T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TUZ STRESİNE MARUZ BIRAKILAN ÇELTİK (*Oryza sativa* L.) ÇEŞİTLERİNDE RADİKAL SÖNDÜRME VE ANTİOKSİDAN ENZİM AKTİVİTELERİ

Pınar ORCAN

DOKTORA TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DİYARBAKIR
Temmuz-2017

T.C

DİCLE ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

DİYARBAKIR

Pınar ORCAN tarafından yapılan "**Tuz Stresine Maruz Bırakılan Çeltik (*Oryza sativa* L.) Çeşitlerinde Radikal Söndürme ve Antioksidan Enzim Aktiviteleri**" konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Biyoloji Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyesinin

Ünvanı Adı Soyadı

Başkan: Prof.Dr. Hasan Çetin ÖZEN

Üye : Doç.Dr. Çiğdem IŞIKALAN (Danışman)

Üye : Prof.Dr. Göksel KIZIL

Üye : Prof.Dr. Fikriye KIRBAĞ ZENGİN

Üye : Prof.Dr.Rabiye TERZİ

Tez Savunma Sınavı Tarihi: 14/07/2017

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

.../...../201..

Doç.Dr. Sevtap SÜMER EKER

ENSTİTÜ MÜDÜR V.

(MÜHÜR)

TEŞEKKÜR

Onları tanıdığım günden beri her konuda tarifi edilemez büyük yardımlarını gördüğüm, daima yanımda olan, hislerimi kelimelere sığdıramadığım çok değerli danışman hocalarım sayın Doç.Dr. Çiğdem IŞIKALAN ve Doç.Dr. Filiz AKBAŞ'a müteşekkerim.

Tüm çalışmalarım sırasında kendi çalışmasından ayırt etmeden en zor zamanımda sıkılmadan bıkmadan yanımda olan ayrıca manevi destekçim de olan çok değerli arkadaşım Arş.Gör.Dr. İbrahim Selçuk KURU'ya teşekkür ederim. Ayrıca, tez çalışmam boyunca güler yüzlülükleriyle beni motive etmeye çalışan ve desteklerini esirgemeyen çok değerleri arkadaşlarım sayın Yrd.Doç.Dr. Nesrin HAŞİMİ, Yrd.Doç.Dr. Selami ERCAN ve Öğ.Grv.Dr. Ercan ÇINAR'a teşekkür ederim.

Yüksek Lisans öğrenimimden bu yana desteğini, tavsiyelerini hiçbir şekilde esirgemeyen, sevecen, güler yüzlü çok değerli hocam sayın Prof.Dr. Süreyya NAMLI'ya teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuar çalışmam sırasında karşılaştığım güçlükleri çözmemde yardımını esirgemeyen çok kıymetli arkadaşım Uzman Kadir Serdar ÇELİK'e teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca, çalışmalarım sırasında laboratuar iş yükümü hafifleten Yüksek Lisans Öğrencisi Şerife AYDINARIĞ'a teşekkür ederim. İhtiyaç duyduğum her anda yanımda olmakta tereddüt etmeyen ve unuttuğum arkadaşlarım varsa hepsinden özür diler teşekkürü bir borç bilirim. Çalışmamın SDS-PAGE analizlerinde hiçbir desteğini esirgemeyen Kafkas Üniversitesi öğretim üyesi sayın Yrd.Doç.Dr. Cem ÖZİÇ ve Dicle Üniversitesi öğretim üyesi sayın Yrd.Doç.Dr. Sevgi İRTEGÜN hocalarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmamın her aşamasında en büyük destekçim olarak yanımda olan sevgili eşim Mehmet Yusuf ORCAN'a teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasını FEN.15.005 nolu proje ile destekleyen Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (DÜBAP)'ne teşekkür ederim.

Bu tezi; bugünlere gelmemde en büyük katkıları olan başta tüm ailem, özellikle de annem AYTAN, babam MUSTAFA ve çalışmamın deney aşamasında bana ilk annelik duygusunu hissettirerek motive eden sevgili kızım CEMRE'ye adıyorum.

İÇİNDEKİLER

		Sayfa
TEŞEKKÜR……		I
İÇİNDEKİLER ……		II
ÖZET……		V
ABSTRACT……		VII
ÇİZELGE LİSTESİ……		IX
ŞEKİL LİSTESİ……		XI
KISALTMA VE SİMGELER……		XIII
1.	**GİRİŞ……**	1
2.	**KAYNAK ÖZETLERİ……**	7
2.1.	Çeltik ……	7
2.1.1.	Çeltiğin Tarihçesi ve Orjini……	7
2.1.2.	Çeltik Üretimi……	7
2.1.3.	Çeltiğin Besinsel ve Tıbbi Değeri ……	8
2.2.	Stres……	9
2.2.1.	Tuz Stresi……	9
2.2.1.1.	Tuzlu Toprakların Dağılımı……	10
2.2.1.2.	Tuz stresinin Bitki Gelişimi Üzerine Etkisi……	10
2.2.2.	Stres Faktörlerinin Ozmolitler Üzerindeki Etkisi……	12
2.2.3.	Reaktif Oksijen Türleri……	13
2.2.3.1.	Reaktif Oksijen Türleri (ROT)'nin Kimyası……	13
2.2.3.2.	ROT Çeşitleri……	15
2.2.3.3.	ROT'un Biyolojik Makromoleküller Üzerine Etkisi……	17
2.2.4.	Antioksidan Savunma Sistemi……	20
2.2.4.1.	Enzimatik Antioksidan Savunma Mekanizması……	20
2.3.	Literatür Özetleri……	22
2.4.	Çalışmanın Amacı……	27
3.	**MATERYAL VE METOT……**	29

3.1.	Bitkisel Materyal ……...…….	29
3.1.1.	Çeşitlerin Genel Özellikleri…….	29
3.2.	Metot...…….……..	31
3.2.1.	Çözeltilerin Hazırlanması……..……..	31
3.2.2.	Bitkisel Materyallerin Yetiştirilmesi.....	31
3.2.3.	Deneme Deseni ve NaCI Stres Faktörü Uygulamaları.....	32
3.2.4.	Bazı Büyüme Parametrelerinin Ölçülmesi……..	33
3.2.5.	Yaprak Bağıl Su İçeriklerinin Belirlenmesi (%)……..……..	33
3.2.6.	Fotosentetik Pigment İçeriklerinin Belirlenmesi…….	34
3.2.7.	Lipid Peroksidasyon Derecesinin Belirlenmesi…….....	34
3.2.8.	Prolin İçeriğinin Belirlenmesi…….	35
3.2.9.	Antioksidan Enzim Ekstraksiyonu……..	36
3.2.9.1.	Toplam Çözünebilir Protein Miktarının Belirlenmesi…….	36
3.2.9.2.	Katalaz Enzim (CAT) Aktivitesinin Belirlenmesi……..	37
3.2.9.3.	Askorbat Peroksidaz (APX) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi……	37
3.2.9.4.	Glutatyon Redüktaz (GR) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi…….	38
3.2.9.5.	Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi…….	39
3.2.10.	ROT Aktivitesinin İncelenmesi……...	38
3.2.10.1.	Süperoksit Radikali ($O_2^{\bullet-}$) Söndürme Aktivitesinin İncelenmesi……	39
3.2.10.2.	Hidroksil Radikali ($HO^{\bullet}$) Söndürme Aktivitesinin İncelenmesi…….	40
3.2.10.3.	Hidrojen Peroksit (H_2O_2) Söndürme Aktivitesinin İncelenmesi…….	41
3.2.11.	Hidrojen Peroksit (H_2O_2) Miktarının Belirlenmesi…….	41
3.2.12.	Proteinlerin SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi) ile Analizi…….	42
3.2.13.	İstatistiki Analiz……..	43
4.	**ARAŞTIRMA BULGULARI……...**	45
4.1.	Kültürel İşlemler.....	45
4.2.	Çeşitlerde Sürgün ve Kök Uzunlukları……...	47
4.3.	Çeşitlerin Yaprak Taze -Kuru Ağırlıkları……...	49
4.4.	Çeşitlerin Yapraklarında Zararlanma Derecesinin Belirlenmesi…….	52

4.5.	Çeşitlerde Bağıl Su İçeriklerinin Belirlenmesi (%)…….	52
4.6.	Fotosentetik Pigment İçeriklerinin Belirlenmesi…….	56
4.7.	Çeşitlerde Lipid Peroksidasyonu Derecesinin Belirlenmesi……...…	62
4.8.	Tolerant ve Hassas Çeltik Çeşitlerinde Yapılan analizler……..	65
4.8.1.	Prolin İçeriğinin Belirlenmesi…….	65
4.8.2.	Toplam Çözünebilir Protein Miktarının Belirlenmesi…..……	67
4.8.3.	Antioksidan Enzim Aktivitelerinin İncelenmesi…….	68
4.8.3.1.	CAT Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi……..	68
4.8.3.2.	APX Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi…..…….	69
4.8.3.3.	GR Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi…….	71
4.8.3.4.	SOD Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi……..	72
4.9.	Reaktif Oksijen Türleri (ROT) Aktivitesinin İncelenmesi……..	73
4.9.1.	$O_2^{\cdot -}$ Radikali Söndürme Aktivitesinin İncelenmesi……..……	73
4.9.2.	$HO^{\cdot}$ Radikali Söndürme Aktivitesinin İncelenmesi……..…….….	75
4.9.3.	H_2O_2 Söndürme Aktivitesinin İncelenmesi…….	77
4.10.	H_2O_2 Miktarının Belirlenmesi……...…….	78
4.11.	SDS-PAGE……...……...	80
5.	**TARTIŞMA VE SONUÇ…….**	83
6.	**KAYNAKLAR……...**	103
ÖZGEÇMİŞ…….		127

ÖZET

TUZ STRESİNE MARUZ BIRAKILAN ÇELTİK (*Oryza sativa* L.) ÇEŞİTLERİNDE RADİKAL SÖNDÜRME VE ANTİOKSİDAN ENZİM AKTİVİTELERİ

DOKTORA TEZİ

Pınar ORCAN

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

2017

Bu çalışmada, kontrollü koşullar altında yetiştirilen çeltik (*Oryza sativa*) çeşitleri 10 gün süre ile üç farklı konsantrasyonda uygulanan tuz stres faktörüne maruz bırakılmıştır. NaCI tuzluluğunun etkisi ile Gala, Edirne, Şumnu, Neğiş, Tunca ve Aromatik-1 çeltik çeşitleri ile 2 yerel popülasyonun (Karacadağ, Hazro) stres faktörüne karşı vermiş oldukları fizyolojik ve biyokimyasal yanıtlarda meydana gelen değişimler incelenmiştir. NaCI (100, 200 ve 300 mM) ile oluşturulan stres koşullarında, konsantrasyona bağlı olarak değişen yanıtlar çeşitlerin hassas veya tolerant seviyeleri ile ilişkilendirilmiş ve tuza dayanıklı/hassas olan çeşitler tespit edilmiştir.

İki aşamalı olarak yürütülen çalışmamızın birinci aşamasında, NaCI uygulamalarının etkisi ile kök-sürgün uzunluğu, yaprak taze-kuru ağırlığı, yaprak zararlanma derecesi, bağıl su içeriği, pigment içeriği ve lipidperoksidasyon seviyelerinde meydana gelen değişimler incelenmiştir. Bağıl su içeriği bakımından yüksek tuz konsantrasyonunda en az etkilenen çeşidin Tunca (%85) ve Aromatik 1 (%86) olduğu tespit edilirken, Gala (%66) ve Karacadağ (%74) ise kontrole göre en çok etkilenen çeşitler olarak belirlenmiştir. Farklı çeltik çeşitleri ile yaptığımız bu çalışmanın birinci aşamasında araştırılan parametreler içerisinden ayırt edici sonuçlar lipid peroksidasyon analizlerinden alınmıştır. 300 Mm NaCI uygulaması sonucunda Tunca ve Aromatik-1 çeşitlerinde çok düşük MDA artışı gözlenmesine rağmen, Karacadağ, Neğiş ve Gala'da MDA'ya ait bu miktar yüksek bulunmuştur. Uygulama grupları kontrolleri ile karşılaştırıldığında, çeşitler arasından Gala ve Karacadağ'ın diğerlerine göre daha hassas, Aromatik-1 ve Tunca çeşitlerinin ise tuzluluğa karşı daha dayanıklı olduğu belirlenmiştir.

