 1999). Hem doğal hem de yetiştirme koşulları altında bitkiler, sıkça strese maruz kalırlar. Bir bitkinin tümü veya bazı kısımları strese karşı dirençli olabilirken meristematik dokular ve genç fideler gibi bazı kısımları ise strese karşı duyarlıdır (Kocaçalışkan, 2008).

Stres genellikle, bitkinin yaşayabilirlik, verimlilik, büyüme ya da primer özümleme işlemlerine dayanılarak ölçülmektedir. Bu parametrelerin tümü bitkinin büyümesi ile ilişkilidir. Stres kavramı strese tolerans ile yakından ilişkilidir. Stres toleransı, bitkinin uygunsuz ortam koşulları ile başa çıkma potansiyelidir (Taiz ve Zeiger, 2008).

Bitkiler, yaşam döngüleri sırasında tuzluluk, kuraklık, düşük ve yüksek sıcaklık, yüksek ışık ve UV ışınları gibi çok sayıda abiyotik strese maruz kalırlar. Tuzluluk, bitkilerin büyümesini, gelişmesini ve üremesini sınırlayan en önemli çevresel etmenlerden birisidir (Allakhverdiev ve ark., 2000). Aşırı tuzluluk bitkilerde ölüme yol açabilir ya da verimliliklerini düşürebilir. Bitkilerin büyük bir bölümü ya tuzu hücrelerinden uzak tutan ya da hücredeki tuzu tolere eden mekanizmalar geliştirmişlerdir.

Toprak tuzlanmasına karşı kültür bitkilerinin çoğunluğunun duyarlı olmasından dolayı toprak tuzluluğu ürün verimliliğini sınırlandıran en önemli abiyotik stresler arasındadır (Hu, 2007). Toprak tuzlanması jeolojik yapıdan veya insan kaynaklı olabilir. Dünya genelinde tuzdan etkilenmiş alanların çoğunluğu yağışlarla kayalardaki sodyum klorür ve kalsiyum klorür gibi çözülebilir tuzların serbest kalması sonucunda oluşmaktadır (Rengasamy, 2002). Okyanuslar üzerinden gelen yağmur suları 6-50 mg/L NaCl içerir ve kıyılardan uzaklaştıkça tuz konsantrasyonu azalır. 10 mg/L NaCl içeren yağmur suları, her yıl 100 mm'lik yağışla 10 kg/h tuz bırakır (Munns ve Tester, 2008).

İnsan kaynaklı tuzlanan topraklar, çoğunlukla kurak ve yarı kurak alanlarda görülmekte olup, aşırı zirai sulamadan ve yer altı suyunun yükselmesinden kaynaklanır. Bu bölgelerde yıkanarak yer altı suyuna karışan çözünebilir tuzlar, yüksek taban suyu ile kapillarite yoluyla toprak yüzeyine çıkmakta ve buharlaşma sonucu suyun uçmasıyla toprak yüzeyinde birikmektedir. Bu durum zirai alanlardaki tuzluluk artışının temel nedenidir (Munns, 2002).

Toprak tuzluluğu dünya çapında sürekli artan bir sorundur ve dünyadaki toprakların yaklaşık % 7'sini (930 milyon hektar) tuzlu toprakların oluşturduğu tahmin edilmektedir (Szabolcs, 1994). Yaklaşık 230 milyon hektar sulanabilen alanın 1/3'ünde toprak tuzluluğundan dolayı ekim yapılamamaktadır (Oldeman ve ark., 1991; Ghassemi ve ark., 1995). Bu alanların % 15.57'si Afrika'da, % 5.07'si Avustralya'da, % 0.57'si Meksika ve Orta Amerika'da, % 1.8'i Kuzey Amerika'da, % 20.21'i Güney Amerika'da, % 26.7'si Kuzey ve Orta Asya'da, % 24.25'i Güney Asya'da ve % 5.82'si Güney Doğu Asya'da bulunmaktadır (Massoud, 1974). Bu alanlar üzerinde yayılış gösteren çok sayıda tür tespit edilmiştir. Bu türlerin tolerans durumları sadece türler arasında değil, tür içerisinde de büyük değişiklik göstermektedir. Monokotil kültür bitkileri arasında çeltik en hassas, ekmeklik buğday hoşgörülü, arpa ise en toleranslı türlerdendir. Dikotillerde tuza tolerans daha fazla çeşitlilik gösterir. Örneğin bazı baklagiller çeltikten daha duyarlıdır. Yonca nispeten tuza toleranslıdır ve bazı *Atriplex* türleri aşırı tuzlu topraklarda gelişebilir (Flowers ve ark., 1977).

Ülkemizdeki toprakların % 1.7'sinde (1518722 hektar) tuzluluk ve alkalilik (çoraklık) sorunu tespit edilmiştir. Bu tuzlu ve alkali alanların, 614617 hektarı hafif tuzlu, 504603 hektarı tuzlu, 8641 hektarı alkali, 125863 hektarı hafif tuzlu-alkali ve 264958 hektarı tuzlu-alkali topraklar şeklindedir (Sönmez, 2003).

Dünya üzerinde birçok kurak ve yarı kurak bölgedeki zirai verim, sulama suyunun artan tuzluluğu ve tarım toprakların yavaş yavaş gelişen tuzluluğu nedeniyle azalmaktadır. Bu problem deniz kıyısına yakın alanlarda, deniz suyunun yer altı sızıntısıyla iç karadaki tatlı su kaynaklarının tuzlanmasına neden olduğu düşük rakımlı bölgelerde de mevcuttur. Bu bölgelerde her yıl yaklaşık 10 milyon hektara yakın verimli tarımsal arazi, toprak tuzluluğundan dolayı kaybedilmektedir (Ashraf, 1994; Szabolcs, 1994). Ülkemizde de var olan bu problem son yıllarda tarımsal üretimi kısıtlayan önemli bir çevresel faktör haline gelmiştir. Her yıl giderek büyüyen verim kayıplarına neden olan toprak tuzluluğundaki bu artış, ülkemiz için ciddi anlamda dikkate alınması ve üzerinde çalışılması gereken öncelikli konulardan birisidir.

Bitkiler tuzlu çevrelerde gelişme ve hayatta kalma yeteneklerine göre halofitler ve glikofitler olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Yüksek tuz konsantrasyonuna sahip topraklar üzerinde yaşamlarını sürdürebilen bitkilere halofitler adı verilir. 200 mM'ın altındaki tuz konsantrasyonunda zarar gören bitkilere ise glikofitler denir. Glikofitler 100-200 mM NaCl stresi altında bile ölürken, halofitler 300 mM NaCl'den daha yüksek

konsantrasyondaki tuzlulukta bile yaşayabilirler (Zhu, 2007). Halofit olmayan bazı bitkiler de 200 mM NaCl konsantrasyonunda büyümeye devam edebilir. Bu bitkiler tuza toleranslı olarak kabul edilirler.

Tuzluluk, türlerin dağılışını ve yaşamını etkileyen en önemli çevresel faktörlerden biridir (Shannon, 1985). Toprak tuzluluğundaki artışa karşı, ekonomik öneme sahip birçok kültür bitkisi (domates, fasulye, patlıcan vb.) artan tuz konsantrasyonuna dayanıksızdır. Tuz stresi toprağın gözeneklerini azaltıp hidroelektrik iletkenliğini bozarak toprağın fiziksel yapısını bozmakta, toprakta düşük su potansiyeli yaratarak bitkinin besin, su ve mineral alınımını güçleştirmekte, neden olduğu iyon toksisitesiyle de bitkilerde metabolik bozukluklara yol açarak bitkinin büyüme ve gelişmesini baskılamaktadır. Ayrıca tuz stresi, proteinlere, lipidlere ve nükleik asitlere saldıran reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşmasına da neden olmaktadır (Mittler, 2002).

Tuz stresi, artan solunum oranı, iyon toksisitesi, bitki büyümesindeki değişimler, mineral bozukluklar, kalsiyum iyonlarının yerine sodyum iyonlarının geçmesiyle sonuçlanan membran kararsızlığı, membran geçirgenliği ve azalan fotosentez etkinliği gibi fizyolojik işlevleri etkilemektedir (Yıldız ve ark., 2010). Diğer taraftan, tuzluluk azot ve karbon metabolizmasını da olumsuz etkilemektedir (Mansour, 2000). Tüm bu olumsuz etkilere rağmen birçok bitki türünün tuzluluğa karşı direnci sağlayan, genetik bir mekanizmaya sahip olduğu bilinmektedir. Bu nedenle bugün bütün bitki yetiştiricileri, yüksek tuz konsantrasyonlarına genetik olarak adapte olabilen, daha iyi çeşitleri seçmeye ve ortaya çıkarmaya çalışmaktadırlar. Tüm bu çalışmalar, özellikle tuzluluk sorunu olan arazilerin ıslah edilmesinde ve bunlardan ürün eldesi açısından önem taşımaktadır. Bunun için de bitkilerin toprak tuzluluğuna karşı gösterdikleri morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal adaptasyon mekanizmalarının anlaşılması, tuzluluğa toleranslı türlerin geliştirilmesi açısından büyük önem taşımaktadır.

Fizyolojik ve biyokimyasal çalışmalar bitkilerdeki tuz toleransının; iyonların bölmelendirilmesi (Blits ve Gallagher, 1990), ozmolit üretimi (Lutts ve ark., 2004), çimlenme tepkileri (Poljakoff-Mayber ve ark., 1994), ozmotik adaptasyon (Lutts, 2000), sukkulensi (Naidoo ve Rughunanan, 1990), seçici taşıma ve iyonların alımı (Lutts ve ark., 1995), enzim tepkileri (Greenway, 1972), tuz salgılama ve genetik kontrol (Flowers, 2004) gibi bir dizi fizyolojik adaptasyon mekanizmalarına bağlı olduğunu göstermektedir.

Bitkilerde tuz stresi sonucunda ROS'lar meydana gelir. Hücrelerde biriken ROS'lar proteinlerin, klorofillerin, lipidlerin, nükleik asitlerin ve karbonhidratlar gibi maddelerin oksidasyonuna neden olmaktadır. Bitkiler, meydana gelen ROS'ları süpürmek için enzimatik ve enzimatik olmayan savunma sistemlerine sahiptir. Enzimatik savunma sistemi, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), askorbat peroksidaz (APX), glutasyon redüktaz (GR), monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR), dehidroaskorbat redüktaz (DHAR), glutasyon peroksidaz (GPX), guaikol peroksidaz (GOPX) ve glutasyon - S - transferaz (GST) enzimleri aracılığıyla sağlanmaktadır. Enzimatik olmayan savunma sistemi ise askorbik asit (AA), glutasyon (GSH), fenolik bileşikler, alkoloidler, aminoasitler ve α-tokoferollerle sağlanmaktadır (Parvaiz ve ark., 2010).

Centaurea L. cinsi dünya üzerinde 400-700 türle temsil edilmektedir (Greuter ve ark., 2001). *Centaurea* L. cinsi, Türkiye florasında, tür sayısı bakımından en fazla tür içeren *Astragalus* L. ve *Verbascum* L. cinslerinin ardından 3. sırada yer almaktadır (Davis ve ark., 1988). Ülkemiz, *Centaurea* L. cinsinin en önemli gen kaynaklarından birisidir (Wagenitz, 1986). Bu cinsin ülkemizdeki toplam tür sayısı 166 olup 199 adet taksona sahiptir. Cinsin endemik tür sayısı 129 ve endemizm oranı ise % 65'tir (Aslan ve ark., 2010).

Centaurea L. türleri halk arasında peygamber çiçeği, zerdali dikeni, çoban kaldıran, timur dikeni ve gökbaş (Baytop, 1999; David, 1997; Wagenitz, 1975) olarak bilinmekte olup tek başına veya diğer bitkilerle birlikte antidiyabetik, antiromatizmal, ishal önleyici, iltihap giderici, safra söktürücü, safra artırıcı, sindirim kolaylaştırıcı, mide kuvvetlendirici, idrar söktürücü, adet söktürücü, doku sıkılaştırıcı, tansiyon düşürücü, ateş düşürücü ve antibakteriyel amaçlarla kullanılmaktadır (Barrero ve ark.,1997). Ayrıca *Centaurea gigantea* Sch.Bip. ex Boiss. türünün kolon kanserine karşı ilaç yapımında ham madde olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Shoeb ve ark., 2007).

Ülkemizde *Centaurea* L. türleri genellikle taşlı-kalkerli kayalıklarda, yol kenarlarında, deniz kıyılarında, jipsli alanlarda, orman açıklıklarında, step alanlarda, nadas alanlarında, makilik bölgelerde, kumlu plajlarda, orman içlerinde, kuru çayırlıklarda ve kayalık yamaçlarda yayılış göstermektedir. *C. tuzgoluensis* gibi birkaç *Centaurea* türü ise aşırı tuzlu step alanlarda da yetişmektedir.

Bu tez çalışmasındaki amaç; biri Tuz Gölü'nün güneyindeki Eskil (Aksaray) çevresinden, diğeri Konya-Seydişehir yolunun 54. km'de yayılış gösteren, tuz stresine

dayanıklılığı ve duyarlılığı ile tuza adaptasyon mekanizmaları hakkında hiçbir araştırmaya konu olmamış olan *Centaurea tuzgoluensis* Aytaç & H.Duman ve *Centaurea lycaonica* Boiss. & Heldr.'nın nisbi tuz toleranslarındaki farklılığı, fizyolojik ve biyokimyasal düzeyde karşılaştırmaktır. Her iki türün tuz toleranslarında, antioksidan sistemin rolünün aydınlatılması için SOD, CAT, POX, APX ve GR gibi antioksidan enzim ve izozim (SOD, CAT, POX ve APX) aktiviteleri ile oksidatif zararın belirteci olan lipid peroksidasyonu araştırılmıştır. Bitkilerin $OH^{\bullet}$ (hidroksil) radikali süpürülme oranları tespit edilmiştir. Stres faktörlerine bağlı olarak sentezi artan prolin miktarı, bağıl su içeriği (RWC), klorofil fluoresansları ve büyüme parametreleri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Bitkiler yüksek yoğunluktaki tuza gösterdikleri toleransa göre halofitler ve glikofitler şeklinde ikiye ayrılırlar. Halofitler tuzlu toprakların doğal bitkileridir ve yaşam döngülerini bu çevrede tamamlamaktadırlar. Halofitlerin büyük bir çoğunluğu, topraktaki tuz oranının % 2-6 olduğu alanlarda başarılı bir şekilde gelişebilir ve hatta bazıları % 20 tuz oranına bile dayanabilirler (Strogonov, 1964). Glikofitler, tuzsuz topraklarda başarı ile gelişebilen ve tuzlu alanlarda yaşamlarını sürdüremeyen bitkilerdir. Bu bitkiler topraktaki tuz oranının % 0.01 oranından yüksek olduğu topraklarda, ya sınırlı bir gelişim gösterir ya da ölürler. Glikofit bitkiler, bünyelerine tuz alımını sınırlandırırlar ve prolin, glisinbetain, çözünür şekerler gibi uyumlu çözünenlerin senteziyle ozmotik basınçlarını ayarlarlar (Greenway ve Munns, 1980). Halofitler sitoplazmadaki toksik iyonları, enerjili taşıma ile vakuollerinde bölmelendirerek tuzlu şartlarda gelişip yaşamlarını devam ettirebilirler. Bazı halofitler Na^+ ve Cl^- iyonlarını, salgı bezleri ve keseler yardımıyla dışarı bırakırlar (Hasegawa ve ark., 2000; Yeo, 1998). Hem halofitlerin hem de glikofitlerin ozmotik düzenlemeleri, sitoplazmada ve organellerin lümen, matriks ve stromalarında organik çözünenlerin birikimi ile gerçekleştirilir. Halofitik bitkiler tuzları vakuollerinde depolayarak sitoplazmadaki tuz konsantrasyonlarını kontrol ederler ve hücrelerinde yüksek K^+/Na^+ oranını devam ettirirler (Glenn ve ark., 1999). Hem halofitik hem de glikofitik türlerin tuz stresine tolerans seviyeleri, duyarlı, ılımlı toleranslı ve çok toleranslı şeklinde sınıflandırılabilir (Waisel, 1972; Flowers ve ark., 1977; Greenway ve Munns, 1980). Glikofitler 100-200 mM NaCl içeren topraklarda yetiştirildiklerinde büyümeleri şiddetle engellenip ölürken, halofitler 300 mM NaCl'den daha yüksek konsantrasyondaki tuzlulukta bile yaşayabilirler (Zhu, 2007). *Suaeda maritima* (L.) Dumort., 200 mM tuzlulukta optimum gelişme göstermekte ve 1000 mM tuzluluğa kadar kök bölgesi tuzu tolere edebilmektedir (Clipson ve ark., 1985). *Salicornia europaea* L. türüne ait bitkiler, 1020 mM NaCl'de bile yaşamlarını devam ettirebilirken, *Atriplex vesicaria* Heward ex Benth., 700 mM NaCl'de bile yüksek verimlilik gösterebilir (Zhu, 2007). Buna karşılık kültür bitkilerinin büyük bir çoğunluğu tuzu tolere edememektedir. Kültür bitkileri arasında soğan, limon, marul ve fasulye tuza çok duyarlı, pamuk ve mısır orta derecede toleranslı, şeker pancarı ve palmiyeler çok toleranslıdır (Greenway ve Munns, 1980). Fasulye verimi, 50 mM tuzlulukta tamamıyla engellenmektedir (Maas ve Grieve, 1987).

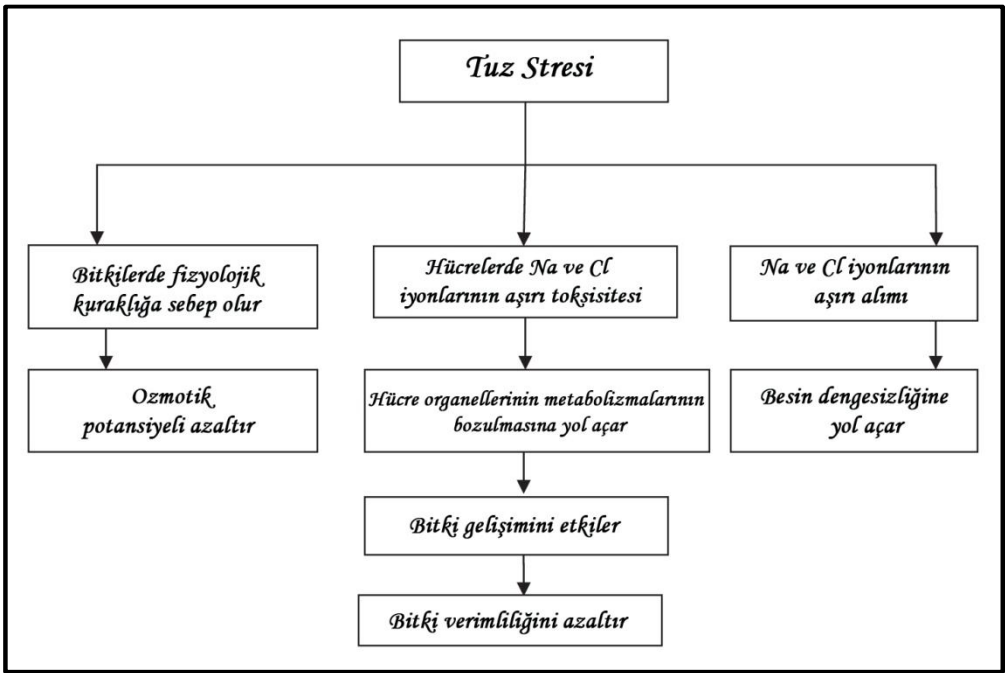
2.1. Tuz Stresinin Bitkiler Üzerine Zararlı Etkileri

Bitki gelişimi üzerine tuzun zararlı etkileri iyon sitotoksisitesinden (başlıca Na^+, Cl^- ve SO_4^- iyonlarından dolayı) ve ozmotik stresten kaynaklanır. Tuzlu şartlar altında iyon toksisitesi, ozmotik stres ve besin yetersizliği tarafından ortaya çıkan metabolik düzensizlikler, oksidatif strese neden olabilir (Zhu, 2002).

Stres şartları süresince bitki gelişimindeki duraklama, stres şiddetine bağlıdır. Hafif bir ozmotik streste kökler uzamaya devam ederken, gövde ve yaprakların gelişimi hızlı bir şekilde inhibe edilir (Westgate ve Boyer, 1985; Sharp ve ark., 1988; Nonami ve Boyer, 1990).

Düşük ozmotik potansiyele sahip bitki köklerinin çevresindeki çözünmüş maddeler, toprağın su potansiyelini düşürür. Bu durum bitkilerin genel su durumunu etkileyerek ozmotik strese neden olur. Ozmotik stres, sodyum iyonlarının direkt bir etkisi olmaksızın su eksikliğinden kaynaklanmaktadır (Munns, 2002). İyonik dengesizlik, aşırı miktarda Na^+ ve Cl^- birikiminden kaynaklanmakta ve K^+, Ca^{+2}, Mn^{+2} ve NO_3^- gibi besin elementlerinin alımı azalmaktadır (Hasegawa ve ark., 2000). Hücreler arası Na^+ birikimi metabolizma için toksiktir ve toprakta aşırı Na^+ birikimi birçok duyarlı bitki için büyüme inhibisyonunda önemli rol oynamaktadır (Mengel ve Kirkby, 2001). Na^+, sitoplazmada biriktiğinde birçok enzimi inhibe etmektedir. Bu etkiler, toksik ROS'ların üretimi ile ilişkili olan oksidatif stres ve beslenme dengesizliği, hücre metabolizması üzerine tuzların ve iyonların inhibitör etkileri ve ters ozmotik gradientlerin bir kombinasyonundan kaynaklanmaktadır (Sharma ve ark., 1997).

Tuz stresi; artan solunum oranı, iyon toksisitesi, bitki büyümesindeki değişimler, mineral bozukluklar, kalsiyum iyonlarının yerine sodyum iyonlarının geçmesiyle sonuçlanan membran kararsızlığı (Marschner, 1986), membran geçirgenliği (Gupta ve ark., 2002) ve azalan fotosentez etkinliği (Hasegawa ve ark., 2000; Munns, 2002) gibi fizyolojik işlevleri etkilemektedir. Diğer taraftan tuzluluk, azot (Mansour, 2000) ve karbon metabolizmasını da (Balibrea ve ark., 2000) olumsuz etkilemektedir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Tuz stresinin bitkiler üzerine etkileri (Evelin ve ark., 2009)

Tuz stresi bitkilerde fotosentez etkinliğinde azalmaya neden olmakta ve bitki yapraklarında klorofil içeriğini olumsuz yönde etkilemektedir (Sayed, 2003). Tuzluluğun artışına bağlı olarak fotosentezdeki azalma;

a. hücre içi CO_2 basıncının azalmasına neden olan stoma kapanması (Sibole ve ark., 1998),

b. protein konsantrasyonundaki azalma (Sibole ve ark., 1998),

c. fotosentetik pigmentlerin miktarındaki azalma (Sultana ve ark., 1999),

d. iyon konsantrasyonlarındaki değişimler (Khan ve Ungar, 1997) ile ilişkilidir.

Bitkilerin yaprak dokusundaki toplam klorofil ve karotenoid içeriği tuz stresi altında genellikle azalmaktadır (Agastian ve ark., 2000). Klorofil içeriğindeki azalma tuzun membran kararlılığı üzerine olumsuz etkilerinden kaynaklanmaktadır (Ashraf ve Bhatti, 2000).

Bitkiler uzun süre tuz stresine maruz kaldıklarında, karbon asimilasyonundaki azalma, yapraklardaki aşırı tuz birikiminden kaynaklanmaktadır (Munns ve Termatt, 1986). Tuz stresi altında bitki dokularında artan Na^+ konsantrasyonunun oksidatif strese ve dolayısıyla kloroplast yapısının bozulmasına neden olduğu bildirilmiştir (Parida ve Das, 2005).

Fotosentetik aktivite, yapraklardaki su potansiyelinin azalmasıyla inhibe olmaktadır (Iyengar ve Reddy, 1996). Düşük su potansiyeli altında fruktoz–1,6–bifosfat

substratının stromal seviyesi artmakta ve fruktoz–1,6–bifosfataz ürünü olan fruktoz–6–fosfat azalmakta ve böylelikle fruktoz–1,6–bifosfataz fotosentezi sınırlayacak seviyeye gelmektedir (Heuer, 1996). Diğer taraftan, fotosentetik aktivitede azalma, toplam tuz konsantrasyonu ve iyonik kompozisyona bağlıdır. Yüksek tuz konsantrasyonuna bağlı olarak su potansiyelindeki azalma, geri dönüşümlü olarak fotosentetik elektron taşınımını bozan ozmotik strese neden olmaktadır (Allakhverdiev ve ark., 2000). Yüksek tuz koşulları altında ozmotik potansiyeldeki artış, Na^+ iyonlarının sitoplazmada birikmesine ve hem fotosentetik hem de solunumdaki elektron taşınımının sekteye uğramasına neden olmaktadır (Allakhverdiev ve ark., 1999). Fotosentetik hızda azalma, karbon indirgeme reaksiyonları için CO_2'in kullanılabilirliğini sınırlayan, stoma iletkenliğinde bir azalmaya neden olmaktadır (Brugnoli ve Bjorkman, 1992). Stomaların kapanması transpirasyonla suyun kaybını minimuma indirmekte ve kloroplast aktivitesinde değişime neden olan kloroplastın ışık toplayan ve enerjiyi koruyan sistemlerini etkilemektedir (Iyengar ve Reddy, 1996).

Tuz stresine karşı gövde büyümesi, kök büyümesinden daha duyarlıdır. Kök büyümesi ile bağlantılı olarak yaprak alanı gelişimindeki azalma, bitkilerce kullanılan su miktarını azaltır. Bu nedenle toprak nemi korunur ve toprak tuz konsantrasyonundaki artış engellenir (Sekmen, 2009).

Tuz, yaşlı yapraklarda toksik konsantrasyonlarda biriktiğinde tuzluluğa bağlı spesifik iyon toksisitesi başlar ve bitki ölür. Ölüm oranı yeni üretilmiş yaprak oranından büyükse, bitkilerin fotosentez kapasitesi genç yaprakların karbonhidrat kaynaklarını uzun süre karşılayamaz.

Aşırı tuzlu bir alandaki yüksek NaCl, bitkilerdeki iyon dengesini bozar. Na^+ iyonları, hücre içine K^+ iyonlarının alımına negatif yönde etki eder ve hücrelerdeki bu besin elementinin girişi azalır (Niu ve ark., 1995). K^+/Na^+ oranının yükselişi, bitkilerde Na^+ miktarının düşük tutulmasından daha önemlidir (Amtmann ve Sanders, 1999; Cuin ve ark., 2003). Yüksek Na^+/K^+ oranı sitoplazmadaki çeşitli enzimatik süreçleri bozabilmektedir. Protein sentezi, K^+ miktarının yüksek olmasını gerektirir; çünkü tRNA'nın ribozomlara bağlanması aşamasında K^+ gereklidir. Ayrıca K^+, hücre turgorunun ve zar potansiyelinin sürdürülmesinde kritik bir rol oynamaktadır (Sekmen, 2009).

Yüksek NaCl, sitoplazmada Ca^{+2} iyonlarının birikimine neden olur ve bu da bir sinyal molekülü olarak kullanılır (Niu ve ark., 1995). Ca^{+2}, bitkiyi tuz stresinin ozmotik

etkisinden çok, Na^+ iyonlarının toksik etkisinden korumaktadır. Tuz stresi sırasında dışarıdan ortama verilen Ca^{+2}, hücre çeperlerine Na^+'un bağlanmasını azaltırken, K^+ alınımı ve taşınımını artırır.

Tuzluluk bitkilerde anatomik değişikliklere de sebep olmaktadır. Tuzlu şartlarda gelişen bitkilerde; yaprak genişliği (Hu ve ark., 2000), yaprak kalınlığı (Yeo ve ark., 1991), yaprak uzunluğu (Munns, 2000), epiderma hücre sayısı (Martins ve Castro, 1999), epiderma hücre genişliği (Curtis ve Lauchli, 1987), stoma sayısı (Flowers ve ark., 1986) ve stoma indeksi (Bray ve Reid, 2002) azalmaktadır.

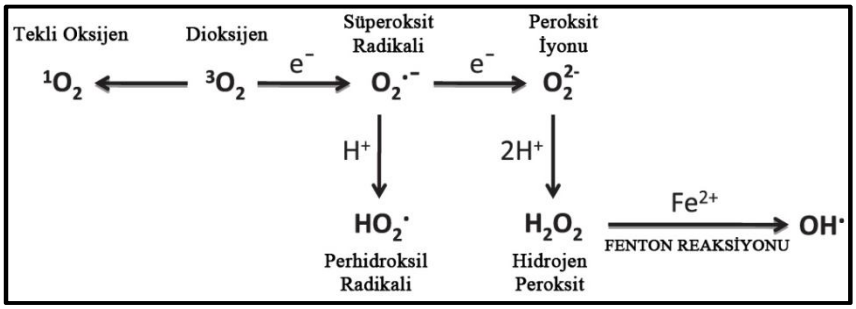
2.2. Reaktif Oksijen Türlerinin Oluşumu

Serbest radikal, atomik ya da moleküler yapılarda eşlenmemiş bir veya daha fazla tek elektron taşıyan moleküllere verilen isimdir. Başka moleküller ile çok kolayca elektron alışverişine giren bu moleküllere, reaktif oksijen türleri (ROS) veya oksidan moleküller de denilmektedir.

Bitkilerde çevresel stresler sonucunda ROS'lar meydana gelir. Biyotik ve abiyotik stresler altında üretilen ROS'lar, hücrelere zarar veren etmenlerin ana sebebidir (Joseph ve Jini, 2010). Hücrelerde biriken ROS'lar proteinlerin, klorofillerin, lipidlerin, nükleik asitlerin, karbonhidratlar gibi maddelerin oksidasyonuna neden olmaktadır (Parvaiz ve ark., 2010).

Normal şartlar altında ROS'lar, bitki hücrelerinde metabolizma yan ürünü olarak üretilirler (Çizelge 2.1). Ancak bunların miktarları çok azdır ve çeşitli ROS temizleme mekanizmaları ile zararlı etkileri ortadan kaldırılır. ROS üretimi ve temizlenmesi arasındaki denge; tuzluluk, UV radyasyonu, kuraklık, ağır metal, ekstrem sıcaklık, besin yetersizliği, hava kirliliği, herbisitler ve patojen saldırıları gibi çeşitli biyotik ve abiyotik stresler ile bozulabilir (Gill ve Tuteja, 2010). Hücrenin çeşitli elemanlarına zarar vermelerinin yanında ROS'lar, strese yanıt verilmesini sağlayan ve sinyal iletim yolunda ikincil mesajcı olarak da iş görebilmektedirler (Ashraf, 2009).

Moleküler oksijenin indirgenmesi, süperoksit ($O_2^{\bullet -}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali ($OH^{\bullet}$) gibi ROS'ları oluşturur. Yüklenmiş elektron ile oksijenin reaksiyona girmesi sonucu oluşan tekli (singled) oksijen de ($^1O_2$), potansiyel ROS'lardan biri olarak kabul edilmektedir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Enerji transferi aracılığıyla ROS'ların üretimi (Gill ve Tuteja, 2010)

Çizelge 2.1. Bitkilerdeki ROS'ların üretim, süpürülme ve kaçınma mekanizmaları (Mittler, 2002)

Mekanizma	Üretim Yeri	ROS'lar
Üretim		
Fotosentetik ET ve PSI veya PSII	Kloroplast	$O_2^{\cdot -}$
Solunum ET	Mitokondri	$O_2^{\cdot -}$
Glikolat oksidaz	Peroksizom	H_2O_2
Uyarılmış klorofil	Kloroplast	$^1O_2$
NADPH oksidaz	Plazma membranı	$O_2^{\cdot -}$
Yağ Asidi β-oksidasyonu	Peroksizom	H_2O_2
Okzalat oksidaz	Apoplast	H_2O_2
Ksantin oksidaz	Peroksizom	$O_2^{\cdot -}$
Peroksidazlar, Mn^{+2} ve NADH	Hücre duvarı	H_2O_2, $O_2^{\cdot -}$
Amin oksidaz	Apoplast	H_2O_2
Süpürülme		
Süperoksit dismutaz	Kloroplast, Sitosol, Mitokondri, Peroksizom, Apoplast	$O_2^{\cdot -}$
Askorbat peroksidaz	Kloroplast, Sitosol, Mitokondri, Peroksizom, Apoplast	H_2O_2
Katalaz	Peroksizom	H_2O_2
Glutasyon peroksidaz	Sitosol	H_2O_2, ROOH
Peroksidazlar	Hücre duvarı, Sitosol, Vakuol	H_2O_2
Tioredoksin peroksidaz	Kloroplast, Sitosol, Mitokondri	H_2O_2
Askorbik asit	Kloroplast, Sitosol, Mitokondri, Peroksizom, Apoplast	H_2O_2, $O_2^{\cdot -}$
Glutasyon	Kloroplast, Sitosol, Mitokondri, Peroksizom, Apoplast	H_2O_2
α-Tokoferol	Membranlar	ROOH, $^1O_2$
Karotenoidler	Kloroplast	$^1O_2$
Kaçınma		
Anatomik adaptasyonlar	Yaprak yüzeyi, epiderma	$O_2^{\cdot -}$, H_2O_2, $^1O_2$
C_4 veya CAM metabolizması	Kloroplast, Sitosol, Vakuol	$O_2^{\cdot -}$, H_2O_2
Kloroplast hareketi	Sitosol	$O_2^{\cdot -}$, H_2O_2, $^1O_2$
Fotosentezin baskılanması	Kloroplast	$O_2^{\cdot -}$, H_2O_2
Fotosistem	Kloroplast	$O_2^{\cdot -}$, $^1O_2$
Alternatif oksidazlar	Kloroplast, Mitokondri	$O_2^{\cdot -}$

2.2.1. Süperoksit ($O_2^{\bullet-}$) radikali

$O_2^{\bullet-}$ radikali, tüm aerobik hücrelerde moleküler oksijenin (O_2) bir elektron alarak indirgenmesi sonucu oluşur. $O_2^{\bullet-}$, doğrudan zarar verici bir özelliğe sahip değildir. Bu radikal anyonun asıl önemi, H_2O_2 kaynağı ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır. $O_2^{\bullet-}$ ile perhidroksil radikali birbirleriyle reaksiyona girince biri okside olurken diğeri indirgenir. Bu ters değişim (dismutasyon) reaksiyonunda O_2 ve H_2O_2 meydana gelir (Parvaiz ve ark., 2010).

$O_2^{\bullet-}$ radikallerinin en önemli üretim yerlerinden birisi, kloroplastların tilakoid membranlarındaki fotosistem I (PSI)'in elektron alıcılarıdır. ROS ürünleri, oksijenli solunumun kaçınılmaz sonuçlarından birisidir. Terminal oksidazlar, sitokrom c oksidaz ve alternatif oksidazlar O_2 ile reaksiyona girdiklerinde dört elektron transfer edilir ve su açığa çıkar. Ancak bazen O_2, diğer elektron taşıma sistemi (ETS) bileşikleriyle reaksiyona girebilir. Bu durumda sadece bir elektron transfer edilir ve sonuçta $O_2^{\bullet-}$ oluşur. $O_2^{\bullet-}$'in yarılanma ömrü 2-4 μs'dir. $O_2^{\bullet-}$, genellikle ilk üretilen ROS'tur. Bitki dokularındaki % 1-2'lik O_2 tüketimi, $O_2^{\bullet-}$ üretilmesine neden olur (Puntarulo ve ark., 1988). $O_2^{\bullet-}$ radikalleri, kloroplast ETS'lerinin devirsiz yollarındaki elektron transferi süresince ve diğer hücre organellerindeki O_2'nin indirgenmesiyle oluşturulur. O_2'nin $O_2^{\bullet-}$'e indirgenmesi, PSI seviyelerindeki ETS'de meydana gelebilir. $O_2^{\bullet-}$ üretimi, $OH^{\bullet}$ ve $^1O_2$ gibi ROS'ların daha fazla üretilmesini tetikler ve bu radikaller membran lipidlerinin peroksidasyonuna ve hücresel zararlara sebep olur (Elstner, 1987). $O_2^{\bullet-}$, güçlü bir oksitleyici ajan olan $HO_2^{\bullet}$'e bir proton verir ve bu $HO_2^{\bullet}$, aşırı doymamış yağ asitlerine (PUFA) saldırır (Elstner, 1987). $O_2^{\bullet-}$ radikalleri; polifenollerin, tokoferollerin, askorbatın ve tiollerin oksidasyonuna neden olur (Fridovich, 1989). Bunlara ek olarak katalaz (Kono ve Fridovich, 1983), peroksidaz ve dihidroksiasit dehidrataz gibi enzimlerin (Kuo ve ark., 1987) aktifleşmesini de engeller.

$O_2^{\bullet-}$, mitokondrinin I. ve III. komplekslerinde bir yan ürün olarak üretilir. $O_2^{\bullet-}$ ve H_2O_2 metabolizma sırasında üretilir. İlk olarak plazma membranlarındaki NADPH oksidaz tarafından üretilir ve birkaç metabolik süreçte önemli bir role sahiptir (Torres ve Dangl, 2005).

2.2.2. Hidrojen peroksit (H_2O_2)

H_2O_2, süperoksitin çevresindeki moleküllerden bir elektron alması veya moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması sonucu oluşan peroksitin iki proton (H^+) ile birleşmesi sonucu meydana gelir. Biyolojik sistemlerde H_2O_2'in asıl üretimi, $O_2^{\bullet-}$ ters değişimi ile gerçekleşir. İki $O_2^{\bullet-}$ molekülü, süperoksitin ters değişim reaksiyonunda iki proton alarak H_2O_2 ve O_2 oluştururlar. H_2O_2, bir serbest radikal olmadığı halde ROS kapsamına girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Çünkü H_2O_2, Fe^{+2} veya diğer geçiş metallerinin varlığında, Fenton reaksiyonu sonucu oluşan $O_2^{\bullet-}$ varlığında, Haber-Weiss reaksiyonu sonucu, en reaktif ve zarar verici ROS olan hidroksil radikalini ($OH^{\bullet}$) oluşturur (Parvaiz ve ark., 2010).

Normal büyüme koşulları altında kloroplastlardaki H_2O_2 oranı 0.5 µM olduğu, tuzluluk gibi stres koşulları altında, H_2O_2'in 15 µM'a yükseldiği rapor edilmiştir (Dat ve ark., 2000; Polle, 2001). H_2O_2'in kloroplastlardaki konsantrasyonu 10 µM'a çıktığında, fotosentezde yaklaşık % 50 azalma meydana gelmektedir (Kaiser, 1979).

ROS'lar, kloroplast, mitokondri ve peroksizom gibi çeşitli organellerde üretilirler. ROS üretimi, metabolik olaylar sırasında her yerde mevcut olup bitkiler onlarla başa çıkabilir. Ancak ROS üretimi belirgin şekilde artarsa hücrede önemli hasarlar oluşturabilir (Mittler, 2002; Sairam ve Srivastava, 2002).

2.2.3. Hidroksil ($OH^{\bullet}$) radikali

Hidroksil radikali ($OH^{\bullet}$), Fenton reaksiyonu ve Haber-Weiss reaksiyonu sonucu H_2O_2'ten oluşmaktadır. Ayrıca bitkilerde radyasyonlar, $OH^{\bullet}$ radikallerinin üreticileri olarak bilinir. Yüksek enerjili radyasyonlar (X-ray veya gama ışınları) hücre özsuyundaki suyun kovalent bağlarını kırarlar (Harber ve Weiss, 1934).

$$O_2^{\bullet-} + H_2O_2 \xrightarrow{\text{Cu ve/veya Fe}} O_2^{\bullet-} + OH^- + OH^{\bullet}$$

$OH^{\bullet}$ radikali son derece reaktif bir oksidan radikaldir, yarılanma ömrü çok kısadır. 10^{-9} saniyeden daha kısa bir ömre sahiptir. $OH^{\bullet}$ radikali büyük bir olasılıkla ROS'ların en güçlüsüdür. Reaktif olması nedeniyle $OH^{\bullet}$ radikalleri, lipid peroksidasyonuna, DNA mutasyonuna ve aminoasitlerin okside edilmesiyle proteinlerin bozulmasına neden olmaktadır (Vaidyanathan ve ark., 2003).

2.3. Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) Üretim Yerleri

2.3.1. Kloroplastlarda ROS oluşumu

Klorofil, PSI ve PSII'deki elektron taşıma sistemi (ETS) gibi ROS üretim yerlerini bünyesinde bulundurmasından dolayı kloroplastlar, en önemli ROS ($O_2^{\bullet-}$, $^1O_2$ ve H_2O_2) üretim merkezlerinden birisidir. Tuz stresi, aşırı ışık, kuraklık ve CO_2 oranının düşük olduğu şartlarda kloroplastlardaki ROS üretimi artar.

Normalde fotosistem merkezlerinden uyarılmış elektronlar, ferrodoksin üzerinden $NADP^+$'ye taşınırlar. ETS'ne aşırı yüklenildiği durumlarda elektronlardan bazıları geri dönerek ferrodoksinden O_2 molekülüne geçerler ve Mehler reaksiyonu aracılığıyla $O_2^{\bullet-}$ radikalleri üretilir (Elstner, 1991). Tekli oksijen fotosentezin bir yan ürünü olarak düşük ışık şiddeti altında PSII'den üretilirler (Buchert ve Forreiter, 2010). $O_2^{\bullet-}$ radikalleri, stroma membran yüzeylerinde Cu/Zn-SOD aracılığıyla ters değişime uğrayarak H_2O_2'e dönüşürler (Buchert ve Forreiter, 2010).

2.3.2. Mitokondrilerde ROS oluşumu

Bitki mitokondrileri enerji fabrikaları olarak bilinir ve H_2O_2 gibi ROS'ların önemli üretim merkezlerinden birisidir (Rasmusson ve ark., 2004). Mitokondrilerdeki ROS üretimi, normal solunum şartlarında gerçekleşir. Fakat çeşitli biyotik ve abiyotik stres şartlarında üretimleri artar. Mitokondriyal ETS'nin Kompleks I ve Kompleks III kısımları, $O_2^{\bullet-}$ üretiminin en fazla olduğu yerlerdir. Mitokondrilerde tüketilen O_2'nin yaklaşık % 1-5'inden H_2O_2 üretilir (Rhoads ve ark., 2006). H_2O_2, indirgenmiş Fe^{+2} ve Cu^+ ile reaksiyona girerek toksik $OH^{\bullet}$ radikalini oluşturur. Bu $OH^{\bullet}$ radikalleri membranlara saldırırlar (Rhoads ve ark., 2006). Mitokondri membranlarının PUFA peroksidasyonu, özellikle $OH^{\bullet}$ gibi ROS'lar tarafından bir hidrojen atomunun çıkarılmasıyla başlatılır. Bitki mitokondrileri, enerji dağıtım sistemleri aracılığıyla ROS üretimini kontrol ederler. Bu yüzden mitokondriler, abiyotik streslere karşı hücre adaptasyonlarında merkezi bir rol oynayabilir (Gill ve Tuteja, 2010).

2.3.3. Peroksizomlarda ROS oluşumu

Peroksizomlar, fotosolunum, glikolat oksidaz reaksiyonu, yağ asitlerinin β-oksidasyonu, flavin oksidazların enzimatik reaksiyonları ve $O_2^{\bullet-}$ radikallerinin yıkımı gibi hücrenin önemli işlevlerinin gerçekleştirildiği organellerdir. Ayrıca dallanmış aminoasitlerin yıkımı, jasmonik asit biyosentezi ve glisinbetain üretiminde önemli rol oynayan bir organeldir (Hu, 2007). Peroksizomlar, mitokondri ve kloroplastlar gibi normal metabolizmaları sonucunda $O_2^{\bullet-}$ radikallerini üretirler. $O_2^{\bullet-}$ radikalleri, peroksizomlarda 2 bölgede oluşturulmaktadır (Corpas ve ark., 2001). Bu bölgelerden birincisi, organel matriksi olup, ksantin oksidaz, ksantin oksidasyonunu ve hipoksantinin ürik aside dönüşümünü katalizler (Corpas ve ark., 2001). İkinci bölge, bir flavo protein, NADH ve sitokrom b'den oluşan küçük bir ETS'ye sahip olan NAD(P)H'a bağlı peroksizom membranlarıdır. Peroksizom, ETS aracılığıyla peroksizom membranlarında $O_2^{\bullet-}$ üretilir.