Çalışmanın ikinci aşamasında ise söz konusu 4 çeltik çeşidinde tuz stresinin etkisini gözlemlemek ve hassas/tolerant seviyeleri hakkında kesin bir sonuca ulaşabilmek amacıyla, çeşitlerin prolin içeriği, antioksidan savunma sisteminde etkili olan enzimleri (SOD, CAT, APX ve GR) ve ROT söndürme aktiviteleri araştırılmıştır. Ayrıca bu çeşitlerde toplam çözünebilir protein profilleri de SDS-PAGE tekniği kullanılarak incelenmiştir. Sonuç olarak Tunca ve Aromatik-1'de SOD, CAT, APX ve GR enzim aktivitelerinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. 300 mM tuz konsantrasyonu uygulamalarında Karacadağ ve Gala çeşitlerinin H_2O_2 miktarı kontrollerine göre önemli miktarda artış göstermiş ve bu çeşitlere ait enzim aktivitelerinin yanısıra H_2O_2 içeriğindeki değişimler de birinci aşamada yapılan analiz sonuçlarını destekler yönde olmuştur.

Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde, enzim aktivitelerinin tuza toleranslı olarak kabul edilen çeşitlerde, duyarlı olanlara kıyasla daha fazla miktarda arttığı ve çeşitlere göre farklılaşan

antioksidan enzim aktivitelerinin ROT söndürme ile paralel sonuçlar verdiği tespit edilmiştir. Sonuç olarak, tuz toleransını sağlayan antioksidan mekanizmalarının NaCI seviyesine ve çeltik çeşitlerine göre değiştiğini ifade edebiliriz.

Anahtar Kelimeler: Çeltik (*Oryza sativa* L), Tuzluluk stresi, Antioksidan enzim, ROT, SDS-PAGE.

ABSTRACT

RADICAL SCAVENGING AND ANTIOXIDANT ENZYME ACTIVITIES IN RİCE (*Oryza sativa* L.) VARIETIES EXPOSED TO SALT STRESS

PhD THESIS

Pınar ORCAN

DEPARTMENT OF BIOLOGY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY OF DICLE

2017

The physiological and biochemical responses of a variety of rice (*Oryza sativa* L.) exposed to salt (NaCI) stress was associated with their sensitive and tolerant levels. The rice varieties involve Gala, Edirne, Şumnu, Neğiş, Tunca and Aromatik-1 and 2 local populations, named Karacadağ and Hazro. These species were grown under controlled conditions and they were exposed to the salt stress factor at three different concentrations of NaCI (100, 200 and 300 mM) for 10 days. The effects of salt on the physiological and biochemical responses to the stress factors were investigated. As a result, the species having a high level of tolerance/sensitivity to salinity were identified.

In the first phase of this two-stepped study, we investigated the changes in the root-shoot length, the weight of dried fresh leaf, the level of leaf damage, the relative water content, pigment content and the level of lipid peroxidation caused by the application of the salt. It was found that the highest salt concentration mostly affects the relative water content in Gala (66%) and Karacadağ (74%) while this was the least affected in Tunca (85%) and Aromatik-1 (86%) species compared with their reference conditions. Among the parameters, lipid peroxidation produced the most significant outcomes. The application of 300 mM NaCl caused a very low malondialdehyde (MDA) increase in Tunca and Aromatik-1 while this was higher in Karacadağ, Neğiş and Gala. The results also showed that among the species Gala and Karacadağ had a higher sensitivity while Tunca and Aromatik-1 had a higher resistance against salinity compared with their respective controls.

In the second phase of the study, the investigation is focused on the measurement of proline content and the content of enzymes played roles in antioxidant defense system such as SOD, CAT, APX and GR, and also reactive oxygen species (ROS) scavenging activities. These observations will provide further concrete evidence of the influence of the salt stress on these species and their sensitivity and tolerance levels. Besides, the total soluble protein profiles to in these species were measured by SDS-PAGE technique. The results indicated that SOD, CAT, APX and GR enzyme activities were higher in Tunca and Aromatik-1. In addition, the amount of H_2O_2 in Karacadağ and Gala at 300 mM salt was significantly higher compared to that in their controls. Changes in the enzyme activities in these two species and H_2O_2 levels are consistent with the observations reported in the previous stage.

All together, it was found that the enzyme activities were higher in the species with the higher salt tolerance compared with those having a higher salt sensitivity. The difference in the antioxidant enzyme activity was in paralel with that in ROS scavenging activities. In conclusion, we may suggest that the antioxidant mechanisms that provide salt tolerance change depending on the types of rice and the level of NaCI.

Keywords: Rice (*Oryza sativa* L), Salinity stress, Antioxidant enzyme, ROS, SDS-PAGE.

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge No		Sayfa
Çizelge 2.1.	Bazı ülkelerin yıllara göre pirinç üretim dağılımı (milyon ton) (TMO 2012)	8
Çizelge 2.2.	ROT süpürücü antioksidan enzimler (Gill ve Tuteja 2010)	21
Çizelge 3.1.	Çeltik çeşitlerinin genel özellikleri (2015)*	30
Çizelge 4.1.	NaCI'nin farklı konsantrasyonları ile oluşturulan stres ortamında çeşitlerin sürgün boyu uzunluğunda gözlenen değişimler (cm bitki^{-1})*	47
Çizelge 4.2.	NaCI'nin farklı konsantrasyonları ile oluşturulan stres ortamında çeşitlerin kök uzunluklarında meydana gelen değişimler (cm bitki^{-1}) *	48
Çizelge 4.3.	NaCI'nin farklı konsantrasyonları ile oluşturulan stres ortamında çeşitlerin yaprak taze ağırlıklarında meydana gelen değişimler (g)*	49
Çizelge 4.4.	NaCI'nin farklı konsantrasyonları ile oluşturulan stres ortamında çeşitlerin yaprak kuru ağırlıklarında meydana gelen değişimler (g)*	51
Çizelge 4.5.	NaCI'nin farklı konsantrasyonlarıile oluşturulan stres ortamında çeşitlerin bağıl su içeriklerinde meydana gelen değişimler (%)*	55
Çizelge 4.6.	NaCI'nin farklı konsantrasyonları ile oluşturulan stres ortamında çeşitlerin klorofil-a içeriklerinde meydana gelen değişimler (mg g^{-1} TA)*	56
Çizelge 4.7.	NaCI'nin farklı konsantrasyonları ile oluşturulan stres ortamında çeşitlerin klorofil-b içeriklerinde meydana gelen değişimler (mg g^{-1} TA)*	58
Çizelge 4.8.	NaCI'nin farklı konsantrasyonları ile oluşturulan stres ortamında çeşitlerin toplam klorofil içeriklerinde meydana gelen değişimler (mg g^{-1} TA)*	59
Çizelge 4.9.	NaCI'nin farklı konsantrasyonları ile oluşturulan stres ortamında çeşitlerin toplam karotenoid içeriklerinde meydana gelen değişimler (µg g^{-1} TA)*	61

Çizelge 4.10. NaCI'nin farklı konsantrasyonları ile oluşturulan stres ortamında çeşitlerin MDA miktarında meydana gelen değişimler (µmol g^{-1} TA)* 64

Çizelge 4.11. NaCI'nin farklı konsantrasyonları ile oluşturulan stres ortamında çeşitlerin prolin içeriklerinde meydana gelen değişimler (mmol g^{-1} TA)* 66

Çizelge 4.12. NaCI'nin farklı konsantrasyonları ile oluşturulan stres ortamında çeşitlerin toplam çözünebilir protein içeriklerinde meydana gelen değişimler (mg g^{-1} TA)* 67

Çizelge 4.13. NaCI'nin farklı konsantrasyonları ile oluşturulan stres ortamında çeşitlerin katalaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişimler (U mg^{-1} protein TA)* 68

Çizelge 4.14. NaCI'nin farklı konsantrasyonları ile oluşturulan stres ortamında çeşitlerin askorbat peroksidaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişimler (U mg^{-1}protein TA)* 70

Çizelge 4.15. NaCI'nin farklı konsantrasyonları ile oluşturulan stres ortamında çeşitlerin glutatyon redüktaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişimler (U mg^{-1} protein TA)* 71

Çizelge 4.16. NaCI'nin farklı konsantrasyonları ile oluşturulan stres ortamında çeşitlerin süperoksit dismutaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişimler (U mg^{-1} protein TA)* 73

Çizelge 4.17. NaCI'nin farklı konsantrasyonları ile oluşturulan stres ortamında çeşitlerin $O_2^{\cdot -}$ radikali söndürme aktivitesinde meydana gelen değişimler (%) 74

Çizelge 4.18. NaCI'nin farklı konsantrasyonları ile oluşturulan stres ortamında çeşitlerin $HO^{\cdot}$ radikali söndürme aktivitesinde meydana gelen değişimler (%) 76

Çizelge 4.19. NaCI'nin farklı konsantrasyonları ile oluşturulan stres ortamında çeşitlerin H_2O_2 söndürme aktivitesinde meydana gelen değişimler (%) 77

Çizelge 4.20. NaCI'nin farklı konsantrasyonları ile oluşturulan stres ortamında çeşitlerin H_2O_2 içeriklerinde meydana gelen değişimler (µ mol g^{-1} TA)* 79

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil No		Sayfa
Şekil 2.1.	Enerji transferi sonucu ROT oluşumu (Gill ve Tuteja 2010)	14
Şekil 2.2.	Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları	14
Şekil 2.3.	ROT oluşumu (Sharma ve ark. 2012)	15
Şekil 3.1.	Bitkisel materyal olarak kullanılan çeltik tohumları	29
Şekil 3.2.	MDA standart eğrisi	35
Şekil 3.3.	L-Prolin standart eğrisi	35
Şekil 3.4.	BSA standart eğrisi	36
Şekil 3.5.	Deoksiriboz metoduyla TBA-MDA kompleksinin oluşumu (Emen 2006)	40
Şekil 3.6.	H_2O_2 standart eğrisi	41
Şekil 4.1.	Çeşitlere uygulanan NaCI stres faktörünün etkisi **a.** Uygulamadan önce bitkilerin genel görünüşü **b.** Uygulamadan 10 gün sonra bitkilerin genel görünüşü	45
Şekil 4.2.	NaCI uygulamalarının 10.gününü takiben çeşitlerin görünüşü; **a.Gala** çeşidinin genel görünüşü, **b.Edirne** çeşidinin genel görünüşü, **c.Şumnu** çeşidinin genel görünüşü, **d. Neğiş** çeşidinin genel görünüşü, **e. Tunca** çeşidinin genel görünüşü **f. Aromatik-1** çeşidinin genel görünüşü **g. Karacadağ** çeşidinin genel görünüşü **h. Hazro** çeşidinin genel görünüşü	47
Şekil 4.3.	Uygulanan NaCI stres faktörünün çeşitlerde sürgün boyu uzunluğuna etkisi	48
Şekil 4.4.	Uygulanan NaCI stres faktörünün çeşitlerde kök uzunluğuna etkisi	49
Şekil 4.5.	Uygulanan NaCI stres faktörünün çeşitlerde yaprak taze ağırlığına etkisi	50
Şekil 4.6.	Uygulanan NaCI stres faktörünün çeşitlerde yaprak kuru ağırlığına etkisi	51
Şekil 4.7.	Uygulanan NaCI stres faktörünün etkisiyle çeşitlerde yaprak zararlanma derecesi	52