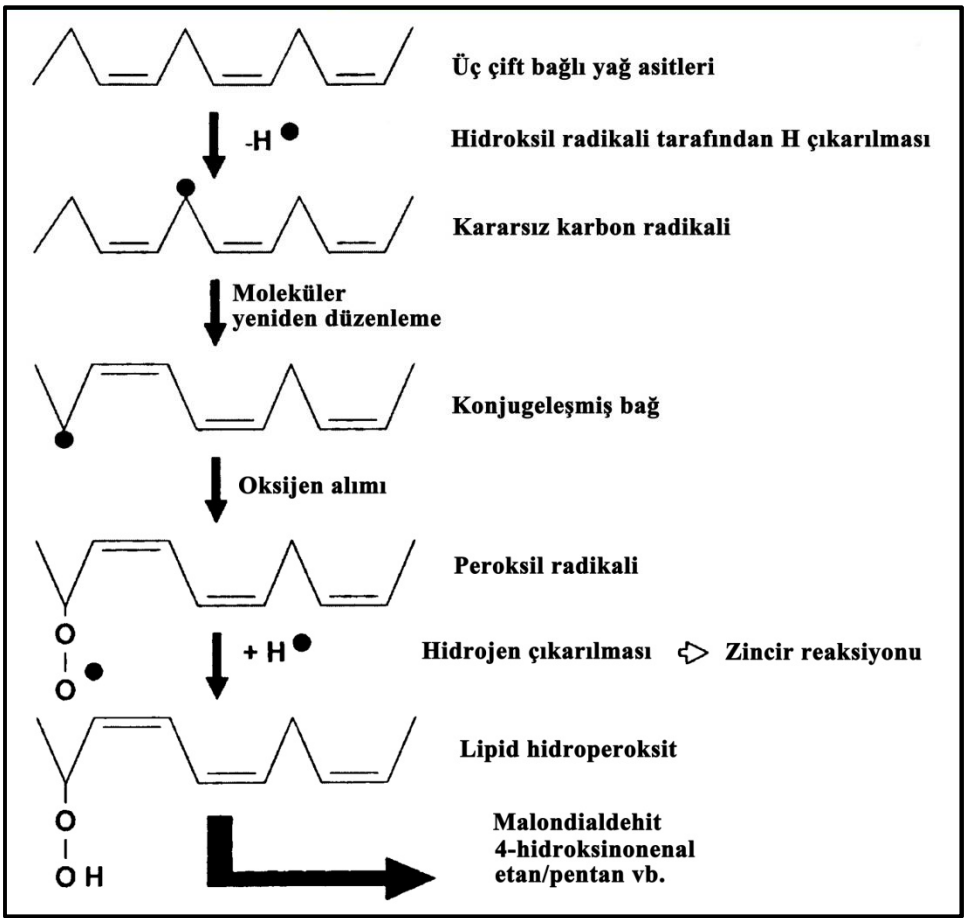
2.3.4. Bitkilerdeki diğer ROS üretim kaynakları

Bitkilerde diğer ROS üretim kaynaklarından birincisi, sitoplazma ve endoplazmik retikulumdaki sitokrom P450 tarafından katalizlenen detoksifikasyon reaksiyonlarıdır (Dybing ve ark., 1976). Diğerleri ise plazma membran yüzeyleri ve apoplastlardır (Gill ve Tuteja, 2010). pH bağımlı hücre duvarı peroksidazları, okzalat oksidazlar ve amin oksidazlar bitki hücrelerinin apoplasttaki H_2O_2'in kaynağı olarak görülmektedirler (Bolwell ve Woftastek, 1997).

2.4. Reaktif Oksijen Türlerinin Lipid Peroksidasyonu Üzerine Etkileri

Lipidlerin peroksidasyonu, her canlı organizmada gerçekleşen en zararlı süreçlerden birisi olarak düşünülmektedir. Lipid peroksidasyonu hem hücre hem de organel membranlarında ROS seviyeleri eşik değere ulaştığında meydana gelir (Montillet ve ark., 2005). Lipit peroksidasyonu, serbest radikallerin etkisi ile membran yapısında bulunan doymamış yağ asidi zincirinden bir hidrojen atomunun uzaklaştırılması ile başlar ve bunun sonucunda yağ asidi zinciri bir lipid radikali niteliği kazanır. Oluşan lipid radikali oksijen ile reaksiyona girer ve lipid peroksil radikalini

oluşturur. Lipid peroksil radikali diğer lipidlerle zincir reaksiyonu başlatır ve lipid hidroperoksitler oluşur. Ortamda bulunan demir ve bakır iyonları, lipid peroksidasyonunu hızlandırır (Kour ve Perkins, 1991). Lipid peroksidasyonun en önemli ürünü malondialdehittir (MDA) (Akkuş, 1995). Oluşan MDA, hücre membranlarından iyon alışverişine etki ederek membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açar ve iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz sonuçlara neden olur (Montillet ve ark., 2005) (Şekil 2.3). Lipid peroksidasyonu, membran bütünlüğünün yok olmasına ve hücrenin elektrolitlere geçirgenliğinin artmasına neden olur. Hücre içine özellikle Ca^{+2} ve Na^{+} iyonlarının geçişi hücrenin enerji oluşturan mekanizmasını etkileyebilir. Hücre içerisinde Ca^{+2} iyonlarındaki artış; protein ve lipidlerde daha fazla hasara neden olabilecek proteaz ve fosfolipazı aktive eder (Halliwell ve Gutteridge, 1999).



Şekil 2.3. Temel lipid peroksidasyon mekanizmaları (Young ve McEneny, 2001)

2.5. Tuz Tolerans Mekanizmaları

Bitkiler, tuz stresinin zararlı etkileriyle baş edebilmek için çok sayıda biyokimyasal ve moleküler mekanizmaya sahiptirler. Bu stratejiler arasında tuz iyonlarının seçici birikimi ya da dışarıda bırakılması, kökler tarafından iyon alımının ve yapraklara taşınımının kontrolü, iyonların bölmelendirilmesi, uyumlu ozmolitlerin sentezi, fotosentetik yolda değişim, membran yapısındaki değişiklikler, antioksidatif enzimlerin indüksiyonu ve bitki hormonlarının uyarılması gibi sistemler bulunmaktadır (Parida ve Das, 2005; Türkan ve Demiral, 2009).

2.5.1. İyonların düzenlenmesi ve bölmelendirilmesi

İyon alımı ve bölmelendirilmesi sadece normal büyüme için değil, tuzlu ortamlardaki büyüme için de çok önemlidir (Adams ve ark., 1992). Çünkü stres, iyon dengesini bozar. İster glikofit ister halofit olsun bitkiler sitoplazmadaki yüksek miktarda tuzu tolere edemezler ve bu nedenle tuzlu koşullarda ya fazla tuzu vakuollerle sınırlarlar ya da iyonları, metabolik fonksiyonlarını harekete geçirmek için farklı dokulara bölmelerler (Parida ve Das, 2005; Zhu, 2003). Glikofitler bünyelerine sınırlı miktarda sodyum alır ve yaşlı dokularda biriktirirler (Cheeseman, 1988).

Sitoplazmadaki tuzun atılması veya vakuollere bölmelendirilmesi, tuz uyarıcı bir enzim Na^+/H^+ antiportırı tarafından yapılır (Apse ve ark., 1999). İki elektrojen H^+ pompası, vakuolar tip H^+-ATPaz (V-ATPaz) ve vakuolar pirofosfataz (V-PPaz) bitkilerin sekresyon yollarının zarlarında birlikte bulunurlar (Dietz ve ark., 2001). V-ATPaz, protein miktarı ve aktivitesine göre çoğu bitki hücrelerinin endomembranlarındaki dominant H^+ pompasıdır. V-ATPaz; sekonder transportu harekete geçirmek, çözücü homeostazını sağlamak ve muhtemelen vezikül füzyonunu kolaylaştırmaktaki görevleri nedeniyle normal koşullarda bitkinin büyümesi açısından vazgeçilmezdir. Tuzluluk, kuraklık, soğuk, asit stresi, anoksiya ve toprakta ağır metallerin fazla olması gibi stres koşulları altında, hücrelerin canlı kalmaları, V-ATPaz'ın aktivitesinin düzenlenmesine bağlıdır (Parida ve Das, 2005). Tuz stresi altındayken bitkiler sitoplazmada yüksek K^+ konsantrasyonu ve düşük Na^+ konsantrasyonu sağlarlar. Bunu, taşıma için itici güç üreten H^+ pompalarının ve K^+-Na^+ taşıyıcılarının aktivitelerini ve ifadelerini düzenleyerek yaparlar. Sitoplazmadaki K^+

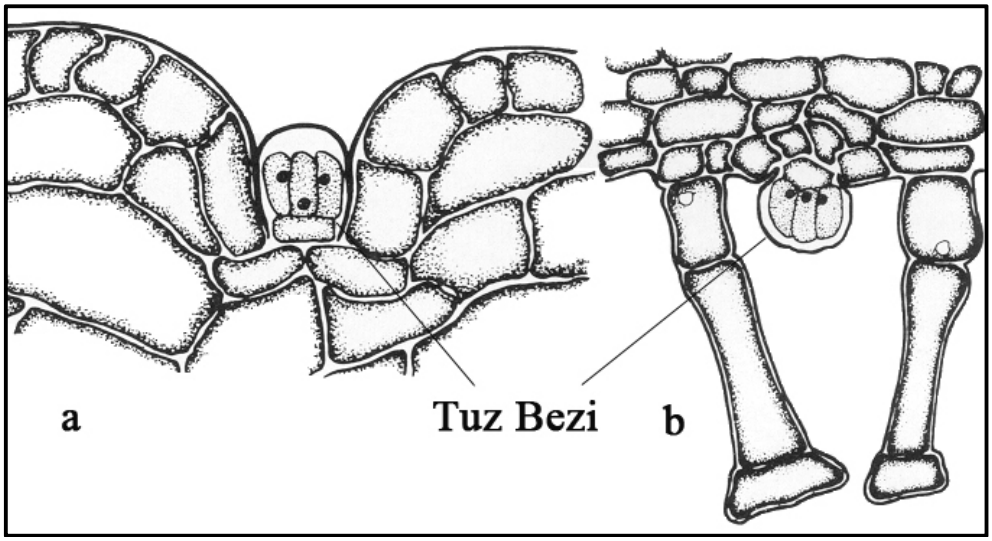
iyonlarının oranının, etkili bir metabolik performans için 100-200 mM düzeyinde tutulması gerekir. Tuz-stres sensörlerini bulmak zor olsa da bazı ara sinyal bileşikleri tanımlanmıştır. Elde edilen bulgular, miristollenmiş kalsiyum bağlayıcı protein SOS3 ve serin/treonin protein kinaz SOS2'den oluşan bir protein kinaz kompleksinin, tuz stresinin ortaya çıkardığı kalsiyum sinyali ile aktive olduğuna işaret etmektedir. Protein kinaz kompleksi, fosforlanır ve plazma membran Na^+/H^+ antiportır SOS1 gibi çeşitli iyon taşıyıcılarını aktive eder (Zhu ve ark., 1993). *Arabidopsis thaliana* (L.) Heyhn'daki AtNHX1 geni, tuz toleransında önemli olan bir vakuolar Na^+/H^+ antiportırı kodlar. Tuz stresi ve absisik asit (ABA) ile AtNHX1 ifadesinin dokulardaki dağılımı ve düzenlenmesi Shi ve Zhu (2002) tarafından belirlenmiştir. Transgenik *Arabidopsis*'te AtNHX1 promotor (GUS) analizleri AtNHX1'in kök uçları hariç tüm dokularda ifade olduğunu göstermiştir. Stomaların bekçi hücrelerindeki güçlü GUS ifadesi, AtNHX1'in pH düzenlemelerinde ve K^+ homeostazisinin sağlanmasında önemli bir rol aldığını göstermektedir. AtNHX1'in promotor aktivitesi NaCl, KCl veya ABA tarafından artırılır. Bu da AtNHX1'in NaCl ve ABA düzenlenmesinin transkripsiyon düzeyinde meydana geldiğini göstermektedir.

Deneysel bulgular Ca^{+2}'un tuz adaptasyonunda görevli olduğunu göstermektedir. Dışarıdan uygulanan Ca^{+2}'un NaCl'ün toksik etkilerini azalttığı bildirilmiştir (Liu ve Zhu, 1998). Tuz stresi sırasında sitoplazmadaki Ca^{+2} miktarının artışı, SOS2 ile fiziksel olarak etkileşen SOS3 tarafından algılanır (Halfter ve ark., 2001) ve aşırı Na^+'un dışarı atılmasını sağlayarak hücresel iyon homeostazisini sağlar. SOS3 ve SOS2'nin tuz stresi altındaki *Arabidopsis*'in kök hücrelerine Na^+ girişine aracılık eden AtHKT1'in aktivitesini azalttığı görülmüştür. SOS2, Na^+/H^+ değiştirme kapasitesini etkileyen vakuolar Na^+/H^+ taşıcılarla etkileşir (Qui ve ark., 2002).

2.5.2. Yapraklardaki tuz bezleri aracılığıyla tuzun uzaklaştırılması

Halofitler çevrelerindeki düşük su potansiyellerine karşı ozmotik düzenlemede tuzlardan faydalanabilirler. Su alabilmek için bünyelerine yararlı iyonları biriktirirken bu iyonların toksik etkilerinden kaçınırlar (Greenway ve Munns, 1980). Bazı türlerde büyüme ve iyon birikimi dengededir. Fazla iyonlar tuz bezleri aracılığıyla atılır (Drennan ve Pammenter, 1982).

Sürgünlerin mineral içerikleri özelleşmiş tuz bezleriyle salgılama ile iyi bir şekilde düzenlenebilir. Tuzlar bunun yanı sıra kutikula ve gutasyon akıntıları ile uzaklaştırılabilir (Drennan ve Pammenter, 1982). Tuz bezleri ya epiderma üzerinde ya da epidermaya gömülü bir şekilde bulunabilir (Şekil 2.4). Salgı bezleri bitkilerin toprak üstündeki tüm kısımlarında bulunabilmesine rağmen genellikle yapraklarda yoğunlaşmaktadırlar.



Şekil 2.4. *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. yapraklarından alınan enine kesitte, tuz bezlerinin görünümü. a. üst epidermada gömülü tuz bezi, b. alt epiderma da yüzeyde bulunan tuz bezi (Waisel, 1972)

Tuz bezlerinden çok miktarda sıvı boşaltılabilir. Örneğin *Limonium latifolium* (Sm.) Kuntze'un yaprak diskleri, kontrollü şartlar altında 24 saatte ağırlığının yarısı kadar sıvı boşaltabilir (Waisel, 1972). İyon seçiciliği tuz bezlerinde gerçekleşebilir. *Sporobolus spicatus* (Vahl) Kunth'un habitatındaki topraklarda Na^+ ve Cl^- iyonları baskın olup, salgılanan tuzların kuru ağırlığının % 93'ünü oluşturur (Ramadan, 2000). Bazı halofitlerde tuz dolu yaşlanmış organların atımı ile fazla miktarda tuz bünyeden uzaklaştırılabilir. *Allenrolfea, Halocnemum ve Salicornia* türlerinde tuzların atımı, etli yaprakların uzaklaştırılması ile sağlanır (Ramadan, 2000).

2.5.3. Bitkilerin reaktif oksijen türlerinden korunmada antioksidan savunma mekanizmaları

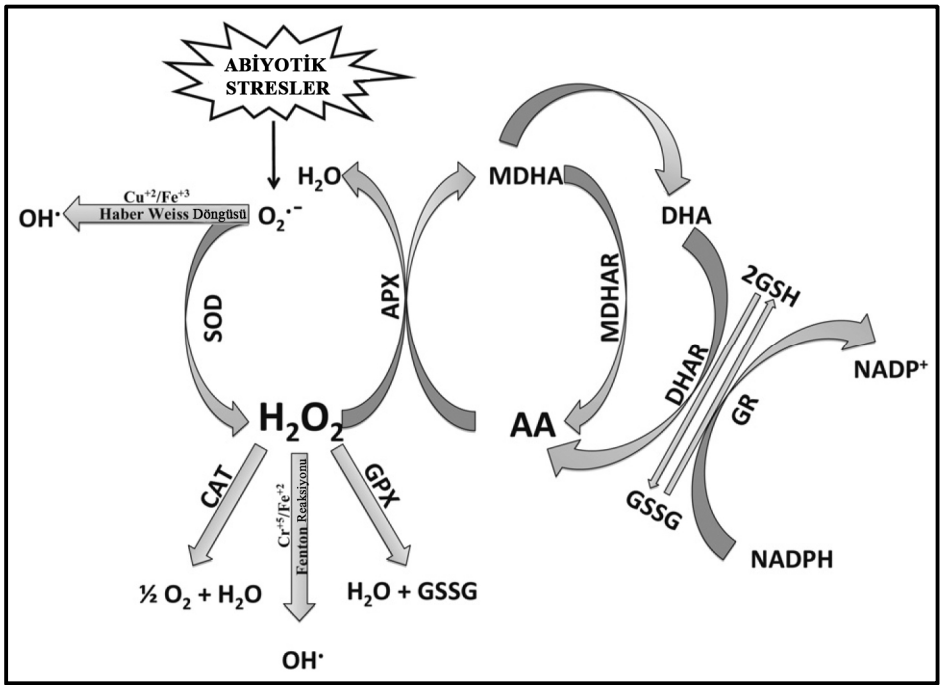
Bitkiler, tuzluluk gibi çeşitli çevresel stresler sonucunda meydana gelen ROS'ları süpürmek için enzimatik ve enzimatik olmayan savunma sistemlerine sahiptir. Enzimatik savunma sistemi, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), askorbat peroksidaz (APX), glutasyon redüktaz (GR), monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR), dehidroaskorbat redüktaz (DHAR), glutasyon peroksidaz (GPX), guaikol peroksidaz (GOPX) ve glutasyon - S - transferaz (GST) enzimleri aracılığıyla sağlanmaktadır (Çizelge 2.2). Enzimatik olmayan savunma sistemi ise askorbik asit (AA), glutasyon (GSH), fenolik bileşikler, alkoloidler, aminoasitler ve α-tokoferollerle sağlanmaktadır. Antioksidan savunma mekanizmaları bitkilerde stres toleranslarını artırıcı bir strateji sağlar. ROS'lar etilen, salisilik asit (SA), jasmonik asit, brassinosteroidler, absisik asit (ABA) gibi bitkisel hormonların da sentezine neden olurlar. Bu fitohormonlar bitkilerin çevresel stres sırasında büyüme ve gelişimleri için ve de savunma tepkileri için gereklidir.

2.5.3.1. Reaktif oksijen türlerine karşı enzimatik antioksidanlar

Bitkiler tuzluluk, ekstrem sıcaklık, ağır metal, kuraklık, hava kirliliği ve besin yetersizliği gibi olumsuz çevre şartlarına maruz kaldıklarında, $^1O_2$, $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 ve $OH^{\bullet}$ radikallerinin üretiminde artış meydana gelir (Gill ve Tuteja, 2010). Bitkiler bu radikallerin zararlı etkilerinden korunmak için kloroplast, mitokondri, peroksizomlarında ve sitoplazmalarında çeşitli enzimatik antioksidan savunma sistemlerine sahiptirler (Şekil 2.5).

Çizelge 2.2. ROS süpürücü antioksidan enzimler ve katalizledikleri reaksiyonlar (Gill ve Tuteja, 2010)

Enzimatik Antioksidantlar	Enzim Kodları	Katalizlenen Reaksiyonlar
Süperoksit Dismutaz (SOD)	EC 1.15.1.1	$O_2^{\bullet-} + O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow 2H_2O_2$
Katalaz (CAT)	EC 1.11.1.6	$2H_2O_2 \rightarrow H_2O + ½\ O_2$
Askorbat Peroksidaz (APX)	EC 1.11.1.11	$H_2O_2 + AA \rightarrow 2H_2O + DHA$
Guaikol Peroksidaz (GPX)	EC 1.11.1.7	$H_2O_2 + GSH \rightarrow H_2O + GSSG$
Monodehidroaskorbat Redüktaz (MDHAR)	EC 1.6.5.4	$MDHA + NAD(P)H \rightarrow AA + NAD(P)^+$
Dehidroaskorbat Redüktaz (DHAR)	EC 1.8.5.1	$DHA + 2GSH \rightarrow AA + GSSG$
Glutasyon Redüktaz (GR)	EC 1.6.4.2	$GSSG + NAD(P)H \rightarrow 2GSH + NAD(P)^+$



Şekil 2.5. ROS oluşumu ve antioksidan savunma mekanizmaları (Gill ve Tuteja, 2010)

2.5.3.1.1. Süperoksit dismutaz (SOD; EC 1.15.1.1)

Süperoksit dismutaz (SOD), bir metaloenzim olup, oksijenli solunum yapan tüm organizmalarda, ROS aracılı oksidatif streslere karşı savunmada görevli olan en etkili antioksidan enzimdir (Gill ve Tuteja, 2010). SOD, çeşitli çevresel streslerden birine maruz kalan bitkilerde üretilen ROS'ların toksik etkilerine karşı ilk savunma hattını oluşturur (Gill ve Tuteja, 2010). SOD'lar, $O_2^{\bullet-}$'i, H_2O_2'e ve O_2'e dönüştürürler. SOD tarafından $O_2^{\bullet-}$ radikalinin parçalanması sonucunda oluşan H_2O_2'in hücreye zarar vermemesi için hemen ortamdan uzaklaştırılması gereklidir. Çünkü bu radikal, belirli metal iyonları ve metal şelatların varlığında yüksek derecede reaktif olan $OH^{\bullet}$ radikallerini oluşturur (Imlay ve Linn, 1988). β-oksidasyon yoluyla glioksizomlarda ve peroksizomlarda oluşan H_2O_2, katalaz tarafından suya dönüştürülür. H_2O_2, kloroplastta oluşmuşsa elektron vericisi olarak askorbatı kullanan askorbat peroksidaz aktivitesiyle süpürülür (Shigeoka ve ark., 2002).

Bitkilerde SOD'lar kendi içerisinde bünyelerindeki metal kofaktörlere göre sınıflandırılırlar. Bunlar Cu/Zn-SOD, Mn-SOD ve Fe-SOD şeklinde olup, farklı hücre organellerinde yer alırlar (Mittler, 2002) (Çizelge 2.3). SOD izozimlerinin aktiviteleri negatif boyama ve izozimlerin KCN ve H_2O_2'e duyarlılıklarına göre belirlenebilir. Fe-SOD, KCN'ye dirençli, H_2O_2'e duyarlı, Cu/Zn-SOD her iki inhibitöre de duyarlı, Mn-

SOD her iki inhibitöre de dirençlidir. Bu izozimler hücrelerin farklı kısımlarında bulunmaktadır. Mn-SOD, mitokondri ve peroksizomlarda (Del Rio ve ark., 2002); Cu/Zn-SOD, bitki hücrelerinin sitoplazma ve kloroplastlarında (Del Rio ve ark., 2002); Fe-SOD, bitkilerde çok fazla saptanan bir izozim olmamakla birlikte bulunduğunda kloroplastlarla bağlantılı olduğu bildirilmektedir (Ferreira ve ark., 2002).

Çizelge 2.3. Bitkilerde bulunan farklı SOD izozimleri ve bulundukları yerler

SOD İzozimleri	Bulundukları yer	Dirençli	Duyarlı
Fe-SOD	Kloroplastlar	KCN	H_2O_2
Mn-SOD	Mitokondri ve Peroksizomlar	KCN ve H_2O_2	—
Cu/Zn-SOD	Kloroplast ve Sitoplazma	—	H_2O_2 ve KCN

SOD, $O_2^{\bullet -}$ radikali konsantrasyonlarını düzenler ve oksijen toksisitesine karşı koruyucu etkilerinden dolayı büyük bir öneme sahiptir (Nordberg ve Arner, 2001). SOD'un aşırı ifade olması, oksidatif stresin negatif etkileriyle mücadele etmede ve bitkilerin hayatiyetlerinin devamında ve toleransında SOD enzimi önemli bir role sahiptir. Deneysel sonuçlar tuz stresi sırasında nohut, mısır, çay, hardal ve dutta SOD aktivitesinde önemli bir artış olduğunu göstermektedir (Ahmad ve ark., 2008). Arbona ve ark. (2008), tuz stresi altındaki tuza duyarlı ve tuza toleranslı domates çeşitlerinde ve *Plantago*'da yapılan çalışmalarda SOD aktivitesinin düşük olduğu bulunmuştur (Shalata ve ark., 2001; Sekmen ve ark., 2007).

2.5.3.1.2. Katalaz (CAT: EC 1.11.1.6)

Katalazlar, yapılarında tetramerik demir içeren ve stresli şartlarda ROS'ların detoksifikasyonu için mutlak gerekli olan enzimlerdir (Garg ve Manchanda, 2009). Başlıca peroksizomlarda lokalize olmuşlardır ve H_2O_2'in O_2 ve H_2O'ya dönüştürülmesinden sorumludurlar. (Srivalli ve ark., 2003). CAT, tüm antioksidan enzimler içerisinde ROS'ların en yüksek yıkımını yapan enzimdir. Dakikada yaklaşık 6 milyon H_2O_2 molekülünü H_2O'ya ve O_2'ye dönüştürür (Gill ve Tuteja, 2010). CAT, tüm aerobik ökaryotlarda mevcuttur ve yağ asitlerinin β-oksidasyonu, glioksilat döngüsü (fotosolunum) ve pürin katabolizması ile ilgili olarak peroksizomlarda üretilen H_2O_2'in yıkımında büyük rol oynamaktadır (Gill ve Tuteja, 2010). Bitkilerde katalazların çoklu

izozim formları bulunmuştur. Mısır bitkisinde CAT1, CAT2 ve CAT3 olmak üzere 3 farklı izoform bulunmakta olup bu izoformlar ayrı kromozomlar üzerinde yer alan genler tarafından birbirinden farklı olarak ifade olmakta ve birbirinden bağımsız bir şekilde düzenlenmektedir (Scandalios, 1990). Peroksizomlar ve sitoplazmada CAT1 ve CAT2, mitokondride ise CAT3 lokalize olmaktadır. *Hordeum vulgare* L. bitkisinde 2 CAT izozimi bulunurken (Azevedo ve ark., 1998), hardal bitkisinde 12 adet CAT izozimi bulunmaktadır (Frugoli ve ark., 1996). Artan katalaz aktiviteleri, bitkilerin zor şartlara adapte olmalarına ve metabolik aktivitelerini sürdürmelerine, toksik düzeydeki H_2O_2'i minimize ederek yardımcı olurlar. Sekmen ve ark. (2007), katalaz aktivitesindeki artışın tuza duyarlı *Plantago media* L.'dan, tuza toleranslı *Plantago maritima* L.'da çok daha fazla olduğunu bildirmişlerdir.

2.5.3.1.3. Peroksidaz (POX: EC 1.11.1.7)

Peroksidazlar, lignin ve etilen biyosentezinde, patojen ve yaralanmalara karşı savunmada, oksin metabolizmasında ve çeşitli streslere karşı cevap gibi birçok fizyolojik olaylara katılan glikoproteinlerdir (Radic ve ark., 2006; Kim ve ark., 1999). POX, SOD'un, $O_2^{\bullet-}$ radikallerini süpürmesiyle ortaya çıkan H_2O_2'in kloroplastlarda süpürülmesinde rol oynayan önemli enzimlerden birisidir (Asada ve Takahashi, 1987). Bitkilerden izole edilen POX, farklı fizyolojik fonksiyonlarından dolayı APX'tan ayrılır (Gill ve Tuteja, 2010). Tuz stresi tarafından oluşturulan oksidatif strese karşı daha fazla koruma sağlayan POX aktivitesi toleranslı bitki türlerinde daha yüksek bulunmaktadır (Scalet ve ark., 1995). POX aktivitesinin, tuz stresi altındaki *Vigna radiata* (L.) R.Wilczek (Panda, 2001) ve *Oryza sativa* L.'da (Koji ve ark., 2009) artış gösterdiği bildirilmiştir.

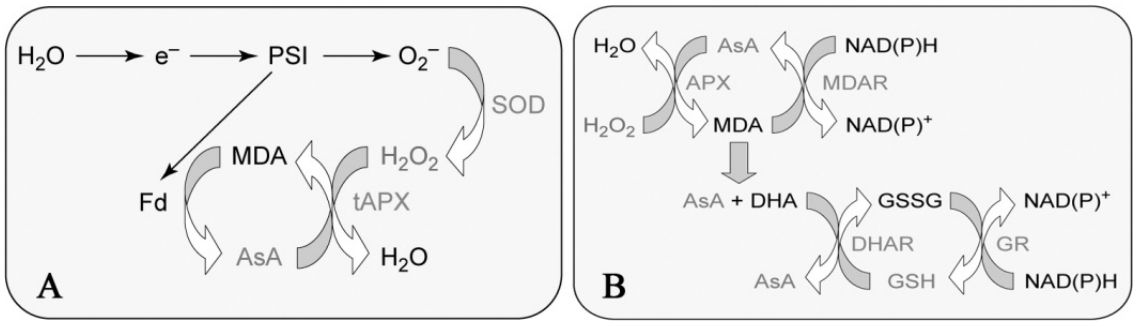
2.5.3.1.4. Glutasyon peroksidaz (GPX: EC 1.11.1.9)

Bitki hücrelerinde H_2O_2'in süpürücüsü olarak görev alan ve çok sayıda izozimi bulunan bir diğer antioksidan enzim de glutasyon peroksidazdır (GPX). Glutasyonu kullanarak H_2O_2'i, organik hidroperoksitleri ve lipid peroksitlerin indirgenmesini katalize ederek bitkileri oksidatif hasardan korurlar (Noctor ve ark., 2002). Millar ve ark. (2003), *Arabidopsis* hücrelerinin sitoplazma, kloroplast, mitokondri ve

endoplazmik retikulumunda yer alan 7 izozim olduğunu bildirmişlerdir. Gapinska ve ark. (2008), 150 mM NaCl stresi altında bulunun *Lycopersicon esculentum* Mill. cv Perkoz'un köklerinde GPX aktivitesinde önemli bir artış olduğunu bildirmişlerdir.

2.5.3.1.5. Askorbat peroksidaz (APX: EC 1.11.1.11)

Askorbat peroksidaz (APX), bitkilerde, alglerde, öglenada ve diğer organizmalarda ROS'ların süpürülmesinde ve hücrelerin korunmasında en önemli rolü oynayan enzimdir (Gill ve Tuteja, 2010). APX, H_2O_2'in süpürülmesinde su-su döngüsü ve askorbat-glutasyon döngüsünde görev alır ve elektron vericisi olarak askorbik asidi kullanır (Şekil 2.6). Hücrenin farklı bölümlerinde 5 farklı APX izoformu tanımlanmıştır. Bunlar; kloroplast stromasındaki çözünebilir form (sAPX), tilakoide bağlı form (tAPX), sitoplazmik form (cAPX), glioksizom membran form (gmAPX) ve mitokondride bulunan mitAPX'dur (Noctor ve Foyer, 1998). Sitoplazmik formu, monodehidroaskorbat radikali (MDA) oluşturur. APX, H_2O_2'e karşı katalaz ve peroksidazdan çok yüksek bir ilgiye sahiptir. CAT ve POX, mM seviyesinde H_2O_2'e duyarlılık gösteriyorken, APX enzimi µM seviyesindeki H_2O_2'e ilgi göstermektedir. Bu özellik, APX'u stres şartlarında ROS'ların yıkımında en önemli enzim yapar (Gill ve Tuteja, 2010). Artan APX aktivitesi kuraklık stresi altındaki *Vigna* (Manivannan ve ark., 2007) ve tuz stresi altındaki *Catharanthus* bitkilerinde (Jaleel ve ark., 2007) gösterilmiştir.



Şekil 2.6. Su-Su döngüsü (A) ve Askorbat-Glutasyon döngüsü (B) (Mittler, 2002)

İndirgeyici olarak askorbatı kullanan ve H_2O_2'e karşı ilgisi yüksek olan APX ile CAT karşılaştırıldığında; CAT'ın indirgeyici bir güç kaynağına ihtiyacı yoktur ve yüksek bir reaksiyon oranına sahiptir, fakat H_2O_2'e karşı ilgisi düşüktür (Willekens ve

ark., 1997). Bu nedenle CAT, sadece H_2O_2 yığınlarını ortadan kaldırırken, APX daha özel bölgelerde bulunan çok küçük orandaki H_2O_2'leri bile süpürebilir (Sekmen, 2009).

2.5.3.1.6. Glutasyon redüktaz (GR: EC 1.6.4.2)

Glutasyon redüktaz (GR) bir flavo-protein oksidoredüktaz olup, hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda oksitlenmiş glutasyonun (GSSG) indirgenmiş forma (GSH), NADPH-bağımlı dönüşümünü katalizler. GR, hücre içerisinde baskın olarak kloroplastlarda, az miktarda da mitokondri, sitoplazma ve peroksizomlarda yer alır (Edwards ve ark., 1990; Creissen ve ark., 1994). GR, oksidatif streslere karşı savunmada görevli olarak askorbat-glutasyon döngüsüne katılır. Bitkilerde bu enzimin birden fazla formu vardır. Nohutta sekiz tane (Edwards ve ark., 1990) ve buğdayda iki tanedir (Dalal ve Khanna-Chopra, 2001). Farklı çevresel streslere karşı GR indüksiyonunu gösteren birçok rapor vardır. Örneğin NaCl stresi altındaki pamuk kalluslarındaki GR aktivitesinde büyük bir artışın olduğu bildirilmiştir (Vital ve ark., 2008). Ancak Azevedo-Neto ve ark. (2005) tarafından NaCl konsantrasyonlarındaki artış ile tuza duyarlı buğday (BR5001) genotiplerinin köklerinde GR aktivitelerinde bir azalma rapor edilmiştir. Tuza toleranslı *Plantago maritima* L.'dan tuza duyarlı *Plantago media* L.'da GR aktivitesindeki azalmanın daha fazla olduğu gözlenmiştir (Sekmen ve ark., 2007).

2.5.3.1.7. Monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR: EC 1.6.5.4)

Monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR), bir flavin adenin dinükleotid (FAD) enzim olup kloroplastik ve sitoplazmik izozimleri bulunmaktadır. MDHAR, elektron alıcısı olarak monodehidroaskorbat (MDHA)'a yüksek bir spesifiklik göstermekte ve elektron vericisi olarak NADPH'tan ziyade NADH'ı tercih etmektedir (Gill ve Tuteja, 2010). MDHAR, APX'a eşlik ederek peroksizomlarda ve mitokondride yer alır ve H_2O_2'i süpürür (Del Rio ve ark., 2002). MDHAR, kloroplastlardaki H_2O_2 süpürücü sistemi korumak ve MDHA'dan askorbatın yeniden oluşumu için gereklidir. Stromadaki MDHA'nın indirgenmesi MDHAR tarafından katalizlenir. Tuz ve ozmotik strese karşı transgenik tütün bitkisinin tolerans artışında, MDHAR'ın fazla miktarda ifade olduğu bildirilmiştir (Eltayeb ve ark., 2007).

2.5.3.1.8. Dehidroaskorbat redüktaz (DHAR: EC 1.8.5.1)

DHAR, askorbatı oksitlenmiş halinden yeniden üretir ve ROS üretimine sebep olan çeşitli abiyotik streslere toleransta önemli olan, hücresel askorbik asit redoksunu düzenler (Gill ve Tuteja, 2010). Askorbatın yeniden oluşumuna DHAR'ın katkısı MDHAR kadar çok değildir (Asada, 1994). *Arabidopsis*'in artan tuz toleransında (Ushimaru ve ark., 2006), tütün bitkisinin kuraklık ve ozon stresine karşı toleransında DHAR'ın fazla miktarda ifade olduğu (Eltayeb ve ark., 2006) bildirilmiştir.

2.5.3.1.9. Glutasyon -S- transferaz (GST: EC 2.5.1.18)

Bitki GST'leri herbisit detoksifikasyonu, hormon homeostazisi, tirozin metabolizması, hidroperoksit detoksifikasyonu, apoptozisin düzenlenmesi ve bitkilerde biyotik ve abiyotik streslere tepki vermede görevlidirler (Dixon, 2010). Bitki hücrelerinde H_2O_2'in diğer bir süpürücüsü olarak da görev alır. Noctor ve ark. (2002), GST'leri DNA, RNA ve proteinlere zarar verebilen, sitotoksik ve genotoksik bileşiklerin temizlenmesinde görevli olduklarını bildirmişlerdir. GST'ler bazı durumlarda bitki hücrelerinde çok fazla bulunan proteinler olup çözünür proteinlerin % 1'den fazlasını oluşturabilirler (Edwards ve ark, 1990). Gapinska ve ark. (2008), tuz stresi altındaki *Lycopersicon esculentum* köklerinde GST aktivitesi artışının olduğunu bildirmişlerdir.

2.5.3.2. Reaktif oksijen türlerine karşı enzimatik olmayan antioksidanlar

Bitkilerde çevresel streslere toleransta görevli olan enzimatik olmayan antioksidanlar ise askorbik asit (AA), glutasyon (GSH), fenolik bileşikler, alkoloidler, aminoasitler ve α-tokoferollerdir.

2.5.3.2.1. Askorbik asit (Vitamin C)

Enzimatik olmayan antioksidanlar arasındaki askorbik asit en kapsamlı çalışılan moleküldür ve çeşitli bitki hücrelerinde bulunmaktadır (Smirnoff, 2000). Hücreler içerisindeki konsantrasyonu sitoplazmada 20 mM'dan, kloroplastlarda 300 mM'a kadar değişen oranlarda bulunabilir (Noctor ve Foyer, 1998). Askorbat sentezi mitokondrilerde meydana gelir ve diğer hücre organellerine transferi, kolaylaştırılmış difüzyonla sağlanır (Horemans ve ark., 2000). Askorbat bitki metabolizması, büyüme düzenlenmesi ve farklılaşma gibi farklı fizyolojik süreçler üzerine etkilere sahiptir. Askorbik asidin (AA) temel rolü bitkileri H_2O_2'in yıkıcı etkilerinden ve diğer toksik oksijen türevlerinden korumaktır. AA temel olarak indirgeyici bir rol oynar ve serbest radikallerin birçok tipinin süpürülmesini sağlar. Askorbat-glutasyon döngüsünde APX, AA'ı kullanır, H_2O_2'i suya indirger ve monodehiroaskorbatı (MDA) üretir. MDA doğrudan AA'e indirgenebilir. AA direkt olarak hücrede üretilen $^1O_2$, $O_2^{\bullet -}$ ve $OH^{\bullet}$ radikallerini süpürebilir. AA ile diğer antioksidanların sinerjik etkileri oksidatif stresin indirgenmesinde önemli bir rol oynar ve çevresel streslere karşı bitkilere tolerans sağlar (Foyer ve Noctor, 2003).

2.5.3.2.2. Glutasyon (GSH)

Sistein içeren bir tripeptit olan glutasyon (γ-GluCysGly), bitkilerdeki ROS'lara karşı en önemli metabolitlerden birisidir. Bitki hücrelerinin tüm bölümlerinde bol miktarda indirgenmiş formda GSH bulunur (Jimenez ve ark., 1998). Sülfat taşınımında, sinyal iletiminde, metabolitlerin bağlanmasında, ksenobiyotiklerin yıkımında (Xiang ve ark., 2001) ve stres tepki genlerinin ifadeleri gibi birkaç fizyolojik süreçte merkezi bir rol oynamaktadır (Mullineaux ve Rausch, 2005). Bunun yanı sıra GSH, bitkilerde önemli bir süpürücü olup $^1O_2$, H_2O_2 ve $OH^{\bullet}$ radikallerini süpürür ve hücredeki bu radikallerin miktarının optimumda tutulmasını sağlar (Smirnoff, 1993; Noctor ve Foyer, 1998). Antioksidan savunma sisteminde GSH, askorbat-glutasyon döngüsü aracılığıyla AA'in yeniden üretiminde önemli bir role sahiptir (Foyer ve ark., 1997). GSH, DHAR ve ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda önemli rol oynayan glutasyon -S- transferazın (GST) substratıdır (Noctor ve ark., 1998).

2.5.3.2.3. α-Tokoferoller (E Vitamini)

Tokoferoller tüm bitki kısımlarında bulunan antioksidanlardandır ve ROS süpürücüsüdürler (Kruk ve ark., 2005). Bitkilerde tokoferollerin 4 izoformu (α-, β-, γ-, δ-) bulunmaktadır (Kamal-Eldin ve Appelqvist, 1996) ve α-tokoferol en fazla bilinenidir. Tokoferoller ROS'ların süpürücüsü olarak görülmektedir. Özellikle $^1O_2$'i süpürücüsüdür (Serbinova ve Packer, 1994). Munne-Bosch (2005), bir α-tokoferol molekülünün rezonans enerji transferi aracılığıyla 120 kadar $^1O_2$'i molekülünü süpürebileceğini bildirmiştir.

2.5.3.2.4. Karotenoidler

Tüm fotosentetik organizmalarda karotenoidler, ROS'ların süpürülmesinde ve lipid peroksidasyonunun azaltılmasında görevlidirler. Karotenoidlerin bitkilerde üç görevi vardır. Birinci görevleri 400 ve 550 nm dalga boyları arasındaki ışığı absorbe etmek ve klorofile aktarmaktır (Sieferman-Harms, 1987). İkinci görevleri fotosentez sırasında doğal olarak üretilen $^1O_2$ ve diğer zararlı serbest radikalleri süpürmesidir (Collins, 2001). Üçüncü görevleri ise tilakoid membran stabilizasyonunu sağlamaktır (Niyogi ve ark., 2001).

2.5.3.2.5. Flavonoidler

Flavonoidler bitkiler aleminde yaygın olarak bulunmakta olup yapraklarda, çiçek kısımlarında ve polenlerde bulunurlar. Flavonoidler genellikle glikozit olarak bitki vakuolünde birikirler. Bitki hücrelerindeki flavonoid konsantrasyonları 1 mM'ın üzerindedir. Flavonoidler, ROS süpürücüsü olarak ve bu radikallerin zararlı etkilerinin ortadan kaldırılmasında görev alırlar (Lovdal ve ark., 2010).

2.5.4. Ozmolitlerin sentezi

Tuz stresi, bitki köklerine doğru su akımını, toprağın su geçirgenliğindeki ve bitki köklerinin su iletkenliğindeki azalmalardan dolayı olumsuz yönde etkiler (Waisel, 1972). Metabolik tepki olarak uyumlu ozmolitler sentezlenir. Bunlar ozmotik

düzenlemelere aracılık ederler ve serbest radikallerin neden olduğu oksidatif zararı azaltırlar (Hare ve ark., 1998). Ozmotik bileşikler içerisinde polioller (Orthen ve ark., 1994), çözünebilir şekerler (Kerepesi ve Galiba, 2000), amino asitler, amidler, imino asitler, proteinler, kuaterner amonyum bileşikleri ve poliaminler bulunur (Khan ve ark., 2000) (Çizelge 2.4). Tuzlu koşullarda büyüyen bitkilerde önemli bir rol oynamalarına karşın bu maddelerin ozmotik düzenlemeye olan katkıları türler, çeşitler ve hatta bir bitkinin farklı organları arasında bile farklılık göstermektedir (Ashraf, 1994). Stres koşulları altında biriken bu bileşiklerin ozmotik ayarlama, hücresel makromoleküllerin korunması, azotun depolanması, hücresel pH'ın sürdürülmesi, hücrelerin detoksifikasyonu ve serbest radikallerin temizlenmesi gibi olaylarda fonksiyon gördüğü bildirilmektedir (Mansour, 2000).

Çizelge 2.4. Tuz stresine karşılık biriktirilen bileşikler ve bu bileşiklerin toleranstaki muhtemel fonksiyonları (Parida ve Das, 2005)

Ürün Grubu	Spesifik Bileşik	Fonksiyonu
İyonlar	Sodyum, Klor	Ozmotik düzenleme, Potasyum çıkışı
Proteinler	Ozmotin, Süperoksit dismutaz/Katalaz	Patojenez ilişkili proteinler, Ozmoprotektan, Radikal detoksifikasyonu
Amino asitler	Prolin, Ektoin	Ozmotik düzenleme, Ozmoprotektan
Şekerler	Glukoz, Fruktoz, Sükroz, Fruktanlar	Ozmotik düzenleme, Ozmoprotektan, Karbon kaynağı
Polioller	Mannitol, Pinitol	Karbon kaynağı, Ozmotik düzenleme, Ozmoprotektan, PSII'nin fotokimyasal etkinliği, Radikal temizleyici,
Poliaminler	Spermin, Spermidin,	İyon dengesi, Kromatin korunması
Kuaterner Aminler	Glisinbetain, β-Alanin betain, Dimetil-sülfonyopropionat, Kolin-o-sülfat, Trigonellin	Ozmoprotektan, Tilakoid ve plazma membran bütünlüğünün korunması
Pigmentler	Karotenoidler, antosiyaninler, betalainler	Fotoinhibisyona karşı koruma

2.5.4.1. Karbonhidratlar

Çözünebilir şekerler tuzluluğa maruz kalan glikofit bitkilerde diğer organik ozmotiklere göre toplam ozmotik potansiyelin yaklaşık %50'sini oluşturmaktadırlar (Cram, 1976). Glukoz, fruktoz, sükroz, trehaloz ve fruktanlar gibi şekerler ve nişasta, tuz stresine maruz kalan bitkilerde birikmekte ve ozmotik koruma, ozmotik düzenleme, karbon kaynağı ve radikal temizleyicisi gibi fonksiyonlar görmektedirler (Parida ve ark., 2002). Tuz stresinde çözünebilir karbonhidratların birikimi artmakta ve CO_2 asimilasyon oranı azalmaktadır (Murakeozy ve ark., 2003).

2.5.4.2. Polioller

Polioller bitkilerde hem asiklik hem de siklik formda bulunan polihidrik şeker alkollerdir. Bitkilerde yaygın olarak bulunan asiklik formdaki polioller mannitol, gliserol, sorbitol iken, siklik formda olanlar ononitol ve pinitoldür. Uyumlu çözünenler arasında poliollerin de ozmotik düzenlemeye katkıda bulunduğu ve bitkilerin tuz toleransında rol oynadığı düşünülmektedir (Yıldız ve ark., 2010). Polioller vakuolde yüksek konsantrasyonlarda lokalize olan inorganik iyonların neden olduğu ozmotik düzensizliklerin üstesinden gelebilmek için sitoplazmada birikmektedirler. Bir şeker alkolü olan mannitol bir primer fotosentetik ürün olarak sentez edilmekte ve bazı bitki türleri tarafından metabolize edilmektedir (Conde ve ark., 2007). Bitkilerin yüksek tuzluluğu tolere etme yeteneğinin mannitol tarafından arttırıldığı belirtilmiştir. Siklik şeker alkoller olan pinitol ve ononitolün tuzlu koşullara maruz kalan birçok bitki türünde biriktiği belirlenmiştir (Paul ve Cockburn, 1989).

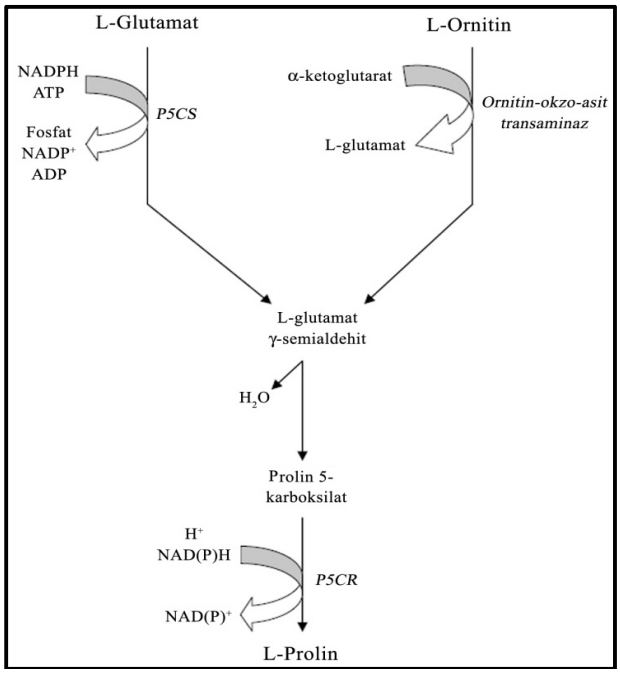
2.5.4.3. Aminoasitler ve amidler

Tuz stresine maruz kalan bitkilerde aminoasitlerin (alanin, arjinin, glisin, serin) ve birer iminoasit olan prolin ve amidlerin (glutamin ve asparajin) biriktiği rapor edilmiştir (Mansour, 2000).

Stres altında bitkilerde biriken en yaygın ozmolitlerden biri prolindir. Prolin, stres koşullarındaki bitkilerde en fazla üretilen aminoasitlerden biri olup glutamat veya ornitinden sentezlenmesine rağmen, baskın olarak glutamattan sentezlenmektedir

(Yıldız ve ark., 2010) (Şekil 2.7). Azot fazlalığı durumlarında ornitinden sentezlenmektedir (Delauney ve ark., 1993). Bitkilerde prolin birikiminin tuzluluk, kuraklık, yüksek sıcaklık, düşük sıcaklık, ağır metal, patojen enfeksiyonu, besin kıtlığı, atmosferik kirlenme ve UV gibi stres durumlarında arttığı bildirilmiştir (Siripornadulsil ve ark., 2002). Bitkilerde prolin birikim seviyesi türden türe değişmekte ve kontrol bitkilerine göre 100 kat daha fazla miktarda birikebilmektedir. Bitkilerde yaygın olarak bulunan ve diğer aminoasitlere oranla daha fazla miktarlarda birikebilen prolin, kullanılabilir azot birikimini düzenlemektedir (Abraham ve ark., 2003). Prolinin $NADP^+$ gereksinimini iyileştirerek stres altındaki hücrelerde oluşan redoks potansiyeli değişimlerini iyileştirici etki yaptığı düşünülmektedir (Hare ve ark., 1998).

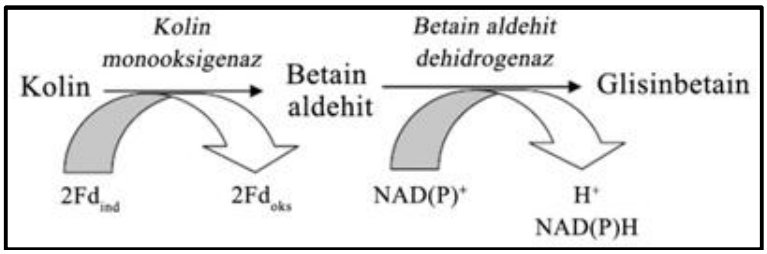
Bütün bitki türleri stres koşullarında prolin biriktirmekte ve prolin sentezi için Δ^1–prolin-5-karboksilat sentetaz (P5CS) geninin ekspresyonu tüm dokularda süratle teşvik edilmektedir. Prolin sentezinde; P5CS'ın Δ^1–γ–glutamil kinaz aktivitesi, P5CS'ın glutamik–γ–semialdehit dehidrogenaz aktivitesi ve Δ^1–prolin-5-karboksilat redüktazın (P5CR) iki izogeni glutamatı, prolin iminoasidine dönüştürmesi olmak üzere üç enzimatik aktivite rol oynamaktadır (Atienza ve ark., 2004; Yıldız ve ark., 2010) (Şekil 2.7). Stresten sonraki iyileşme döneminde prolinin parçalanması ile karbon, azot ve enerji kaynağı sağlanır.



Şekil 2.7. Prolin biyosentez yolu. P5CS: Δ^1–prolin-5-karboksilat sentetaz, P5CR: Δ^1–prolin-5-karboksilat redüktaz (Delauney ve ark., 1993)

2.5.4.4. Kuaterner amonyum bileşikleri

Tuz stresine maruz kalan bitkilerde en yüksek seviyelerde biriken kuaterner amonyum bileşiği glisinbetaindir (Mansour, 2000). Uyumlu çözünenler arasında glisinbetain abiyotik streslere karşı etkin bir koruyucudur (Chen ve Murata, 2008). Yüksek bitkilerde glisinbetain kloroplastlarda etanolamin, kolin ve betain aracılığıyla serin amino asidinden sentez edilmektedir (Şekil 2.8). Glisinbetain kloroplastlarda lokalize olmakta ve kloroplast yapısının ve tilakoid membranların korunmasında önemli bir rol oynayarak fotosentetik aktivitenin ve plazmamembran bütünlüğünün sürdürülmesini sağlamaktadır (Yokoi ve ark., 2002). Murata ve ark. (1992), glisinbetainin tuz stresi altındaki bitkilerde PSII kompleksini koruduğunu ileri sürmüşlerdir.



Şekil 2.8. Glisinbetain biyosentez yolu. Fd_{ind} : İndirgenmiş ferrodoksin, Fd_{oks}: Yükseltgenmiş ferrodoksin (Weretilnyk ve ark., 1989)

2.5.4.5. Poliaminler

Poliaminler iki ya da daha fazla amino grubu içeren polivalent bileşiklerdir (Mansour, 2000). Tuz stresi koşullarında poliaminlerin içeriğindeki değişimler, hem prolin birikimini teşvik edebilmekte hem de kontrol edebilmektedir (Larher ve ark., 1998). Tuz stresinde, bitkilerde poliaminlerin konsantrasyonunun önemli seviyede artmasının tuz stresine karşı koruyucu bir mekanizma ve tuza toleransla ilişkili olduğu bildirilmiştir (Iqbal ve Ashraf, 2005).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Bitki Materyallerinin Genel Özellikleri

3.1.1. *Centaurea tuzgoluensis* Aytaç & H.Duman

Centaurea tuzgoluensis, *Acrolophus* (Cass.) DC. seksiyonu içerisinde yer almakta olup Tuz Gölü (Konya) güneyindeki Eskil (Aksaray) çevresinde yayılış gösteren halofitik endemik bir bitki türüdür. Bu tür Gazi Üniversitesi Biyoloji Bölümü öğretim üyelerinden Prof. Dr. Zeki Aytaç ve Prof. Dr. Hayri Duman tarafından 2006 yılında bilim dünyasına yeni bir tür olarak tanıtılmıştır. *C. tuzgoluensis*, çok dar bir alanda yayılış göstermektedir. Bitkinin yaşadığı habitat, diğer birçok bitkinin büyüyüp neslini devam ettirmesine imkan vermeyen tuzlu topraklar şeklindedir. Yüksek tuz oranına sahip topraklarda neslini devam ettirebilmesi için çeşitli fizyolojik, morfolojik, biyokimyasal ve ekolojik adaptasyon mekanizmaları geliştirmiştir. Bitki günümüzde yok olma tehlikesiyle karşı karşıya olmakla birlikte EN (Endangered: tehlikede), IUCN tehlike kategorisi içerisinde bulunmaktadır (IUCN., 2001).

Deskripsiyon: Çok yıllık otsu bitkilerdir. Gövde 15-70 cm uzunlukta, sürünücü bir yapıda, tabandan dallanmakta olup üzerinde çizgiler bulunmaktadır. Gövde üzeri tamamen yapışık canescent-tomentos tüylerle kaplıdır. Taban yaprakları 3-8 (-12) cm uzunlukta, petiolat, pinnatisekt veya nadiren pinnatifit şekilde; loplar ovattan - eliptik şekle değişim gösterebilir, 5-10 x 2.5 mm boyutlarında ve araknoid tüylerle kaplıdır. Orta gövde yaprakları taban yapraklarına benzer şekilde olup, boyut olarak taban yapraklarından daha küçüktür; en üstte bulunan lop bazen yan loplardan daha uzun ve geniş olabilir. Üst yapraklar parçalanmamış, obovat şekilde, 3-7 x 3 mm boyutlarındadır. Kapitulalar sürgünlerin uç kısımlarında (1-) 2-5 adet gruplanmış halde bulunmakta; involukrum ovoid şekilde, 9-12 x 5-6 mm boyutlarında ve yoğun araknoid tüylerle kaplıdır. İnvolukrum brakteleri 4-6 serili; dıştakiler 2-3 mm uzunlukta, ovat-lanseolat şekilde olup uç kısmında geriye kıvrık 0.5 mm uzunlukta dikencik bulunmaktadır. Yan involukrum brakteleri 8-10 mm, lanseolat şekilde, koyu damarlı, tabanları tüysüz olup kenarlı membransı yapıdadır. Ek uzantıların her bir kenarında (1-) 2-4 sil (0.2-0.5 mm) bulunmakta; uç kısmında 2-2.5 mm uzunlukta geriye kıvrık

dikencik bulunmaktadır. İçteki involukrum brakteleri 9-12 mm, linear şekilde, daha dar membransı kenarlara sahiptir. Çiçekler pembe renkte, 12-15 mm uzunlukta, kenardaki çiçekler ışınsal (radyant) ve sterildir. Akenler ovoidten oblong şekle değişim gösterebilir, 4-5 x 2-2.5 mm, koyu siyah renkte ve çizgilidir. Pappuslar çift sıralı, dıştaki seriler 1-1.5 mm, içtekiler 0.5-1 mm uzunluktadır. Çiçeklenme dönemi Haziran-Temmuz aylarındadır (Vural ve ark., 2006) (Şekil 3.1). *C. tuzgoluensis*'in yayılış gösterdiği alanda yetişen diğer bitki türleri ise *Linum seljukorum* P.H.Davis*, Hypericum salsugineum* Robson & Hub.-Mor.*, Silene salsuginea* Hub.-Mor.*, Salvia halophila* Hedge*, Taraxacum mirabile* Wagenitz*, Inula aucherana* DC. ve *Microcnemum coralloides* (Loscos & Pardo) Font-Quer'dir.



Şekil 3.1. *Centaurea tuzgoluensis* Aytaç & H.Duman'in genel görünümü

Bitkinin yayılış gösterdiği habitat 38˚.25'.017" Kuzey, 33˚.28'.779" Doğu koordinatlarındaki Eskil'in (Aksaray) 5 km kuzeydoğusunda yer alan Küngönü mevkisindeki tuzlu stepler şeklindedir. Bitkinin habitatından alınan toprak örneklerinin analizi yapılarak iyon içerikleri saptanmıştır. Çizelge 3.1'deki Na^+ miktarı, pH, elektrik iletkenliği ve $CaCO_3$ miktarlarından anlaşıldığı üzere bitkinin yetiştiği yer birçok kültür bitkisi ve diğer doğal glikofitik bitkinin yetişmesi için uygun değildir. Bu gibi topraklarda ancak özel fizyolojik adaptasyon mekanizmaları geliştirmiş bitkiler

yaşayabilir. Sodyum miktarının 1791 mg/kg olması, diğer bitkiler üzerinde toksik etki göstermesine rağmen *C. tuzgoluensis*'in gelişimi üzerine toksik etki göstermemektedir. Bor miktarına da dikkat edilecek olursa bulunan değerlerin çok yüksek olduğu görülmektedir.

Çizelge 3.1. *Centaurea tuzgoluensis*'in toprak analiz sonuçları

Analiz Adı		**Birimi**	**Sonuç**	**Yorum**
Tekstür	**Kum**	(%)	42.4	
	Silt	(%)	35.4	
	Kil	(%)	22.2	
	Tekstür sınıfı		Tın	
pH (1:2.5, Toprak: Su)			8.95	Kuvvetli Alkalin
EC (Tuz) (1:5, Toprak: Su)		(µS/cm)	5430	**Aşırı Tuzlu**
$CaCO_3$ (Kireç)		(%)	52.25	**Çok Fazla Kireçli**
Organik madde		(%)	3.30	İyi
İnorganik Azot (NH_4+NO_3-N)		mg/kg	18.1	Yetersiz
Fosfor (P)		mg/kg	2.25	Çok Az
Potasyum (K)		mg/kg	1354	Çok Fazla
Kalsiyum (Ca)		mg/kg	1786	Yeterli
Magnezyum (Mg)		mg/kg	567	Fazla
Sodyum (Na)		mg/kg	1791	**Çok Fazla**
Değişebilir Na Yüzdesi		(%)	31.3	
Bor (B)		mg/kg	104.5	**Çok Fazla**
Bakır (Cu)		mg/kg	0.12	Az
Demir (Fe)		mg/kg	0.30	Az
Çinko (Zn)		mg/kg	0.15	Çok Az
Mangan (Mn)		mg/kg	0.25	Yetersiz

3.1.2. *Centaurea lycaonica* Boiss. & Heldr.

Centaurea lycaonica, *Phalolepis* (Cass.) DC. seksiyonu içerisinde yer almakta olup ilk kez 1845 yılının Mayıs ayında Konya ili Beyşehir ilçesi yakınlarından Heldreich tarafından toplanıldıktan sonra bitkinin yayılış gösterdiği lokalitenin ayrıntılı bir şekilde verilmemesinden dolayı uzun süre bilim adamları tarafından aranmış ancak bulunamamıştır. Bu tür, Prof. Dr. Ahmet Duran tarafından tip lokalitesinin dışında farklı bir lokaliteden toplanmış ve Doç. Dr. Tuna Uysal tarafından teşhiş edilmiştir. B tür şu anda iki ayrı lokaliteden bilinmektedir. Bitkinin yayılış gösterdiği alan kalkerli serpantin kayalıklar şeklindedir. *C. lycaonica,* EN (Endangered: Tehlikede), IUCN tehlike kategorisi içerisinde yer almaktadır (Ekim ve ark., 2000; IUCN, 2001).

Deskripsiyon: Bitki çok yıllık, dik veya yükselici, seyrek flokkoz tüylü, 20-35 cm boyundadır. Taban yaprakları seyrek araknoid tüylü, 7-8 x 1.5-3 cm, segmentler ayanın yarısının 2/3'sine kadar pinnatipartit, 3-5 lateral segmentli, segmentler şeritsi, 10-15 x 1-1.5 mm, gövde yaprakları 4.5-0.9 x 1.5 - 0.2 mm, taban yapraklarına benzer, kapitulaya doğru kademeli bir biçimde pinnatipartit'den basite indirgenir. İnvolukrum silindirik, 11-13.5 x 5-8 mm, hafifçe tüylüdür. İnvolukrum brakteleri; en iç 11-13 mm, orta 8-9 mm, genellikle morumsu, dış involukrum brakteleri 2.5-6 mm, dıştan içe doğru oblongdan linear lanseolata değişir, belirgin bir biçimde boyuna 4-6 paralel çizgilidir. Ek uzantılar; dairemsi, büyük, involukrum braktelerinin taban kısmını örter, aşağı doğru hafifçe sarıcı, darca koyu kahverengi merkezli, kenarları saçaklı laserat, uçtaki dikencik oldukça indirgenmiş veya yoktur. Dış çiçekler verimsiz, ışınsal (radyant), pembe renkte, içtekiler verimli, erdişi (hermafrodit), küçük, beyaz veya beyazımsı pembe, anter tüpsü ve genellikle pembe, verimli erdişi çiçekten daha uzundur. Aken linear-lanseolat, 3.5-4 x 1-1.5 mm, tüysüz, siyahımsı kahverengi ve belirgin boyuna çizgili, pappus pürüzlü, iki serili, dış halka 3-3.5 mm, iç halka 0.2-0.5 mm'dir (Şekil 3.2). Çiçeklenme dönemi Haziran-Temmuz aylarındadır. *C. lycaonica*'nın yayılış gösterdiği alanda yetişen diğer bitki taksonları ise *Centaurea urvillei* DC. subsp. *stepposa* Wagenitz, *Scabiosa argentea* L., *Phlomis armeniaca* Willd., *Xeranthemum annuum* L., *Stachys cretica* L. subsp. *anatolica* Rech.fil. ve *Taeniatherum caput-medusae* (L.) Nevski subsp. *crinitum* (Schreb.) Melderis'dur.



Şekil 3.2. *Centaurea lycaonica* Boiss. & Heldr.'nın genel görünümü

Bitkinin yayılış gösterdiği habitat, 37˚.44'.486" Kuzey, 32˚.04'.208" Doğu koordinatlarındaki Konya – Seydişehir yolunun 54. km'de yer alan kalkerli serpantin kayalıklar şeklindedir. Bitkinin habitatından alınan toprak örneklerinin analizi yapılarak toprak içerikleri saptanmıştır (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. *Centaurea lycaonica*'nın toprak analiz sonuçları

Analiz Adı		**Birimi**	**Sonuç**	**Yorum**
Tekstür	**Kum**	(%)	88.4	
	Silt	(%)	7.4	
	Kil	(%)	4.2	
	Tekstür sınıfı		Kumlu	
pH (1:2.5, Toprak: Su)			6.52	Nötr
EC (Tuz) (1:5, Toprak: Su)		(µS/cm)	52.7	**Düşük**
$CaCO_3$ (Kireç)		(%)	0.85	**Az Kireçli**
Organik madde		(%)	4.27	Çok Fazla
İnorganik Azot (NH_4+NO_3-N)		mg/kg	16.7	Yetersiz
Fosfor (P)		mg/kg	6.55	Az
Potasyum (K)		mg/kg	14	Çok Az
Kalsiyum (Ca)		mg/kg	2253	Yeterli
Magnezyum (Mg)		mg/kg	310	Yeterli
Sodyum (Na)		mg/kg	18	
Değişebilir Na Yüzdesi		(%)	0.55	
Bor (B)		mg/kg	0.24	**Yetersiz**
Bakır (Cu)		mg/kg	0.45	Yeterli
Demir (Fe)		mg/kg	36.5	Orta
Çinko (Zn)		mg/kg	0.51	Orta
Mangan (Mn)		mg/kg	2.37	Orta

3.2. Bitki Materyallerinin Yetiştirilmesi

Centaurea tuzgoluensis tohumları, Eskil'in (Aksaray) 5 km kuzeydoğusunda Küngönü mevkisinden 10.08.2008 tarihinde toplanmıştır. Bu lokalitenin GPS Koordinatları: 38˚.25'.017" Kuzey, 33˚.28'.779" Doğu'dur. *Centaurea lycaonica*'ya ait tohumlar, 37˚.44'.486" Kuzey, 32˚.04'.208" Doğu koordinatlarındaki Konya – Seydişehir yolunun 54. km'de yer alan kalkerli serpantin kayalıklardan 23.07.2008 tarihinde toplanmıştır. Her iki türe ait dolgun görünüşlü, sağlam ve az çok birbirine benzer büyüklükte olan tohumlar seçilerek kullanılmadan önce yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuşlardır. Bunun için tohumlar % 5'lik sodyum hipoklorid içerisinde 15 dakika tutulduktan sonra steril deiyonize su ile yıkanmıştır. Deneme kurulmadan önce her iki türe ait tohumların en uygun çimlendirme ortamının belirlenmesi amacıyla tohumlar 20'şer adet gruplandırılarak (her iki türde 3'er tekrarlı olmak üzere) bir kısmı perlit içerisinde bir kısmı da kurutma kağıdında 24°C'de, 16 saat ışık/8 saat karanlıktaki iklim odasında çimlenmeye bırakılmış, 3-4 gün sonra her iki türe ait tohumların kurutma kağıdında daha hızlı çimlendikleri gözlemlenmiştir. Ön denemenin sonucunda tohumların çimlendirilmesi işleminin kurutma kağıdında yapılmasına karar verilmiştir. Kurutma kağıdında çimlendirilen tohumlar, içerisinde perlit bulunan kaplara aktarılmıştır. Fideler 60 gün tam kuvvet hoagland solüsyonu (Hoagland ve Arnon, 1950) ile kontrollü şartlar altında (16 saat ışık/8 saat karanlık, 23 °C sıcaklık, % 70 nem, 350 µmol $m^{-2}s^{-1}$ ışık yoğunluğu) büyütülmüş ve tuz uygulamasına geçilmeden önce 3 gruba ayrılmıştır. Normal büyümenin 60. gününde fidelere 0, 150 ve 300 mM NaCl içeren hoagland solüsyonunun verilmesiyle tuz uygulaması başlamıştır. Tuz uygulamasının 0., 7. ve 14. gününde bitkiler hasat edilmiştir. Hasat edilen örnekler analizlere kadar -80 °C'de saklanmıştır.

3.2.1. Büyüme parametreleri

Her iki türe ait 60 günlük fideler, tuz uygulamasının 0., 7. ve 14. gününde hasat edilmiştir. Her bir gruptan rastgele 10'ar bitki alınarak gövde ve kökler birbirinden ayrılmıştır. Gövde ve köklerin yaş ağırlıkları (g) tartılarak uzunlukları (cm) ölçülmüştür. Örnekler 70 °C'de 72 saat bekletildikten sonra kuru ağırlıkları (g) belirlenmiştir.

3.2.1.1. Bağıl sürgün büyüme oranı (RGR)

Her iki türe ait bağıl sürgün büyüme oranları; 7. ve 14. günde hasat edilen bitkilerin kuru sürgün ağırlıkları alınarak, aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (Hunt ve ark., 2002).

$$\text{Bağıl Sürgün Büyüme oranı: } (KA_2 - KA_1)/(H_2 - H_1)$$

(KA_1: 1. Hasattaki sürgün ağırlığı (mg), KA_2: 2. Hasattaki sürgün ağırlığı (mg), H_1: 1. Hasat süresi, H_2: 2. Hasat süresi)

3.2.1.2. Yaprakların bağıl su içerikleri (RWC)

Yapraklardaki bağıl su içeriklerini belirlemek için her bir gruptaki bitkilerden 6 yaprak örneği alınarak yaş ağırlıkları (Y.A.) ölçülmüştür. Yapraklar 6 saat boyunca düşük ışık altında deiyonize su içinde petrilerde bekletilerek turgor haline gelmeleri sağlanmıştır. Turgorlu yapraklar kurulanarak turgorlu ağırlıkları (T.A.) belirlenmiş ve bu yapraklar 72 saat boyunca 70 ^{o}C'de bekletilerek kuru ağırlıkları (K.A.) ölçülmüştür. Her bir gruba ait yaprak örneklerinin bağıl su içeriği aşağıdaki formüle göre % olarak hesaplanmıştır (Smart ve Bingham, 1974).

$$\text{Bağıl Su İçeriği} = [(\text{Y.A.-K.A.})/(\text{T.A.-K.A.})]\text{x}100$$

3.2.1.3. Yapraklardaki klorofil fluoresans ölçümleri

Klorofil fluoresans ölçümleri, tuz uygulamasının 0., 7. ve 14. gününde, her bir uygulamaya ait 10 farklı bitkinin en üstteki katlanmamış yaprakları kullanılarak yapılmıştır. Her gruptan yaklaşık 1 cm^2 yüzey alanına sahip yaprak örnekleri alınarak, yaprak fluoresansının daha önceden tespit edilen en yüksek değere ulaştığı süre olan 5 dakika boyunca karanlıkta bekletilmiştir. Bitki verim analiz cihazı (Plant Efficiency Analyser-Hansatech Instruments Ltd.) ile yaprakların doygun ışık demetine maruz bırakılmasıyla, değişken olmayan bazal klorofil fluoresansı (*Fo*), maksimum fluoresans indüksiyonu (*Fm*), değişken fluoresans (*Fv*) ve *Fv/Fm* oranları belirlenmiştir. Her iki

Centaurea türünün NaCl stresine gösterdikleri yanıtları karşılaştırmak için özellikle PS-II'nin fotokimyasal verimi (Maksimum kuantum verimi Fv/Fm) dikkate alınmıştır.

3.2.2. Bitki sürgünlerindeki iyon konsantrasyonlarının belirlenmesi

Öğütülmüş ve kurutulmuş 0.5'er gram bitki materyalleri mikrodalga sisteminde (CEM, Mars 5), konsantre nitrik asit (HNO_3) içerisinde çözülmüştür. Elde edilen ekstraktların Na^+, K^+, ve Ca^{+2} içerikleri (µmol g^{-1} K.A.), ICP-AES (Varian-Vista) ile tespit edilmiştir (Nyomora ve ark., 1997). Sürgünlerin Cl^- içerikleri (µmol g^{-1} K.A.), Johnson ve Ulrich (1959) tarafından bildirilen $AgNO_3$ titrasyon metoduna göre belirlenmiştir.

3.2.3. Protein miktarının belirlenmesi

Her iki türe ait bitkilerin protein içerikleri, Bradford (1976)'a göre, bovin serum albümin (BSA) standart olarak kullanılarak tespit edilmiştir. Standartlar 0.01-0.2 mg/ml aralığında hazırlanmıştır.

3.2.4. Yapraklardaki lipid peroksidasyon seviyelerinin belirlenmesi

Yapraklarda meydana gelen lipid peroksidasyon derecesinin belirlenmesi için, lipit peroksidasyonunun son ürünü olan malondialdehit (MDA) seviyesi ölçülmüştür. MDA miktarı, Madhava-Rao ve Sresty (2000)'e göre belirlenmiştir. Bunun için 0.5 g yaprak örneği, trikloroasetik asit (TCA) ile homojenize edilmiştir. Santrifüjden sonra tüplere aktarılan süpernatanta, tiobarbitürik asit (TBA) ve TCA içeren reaksiyon karışımı pipetlenmiş ve tüm deney tüpleri 95 °C'de 30 dk ısıtılmıştır. Karışım 10.000g x 15 dk santrifüjlenmiştir. Oluşan süpernatantın 532 ve 600 nm'deki absorbans değerleri okunmuştur. MDA konsantrasyonu, ekstinksiyon katsayısı (ϵ=155 mM^{-1} cm^{-1}) kullanılarak hesaplanmış ve nmol g^{-1} Y.A. olarak ifade edilmiştir.

3.2.5. Yapraklardaki prolin miktarının belirlenmesi

Bitkilerin prolin miktarının belirlenmesi Bates ve ark. (1973)'nın metoduna göre yapılmıştır. Her gruptan 0.5 g yaprak örnekleri alınarak % 3'lük sülfosalisilik asit ile homojenize edilmiştir. Filtre edilen homojenata asit ninhidrin ve glasiyel asetik asit eklenerek 100 °C'de 1 saat süre ile su banyosunda bekletilmiştir. Reaksiyonun durdurulması amacıyla karışım buz banyosuna aktarılmıştır. Soğutma işleminden sonra karışıma toluen ekstrakte edilerek, sıvı fazdan aspire edilen toluen fraksiyonunun 520 nm'deki absorbansı spektrofotometrede okunmuştur. Prolin konsantrasyonu kalibrasyon eğrisi yardımıyla hesaplanmış ve µmol prolin g^{-1} Y.A. olarak belirtilmiştir.

3.2.6. Yaprakların hidroksil ($OH^{\bullet}$) radikali süpürülme aktivitelerinin belirlenmesi

Bitki yapraklarındaki $OH^{\bullet}$ radikali süpürülme aktivitelerinin belirlenmesi, Chung ve ark. (1997)'larının belirttiği yöntemde küçük modifikasyonlar yapılarak tespit edilmiştir. Çözeltilerin tümü analiz süresince taze olarak hazırlanmıştır. Fe^{+3}/askorbat/EDTA/H_2O_2 sisteminden üretilen $OH^{\bullet}$ radikallerine karşı deoksiriboz ve örnek arasındaki rekabet $OH^{\bullet}$ süpürme aktivitesinin belirlenmesi için ölçülmüştür. Reaksiyon karşımı; 0.3 ml 0.02 M sodyum fosfat tamponu (pH: 7.0), 0.15 ml 10 mM 2-deoksiriboz, 0.15 ml 10 mM $FeSO_4$, 0.15 ml 10 mM EDTA, 0.15 ml 10 mM H_2O_2, 0.525 ml H_2O ve 75 µl örnek içermektedir. Reaksiyon karışımı 37 °C'de 2 saat inkübe edilmiştir. Test tüplerine 0.75 ml % 2.8'lik TCA ve 0.75 ml % 1'lik TBA eklenmiş ve 20 dakika kaynatılmıştır. Soğutma işleminden sonra karışımın, 520 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüştür. $OH^{\bullet}$ süpürülme yeteneği hidroksil radikali tarafından 2-deoksiriboz oksidasyonunun inhibisyon oranı olarak aşağıdaki formüle göre değerlendirilmiştir.

$$\text{Hidroksil radikali süpürülme aktivitesi (\%)} = [(A_0 - A_1)/A_0]*100$$

A_0 = Körün Absorbansı, A_1= Örnek Absorbansı

3.3. Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

3.3.1. Enzim ekstraktlarının hazırlanması

Hasat edilen her iki türe ait fideler, sıvı azotla dondurularak, biyokimyasal analizlere kadar -80 °C'de saklanmıştır. SOD, CAT, POX, APX ve GR enzimlerinin ekstraksiyonu için 0.5 g yaprak, soğutulmuş havanda sıvı azot yardımıyla, % 2 (w/v) polivinilpolipirolidon (PVPP) ve 1 mM EDTA içeren 0.05 M sodyum fosfat tamponuyla (pH: 7.8) homojenize edilmiştir. APX ekstraksiyonu için 2 mM askorbat içeren homojenizasyon tamponu kullanılmıştır (pH: 7.8). Homojenat 4 °C'de 14.000 rpm'de 30 dk santrifüj edilmiş ve oluşan süpernatant, enzim aktivitesinin tayin edilmesinde kullanılmıştır. Ekstraksiyon prosedürünün tümü ±4 °C'de gerçekleştirilmiştir. Tüm spektrofotometrik ölçümler Shimadzu UV-1600 ile yapılmıştır.

3.3.2. Süperoksit dismutaz (SOD; EC 1.15.1.1) aktivitesinin belirlenmesi

SOD aktivitesi, Beauchamp ve Fridovich (1971)'e göre, SOD'un fotokimyasal olarak nitro blue tetrazolium (NBT)'un indirgenmesini inhibe etme yeteneğinin ölçülmesiyle tayin edilmiştir. 3 ml reaksiyon karışımı; 50 mM fosfat tamponu (pH: 7.8), 33 µM NBT, 10 mM L-metionin, 0.66 mM EDTA Na_2, 0.0033 mM riboflavin içermektedir. Süpernatant seyreltildikten sonra karışım 10 dk 300 µmol $m^{-2}s^{-1}$ ışık şiddeti altında bekletildi. Daha sonra reaksiyon karışımının 560 nm'de verdiği absorbans değerleri okunmuştur. SOD için 1 enzim birimi; ışıkla indirgenmenin % 50 engellenmesine neden olan protein miktarı (mg) olarak tanımlandığından yaprak örneklerindeki SOD aktiviteleri buna göre belirlenmiştir.

3.3.3. Katalaz (CAT; EC 1.11.1.6) aktivitesinin belirlenmesi

Katalaz enzim aktivitesinin belirlenmesi, Bergmeyer (1970)'in metoduna göre gerçekleştirilmiştir. H_2O_2'in miktarında oluşan azalma, 240 nm'de gösterdiği maksimum absorbanstaki düşüşle belirlenmiştir. 1ml'lik son hacme sahip kuvartz küvetlerdeki reaksiyon karışımı; 0.1 mM EDTA, 50 mM Na-fosfat tamponu (pH: 7),

deiyonize su ve ‰ 0.3 H_2O_2'den oluşmaktadır. Reaksiyon boyunca absorbansta oluşan düşüş 180 sn boyunca takip edilmiştir. CAT aktivitesi, dakikada harcanan µmol H_2O_2 olarak ifade edilmiştir.

3.3.4. Peroksidaz (POX; EC 1.11.1.7) aktivitesinin belirlenmesi

POX aktivitesi Herzog ve Fahimi (1973)'ye göre belirlenmiştir. Aktivite 465 nm'de 3.3'-diaminobenzidin tetrahidroklorid'in (DAB) oksidasyonuyla, absorbansta meydana gelen artış takip edilerek hesaplanmıştır. Polystrene küvetteki reaksiyon karışımı, DAB solüsyonu, % 0.6'lık H_2O_2, deiyonize su ve enzim ekstraktından oluşmaktadır. Reaksiyon, H_2O_2'in katılmasıyla başlatılmış ve 180 sn boyunca absorbans artışı takip edilmiştir. Spesifik enzim aktivitesi, dakikada tüketilen µmol ml^{-1} H_2O_2 olarak ifade edilmiştir.

3.3.5. Askorbat peroksidaz (APX; EC 1.11.1.11) aktivitesinin belirlenmesi

APX aktivitesinin tayini Nakano ve Asada (1981)'ya göre yapılmıştır. Askorbat okside oldukça, spektrofotometredeki 290 nm'deki absorbansta oluşan azalma okunmuş ve hesaplamalar askorbatın ekstinksiyon katsayısı kullanılarak (2.8 $mM^{-1}cm^{-1}$) yapılmıştır. Reaksiyon karışımında; 50 mM sodyum fosfat tamponu (pH: 7), 0.5 mM askorbat, 0.1 mM EDTA Na_2 ve 1.2 mM H_2O_2 bulunmaktadır. Askorbatın oksidasyonu, enzim ekstraktının katılmasıyla başlatılmış ve absorbanstaki azalma 180 sn boyunca takip edilmiştir. 1 birim APX aktivitesi, dakikada okside olan 1 mmol ml^{-1} askorbat olarak ifade edilmektedir.

3.3.6. Glutasyon redüktaz (GR; EC 1.6.4.2) aktivitesinin belirlenmesi

GR aktivitesi, Foyer ve Halliwell (1976)'in yöntemine göre, 340 nm'deki absorbans azalmasından yola çıkılarak belirlenmiştir. NADPH varlığında, okside glutasyon miktarındaki azalma, kuvartz küvette, köre karşı 180 sn boyunca takip edilmiştir. Hesaplamalar, glutasyon redüktaz enziminin ekstinksiyon katsayısı kullanılarak (ε=6.2 mM^{-1} cm^{-1}) yapılmıştır. Spesifik enzim aktivitesi, dakikada indirgenen 1 mmol ml^{-1} okside glutasyon (GSSG) miktarı olarak ifade edilmektedir.

3.3.7. İzozimlerin elektroforetik ayrımı

Her iki *Centaurea* türüne ait yapraklar 9 mM Tris – HCl (pH: 6.8) ve % 13.6 (v/v) gliserol içeren tamponla 4 ^{o}C'de homojenize edilmiştir. Homojenatlar 4 $^{\circ}$C'de, 14.000 rpm'de 30 dakikada santrifüjlendikten sonra elde edilen süpernatantlar SOD, POX ve CAT izozimlerinin elektroforetik ayrımında kullanılmıştır. APX izozimlerinin ayrımı için homojenizasyon tamponuna 2 mM askorbat ilave edilmiştir.

3.3.7.1. Süperoksit dismutaz (SOD) izozimlerinin elektroforetik ayrımı

Elektroforetik SOD izozimlerinin ayrımı Beauchamp ve Fridovich (1971)'e göre riboflavin ve NBT boyamasıyla yapılmıştır. Eşit miktarda protein (75 µg) içeren örnekler, denatüre olmayan (SDS içermeyen) poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE)'ne tabi tutulmuştur (Laemmli, 1970). SOD örnekleri 4 ^{o}C'de sabit akım altında (120 mA), % 5 toplayıcı jel (stacking gel) ve % 12 ayırıcı jelde (seperating gel) yürütülmüştür. Elektroforezden sonra farklı SOD izozimleri, boya çözeltisine inhibitörler eklenerek belirlenmiştir. Potasyum siyanür (KCN), Cu/Zn-SOD inhibisyonu için, H_2O_2 ise Fe-SOD ve Cu/Zn-SOD inhibisyonu için boya çözeltisine eklenmiştir. Mn-SOD aktivitesi ise her iki inhibitöre de direnç göstermiştir.

3.3.7.2. Katalaz (CAT) izozimlerinin elektroforetik ayrımı

CAT izozimleri Woodbury (1971) tarafından tanımlanan metoda göre belirlenmiştir. 75 µg protein içeren örnekler, % 10'luk denatüre olmayan jelde yürütüldükten sonra, jeller % 0.01 H_2O_2'de 5 dakika inkübe edilip deiyonize su ile yıkandı. Daha sonra jeller % 1 $FeCl_3$ ve % 1 $K_3Fe(CN_6)$ içeren çözeltide 20 dakika boyamaya alınmıştır. Farklı katalaz izozimlerini tespit etmek için H_2O_2 solüsyonu içerisine 3-amino-1,2,4-triazole (3-AT) eklenmiştir. Yeşil renkte görünmeye başlayan jeller deiyonize su ile yıkanmıştır.

3.3.7.3. Peroksidaz (POX) izozimlerinin elektroforetik ayrımı

Elektroforetik POX izozimlerinin ayrımı Seevers ve ark. (1971)'na göre yapılmıştır. 75 µg protein içeren örnekler % 10'luk denatüre olmayan akrilamid jelde (PAGE) sabit akım altında (120 mA) yürütülmüştür. Elektroforezden sonra oluşan bantları görebilmek için jeller karanlıkta 30 dakika boyunca, benzidin ve hidrojen peroksit içeren 200 mM Na-asetat tamponunda (pH: 5.0) inkübe edilmiştir. Daha sonra jeller % 7'lik asetik asit solüsyonunda saklanmıştır.

3.3.7.4. Askorbat peroksidaz (APX) izozimlerinin elektroforetik ayrımı

APX izozimleri, Mittler ve Zilinkas (1993)'ın yöntemine göre belirlenmiştir. Örnekler yüklenmeden önce jeller 2 mM askorbat içeren tamponda 4 °C'de 30 dakika yürütülmüştür. Daha sonra 35 µl protein içeren örnekler jellere yüklenerek sabit akım altında (50 mA) yürütülmüştür. Yürütme işleminden sonra jeller 2 mM askorbat içeren 50 mM potasyum fosfat tamponunda (pH: 7) 20 dakika inkübe edilmiş ve sonra 4 mM askorbat ve 2 mM hidrojen peroksit içeren 50 mM potasyum fosfat tamponunda (pH: 7.8) 20 dakika bekletilmiştir. Ardından jeller tamponla 1 dakika yıkanmış ve 28 mM TEMED ve 2.5 mM NBT içeren 50 mM potasyum fosfat tamponuna alınmış ve ışıkta 10-20 dakika bekletilmiştir.

3.4. İstatistiksel Analizler

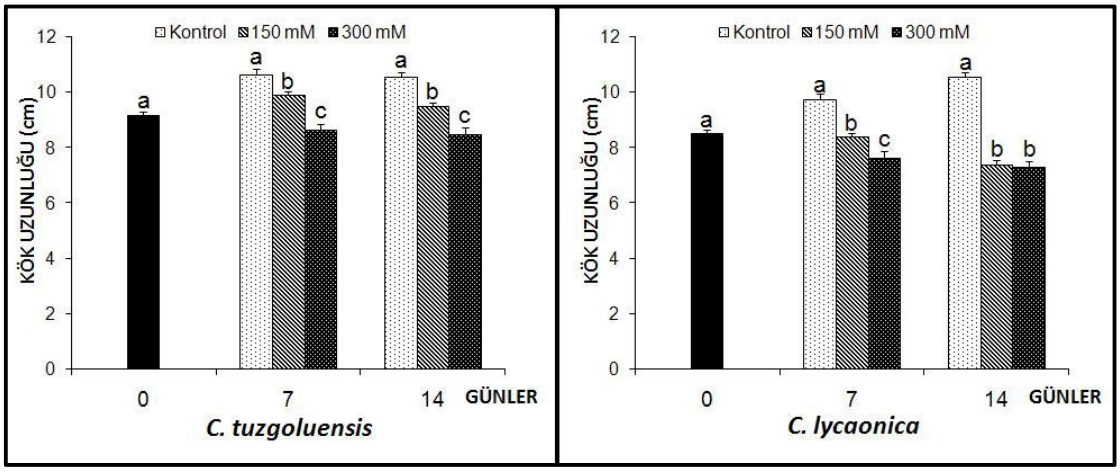
Her bir deneme en az 3 kez tekrar edilmiştir ve her bir bulgu, büyüme parametreleri dışında (n=10) 2 tekrardan oluşmaktadır (n=6). Elde edilen veriler tek-yönlü varyans analizi (One–way ANOVA) ile analiz edilmiş ve ortalamalar arasındaki farklılıklar Lowest Standard Deviations (LSD) testi ile karşılaştırılmıştır. $P< 0.05$ olan değerler istatistiksel bakımdan anlamlı kabul edilmiştir. İstatistiksel analizler SPSS programı (standart versiyon 13.0) ile gerçekleştirilmiştir. Bütün şekillerdeki hata çubukları ortalama standart hatayı göstermektedir ve çizelgelerdeki değerler ortalama şeklinde verilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Büyüme Parametreleri

4.1.1. Bitkilerin kök ve gövde uzunlukları

C. tuzgoluensis ve *C. lycaonica* türlerinin tuz uygulamasının 0., 7. ve 14. günlerinde kök ve gövde uzunlukları ölçülmüştür. Her iki türün tuz uygulamalarına bağlı olarak kök uzunluğunda meydana gelen değişimler şekil 4.1 ve çizelge 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1. 7 ve 14 gün süreyle tuz stresine maruz bırakılan *C. tuzgoluensis* ve *C. lycaonica*'nın kök uzunluklarında (cm) gözlenen ortalama değişimler (n=10). Sütunlar üzerindeki aynı harfler, aynı tür içinde istatistiksel bakımdan farklı olmayan değerleri göstermektedir (P> 0.05)

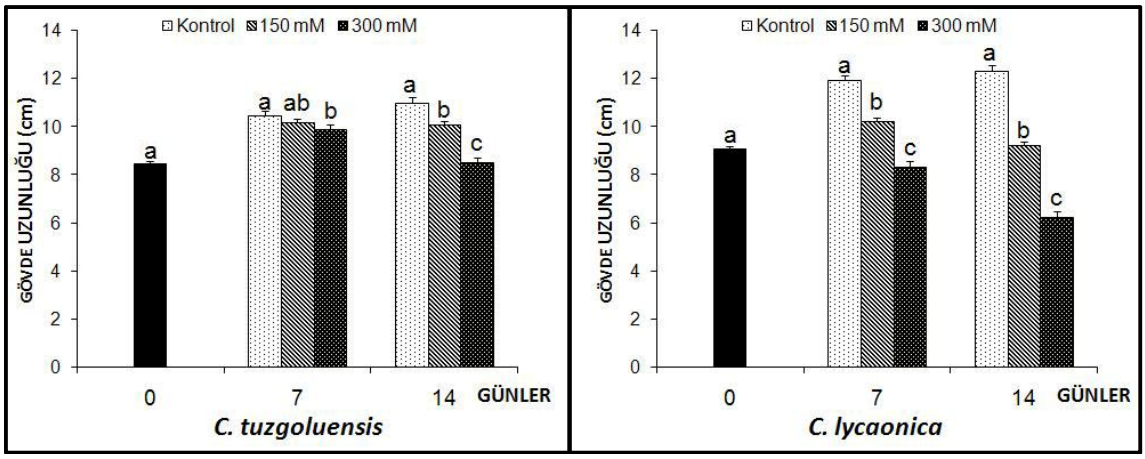
Çizelge 4.1. 7 ve 14 gün süreyle tuz stresine maruz bırakılan *C. tuzgoluensis* ve *C. lycaonica*'nın kök uzunluklarında (cm) gözlenen ortalama değişimler (n=10). Rakamların yanlarındaki aynı harfler, istatistiksel bakımdan birbirinden farklı olmayan değerleri göstermektedir (*P*> 0.05)

	Gruplar	**0. Gün**	**7. Gün**	**14. Gün**
C. tuzgoluensis	Kontrol	9.17 ± 0.4^{a}	10.64 ± 0.19^{a}	10.55 ± 0.22^{a}
	150 mM NaCl		9.9 ± 0.15^{b}	9.5 ± 0.13^{b}
	300 mM NaCl		8.64 ± 0.28^{c}	8.5 ± 0.19^{c}
C. lycaonica	Kontrol	8.5 ± 0.22^{a}	9.75 ± 0.22^{a}	10.55 ± 0.16^{a}
	150 mM NaCl		8.4 ± 0.16^{b}	7.4 ± 0.12^{b}
	300 mM NaCl		7.65 ± 0.36^{c}	7.3 ± 0.27^{b}

C. tuzgoluensis'in tuz stresi uygulamasını 7. gününde 150 mM NaCl, kök uzunluğunda % 6.95, 300 mM NaCl'de ise % 18.8 azalmaya neden olmuştur. 14. günde 150 mM NaCl, *C. tuzgoluensis*'in kök uzunluğunda % 9.95, 300 mM NaCl ise % 19.43 azalmaya sebep olmuştur. 7. günde *C. lycaonica*'nın kök uzunluğu 150 mM NaCl'de % 13.84, 300 mM NaCl stresinde ise % 21.54 azalmıştır. 14. gün hasadında ise *C. lycaonica*'nın kök uzunluğundaki bu azalma, 150 mM NaCl'de stresinde % 29.86, 300 mM NaCl stresinde ise % 30.81 olmuştur.