Şekil 4.8.	Uygulanan NaCI stres faktörünün çeşitlerde bağıl su içeriğine etkisi	53
Şekil 4.9.	Uygulanan NaCI stres faktörünün çeşitlerin klorofil-a içeriğine etkisi	57
Şekil 4.10.	Uygulanan NaCI stres faktörünün çeşitlerin klorofil-b içeriğine etkisi	57
Şekil 4.11.	Uygulanan NaCI stres faktörünün çeşitlerin toplam klorofil içeriğine etkisi	58
Şekil 4.12.	Uygulanan NaCI stres faktörünün çeşitlerin toplam karotenoid içeriğine etkisi	59
Şekil 4.13.	Uygulanan NaCI stres faktörünün çeşitlerin MDA içeriğine etkisi	62
Şekil 4.14.	NaCI stres faktörünün etkisiyle çeşitlerin prolin içeriğindeki değişimler	67
Şekil 4.15.	NaCI stres faktörünün etkisiyle çeşitlerin toplam çözünebilir protein içeriğindeki değişimler	68
Şekil 4.16.	NaCI stres faktörünün etkisiyle çeşitlerin CAT enzim aktivitesindeki değişimler	69
Şekil 4.17.	NaCI stres faktörünün etkisiyle çeşitlerin APX enzim aktivitesindeki değişimler	70
Şekil 4.18.	NaCI stres faktörünün etkisiyle çeşitlerin GR enzim aktivitesindeki değişimler	71
Şekil 4.19.	NaCI stres faktörünün etkisiyle çeşitlerin SOD enzim aktivitesindeki değişimler	72
Şekil 4.20.	NaCI stres faktörünün etkisiyle çeşitlerin hidrojen peroksit içeriğindeki değişimler	78
Şekil 4.21.	Uygulanan NaCI stres faktörünün faktörünün etkisiyle çeşitlerin protein profillerindeki (SDS-PAGE tekniği ile) değişimler (M, marker; AK, Aromatik-1-Kontrol; A100, Aromatik-1-100 mM NaCI; A200, Aromatik-1-200 mM NaCI; A300, Aromatik-1-300 mM NaCI; GK, Gala-Kontrol; G100, Gala-100 mM NaCI; G200, Gala-200 mM NaCI; G300, Gala-300 mM NaCI; KK, Karacadağ-Kontrol; K100, Karacadağ-100 mM NaCI; K200, 200 mM NaCI; Karacadağ-K300, Karacadağ-300 mM NaCI; TK, Tunca-Kontrol; T100, Tunca-100 mM NaCI; T200, Tunca-200 mM NaCI; T300, Tunca- 300 mM NaCI)	80

KISALTMA VE SİMGELER

ºC	: Santigrat derece
Na^+	: Sodyum
K^+	: Potasyum
Cl	: Klor
dek/kg	: Dekar/Kilogram
%	: Yüzde
Lt	: Litre
G	: Gram
Kg	: Kilogram
mM	: Milimolar
mmol	: Milimol
dk	: Dakika
µm	: Mikrometre
w	: Watt
mg	: Miligram
µl	: Mikrolitre
µmol	: Mikromol
µg	: Mikrogram
cm	: Santimetre
nm	: Nanometre
atm	: Atmosfer
pH	: Power of Hydrogen=Hidrojenin gücü
rpm	: Rotation per minute=Dakikadaki dönüş sayısı
Std	: Standart
U	: Ünite
MS	: Murashige&Skoog
dI-H_2O	: Deiyonize-Su
YA	: Yaş Ağırlık
KA	: Kuru Ağırlık
TA	: Taze Ağırlık

T.A	: Turgorlu Ağırlık
TCA	: Trikloro Asetik Asit
MDA	: Malondialdehit
TBA	: Tiyobarbütirik Asit
NaOCI	: Sodyum Hipoklorit
KI	: Potasyum iyodür
KNO_3	: Potasyum nitrat
H_3BO_3	: Borik asit
HCl	: Hidroklorik Asit
MgCI	: Magnezyum klorür
Na_2EDTA	: Sodyum Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
NaOH	: Sodyum Hidroksit
NaCI	: Sodyum Klorür
H_2O_2	: Hidrojen Peroksit
$^1O_2$	: Singlet Oksijen
$O_2^{\cdot -}$	: Süperoksit Radikali
$HO^{\cdot}$	: Hidroksil Radikali
ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
POX	: Peroksidaz
APX	: Askorbat Peroksidaz
CAT	: Katalaz
SOD	: Süperoksit Dismutaz

1. GİRİŞ

Doğaları gereği dış çevre ile sürekli ilişki halinde olan canlılar, bulundukları çevrede olumsuz koşullar oluşması durumunda, adaptasyon eksikliğine bağlı olarak stres koşullarına maruz kalırlar. Bitkilerin yaşadığı ortamda bir veya birden fazla etkenin, büyüme, gelişme, ürün verimi veya kalitesini olumsuz yönde etkileyerek, bir dizi gerilemeye neden olması "bitkisel üretimde stres" olarak tanımlanır.

Çevresel stresler abiyotik ve biyotik olmak üzere iki temel grupta sınıflandırılır: Bitkiler; böcek, patojen ve herbivorlar gibi organizmaların olumsuz etkilerine maruz kaldıklarında biyotik stres oluşur. Abiyotik stres faktörü ise çeşitli olumsuz çevresel faktörlerin organizmalar üzerindeki etkisinden ötürü ortaya çıkmaktadır (Lichtenhaler 1996; Schulze ve ark. 2005).

Doğaları gereği stres faktöründen kaçınma gibi bir yeteneğe sahip olmayan bitkiler olumsuz koşulların etkisiyle direkt karşı karşıya kalırlar. Maruz kaldıkları bu olumsuz durum karşısında korunmaya yönelik morfolojik, biyokimyasal veya moleküler düzeyde yanıtlar verebilen bitkiler, stres faktöründen etkilenme derecesine göre tolerant veya hassas olarak adlandırılır. Yapılan araştırmalarda stres faktörlerinin neden olduğu zararın bitkinin türüne, gelişme dönemine, tolerans ve adaptasyon kabiliyetine bağlı olarak değişebildiği bildirilmiştir (Kadıoğlu 2004; Madhova ve ark. 2005).

Bitkiler için en önemli stres faktörlerinden bir tanesi olan tuzluluk, dünya genelinde ekimi yapılan zirai alanların %23'ünü etkileyip bitki verimi ve üretimini tehdit etmektedir (El-Hendawy ve ark. 2005). Özellikle dünyanın bazı yerlerinde tarım için 3000 yıldır süren bu tehdidin gün geçtikçe büyüyerek yaygınlaştığı bildirilmiştir (Flowers 2006). Ülkemizde de toprak tuzluluğu, tarımsal verimliliği sınırlayan önemli çevresel stres faktörlerinden bir tanesi olarak kabul edilmekte olup, topraklarımızın yaklaşık 1.5 milyon hektarının (bunun %32.5'i sulanabilir alanlardır) tuzluluk sorunuyla karşı karşıya kaldığı bildirilmiştir (Ekmekçi ve ark. 2005). Ayrıca, her geçen yıl sulamaya açılan tarım alanlarının artması ile birlikte yoğun kimyasal ilaç ve gübre kullanımı da toprakta tuz oranının artmasına yol açmaktadır (Pakyürek 2006).

İklim değişikliğinin etkisiyle 2050 yılı itibariyle dünya genelinde tüm ekilebilir tarım alanlarının yarısından fazlasında tuzluluk oranı bakımından ciddi bir artış beklendiği (Wang ve ark. 2003), bu artışa bağlı olarak sürdürülebilir tarım alanlarının

önümüzdeki 25 yıl içerisinde %30'unun, 21. yüzyılın ortalarında ise %50'sinin tahrip olabileceği (Bonilla ve ark. 2004; Ahmadi ve ark. 2009) rapor edilmiştir. Bu nedenlerden dolayı bitkilerde tuz stresi araştırıcılar için oldukça dikkat çekici ve üzerinde önemle durulması gereken bir konu olarak ele alınmaktadır.

Bitki gelişimi üzerine tuzluluğun zararlı etkileri, toprağın düşük ozmotik potansiyeli (ikincil kuraklık), besinsel dengesizlikler, spesifik iyon etkileri (sodyum veya klor toksisitesi) veya bu faktörlerin birlikte etkisi ile ilişkilendirilmektedir (Ashraf 1994; Marschner 1995; Ashraf ve Harris 2004). Tuzluluk terimi "toprakta tuz çeşitlerinin yüksek konsantrasyonları"nı ifade etmektedir. Bilinen tuz çeşitleri arasından toprağın tuzlanmasına en fazla neden olan NaCI (sodyum klorür), sulanan arazilerin %24'ü ve ekilebilir alanların ise yaklaşık %10'unu etkilemektedir (Pessarakli ve Szabolcs 1999).

Bitkilerin çoğunda fotosentez, solunum, antioksidan metabolizma (Khan ve ark. 2012), osmolit birikimi, hormonal sinyal iletimi (Misra ve Gupta 2005) ve karbohidrat metabolizmasının (Chen ve ark. 2008) yanısıra biyokimyasal reaksiyonların da yüksek tuzluluktan etkilendiği bildirilmiştir. Tuz stres faktörü aynı zamanda, gelişmekte olan bitkilerde, metabolik süreçlerde olduğu gibi birçok enzim aktivitesi ve içeriğinin değişmesine de neden olmaktadır (Dubey 1997; Khan ve Panda 2008).

Bitkiler tarafından geliştirilen dayanıklılık stratejileri arasında; tuz iyonlarının dışarı atılması veya seçici olarak biriktirilmesi, kökler vasıtasıyla iyon alımının kontrolü, fotosentetik sinyal yolunda bazı değişimler, membran yapısında değişiklikler ve fitohormonların stimulasyonu yer almaktadır (Parida ve Das 2005). Bunların yanısıra, çeşitli stres faktörlerine karşı bitkiler; tokoferoller, flavonoidler, antosiyaninler, fenolik bileşikler, karotenoidler, glutatyon ve askorbat gibi ROT (Reaktif Oksijen Türleri) süpürücüler olarak görev yapan enzimatik olmayan moleküller ve spesifik ROT süpürücü antioksidatif enzimleri içeren etkili sistemleri devreye sokarlar.

Bitkilerde ROT; kloroplast, mitokondri ve peroksizomlar gibi farklı hücresel yapılarda yer alan çeşitli metabolik yolların yan ürünleri olarak sürekli üretilerek (del Rio ve ark. 2006; Navrot ve ark. 2007), hem serbest radikal ($O_2^{\bullet -}$; süperoksit radikalleri, $HO^{\bullet}$; hidroksil radikali, $HO_2^{\bullet}$; perhidroksi radikali ve $RO^{\bullet}$; alkoksi radikalleri) hem de radikal olmayan formlar (H_2O_2; hidrojen peroksit ve $^1O_2$; singlet oksijen) içerirler (Gill

ve Tuteja 2010). ROT'un süpürülmesi ve üretilmesi arasındaki dengeyi tuzluluk, kuraklık, ağır metaller, besin eksikliği, herbisitler ve patojen gibi stres faktörleri bozabilmektedir. Bu dengenin bozulması ROT üretiminde ani artışlara yol açarak hücre yapısında önemli zararlara neden olmaktadır (Gill ve Tuteja 2010).

Stres faktörünün etkisiyle hücrelerde meydana gelen ROT'un yapacağı olumsuz etkiyi önlenmeye yönelik olarak bitkiler; birer antioksidan enzim olan katalaz, glutatyon redüktaz, askorbat peroksidaz ve süperoksit dismutazı içeren çok sayıda detoksifikasyon mekanizması geliştirmişlerdir (Hemavathi ve ark. 2009; Gill ve Tuteja 2010; Noctor ve ark. 2012). Tuz stresine yanıt olarak bitkilerin antioksidatif cevapları üzerine yapılan çalışmalarda, antioksidatif enzimler ve lipid peroksidasyonu aktivitelerinde artış olduğu birçok araştırmacı (Lee ve ark. 2001; Noreen ve Ashraf 2009; Wang ve ark. 2009) tarafından rapor edilmiştir.

Tolerant *Plantago media* ve hassas *Plantago maritima* bitkilerinde tuz stres faktörü etkisinin araştırıldığı çalışmada, tuzluluğun artışına bağlı olarak hassas çeşide ait SOD, CAT, GR ve APX aktivitelerinde artış olduğu, tolerant çeşitte ise tuzluluk faktörünün söz konusu enzim aktivitelerinde düşüşe yol açtığı bildirilmiştir (Sekmen ve ark. 2007).

Bitkilerde tuz stresinin yol açtığı oksidatif stresin etkisiyle hücrede üretilen malondialdehitin (MDA) lipid peroksidasyonuna yol açtığı ve bu durumun etkili bir ROT olan süperoksit radikalinden ($O_2^{\bullet -}$) kaynaklandığı düşünülmektedir (Triantaphylidés ve ark. 2008; Tripathy ve Pattanayak 2010). Tarchoune ve ark. (2010) sodyum sülfat ve klorür tuzlarının etkisini inceledikleri araştırmalarında; antioksidan enzimlerin miktarında artış olduğunu ancak buna bağlı olarak lipid peroksidasyonu seviyesinde değişiklik olmamasının bir sonucu olarak, bitkilerde ROT'a karşı adaptasyon mekanizmasının sağlandığını bildirmişlerdir.