Halofitik bitkilerdeki kök uzunluklarındaki azalma oranları glikofitlere nazaran daha az olmaktadır. Her iki örnekleme zamanında hasat edilen tuz stresi altındaki *C. lycaonica* fidelerinin kök uzunluklarında meydana gelen azalma, *C. tuzgoluensis* fidelerinden daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar benzer çalışmalar ile uyum göstermektedir (Sekmen ve ark., 2007; Seçkin ve ark., 2010; Koca ve ark., 2007).

C. tuzgoluensis ve *C. lycaonica* türlerinin tuz stresi uygulamalarına bağlı olarak gövde uzunluğunda meydana gelen değişimler şekil 4.2 ve çizelge 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.2. 7 ve 14 gün süreyle tuz stresine maruz bırakılan *C. tuzgoluensis* ve *C. lycaonica*'nın gövde uzunluklarında (cm) gözlenen ortalama değişimler (n=10). Sütunlar üzerindeki aynı harfler, aynı tür içinde istatistiksel bakımdan farklı olmayan değerleri göstermektedir (P> 0.05)

Çizelge 4.2. 7 ve 14 gün süreyle tuz stresine maruz bırakılan *C. tuzgoluensis* ve *C. lycaonica*'nın gövde uzunluklarında (cm) gözlenen ortalama değişimler (n=10). Rakamların yanlarındaki aynı harfler, istatistiksel bakımdan birbirinden farklı olmayan değerleri göstermektedir ($P > 0.05$)

	Gruplar	**0.Gün**	**7.Gün**	**14.Gün**
C. tuzgoluensis	Kontrol	8.44 ± 0.81^{a}	10.45 ± 0.31^{a}	11.02 ± 0.2^{a}
	150 mM NaCl		10.2 ± 0.29^{ab}	10.09 ± 0.17^{b}
	300 mM NaCl		9.88 ± 0.23^{b}	8.5 ± 0.14^{c}
C. lycaonica	Kontrol	9.06 ± 0.15^{a}	11.95 ± 0.29^{a}	12.35 ± 0.35^{a}
	150 mM NaCl		10.25 ± 0.21^{b}	9.25 ± 0.08^{b}
	300 mM NaCl		8.35 ± 0.13^{c}	6.25 ± 0.13^{c}

C. tuzgoluensis'in gövde büyümesi, 7. günde 150 mM NaCl'de kontrole göre önemli bir azalma göstermezken, 300 mM NaCl'de % 5.45 azalmıştır. *C. lycaonica*'nın gövde büyümesi, 7. günde 150 mM NaCl'de % 14.2, 300 mM'da ise % 30.1 azalmıştır.

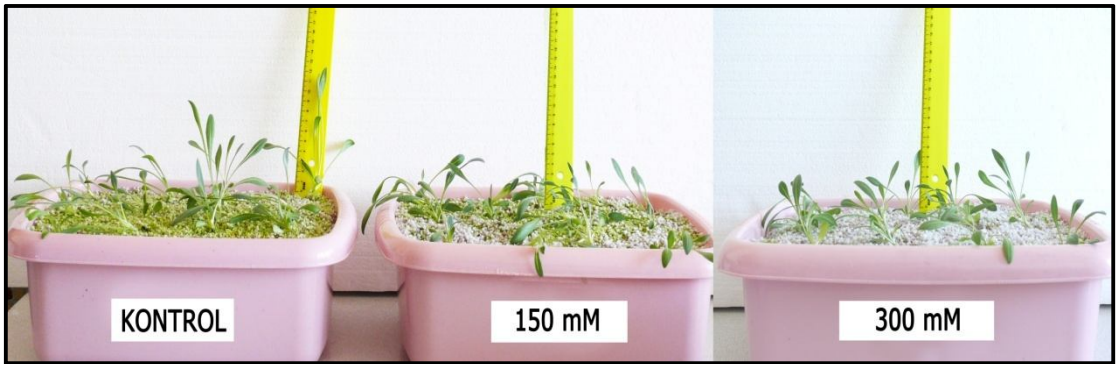
Tuz stresi uygulamasının 14. gününde *C. tuzgoluensis*'in gövde büyümesindeki azalma, 150 mM NaCl'de % 8.4 iken, 300 mM NaCl'de % 22.86, *C. lycaonica*'da ise 150 mM'da % 25.1, 300 mM NaCl'de % 49.4 olarak tespit edilmiştir.

Topraktaki artan tuzluluğun bitki kökleri çevresindeki ozmotik etkileri, yaprak büyüme oranlarında azalışa sebep olmaktadır (Munns ve Tester, 2008). Çalışmamızda olduğu gibi Sekmen ve ark. (2007), Yazıcı ve ark., (2007), Koca ve ark. (2007)'nın yapmış oldukları çalışmalarda, tuz stresi altındaki duyarlı türlerin sürgün gelişimlerinin, toleranslı türlerden daha fazla azalma gösterdikleri bildirilmiştir.

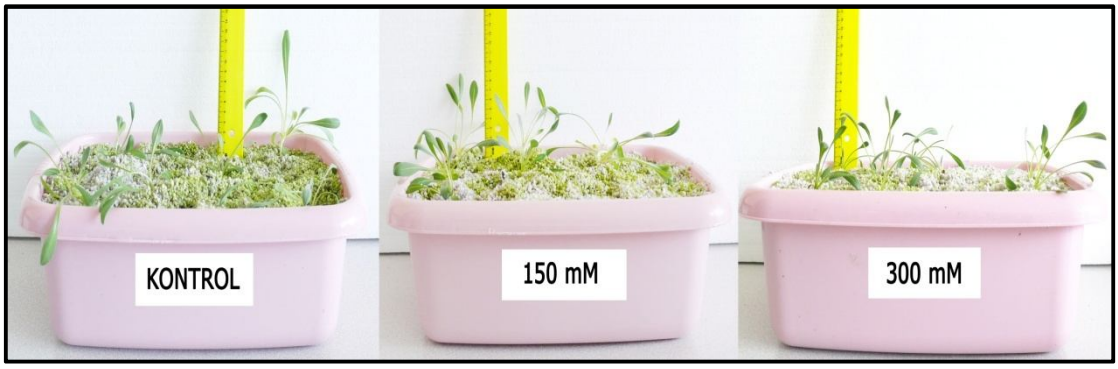
C. tuzgoluensis ve *C. lycaonica* fidelerinin tuz stresi uygulamasının 0., 7. ve 14. günündeki görünümleri Şekil 4.3, 4.4, 4.5, 4.6 ve 4.7'de; yaprakların morfolojik yapılarında gözlenen değişimler ise şekil 4.8 ve 4.9'da verilmiştir.



Şekil 4.3. 60 günlük *Centaurea tuzgoluensis* ve *Centaurea lycaonica* fidelerinin tuz uygulamasından önceki görünümleri



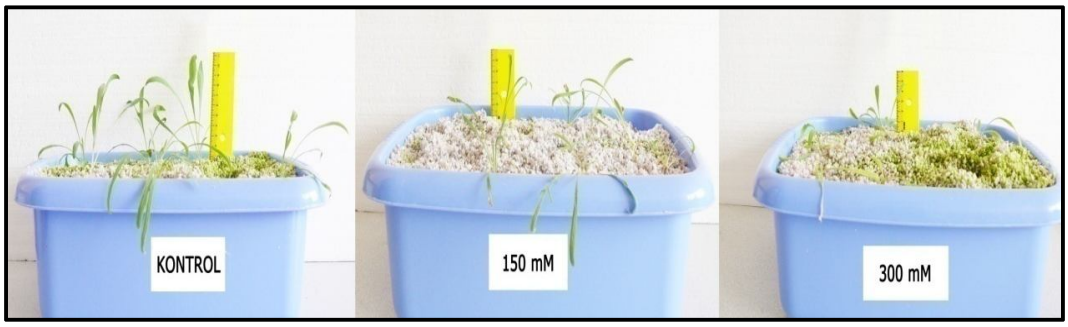
Şekil 4.4. Tuz uygulamasının 7. gününde *Centaurea tuzgoluensis* fidelerinin görünümleri



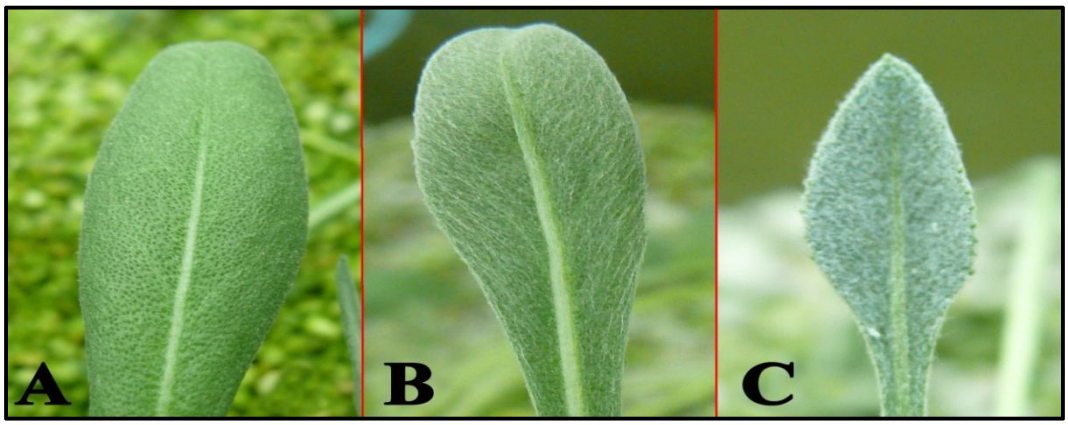
Şekil 4.5. Tuz uygulamasının 14. gününde *Centaurea tuzgoluensis* fidelerinin görünümleri



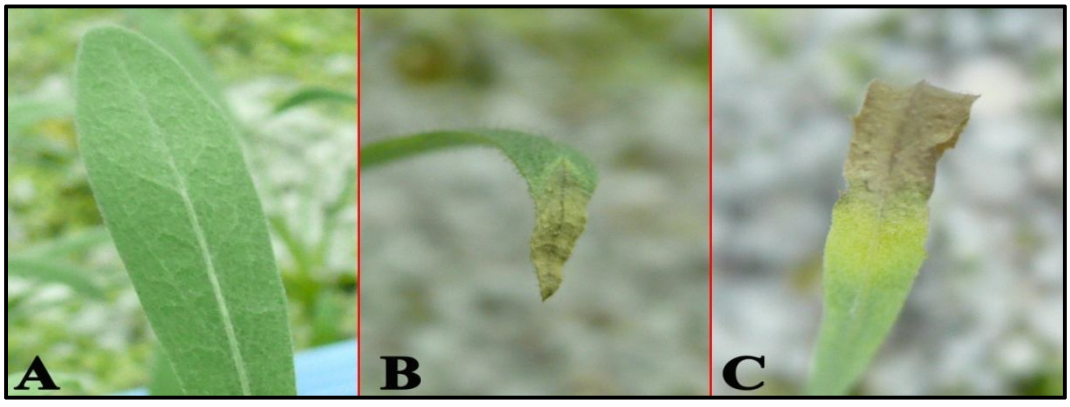
Şekil 4.6. Tuz uygulamasının 7. gününde *Centaurea lycaonica* fidelerinin görünümleri



Şekil 4.7. Tuz uygulamasının 14. gününde *Centaurea lycaonica* fidelerinin görünümleri



Şekil 4.8. 14 gün süreyle tuz stresine maruz bırakılan *C. tuzgoluensis* yapraklarında gözlenen değişimler. Kontrol grubunun tüysüz yaprakları **(A)**, 150 mM **(B)** ve 300 mM **(C)** NaCl stresi altındaki bitkilerin yapraklarındaki tüylenme

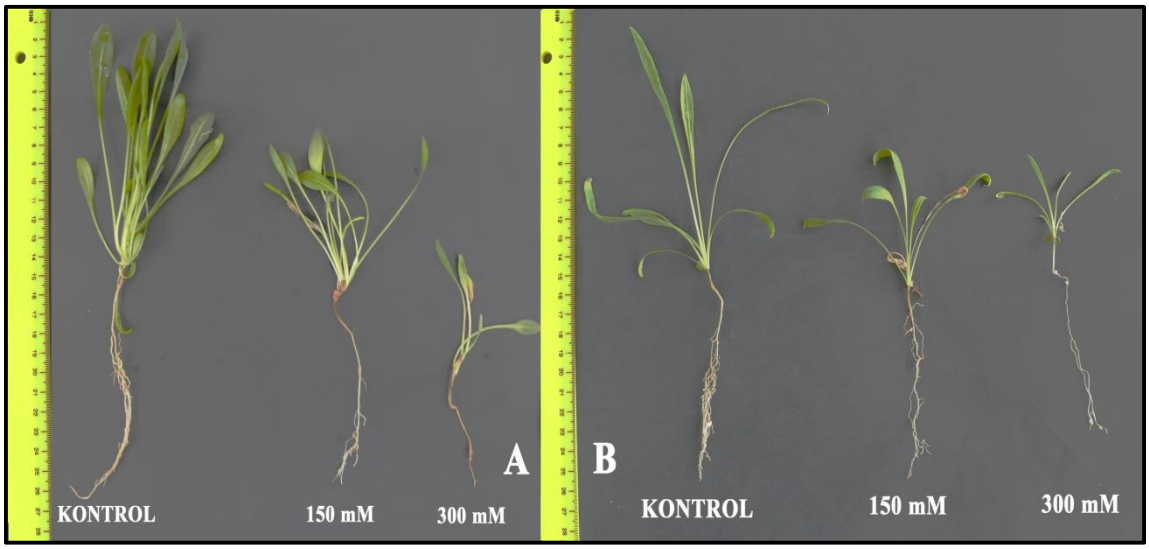


Şekil 4.9. 14 gün süreyle tuz stresine maruz bırakılan *C. lycaonica* yapraklarında gözlenen değişimler: Kontrol grubunun yaprakları **(A)**, 150 mM **(B)** ve 300 mM **(C)** NaCl stresi altındaki bitkilerin yapraklarında meydana gelen yanıklar

Tuz stresinin 7. ve 14. gününde, *C. tuzgoluensis* ve *C. lycaonica* fidelerinin gelişimlerinde meydana gelen indirgenme oranlarının görünümleri şekil 4.10 ve 4.11'te verilmiştir.



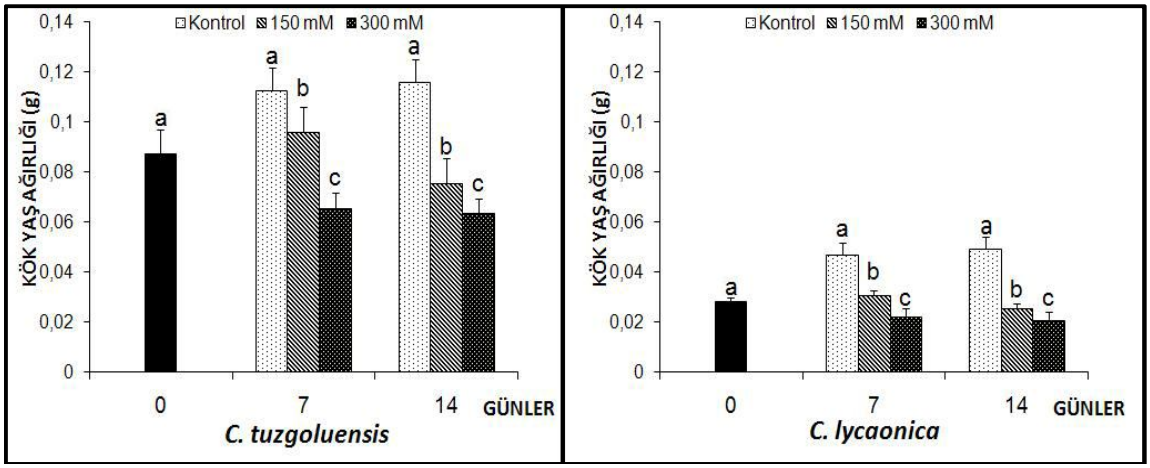
Şekil 4.10. 7 gün süreyle tuz stresine maruz bırakılan *C. tuzgoluensis* **(A)** ve *C. lycaonica* **(B)** fidelerinin görünümü



Şekil 4.11. 14 gün süreyle tuz stresine maruz bırakılan *C. tuzgoluensis* **(A)** ve *C. lycaonica* **(B)** fidelerinin görünümü

4.1.2. Bitkilerin kök yaş ve kuru ağırlıkları

Her iki *Centaurea* türünde de tuz stresinin uygulanma süresi ve konsantrasyonuna bağlı olarak bitki köklerinin yaş ağırlıklarında azalma meydana gelmiş olup, değişimler şekil 4.12 ve çizelge 4.3'de verilmiştir.



Şekil 4.12. 7 ve 14 gün süreyle tuz stresine maruz bırakılan *C. tuzgoluensis* ve *C. lycaonica*'nın kök yaş ağırlıklarında (g) gözlenen ortalama değişimler (n=10). Sütunlar üzerindeki aynı harfler, aynı tür içinde istatistiksel bakımdan farklı olmayan değerleri göstermektedir (P> 0.05).

Çizelge 4.3. 7 ve 14 gün süreyle tuz stresine maruz bırakılan *C. tuzgoluensis* ve *C. lycaonica*'nın kök yaş ağırlıklarında (g) gözlenen ortalama değişimler (n=10). Rakamların yanlarındaki aynı harfler, istatistiksel bakımdan birbirinden farklı olmayan değerleri göstermektedir (*P*> 0.05)

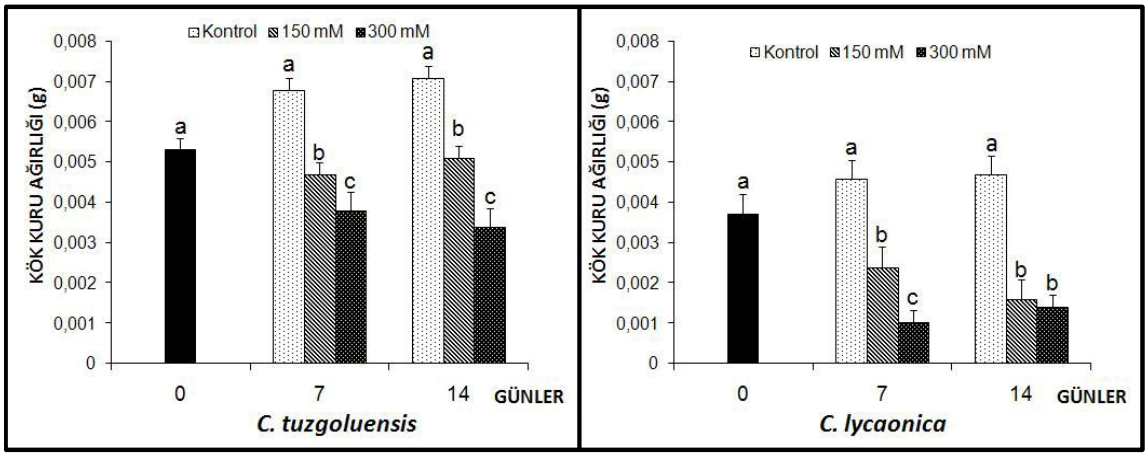
	Gruplar	**0.Gün**	**7.Gün**	**14.Gün**
C. tuzgoluensis	Kontrol	0.087 ± 0.003^{a}	0.1126 ± 0.029^{a}	0.1162 ± 0.021^{a}
	150 mM NaCl		0.0962 ± 0.024^{b}	0.0755 ± 0.007^{b}
	300 mM NaCl		0.0656 ± 0.016^{c}	0.0636 ± 0.005^{c}
C. lycaonica	Kontrol	0.028 ± 0.002^{a}	0.0471 ± 0.007^{a}	0.0496 ± 0.014^{a}
	150 mM NaCl		0.0308 ± 0.007^{b}	0.0256 ± 0.002^{b}
	300 mM NaCl		0.0223 ± 0.003^{c}	0.021 ± 0.009^{c}

C. tuzgoluensis'in kök yaş ağırlığı, 7. günde 150 mM NaCl'de % 14.56, 300 mM NaCl'de % 41.74 azalmıştır. *C. lycaonica*'da ise 7. günde 150 mM NaCl'de % 34.6, 300 mM'da % 52.65 azalmıştır.

Tuz stresi uygulamasının 14. gününde *C. tuzgoluensis*'deki kök yaş ağırlığındaki azalma, 150 mM NaCl'de % 35.02 iken, 300 mM NaCl'de % 45.27 olarak

ölçülmüştür. *C. lycaonica*'nın yaş ağırlığında ise 150 mM'da % 48.39, 300 mM NaCl'de % 57.66 azalma olduğu tespit edilmiştir.

C. tuzgoluensis ve *C. lycaonica* türlerinin kök kuru ağırlıklarındaki değişimler şekil 4.13 ve çizelge 4.4'de verilmiştir.



Şekil 4.13. 7 ve 14 gün süreyle tuz stresine maruz bırakılan *C. tuzgoluensis* ve *C. lycaonica*'nın kök kuru ağırlıklarında (g) gözlenen ortalama değişimler (n=10). Sütunlar üzerindeki aynı harfler, aynı tür içinde istatistiksel bakımdan farklı olmayan değerleri göstermektedir (P> 0.05)

Çizelge 4.4. 7 ve 14 gün süreyle tuz stresine maruz bırakılan *C. tuzgoluensis* ve *C. lycaonica* türlerinin kök kuru ağırlıklarında (g) gözlenen ortalama değişimler (n=10). Rakamların yanlarındaki aynı harfler, istatistiksel bakımdan birbirinden farklı olmayan değerleri göstermektedir (*P*> 0.05)

	Gruplar	**0. Gün**	**7.Gün**	**14.Gün**
C. tuzgoluensis	Kontrol	0.0053 ± 0.0006^{a}	0.0068 ± 0.0005^{a}	0.0071 ± 0.0002^{a}
	150 mM NaCl		0.0047 ± 0.0003^{b}	0.0051 ± 0.0003^{b}
	300 mM NaCl		0.0038 ± 0.004^{c}	0.0034 ± 0.0005^{c}
C. lycaonica	Kontrol	0.0037 ± 0.0005^{a}	0.0046 ± 0.0006^{a}	0.0047 ± 0.0004^{a}
	150 mM NaCl		0.0024 ± 0.0002^{b}	0.0016 ± 0.0004^{b}
	300 mM NaCl		0.00104 ± 0.0005^{c}	0.00142 ± 0.0002^{b}

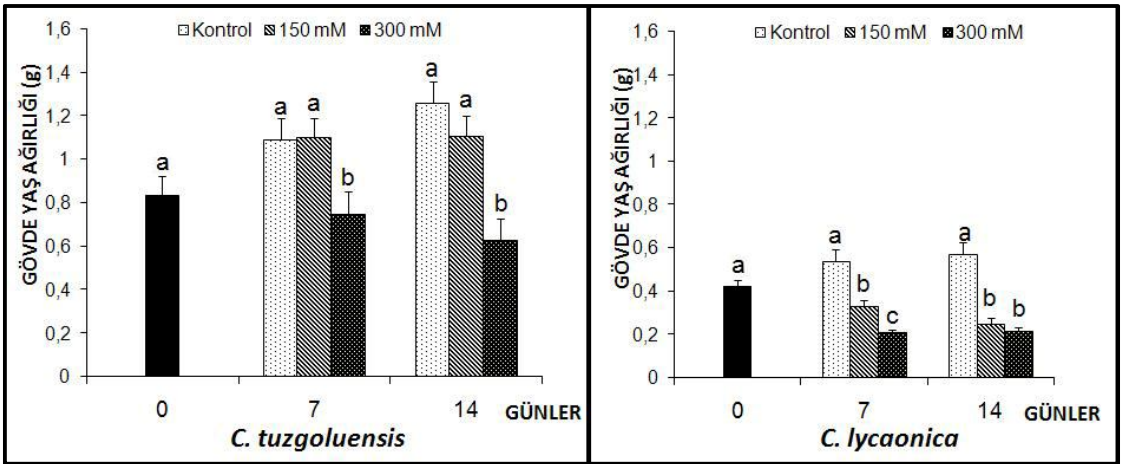
C. tuzgoluensis'in kök kuru ağırlıklarında 7. günde 150 mM NaCl'de % 30.88, 300 mM NaCl'de % 44.12 azalma meydana gelmiştir. *C. lycaonica*'nın kök kuru ağırlığı 7. günde 150 mM NaCl'de % 47.83, 300 mM'da ise % 77.39 azalmıştır.

Tuz stresi uygulamasının 14. gününde ise *C. tuzgoluensis*'deki bu azalma, 150 mM NaCl'de % 28.16, 300 mM NaCl'de % 52.11 iken, *C. lycaonica*'da, 150 mM'da % 65.96, 300 mM NaCl'de ise % 69.79 olarak saptanmıştır.

Kök büyümesindeki azalma, tuzluluk stresine karşı bitkilerin göstermiş olduğu ortak tepkilerden birisidir (Munns, 2002). *C. lycaonica*'nın kök yaş ve kuru ağırlıkları, *C. tuzgoluensis*'in kök yaş ve kuru ağırlıklarından daha fazla azalma göstermiştir. Hernandez ve ark. (1995), Dinar ve ark. (1999), Chartzoulakis ve Klapaki (2000); Naseer ve ark. (2001)'nın yapmış oldukları tuz stresi çalışmalarındaki kök yaş ve kuru ağırlıklarında azalma oranlarıyla ilgili veriler, bulgularımızı destekler niteliktedir.

4.1.3. Bitkilerin gövde yaş ve kuru ağırlıkları

C. tuzgoluensis ve *C. lycaonica*'nın tuz uygulamalarına bağlı olarak gövde yaş ağırlıklarında gözlenen değişimler şekil 4.14 ve çizelge 4.5'de verilmiştir.



Şekil 4.14. 7 ve 14 gün süreyle tuz stresine maruz bırakılan *C. tuzgoluensis* ve *C. lycaonica*'nın gövde yaş ağırlıklarında (g) gözlenen ortalama değişimler (n=10). Sütunlar üzerindeki aynı harfler, aynı tür içinde istatistiksel bakımdan farklı olmayan değerleri göstermektedir (P> 0.05)

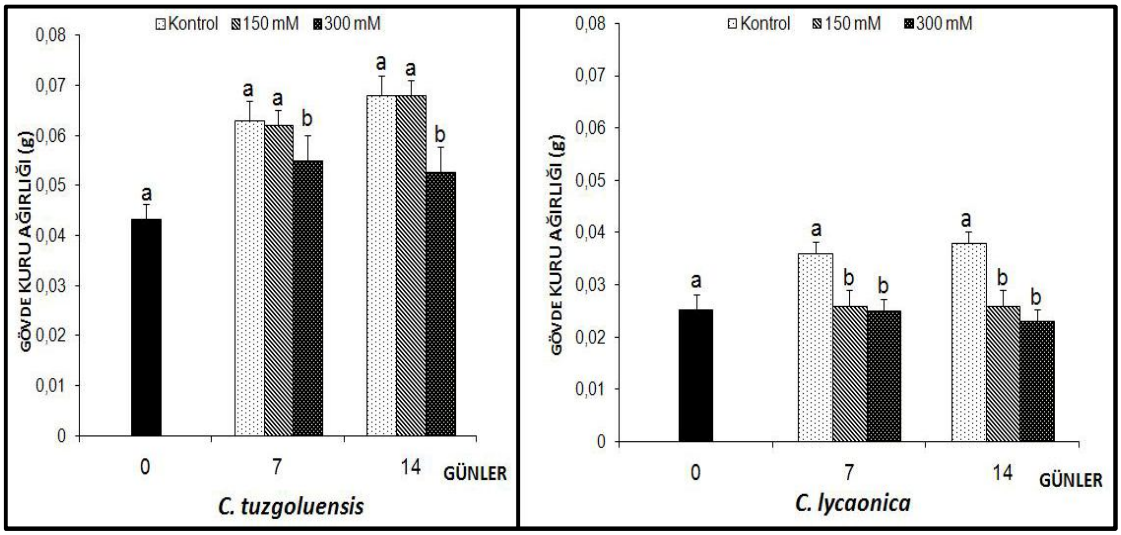
Çizelge 4.5. 7 ve 14 gün süreyle tuz stresine bırakılan *C. tuzgoluensis* ve *C. lycaonica*'nın gövde yaş ağırlıklarında (g) gözlenen ortalama değişimler (n=10). Rakamların yanlarındaki aynı harfler, istatistiksel bakımdan birbirinden farklı olmayan değerleri göstermektedir ($P > 0.05$)

	Gruplar	**0.Gün**	**7.Gün**	**14.Gün**
C. tuzgoluensis	Kontrol	0.832 ± 0.009^{a}	1.09 ± 0.24^{a}	1.26 ± 0.27^{a}
	150 mM NaCl		1.10 ± 0.134^{a}	1.11 ± 0.01^{a}
	300 mM NaCl		0.749 ± 0.034^{b}	0.628 ± 0.02^{b}
C. lycaonica	Kontrol	0.423 ± 0.013^{a}	0.54 ± 0.05^{a}	0.57 ± 0.06^{a}
	150 mM NaCl		0.33 ± 0.05^{b}	0.25 ± 0.02^{b}
	300 mM NaCl		0.21 ± 0.01^{c}	0.22 ± 0.02^{b}

C. tuzgoluensis'in gövde yaş ağırlığı, tuz uygulamasının 7. gününde 150 mM NaCl'den etkilenmezken, 300 mM NaCl'de % 31.2 azalmıştır. *C. lycaonica*'nın gövde yaş ağırlığı ise, kontrol grubuna göre 150 mM NaCl'de % 38.9, 300 mM NaCl'de % 61.1 azalmıştır.

Tuz stresi uygulamasının 14. gününde *C. tuzgoluensis*'in gövde yaş ağırlığında, 150 mM NaCl'de kontrole göre önemli bir azalma gözlenmezken, 300 mM NaCl'de % 49.96 azalma olmuştur. *C. lycaonica*'da azalma oranı, 150 mM NaCl'de % 56.1, 300 mM NaCl'de ise % 61.4'tür. Tuz stresinin uygulanma süresi ve konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak gövde yaş ağırlığında en fazla azalma, *C. lycaonica*'da tespit edilmiştir.

C. tuzgoluensis ve *C. lycaonica* bitkilerinin tuz uygulamalarına bağlı olarak gövde kuru ağırlıklarında meydana gelen değişimler şekil 4.15 ve çizelge 4.6'da verilmiştir.



Şekil 4.15. 7 ve 14 gün süreyle tuz stresine maruz bırakılan *C. tuzgoluensis* ve *C. lycaonica*'nın gövde kuru ağırlıklarında (g) gözlenen ortalama değişimler (n=10). Sütunlar üzerindeki aynı harfler, aynı tür içinde istatistiksel bakımdan farklı olmayan değerleri göstermektedir (P> 0.05)

Çizelge 4.6. 7 ve 14 gün süreyle tuz stresine bırakılan *C. tuzgoluensis* ve *C. lycaonica*'nın gövde kuru ağırlıklarında (g) gözlenen ortalama değişimler (n=10). Rakamların yanlarındaki aynı harfler, istatistiksel bakımdan birbirinden farklı olmayan değerleri göstermektedir (*P*> 0.05)

	Gruplar	**0.Gün**	**7.Gün**	**14.Gün**
C. tuzgoluensis	Kontrol	0.0432 ± 0.002^{a}	0.063 ± 0.009^{a}	0.068 ± 0.004^{a}
	150 mM NaCl		0.062 ± 0.005^{a}	0.068 ± 0.004^{a}
	300 mM NaCl		0.055 ± 0.005^{b}	0.0528 ± 0.005^{b}
C. lycaonica	Kontrol	0.0251 ± 0.002^{a}	0.036 ± 0.003^{a}	0.038 ± 0.002^{a}
	150 mM NaCl		0.026 ± 0.004^{b}	0.026 ± 0.004^{b}
	300 mM NaCl		0.025 ± 0.002^{b}	0.023 ± 0.003^{b}

150 mM NaCl stresine 7 gün maruz kalan *C. tuzgoluensis*'in gövde kuru ağırlığı kontrol grubuna göre değişmezken 300 mM tuz stresi altında % 12.7 oranında azalmıştır. *C. lycaonica*'da ise 7. günde 150 mM NaCl'de % 27.7, 300 mM NaCl'de % 30.6 azalmıştır.

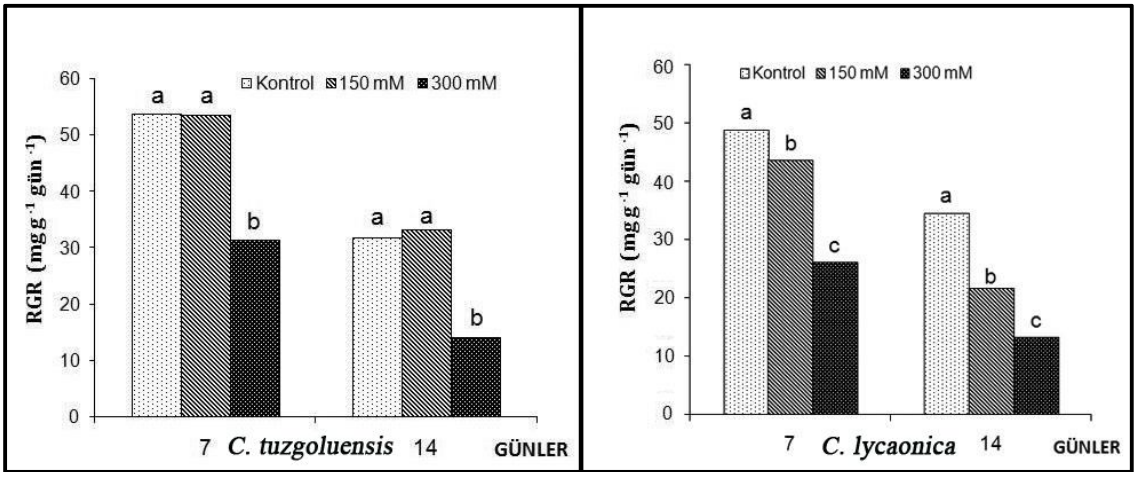
Tuz stresi uygulamasının 14. gününde *C. tuzgoluensis*'in gövde kuru ağırlığı kontrol grubuna göre değişmezken, 300 mM tuz stresi altında % 22.35 oranında azalmıştır. *C. lycaonica*'da ise 14. günde 150 mM NaCl'de % 31.6, 300 mM NaCl'de % 39.5 azalmıştır.

Gövde büyümesindeki azalma, tuzluluk stresine karşı bitkilerin göstermiş olduğu ortak bir tepkidir (Munns, 2002). Gövde yaş ve kuru ağırlıklarıyla ilgili bulgularımız, Seçkin ve ark. (2010)'nın *Hordeum* türlerinde yapmış oldukları tuz stresi uygulamalarından elde edilen gövde yaş ve kuru ağırlığı ile ilgili verilerle uyumluluk göstermektedir.

Tuz stresi, her iki türün büyüme parametrelerinde (Kök-gövde uzunluk, yaş-kuru ağırlık) azalmaya sebep olmuştur. Hossain ve ark. (2004), tuz stresinin, hücrelerde mitotik inhibisyona neden olduğunu bildirmişlerdir. *Centaurea* türlerinin büyüme parametrelerindeki azalmalar, tuz stresi uygulama süresi ve tuz konsantrasyonuna bağlı olarak artan mitotik inhibisyon ile ilişkili olabilir. *C. lycaonica* fidelerinin büyüme parametrelerinin daha fazla azalması, yüksek oranda artış gösteren mitotik inhibisyon ile bağlantılı olabilir.

4.1.4. Sürgün bağıl büyüme oranı (RGR)

C. tuzgoluensis ve *C. lycaonica*'nın tuz stresi uygulamalarına bağlı olarak sürgün bağıl büyüme oranları (RGR) şekil 4.16 ve çizelge 4.7'de verilmiştir.



Şekil 4.16. 7 ve 14 gün süreyle tuz stresine maruz bırakılan *C. tuzgoluensis* ve *C. lycaonica*'nın bağıl sürgün büyüme oranlarında (mg g^{-1} $gün^{-1}$) gözlenen ortalama değişimler (n=5). Sütunlar üzerindeki aynı harfler, aynı tür içinde istatistiksel bakımdan farklı olmayan değerleri göstermektedir (P> 0.05)

Çizelge 4.7. 7 ve 14 gün süreyle tuz stresine bırakılan *C. tuzgoluensis* ve *C. lycaonica*'nın bağıl sürgün büyüme oranlarında (mg g^{-1} $gün^{-1}$) gözlenen ortalama değişimler (n=10). Rakamların yanlarındaki aynı harfler, istatistiksel bakımdan birbirinden farklı olmayan değerleri göstermektedir (P> 0.05)

	Gruplar	**7.Gün**	**14.Gün**
C. tuzgoluensis	Kontrol	53.7 ± 11^{a}	31.8 ± 5^{a}
	150 mM NaCl	53.7 ± 15^{a}	33.2 ± 4^{a}
	300 mM NaCl	31.26 ± 13^{b}	14.1 ± 8^{b}
C. lycaonica	Kontrol	48.9 ± 13.7^{a}	34.4 ± 11.3^{a}
	150 mM NaCl	43.6 ± 16.5^{b}	21.6 ± 10.4^{b}
	300 mM NaCl	26.1 ± 16.7^{c}	13.2 ± 8.2^{c}

Tuz uygulaması yapılmayan her iki *Centaurea* türüne ait fidelerin 7. gündeki RGR oranları, 14. gündeki RGR oranlarından daha yüksektir. *C. tuzgoluensis*'in 14. gün kontrol grubunun RGR'si, 7. gün kontrol grubu ile karşılaştırıldığında % 40.78 oranında azalmıştır. *C. lycaonica*'nın 14. gün kontrol grubunun RGR'si, 7. gün kontrol grubu ile karşılaştırıldığında % 29.7 oranında azalmıştır. Normal şartlar altındaki bitkilerin 7. ve 14. gündeki RGR değerleri arasındaki bu farklılıklar, *C. tuzgoluensis* ve *C. lycaonica* türlerinin, 60-67 günlük periyotta aktif bir gelişim göstermekte olduğunu, 67-74 günlük periyotta ise gelişimlerinde hızlı bir azalmanın meydana geldiğini işaret etmektedir.

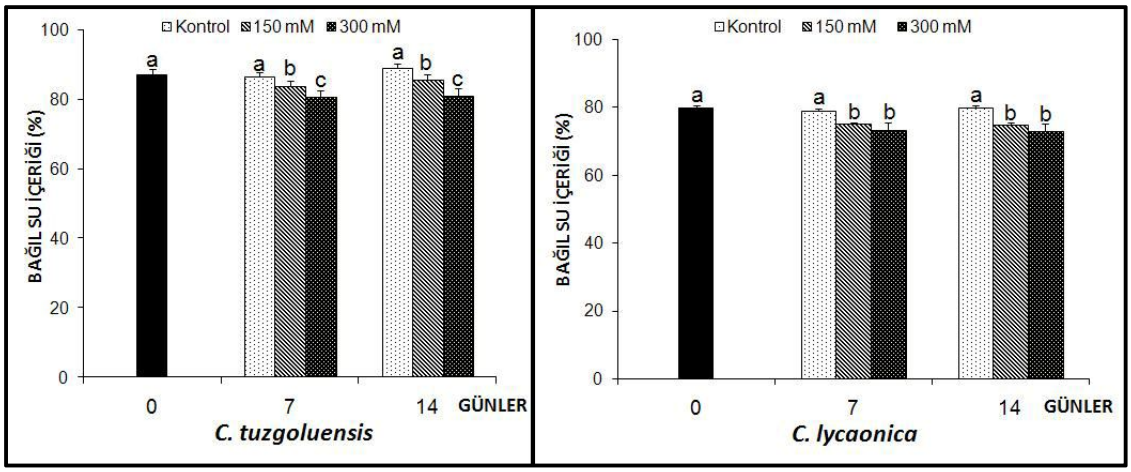
150 mM NaCl uygulanan *C. tuzgoluensis*'e ait grupların 7. ve 14. gün RGR'leri kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında önemli bir azalma görülmemiştir. Ancak 300 mM NaCl uygulanan grupların RGR'leri kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında 7. gün RGR'sinde % 41.8, 14. gün RGR'sinde % 55.7 oranında azalma meydana gelmiştir. Sonuçlarımıza benzer şekilde Hamed ve ark., (2007)'nın *Crithmum maritimum* L. türüne 300 mM NaCl uygulamaları bağıl gelişim oranını % 20.6 azaltırken, 150 mM NaCl, RGR'yi etkilememiştir. *C. lycaonica*'nın 150 mM NaCl uygulanan gruplarının 7. gün RGR'leri kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında % 10.8 oranında, 14. gün RGR'leri kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında % 37.2 oranında bir azalma görülmüştür. 300 mM NaCl uygulanan grupların RGR'leri kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında 7. gün RGR'sinde % 46.6, 14. gün RGR'sinde % 61.6 oranında azalma meydana gelmiştir.

RGR ile ilgili bulgularımıza benzer şekilde, tuza toleranslı çeltiğin (IR4630) 50 mM NaCl'deki RGR'sinde % 51.24 (Lutts ve ark., 1996), *Sorghum*'un 100 mM NaCl'deki RGR'sinde % 22.36 (Lacerda ve ark., 2005) azalma meydana geldiği rapor edilmiştir. Bu verilere göre *C. tuzgoluensis*'in RGR dereceleri tuza toleranslı bu iki

glikofitle karşılaştırıldığında, *C. tuzgoluensis*'in glikofitlerden daha fazla toleransa sahip olduğunu söyleyebiliriz. Seçkin ve ark. (2010)'nın arpa türleri üzerine yaptıkları çalışma sonuçlarına benzer şekilde, halofitik *C. tuzgoluensis*'in tuz stresine bağlı olarak RGR'sindeki azalma oranı, *C. lycaonica*'nın azalma oranından daha düşüktür.

4.1.5. Yaprakların bağıl su içerikleri (RWC)

C. tuzgoluensis ve *C. lycaonica* yapraklarının bağıl su içeriklerinde tuz uygulamalarına bağlı olarak oluşan değişimler Şekil 4.17 ve çizelge 4.8'de gösterilmiştir.



Şekil 4.17. 7 ve 14 gün süreyle tuz stresine maruz bırakılan *C. tuzgoluensis* ve *C. lycaonica*'nın yaprak bağıl içeriklerinde (RWC) gözlenen ortalama değişimler (%), (n=6). Sütunlar üzerindeki aynı harfler, aynı tür içinde istatistiksel bakımdan farklı olmayan değerleri göstermektedir (P> 0.05)

Çizelge 4.8. 7 ve 14 gün süreyle tuz stresine maruz bırakılan *C. tuzgoluensis* ve *C. lycaonica*'nın bağıl su içeriklerinde (RWC) gözlenen ortalama değişimler (%), (n=6). Rakamların yanlarındaki aynı harfler, istatistiksel bakımdan birbirinden farklı olmayan değerleri göstermektedir (*P*> 0.05)

	Gruplar	**0.Gün**	**7.Gün**	**14.Gün**
C. tuzgoluensis	Kontrol	86.93 ± 1.56^{a}	86.84 ± 1.93^{a}	88.81 ± 0.86^{a}
	150 mM NaCl		83.63 ± 1.77^{b}	85.68 ± 0.61^{b}
	300 mM NaCl		80.55 ± 3.3^{c}	81.01 ± 0.57^{c}
C. lycaonica	Kontrol	79.80 ± 0.49^{a}	79.06 ± 0.65^{a}	79.92 ± 0.48^{a}
	150 mM NaCl		75.03 ± 0.77^{b}	74.73 ± 0.82^{b}
	300 mM NaCl		73.13 ± 0.89^{b}	72.97 ± 2.19^{b}

Her iki türün bağıl su içeriği, tuz stresinin uygulama süresine ve konsantrasyonuna bağlı olarak azalmıştır. Bu azalma, *C. tuzgoluensis*'in kontrol grubuyla karşılaştırıldığında 7. günde 150 mM'da % 3.69, 300 mM NaCl'de ise % 7.24'tür. 14. günde ise bu azalma 150 mM'da % 3.52, 300 mM'da % 8.78 olarak kaydedilmiştir. *C. lycaonica*'nın kontrol grubuyla karşılaştırıldığında azalma oranları 7. günde 150 mM'da % 5.1, 300 mM NaCl'de ise % 7.5'dir. 14. günde ise bu oran, 150 mM'da % 6.49, 300 mM'da % 8.7'dir.

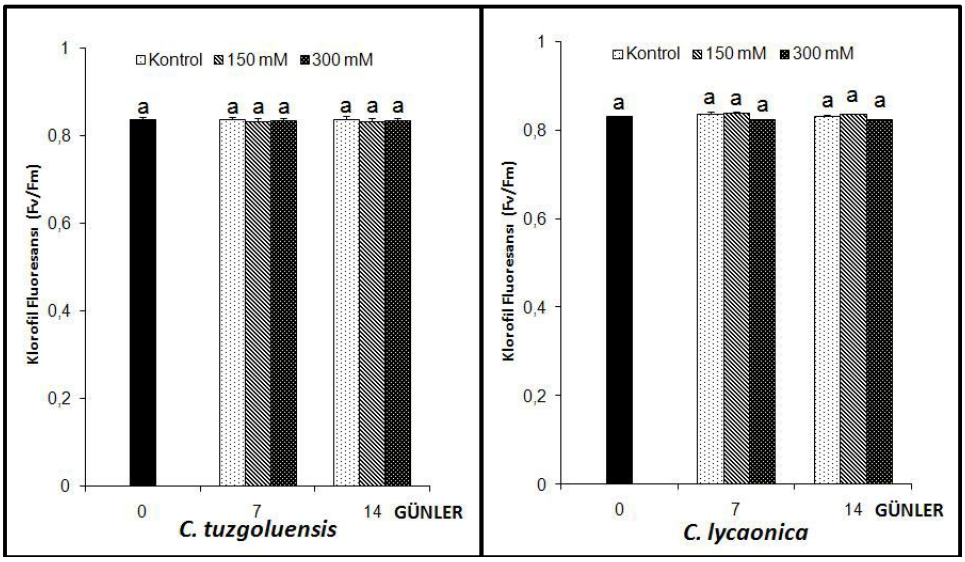
C. tuzgoluensis fidelerinin tuz stresine bağlı olarak RWC oranlarındaki azalma *C. lycaonica*'ya göre daha azdır. Buna bağlı olarak tuz stresi altındaki *C. tuzgoluensis* fidelerinin diğer türe nazaran su içeriklerini daha iyi koruyabilme yeteneğine sahip oldukları anlaşılmaktadır. Bu yetenek, yapraklardaki RWC ile yakından ilişki olduğu bilinen prolin birikimi (Claussen, 2005) ile bağlantılı olabilir. *C. tuzgoluensis*'e 150 ve 300 mM'lık tuz uygulamalarının 14. gününde, RWC oranlarındaki azalmaya paralel olarak prolin birikimleri artmaktadır. Bu sonuçlar, prolin birikiminin, *C. tuzgoluensis* hücrelerinin ozmotik potansiyelinin devam ettirilmesine yardımcı olabileceğini göstermektedir.

Kısacası, *C. tuzgoluensis*'in bağıl su içeriklerinin düzenlenmesi, stres şartları altında prolin birikiminden dolayı ozmotik düzenlemenin sonucu olabilir ve tuza toleranslı domates (Claussen, 2005) ve arpa (Veselov ve ark., 2008) çeşitlerinde yapılan tuz stresi çalışmalarından elde edilen bağıl su içeriği ile ilgili veriler bulgularımızı destekler niteliktedir.

4.1.6. Yapraklardaki klorofil fluoresans ölçümleri

Fotosentetik aygıtlar ve özellikle de PSII'nin, çeşitli çevresel streslere karşı duyarlı oldukları bilinmektedir. Bu aygıtlarda, herhangi bir yapısal zarar oluşmadan önce çevresel stresler, PSII'yi geçici olarak etkileyebilir (Force ve ark., 2003). Bu yüzden, çevresel faktörlere karşı bitkilerin tolerans derecelerinin ölçülmesinde bir indikatör olarak, PSII (Fv/Fm)'nin fotokimyasal etkinliğinin ölçülmesi kullanılabilir (Demiral ve Türkan, 2006; Sekmen ve ark., 2007).

Tuz stresinin *C. tuzgoluensis* ve *C. lycaonica*'nın fotosentetik verimi üzerine etkileri, uygulamanın 0., 7. ve 14. gününde ölçülen Fv/Fm değerlerine göre belirlenmiş olup şekil 4.18'de ve Çizelge 4.9'da gösterilmiştir.



Şekil 4.18. 7 ve 14 gün süreyle tuz stresine bırakılan *C. tuzgoluensis* ve *C. lycaonica*'nın fotosentetik veriminde gözlenen ortalama değişimler (n=6). Sütunlar üzerindeki aynı harfler, aynı tür içinde istatistiksel bakımdan farklı olmayan değerleri göstermektedir (P> 0.05)

Çizelge 4.9. 7 ve 14 gün süreyle tuz stresine maruz bırakılan *C. tuzgoluensis* ve *C. lycaonica*'nın fotosentetik veriminde gözlenen ortalama değişimler (n=6). Rakamların yanlarındaki aynı harfler, istatistiksel bakımdan birbirinden farklı olmayan değerleri göstermektedir (*P*> 0.05)

	Gruplar	**0.Gün**	**7.Gün**	**14.Gün**
C. tuzgoluensis	Kontrol	0.836 ± 0.006^{a}	0.836 ± 0.009^{a}	0.837 ± 0.004^{a}
	150 mM NaCl		0.833 ± 0.005^{a}	0.833 ± 0.004^{a}
	300 mM NaCl		0.834 ± 0.006^{a}	0.835 ± 0.003^{a}
C. lycaonica	Kontrol	0.830 ± 0.001^{a}	0.838 ± 0.004^{a}	0.831 ± 0.001^{a}
	150 mM NaCl		0.839 ± 0.004^{a}	0.836 ± 0.001^{a}
	300 mM NaCl		0.824 ± 0.001^{a}	0.824 ± 0.004^{a}

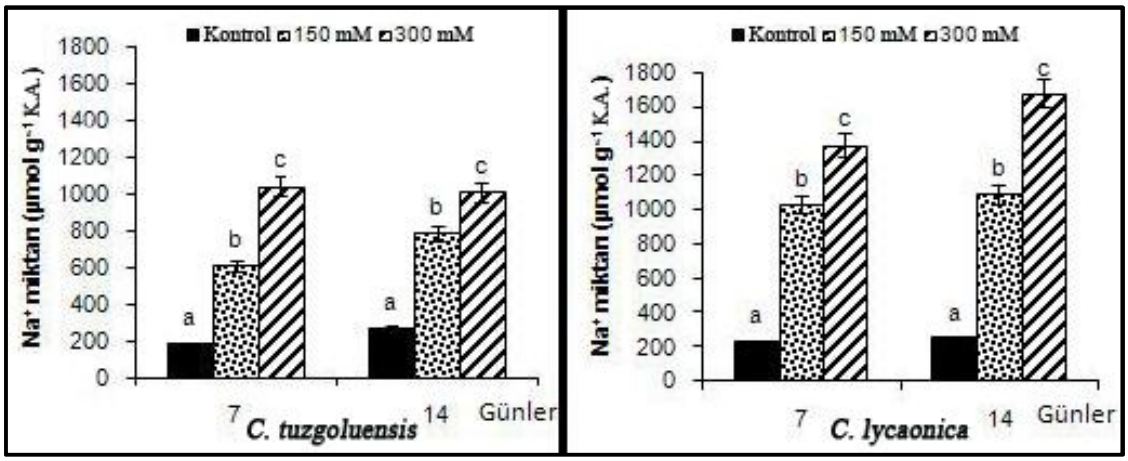
Çalışmamızda, tuz stresinin PSII aygıtı üzerindeki etkisini aydınlatmak için klorofil fluoresans değeri (Fv/Fm) ölçülmüştür. Tuz stresi uygulamalarının 7. ve 14. günündeki, her iki *Centaurea* türünün klorofil fluoresans değerlerinin 0.800'ün üzerinde çıkması PSII aygıtının etkinliklerinin optimal düzeyde olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar tuz stresi altındaki her iki türde de PSII'nin fotosentetik etkinliğinin iyi bir şekilde korunduğunu göstermektedir. Bulgularımıza benzer şekilde arpa türlerinde (Seçkin ve ark., 2010), salatalık fidelerinde (Zhu ve Bie, 2007), semizotu genotiplerinde (Yazıcı, 2005) ve mısır çeşitlerinde (Shabala ve ark, 1998) tuz stresi uygulamalarının PSII'nin etkinliği üzerine olumsuz etkilerinin bulunmadığı bildirilmiştir.

4.2. Bitki Sürgünlerindeki İyon Konsantrasyonları

Tuz stresi altındaki *C. tuzgoluensis* ve *C. lycaonica* Na^+, K^+, Ca^{+2} ve Cl^- iyon konsantrasyonlarında meydana gelen değişimler grafikler üzerinde gösterilmiştir (Şekil 4.19, 4.20, 4.21, 4.22).

4.2.1. Yaprakların sodyum (Na^+) ve klor (Cl^-) içeriklerindeki değişiklikler

Her iki türün tuzsuz şartlarda büyütülmesi durumunda 7. ve 14. gün hasatlarındaki Na^+ iyonlarının konsantrasyonları arasında önemli bir farklılık gözlenmemiştir. Tuz stresi uygulama süresi ve artan tuz konsantrasyonu, Na^+ miktarında her iki türde de önemli derecede artışa neden olmuştur (Şekil 4.19).

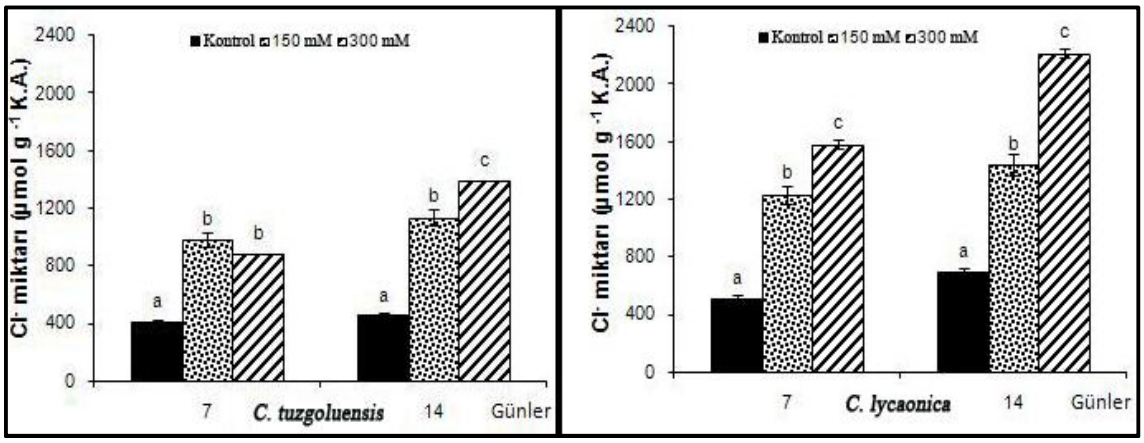


Şekil 4.19. 7 ve 14 gün süreyle tuz stresine bırakılan *C. tuzgoluensis* ve *C. lycaonica*'nın Na^+ iyon konsantrasyonlarında (µmol g^{-1} kuru ağırlık) gözlenen ortalama değişimler. Sütunlar üzerindeki aynı harfler, aynı tür içinde istatistiksel bakımdan farklı olmayan değerleri göstermektedir (P> 0.05)

C. tuzgoluensis'in Na^+ konsantrasyonlarındaki en fazla artış, 14 gün boyunca 300 mM NaCl uygulanan gruplarda görülmüş olup Na^+ miktarı 1006.7 µmol g^{-1} K.A.'tır. 150 mM'da Na^+ miktarı ise 784.1 µmol g^{-1} K.A.'tır.

C. lycaonica'nın Na^+ miktarındaki en fazla artış, 14 gün süreyle 300 mM NaCl uygulanan gruplarda tespit edilmiştir. Buna göre 14. günde Na^+ miktarındaki artış, 150 mM'da kontrol grubunun 4.3 katı (1088.5 µmol g^{-1} K.A.), 300 mM NaCl'de ise 6.7 katı (1676.1 µmol g^{-1} K.A.) kadardır.

Tuz stresinin uygulanma süresi ve artan tuz konsantrasyonlarına bağlı olarak, her iki türün Cl^- içeriklerinde artış görülmektedir. *C. lycaonica*'daki artışın, halofitik türe göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.20).



Şekil 4.20. 7 ve 14 gün süreyle tuz stresine bırakılan *C. tuzgoluensis* ve *C. lycaonica*'nın Cl^- iyon konsantrasyonlarında gözlenen ortalama değişimler. Sütunlar üzerindeki aynı harfler, aynı tür içinde istatistiksel bakımdan farklı olmayan değerleri göstermektedir (P> 0.05)

C. tuzgoluensis'in 7 gün boyunca kontrol, 150 ve 300 mM tuz uygulanan gruplarının klor içerikleri sırasıyla 401.3, 979.9 ve 880.7 µmol g^{-1} K.A.'tır. 14 gün boyunca kontrol, 150 ve 300 mM tuz uygulanan gruplarının klor içerikleri ise 447.1 ve 1391.7 µmol g^{-1} K.A.'tır.

C. lycaonica'nın 7 gün boyunca kontrol, 150 ve 300 mM tuz uygulanan gruplarının, klor içerikleri sırasıyla 505.9, 1234.3 ve 1581.3 µmol g^{-1} K.A.'dır. 14 gün boyunca kontrol, 150 ve 300 mM tuz uygulanan gruplarının klor içerikleri ise 688.8, 1142.3 ve 2216.5 µmol g^{-1} K.A. olarak belirlenmiştir.

Tuzsuz şartlarda yetiştirilen her iki türe ait bitkilerde Cl^- iyonlarının miktarı, Na^+ iyonlarının miktarından daha fazladır. *C. tuzgoluensis* yapraklarının Cl^- iyonlarının konsantrasyonları 7 günlük uygulama süresinde Na^+ iyonlarının konsantrasyonlarının 2.17 katı, 14 günlük uygulama süresinde ise 1.68 katıdır. *C. lycaonica*'nın yapraklarında ise 7 günlük uygulama süresinde Cl^- iyonları Na^+ iyonlarının 2.21 katı, 14 günlük uygulama süresinde ise 2.74 katıdır.

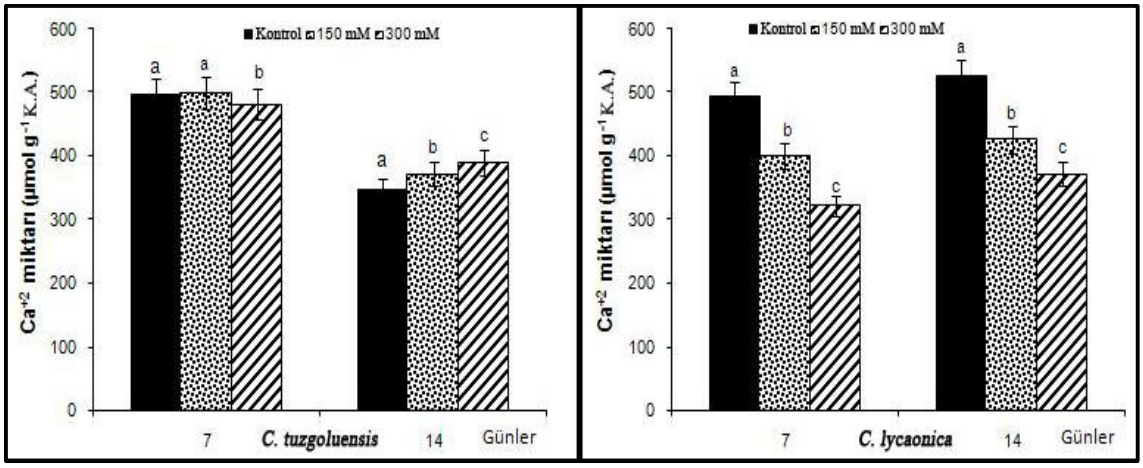
Tuz stresi uygulanan her iki türünde Na^+/Cl^- oranları, artan NaCl konsantrasyonuna bağlı olarak artış göstermiştir. 14 gün süreyle *C. tuzgoluensis*'in kontrol, 150 ve 300 mM tuz uygulanan grupların Na^+/Cl^- oranları sırasıyla 0.60, 0.73 ve

0.78'dir. *C. lycaonica*'da ise 14 gün sonunda kontrol, 150 ve 300 mM tuz uygulanan grupların Na^+/Cl^- oranları ise 0.37, 0.75 ve 0.76'dır.

Tuz stresinin bitki metabolizması üzerine spesifik etkileri, yapraklarda toksik Na^+ ve Cl^- iyonlarının birikimi ile ilgili olarak yaprak senesensi üzerinedir (Kingsburry ve Epstein, 1986; Rengel, 1992). Dikotil halofitlerin tuz toleransı, bitki dokularında yüksek oranda iyonları depolayabilme, bu iyonları turgor durumunun sürdürülmesinde ve ozmotik düzenlemelerde kullanabilme yeteneklerine bağlıdır (Flowers ve ark., 1977). Bitki yapraklarındaki Na^+ ve Cl^- iyonu içeriklerinin, *C. lycaonica*'da, halofitik *C. tuzgoluensis*'ten, daha fazla olduğu tespit edilmiştir. *C. tuzgoluensis* ve *C. lycaonica*'nın uzun süreli tuz uygulanmasıyla gelişimlerindeki indirgenme, tuzun ozmotik ve iyonik etkilerinden dolayı olabilir. Bu indirgenme durumu, yapraklardaki RWC'nin azalması, Na^+ ve Cl^- iyonlarının artışı ile desteklenebilir (Munns ve Tester, 2008; Türkan ve Demiral, 2009).

4.2.2. Yaprakların kalsiyum (Ca^{+2}) içeriklerindeki değişiklikler

7 ve 14 gün süreyle 150 ve 300 mM tuz stresine maruz bırakılan *C. tuzgoluensis* ve *C. lycaonica*'nın Ca^{+2} iyon konsantrasyonlarında gözlenen değişimler şekil 4.21'te belirtilmiştir.



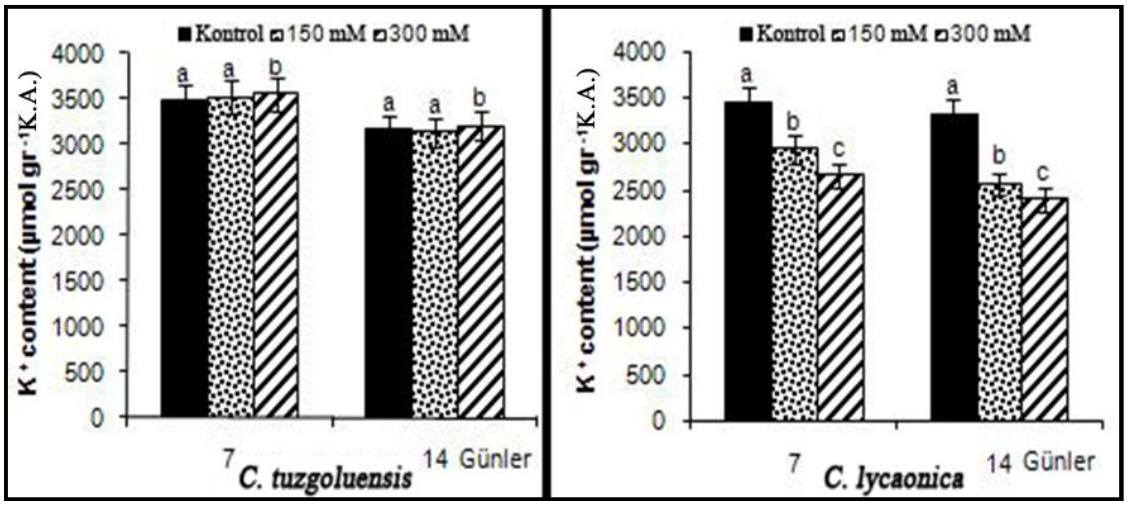
Şekil 4.21. 7 ve 14 gün süreyle tuz stresine bırakılan *C. tuzgoluensis* ve *C. lycaonica*'nın Ca^{+2} iyon konsantrasyonlarında gözlenen ortalama değişimler. Sütunlar üzerindeki aynı harfler, aynı tür içinde istatistiksel bakımdan farklı olmayan değerleri göstermektedir (P> 0.05)

C. tuzgoluensis'in tuz stresine bağlı olarak Ca^{+2} içerikleri, 7 gün boyunca 300 mM NaCl uygulanan gruplar haricindeki diğer tüm gruplarda artış göstermiştir. *C. lycaonica*'da ise artan tuz stresine bağlı olarak tüm gruplarda Ca^{+2} içeriği azalmıştır. *C. tuzgoluensis*'in 14 gün boyunca kontrol, 150 ve 300 mM tuz uygulanan gruplarının Ca^{+2} içerikleri sırasıyla 347.1, 372.7 ve 391.03 µmol g^{-1} K.A.'dır. *C. lycaonica*'nın 14 gün boyunca kontrol, 150 ve 300 mM tuz uygulanan gruplarının Ca^{+2} içerikleri ise sırasıyla 526.4, 426.6 ve 372.2 µmol g^{-1} K.A.'dır.

Ca^{+2} iyonlarının yetersizliği, hücre membranlarının bütünlüğünü ve seçiciliğini bozarak, dokularda Na^{+} iyonlarının pasif olarak depolanmasına neden olur (Hu ve Schmidhalter, 2005). Buna göre *C. lycaonica*'da Ca^{+2} iyonlarındaki azalmaya bağlı olarak hücre membran yapısının, *C. tuzgoluensis*'e göre daha fazla bozulduğunu ve hücrelerdeki Na^{+} iyonu içeriğinin artışının temel sebeplerinden birisinin Ca^{+2} iyonlarındaki azalmaya bağlı olabileceği söylenebilir.

4.2.3. Yaprakların potasyum (K^{+}) içeriklerindeki değişiklikler

Tuz stresi uygulamasına bağlı olarak her iki *Centaurea* türünün K^{+} içeriklerindeki değişiklikler şekil 4.22'de gösterilmiştir.



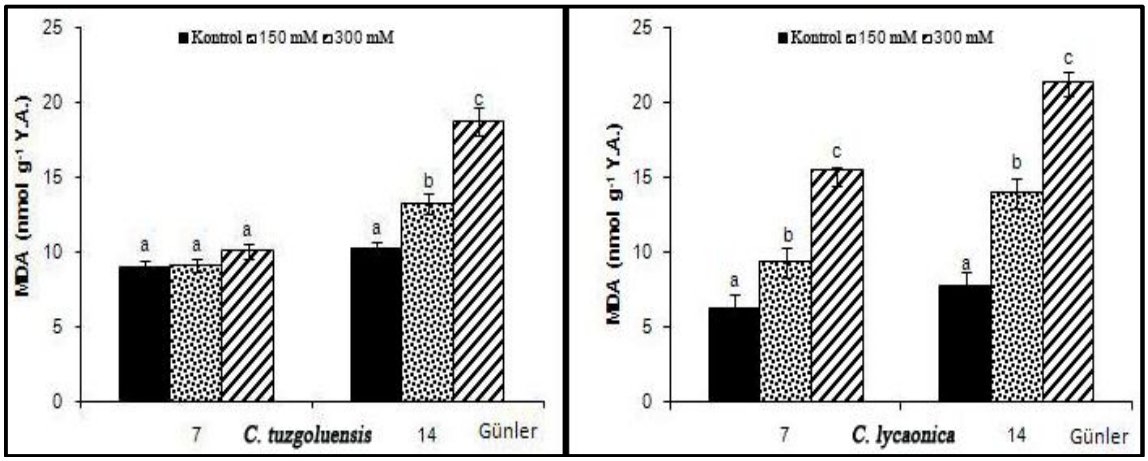
Şekil 4.22. 7 ve 14 gün süreyle tuz stresine maruz bırakılan *C. tuzgoluensis* ve *C. lycaonica*'nın K^{+} iyon konsantrasyonlarında gözlenen ortalama değişimler. Sütunlar üzerindeki aynı harfler, aynı tür içinde istatistiksel bakımdan farklı olmayan değerleri göstermektedir (P> 0.05)

Tuzsuz şartlarda yetiştirilen her iki türe ait bitkilerin K^+ içerikleri, Na^+ ve Cl^- iyon konsantrasyonlarından daha yüksektir. *C. tuzgoluensis*'in K^+ içerikleri, 150 mM tuz stresi uygulanan gruplarda değişmezken, 300 mM tuz stresi uygulanan gruplarda çok az artmıştır. *C. tuzgoluensis*'in 150 mM NaCl altında gelişebilme yeteneği, K^+ iyonlarının alınımı, hücre genişlemesinin ve turgor durumunun devam ettirilmesiyle ilişkili olabilir. *C. lycaonica*'da ise tuz stresi uygulamalarına bağlı olarak tüm grupların K^+ içerikleri azalmıştır. Bu azalmanın 14 gün süreyle 300 mM NaCl uygulanan gruplarda en fazla olduğu tespit edilmiştir. Kontrole göre azalma oranı ise % 29.3'tür. Çakmak (2005)'a göre hücresel seviyedeki K^+ yetersizliği, tuzla indüklenmiş oksidatif stresi artırıcı yönde etki eder ve hücre zararına neden olabilir. *C. lycaonica*'nın MDA seviyelerindeki artış ve K^+ iyonlarındaki azalış Çakmak'ın çalışmasını destekler niteliktedir.

Yüksek K^+/Na^+ oranı, tuzluluğa karşı bitkilerin gelişiminde meydana gelen azalmayı minimuma düşürmek için iyi bir düzenleme stratejisidir (Çakmak, 2005). Her iki *Centaurea* türünde de artan tuz konsantrasyonu, K^+/Na^+ oranını azaltmaktadır. *C. tuzgoluensis*'in kontrol grubunun K^+/Na^+ oranı, 14 gün boyunca 300 mM NaCl uygulanan grupların K^+/Na^+ oranının 3.7 katı iken, *C. lycaonica*'nın kontrol gruplarının K^+/Na^+ oranları, 300 mM NaCl uygulanan grupların 7.6 katıdır. K^+/Na^+ oranındaki azalmaya göre bulgularımız, Amor ve ark. (2005)'nın ve Ertürk ve ark. (2007)'nın çalışmalarıyla birebir örtüşmektedir.

4.3. Yapraklardaki Lipid Peroksidasyon Seviyeleri

Lipid peroksidasyonu, hücre düzeyinde tuz stresinin neden olduğu hasarın bir göstergesidir (Hernandez ve Almansa, 2002). MDA içeriklerinin belirlenmesi ve membran lipidlerinin peroksidasyon seviyeleri, tuzla indüklenen oksidatif stresin şiddetinin ve bitki duyarlılık derecelerinin değerlendirilmesinde önemli bir yere sahiptir (Bor ve ark., 2003; Perez-Lopez ve ark., 2009). Her iki *Centaurea* türünün, malondialdehit (MDA) miktarında meydana gelen değişimler şekil 4.23'da gösterilmiştir.



Şekil 4.23. *C. tuzgoluensis* ve *C. lycaonica*'nın malondialdehit miktarında (nmol g^{-1} Y.A.) meydana gelen ortalama değişimler (n=6). Sütunlar üzerindeki aynı harfler, aynı tür içinde istatistiksel bakımdan farklı olmayan değerleri göstermektedir (P> 0.05)

7 gün boyunca 150 ve 300 mM tuz stresi altındaki *C. tuzgoluensis*'in lipid peroksidasyon düzeyi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli bir değişim gözlenmezken, *C. lycaonica*'da MDA seviyesi 150 mM tuz stresi altında % 49.6, 300 mM'da ise % 148.7 artmıştır.

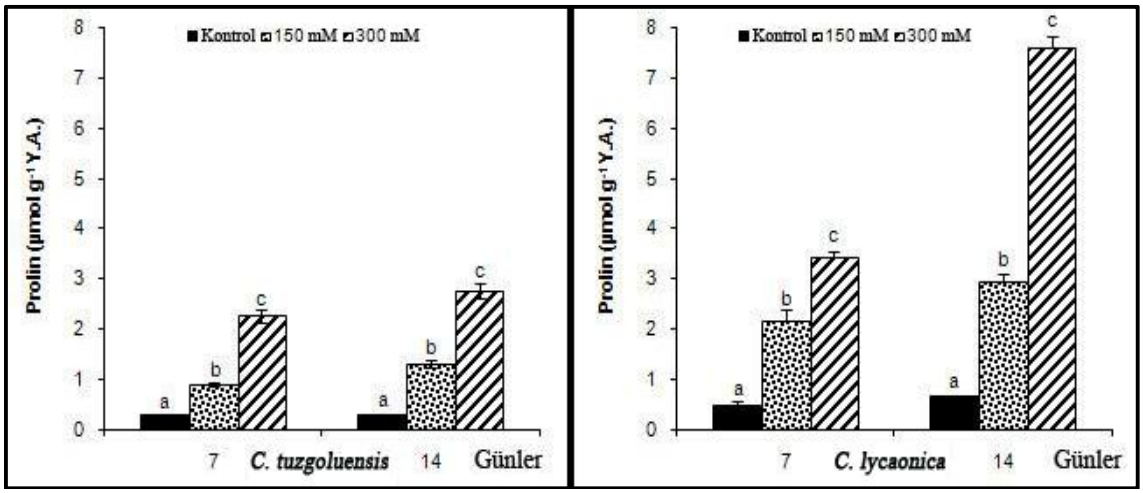
Kısa süreli tuz uygulanması ile peroksidasyon seviyelerinin değişmediğini gösteren önceki bulgularla, *C. tuzgoluensis*'in MDA sonuçları uyumlu olmakla beraber, tuzlulukla başa çıkabilen toleranslı bitkilerin lipid peroksidasyon seviyelerinin değişmemesi karakteristik bir özelliktir (Seçkin ve ark., 2010). Düşük MDA seviyeleri, tuza toleranslı bitkilerde membran işlevselliğiyle yakından ilişkilidir. Bu nedenle *C. tuzgoluensis*'e kısa süreli tuz uygulamasında, MDA içeriklerinin değişmemesinden dolayı membran fonksiyonelliğinin sürdürülmesi, *Crithmum maritimum* L. (Amor ve ark., 2005) ve *Suaeda salsa* Pall. (Cai-Hong ve ark., 2005; Qiu-Fang ve ark., 2005) bitkilerinde olduğu gibi tuz teşvikli oksidatif zarara karşı, yeterli antioksidan sistem tepkileriyle bağlantılı olabilir. Kısa süreli tuz uygulamasının *C. tuzgoluensis*'in MDA seviyesinde değişikliğe sebep olmaması, tuza toleranslı bitkilerin daha iyi korunduğunu göstermektedir.

Uzun süreli tuz stresi uygulamaları her iki türün MDA seviyelerini artırmıştır. Ancak *C. lycaonica*'nın lipid peroksidasyonunda meydana gelen artış halofitik türümüzden daha fazladır. Tuz uygulamasının 14. gününde, *C. tuzgoluensis*'in MDA seviyesi 150 mM tuz stresi altında kontrol grubuna göre % 30, 300 mM tuz stresi altında ise % 84 artmıştır. Tuz uygulamasının 14. gününde *C. lycaonica*'nın MDA seviyesi 150 mM tuz stresi altında kontrol grubuna göre % 79.9, 300 mM tuz stresi

altında ise % 175.7 artmıştır. Bu durum, *C. lycaonica* yapraklarındaki tuz stresine bağlı olarak daha fazla oksidatif hasar oluşumu, antioksidatif enzim sisteminin, tuzun zararlı etkilerinin uzaklaştırılmasında yetersiz kalmasıyla ilişkilendirilebilir. Tuz stresine karşı *C. tuzgoluensis*'in daha iyi bir tepki vermesinde, SOD, CAT, POX, GR ve APX enzimlerinin total aktivite ve yoğunluklarındaki artışın katkı sağladığı görülmektedir. Bulgularımıza benzer şekilde antioksidan enzim aktiviteleri ve izozimlerindeki artış ile lipid peroksidasyonu arasındaki ilişki, Seçkin ve ark. (2009), Sekmen ve ark. (2007), Bor ve ark. (2003) ve Hernandez ve Almansa (2002) tarafından da rapor edilmiştir.

4.4. Yapraklardaki Prolin Seviyeleri

Stres altında bitkilerde biriken en yaygın ozmolitlerden birisi prolindir. Prolin sadece bir ozmotik düzenleyici değil bunun yanı sıra fotosentetik aygıtın koruyucusu ve bir antioksidan olarak görev yapmaktadır (Verbruggen ve Hermans, 2008). Prolin birikimi, birçok bitkide, biyotik ve abiyotik streslere karşı yaygın bir fizyolojik tepkidir (Verbruggen ve Hermans, 2008). Tuz stresi altındaki *C. tuzgoluensis* ve *C. lycaonica*'nın prolin konsantrasyonlarında meydana gelen değişimler şekil 4.24'de gösterilmiştir.



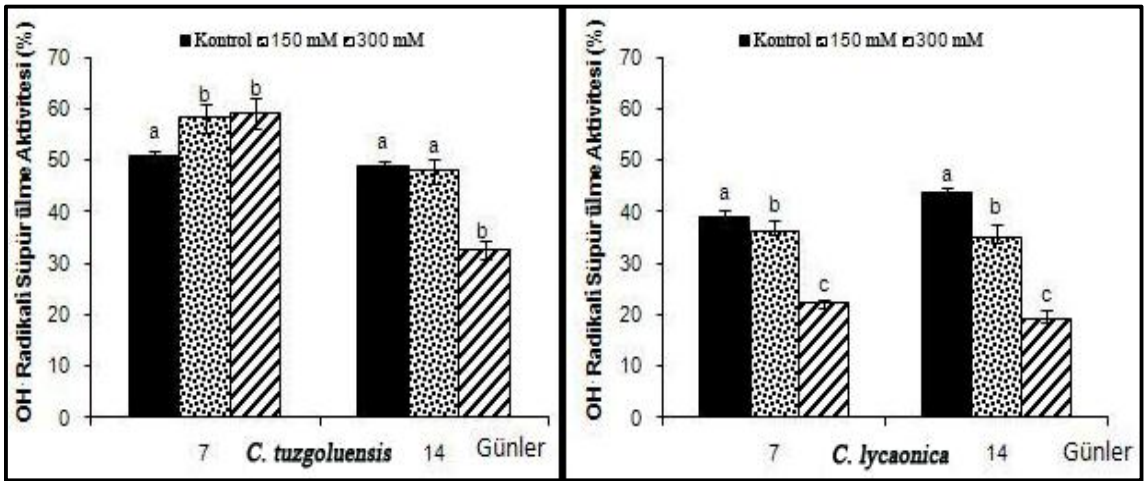
Şekil 4.24. 7 ve 14 gün süreyle tuz stresine bırakılan *C. tuzgoluensis* ve *C. lycaonica*'nın prolin miktarlarında (µmol g^{-1} Y.A.) gözlenen ortalama değişimler. Sütunlar üzerindeki aynı harfler, aynı tür içinde istatistiksel bakımdan farklı olmayan değerleri göstermektedir (P> 0.05)

C. tuzgoluensis'in 7. ve 14. gün hasatlarındaki kontrol gruplarının prolin seviyeleri değişmezken, *C. lycaonica*'nın kontrol gruplarında artış meydana gelmiştir. *C. tuzgoluensis*'e 7 gün süreyle 150 ve 300 mM tuz uygulanan gruplarda prolin seviyeleri kontrole göre sırasıyla 3.14 ve 8 kat, *C. lycaonica*'da ise 4.7 ve 7.48 kat artmıştır. 14 gün süreyle 150 ve 300 mM tuz uygulanan *C. tuzgoluensis*'in prolin seviyeleri kontrole göre sırasıyla 4.76 ve 10.03 kat, *C. lycaonica*'da ise 4.49 ve 11.6 kat artmıştır.

Çalışmamızda her iki *Centaurea* türünde de uygulanan tuz konsantrasyonuna ve süresine bağlı olarak prolin seviyelerinde artış meydana gelmiştir. Prolin seviyelerindeki artışların her iki türde tuz stresinin ozmotik etkilerini azaltmada yardımcı olabileceği söylenebilir. Tuza toleranslı bitkilerin büyük bir çoğunluğunun prolin seviyeleri tuza duyarlı türlere nazaran daha yüksektir. Ancak çalışmamızdaki prolin seviyesindeki en fazla artış, 14 gün süresince 300 mM NaCl uygulanan *C. lycaonica* fidelerinde tespit edilmiştir. Bulgularımıza benzer şekilde Poustini ve ark. (2007), otuz ekmeklik buğday çeşidinde yapmış oldukları çalışmada, yaprak dokularındaki tuz stresinin prolin birikiminde artışa neden olduğunu bildirmişlerdir. Prolin birikimi tuza toleranslı 19 buğday çeşidinde 5.2 kat artarken, tuza hassas çeşitlerde 13.8 kat artmıştır. Üstelik tuz stresine en duyarlı çeşit olan *Ghods*'ta prolin birikimi 27.4 kat artmıştır. Aynı şekilde tuza toleranslı çeltik genotipine göre hassas çeşitlerde prolin daha fazla miktarda biriktiği rapor edilmiştir (Lutts ve ark., 1999).

4.5. Yaprakların Hidroksil ($OH^{\bullet}$) Radikali Süpürülme Aktiviteleri

Reaktif oksijen türleri arasında hidroksil ($OH^{\bullet}$) radikalleri, protein, DNA ve makromoleküller gibi önemli bileşiklerde oluşturduğu hasar açısından en zararlı radikaldir. Tuz stresi altındaki *C. tuzgoluensis* ve *C. lycaonica* yapraklarının $OH^{\bullet}$ radikali süpürülme aktivitelerinde meydana gelen değişimler şekil 4.25'de gösterilmiştir.



Şekil 4.25. 7 ve 14 gün süreyle tuz stresine bırakılan *C. tuzgoluensis* ve *C. lycaonica* yapraklarının hidroksil ($OH^{\bullet}$) radikali süpürülme aktivitelerinde (%) gözlenen ortalama değişimler. Sütunlar üzerindeki aynı harfler, aynı tür içinde istatistiksel bakımdan farklı olmayan değerleri göstermektedir ($P > 0.05$)

C. tuzgoluensis'in 7 gün süreyle 150 ve 300 mM tuz uygulanan gruplarındaki $OH^{\bullet}$ radikali süpürülme aktivitesi kontrole göre artış göstermekte olup bu artış sırasıyla % 14.48 ve % 15.94'tür. 14 gün boyunca 150 mM tuz uygulanan *C. tuzgoluensis* fidelerinde $OH^{\bullet}$ radikali süpürülme aktivitesi, kontrole göre önemli bir azalma göstermezken, 300 mM tuz uygulanan gruplarda % 33.3 azalma meydana gelmiştir. *C. lycaonica* fidelerine 7 ve 14 gün süreyle 150 ve 300 mM tuz uygulanması, $OH^{\bullet}$ radikali süpürülme aktivitesinde kontrole göre önemli derecede azalma meydana getirmiştir. 7 gün süreyle 150 ve 300 mM tuz uygulanan *C. lycaonica* gruplarının kontrole göre $OH^{\bullet}$ radikali süpürülme aktivitesindeki azalma sırasıyla % 6.5 ve % 42.41'dir. 14 gün boyunca 150 ve 300 mM tuz uygulanan *C. lycaonica* fidelerinde $OH^{\bullet}$ radikali süpürülme aktivitesindeki kontrole göre azalma oranı, sırasıyla % 19.56 ve % 55.58'dir.

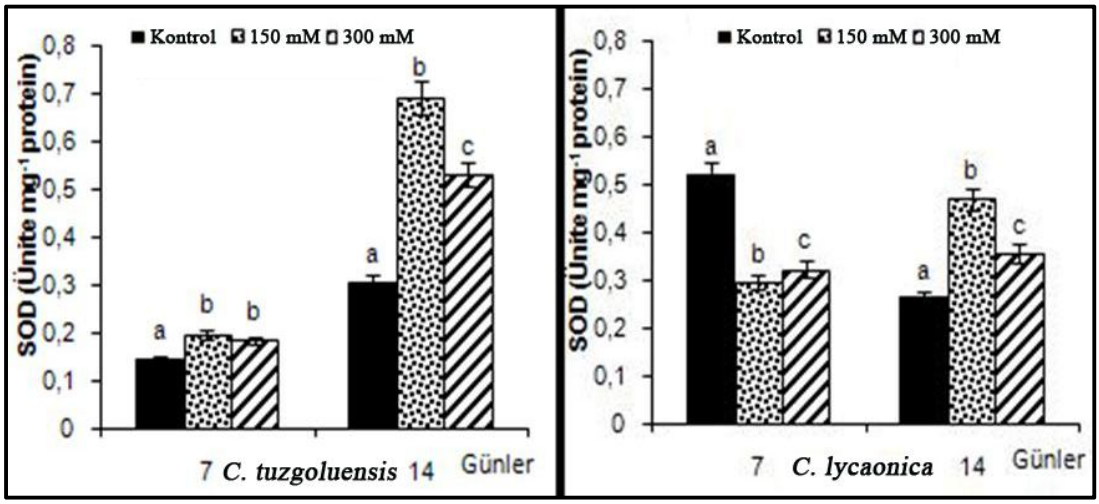
Kısa süreli tuz stresi uygulamaları, *C. tuzgoluensis*'in $OH^{\bullet}$ radikali süpürülme aktivitesini kontrole göre artırırken, *C. lycaonica*'da ise azaltmıştır. Bu radikalin süpürülme aktivitesinin azalması, lipid peroksidasyon düzeyindeki artışla paralel olabilir (Özfidan, 2010). *C. tuzgoluensis*'e kısa süreli tuz uygulamaları, $OH^{\bullet}$ radikali süpürülme aktivitesini artırırken, MDA seviyelerini etkilememesi, Özfidan (2010)'nın bulgularını destekler niteliktedir. Uzun süreli tuz stresi uygulamaları ise her iki türün $OH^{\bullet}$ radikali süpürülme aktivitesini azaltmıştır. Tuz stresinin hücre zarlarında oluşturduğu lipid peroksidasyonu, $OH^{\bullet}$ radikalinin süpürülme aktivitesindeki azalışa bağlanabileceği gibi, katalitik demir birikiminden de (Jiang ve Zhang, 2001) kaynaklanabilmektedir (Özfidan, 2010).

4.6. Antioksidan Enzim Aktivite Sonuçları

4.6.1. Süperoksit dismutaz (SOD) aktivite sonuçları

Her iki *Centaurea* türünün total SOD aktivitelerini tespit etmek için jellere 75 µg'lık protein içeren örnekler ve 0.5 ünite SOD standardı pipetlenmiştir. Yürütme işleminden sonra Bio-Profil Bio-1D Windows Application V11.9 yazılımı ile densiyometrik analiz yapılarak 0.5 ünite SOD standardına karşılık gelen hacime göre total SOD aktivitesi (Şekil 4.26) ve SOD izozimlerinin densiyometrik analizleri ile stres faktörü uygulanmış grupların aktivite değerleri, kontrol gruplarıyla kıyaslanarak % olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.10 ve 4.11).