Yüksek tuzluluğa maruz kalan bitkilerin çoğunda prolin sentezindeki artış stres faktörüne ortak yanıt olarak kabul edilmektedir (Ben Hassine ve ark. 2008). Osmolit olarak kabul edilen ve aynı zamanda enzim kararlılığını sağlayan prolinin, stres süresince sentezi ve birikimi devam etmektedir (Kavi Kishor ve ark. 2005; Sharma ve Dubey 2005; Mishra ve Dubey 2006).

Çeltik (*Oryza sativa* L.) gibi yüksek yapılı glikofit bitkilerin büyüme ve ürün veriminin tuzluluktan etkilenmesi önemli bir problem olarak ortaya çıkmakta ve bu durum çeltik üretimini ciddi boyutta sınırlamaktadır. Özellikle kıyı bölgelerinde deniz seviyesinin yükselmesi, küresel ısınma ve insan kaynaklı faktörlerden dolayı bu problem günümüze kadar artarak devam etmektedir (Peltier ve Tushingham 1989; Wassmann ve ark. 2004).

Gelişmekte olan ülkelerin en önemli besin kaynağı ve dünya nüfusunun yarısından fazlasının temel besini olarak bilinen çeltik, mısır ve buğdaydan sonra en fazla ekimi yapılan otsu bir bitki türüdür (Sürek 1994). Oryza türleri dünyada geniş bir dağılım göstermekte ve çok çeşitli habitatlarda (bataklık, savan, ormanlık alan, tatlı su lagünleri, durgun sular, derin-sığ sular gibi) bulunabilmektedirler (Vaughan ve ark. 1994; Bay 2009).

Tuz stres faktörüne karşı dayanıklılığın bir göstergesi olan toleranslılık, bitki türüne, gelişme dönemine ve çevre şartlarına bağlı olarak çeşitlilik göstermektedir (Gürel ve Avcıoğlu 2001). Genç fide ve çiçeklenme döneminde, çeltik bitkisi tuzluluk faktörüne karşı yüksek oranda hassas iken, kardeşlenme döneminde daha yüksek dayanıklılık göstermektedir (Asch ve ark. 1995).

Bitki popülasyonunun artışı ve tuzluluğun etkisiyle arazilerin bozulması bitki bilimcilerini, genetik yaklaşımlar kullanarak "tuza-tolerant bitki geliştirme" fikrine yöneltmiştir (Läuchli ve Grattan 2007). Bitkilerde tuz toleransının mekanizmaları henüz yeterince anlaşılamadığı için tuzluluğa dayanıklı (toleranslı) çeşitlerin geliştirilmesindeki ilerlemeler yavaş olmuştur. Bu nedenle çeltiğin gelişim safhalarında tuzluluğa karşı verdiği biyokimyasal yanıtlar ve tuz stresinin etkisini belirlemek amacıyla yapılacak çalışmalar, tuza toleranslı çeltik çeşitlerinin geliştirilmesine (Alscher ve ark. 2002) önemli katkılar sağlayacaktır.

Tuz stres faktörünün bitkiler üzerinde yaptığı olumsuz etkileri içeren literatür taramalarından elde ettiğimiz verilere göre; ülkemizde ziraati yapılan çeltik çeşitleri hakkında yeterli çalışmanın olmadığı sonucu gözönünde bulundurularak çalışma konumuz NaCI stres faktörü ve çeltik çeşitleri olarak belirlendi. Çalışmamızın birinci aşamasında, ülkemizde yaygın olarak yetiştirilen 6 farklı çeltik çeşidi (Gala, Edirne, Şumnu, Neğiş, Tunca, Aromatik-1) ile Diyarbakır-Karacadağ civarında yetişen 2 yerel

popülasyonun (Karacadağ, Hazro) NaCI stres faktörüne karşı verdikleri fizyolojik ve biyokimyasal cevaplar incelenerek tolerant ve hassas çeşitler belirlenmiştir. İkinci aşamada ise hassas ve tolerant olarak belirlenen çeşitlerde toplam çözünebilir protein, H_2O_2 içeriği, antioksidan enzim aktivitesi, prolin birikimi ve ROT söndürme aktivitesi araştırılmıştır. Ayrıca hassas ve tolerant olduğu düşünülen çeltik çeşitlerinin yaprak dokularından elde edilen proteinler, Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) tekniği kullanılarak görüntülenmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Çeltik

2.1.1. Çeltiğin Tarihçesi ve Orjini

Oryzeae familyasının Oryza cinsine ait olan çeltik (*Oryzae sativa* L.) tarımının M.Ö. 3 bin yıllarında ilk olarak Hindistan'da başlayıp Batı'ya doğru yayılış gösterdiği, Türkiye'de ise 500 yıl önce başladığı düşünülmektedir (Kün 1985; Bay 2009).

20 çeşidi yabani olan Oryza cinsinin, 2'si kültüre alınmış türdür. Yabani türler genel olarak Afrika, Asya, merkez ve Güney Amerika ile Avustralya'nın tropik ve subtropik bölgelerinde yayılmıştır (Chang ve Bardenas 1965). Kültüre alınmış iki çeltikten birisi olan Afrika çeltiği (*Oryzae glaberrima*) Batı Afrika ile sınırlanmış olmasına rağmen, Asya çeltiği (*Oryzae sativa*) ticari olarak 112 ülkede yetiştirilmekte ve tüm dünyaya yayılmış durumdadır (Bertin ve ark. 1971).

Ülkelere, bölgelere veya farklı yörelere göre değişen damak zevki, kalite anlayışı, hastalık ve dış çevre koşullarına karşı dayanıklılılığın yanısıra üreticilerin de beklentileri dikkate alınarak, dünyada 140 binden fazla çeltik çeşidinin geliştirildiği tahmin edilmektedir. Ülkemizde de verim, kalite ve hastalıklara dayanıklılık konularında çeltik ıslah çalışmaları yapılmakta ve Gala, Tunca, Paşalı gibi yüksek verimli yeni çeşitler geliştirilmektedir (Sürek 2002).

2.1.2. Çeltik Üretimi

Dünyada yaklaşık 1.5 milyar hektar tarım alanı bulunmakta ve bunun yaklaşık 7 milyar dekarına tahıl ekilmektedir. Çeltik ise tüm tahıl ekimi içinde ortalama %22'sini karşılayarak üretimde %28'lik pay almaktadır (Anonim 2011; Donduran 2014). Çeltik üretimine ve dağılımına bakıldığında, üretim açısından Çin birinci sırada olup onu sırasıyla Hindistan, Endonezya, Bangladeş ve Vietnam takip eder ve bu beş ülke tüm dünyada toplam çeltik üretiminin %71'ini karşılamaktadırlar (FAO 2009).

Ekolojik yönden birçok bölgesi çeltik üretimine uygun olan ülkemizde, çeltik üretiminin bölgelere göre dağılımı incelendiğinde; Batı ve Doğu Marmara, Batı Karadeniz, Güneydoğu Anadolu en önemli çeltik üretim bölgeleridir. Marmara Bölgesi %67 ekim ve %72 üretim payı ile ekiliş ve üretim bölgesi olarak ilk sırayı alırken bunu

%20 ekim ve üretim payı ile Karadeniz bölgesi takip etmekte ve bu iki bölge, ülkemizdeki toplam çeltik üretiminin %90'ından fazlasını karşılamaktadır. Marmara bölgesinde çeltik üretimi bakımından ilk sıraları Tekirdağ, Edirne, Kırklareli, Balıkesir ve Çanakkale illeri almaktadır (Anonim 2011; TÜİK 2013). Çizelge 2.1.'de bazı ülkelerin yıllara göre pirinç üretim dağılımı verilmiştir.

Çizelge 2.1. Bazı ülkelerin yıllara göre pirinç üretim dağılımı (milyon ton) (TMO 2012)

ÜLKELER	2005 2006	2006 2007	2007 2008	2008 2009	2009 2010	2010 2011	2011 2012
ÇİN	126.40	127.20	130.20	134.35	136.55	137.00	140.50
HİNDİSTAN	91.80	93.35	96.70	99.20	89.10	95.98	102.75
ENDENOZYA	34.95	35.35	37.00	38.30	36.40	35.51	36.30
BANGLADEŞ	28.76	29.00	29.00	31.20	31.00	31.70	34.10
VİETNAM	22.77	22.92	24.38	24.40	24.99	26.37	26.45
TAYLAND	18.20	18.25	19.80	19.85	20.26	20.26	20.45
FİLİPİNLER	9.82	9.78	10.48	10.76	9.77	10.54	10.65
BREZİLYA	7.87	7.70	8.20	8.57	7.93	9.30	7.68
JAPONYA	8.26	7.80	7.93	8.00	7.70	7.72	7.65
ABD	7.10	6.27	6.29	6.55	7.13	7.59	5.87
PAKİSTAN	5.55	5.45	5.70	6.90	6.80	5.00	6.50
NİJERYA	2.14	2.55	2.01	2.63	2.73	2.62	2.71

2.1.3. Çeltiğin Besinsel ve Tıbbi Değeri

Tarladaki kabuklu formu "çeltik" olarak isimlendirilen bitkiye ait kimyasal bileşim çevre, toprak ve çeşide bağlı olarak büyük ölçüde değişiklik gösterir. Makro elementler (azot, fosfor ve potasyum gibi), mikro elementler (bakır, demir, manganez, çinko), kalsiyum (Ca), magnezyum (Mg) , kükürt (S), sodyum (Na) gibi ikinci derecede öneme sahip elementler ve B vitamini yönünden de zengin bir bitki çeşidi olarak bilinir.

Çeltik tanesinin yapısına bakıldığında %1-2 perikarp, %4-6 aleuron ve tohum nüvesi, % 2-3 embriyo, %89-94 nişastalı endosperm içermektedir (Zhou ve ark. 2002). İçeriğinde nişastadan sonra en fazla bulunan protein (Juliano 1972), pirincin besin kalitesi bakımından önem taşımaktadır (Osborne 1982). Aromatik ile aromatik olmayan çeltik örneklerinde yapılan araştırmada, pirinç protein franksiyonunun %9.7-14.2 albümin (suda çözünen), %13.5-18.9 globulin (tuzda çözünen), %3.0-5.4 prolamin (alkolde çözünen) ve %63.8-73.4 glutelin (asit veya alkalide çözünen) olarak değiştiği bildirilmiştir (Basak ve ark. 2002). Temel pirinç proteini glutelindir ve tahıl proteinleri arasında en yüksek besinsel değere sahip olduğu bildirilmiştir (Juliano 1972). Yapılan araştırma sonuçlarına göre, pirinçte ham protein oranının çeşitlere ve çevre şartlarına göre %7-8 arasında değişiklik gösterdiği bildirilmiştir (Koca ve Anıl 2001).

2.2. Stres

Çok farklı koşullara adapte olabilen bitkiler, hat safhalarda kendini gösteren olumsuz koşullara karşı dahi tolerans gösterebilme yeteneği geliştirmişlerdir (Hawkesford ve Buchner 2001; Horasan 2010).

Stres koşullarına karşı dayanıklılık seviyesi bitkilerde "tolerans" olarak tanımlanmaktadır. Olumsuz çevresel faktörler bitki gelişiminde gerilemeye neden olmasına rağmen sahip oldukları adaptasyon mekanizmaları bitkilerin hayatta kalmaları ve üremelerine olanak sağlamaktadır (Hawkesford ve Buchner 2001).

Bitkilerin stres faktörlerine karşı son derece karmaşık olan tepkisi 3 adımda gerçekleşir. Stres öncelikle bitki hücre membranındaki reseptörler aracılığıyla algılanır ve bunu kalsiyum, reaktif oksijen türleri, inositol fosfatlar gibi sekonder mesajcıların oluşumu izler. Sekonder mesajcılar hücre içi kalsiyum konsantrasyonunu ayarlayarak kalsiyum-bağlayıcı proteinlere kalsiyum iyonlarını bağlar. Bu etkileşim, stres-yanıt geninin transkripsiyon faktörlerinin kontrolü ve fosforilasyon kaskatının oluşumu ile sonuçlanır. Böylece, bitkiler oluşan stres faktörüne karşı bir savunma mekanizması geliştirirler (Köse 2012; Mahajan ve Tuteja 2005).

2.2.1. Tuz Stresi

En önemli stres etmenlerinden biri olan toprak tuzluluğu, bitkilerde büyüme ve gelişmeyi, ürünün nitelik ve niceliğini olumsuz şekilde etkilemektedir. Kurak ve yarı kurak alanlarda yağış miktarınının azlığına bağlı olarak tuzun topraktan yıkanarak yeraltı sularına karışması da düşük seviyelerde olmaktadır (Kaçar ve ark. 2002).