Normal koşullar altında, kontrol gruplarının total SOD aktivitesi *C. lycaonica*'da *C. tuzgoluensis*'den daha yüksektir. 7 gün süresince 150 ve 300 mM tuz uygulamaları, *C. tuzgoluensis*'te kontrole göre % 36.20 ve % 27.50 artış gösterirken, *C. lycaonica*'da % 43.07 ve % 37.50 azalma meydana getirmiştir. 14 gün süresince tuz uygulamaları sonucunda her iki türde de en fazla total SOD aktivitesi artışı 150 mM'da görülmüş olup, *C. tuzgoluensis*'te kontrolün 2.26 katı, *C. lycaonica*'da ise 1.79 katıdır. 300 mM NaCl uygulamasının 14. gününde her iki *Centaurea* türünde de total SOD aktivitesinde artış tespit edilmiş olup, bu artış, *C. tuzgoluensis*'de kontrolle kıyaslandığında % 73.10, *C. lycaonica*'da ise % 35.61 oranındadır (Şekil 4.26). *C. tuzgoluensis*'in 14 gün boyunca tuz uygulanan gruplarında görülen en yüksek SOD aktivitesi, türün tuz toleransı için SOD'un ekspresyonundaki artışın temel olduğunu göstermektedir. SOD aktivitesindeki bu artış, elektron taşıma zincirinden elektron sızıntıları sonucunda $O_2^{\bullet-}$ radikallerinin üretimindeki artışı yansıtabilir. Bu durum daha önceden *Cakile maritima* Scop. (Amor ve ark., 2006; Amor ve ark., 2007) ve *Plantago maritima* L. (Sekmen ve ark., 2007) gibi diğer halofitik bitkilerden elde edilen bulgularda da kabul edilmektedir.



Şekil 4.26. 7 ve 14 gün süreyle tuz stresine maruz bırakılan *C. tuzgoluensis* ve *C. lycaonica* fidelerinin total SOD aktivite değişimleri. Sütunlar üzerindeki aynı harfler, aynı tür içinde istatistiksel bakımdan farklı olmayan değerleri göstermektedir (P> 0.05)

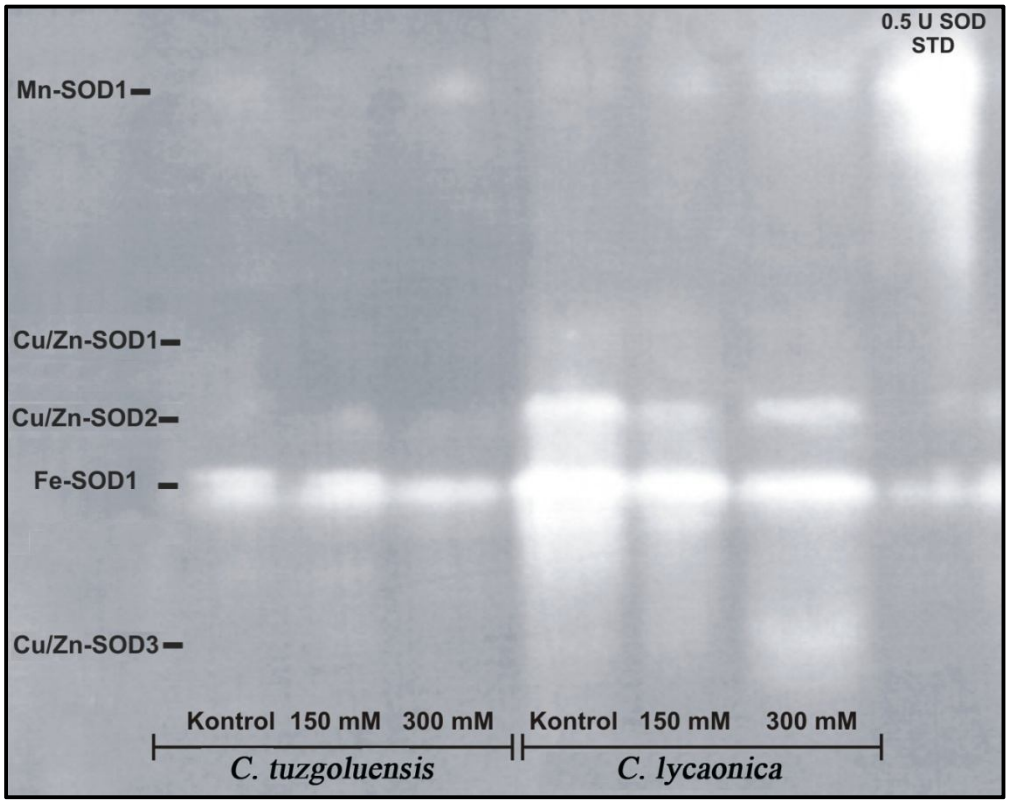
Çalışmamızda SOD aktivitesi, tuz stresinin uygulama süresine ve konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak *C. tuzgoluensis*'de artmış, *C. lycaonica*'da ise kısa süreli tuz stresi uygulamasında büyük oranda azalmıştır. Bu bulgular, halofitik türün süperoksit radikallerini süpürme yeteneklerinin daha fazla olduğunu göstermektedir. Benzer sonuçlar tuza toleranslı arpa, bezelye, yabani pancar, mısır ve susamda da elde edilmiştir (Seçkin ve ark., 2010; Hernandez ve ark., 2000; Bor ve ark., 2003; Azevedo-Neto ve ark, 2005; Koca ve ark., 2006).

SOD enzimine ait elektroforetik ayrım ile 150 ve 300 mM tuz uygulamaları sonucunda *C. tuzgoluensis* yapraklarında toplam 7, *C. lycaonica* yapraklarında ise toplam 6 farklı izozim tespit edilmiştir. Tanımlanan bu izozimlerden bir tanesi, KCN ve H_2O_2'den etkilenmeme durumuna göre Mn-SOD, bir tanesi KCN tarafından engellenmeyip, H_2O_2 tarafından engellenme özelliğine göre Fe-SOD olarak, diğer izozimler ise hem KCN hem de H_2O_2 tarafından engellenme özelliğine göre Cu/Zn-SOD olarak tanımlanmıştır. Tuz uygulamasının 7. gününde, *C. tuzgoluensis*'in yapraklarında 3, *C. lycaonica*'nın yapraklarında ise 5 farklı SOD izozimi belirlenmiştir (Şekil 4.27). 7. günde hasat edilen fidelerde tespit edilen izozimlerden Mn-SOD1, Cu/Zn-SOD2 ve Fe-SOD1 izozimleri her iki *Centaurea* türünde de tanımlanmış olup, tuz stresi artışına bağlı olarak yoğunlukları değişim göstermektedir (Şekil 4.27-4.28).

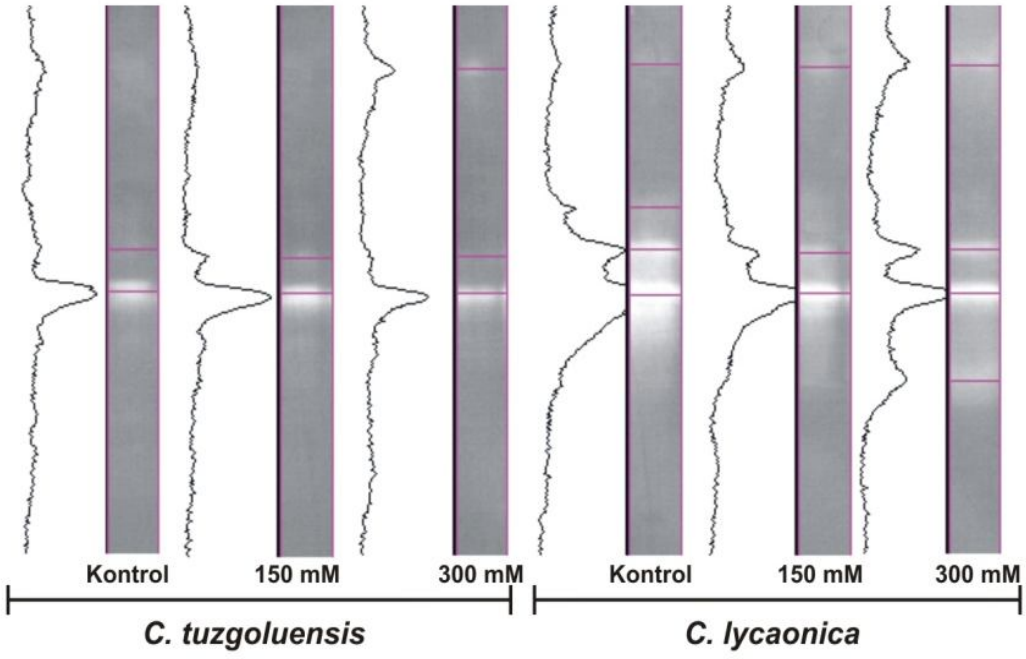
7 günlük tuz stresi uygulamalarında her iki *Centaurea* türünde de en fazla aktiviteye sahip olan izozimler Fe-SOD1 ve Cu/Zn-SOD2'dir. 7 gün boyunca 150 ve 300 mM tuz uygulamasına bağlı olarak *C. tuzgoluensis*'deki Fe-SOD1 izoziminin

kontrol gruplarına göre aktivite oranı, sırasıyla % 29.52 ve % 19.85 artış gösterirken, *C. lycaonica*'da kontrole göre % 57.91 ve % 54.21 azalmıştır. Cu/Zn-SOD2 izozimleri, *C. tuzgoluensis*'in 150 ve 300 mM NaCl uygulanan gruplarında, kontrole göre % 62.56 ve % 1.89 artış gösterirken, *C. lycaonica*'da sırasıyla % 57.91 ve % 44.74 azalmıştır. Kısa süreli tuz stresi süresince, Fe-SOD1 izozimlerinin yoğunluğu her 2 türde de diğer izozimden daha fazladır. Bu nedenle, hem *C. tuzgoluensis*'in hem de *C. lycaonica*'nın stresli fidelerindeki $O_2^{\bullet-}$ radikallerinin süpürülmesinde, kloroplast bölümlerinin daha önemli olduğu ileri sürülebilir. Ayrıca diğer bitkilerle (Hernandez ve ark., 2000; Kurepa ve ark., 1997) karşılaştırıldığında *Centaurea* türlerinin Fe-SOD izoziminin, total SOD aktivitesine daha yüksek katkı sağladığı görülmektedir.

Tuz stresine maruz kalan bitkilerde özellikle Mn-SOD ve Cu/Zn-SOD aktivitelerinin ve hidrojen peroksit seviyelerinin arttığı görülmüştür. 7. günde Mn-SOD1 izozimleri, *C. tuzgoluensis*'te sadece 300 mM tuz uygulanan gruplarda, *C. lycaonica*'da ise hem kontrol hem de stresli grupta tanımlanmıştır. *C. lycaonica*'da *C. tuzgoluensis*'den farklı olarak Cu/Zn-SOD1 ve Cu/Zn-SOD3 izozimleri tespit edilmiştir. Cu/Zn-SOD1 izozimi tuz stresi uygulanan gruplarda gözlenmemiştir. 7 günlük tuz uygulaması sırasında Cu/Zn-SOD3 izozimi, sadece *C. lycaonica*'nın 300 mM tuz uygulanan gruplarında tanımlanmıştır (Şekil 4.27 ve 4.28).



Şekil 4.27. 7 gün süreyle tuz stresine maruz bırakılan *C. tuzgoluensis* ve *C. lycaonica*'nın SOD izozimlerinde meydana gelen aktivite değişimleri (Jele 75 µg'lık protein içeren örnekler ve 0.5 ünite SOD standardı pipetlenmiştir.)

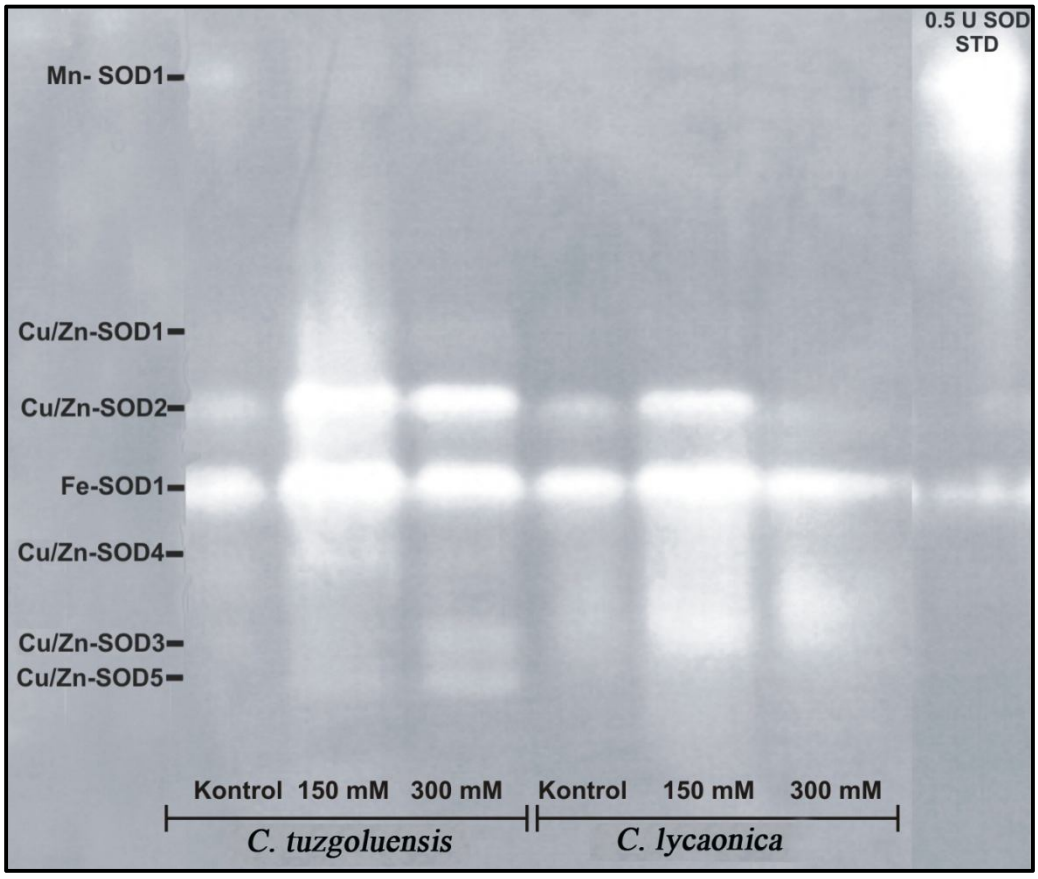


Şekil 4.28. 7 gün süreyle tuz stresine maruz bırakılan *C. tuzgoluensis* ve *C. lycaonica*'nın SOD izozim profilleri

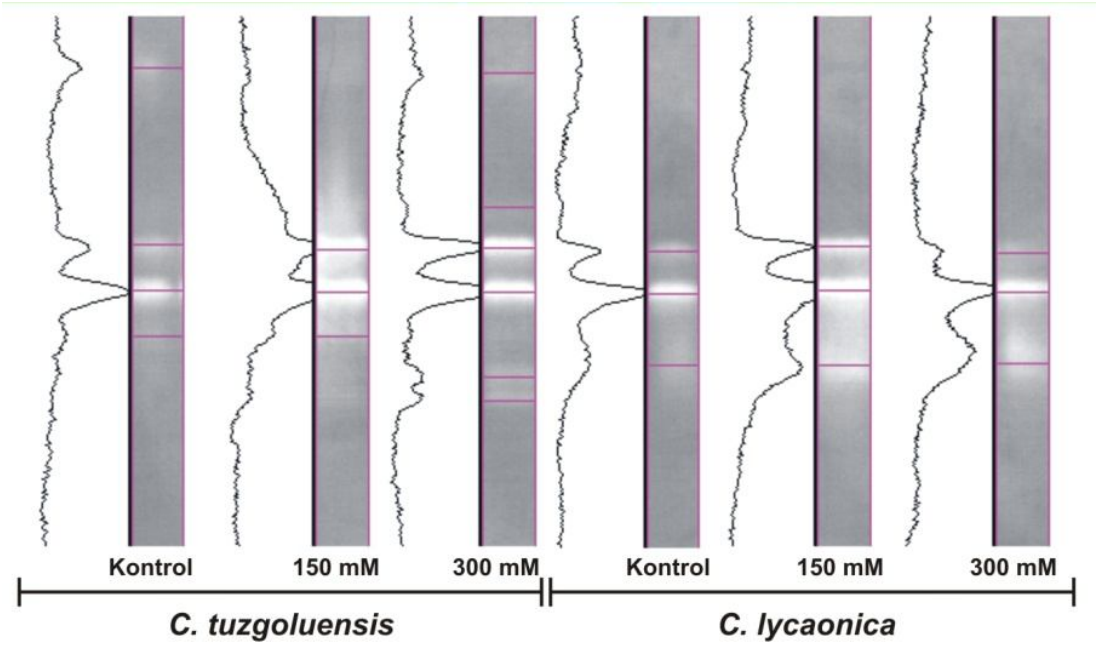
Çizelge 4.10. 7 gün süreyle tuz stresine maruz bırakılan *C. tuzgoluensis* ve *C. lycaonica* fidelerinin SOD izozimlerindeki aktivite değişimlerine ait densiyometrik analiz sonuçları (Her bir izozimin kontrol grubundaki aktiviteleri % 100 olarak alınmış ve stresli gruplardaki aktivite oranları kontrol grubuna göre % olarak belirlenmiştir.)

	C. tuzgoluensis			***C.lycaonica***		
Gruplar	**Kontrol**	**150 mM**	**300 mM**	**Kontrol**	**150 mM**	**300 mM**
Mn-SOD1	-	-	100	100	111.80	122.80
Cu/Zn-SOD1	-	-	-	100	-	-
Cu/Zn-SOD2	100	162.56	101.89	100	42.09	55.26
Fe-SOD1	100	129.52	119.85	100	42.09	45.79
Cu/Zn-SOD3	-	-	-	-	-	100
Cu/Zn-SOD4	-	-	-	100	63.61	-
Cu/Zn-SOD5	-	-	-	-	-	-

14 gün boyunca 150 ve 300 mM tuz uygulanan *C. tuzgoluensis* gruplarının Fe-SOD1 izozim aktiviteleri, kontrol gruplarının yaklaşık olarak 2.4 ve 1.98 katıdır. *C. lycaonica*'da ise Fe-SOD1 izozim aktiviteleri % 22.54 ve % 6.17 artmıştır. 150 ve 300 mM NaCl uygulamasının 14. gündeki Cu/Zn-SOD2 izozimlerinin aktiviteleri, *C. tuzgoluensis*'te, kontrol grubunun yaklaşık 4.47 ve 3.6 katıdır. *C. lycaonica*'da Cu/Zn-SOD2 izozimlerinin aktiviteleri, 150 mM NaCl'de kontrol grubunun yaklaşık 2.26 katı iken, 300 mM NaCl'de ise % 17.57 azalma göstermiştir. Tuz uygulamalarının 14. gününde Mn-SOD1 ve Cu/Zn-SOD1 izozimleri sadece *C. tuzgoluensis*'te tespit edilmiştir. Mn-SOD1 izoziminin 300 mM NaCl'deki aktivitesi kontrole göre % 10 azalmıştır. *C. lycaonica*'da 7. günde sadece 300 mM NaCl'de tanımlanan Cu/Zn-SOD3 izozimi 14. günde *C. tuzgoluensis*'te sadece 300 mM NaCl uygulanan grupta belirlenirken, *C. lycaonica*'nın hem kontrol grubunda hem de stresli gruplarda tespit edilmiştir. *C. lycaonica*'nın Cu/Zn-SOD3 izozimlerinin aktiviteleri tuz stresine bağlı olarak artış göstermiştir. *C. tuzgoluensis*'de Cu/Zn-SOD4 ve Cu/Zn-SOD5 izozimleri 14. günde yeni birer izozim olarak tanımlanmıştır. *C. tuzgoluensis*'in Cu/Zn-SOD4 izozimi hem kontrol hem de 150 mM NaCl uygulanan gruplarda tespit edilmiş olup, 150 mM'daki aktivitesi, kontrol grubunun yaklaşık 3.8 katıdır. Bu izozim 300 mM NaCl uygulanan gruplarda tespit edilememiştir. Cu/Zn-SOD5 izozimi *C. tuzgoluensis*'in sadece 14 gün süreyle 300 mM NaCl uygulanan gruplarında tanımlanmıştır (Şekil 4.29 ve 4.30, Çizelge 4.11). Tuz stresi altındaki *C. tuzgoluensis*'in yapraklarındaki SOD aktivisindeki belirgin artış, spesifik izoenzimlerin geçici olarak düzenlenmesiyle ve yeni izozimlerin oluşumundaki artışla ilişkilendirilebilir (Sekmen, 2009).



Şekil 4.29. 14 gün süreyle tuz stresine bırakılan *C. tuzgoluensis* ve *C. lycaonica*'nın SOD izozimlerinde meydana gelen aktivite değişimleri (Jele 75 µg'lık protein içeren örnekler ve 0.5 ünite SOD standardı pipetlenmiştir.)



Şekil 4.30. 14 gün süreyle tuz stresine maruz bırakılan *C. tuzgoluensis* ve *C. lycaonica*'nın SOD izozim profilleri

Çizelge 4.11. 14 gün süreyle tuz stresine maruz bırakılan *C. tuzgoluensis* ve *C. lycaonica* fidelerinin SOD izozimlerindeki aktivite değişimlerine ait densiyometrik analiz sonuçları (Her bir izozimin kontrol grubundaki aktiviteleri % 100 olarak alınmış ve stresli gruplardaki aktivite oranları kontrol grubuna göre % olarak belirlenmiştir.)

	C. tuzgoluensis			***C.lycaonica***		
Gruplar	**Kontrol**	**150 mM**	**300 mM**	**Kontrol**	**150 mM**	**300 mM**
Mn-SOD1	100	-	90.45	-	-	-
Cu/Zn-SOD1	-	-	100	-	-	-
Cu/Zn-SOD2	100	446.84	359.81	100	225.81	84.43
Fe-SOD1	100	240.81	198.68	100	122.54	106.17
Cu/Zn-SOD3	-	-	100	100	333.18	252.06
Cu/Zn-SOD4	100	380.08	-	-	-	-
Cu/Zn-SOD5	-	-	100	-	-	-

Cu/Zn-SOD ve Fe-SOD izozimleri, 14 gün tuz stresine maruz bırakılan her iki türde de tuzla indüklenen oksidatif strese karşı önemli bir rol oynamaktadırlar. *C. tuzgoluensis*'in uzun süreli tuz stresinde Cu/Zn-SOD'lar indüklenirken, kısa süreli (7 gün) tuz stresinde Fe-SOD'un en önemli SOD olduğu ileri sürülebilir. *C. lycaonica* için hem kısa hem de uzun süreli tuz stresi uygulamaları $O_2^{\bullet-}$ radikallerinin süpürülmesinde en etkili SOD izoziminin Fe-SOD olduğu söylenebilir.

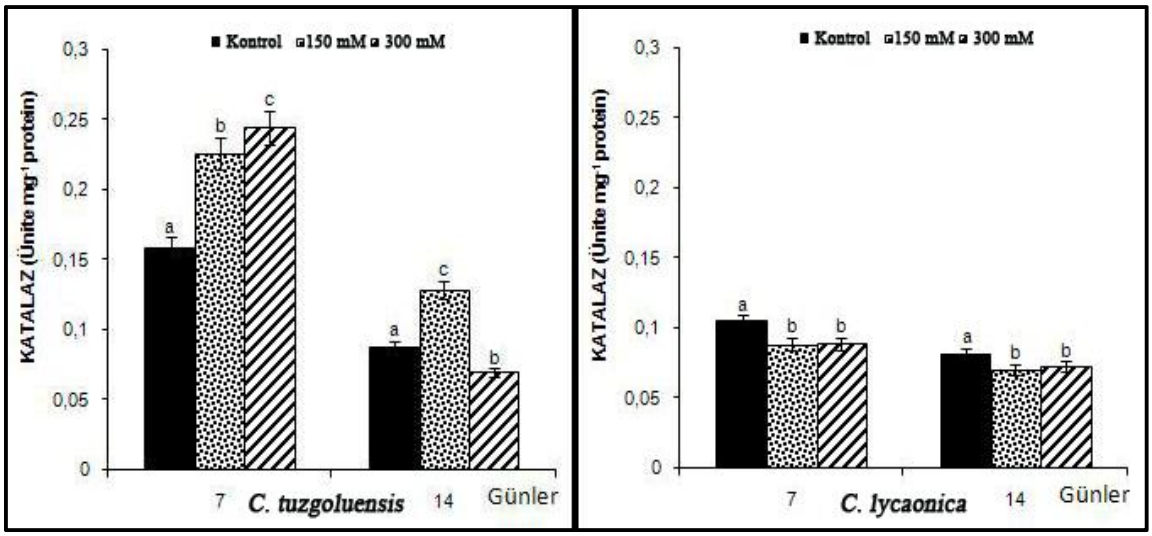
Centaurea türlerine tuz stresi uygulamasının; i) 7. gününde *C. lycaonica*'nın Cu/Zn-SOD1 ve Cu/Zn-SOD4 izozimlerinin tuz stresindeki artışa bağlı olarak ortadan kalkması veya yoğunluklarının azalması, ii) 7. günde tuz stresindeki artışa bağlı olarak *C. tuzgoluensis*'te Mn-SOD1, *C. lycaonica*'da Cu/Zn-SOD3'un yeni birer izozim olarak ortaya çıkması, iii) 14. günde *C. tuzgoluensis*'te 7. günde tanımlanan izozimlerin yanı sıra 4 yeni izozimin tanımlanması, iv) 14. günde *C. lycaonica*'da Mn-SOD1 ve Cu/Zn-SOD1-3-4 izozimlerinin belirlenememesi, *Centaurea* türlerinde SOD izozimlerinin aktivitelerinin uygulanan tuz konsantrasyonlarından ve uygulama süresinden etkilendiğini göstermektedir. Benzer şekilde Seçkin ve ark. (2010), Özfidan ve ark. (2010), Seçkin ve ark. (2009), Sekmen ve ark. (2007)'nın yapmış oldukları çalışmalarda SOD izozimlerinin yoğunluklarında değişimlerin meydana geldiği, bulgularımızı destekler niteliktedir.

4.6.2. Katalaz (CAT) aktivite sonuçları

Her iki türe ait CAT aktivitelerinin spektrofotometrik sonuçları Şekil 4.31'de verilmiştir. 7 gün boyunca 150 ve 300 mM'lık NaCl uygulamaları, *C. tuzgoluensis*'in CAT aktivitelerini artırırken, *C. lycaonica*'nın CAT aktivitelerini azaltmıştır.

Her iki örnekleme zamanında da 150 mM NaCl, *C. tuzgoluensis*'in CAT aktivitesini önemli derecede artırmıştır. 7 günlük 300 mM NaCl uygulaması, CAT aktivitesini artırmış, ancak 14. günde ise azaltmıştır. *C. tuzgoluensis*'in CAT aktivitesi 7. günde, 150 mM NaCl'de % 42.75, 300 mM NaCl'de % 46 artmıştır. 14. günde ise *C. tuzgoluensis*'in CAT aktivitesi kontrole göre 150 mM NaCl'de % 46.6 artmış, 300 mM NaCl'de % 20 azalmıştır.

C. lycaonica'nın CAT aktivitesi ise deneme süresince tuz konsantrasyonuna ve tuz stresinin uygulanma süresine bağlı olarak azalmıştır. 7. günde, 150 mM NaCl'de % 15.74, 300 mM NaCl'de % 15.13 azalmıştır. 14. günde CAT aktivitesi kontrole göre 150 mM NaCl'de % 14.17, 300 mM NaCl'de ise % 11.17 azalmıştır.

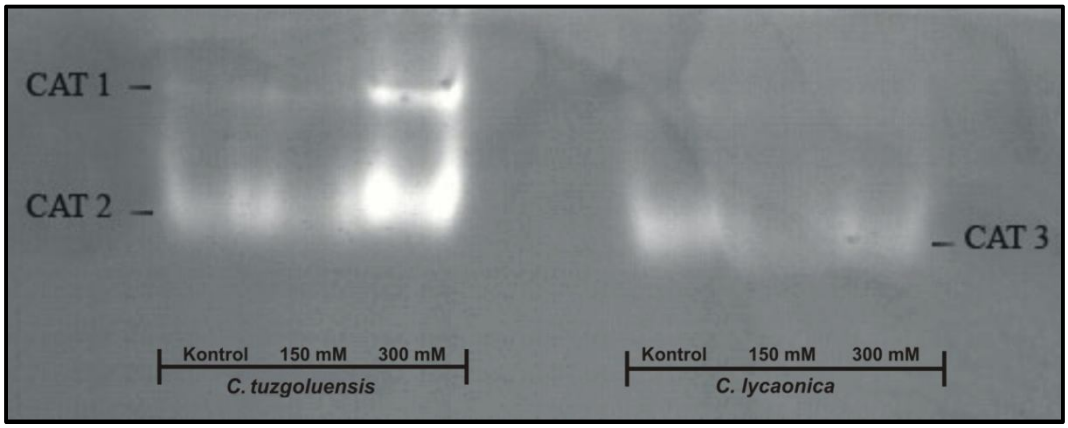


Şekil 4.31. 7 ve 14 gün süreyle tuz stresine maruz bırakılan *C. tuzgoluensis* ve *C. lycaonica*'nın CAT aktivitesinde (Ünite mg^{-1} protein) gözlenen ortalama değişimler (n=6). Sütunlar üzerindeki aynı harfler, aynı tür içinde istatistiksel bakımdan farklı olmayan değerleri göstermektedir (P> 0.05)

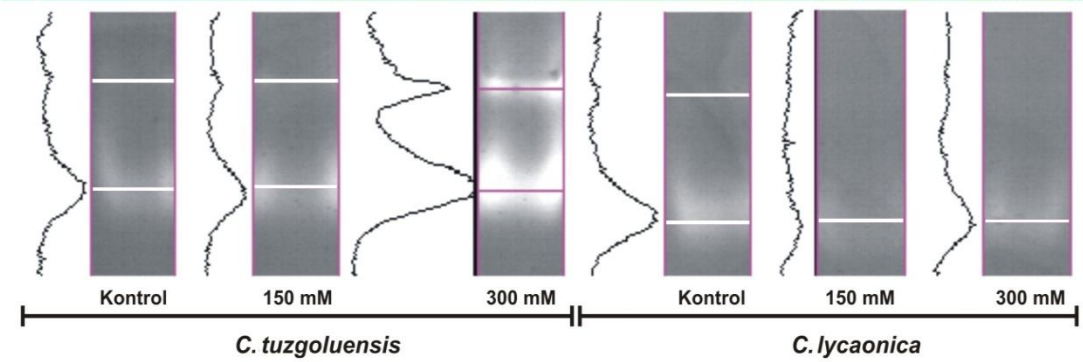
C. tuzgoluensis yapraklarındaki artan CAT aktivitesinin, peroksizomlardaki tuzla indüklenen fotosolunuma karşı hücresel savunmada hayati bir öneme sahip olduğu söylenebilir. 150 mM NaCl uygulamaları her iki örnekleme zamanında *C. tuzgoluensis*'in CAT aktivitelerini artırmış, *C. lycaonica*'nın CAT aktivitelerini azaltmıştır. Bu sonuçlar çevresel stresler sırasında, hücresel toksisitenin önemli bir aracı

olarak görülen H_2O_2'in, tuz stresi altındaki *C. tuzgoluensis*'in peroksizomlarında, indüklenen CAT aktiviteleri ile etkili bir şekilde süpürüldüğünü göstermektedir. Bulgularımıza paralel olarak tuza toleranslı *Hordeum marinum* L. (Seçkin ve ark., 2010), *Plantago maritima* L. (Sekmen ve ark., 2007), *Suaeda salsa* Pall. (Cai-Hong ve ark., 2005), *Bruguiera gymnorrhiza* (L.) Lamk. (Takemura ve ark., 2000) türlerinde yapılan çalışmalarda da CAT seviyelerinin tuz stresi altında arttığı rapor edilmiştir.

CAT enzimine ait izozimler, native page elektroforezi ile belirlenmiştir. 7 gün süresince tuz uygulamaları sonucunda her iki *Centaurea* türünde de 2'şer izozim tespit edilmiştir (Şekil 4.32 ve 4.33). Benzer şekilde tütün (Willekens ve ark., 1997) ve arpa (Perez-Lopez ve ark., 2009) yapraklarında da ikişer izozim tespit edilmiştir. CAT1 izozimi her iki türde de ortaktır. CAT1 izozimi, *C. tuzgoluensis*'te hem kontrol hem de stresli gruplarda bulunmakta olup yoğunluğu, uygulanan tuz stresi konsantrasyonuna bağlı olarak artış göstermiştir. 7. günde *C. tuzgoluensis*'teki CAT1 izoziminin aktivitesi, 150 mM NaCl'de kontrole göre % 63.71 artış gösterirken, 300 mM NaCl'deki aktivitesi kontrol grubunun 4.8 katıdır. CAT1 izozimi *C. lycaonica*'da sadece kontrol grubunda bulunmakta olup tuz uygulanan gruplarda tespit edilememiştir. CAT2 izozimi sadece *C. tuzgoluensis*'te tespit edilmiş olup hem kontrol hem de stresli gruplarda tanımlanmıştır. CAT2 izozim aktivitesindeki en fazla artış 300 mM NaCl uygulanan gruplarda tespit edilmiş olup kontrolün 3.26 katıdır. *C. tuzgoluensis*'in tuz stresi altında CAT1 ve CAT2 izozimlerinin yoğunluklarındaki artış, total CAT artışı ile ilişkilendirilebilir. CAT3 izozimi sadece *C. lycaonica*'da tanımlanmış ve aktivitesi her iki konsantrasyondaki tuz uygulamalarıyla azalmıştır. CAT3 aktivitesi, 150 mM NaCl uygulanan gruplarda kontrole göre % 42.31, 300 mM NaCl'de ise % 17.71 azalmıştır (Şekil 4.32 ve 4.33).

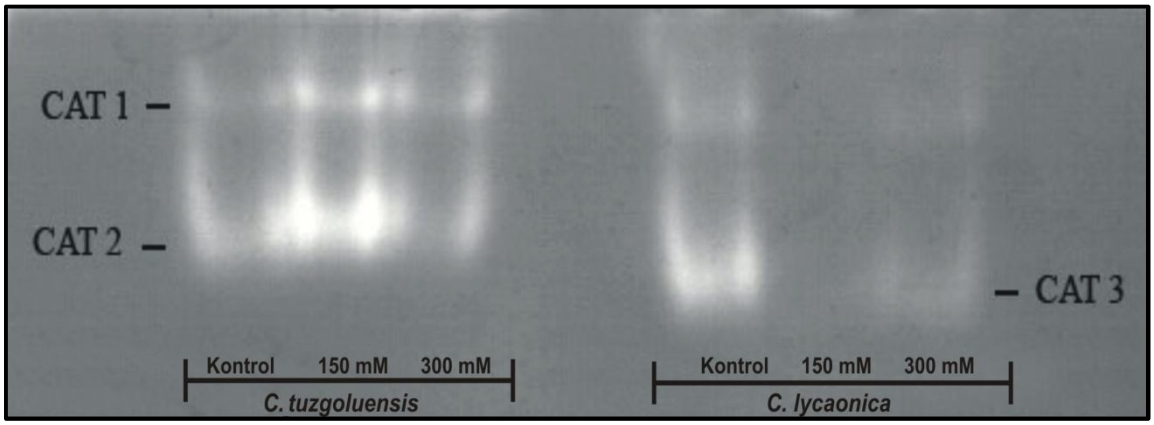


Şekil 4.32. 7 gün süreyle tuz stresine maruz bırakılan *C. tuzgoluensis* ve *C. lycaonica*'nın CAT izozimlerinde meydana gelen aktivite değişimleri (Jele 75 µg'lık protein içeren örnekler pipetlenmiştir.)

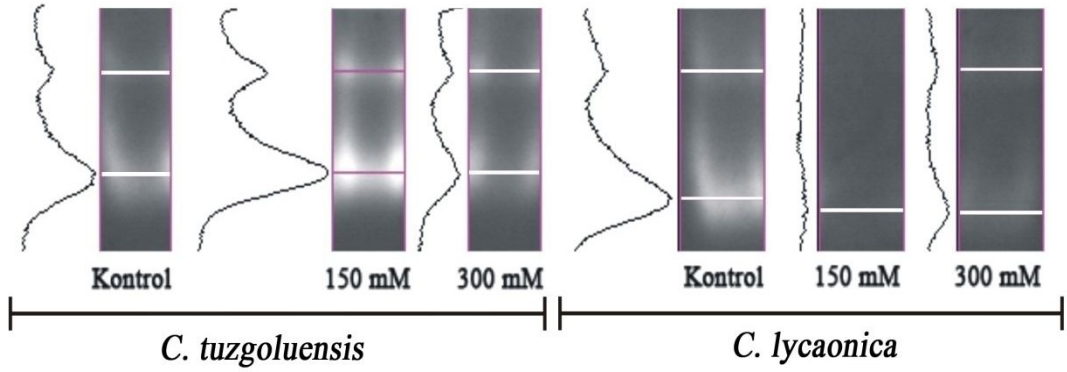


Şekil 4.33. 7 gün süreyle tuz stresine maruz bırakılan *C. tuzgoluensis* ve *C. lycaonica*'nın CAT izozim profilleri

Tuz uygulamasının 14. gününde hasat edilen her iki türe ait fidelerde aynı izozimler tanımlanmıştır (Şekil 4.34 ve 4.35). *C. tuzgoluensis*'in CAT1 ve CAT2 izozimlerinin aktivitelerindeki en fazla artış 150 mM NaCl uygulanan gruplarda görülmüş olup bu artış kontrolün, sırasıyla 2.21 ve 2.64 katıdır.



Şekil 4.34. 14 gün süreyle tuz stresine maruz bırakılan *C. tuzgoluensis* ve *C. lycaonica*'nın CAT izozimlerinde meydana gelen aktivite değişimleri (Jele 75 µg'lık protein içeren örnekler pipetlenmiştir.)



Şekil 4.35. 14 gün süreyle tuz stresine maruz bırakılan *C. tuzgoluensis* ve *C. lycaonica*'nın CAT izozim profilleri

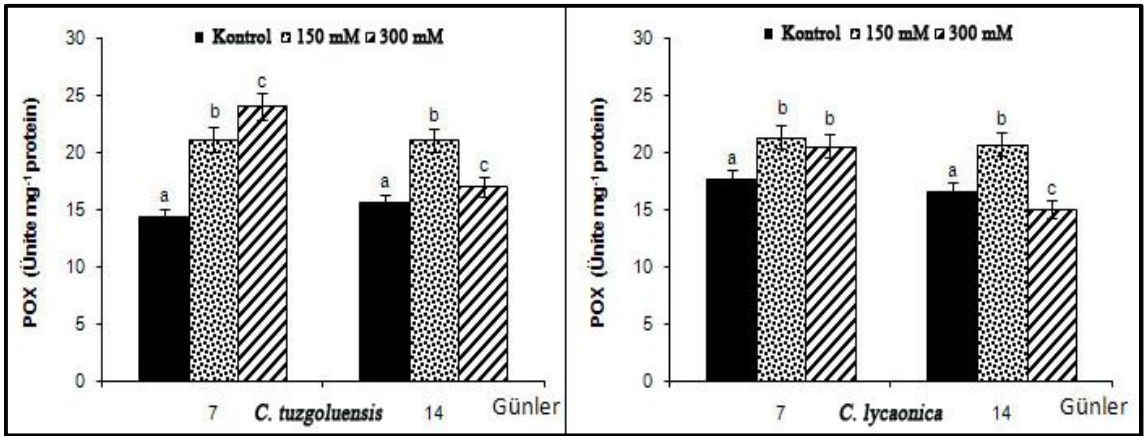
4.6.3. Peroksidaz (POX) aktivite sonuçları

Her iki *Centaurea* türünün POX aktivitelerine ait spektrofotometrik sonuçlar Şekil 4.36'da verilmiştir.

C. tuzgoluensis ve *C. lycaonica*'nın normal koşullar altında yetişen kontrol gruplarının POX aktiviteleri karşılaştırıldığında 7. günde hasat edilen *C. lycaonica*'nın temel POX aktivitesinin, *C. tuzgoluensis*'den % 22.92, 14. günde hasat edilen fidelerde ise % 6.2 daha fazla olduğu saptanmıştır.

7 gün süreyle 150 ve 300 mM'lık tuz uygulamaları, her iki türün POX aktivitelerinde kontrol gruplarına göre önemli derecede artış meydana getirmiştir. *C. tuzgoluensis* fidelerinin 7 günlük 150 ve 300 mM tuz uygulamasındaki POX artışı, *C. lycaonica*'ya nazaran daha yüksek olup, kontrole göre sırasıyla % 46.75 ve % 66.69 artış tespit edilmiştir. *C. lycaonica*'da ise 7. günde kontrol gruplarına göre POX

aktivitelerindeki artış, 150 mM'da % 20.79, 300 mM'da % 16.28'dir. 14 gün boyunca 300 mM tuz uygulaması, *C. tuzgoluensis*'in kontrol gruplarına göre POX aktivitesini artırırken, *C. lycaonica*'nın POX aktivitesinde azalmaya neden olmuştur. *C. tuzgoluensis* fidelerinin 14 gün boyunca 150 ve 300 mM tuz uygulamasındaki POX artışı kontrole göre sırasıyla % 35.02 ve % 9.52 olarak tespit edilmiştir. *C. lycaonica*'da ise 14. günde kontrol gruplarına göre POX aktivitelerinde 150 mM'da % 25.33 artış meydana gelirken, 300 mM'da % 8.72 oranında bir azalma tespit edilmiştir. Lin ve Kao (2000), çeltik gibi duyarlı türlerde, POX aktivitesinin oksidatif stresle ters orantılı bir korelasyon gösterdiğini rapor etmişlerdir. Yapılan birçok çalışmada toleranslı türlerde, tuz stresine bağlı olarak üretilen H_2O_2'i süpürmek için POX enzim aktivitelerinde artışın meydana geldiği bildirilmektedir (Seçkin ve ark., 2010; Sekmen ve ark., 2007; Radic ve ark., 2006; Bor ve ark., 2003; Meloni ve ark., 2003). Çalışmamıza benzer şekilde *Centaurea ragusina* L.'ya 150 ve 300 mM NaCl uygulaması bizim bulgularımıza benzer şekilde POX aktivitesini artırmıştır (Radic ve ark., 2006). *C. tuzgoluensis*'de MDA miktarının düşük ve total POX aktivitelerinin diğer türden yüksek olmasından dolayı halofitik türümüzün tuza bağlı olarak üretilen H_2O_2'i daha etkin bir şekilde süpürdüğü söylenebilir.

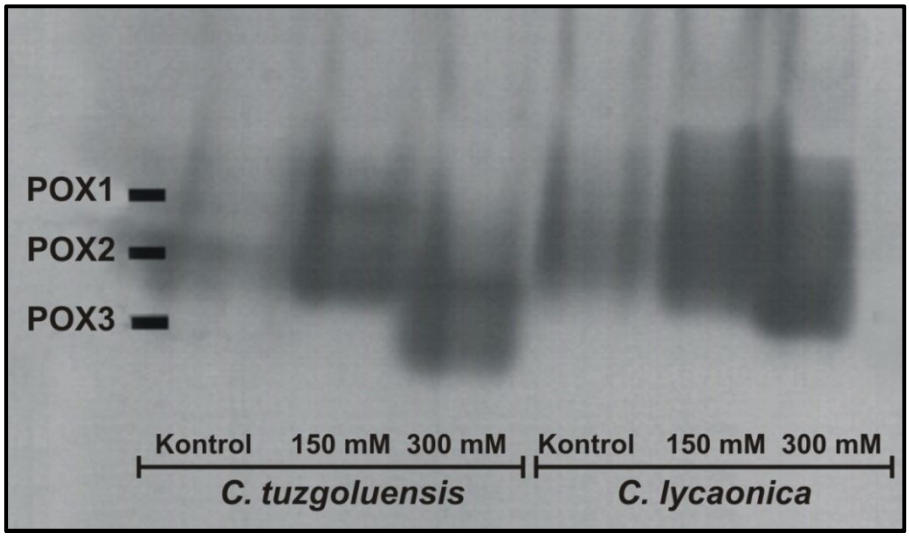


Şekil 4.36. 7 ve 14 gün süreyle tuz stresine maruz bırakılan *C. tuzgoluensis* ve *C. lycaonica*'nın POX aktivitesinde (Ünite mg^{-1} protein) gözlenen ortalama değişimler (n=6). Sütunlar üzerindeki aynı harfler, aynı tür içinde istatistiksel bakımdan farklı olmayan değerleri göstermektedir (P> 0.05)

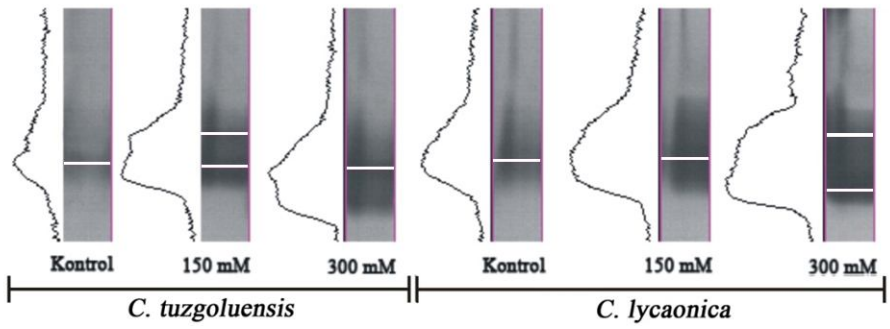
Peroksidaz izozimlerinin tuz toleransında önemli bir yeri olduğu bilinmektedir (Screenivasulu ve ark., 1999). *C. tuzgoluensis* ve *C. lycaonica*'nın POX izozimlerinin elektroforetik ayrımı ve izozimlerin profilleri sırasıyla Şekil 4.37, 4.38, 4.39 ve 4.40'de

gösterilmiştir. Elektroforetik ayrım sonucu her iki *Centaurea* türünde 4 farklı POX izozimi tanımlanmıştır.