Sulama ve taban suyunda bulunan tuzlar zaman içerisinde toprak yüzeyine çıkarak toprakta tuzluluğun artmasına yol açmaktadır. Aynı zamanda, iyi drenaj sağlanmadan yapılan sulama da, tuzluluğun artmasına neden olan bir diğer etmen olarak değerlendirilmektedir. Tuzlu topraklarda en fazla bulunan katyonlar Na^{+}, Ca^{2+} ve Mg^{2+}, anyonlar ise Cl^{-} ve SO_4^{-2}'dir (Ergene 1982). Bitki gelişiminde olumsuz etkiye sahip en yaygın toprak tuzluluğu, Na^{+} ve Cl^{-}'den kaynaklanmaktadır (Tester ve Davenport 2003; Tunçer 2007).

2.2.1.1. Tuzlu Toprakların Dağılımı

Dünya üzerinde 800 milyon hektardan fazla karasal alan tuzluluktan etkilenmekte ve bu oran dünyanın tüm karasal alanlarının yaklaşık %6'sını kapsamaktadır. Ayrıca, 230 milyon hektar sulama yapılmış alanın 45 milyon hektarı tuzdan etkilenmektedir (Munns 2002). İklim değişikliğinin etkisi ile 2050 yılı itibariyle tüm ekilebilir tarım alanlarının yarısından fazlasının tuz stresi faktöründen ciddi bir şekilde etkilenebileceği de Wang ve ark. (2003) tarafından rapor edilmiştir. Ülkemizdeki toprakların ise yaklaşık 1.5 milyon hektarının tuzluluk sorunuyla karşı karşıya kaldığı bildirilmiştir (Ekmekçi ve ark. 2005).

2.2.1.2. Tuz stresinin Bitki Gelişimi Üzerine Etkisi

Bitkiler tuza karşı gösterdikleri tepkilere göre halofitler ve glikofitler olmak üzere iki grup altında değerlendirilir. Glikofitler 100-200 mM NaCI koşullarına bile dayanamazken, halofitler (*Salicornia herbacea, Atriplex vericaria* gibi) 300-400 mM NaCI bulunan ortamlarda bile yaşamlarını sürdürerek (Zhu 2007) tolerans mekanizmaları aracılığıyla ekstrem tuz koşullarına dayanabilmektedirler (Köse 2012). Mısır, soğan, turunçgiller (özellikle limon), marul, fasulye, ceviz, fındık, kayın ve zambak tuza çok duyarlı; domates, pamuk, çeltik, arpa, karanfil, ıhlamur, meşe ve çınar orta derecede toleranslı; palmiye, hurma, söğüt, meşe, kavak, şeker pancarı ve gül yüksek toleranslı bitkilerdir (Gürel ve Avcıoğlu 2001; Ekmekçi ve ark. 2005; Bressan ve ark. 2008).

Toprakta tuzluluğun yüksek olması bitkileri iki şekilde etkilemektedir; -Birincisi toprak çözeltisinden bitkilerin su alımını engelleyen toplam tuz etkisi veya osmotik etki, -İkincisi ise bitkilerdeki bazı fizyolojik olayları etkileyen toksik iyon etkisidir (James ve ark. 1982). Yüksek tuzluluğun neden olduğu su eksikliği ve iyonik toksisite bitkilerde fizyolojik ve biyokimyasal işlevi bozabilmektedir. Munns ve ark. (1995) bitkinin büyümesi üzerine tuzluluğun osmotik ve iyonik etkilerini gösteren iki aşamalı bir model sunmuştur: Birinci aşamada, bitkilerin yaşadığı ortamda tuzun yüksek konsantrasyonda bulunması bitkilerin su alımını düşürerek yapraklarda stoma kapanmasına yol açar ve bunun bir sonucu olarak hücrelerde turgor kaybı meydana gelir. İkinci aşamada ise bitki hücrelerinde daha çok yapraklarda, Na^+ birikimi meydana gelir ve oluşan Na^+ fazlalığı klorofil ile enzimlerin de yer aldığı fotosentetik bileşenleri olumsuz etkiler (Davenport

ve ark. 2005). Düşük tuzluluk bitilerde klorofil içeriğini arttırmasına rağmen yüksek tuzluluk klorofillerin moleküler yapısının bozulmasına yol açar (Ashraf ve Harris 2004).

Tuz stresinin neden olduğu osmotik ve iyon stresi etkisiyle ortamda artan Na^+ ve Cl^- iyonlarının K^+, Ca^{+2} ve NO_3^- gibi besin elementleri ile rekabete girmesiyle bitkilerde besin eksikliği veya besin dengesizliği meydana gelir (Hu ve Schmidhalter 2005). NaCl'nin yüksek konsantrasyonları hücre büyümesi üzerine negatif etki yaparken, potasyum ve kalsiyum iyonları bu iyonik toksisiteyi azaltmaktadır (Mahajan ve Tuteja 2005).

Tuz stresi; mitokondri ve kloroplastlardaki elektron transport zinciri, fotorespirasyon, yağ asidi oksidasyonu ve çeşitli detoksifikasyon reaksiyonlarının aşırı indirgenmesine yol açmaktadır (Miller ve ark. 2010). Genel olarak tuz stresine maruz kalan bitkilerin kök, gövde ve sürgün uzunluğu ile taze/kuru ağırlıklarında, yaprak alanı ve sayılarında, klorofil miktarında azalma ile birlikte verimde, meyve tat ve renklerinde bozulma meydana gelmektedir. Uzun süreli maruziyette, yaşlı yapraklarda iyon toksisitesi ve su noksanlığı, genç yapraklarda ise karbohidrat noksanlığı ve buna bağlı belirtilerin ortaya çıktığı kaydedilmektedir (Greenway ve Munns 1980; Franco ve ark. 1993; Sivritepe 1995; Tıpırdamaz ve Ellialtıoğlu 1994, 1997).

Tuzun zararlı etkileri genel olarak şu şekilde özetlenebilir:

- Toprakta tuzun bulunması, kök hücrelerinin osmotik potansiyelini artırmaktadır. Bu durumda, kökler topraktan suyu almakta zorlanır ve bünyelerindeki suyu da kaybedebilmektedirler.
- Bitkide tuzluluk, hücre duvarının genişlemesini durdurur ve büyümeyi engeller.
- Cl^- stresinin etkisiyle yapraklarda yanma ve yeşil uç yanıklığı meydana gelir. Klorozise neden olan bu durum, ileri safhalarda, yaprağın %50'sini kaplayabilmekte ve fotosentez etkinliğinin önemli derecede düşmesine yol açmaktadır.
- Tuzluluğu, bitkinin bütün metabolizmasını etkileyen bir faktör olarak tanımlayan Levitt (1980) tuz stresi sonucu oluşan iyon toksisitesini birincil stres faktörü olarak belirtmiş ve bu faktörün bir sonucu olarak oluşan su stresini ise ikincil stres faktörü olarak tanımlamıştır. Toprak içeriğinde tuzluluk arttığında suyun da

ozmotik potansiyeli düşer, böylece oluşan tuz stresi bitkide ikincil bir ozmotik stres olan "fizyolojik kuraklık stresi" ne yol açar (Gürel ve Avcıoğlu 2001).

Bitkilerde stresin etkisiyle turgor basıncının azalması; iyon alımını, vakuol bölümleşmesini ve çözünebilir solutların sentezini teşvik eder (Chinnusamy ve Zhu 2003). Temel çözünebilir solutlar; sukroz, fruktoz gibi şekerler, prolin ve glisin betain gibi yüklü metabolitlerdir (McCue ve Hanson 1990). Bitkiler bir stres faktörüyle karşılaştıklarında, osmokoruyucu olan bu solutlar sentezlenir. Osmolitlerin en önemli avantajı, hücrede osmotik ayarlama yoluyla enzim ve membranları yüksek tuzluluğun yıkıcı hasarından koruma ile birlikte hücreye su alımını sağlamalarıdır (Gupta 2006).

2.2.2. Stres Faktörlerinin Ozmolitler Üzerindeki Etkisi

Prolin tüm bitkilerde hem redox sinyallemede rol alan önemli bir molekül, hem de tuz, metal ve dehidrasyon koşulları altında oluşan ROT için etkili bir söndürücü olarak kabul görülmektedir (Alia ve Pardha 1991). Dolayısıyla bitkiler ROT'un olumsuz etkilerini azaltmak için proline ihtiyaç duyarlar (Chen ve Dickman 2005). L-Prolin sentezi bitkilerde; D1-prolin-5-karboksilat (P5C) aracılığıyla L-glutamik asitten; D1-prolin-5-karboksilat sentaz (P5CS) ve D1-prolin-5-karboksilat redüktaz (P5CR) enzimlerinin aktiviteleri tarafından katalizlenir (Verbruggen ve Hermans 2008).

Çeltikte tuzluluk stresi uygulamalarında, yapraklarda prolin birikiminde artış olduğu rapor edilmiştir (Hsu ve ark. 2003). Serbest prolinin bir osmoprotektan olarak işlev görmesinin yanısıra, protein sabitleyici ile metal kenetleyici, LPO inhibitörü, $HO^{\bullet}$ ve $^{1}O_2$ süpürücü olduğu yapılan çalışmalarla desteklenmiştir (Ashraf ve Foolad 2007; Trovato ve ark. 2008).

Tuza toleransları birbirinden farklı iki çeltik çeşidinin yapraklarında tuz stresi prolin birikimini arttırmıştır (Demiral ve Türkan 2005). Bitkilerde artan prolin birikimi, özellikle tuz ve kuraklık streslerine karşı toleransın geliştirilmesi ile ilişkilendirilmiştir. Tuz ve kuraklık stresleri koşullarında prolin sentezinin artması, metabolizma ile uyumlu değerlerde sitoplazmik asiditeyi hafifletmek ve $NADP^{+}$/NADPH korumak için bir mekanizma olarak düşünülmektedir (Hare ve Cress 1997).

Antioksidan savunma sistemi için önemli bir sinyal yolu olan Pentoz fosfat yolu aktivitesinin güçlendirilmesinde prolin sentezi oldukça önemlidir (Siripornadulsil ve

ark. 2002). Su ve Wu (2004) transgenik *O. sativa'*da stres varlığında uyarılan P5CS cDNA'sının prolin miktarında artışa yol açtığını ve bunun bir sonucu olarak tuzluluk ve su eksikliği streslerine toleransın arttığını bildirmişlerdir.

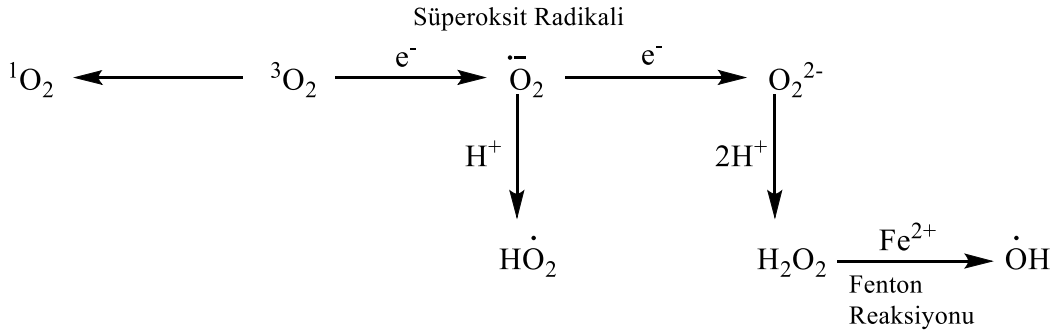
Martinez ve ark. (1996) tarafından dört patates türü üzerine yapılan bir çalışmada, tuz stresinin artmasıyla birlikte türlerde prolin içerikleri de artmıştır. Bu sonuçlar yüksek tuzluluk yönünden, prolin birikimi ile osmotik stres savunması arasında direkt bir ilişki olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca, Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*), çeltik (*Oryza sativa*) ve domates (*Lycopersicon esculentum*) üzerine yapılan bazı çalışmalarda, glisin betainin ifadesinden sorumlu gen söz konusu bitkilere transfer edilmiş ve gen aktarılan transgenik bitkilerde glisin-betainin tuz stresine direnci sağlayabildiği rapor edilmiştir (Hayashi ve ark. 1997,1998; Alia ve ark. 1998, 1999; Sakamoto ve ark. 2000; Chen ve Murata 2002).

2.2.3. Reaktif Oksijen Türleri (ROT)

2.2.3.1. Reaktif Oksijen Türlerinin Kimyası

Genel olarak çevresel stres faktörlerinin yüksek ototoksisitesi olan ROT üretimine neden olduğu bilinmektedir. Yoğun elektron akışı veya yüksek derecede okside metabolik aktiviteleri olan kloroplast, mitokondri ve peroksizomlar bitki hücrelerinde büyük bir ROT kaynağı olarak görülmektedir. Kloroplastlarda ışığa duyarlı komponentlerinin ve çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) çokluğu sebebiyle özellikle fotosentetik canlılar oksidatif hasar riski taşırlar.

O_2 mitokondride elektron taşıma zinciri (ETC) içinde, su molekülü oluşturmak için dört elektron tarafından indirgenir ve temel durumda iken reaktif olmamasına rağmen, $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2, $HO^{\bullet}$ ve $^1O_2$ gibi ROT'ları oluşturabilir (Scandolios 2005; Gill ve Tuteja 2010) (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. Enerji transferi sonucu ROT oluşumu (Gill ve Tuteja 2010)

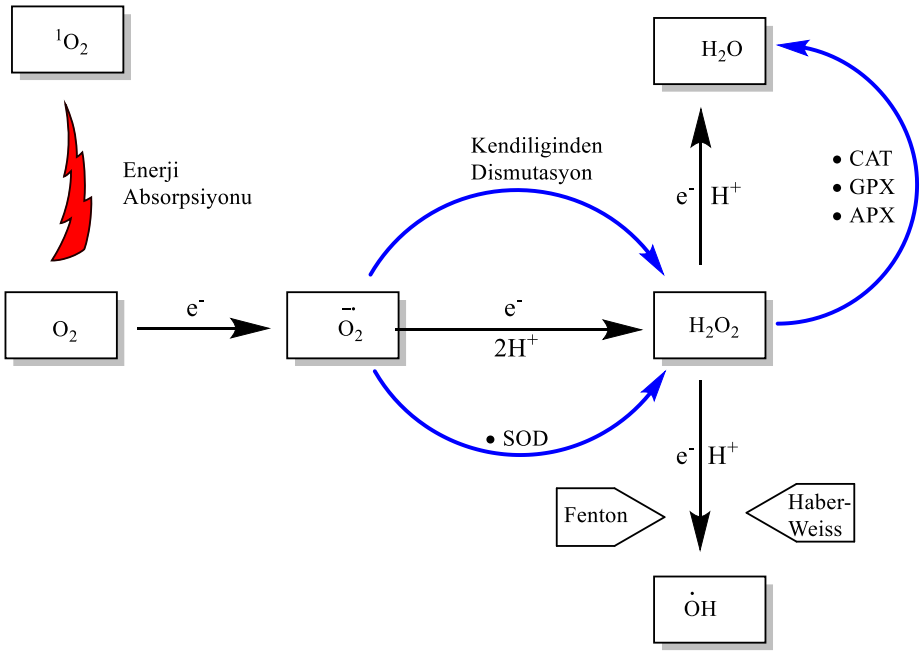
Ayrıca bakır ve demir gibi geçiş metalleri varlığında; en reaktif kimyasal tür olan Ḥ$O^{\bullet}$'nun salınımını yapan Fenton ve Haber-Weiss mekanizması (Şekil 2.2.) aracılığıyla daha fazla reaksiyon gerçekleşir. ROT'un başka bir formu olan $^1O_2$ (singlet oksijen) durumunda bir elektron daha yüksek enerjili bir orbitale geçer ve böylece oksijen kendi spin durumundan ayrılmış olur. $^1O_2$; klorofilin fotoeksitasyonu ve kendisinin O_2 ile reaksiyonu durumunda oluşabilir.

$Fe^{+2} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{+3} + HO^{\bullet} + OH^-$ (Fenton Reaksiyonu)

$O_2^{\bullet-} + H_2O_2 \longrightarrow HO^{\bullet} + O_2 + OH^-$ (Haber-Weiss Reaksiyonu)

Şekil 2.2. Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları

Bununla birlikte, yeterli enerji emildiği veya indirgenme kademeli bir şekilde olduğu zaman; ROT oluşumu başlatılmaktadır. ROT ya enzimatik olarak ya da ETC yoluyla Şekil 2.3.'te gösterildiği gibi sentezlenir.



Şekil 2.3. ROT oluşumu (Sharma ve ark. 2012)

Bitkilerde hücre içindeki miktarına bağlı olarak ROT'un zararları olduğu gibi yararları da mevcuttur. Normal büyüme koşullarında, ROT elemanları bitki hücreleri içinde düşük konsantrasyonlarda bulunur ve değişen çevresel koşullara göre programlanmış hücre ölümü, gravitropizma ve stomal kapanma gibi bitki yanıtlarını sağlayan sinyal iletim süreçlerinde ikincil haberciler olarak davranırlar. Bunun yanısıra, ROT'un süpürülmesi etkin bir antioksidan savunma mekanizması tarafından gerçekleştirilir. Ancak, stresli koşullar altında fotosentetik ROT oluşumu hızlandığından üretim ile eliminasyon arasındaki denge bozularak oksidatif strese yol açan ROT birikimi meydana gelir (Sharma ve ark. 2012). Oksidatif stres DNA, protein ve lipid gibi önemli makromoleküllerin yapılarında ciddi hasarlara yol açar (Mittler 2002; Desikan ve Hancock 2004; Miller ve ark. 2008).

2.2.3.2. ROT Çeşitleri

Süperoksit ($O_2^{\bullet-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali ($HO^{\bullet}$) temel ROT elemanlarındandır:

Süperoksit Radikali ($O_2^{\bullet-}$)

ROT üretimi aerobik solunumun kaçınılmaz bir sonucudur ve bitki dokularında O_2 tüketiminin yaklaşık %1-2'si $O_2^{\bullet-}$ oluşumuna yol açar (Puntarulo ve ark. 1988).

O_2'nin Mehler reaksiyonu vasıtasıyla tilakoid zara bağlı fotosistem I (PSI) içinde tek elektron ile indirgenmesi sonucu süperoksit radikali ($O_2^{\bullet-}$) oluşur. $O_2^{\bullet-}$'nin en çok üretildiği yer PSI'in tilakoid membranına bağlı primer elektron alıcısıdır. $O_2^{\bullet-}$ ilk üretildiğinde orta derecede zararlı bir ROT'tur. Süperoksit dismutaz (SOD) $O_2^{\bullet-}$'yi daha da indirger ve reaksiyon H_2O_2 oluşumu ile sonuçlanır. $O_2^{\bullet-}$, Fe^{+3}'e bir elektron vererek $^1O_2$'yi oluşturur (Gill ve ark. 2010).

Ayrıca, $O_2^{\bullet-}$ demire (Fe^{3+}) bir elektron vererek demirin indirgenmiş formunu (Fe^{2+}) oluşturur. Daha sonra Fe^{2+}; SOD vasıtasıyla $O_2^{\bullet-}$'nin $HO^{\bullet}$'ya dismutasyonunun bir sonucu olarak H_2O_2'yi indirgeyebilir. $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 ve demirin $HO^{\bullet}$'yu oluşturduğu reaksiyonlar Haber-Weiss olarak adlandırılırken H_2O_2 tarafından Fe^{2+}'nin oksidasyonunu içeren son adım Fenton reaksiyonu olarak ifade edilir. Yapılan bir çalışmada, Amaranth bitkisinin tuzluluk koşullarında düşük molekül ağırlıklı antioksidan olan amarathine ve SOD vasıtasıyla $O_2^{\bullet-}$'yi detoksifiye edebildiği tespit edilmiş söz konusu bitkinin yapraklarında amaranthine ve SOD aktivitesi arasındaki doğrusal ilişki tanımlanmıştır (Gambarova ve Gins 2008).

Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Bitki hücrelerinde H_2O_2'nin aşırı miktarda birikimi, oksidatif stresin oluşumuna yol açmaktadır. H_2O_2 ya kendiliğinden ya da SOD tarafından katalizlenen sinyal yolları aracılığıyla oluşur. Ayrıca, glioksilat döngüsü, β-oksidasyon ve fotorespirasyon gibi kendiliğinden olan reaksiyonlar peroksizomlarda H_2O_2 oluşumu ile sonlanır. Mitokondriyal ETS, kloroplast ve endoplazmik retikulumda oluşan H_2O_2, nötr bir molekül olduğu için hücre membranından kolaylıkla difüzyon ile geçebilmektedir.

H_2O_2 stres koşulları altındaki bitki hücrelerinde düşük konsantrasyonda bulunduğu durumlarda sinyal molekülü işlevini yürütmekte, yüksek konsantrasyonlarda ise programlanmış hücre ölümünü tetiklemektedir (Desikan ve Hancock2004; Bhattachrjee 2005; Quan ve ark. 2008).

Tanoua ve ark. (2009), H_2O_2 ve sodyum nitroprusside (SNP) ile ön muamele görmüş citrus bitkisinin, 150 mM NaCI içeren ortamda gelişen yapraklarında antioksidan savunma cevaplarını araştırmışlar, H_2O_2 ve SNP ile ilgili izoformların uyarılmasıyla birlikte NaCI stresinin olmadığı ortamdaki yapraklarda SOD, CAT, APX

ve GR aktivitelerinde artış meydana geldiğini bildirmişlerdir. Bununla birlikte hem kontrol hem de stres grubunda, NaCI'ye bağlı olarak oluşan protein oksidasyonu, H_2O_2 ve SNP'nin ön muamelelerinin etkisiyle tamamen tersine döndüğü aynı araştırıcılar tarafından belirtilmiştir.

Hidroksil Radikali ($HO^{\bullet}$)

Çiftlenmemiş tek bir elektrona sahip olduğu için en reaktif ROT olan $HO^{\bullet}$, tüm biyolojik makromoleküllerle etkileşmek için yüksek derecede afiniteye sahiptir. Bu etkileşimler lipid peroksidasyonu ve protein yapısında bozulmalara neden olmaktadır (Foyer ve ark.1997). Yüksek derecede reaktif olan $HO^{\bullet}$'nun eliminasyonu için herhangi bir enzimatik mekanizmanın olmadığı bildirilmiş ve bu nedenle, hücre ölümüne yol açabilen aşırı $HO^{\bullet}$ üretiminin, katalaz ve SOD tarafından süpürülmesi oldukça önemli bulunmuştur (Vranova ve ark. 2002; Pinto ve ark.2003).

2.2.3.3. ROT'un Biyolojik Makromoleküller Üzerine Etkisi

ROT'un üretimi ve süpürülmesi arasındaki denge; tuzluluk, kuraklık, yüksek ışık, metalik toksisite ve patojen saldırısı gibi çeşitli stres koşulları altında bozulabilir. Bitki hücrelerinde ROT'un yüksek seviyelerde olması lipid, protein ve en önemlisi DNA üzerinde ciddi boyutta hasara yol açabilmektedir.

Lipidler

Çeşitli stres koşulları altında lipidlerde yıkımın belirlenmesi, membran hasarının bir ölçüsü niteliğinde tek bir parametre olarak kullanılır. ROT düzeyleri eşik değere ulaştığı zaman hücrede ve membranlarda lipid peroksidasyonu (LPO) gerçekleşmekte ve bu durumda oluşan ürünler; ketonlar, MDA ve bunlarla ilişkili küçük hidrokarbon fragmentlerinden oluşan çoklu doymamış öncüllerdir (Garg ve Manchandra 2009). Bu bileşenlerden bazıları tiyobarbütirik asit reaktifi bileşenleri (TBARS) olarak adlandırılan tiyobarbütirik asit (TBA) ile reaksiyona girerler (Heath ve Packer 1968; Gill ve Tuteja 2010).

Membranda LPO başlaması, çoklu doymamış bir yağ asidi kalıntısının doymamış bir yağ asidi zincirinde bir hidrojen atomunun çıkarılması ile $HO^{\bullet}$ tarafından gerçekleşir. Aerobik ortamda, oksijen bir $ROO^{\bullet}$ oluşturmak için karbon merkezli lipid radikaline yağ asidi ekleyebilir. $ROO^{\bullet}$ komşu PUFA yan zincirlerinden bir hidrojen

atomu çıkararak peroksidasyon zincir reaksiyonunu daha da arttırabilir. Oluşan lipid hidroperoksit kolayca lipid alkoksi radikalleri, aldehitler (malondialdehit), alkanlar, lipid epoksitleri ve alkoller gibi birçok reaktif türe ayrışabilir (Davies 2001; Fam ve Morrow 2003; Gill ve Tuteja 2010).