7. günde hasat edilen her iki türde de POX1 ve POX2 izozimleri ortak olarak bulunmaktadır. *C. tuzgoluensis*'in 7. günde hasat edilen kontrol ve 300 mM NaCl uygulanan gruplarında sadece POX2 izozimi tanımlanırken, 150 mM NaCl uygulanan gruplarda POX1 ve POX2 izozimleri tespit edilmiştir. Tuz uygulamasının 7. gününde *C. lycaonica*'nın kontrol ve 150 mM tuz uygulanan gruplarında sadece POX2 izozimi tanımlanırken, 300 mM'da POX1 ve POX3 izozimleri tespit edilmiştir. 7 gün süreyle her iki konsantrasyonda tuz uygulanan *C. tuzgoluensis* fidelerinde POX2 izozimlerinin yoğunlukları kontrole göre büyük bir artış göstermiştir. *C. lycaonica*'nın 150 mM tuz uygulanan gruplarında kontrole göre POX2 izozimlerinin yoğunluklarında da artış tespit edilmiştir. 300 mM tuz uygulanan *C. lycaonica* fidelerinde ise POX1 ve POX3 izozimleri tanımlanmış olup, POX2 izozimi tespit edilememiştir (Şekil 4.37 ve 4.38).

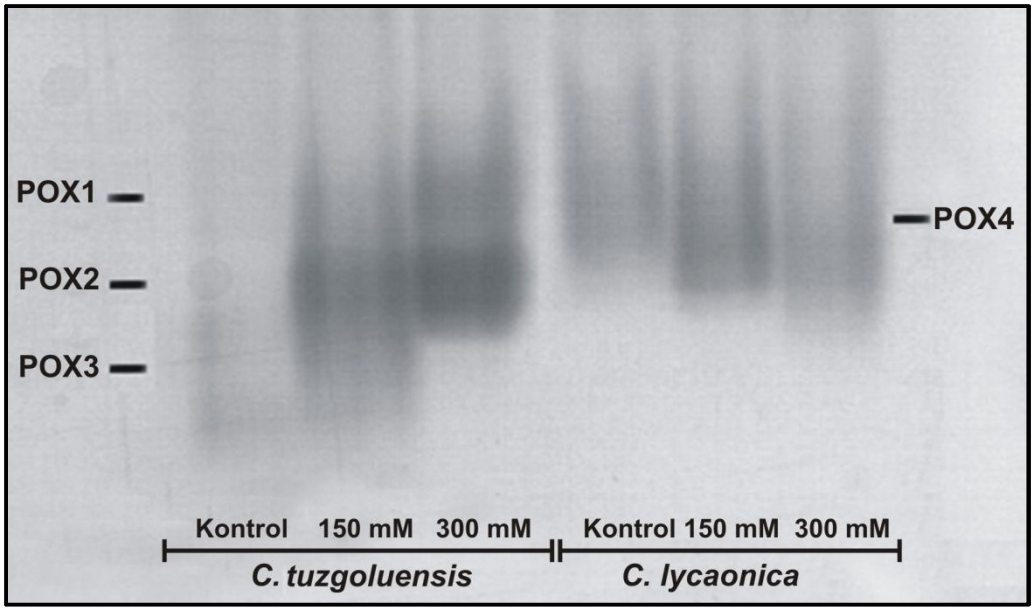


Şekil 4.37. 7 gün süreyle tuz stresine maruz bırakılan *C. tuzgoluensis* ve *C. lycaonica*'nın POX izozimlerinde meydana gelen aktivite değişimleri (Jele 75 µg'lık protein içeren örnekler pipetlenmiştir)

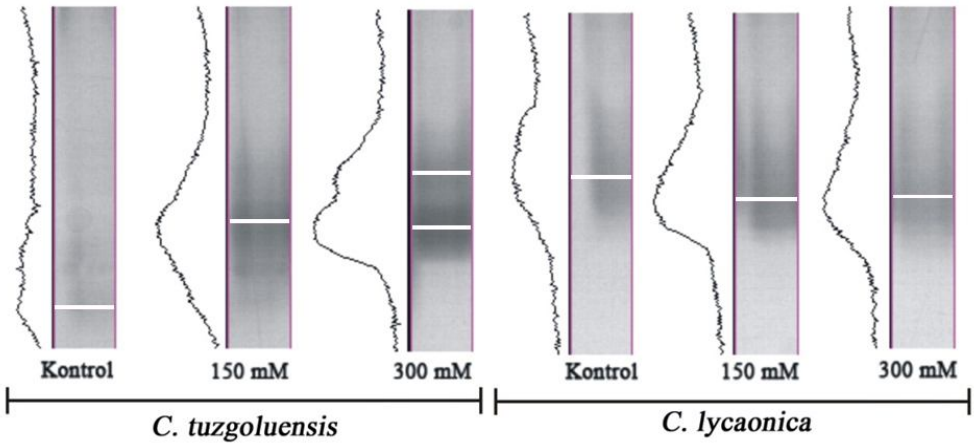


Şekil 4.38. 7 gün süreyle tuz stresine maruz bırakılan *C. tuzgoluensis* ve *C. lycaonica*'nın POX izozim profilleri

Tuz stresin 14. gününde her iki *Centaurea* türünde toplam 4 farklı izozim (POX1, POX2, POX3 ve POX4) tanımlanmıştır. POX1 izozimi, her iki türde de ortaktır. 14 gün süreyle tuz uygulaması sırasında POX3 izozimi sadece *C. tuzgoluensis*'in kontrol gruplarında tespit edilirken, POX4 izozimi sadece *C. lycaonica*'da tanımlanmıştır. *C. tuzgoluensis*'te stres yoğunluğuna bağlı olarak POX2 izoziminin yoğunluğu da artış göstermiş, 300 mM NaCl'de ise POX2 izoziminin yanısıra POX1 izozimi de tespit edilmiştir. *C. lycaonica*'da 150 mM tuz uygulanan gruplarda POX4 izoziminin yoğunluğu artış gösterirken 300 mM tuz uygulanan gruplarda ise yoğunluğu azalmıştır (Şekil 4.39 ve 3.40).



Şekil 4.39. 14 gün süreyle tuz stresine maruz bırakılan *C. tuzgoluensis* ve *C. lycaonica*'nın POX izozimlerinde meydana gelen aktivite değişimleri (Jele 75 µg'lık protein içeren örnekler pipetlenmiştir.)

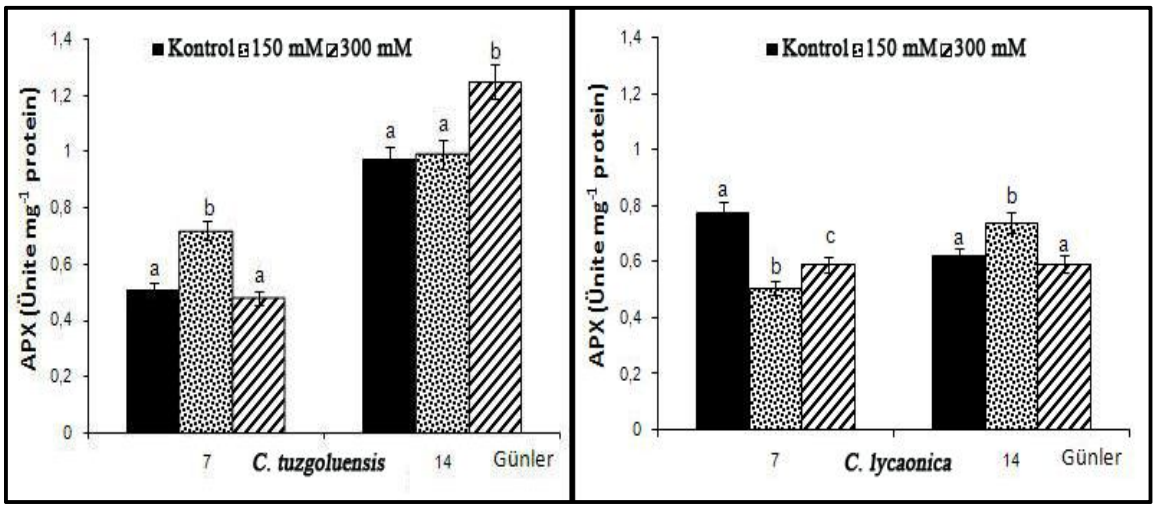


Şekil 4.40. 14 gün süreyle tuz stresine maruz bırakılan *C. tuzgoluensis* ve *C. lycaonica*'nın POX izozim profilleri

C. tuzgoluensis'te tuz stresine bağlı olarak POX aktivitelerindeki artışın nedeni, yeni izozimlerin sentezlenmesinden çok, varolan izozimlerin aktivitelerinin artmasıdır. Radic ve ark. (2006), *Centaurea ragusina* L. türü üzerinde yaptıkları çalışma da bulgularımıza benzer şekilde, tuz stresine bağlı olarak izozimlerin yoğunluklarının değiştiğini rapor etmişlerdir.

4.6.4. Askorbat peroksidaz aktivite (APX) sonuçları

Her iki *Centaurea* türünün askorbat peroksidaz (APX) aktivitelerine ait spektrofotometrik sonuçlar Şekil 4.41'da verilmiştir. 7 gün süresince 150 mM NaCl uygulamaları, *C. tuzgoluensis*'in APX aktivitesini kontrole göre % 51 artırırken, *C. lycaonica*'nın APX aktivitesini % 34.66 azaltmıştır. 300 mM tuz uygulamasının 7. gününde *C. tuzgoluensis*'in APX aktivitesi etkilenmezken, *C. lycaonica*'nın APX aktivitesi % 23.84 azalmıştır. 14 gün boyunca *C. tuzgoluensis*'te 150 mM tuz stresi uygulamaları, APX aktivitesini etkilemezken, 300 mM NaCl'de % 29 artış meydana gelmiştir. *C. lycaonica*'nın APX aktivitesi ise, 150 mM NaCl'de % 19.35 artış gösterirken, 300 mM NaCl'den kontrole göre etkilenmemiştir.

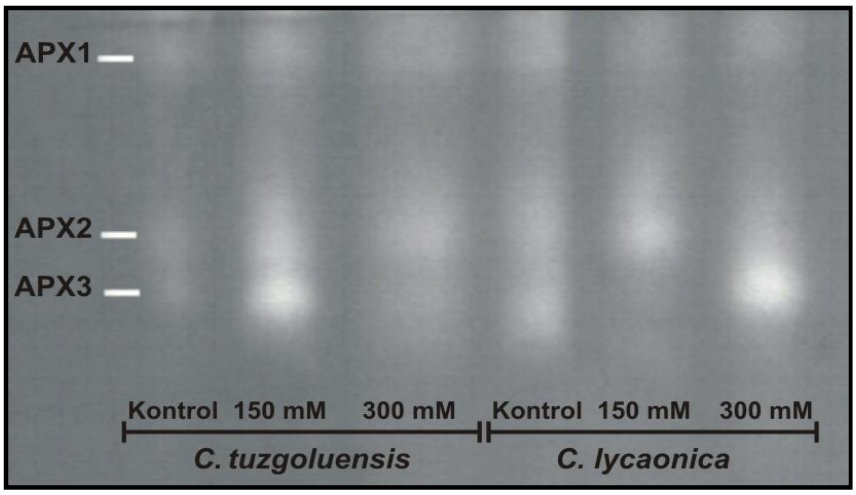


Şekil 4.41. 7 ve 14 gün süreyle tuz stresine maruz bırakılan *C. tuzgoluensis* ve *C. lycaonica*'nın APX aktivitesinde (Ünite mg^{-1} protein) gözlenen ortalama değişimler (n=6). Sütunlar üzerindeki aynı harfler, aynı tür içinde istatistiksel bakımdan farklı olmayan değerleri göstermektedir (P> 0.05)

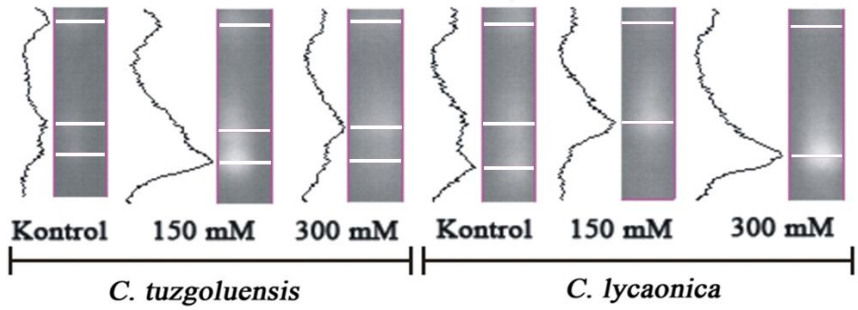
CAT ve APX enzimlerinin aktiviteleri tuz uygulama süresi ve tuz konsantrasyonuna bağlı olarak değişim göstermektedir. Çalışmamızda 150 mM tuz stresi uygulamasının 7. gününde *C. tuzgoluensis*'in CAT ve APX enzimleri artış

göstermiştir. CAT ve APX aktivitelerindeki bu paralel artışla, 150 mM tuz stresi altındaki *C. tuzgoluensis*'de, H_2O_2'in detoksifikasyonu için her iki enziminde önemli olduğunu söyleyebiliriz. Kısa süreli (7 gün) 150 mM tuz uygulamalarının tersine 300 mM tuz uygulanan *C. tuzgoluensis* fidelerinde, kontrole göre CAT aktivitesi artış gösterirken, APX aktivitesi değişmemiştir. Elde edilen bu bulgular ile kısa süreli yüksek konsantrasyondaki (300 mM NaCl) tuz stresi uygulamalarında, H_2O_2'in süpürülmesinde CAT enziminin, APX enziminden daha önemli bir role sahip olduğu söylenebilir. 14 gün süresince tuz stresi uygulamalarına maruz bırakılan *C. tuzgoluensis*'deki CAT aktivitesi, 150 mM NaCl uygulanan gruplarda artış gösterirken, APX aktivitesinin hem 150 mM hem de 300 mM NaCl uygulanan gruplarda arttığı tespit edilmiştir. Bu yüzden, yüksek konsantrasyondaki (300 mM NaCl) tuz stresi uygulamalarında, CAT aktivitesinin değişmemesinden dolayı uzun süreli (14 gün) tuz stresinde H_2O_2'in süpürülmesinde APX enzimi, CAT enziminden daha büyük öneme sahiptir. *C. tuzgoluensis*'deki artan APX aktivitesi, stresli koşullarda H_2O_2'in hızlı bir şekilde yıkımı için gerekli olan H_2O_2'in süpürülme kapasitesindeki artışı da işaret etmektedir. *C. maritima*'daki APX aktivitesinin uyarılması bulgularımızı destekler niteliktedir (Amor ve ark., 2006). *C. lycaonica*'da ise kısa süreli tuz stresi uygulamalarında APX aktivitesi, CAT aktivitesinde olduğu gibi kontrol gruplarına göre azalmıştır. CAT aktivitesinin azalma oranı APX'tan daha düşük olmasından dolayı kısa süreli tuz stresi uygulamalarında *C. lycaonica*'da CAT enziminin H_2O_2'in süpürülmesinde daha etkili olduğu söylenebilir. *C. lycaonica*'ya uzun süreli tuz uygulamalarında, H_2O_2'in süpürülmesinde APX enziminin daha büyük öneme sahiptir. Tuz stresi altında *C. lycaonica*'da CAT ve APX (150 mM NaCl'deki APX artışı hariç) aktivitelerinin düşmesi, hücre içinde H_2O_2 miktarında artışa neden olur. Hücre içinde fazla miktarda H_2O_2'in bulunması hücre için son derece zararlı $OH^{\bullet}$ radikallerinin üretimini teşvik edebilir.

APX enzimine ait izozimlerin elektroforetik ayrım ile her iki *Centaurea* türünde de 7. gün hasatında 3 izozim tespit edilmiştir (Şekil 4.42-4.43). 7 gün süresince tuz uygulamalarında, *C. tuzgoluensis*'te her üç APX izozimi de bulunmakta iken, *C. lycaonica*'da 150 mM NaCl'de APX3 izozimi, 300 mM'da ise APX2 izozimi tespit edilememiştir. 7. günde her iki *Centaurea* türünde de en fazla yoğunluğa sahip izozim, APX3'tür. APX3 izozimi, *C. tuzgoluensis*'te en fazla, 150 mM NaCl'de, *C. lycaonica*'da ise 300 mM NaCl'de tanımlanmıştır (Şekil 4.42-4.43).

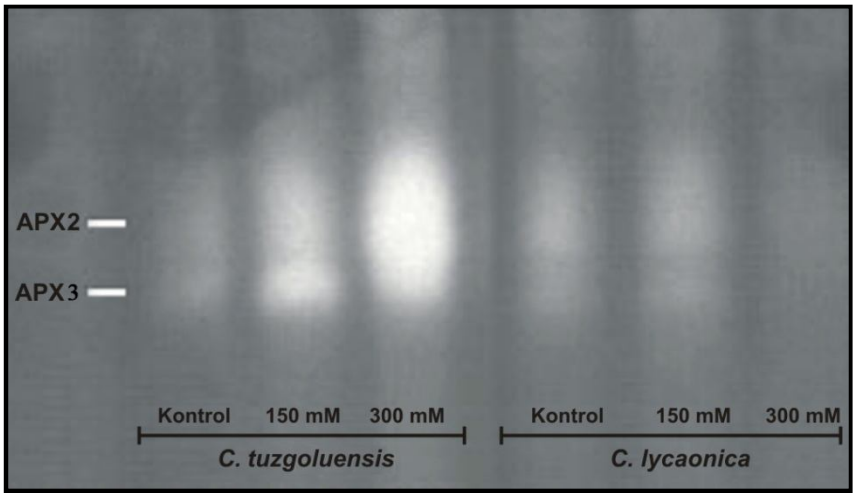


Şekil 4.42. 7 gün süreyle tuz stresine maruz bırakılan *C. tuzgoluensis* ve *C. lycaonica*'nın APX izozimlerinde meydana gelen aktivite değişimleri (Jele 20µg'lık protein içeren örnekler pipetlenmiştir.)

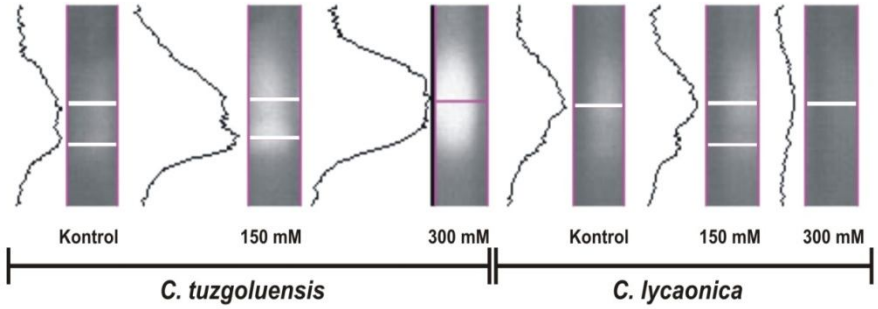


Şekil 4.43. 7 gün süreyle tuz stresine maruz bırakılan *C. tuzgoluensis* ve *C. lycaonica*'nın APX izozim profilleri

Tuz stresi uygulamasının 14. gününde her iki *Centaurea* türünde de APX1 izozimi tespit edilememiştir. 14. günde hasat edilen *C. tuzgoluensis*'in kontrol ve 150 mM NaCl uygulanan gruplarında hem APX2 hem de APX3 izozimleri tanımlanırken, 300 mM NaCl uygulanan gruplarda sadece APX2 izozimi tanımlanmıştır. 300 mM'lık tuz stresi ile APX2 izozim yoğunluğundaki artış, 300 mM NaCl uygulanan gruplardaki total APX aktivitesindeki artışın temel nedeni olarak düşünülebilir. *C. lycaonica*'nın kontrol ve 300 mM NaCl uygulanan gruplarında sadece APX2 izozimi tanımlanmıştır. APX3 izozimi *C. lycaonica*'nın sadece 150 mM tuz stresi uygulanan gruplarında tespit edilmiştir (Şekil 4.44 ve 4.45).



Şekil 4.44. 14 gün süreyle tuz stresine maruz bırakılan *C. tuzgoluensis* ve *C. lycaonica*'nın APX izozimlerinde meydana gelen aktivite değişimleri (Jele 20µg'lık protein içeren örnekler pipetlenmiştir.)

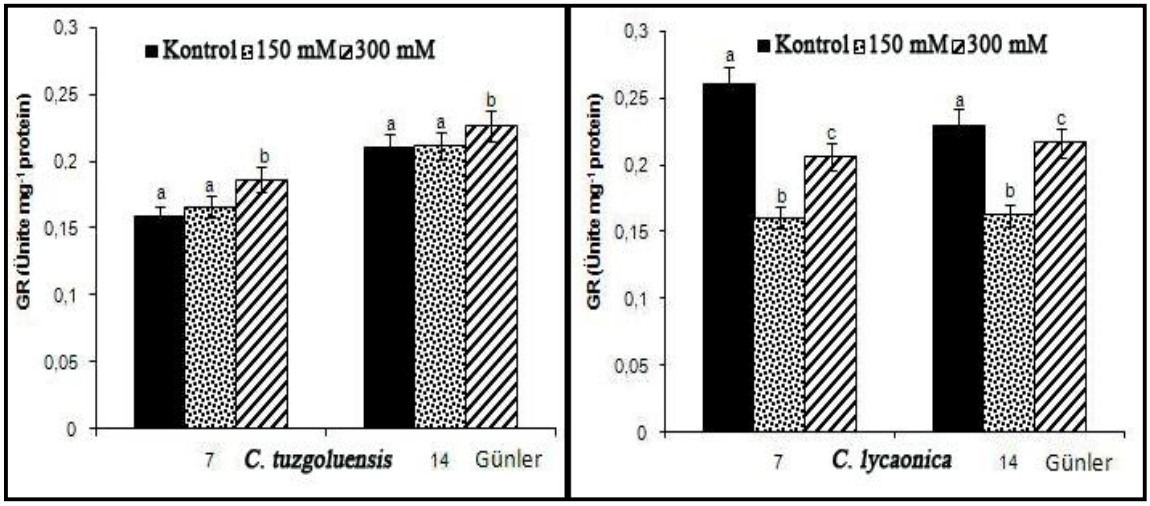


Şekil 4.45. 14 gün süreyle tuz stresine maruz bırakılan *C. tuzgoluensis* ve *C. lycaonica*'nın APX izozim profilleri

4.6.5. Glutasyon redüktaz (GR) aktivite sonuçları

Her iki *Centaurea* türünün glutasyon redüktaz (GR) aktivitesine ait spektrofotometrik sonuçlar Şekil 4.46'da verilmiştir. Normal koşullar altında yetiştirilen *C. lycaonica*'nın kontrol grubu fidelerinin GR aktivitesi, her iki örnekleme zamanında da *C. tuzgoluensis*'den daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. *C. lycaonica*'nın kontrol gruplarının GR aktivitesinin yüksek olmasının sebebi, türün habitat özelliklerinden (kalkerli serpantin kayalıklar şeklinde olması) kaynaklanmış olabilir. Serpantin kayalıkların nikel içerikleri yüksektir. Nikel hiperakümülatörü olan birkaç *Thlaspi* türünde de GR aktivitelerinin yüksek olduğu rapor edilmiştir (Freeman ve ark., 2004). Tuz stresi uygulamaları, *C. lycaonica*'nın GR aktivitelerini azaltırken, *C. tuzgoluensis*'in GR aktivitelerini artırmıştır. 7 günlük 150 mM NaCl uygulamaları, *C. tuzgoluensis*'in GR aktivitesini % 5, 300 mM NaCl'de ise % 17.61 artırmıştır. 14. günde ise 150 mM NaCl'de değişmezken, 300 mM NaCl'de % 7.6 artmıştır. 7 ve 14 günlük

tuz stresi altındaki *C. lycaonica* fidelerinin kontrole göre GR aktivitelerindeki maksimum azalma, 150 mM NaCl uygulanan gruplarda tespit edilmiştir. Tuz stresi uygulamasının 7. gününde *C. lycaonica* fidelerinin GR aktivitesi kontrole göre, 150 mM NaCl'de % 38.46, 300 mM NaCl'de ise % 19.23 azalmıştır. 14. günde ise *C. lycaonica*'nın GR aktivitesi, 150 mM NaCl'de % 30.43, 300 mM NaCl'de % 4.35 azalmıştır.



Şekil 4.46. 7 ve 14 gün süreyle tuz stresine maruz bırakılan *C. tuzgoluensis* ve *C. lycaonica*'nın GR aktivitesinde (Ünite mg^{-1} protein) gözlenen ortalama değişimler (n=6) Sütunlar üzerindeki aynı harfler, aynı tür içinde istatistiksel bakımdan farklı olmayan değerleri göstermektedir (P> 0.05)

C. tuzgoluensis'te hem 7 hem de 14 günlük tuz stresi uygulamalarında SOD aktivitesinin artışından dolayı, üretimi artan H_2O_2'in süpürülmesi için önemli bir rol oynayan GR enziminin aktivitesi, kontrol gruplarına göre önemli oranda artmıştır. *C. tuzgoluensis* ile ilgili verilerimiz, *Hordeum marinum* ve *Plantago maritima*'da, GR enziminin antioksidan savunma sisteminin önemli bir enzimi olduğunu bildiren Seçkin ve ark. (2010)'nın ve Sekmen ve ark. (2007)'nın bulgularıyla birebir örtüşmektedir. Öte yandan 14. günde, 300 mM tuz stresine rağmen GR ve APX enzimlerinin aşırı üretimi, *C. tuzgoluensis*'in yapraklarındaki AA-GSH döngüsündeki enzimlerin yüksek bir aktivite de korunduğunu işaret etmektedir. Bu nedenle *C. tuzgoluensis*'de tuz stresinin oluşturduğu oksidatif stresi önlemede askorbat-glutasyon döngüsünün etkili olduğunu söyleyebiliriz. *C. lycaonica*'nın GR aktivitesinde ise tuz stresine bağlı olarak her iki örnekleme zamanında da azalma meydana gelmiştir. Benzer şekilde Seçkin ve ark. (2010), Sekmen ve ark. (2007), Demiral ve Türkan (2005) ve Bor ve ark. (2003)'nın çalışmalarında da duyarlı türlerde GR aktivitesinin daha az olduğu bildirilmiştir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Bu çalışmada, endemik iki farklı *Centaurea* türünün, in vitro ortamda, değişen tuz konsantrasyonlarına göstermiş oldukları tepkiler, fizyolojik, biyokimyasal ve morfolojik olarak değerlendirilmiştir. Tuz stresine bağlı olarak iki tür arasında belirgin farklılıklar tespit edilmiştir. Halofitik *C. tuzgoluensis*'in tuz stresine bağlı büyüme parametrelerindeki azalma oranları, *C. lycaonica*'ya göre daha düşük olduğu gözlenmiştir. Sürgünlerin element analizleri sonucunda Na^+ ve Cl^- iyonları, *C. lycaonica*'da daha fazla biriktiği belirlenmiştir. *C. lycaonica*'da Na^+ ve Cl^- iyonlarının aşırı birikmesinin tersine, K^+ ve Ca^{+2} iyonlarının içerikleri azalmıştır. *C. tuzgoluensis*'de ise bu iki iyonun miktarı, tuz stresine bağlı olarak ya artış göstermiş ya da tuz stresinden etkilenmemiştir. Her canlı organizmada gerçekleşen en zararlı süreçlerden biri olan lipid peroksidasyonu, türlerin stres faktörlerinden etkilenme derecelerinin belirlenmesindeki en önemli göstergelerden birisidir. Tuz stresine bağlı olarak lipid peroksidasyon seviyelerinin, her iki örnekleme zamanında da *C. lycaonica*'da daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle *C. lycaonica* yapraklarında, tuz stresine bağlı olarak daha fazla oksidatif hasar oluştuğu ve antioksidatif enzim sisteminin tuzun zararlı etkilerinin uzaklaştırılmasında yetersiz kaldığı söylenebilir. Kısa süreli tuz uygulamaları, *C. tuzgoluensis*'in hidroksil radikali süpürülme aktivitesini artırırken, *C. lycaonica*'da azalmaya neden olmuştur. Uzun süreli tuz stresi uygulaması ise her iki *Centaurea* türünün $OH^{\bullet}$'in süpürülme aktivitesini azaltmış, en fazla azalma *C. lycaonica*'da tespit edilmiştir. Tuz stresine bağlı olarak her iki türün antioksidan enzim sisteminde de büyük değişiklikler meydana gelmiştir. *C. tuzgoluensis*'in SOD, CAT, POX, APOX ve GR enzimlerinin aktiviteleri, tuzla (150 ve 300 mM NaCl) indüklenmiş oksidatif stresle üretilen $O_2^{\bullet-}$ ve H_2O_2'in süpürülmesinde etkili bir şekilde görev almıştır. *C. lycaonica*'da ise bu enzimlerin aktiviteleri tuz uygulama süresi ve tuz konsantrasyonuna göre azalmış, MDA içerikleri ise antioksidan aktivitelerin tersine artış göstermiştir. Strese bağlı olarak kloroplastlarda etkinliği az olarak bilinen Fe-SOD, *C. tuzgoluensis*'te tuzla indüklenen oksidatif strese karşı önemli bir rol oynadığı belirlenmiştir.

Sonuç olarak; bu çalışmayla tuz stresi altındaki *C. tuzgoluensis*'in, *C. lycaonica*'ya göre daha etkili bir antioksidan savunma sistemine sahip olduğu bilim dünyası için ilk kez ortaya konulmuştur. Halofitik bir tür olmasından dolayı *C. tuzgoluensis,* daha fazla tuza tolerans göstermiştir. Bu durum sonuçlarımızdan da görüleceği üzere antioksidan savunma sisteminin daha iyi işlemesinden dolayı *C. tuzgoluensis*'in gelişimi, tuz stresi altında *C. lycaonica*'ya göre daha üstün konumdadır.

5.2. Öneriler

Dünyada son yıllardaki iklim değişikliklerinin sonucu olarak ortaya çıkan kuraklık ve yanlış sulama yöntemlerinden kaynaklanan tuzluluk, ekosistemler üzerinde ciddi tehditler içermektedir. Günümüzde artan nüfus artışına bağlı olarak besin ihtiyacının karşılanabilinmesi adına tarım sektörüne yönelim artmıştır. Fakat tarım alanlarında yürütülen yanlış metotlar ve politikalar, toprakların gittikçe tuzlanmasına ve çoraklaşmasına neden olmakta ve bunun sonucu olarak da tarım alanları kullanılamaz hale gelmektedir.

Son zamanlarda halofitlere olan ilgi, gün geçtikçe artmaktadır. Aşırı tuzlu alanlarda yetişen halofitlerin tuza tolerans mekanizmalarının ortaya konulması son derece önemlidir. Bu bitkiler, birçok tarım bitkisinin yetişemeyeceği ekstrem çevre şartlarında, başarı ile yaşamlarını sürdürebilmektedirler. Halofitlerin aşırı tuzlu alanlarda, varlıklarını sürdürebilmesi adına verdiği çabalar ve tolerans mekanizmaları, araştırılmaya değerdir. Bu tolerans mekanizmalarının net bir şekilde ortaya konulması ve tarımsal öneme sahip bitkilere bu özelliklerin kazandırılması, çoraklaşmış alanlardan daha etkin bir şekilde faydalanmamızı sağlayabilir. Kültür bitkisi yetiştirilemeyecek kadar yüksek tuz bulunduran alanlarda, tuzlu koşullara orta ve yüksek seviyede toleranslı halofitik bitkilerin yetiştirilmesi ile bu bitkilerin toprağa yapacakları olumlu etkileri, problemli olan tuzlu topraklarının üretime kazanılmasında önemli bir katkı sağlayabilir.

Stres koşullarında bitkilerin antioksidan savunma sistemlerinin anlaşılması, bitki ıslahı çalışmalarında daha etkili sonuçlara ulaşılmasına yardımcı olacağı düşüncesindeyiz.

Elde ettiğimiz veriler, tuz stresi ve halofitik türler ile yapılacak genetik mühendisliği, bitki biyolojisi ve biyoteknolojisi alanlarında yapılacak bilimsel çalışmalara yol gösterici olarak iyi bir kaynak olacağı görüşündeyiz.

6. KAYNAKLAR

Abraham, E., Rigo, G., Szekely, G., Nagy, R., Koncz, C. and Szabados, L., 2003, Light – dependent induction of proline biosynthesis by abscisic acid and salt stress is inhibited by brassinosteroid in *Arabidopsis*, *Plant Mol. Biol.*, 51, 363–372.

Adams, P., Thomas, J.C., Vernon, D.M., Bohnert, H.J., Jensen, R.G., 1992, Distinct cellular and organismic responses to salt stress, *Plant Cell Physiol.,* 33, 1215–1223.

Agastian, P., Kingsley, S.J. and Vivekanandan, M., 2000, Effect of salinity on photosynthesis and biochemical characteristics in mulberry genotypes, *Photosynthetica*, 38, 287–290.

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, *Int. J. Plant Produc.,* 2, 353–366.

Akkuş, İ., 1995, Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri, *Mimoza Yay*., Konya, 1-3.

Allakhverdiev, S.I., Nishiyama, Y., Suzuki, I., Tasaka, Y., Sakamoto, A. and Murata, N., 1999, Genetic engineering of the unsaturation of fatty acids in membrane lipids alters the tolerance of *Synechocystis* to salt stress, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96, 5862–5867.

Allakhverdiev, S.I., Sakamoto, A., Nishiyama, Y., Inaba, M. and Murata, N., 2000, Ionic and osmotic effects of NaCl-induced inactivation of photosystems I and II in *Synechococcus* sp., *Plant Physiol.*, 123, 1047-1056.

Amor, N.B., Hamed, K.B., Debez, A., Grignon, C. and Abdelly, C., 2005, Physiological and antioxidant responses of the perennial halophyte *Crithmum maritimum* to salinity, *Plant Sci.*, 168, 889–99.

Amor, N.B., Jimenez, A., Megdiche, W., Lundqvist, M., Sevilla, F., Abdelly, C., 2006, Response of antioxidant systems to NaCl stress in the halophyte *Cakile maritima*, *Physiol. Plantarum,* 126, 446-457.

Amor, N.B., Jimenez, A., Megdiche, W., Lundqvist, M., Sevilla, F., Abdelly, C., 2007, Kinetics of the antioxidant response to salinity in the halophyte *Cakile maritima*, *J. Integr. Plant Biol.*, 49, 982-992.

Amtmann, A. and Sanders, D., 1999, Mechanisms of Na^+ uptake by plant cells, *Adv. Bot. Res.*, 29, 75-112.

Apse, M.P., Aharon, G.S., Snedden, W.A., Blumwald, E., 1999, Salt tolerance conferred by overexpression of vacuolar Na^+/H^+ antiport in *Arabidopsis*, *Science*, 285, 1256-1258.

Arbona, V., Hossain, Z., Lopez-Climent, M.F., Perez-Clemente, R.M., Gomez-Cadenas, A., 2008, Antioxidant enzymatic activity is linked to waterlogging stress tolerance in citrus, *Physiol. Plant,* 132, 452–466.

Asada, K., Takahashi, M., 1987, Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis, In: Kyle, D.J. (Ed.), Photoinhibition, *Elsevier,* Amsterdam/North Holland, 227–287.

Asada, K., 1994, Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues, In: Foyer and Mullineaux, Causes of oxidative stress and amelioration of defense systems in plants, *CRC Press,* 78-99.

Ashraf, M., 1994, Breeding for salinity tolerance in plants, *Crit. Rev. Plant Sci*., 13, 17–42.

Ashraf, M.Y. and Bhatti, A.S., 2000, Effect of salinity on growth and chlorophyll content in rice, *Pak. J. Sci. Ind. Res.*, 43, 130–131.

Ashraf, M., 2009, Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers, *Biotechnology Advances*, 27, 84-93.

Aslan, S., Vural, M., Şahin, B., Çelik, S., Karavelioğulları, F.A., 2010, Presence of *Centaurea regia* Boiss. subsp. *regia* [Subgen. Cynaroides (Boiss. ex Walp.) Dostal, Compositae] in Turkey, *Biological Diversity and Conservation*, 3/2, 185-191.

Atienza, S.G., Faccioli, P., Perrotta, G., Dalfino, G., Zschiesche, W., Humbeck, K., Stanca, A. and Cattivelli, L., 2004, Large scale analysis of transcripts abundance in barley subjected to several single and combined abiotic stress conditions, *Plant Sci.*, 167, 1359–1365.

Aydemir, S., Çullu, M.A., Polat, T., Sönmez, O., Dikilitaş, M., Akıl, H., 2009, Tuzlanma etkisinde kalan Şanlıurfa-Harran Ovası topraklarının kullanım durumları ve iyileştirebilme olanakları, *Harran Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Dergisi,* Şanlıurfa, 45-62.

Azevedo, R.A., Alas, R.M., Smith, R.J., Lea, P.A., 1998, Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in leaves and roots of wild type and catalase deficient mutant of barley, *Physiol Plant.*, 104, 280–292.

Azevedo-Neto, A.D., Prisco, J.T., Eneas-Filho, J., Abreu, C.E.B., Filho, E.G., 2005, Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes, *Environ. Exp. Bot.*, 56, 87-94.

Balibrea, M.E., Dell'Amico, J., Bolarin, M.C. and Perez–Alfocea, F., 2000, Carbon partitioning and sucrose metabolism in tomato plants growing under salinity, *Physiol. Plant.*, 110, 503–511.

Barrero, A.F., Oltra, J.E., Rodriguez, I., Barragan, A., Gravalos, D.G., Ruiz, P., 1997, Lactones from species of *Centaurea*, cytotoxic and antimicrobial activities, *Fitoterapia*, 66 (3), 227-230.

Bates, L.S., Waldren, R. P., and Teare, I. D., 1973, Rapid determination of free proline for water stress studies, *Plant and Soil*, 39, 205-207.

Baytop, T., 1999, Türkiye'de bitkiler ile tedavi, *Nobel Tıp Kitabevi*, 316.

Beauchamp, C., and Fridovich, I., 1971, Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels, *Anal. Biochem*., 44:276-287.

Bergmeyer, N., 1970, Methoden der enzymatischen Analyse, *Vol.1 Akademie Verlag*, 636.

Blits, K.C. and Gallagher, J.L., 1990, Salinity tolerance of *Kosteletzkya virginica* 2. root-growth, lipid-content, ion and water relations, *Plant Cell Environ.,* 13, 419–425.

Bolwell, G.P., Woftastek, P., 1997, Mechanism for the generation of reactive oxygen species in plant defense-broad perspective, *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 51, 347-349.

Bor, M., Özdemir, F. and Türkan İ., 2003, The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in leaves of sugar beet *Beta vulgaris* L. and wild beet *Beta maritima* L., *Plant Sci.*, 164, 77-84.

Bradford, M.N., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem.*, 72, 248-254.

Bray, S., Reid, D.M., 2002, The effect of salinity and CO_2 enrichment on the growth and anatomy of the second trifoliate leaf of *Phaseolus vulgaris*, *Canadian Journal of Botany*, 80, 349-359.

Brugnoli, E. and Bjorkman, O., 1992, Growth of cotton under continuous salinity stress: influence on allocation pattern, stomatal and nonstomatal components of photosynthesis and dissipation of excess light energy, *Planta*, 187, 335–347.

Buchert, F., Forreiter, C., 2010, Singlet oxygen inhibits ATPase and proton translocation activity of the thylakoid ATP synthase CF1CFo, *FEBS Lett.*, 584, 147-152.

Cai-Hong, P., Su-Jun, Z., Zhi-Zhong, G., Bao-Shan, W., 2005, NaCl treatment markedly enhances H_2O_2-scavenging system in leaves of halophyte *Suaeda salsa*, *Physiol. Plantarum*, 125, 490-499.

Chartzoulakis, K. and Klapaki, G., 2000, Response of two green house pepper hybrids to NaCl salinity during different growth stages, *Sci. Hortic.*, 86, 247–260.

Cheeseman, J., 1988, Mechanisms of salinity tolerance in plants, *Plant Physiol.,* 87, 104–108.

Chen, T.H.H. and Murata, N., 2008, Glycinebetaine: an effective protectant against abiotic stress in plants, *Trends Plant Sci*., 13, 499–505.

Chung, S.K., Osawa, T. and Kawakishi, S., 1997, Hydroxyl radical-scavenging effects of spices and scavengers from brown mustard (*Brassica nigra*), *Bioscience Biotechn. and Biochem.,* 61(1):118-123.

Claussen, W., 2005, Proline as a measure of stress in tomato plants, *Plant Sci.*, 168, 241-248.

Clipson, N.J.W., Tomos, A.D., Flowers, T.J. and Wyn Jones, R.G., 1985, Salt tolerance in the halophyte *Suaeda maritima* L., *Dun. Planta*, 165, 392-396.

Collins, A., 2001, Carotenoids and genomic stability, *Mutat. Res.*, 475, 1-28.

Conde, C., Silva, P., Agasse, A., Lemoine, R., Delrot, S., Tavares, R. and Geros, H., 2007, Utilization and transport of mannitol in *Olea europaea* and implications for salt stress tolerance, *Plant Cell Physiol.*, 48, 42–53.

Corpas, F.J., Barroso, J.B., del Río, L.A., 2001, Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells, *Trends Plant Sci.*, 6, 145-150.

Cram, W.J., 1976, Internal factors regulating nitrate and chloride influx in plant cells, *J. Exp. Bot.*, 24, 328–341.

Creissen, G.P., Broadbent, P., Kular, B., Reynolds, H., Wellburn, A.R. and Mullineaux, P.M., 1994, Manipulation of glutathione reductase in transgenic plants: implications for plant responses to environmental stress, *Proc R Soc Edin.*, 102,167–75.

Cuin, T.A., Miller, A.J., Laurie, S.A., Leigh, R.A., 2003, Potassium activities in cell compartments of salt-grown barley leaves, *J Exp Bot.*, 54, 657-661.

Curtis, P.S., Lauchli, A., 1987, The effect of moderate salt stress on leaf anatomy in *Hibiscus cannabinus* (Kenaf) and its relation to leaf area, *American Journal of Botany*, 74 (4), 538-542.

Çakmak, İ., 2005, The role of potassium in alleviating detrimental effects of abiotic stresses in plants, *J. Plant Nutr. Soil Sci.,* 168, 521-530.

Dalal, M. and Khanna-Chopra, R., 2001, Differential response of antioxidant enzymes in leaves of necrotic wheat hybrids and their parents, *Physiologia Plantarum*, 111, 297–304.

Dat, J., Vandenabeele, S., Vranova, E., Van Montagu, M., Inze, D. and Van Breusegem, F., 2000, Dual action of the active oxygen species during plant stress responses, *Cell Mol Life Sci.,* 57, 779–95.

David, M., 1997, Antimicrobial activity of garlic, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41, 2286–2288.

Davis, P.H., Mill, R.R. and Tan, K., 1988, Flora of Turkey and the East Aegean Islands, *Edinburgh Univ. Press.*, Vol. 10, 166–169.

Del Rio, L.A., Corpas, F.J., Sandalio, L.M., Palma, J.M., Gomez, M., Barroso, J.B., 2002, Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes, *J. Exp. Bot*., 53, 1255-1272.

Delauney, A.J., Hu, C.A., Kishor, P.B. and Verma, D.P., 1993, Cloning of ornithine delta–aminotransferase cDNA from *Vigna aconitifolia* by trans–complementation in *Escherichia coli* and regulation of proline biosynthesis, *J. Biol. Chem.,* 268, 18673–18678.

Demiral, T. and Türkan, İ., 2005, Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance, *Environ. Exp. Bot.*, 53(3), 247-257.

Demiral, T., Türkan, İ., 2006, Exogenous glycinebetaine affects growth and proline accumulation and retards senescence in two rice cultivars under NaCl stress, *Environ. Exp. Bot*., 56, 72-79.