$RH + HO^{\bullet} \rightarrow R^{\bullet} + H_2O$ (lipid alkil radikali)

$R^{\bullet} + O_2 \rightarrow ROO^{\bullet}$ (lipid peroksi radikali)

$ROO^{\bullet} + RH \rightarrow ROOH + R^{\bullet}$

$ROOH \rightarrow RO^{\bullet}$ (epoksitler, hidroperoksitler, glikol, aldehitler)

Membran akışkanlığını azaltan LPO iyon kanallarını, enzimleri ve reseptörleri inaktive ederek membran proteinleri üzerinde hasar yaratır (Moller ve ark. 2007).

Khan ve Panda (2008) Begunbitchi ve Lunishree çeltik çeşitlerinde tuz stresi yanıtlarını araştırdıkları çalışmalarında, Begunbitchi'nin LPO seviyesindeki artışın Lunishree'ye göre daha yüksek olduğunu bildirmişler. Bu durumu tuz stresine karşı Lunishree'de daha etkili koruma mekanizması ve daha yüksek serbest radikal süpürücü etkisi ile ilişkilendirmişlerdir. Kukreja ve ark. (2005) tuzluluk stresi altında *Cicer arietinumroots*'un lipid peroksidasyonu oksidasyonunda belirgin artış olduğunu bildirmişlerdir. Lutts ve ark. (1996a) çeltik bitkisi üzerine tuzluluğun etkisini araştırdıkları bir çalışmada, toleranslı çeşitte MDA değerlerinin düşük olduğunu, duyarlı olanda ise bu değerlerin çok yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Proteinler

Proteinler besin kaynağı olarak kullanılmasının yanı sıra organizmayı tanımlayıcı yapısal bilgileri sunan moleküllerdir. Hücrede pek çok işlev birbirinden farklı çok sayıda protein molekülü tarafından yürütülmektedir. Proteinler tür içi ve türler arası genetik çeşitliliğin analizinde, genetik kaynakların korunması ve ıslah çalışmalarında, genom ilişkilerinin belirlenmesinde ve mahsullerin geliştirilmesinde genetik belirteç (marker) olarak kullanılmaktadır (Özbolat 2010) .

Protein yapısını doğrudan kimyasal değişikliklere uğratan ROT'lar tarafından oluşturulan modifikasyonlar çoğunlukla geri dönüşümsüzdür. Yapılan çalışmalarda protein modifikasyonunun $HO^{\bullet}$ radikali tarafından tetiklendiği fakat tüm protein oksidasyonu sürecinin $O_2^{\bullet-}$ radikalinin varlığına ya da protonlanmış ($HO_2^{\bullet}$) halde

bulunmasına bağlı olduğu belirtilmiştir (Swallow 1960; Scheussler ve ark. 1984; Garrison 1987; Köse 2012).

Proteinlerin bir elektrik alana bırakıldığında, bir elektrota ya da diğerine doğru hareket etme prensibine dayanan "elektroforez", proteinlerin analizinde ve ayrılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (Özbolat 2010).

Protein analiz tekniklerinde var olan gelişmelere rağmen, protein boyutunun elektroforetik ayrımında genelde en iyi ayrışımın sağlandığı teknik poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE)'dir (Temizkan ve ark. 2004). Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ise, bitki gruplarının genetik yapısını tanımlamadaki kolaylığı ve geçerliliği nedeniyle oldukça geniş bir kullanım alanına sahiptir.

SDS (Sodyum dodesil sülfat) anyonik bir deterjan olup iki amino asitte bir peptit zincirine bağlanarak protein moleküllerini oluşturan alt birimleri birbirinden ayırır. Ayrıca (-) yük taşıdığından peptitlere de yüksek oranda (-) yük kazandırır. Böylece elektrik yükü açısından karışım içerisindeki bütün protein molekülleri eşit duruma getirilir. (Tutar ve ark. 2010). Sonuç olarak her protein eşit yük yoğunluğuna sahip olur, jel üzerinde de eşit güce maruz kalır ve böylece proteinler sadece moleküller ağırlıklarına göre ayrılmış olur (Aslan 2004; Özbolat 2010).

DNA

Bitki genomu çok kararlı olmasına rağmen, çeşitli stres faktörlerine maruz kaldığında DNA zarar görebilir (Tuteja ve ark. 2009). Endojen olarak reaktif metabolitler ($HO^{\bullet}$, $O_2^{\bullet-}$ ve NO^{-}) tarafından oluşturulan DNA hasarı "spontan DNA hasarı" olarak bilinir (Valko ve ark. 2006).

En reaktif ROT olarak bilinen $HO^{\bullet}$'nun pürin ile primidin bazlarına ve aynı zamanda deoksiriboz omurgasına zarar vererek DNA molekülünün tüm bileşenlerini etkilediği (Halliwell ve Gutteridge 1989); $^1O_2$'nin ise guanine saldırdığı rapor edilmiştir. Bu etkinin bir sonucu olarak, protein sentezinde azalma, hücre membranında yıkım, fotosentetik proteinlerde zarar gibi tüm organizmanın gelişimi ve büyümesini etkileyen çeşitli fizyolojik değişimler görülür (Britt 1999; Gill ve ark. 2010).

2.2.4. Antioksidan Savunma Sistemi

Çeşitli stres faktörünün etkisiyle canlı hücrelere ait protein, lipid, karbohidrat, DNA yapısında meydana gelebilecek hasar veya oksidasyonu önleyen veya geciktirebilen maddelere "antioksidanlar" denir (Çavdar ve ark. 1997).

Bitki hücreleri ve organelleri (kloroplast, mitokondri ve peroksizom) ROT'lara karşı kendilerini korumak için enzimatik veya enzimatik olmayan antioksidanlardan oluşan antioksidan savunma sistemi geliştirmişlerdir. Farklı çeşit ve seviyelerde meydana gelen strese karşı bitkilerde koruma amaçlı antioksidan mekanizmanın uyarılmasının önemli olduğu birçok çalışmada vurgulanmıştır (Tuteja 2007; Khan ve Singh 2008; Singh ve ark. 2008; Gill ve ark. 2011).

Antioksidan savunma sisteminin bileşenleri, enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlardır. Süperoksit dismutaz, katalaz, askorbat-glutatyon döngüsü enzimleri [glutatyon redüktaz, dehidro askorbat redüktaz (DHAR), monodehidro askorbat redüktaz (DHAR), askorbat peroksidaz] enzimatik antioksidanlar olarak bilinir. Askorbat, glutatyon, karotenoidler, tokoferoller ve fenolik bileşikler ise enzimatik olmayan antioksidanlar başlığı altında değerlendirilmiştir (Mittler ve ark. 2004; Singh ve ark. 2008; Gill ve ark. 2011).

2.2.4.1. Enzimatik Antioksidan Savunma Mekanizması

Süperoksit Dismutaz (SOD)

SOD'lar, süperoksitin oksijen ve H_2O_2'ye dismutasyonunu katalizler ve hücre içinde ROT'a karşı savunmanın ilk basamağını oluşturur (Alscher ve ark. 2002). Metalloenzim olan SOD, tüm aerobik organizmalar ve ROT'a yatkın tüm hücre içi bölümlerde oksidatif stresi düzenleyen, en etkili hücre içi enzimatik antioksidandır. SOD, $O_2^{\bullet -}$'leri uzaklaştırarak, birini H_2O_2'ye indirger diğerini ise O_2'ye okside eder. Böylece Haber-Weiss reaksiyonunu katalizleyen geçiş metalleri aracılığıyla $HO^{\bullet}$ oluşum riskini azaltır (Çizelge 2.2.).

Çizelge 2.2. ROT süpürücü antioksidan enzimler (Gill ve Tuteja 2010)

Enzimatik antioksidanlar	Enzim kodu	Katalizledikleri Reaksiyonlar
Süperoksit Dismutaz (SOD)	EC 1.15.1.1	$O_2^{\bullet-} + O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow 2H_2O + O_2$
Katalaz (CAT)	EC 1.11.1.6	$H_2O_2 \rightarrow H_2O + ½O_2$
Askorbat peroksidaz(APX)	EC 1.11.1.11	$H_2O_2 + AA \rightarrow 2H_2O + DHA$
Mono dehidro askorbat redüktaz (MDHAR)	EC 1.6.5.4	MDHA+NAD(P)H→AA+ $NAD(P)^+$
Dehidroaskorbat redüktaz (DHAR)	EC 1.8.5.1	DHA + 2GSH→AA + GSSG
Glutatyon redüktaz (GR)	EC 1.6.4.2	GSSG+NAD(P)H→2GSH+ $NAD(P)^+$

Tuz stresi altında SOD aktivitesindeki önemli artış *Morus sp.* (Harinasut ve ark. 2003), *Cicer arietinum* (Kukreja ve ark. 2005) ve *Lycopersicon esculentum* (Gapinska ve ark. 2007) gibi çeşitli bitkilerde gözlenmiştir. Pan ve ark. (2006) *Glycyrrhiza uralensis* Fisch'de tuz ve kuraklık streslerinin etkisini çalıştıkları araştırmada, SOD aktivitesinde önemli bir artışı bildirmişlerdir (Srivastava ve ark. 2005).

Glutatyon Redüktaz (GR)

Hem prokaryot hem de ökaryotlarda bulunan bir flavo protein oksidoredüktaz olan GR, (Romero-Puertas ve ark. 2006) ağırlıklı olarak kloroplastta ve küçük bir miktarı da mitokondri ile sitosolde bulunmuştur (Edwards ve ark. 1990; Creissen ve ark. 1994). ASH-GSH döngüsünün bir enzimi olan GR, GSH'nin indirgenmiş durumunu devam ettirerek ROT'a karşı savunma sisteminde önemli bir rol oynar. GR elektron vericisi olarak NADPH'yı kullanarak GSH'yı GSSG'ye indirger. GSH çoğu metabolik düzenlenme ve antioksidatif süreçlerde yer alan bir moleküldür (Chalapathi-Rao ve Reddy 2008).

Kukreja ve ark. (2005) tuz stresi sonrası *Cicer arietinum* köklerinde GR aktivitesinin arttığını bildirmişlerdir. Benzer şekilde Srivastava ve ark. (2005) *Anabaena doliolum*'da tuz stresi koşullarında GR aktivitesinde artış kaydetmişlerdir.

Askorbat Peroksidaz (APX)

ROT savunmasında önemli rolü olan peroksidazların (POD'lar) tuz stresi altındaki bitkilerde seviyelerinin arttığı bilinmektedir (Sugimoto ve Takeda 2009; Du ve ark. 2011). APX, H_2O_2'nin H_2O'ya indirgenmesini sağlayan reaksiyonları AsA yardımıyla katalizler.

APX'in ROT süpürülmesinde en önemli rolü oynadığı ve yüksek bitkilerde, alglerde, öglena ve diğer organizmalarda hücreleri koruduğu düşünülmektedir. APX, su-su ve ASH-GSH döngülerinde H_2O_2'nin süpürülmesinde yer alır ve ASH'yı elektron vericisi olarak kullanır (Çizelge 2.2.). APX izoenzimleri sitosol, mitokondri, peroksizom ve kloroplastta bulunmuştur. Srivastava ve ark. (2005) tuz stresine maruz bırakılmış *A. doliolum*'da tuzluluğun artışı ile birlikte APX aktivitesinde de artış olduğunu bildirmişler ve tuz stresi koşullarında, H_2O_2'nin süpürülmesinde antioksidan enzimlerden sadece APX'in rol aldığı sonucunu ileri sürmüşlerdir.

Katalaz (CAT)

H_2O_2'yi direkt olarak H_2O ve O_2'ye dismute edebilen (Çizelge 2.2.) CAT, tetramerik hem yapısında olup (Garg ve Manchanda 2009), fotorespirasyon ve yağ asitlerinin β-oksidasyonunda yer alan oksidazlar tarafından peroksizomlarda üretilen H_2O_2'nin atımında önemli rol oynamaktadır (Del Rio ve ark. 2006; Corpas ve Palma 2008).