Dietz, K.J., Tavakoli, N., Kluge, C., Mimura, T., Sharma, S.S., Harris, G.C., Chardonnens, A.N., Golldack, D., 2001, Significance of the V-type ATPase for the adaptation to stressful growth conditions and its regulation on the molecular and biochemical level, *J. Exp. Bot.*, 52, 1969–1980.

Dinar, H.M., Ebert, G. and Ludders, P., 1999, Growth, chlorophyll content, photosynthesis and water relations in guava (*Psidium guajava* L.) under salinity and different nitrogen supply, *Gartenbauwissenschaft*, 64, 54–59.

Dixon, D.P. and Edwardsa, R., 2010, Glutathione transferases, *American Society of Plant Biologists, The Arabidopsis Book*, Number 8.

Drennan, P. and Pammenter, N.W., 1982, Physiology of salt secretion in the mangrove *Avicennia marina* (Forssk.), *New Phyt*., 91, 597-606.

Dybing, E., Nelson, J.R., Mitchell, J.R., Sesame, H.A., Gillette, J.R., 1976, Oxidation of a methyldopa and other catechols by chytochromes R450-generated superoxide anion: possible mechanism of methyldopa hepatitis, *Mol. Pharmacol.*, 12, 911-920.

Edwards, E.A., Rawsthorne, S. and Mullineaux, P.M., 1990, Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum* L.), *Planta*, 180, 278–84.

Ekim, T., Koyuncu, M., Vural, M., Duman, H., Aytaç, Z., Adıgüzel, N., 2000, Red Data Book of Turkish Plants (Pteridophyta and Spermatophyta), *Türkiye Tabiatını Koruma Derneği*, Ankara.

Elstner, E.F., 1987, Metabolism of activated oxygen species, in: D.D. Davies (Ed.), *Biochemistry of Plants*, Academic Press, 253-315.

Elstner, E. F., 1991, Mechanism of oxygen activation in different compartments of plant cells, In: Pell, E.J. and Steffen, K.L., (ed.) Active oxygen/oxidative stress and plant metabolism, *American Society of Plant Physiologists,* 13-25.

Eltayeb, A.E., Kawano, N., Badawi, G.H., Kaminaka, H., Sanekata, T., Morishima, I., Shibahara, T., Inanaga, S., Tanaka, K., 2006, Enhanced tolerance to ozone and drought stresses in transgenic tobacco overexpressing dehydroascorbate reductase in cytosol, *Physiol. Plant*, 127, 57–65.

Eltayeb, A.E., Kawano, N., Badawi, G.H., Kaminaka, H., Sanekata, T., Shibahara, T., Inanaga, S., Tanaka, K., 2007, Overexpression of monodehydroascorbate reductase in transgenic tobacco confers enhanced tolerance to ozone, salt and polyethylene glycol stresses, *Planta,* 225, 1255-1264.

Ertürk, U., Sivritepe, N., Yerlikaya, C., Bor, M., Özdemir, F. and Türkan, İ., 2007, Responses of the cherry rootstock to salinity in vitro, *Biologia Plantarum*, 51 (3), 597-600.

Evelin, H., Kapoor, R. and Giri, B., 2009, Arbuscular mycorrhizal fungi in alleviation of salt stress: a review, *Annals of Botany,* 104: 1263–1280.

Ferreira, R.R., Fornazier, R.F., Vitoria, A.P., Lea, P.J., Azevedo, R.A., 2002, Changes in antioxidant enzyme activities in soybean under cadmium stress, *J. Plant Nutr.*, 25, 327-342.

Flowers, T.J., Troke, P.F., Yeo, A.R., 1977, The mechanism of salt tolerance in halophytes, *Annu. Rev. Plant Physiol*., 28, 89–121.

Flowers, T.J., Hajibagheri, M.A. and Clipson, N.J.W., 1986, Halophytes, *Quart Rev Biol.,* 61, 313–335.

Flowers, T., 2004, Improving crop salt tolerance, *J. Exp. Bot.,* 55, 307–319.

Force, L., Critchley, C., Van Rensen, J.J.S., 2003, New fluorescence parameters for monitoring photosynthesis in plants, *Photosynth. Res.,* 78, 17-33.

Foyer, C.H. and Halliwell, B., 1976, The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism, *Planta*, 133, 21-25.

Foyer, C.H., Lopez-Delgardo, H., Dat, J.F. and Scott, I.M., 1997, Hydrogen peroxide and glutathione associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signaling, *Physiol. Plant.*, 100, 241–54.

Foyer, C.H. and Noctor, G., 2003, Redox sensing and signaling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria, *Physiol Plant*, 199,355-364.

Foyer, C.H., Noctor, G., 2005, Redox homeostis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses, *Plant Cell,* 17, 1866-1875.

Freeman, J.L., Persans, M.W., Nieman, K., Albrecht, C., Peer, W., Pickering, I.J., Salt, D.E., 2004, Increased glutathione biosynthesis plays a role in nickel tolerance in *Thlaspi* nickel hyperaccumulators, *Plant Cell*, 16, 2176–2191.

Fridovich, I., 1989, Superoxide dismutases: An adaptation to a pragmatic gas, *J. Biol. Chem.,* 264, 7761-7764.

Frugoli, J.A., Zhong, H.H., Nuccio, M.L., McCoourt, P., McPeek, M.A., Thomas, T.L. and McClung, C.R., 1996, Catalase is encoded by multigene family in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, *Plant Physiology*, 112(1), 327-336.

Gapinska, M., Skłodowska, M, Gabara, B., 2008, Effect of short - and long-term salinity on the activities of antioxidative enzymes and lipid peroxidation in tomato roots, *Acta Physiol. Plant.*, 30, 11–18.

Garg, N., Manchanda, G., 2009, ROS generation in plants: boon or bane?, *Plant Biosys.*, 143, 8-96.

Ghassemi, F., Jakeman, A.J., Nix, H.A., 1995, Salinization of land and water resources, human causes, extent, management, and case studies, *University of New South Wales*, Sydney.

Gill, S.S., Tuteja, N., 2010, Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants, *Plant Physiology and Biochemistry,* 48, 909-930.

Glenn, E.P., Brown, J.J., Blumwald, E., 1999, Salt tolerance and crop potential of halophytes, *Crit. Rev. Plant. Sci*., 18, 227–255.

Greenway, H., 1972, Salt responses of enzymes from species differing in salt tolerance, *Plant Physiol.,* 49, 256–259.

Greenway, H., and Munns, R., 1980, Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes, *Annu Rev Plant Physiol.*, 49, 256-259.

Greuter, W., Wagenitz, G., Agababian M. and Hellwig F.H., 2001, Proposal to conserve the name *Centaurea* (Compositae) with a conserved type, *Taxon,* 50, 1201-1205.

Gupta, N.K., Meena, S.K., Gupta, S. and Khandelwal, S.K., 2002, Gas exchange, membrane permeability, and ion uptake in two species of Indian jujube differing in salt tolerance, *Photosynthetica*, 40, 535–539.

Harber, F., Weiss, J., 1934, The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salt, *A Math Phys. Sci*., 147, 337–351.

Halfter, U., Ishitani, M. and Zhu, J.K., 2001, The Arabidopsis SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by calcium-binding protein SOS3, *Proceed. Natl. Acad. Sci.*, 97, 3735-3740.

Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C., 1999, Free radicals in biology and medicine, 3rd ed. Oxford, *Oxford University Press*.

Hamed, K.B., Castagna, A., Salem, E., Ranieri, A., Abdelly, C., 2007, Sea fennel (*Crithmum maritimum* L.) under salinity conditions: a comparison of leaf and root antioxidant responses, *Plant Growth Regul.,* 53, 185-194.

Hare, P.D., Cress, W.A. and Van Staden, J., 1998, Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress, *Plant Cell Environment*, 21, 535-553.

Hasegawa, M., Bressan, A., Zhu, J.K. and Bohnert, H.J., 2000, Plant cellular and molecular responses to high salinity, *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Bio.,* 51, 463-499.

Hernandez, J.A., Jimenez, A., Mullineaux, P. and Sevilla, F., 2000, Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long term salt stress is associated with induction of antioxidant defences, *Plant Cell and Environment*, 23 853–862.

Hernandez, J.A., Almansa, M.S., 2002, Short-term effects of salt stress on antioxidant systems and leaf water relations of pea leaves, *Physiol Plant*, 115, 251–257.

Hernandez, J.A., Olmos, E., Corpas, F.J., Sevilla, F. and Del-Rio, L.A., 1995, Salt-induced oxidative stress in chloroplasts of pea plants, *Plant Sci.*, 105, 151 - 167.

Herzog, V. and Fahimi, H., 1973, Determination of the activity of peroxidase, *Anaytical Biochem.*, 55, 554-562.

Heuer, B., 1996, Photosynthetic carbon metabolism of crops under salt stress. In: M. Pesserkali (Ed.), Hand Book of Photosynthesis, *Marshal Dekar, Baten Rose,* 887–896, *USA*.

Hoagland, D.R., Arnon, D.I., 1950, The water-culture method for growing for plants without soil, *Univ. of Calif. Agric. Exp. Station*, 347, 1-32.

Horemans, N., Foyer, C.H., Potters, G., Asard, H., 2000, Ascorbate function and associated transport systems in plants, *Plant Physiology of Biochemistry*, 38, 531–40.

Hossain, Z., Mandal, A.K.A., Shukla, R., Datta, S.K., 2004, NaCl stres - its chromotoxic effects and antioxidant behaviour in roots of *Chrysanthemum morifolium* Ramat, *Plant Science*, 166 (1), 215-220.

Hu, Y.X., Bao, F., Li, J., 2000, Promotive effects of brassinosteroids on cell division involves a distinct CycD3-induction pathway in *Arabidopsis*, *The Plant Journal*, 24, 693-701.

Hu, J.P., 2007, Toward understanding plant peroxisome proliferation, *Plant Sig. Behav.*, 2, 308-310.

Hu, Y., Schmidhalter, U., 2005, Drought and salinity: a comparison of their effects on mineral nutrition of plants, *J. Plant Nutr. Soil Sci.,* 168, 541-549.

Hunt, R., Causton, D.R.B., Shipley, A., Askew, P., 2002, A modern tool for classical plant growth analysis, *Ann. Bot*., 90, 485-488.

Imlay, J.A., Linn, S., 1988, DNA damage and oxygen radical toxicity, *Science*, 240, 1302-1309.

Iqbal, M. and Ashraf, M., 2005, Changes in growth, photosynthetic capacity and ionic relations in spring wheat (*Triticum aestivum* L.) due to pre–sowing seed treatment with polyamines, *Plant Growth Regul.*, 46, 19–30.

IUCN., 2001., IUCN Red List Categories: Version 3.1. Prepared by the IUCN Species Survival Commission, IUCN, Gland Switzerland and Cambridge, UK.

Iyengar, E.R.R. and Reddy, M.P., 1996, Photosynthesis in highly salt–tolerant plants, In: M. Pesserkali (Ed.), *Handbook of Photosynthesis*, 897–909.

Jaleel, C.A., Gopi., R., Manivannan, P., Panneerselvam, R., 2007, Responses of antioxidant defense system of *Catharanthus roseus* (L.) G.Don. to paclobutrazol treatment under salinity, *Acta Physiol Plant*, 29, 205–209.

Jiang, M. and Zhang, J., 2001, Effect of abscisic acid on active oxygen species, antioxidative defense system and oxidative damage in leaves of maize seedlings, *Plant Cell Physiol*., 42(11), 1265-1273.

Jimenez, A., Hernandez, J.A., Del Rio, L.A., Sevilla, F., 1998, Evidence for the presence of the ascorbate glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves, *Plant Physiol.*, 114, 275–84.

Johnson, C.M., Ulrich, A., 1959, Analytical methods for use in plant analysis, *Calif. Aes. Bull*., 766, 11.

Joseph, B. and Jini, D., 2010, Insight into the role of antioxidant enzymes for salt tolerance in plants, *International Journal of Botany,* 6(4), 456-464.

Kadıoğlu, A., 1999, Bitki fizyolojisi, *Eser Ofset*, Trabzon, 348-370.

Kaiser, W.M., 1979, Reversible inhibition of the calvin cycle and activation of oxidative pentose phosphate cycle in isolated intact chloroplasts by hydrogen peroxide, *Planta*, 145, 377–82.

Kamal-Eldin, A., Appelqvist, L., 1996, The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols, *Lipids,* 31, 671–701.

Kao, W.Y., Tsai, T.T. and Shih, C.N., 2003, Photosynthetic gas exchange and chlorophyll a fluorescence of three wild soybean species in response to NaCl treatments, *Photosynthetica,* 41, 415–419.

Kerepesi, I. and Galiba, G., 2000, Osmotic and salt stress induced alteration in soluble carbohydrate content in wheat seedlings, *Crop Sci*., 40, 482–487.

Khan, M.A. and Ungar, I.A., 1997, Effect of thermoperiod on recovery of seed germination of halophytes from saline conditions, *Am. J. Bot.*, 84, 279–283.

Khan, M.A., Ungar, I.A., Showalter, A.M., 2000, The effect of salinity on the growth, water status and ion content of a leaf a succulent perennial halophyte, *Suaeda fruticosa* (L.) Forssk, *J Arid Environ*, 45, 73–84.

Kim, K.Y., Huh, G.H., Lee, H.S., Kwon, S.Y., Hur, Y., Kwak, S.S., 1999, Molecular characterization of cDNAs for two anionic peroxidases from suspension cultures of sweet potato, *Mol. Genet. Genomics*, 261, 941–947.

Kingsburry, R.W., Epstein, E., 1986, Salt sensitivity in wheat; a case for specific ion toxicity, *Plant Physiol.*, 80, 651–654.

Koca, H., Bor, M., Özdemir, F. and Türkan, İ., 2007, Effect of salt stress on lipid peroxidation, antioxidative enzymes and proline content of sesame cultivars, *Environ. Exp. Botany*, 60, 344-351.

Kocaçalışkan, İ., 2008, Bitki fizyolojisi, *Nobel Bilim ve Araştırma Merkezi,* Yayın no: 1338, 220-222.

Koji, Y., Shiro, M., Michio, K., Mitsutaka, T., Hiroshi, M., 2009, Antioxidant capacity and damages caused by salinity stress in apical and basal regions of rice leaf, *Plant Prod. Sci*., 12, 319-326.

Kono, Y. and Fridovch, I., 1983, Inhibition and reactivation of manganese catalase implications for valence changes at the active site manganese, *J. Biol. Chem.*, 258, 13646-13648.

Kour, H., Perkins, M.J., 1991, The free radical chemistry of food additives, In Ed: Arvoma O.I, Halliwell B., *Free Radicals and Food Additives*, New York.

Kruk, J., Hollander-Czytko, H., Oettmeier, W., Trebst, A., 2005, Tocopherol as singlet oxygen scavenger in photosystem II, *J. Plant Physiol.*, 162, 749–757.

Kuo, C.F., Mashino, T. and Fridovich, I., 1987, α-β-dihydroyisovalerate dehydratase a superoxide sensitive enzyme, *J. Biol. Chem.,* 262, 4724-4727.

Kurepa, J., Herouart, D., Montagu, M., Inze, D., 1997, Differential expression of Cu/Zn and Fe-superoxide dismutase genes of tobacco during development, oxidative stress, and hormonal treatments, *Plant Cell Physiol*., 38, 463-470.

Lacerda, C.F., Cambraia, J., Oliva, M.A., Ruiz, H.A., 2005, Changes in growth and in solute concentrations in sorghum leaves and roots during salt stress recovery, *Environ. Exp. Bot*., 54, 69-76.

Laemmli, U.K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head o bacteriophage T4, *Nature*, 227:680–685.

Larher, F., Aziz, A., Deleu, C., Lemesle, P., Ghaffar, A., Bouchard, F. and Plasman, M., 1998, Suppression of the osmoinduced proline response of rapeseed leaf discs by polyamines, *Physiol. Plant.*, 102, 139–147.

Lin, C.C. and Kao, C.H., 2000, Effect of NaCl on metabolism in rice leave, *Plant Growth Reg.*, 30, 151-155.

Liu, J. and Zhu, J.K., 1998, A calcium sensor homolog required for plant salt tolerance, *Science,* 280, 1943-1945.

Lovdal, T., Olsen, K.M., Slimestad, R., Verheul, M., Lillo, C., 2010, Synergetic effects of nitrogen depletion, temperature, and light on the content of phenolic compounds and gene expression in leaves of tomato, *Phytochemistry*, 71, 605–613.

Lutts, S., Kinet, J.M., Bouharmont, J., 1995, Effects of salt stress on growth, mineral nutrition and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance, *Plant Growth Regul.*, 19, 207-218.

Lutts, S., Majerus, V. and Kinet, J.M., 1999, NaCl effects on proline metabolism in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings, *Physiol. Plant.*, 105, 450–458.

Lutts, S., 2000, Exogenous glycinebetaine reduces sodium accumulation in salt stressed rice plants, *Int. Rice Res. Notes,* 25, 39–40.

Lutts, S., Almansouri, M. and Kinet, J.M., 2004, Salinity and water stress have contrasting effects on the relationship between growth and cell viability during and after stress exposure in durum wheat callus, *Plant Sci.,* 167, 9–18.

Maas, E.V. and Grieve, C.M., 1987, Sodium-induced calcium deficiency in salt-stressed corn, *Plant Cell Environ.*, 10, 559-564.

Madhava-Rao, K.V. and Sresty, T.V.S., 2000, Antioxidative parameters in the seedlings of pigeonpea (*Cajanus cajan* L. Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses, *Plant Science*, 157, 113-128.

Manivannan, P., Jaleel, C.A., Sankar, B., Somasundaram, R., Muralı, P.V., Sridharan, R. and Panneerselvam, R., 2007. Salt Stress Mitigation By Calcium Chloride In *Vigna radiata* (L.) Wilczek, *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica,* 49/2: 105–109.

Massoud, F.I., 1974, Salinity and alkalinity as soil degradation hazards, *FAO*, June 10–14.

Mansour, M.M.F., 2000, Nitrogen containing compounds and adaptation of plants to salinity stress, *Biol. Plant.*, 43, 491–500.

Marschner, H., 1986, Mineral nutrition in higher plants, *Academic Press*, 477–542.

Martins, M.B.G., Castro, P.R.C., 1999, Growth regulators and tomato leaf anatomy (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cv. Angela Gigante, *Scientia Agricola*, 56 (3), 693-703.

Meloni, D.A., Oliva, M.A., Martinez, C.A. and Cambraia, J., 2003, Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress, *Environ. Exp. Bot.*, 49, 69-76.

Mengel, K. and Kirkby, E.A., 2001, Principles of plant nutrition, *5th Edn. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers*, 848.

Millar, A.H., Mittova, V., Kiddle, G., Heazlewood, J.L., Bartoli, C.G., Theodoulou, F.L., Foyer, C.H., 2003, Control of ascorbate synthesis by respiration and its implication for stress responses, *Plant Physiol.*, 133, 443-447.

Mittler, R. and Zilinskas, B.A., 1993, Detection of ascorbate peroxidase activity in native gels by inhibition of the ascorbate dependent reduction of nitroblue tetrazolium, *Analytical Biochemistry*, 212, 540-546.

Mittler, R., 2002, Oxidative stress, antioksidants and stress tolerance, *Trends in Plant Science*, 7, 405-410.

Montillet, J.L., Chamnongpol, S., Rusterucci, C., Dat, J., Van de Cotte, B., Agnel, J.P., Battesti, C., Inze, D., Van Breusegem, F., Triantaphylides, C., 2005, Fatty acid hydroperoxides and H_2O_2 in the execution of hypersensitive cell death in tobacco leaves, *Plant Physiol.*, 138, 1516-1526.

Mullineaux, P.M., Rausch, T., 2005, Glutathione, photosynthesis and the redox regulation of stress responsive gene expression, *Photosynth. Res.*, 86, 459-474.

Munne-Bosch, S., 2005, The role of α-tocopherol in plant stress tolerance, *J. Plant Physiol.,* 162, 743-748.

Munns, R. and Termatt, A., 1986, Whole plant responses to salinity, *Aust. J. Plant Physiol.*, 13, 143-160.

Munns, R., 2000, Salinity, growth and phytohormones, *Kluwer Academic Publishers*, NJ, USA.

Munns, R., 2002, Comparative physiology of salt and water stres, *Plant Cell Environ.*, 25, 239–250.

Munns, R. and Tester, M., 2008, Mechanisms of salinity tolerance, *Annu. Rev. Plant. Bio.*, 59, 651-681.

Murakeozy, E.P., Nagy, Z., Duhaze, C., Bouchereau, A. and Tuba, Z., 2003, Seasonal changes in the levels of compatible osmolytes in three halophytic species of inland saline vegetation in Hungary, *J. Plant Physiol.*, 160, 395-401.

Murata, N., Mohanty, P.S., Hayashi, H. and Papageorgiou, G.C., 1992, Glycinebetaine stabilizes the association of extrinsic proteins with the photosynthetic oxygen – evolving complex, *FEBS Lett*., 296, 187-189.

Naidoo, G. and Rughunanan, R., 1990, Salt tolerance in the succulent, coastal halophyte, *Sarcocornia natalensis*, *J. Exp. Bot.,* 41, 497–502.

Nakano, Y. and Asada, K., 1981, Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-spesific peroxidase in spinach chloroplasts, *Plant and Cell Physiology*, 22, 867-880.

Naseer, S.H., Nisar, A. and Ashraf, M., 2001, Effect of salt stress on germination and seedling growth of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Pak. J. Biol. Sci.,* 4, 359–360.

Niu, X., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., Pardo, J.M., 1995, Ion homeostasis in NaCl stress environments, *Plant Physiol.,* 109, 735-42.

Niyogi, K.K., Shih, C., Chow, W.S., Pogson, B.J., Della-Penna, D., Bjorkman, O., 2001, Photoprotection in a zeaxanthin and lutein deficient double mutant of Arabidopsis, *Photosynthetic Res*., 67, 139-145.

Noctor, G. and Foyer, C., 1998, Ascorbate and glutathione: keeping active oxgen under control, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology,* 49, 249-279.

Noctor, G., Gomez, L., Vanacker, H., Foyer, C.H., 2002, Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling, *J. Exp. Bot.*, 53, 1283-1304.

Nonami, H. and Boyer, J.S., 1990, Primary events regulating stem growth at low water potentials, *Plant Physiol.*, 94, 1601-1609.

Nordberg, J., Arner, E.S.J., 2001, Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system, *Free Radi. Biol. Med.*, 31, 1287-1312.

Nyomora, A.M.S., Sah, R.N., Brown, P.H., Miller, R.O., 1997, Boron determination in biological materials by inductively coupled plasma atomic emission and mass spectrophotometry: effects of sample dissolution methods, *Fresenius J. Anal. Chem.,* 357, 1185-1191.

Oldeman, L.R., Hakkeling, R.T.A., Sombroek, W.G., 1991, World map of the status of human–induced soil degradation: An explanatory note, *ISRIC–UNEP Report*, Netherlands.

Orthen, B., Popp, M. and Smirnoff, N., 1994, Hydroxyl radical scavenging properties of cyclitols, *Proc. R. Soc. Edinburg Sect.*, 102, 269–272.

Özfidan, C., 2010, Ekzojen ABA uygulamasının kuraklık stresi (PEG-6000) altındaki yabani ve ABA-eksik *Arabidopsis* mutantları üzerindeki biyokimyasal ve fizyolojik etkilerinin araştırılması, Doktora Tezi, *Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü,* İzmir, 103-104.

Panda, S.K., 2001, Response of green gram seeds under salinity stress, *Indian J. Plant Physiol.*, 6, 438-440.

Parida, A., Das, A.B. and Das, P., 2002, NaCl stress causes changes in photosynthetic pigments, proteins and other metabolic components in the leaves of a true mangrove, *Bruguiera parviflora*, in hydroponic cultures, *J. Plant Biol.*, 45, 28-36.

Parida, A.K. and Das, A.B., 2005, Salt tolerance and salinity effects on plants: a review, *Ecotox. Environ. Safe,* 60, 324-349.

Parvaiz A., Shahid, U., and Satyawati, S., 2010, Mechanism of free radical scavenging and role of phytohormones in plants under abiotic stresses. M. Ashraf et al. (eds.), *Plant Adaptation and Phytoremediation*, 99-118.

Paul, M.J. and Cockburn, W., 1989, Pinitol, a compatible solute in *Mesembryanthemum crystallinum* L., *J. Exp. Bot.*, 40, 1093–1098.

Perez-Lopez, U., Robredo, A., Lacuesta, M., Sgherri, C., Munoz-Rueda, A., Navari-Izzo, F., Mena-Petite, A., 2009, The oxidative stress caused by salinity in two barley cultivars, mitigated by elevated CO_2, *Physiol. Plant,* 135, 29-42.

Poljakoff-Mayber, A., Somers, G.F., Werker, E. and Gallagher, J., 1994, Seeds of *Kosteletzkya virginica* (Malvaceae): their structure, germination, and salt tolerance, *Am. J. Bot.,* 81, 54–59.

Polle, A., 2001, Dissecting the superoxide dismutase–ascorbate–glutathione pathway by metabolic modeling: computer analysis as a step towards flux analysis, *Plant Physiol.*, 126, 445–62.

Poustini, K., Siosemardeh, A. and Ranjbar, M., 2007, Proline accumulation as a response to salt stress in 30 wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars differing in salt tolerance, *Genet. Resour. Crop. Evol*., 54, 925-934.

Puntarulo, S., Sanchez, R.A., Boveris, A., 1988, Hydrogen peroxide metabolism in soybean embryonic axes at the onset of germination, *Plant Physiol.*, 86, 626-630.

Qui, Q.S., Guo, Y., Dietrich, M.A., Schumaker, K.S., Zhu, J.K., 2002, Regulation of SOS1, plasma membrane Na^+/H^+ exchanger in *Arabidopsis thaliana* by SOS2 and SOS3, *Proceed. Natl. Acad. Sci.*, 99, 9061-9066.

Qiu-Fang, Z., Yuan-Yuan, L., Cai-Hong, P., Cong-Ming, L., Bao-Shan, W., 2005, NaCl enhances thylakoid-bound SOD activity in the leaves of C3 halophyte *Suaeda salsa* L., *Plant Sci*., 168, 423-430.

Radic, S., Radic-Stojkovic, M., 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.

Ramadan, T., 2000, Dynamics of salt secretion by *Sporobolus spicatus* (Vahl) Kunth from sites of differing salinity, *Annals. Bot*., 87, 259-266.

Rasmusson, A.G., Soole, K.L., Elthon, T.E., 2004, Alternative NAD(P)H dehydrogenases of plant mitochondria, *Annu. Rev. Plant Biol*., 55, 23-39.

Reich, P.B., Tjoelker, M.G., Walters, M.B., Vanderklein, D., Buschena, C., 1998, Close association of RGR, leaf and root morphology, seed mass and shade tolerance in seedlings of nine boreal tree species grown in high and low light, *Functional Ecology,* 12, 327–338.

Rengasamy, P., 2002, Transient salinity and subsoil constrainst to dryland farming in Australian sodic soils an overview, *Aus J. of Exp. Botany Agriculture*, 42, 351-362.

Rengel, Z., 1992, The role of calcium in salt toxicity, *Plant Cell Environ*, 15, 625–632.

Rhoads, D.M., Umbach, A.L., Subbaiah, C.C., Siedow, J.N., 2006, Mitochondrial reactive oxygen species, contribution to oxidative stress and interorganellar signaling, *Plant Physiol.,* 141, 357-366.

Sairam, R.K., Srivastava, G.C., 2002, Changes in antioxidant activity in subcellular fractions of tolerant and susceptible wheat genotypes in response to long-term salt stress, *Plant Sci.*, 162, 897-904.

Sayed, O.H., 2003, Chlorophyll fluorescence as a tool in cereal crop research, *Photosynthetica*, 41, 321-330.

Scalet, M., Federico, R., Guido, M.C., Manes, F., 1995, Peroxidase activity and polyamine changes in response to ozone and simulated acid rain in *Aleppo pine* needles, *Environ. Exp. Bot*., 35, 417-425.

Scandalios, J.G., 1990, Response of plant antioxidant defense genes to environmental stress, *Adv. Genet.,* 28, 1-41.

Screenivasulu, N., Ravanjulu, V., Ramachandru, K., Prakash, S., Shekar-Shetty, H., Savithri, H.S., Sudhakar, C., 1999, Total peroxidase activity and peroxidase isoforms as modified by salt stress in two cultivars of foxtail millet with differential salt tolerance*, Plant Sci,* 141, 1-9.

Seçkin, B., Sekmen, A.H., Türkan, İ, 2009, An enhancing effect of exogenous mannitol on the antioxidant enzyme activities in roots of wheat under salt stress, *J Plant Growth Regul*, 28, 12–20.

Seçkin, B., Türkan, İ., Sekmen, A.H., Özfidan, C., 2010, The role of antioxidant defense systems at differential salt tolerance of *Hordeum marinum* Huds. (sea barleygrass) and *Hordeum vulgare* L. (cultivated barley), *Environmental and Experimental Botany,* 69, 76–85.

Seevers, F.M., Daly, J.M. and Caterdal, F.F., 1971, The role of peroxidase isozymes in resistance to wheat stem rust, *Plant Physiology,* 48, 353-360.

Sekmen, A.H., Türkan, İ., Takio, S., 2007, Differential responses of antioxidative enzymes and lipid peroxidation to salt stress in salt-tolerant *Plantago maritima* and salt-sensitive *Plantago media, Physiol. Plant*, 131, 399-411.

Sekmen, A.H., 2009, Tuz stresinin farklı tuz toleransına sahip iki *Plantago* türünün fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri üzerine etkisinin araştırılması, Doktora Tezi, *Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, İzmir, 4-5.

Serbinova, E.A., Packer, L., 1994, Antioxidant properties of α-tocopherol and α-tocotrienol, *Methods Enzymol,* 234, 354-366.

Shabala, N.S., Shabala, S.I., Martynenko, A.I. Babourima, O. and Newman, I.A., 1998, Salinity effect on the bioelectric activity, growth, Na^+ accumulation and chlorophyll fluorescence of maize leaves; a comparative survey and prospects for screening, *Australian J. Plant Physiol*., 25: 609–16.

Shalata, A., Mittova, V., Volokita, M., Guy, M. and Tal. M., 2001, Response of the cultivated tomato and it's wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennelli* to salt dependent oxidative stress: the root antioxidative system, *Physiologia Plantarum*, 112, 487-494.

Shannon, M.C., 1985, Adaptation of plants to salinity, *Adv. Argon,* 60, 75–119.

Sharma, S., Sharma, K.P. and Uppal, S.K., 1997, Influence of salt stress on growth and quality on sugarcane, *Indian J. Plant Physiol.*, 2, 179-180.

Sharp, R.E., Hsiao, T.C. and Silk, W.K., 1988, Growth of the maize primary root at low water potentials, I. Spatial distribution of expansive growth, *Plant Physiol.*, 87, 50-57.

Shi, H., Zhu, J.K., 2002, Regulation of expression of the vacuolar Na^+/H^+ antiporter gene ATNHX1 by salt stress and ABA.

Shigeoka, S., Ishikawa, T., Tamol, M., Miyagawa, Y., Takeda, T., Yabuta, Y., Yoshimura, K., 2002, Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes, *Journal of Experimental Botany*, 53, 1305-1319.

Shoeb, M., Jaspars, M., Manus, M., Çelik, S.M., Nahar, S. L., Kong-Thoo-Lin, P. and Sarker, S.D., 2007, Anti-colon cancer potential of phenolic compounds from the aerial parts of *Centaurea gigantea* (Asteraceae), *J. Nat. Med.,* 61, 164–169.

Sibole, J.V., Montero, E., Cabot, C. and Poschenrieder, C.B., 1998, Role of sodium in the ABA–mediated long–term growth response of bean to salt stress, *Physiol. Plant*, 104, 299-305.

Sieferman-Harms, D., 1987, The light harvesting function of carotenoids in photosynthetic membrane, *Plant Physiol.,* 69, 561-568.

Siripornadulsil, S., Train, S., Verma, D.P.S. and Sayre, R.T., 2002, Molecular mechanisms of proline–mediated tolerance to toxic heavy metals in transgenic microalgae, *Plant Cell*, 14, 2837-2847.

Smart, R.E. and Bingham, G.E., 1974, Rapid estimates of relative water content, *Plant Physiol.*, 53, 258-260.

Smirnoff, N., 1993, The role of active oxygen in the responce of plants to water deficit and desiccation, *New Phytol.*, 125, 27-58.

Smirnoff, N., 2000, Ascorbic acid: metabolism and functions of a multifacetted molecule*, Curr Opin Plant Bio.*, 3, 229-235.

Sönmez, B., 2003, Türkiye çoraklık kontrol rehberi, *Toprak ve Gübre Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü*, teknik yayın no, 33.

Srivalli, B., Chinnusamy, V., Khanna-Chopra, R., 2003, Antioxidant defense in response to abiotic stresses in plants, *J. Plant Biol.,* 30, 121–139.

Sultana, N., Ikeda, T. and Itoh, R., 1999, Effect of NaCl salinity on photosynthesis and try matter accumulation in developing rice grains, *Environ. Exp. Bot.,* 42, 211–220.

Strogonov, B.P., 1964, Physiological basis of salt tolerance in plants, *Academy of Science USSR and Davey and Co*.

Szabolcs, I., 1994, Soils and salinization, In: Pessarakli, M. (Ed.), *Handbook of Plant and Crop Stress*, 3-11, New York.

Taiz, L. and Zeiger, E., 2008, Bitki fizyolojisi, İ, Türkan (Ed.), Palme Yayıncılık, 593-621.

Takemura, T., Hanagata, N., Sugihara, K., Baba, S., Karube, I., Dubinsky, Z., 2000, Physiological and biochemical responses to salt stress in the mangrove, *Bruguiera gymnorrhiza*, *Aquat. Bot.*, 68, 15-28.

Torres, M.A., Dangl, J.L., 2005, Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development, *Curr. Opin. Plant Biol.*, 8, 397–403.

Türkan, İ., Demiral, T., 2009, Recent developments in understanding salinity tolerance, *Environ. Exp. Bot*., 67, 2-9.

Ushimaru, T., Nakagawa, T., Fujioka, Y., Daicho, K., Naito, M., Yamauchi, Y., Nonaka, H., Amako, K., Yamawaki, K., Murata, N., 2006, Transgenic *Arabidopsis* plants expressing the rice dehydroascorbate reductase gene are resistant to salt stress, *J. Plant Physiol.*, 163, 1179-1184.

Vaidyanathan, H., Sivakumar, P., Chakrabarty, R., Thomas, G., 2003, Scavenging of reactive oxygen species in NaCl-stressed rice (*Oryza sativa* L.) differential response in salt-tolerant and sensitive varieties, *Plant Sci.*, 165, 1411-1418.

Verbruggen, N., Hermans, C., 2008, Proline accumulation in plants: a review, *Amino Acids*, 35, 753-759.

Veselov, D.S., Sharipova, G.V., Veselov, S.U., Kudoyarova, G.R., 2008, The effects of NaCl treatment on water relations, growth, and ABA content in barley cultivars differing in drought tolerance, *J. Plant Growth Regul.*, 27, 380-386.

Vital, S.A., Fowler, R.W., Virgen, A., Gossett, D.R., Banks, S.W., Rodriguez, J., 2008, Opposite roles for superoxide and nitric oxide in the NaCl stress-induced upregulation of antioxidant enzyme activity in cotton callus tissue, *Environ. Exp. Bot.,* 62, 60-68.

Vural, M., Duman, H., Aytaç, Z., Adıgüzel, N., 2006, *Saponaria karapinarensis*, *Senecio salsuginea* and *Centaurea tuzgoluensis*, three new species from Central Anatolia, *Belg. J. Bot*., 139, 1-9.

Wagenitz, G., 1975, *Centaurea* L. In P.H. Davis (Ed.), Flora of Turkey and The East Aegean Islands, *Edinburgh: Edinburgh University Press*, 465–585.

Wagenitz, G., 1986, *Centaurea* in South-West Asia: patterns of distribution and diversity, *Proc. Royal Soc. Edinburgh*, 89, 11-21.

Waisel, Y., 1972, Biology of halophytes, *Academic Press*, New York.

Weretilnyk, E.A., Bednarek, S., McCue, K.F., Rhodes, D., Hanson, A.D., 1989, Comparative biochemical and immunological studies of the glycine betaine synthesis pathway in diverse families of dicotyledons, *Planta*, 178:342–352.

Westgate, M.E. and Boyer, J.S., 1985, Osmotic adjustment and the inhibition of leaf, root, stem and silk growth at low water potentials in maize, *Planta,* 164, 540-549.

Willekens, H., Chamnongpol, S., Davey, M., Schraudner, M., Langebartels, C., Van Montagu, M., 1997, Catalase is a sink for H_2O_2 and is indispensable for stress defence in C3 plants, *The EMBO Journal*, 16, 4806-4816.

Woodbury, W., Spencer, A.K., Stahman, M.A., 1971, An improved procedure for using ferricyanide for detecting catalase isozymes, *Anal. Biochem.*, 44, 301-305.

Xiang, C., Werner, B.L., Christensen, E.M., Oliver, D.J., 2001, The biological function of glutathione revisited in *Arabidopsis* transgenic plants with altered glutathione levels, *Plant Physiol.*, 126, 564-574.

Yeo, A.R., Lee, K.S., Izard, P., Boursier, P.J., Flowers, T.J., 1991, Short-term and long-term effects of salinity on leaf growth in rice (*Oryza sativa* L.), *J. Exp. Bot.*, 42, 881–889.

Yeo, A.R., 1998, Molecular biology of salt tolerance in the context of whole-plant physiology, *J. Exp. Bot.*, 49, 915-929.

Yazıcı, I. 2005, Farklı semizotu (*Portulaca oleracea* L.) genotiplerinde tuz stresine bağlı olarak bazı fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerin araştırılması, Doktora Tezi, *Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, İzmir.

Yazıcı, I., Türkan, İ., Sekmen, A.H. and Demiral, T., 2007, Salinity tolerance of purslane (*Portulaca oleracea* L.) is achieved by enhanced antioxidative system, lower level of lipid peroxidation and proline accumulation, *Environ Exp Bot*, 61(1), 49-57.

Yıldız, M., Terzi, H., Cenkci, S., Arıkan-Terzi, E.S., Uruşak, B., 2010, Bitkilerde tuzluluğa toleransın fizyolojik ve biyokimyasal markörleri, *Anadolu University Journal of Science and Technology –C, Life Sciences and Biotechnology*, 1, 1-33.

Yokoi, S., Quintero, F.J., Cubero, B., Ruiz, M.T., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M. and Pardo, J.M., 2002, Differential expression and function of *Arabidopsis thaliana* NHX Na^+/H^+ antiporters in the salt stress response, *Plant J.*, 30, 529-539.

Young, I.S. and J. McEneny, 2001, Lipoprotein oxidation and atherosclerosis, *Biochem. Soc. Trans.*, 29: 358-362.

Zhu, J.K., Shi, J., Singh, U., Wyatt, S.E., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., Capita, N.C., 1993, Enrichment of vitronectin and fibronectin like proteins in NaCl-adapted plant cells and evidence for their involvement in plasma membrane-cell wall adhesion, *Plant J.*, 3, 637-646.

Zhu, J.K., 2002, Salt and drought stress signal transduction in plants, *Annu. Rev. Plant Biol*., 53, 247-273.

Zhu, J.K., 2003, Regulation of ion homeostasis under salt stress, *Curr. Opin. Plant Biol.,* 6, 441-445.

Zhu, J.K., 2007, Plant Salt Stress, *Encyclopedia of life sciences*, doi: 10.1002/9780470015902.a0001300.pub2.

Zhu, J.K., Bie, Z.L., 2007, Effects of NaCl stress on photosynthetic characteristics of three cucumber rootstock seedlings, *Acta Horticulturae Sinica*, 34(6), 1418-1424.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı	**:**	Evren YILDIZTUGAY
Uyruğu	**:**	T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi	**:**	Şereflikoçhisar, 08.04.1981
Telefon	**:**	0 332 2232777
e-mail	**:**	eytugay@selcuk.edu.tr

EĞİTİM

Derece		**Adı, İlçe, İl**	**Bitirme Yılı**
Lise	:	Cemil Keleşoğlu Lisesi, Selçuklu, Konya	1998
Üniversite	:	Selçuk Üniversitesi, Selçuklu, Konya	2003
Yüksek Lisans	:	Selçuk Üniversitesi, Selçuklu, Konya	2006
Doktora	:	Selçuk Üniversitesi, Selçuklu, Konya	2011

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	**Kurum**	**Görevi**
31.03. 2006	Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi	Arş.Gör.

UZMANLIK ALANI

Bitki Fizyolojisi ve Bitki Sistematiği

YABANCI DİLLER

İngilizce

YAYINLAR

Yıldıztugay, E., Sekmen, A.H., Türkan, İ., Küçüködük, M., 2011, Elucidation of physiological and biochemical mechanisms of an endemic halophyte *Centaurea tuzgoluensis* under salt stress, *Plant Physiology and Biochemistry*, doi:10.1016/j.plaphy.2011.01.021 (Basımda) **(Doktora Tezinden)**.

Yıldıztugay, E., Küçüködük, M., Özel, M., Özdemir, C., 2009, A new record for the Flora of Turkey: *Crambe hispanica* L. (Brassicaceae), *Turk J Bot*, 33, 227-230.

Zengin, G., Aktümsek, A., Güler, G.Ö., Çakmak, Y.S., Yıldıztugay, E., 2011, Antioxidant properties of methanolic extract and fatty acid composition of *Centaurea urvillei* DC. subsp. *hayekiana* Wagenitz, *Rec. Nat. Prod.,* 5(2), 123-132.

Yıldıztugay, E., Küçüködük, M., 2010, The Flora of Kaş Plateau and its surroundings (Anamur - Mersin/Turkey), *Biological Diversity and Conservation, Biodicon*, 3/2, 170-184.

Yıldıztugay, E., Küçüködük, M., 2010, The flora of Anamur antique city and its surroundings (Mersin/Turkey), *Biological Diversity and Conservation, Biodicon*, 3/3, 46-63.

Yıldıztugay, E., Bağcı, Y., Tugay, O., 2006, Başarakavak, Tatköy ve Altınapa Barajı (Konya) arasında kalan bölgenin florası, *Selçuk Ünv. Fen Dergisi*, 28, 99-124 **(Yüksek Lisans Tezinden).**

Yıldıztugay, E., Bağcı, Y., Küçüködük, M., 2009, Endemic plants of Başarakavak and environs (Konya, Turkey), *Botanica Serbica* 33 (2), 147-155 **(Yüksek Lisans Tezinden).**

Tugay, O., Ertuğrul, K., Yıldıztugay, E., 2005, Başarakavak (Konya) Kasabası etnobotanik alan araştırması 2004 yılı çalışması, *TÜBA Kültür Envanteri Dergisi*, 4, 245-257.

Tugay, O., Ertuğrul, K., Yıldıztugay, E., 2008, Başarakavak Kasabasının (Konya/Türkiye) halk tıbbında kullanılan bitkileri, *1. Uluslararası Türk Tıp Tarihi Kongresi 10. Ulusal Türk Tıp Tarihi Kongresi*, Bildiri Kitabı.

Yıldıztugay, E., Bağcı, Y., 2008, Başarakavak Kasabası ve çevresindeki (Konya) bazı soğanlı bitkileri, *19. Ulusal Biyoloji Kongresi Trabzon,* (Poster), *Bildiri Kitapçığı*, 344 **(Yüksek Lisans Tezinden).**

Tugay, O., Ertuğrul, K., Yıldıztugay, E., 2009, Başarakavak (Konya) Kasabası etnobotanik özellikleri, IX. *Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi.*

Küçüködük, M., Yıldıztugay, E., Özel, M., 2009, Geophytes of Anemurion Antique City (Mersin/Turkey), *5th Balkan Botanical Congress - Book of Abstracts*, 21.

Yıldıztugay, E., Bağcı, Y., Küçüködük, M., 2009, Endemic Plants of Başarakavak and environs (Konya-Turkey), *5th Balkan Botanical Congress - Book of Abstracts*, 23-24 **(Yüksek Lisans Tezinden).**

Hamurcu, M., Küçüködük, M., Gezgin, S., Hakkı, E.E., Yıldıztugay, E. ,2010, Effects of application of boron on growth of soja (*Glycine max* L.) Merr., *45th Croatian & 5th International Symposium on Agriculture.*

Keskin, H., Hamurcu, M., Uygan, S., Sekmen, A.H., Yıldıztugay, E., Hakkı, E.E., Gezgin, S., Türkan, İ., 2009, Arpa çeşitlerinde (*hordeum vulgare*) bor toksisitesinin temel fizyolojik ve biyokimyasal özelliklere etkisinin belirlenmesi, XVI. *Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, Bildiri Kitabı,* P-BHB15.

Küçüködük, M. & Yıldıztugay, E., 2011, Endemic plants of Kaş Plateau and its surroundings (Anamur -Mersin/Turkey), *Biosystematics Berlin 2011*, Poster I-39, 217.