Eyidoğan ve Öz (2007) tarafından yapılan çalışmada tuz stresi koşullarında *C. arietinum* yapraklarında CAT aktivitesinde önemli bir artış olduğu bildirilmiştir. Tuz stresi koşullarında *Oryza sativa*'da CAT seviyelerinin arttığı (Kim ve ark. 2005; Live ark. 2010) fakat *Citrus aurantium*, *Hordeum vulgare* ve *Cucumis sativus*'da azaldığı bildirilmiştir (Tanou ve ark. 2009; Witzel ve ark. 2009; Du ve ark. 2011).

2.3. Literatür Özetleri

Zeng ve Shannon (2000) çeltikte ürün verimi ve fide gelişimi üzerine tuzluluğun etkisini inceledikleri araştırmada, 1.9 dS m^{-1}'ye kadar düşen tuzluluk değerlerinde fide gelişiminin olumsuz etkilendiğini fakat bu etkinin tane veriminde düşüşe yol açmadığını bildirmişlerdir.

Yapılan diğer bir çalışmaya göre, tuzluluk stresi altındaki çeltik çeşitlerinde polen canlılığında azalma gözlendiği ve bu azalmanın tuza duyarlı olan Basmati çeşidinde daha önemli olduğu rapor edilmiştir. Aynı zamanda nişasta sentez aktivitesi (α,1-4 glukan glukosil transferaz) tuza duyarlı olanlarda dirençli olanlara göre önemli düşüş göstermiştir (Khan ve Abdullah 2003).

Tuz stresinin yaprak, doku ve köklerde kuru ve taze ağırlıkta azalmalara yol açtığı birçok araştırıcı tarafından bildirilmiştir (Chartzoulakis ve Klapaki 2000).

Vaidyanathan ve ark. (2003) duyarlı Pusa Basmati 1 ve toleranslı Pokkali pirinç çeşitlerini 42 saat süre ile tuzun farklı konsantrasyonlarına (0, 100, 150, 200, 250, 300 mM NaCI) maruz bırakarak büyüme ve reaktif oksijen türlerinin süpürülmesine ilişkin yanıtlarını araştırmışlardır. Araştırıcıların aldıkları sonuçlar, stresin düşük seviyelerinden orta seviyelerine doğru Pokkali'nin Pusa Basmati 1'e göre tuza kısmen daha tolerant olmasına dair genel bir fikir vermiştir.

Demiral ve Türkan (2005) toleranslı Pokkali ve duyarlı IR-28 çeltik çeşitlerinin kökleri üzerine tuzluluğun etkisini araştırdıkları çalışmalarında, tuzluluğun genel olarak kayda değer bir etkisinin olmadığını ancak duyarlı olan IR-28'in kök uzunluğunda azalmayı vurgulamışlardır.

Tatar ve ark. (2010) 60 mM NaCI etkisi ile kuru madde üretiminin tüm çeşitlerde (Kıral ve Yavuz; dayanıklı IR4630-22-2 ve hassas IR31785-58-1-2-3-3) düştüğünü ve bu durumun IR31785 ve Kıral çeşitlerinde daha belirgin olduğunu belirterek bu çeşitlerin tuzluluk stresi altında farklı adaptasyon mekanizmaları geliştirdikleri sonucunu ileri sürmüşlerdir.

Singh ve Dubey (1995), tuzluluğa toleransları birbirinden farklı çeltik çeşitlerinin (toleranslı CSR1 ile CSR3; hassas Ranta ile Jaya) klorofil içeriği üzerine tuz stres etkisini incelemişlerdir. Çeşitlerde tuzluluğa bağlı olarak klorofil a ve b içeriklerinin düştüğünü ve bu düşüşün hassas olanlarda daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırıcılar klorofil a içeriğinin klorofil b içeriğine göre tuzluluktan daha çok etkilendiğini belirtmişlerdir.

Lutts ve ark. (1996a) 0, 30, 50 mM NaCl konsantrasyonlarının yarattığı stres ortamında yetiştirilen çeltik bitkilerinin genç ve yaşlı yapraklarında protein, klorofil içeriğini incelemişler. Sonuçta kontrol bitkilerine oranla yaprak sayısında bir farklılık meydana gelmemekle birlikte, stres koşullarında yetiştirilen bitkilerin daha küçük yaprak alanına sahip olduklarını ve klorofil miktarının tüm çeşitlerde azaldığını bildirmişlerdir.

Alamgir ve Ali (1999), tuz stresinin çeltiğin farklı çeşitlerinde fotosentetik pigment miktarı üzerine etkisi ile ilgili yaptıkları çalışmada, genel olarak pigment

miktarının tuzluluk ile birlikte düştüğünü, ancak kullanılan altı çeşitte pigment içeriğinin yükseldiğini saptamışlardır.

Tiwari ve ark. (1997) 4 pirinç (*Oryza sativa* L.) çeşidi üzerine yaptıkları çalışmada, yüksek NaCI konsantrasyonu uygulamasında PSI, PSII ve klorofil floresans aktivitelerinde kademeli düşüş ve net fotosentez oranında etkili bir artış gözlemlemişlerdir.

Mitsuya ve ark. (2003), tuzluluğun Nipponbare çeltik çeşidinde, klorofil-a içeriği üzerine etkisi ile ilgili yaptıkları çalışmada, klorofil-a içeriğinin artan tuzluluk ile beraber düştüğünü ve bu düşüşün yaşlı yapraklarda genç yapraklara göre daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir.

Lee ve ark. (2013) duyarlı ve toleranslı iki pirinç çeşidinde 100 mM NaCI stresinin fotosentetik pigment içeriği üzerine etkilerini araştırmışlardır. Duyarlı IR-29'da toplam klorofil içeriği düşüş gösterirken, toplam karotenoid içeriği artmıştır. Tolerant Pokkali ise toplam karotenoid ve klorofil içeriği bakımından tuz stresinden etkilenmemiştir. Araştırıcılar IR-29'da klorofil içeriğindeki düşüşü, tuz stresine bağlı olarak fotosentetik mekanizmada oluşan zarar ile ilişkilendirmişlerdir.

Tuzun çeltikte oksidatif hasara yol açıp açmadığını belirlemek için, Vaidyanathan ve ark. (2003), NaCI'nin farklı konsantrasyonlarına (0, 100, 150, 200, 250, 300 mM) maruz bırakılan tuza duyarlı Pusa Basmati 1 (PB-1) ve toleranslı Pokkali (PK) çeltik fidelerinde tiyobarbütirik asit reaktif bileşenlerini ölçerek lipid peroksidasyonundaki değişiklikleri izlemişlerdir. Çeşitlerde tuz konsantrasyonlarının artmasına paralel olarak lipid peroksidasyonunda artış olmuş ve bu artış tüm NaCI konsantrasyonlarında tuza duyarlı PB-1'de daha yüksek bulunmuştur.

Lutts ve ark. (1996b), tolerans seviyeleri birbirinden farklı 4 çeltik çeşidinde (dayanıklı- Nona Bokra, IR-4630; hassas- I Kong Pao, IR-31785) tuzluluğun bitki gelişimi, mineral beslenme ve prolin birikimine etkisini araştırmışlar ve prolinin osmotik düzenlemede rol oynamadığını ileri sürmüşlerdir. Lutts ve ark. (1999) osmotik düzenlemeye, iyon ve prolin birikimine tuz stresinin etkisini iki çeltik çeşidi (I Kong Pao: tuza hassas, Nona Bokra: tuza dayanıklı) üzerinde incelemişlerdir. 3 ve 10 günlük dönemlerde çeltik fidelerine uygulanan, 50 ve 100 mM NaCI'nin, tuza hassas çeşitte daha yüksek oranda Na^+ ve prolin biriktirdiğini tespit etmişlerdir. Araştırıcılar, prolinin

tolerans mekanizmasında rol almadığını ancak tuzluluk stresinin bir göstergesi olabileceğini belirtmişlerdir.

Chuan ve Ching (1999), 50 mM ile 150 mM NaCI stresine maruz bırakılmış çeltik köklerindeki hücre duvarı peroksidaz aktivitesi ve H_2O_2 seviyesindeki değişiklikler ile dışarıdan uygulanan prolinin yol açtığı değişiklikleri incelemişlerdir. Dışarıdan uygulanan prolin, her iki NaCI uygulamasında da kök gelişimini yavaşlatmış, peroksidaz aktivitesi ve H_2O_2 seviyesini ise arttırmıştır.

Bhattacharjee ve Mukherjee (2002), dayanıklı (Hamilton, SR26B) ve hassas (Ratna) çeltik çeşitleri ile yapmış oldukları çalışmada, 100 mM NaCI uygulamasına bağlı olarak bitkilerde antioksidan aktivite ve prolin birikimi açısından yanıtları araştırmışlar, tüm çeşitlerde prolin birikiminin arttığını, tuza toleransı yüksek olan çeşitlerde ise daha yüksek seviyelere ulaştığını belirtmişlerdir.

Demiral ve Türkan (2005) NaCI stresi altındaki farklı iki çeltik çeşidinin köklerinde; MDA açısından lipid peroksidasyon düzeyi oranını ve serbest prolin içeriğini incelemişlerdir. Tuza duyarlı (IR-28) çeşidin köklerinde MDA düzeyi artarken, tolerant çeşitte (Pokkali) değişiklik olmadığını, IR-28'in Pokkali'den daha fazla prolin üretttiğini ve konsantrasyon artışının IR-28'in kök kuru ağırlığında ve Pokkali'nin kök taze ağırlığında düşüşe yol açtığını bildirmişlerdir.

Tuz stresine maruz bırakılmış *Oryza sativa* L. cv. Dongjin bitkilerinde antioksidan enzim aktiviteleri üzerine yapılan bir çalışmada (Lee ve ark. 2001), artan SOD aktivitesinin H_2O_2'nin aşırı üretimine yol açtığını bildirmişlerdir.

Tuza duyarlı Pusa Basmati 1 (PB-1) ve tuza toleranslı Pokkali (PK) olmak üzere iki pirinç çeşidinde tuzlulukla tetiklenen oksidatif strese karşı enzimatik ve enzimatik olmayan cevapları inceleyen Vaidyanathan ve ark. (2003), tuz stresi altında toleranslı PK çeşidinin duyarlı PB-1'den daha yüksek CAT, askorbat ve glutatyon aktivitesi gösterdiğini bildirmiştir.

Demiral ve Türkan (2005) tarafından yapılan çalışmada tuza toleransları farklı iki pirinç türünün kökleri 0,60 ve 120 mol m^{-3} NaCI stresine 7 gün boyunca maruz bırakılmış ve SOD, CAT, POX, APX ve GR enzim aktivitelerindeki değişiklikler incelenmiştir. Tuzluluktaki artışla birlikte her iki türün köklerinde GR aktivitesinde düşüş olduğu bildirilmiştir. Toleranslı Pokkali çeşidinde tuz stresinin artmasıyla CAT

aktivitesinde artış POX'ta ise düşüş kaydedilirken IR-28 çeşidinin köklerinde CAT aktivitesinde düşüş POX'ta artış olmuştur. Her iki çeşidin köklerinde SOD aktivitesinde değişiklik olmamıştır.

Turan ve Tripathy (2013) tarafından yapılan bir çalışmada, tuza duyarlı PB-1 pirinç genotipi ile kısmen toleranslı CSR10 pirinç çeşidinin 200 mM NaCI stresine cevap olarak; askorbat, dehidroaskorbat, lipid peroksidasyonu, tokoferol birikimi ve bazı önemli antioksidatif enzimlerin gen ekspresyonu ve jel üzerinde enzimatik aktiviteleri tanımlanmıştır. Tokoferol ve askorbat içeriği tuz stresi uygulanmış pirinç fidelerinde düşmüştür. Antioksidatif enzimlerden SOD, CAT, APX, GR ve bunların gen ekspresyonlarında her iki pirinç çeşidinde de tuz stresine cevap olarak artış gözlenmiştir.

Çeşitli abiyotik stres faktörleri bitkilerde**;** yüksek derecede reaktif ve toksik olan oksijen türlerinin aşırı üretimine yol açar. Kloroplastlarda Fotosistem I ve II (PSI ve PSII), mitokondride Kompleks I ile ETS'nin Kompleks III ve ubiquinon bölgeleri $^1O_2$ ve $O_2^{\bullet-}$'nin üretildiği önemli yerlerdir. ROT çok sayıda genin ekspresyonunda etkilidir ve böylece büyüme, hücre döngüsü, programlı hücre ölümü (PCD), abiyotik stres yanıtları, patojen savunma ve gelişim gibi çoğu süreçleri kontrol eder (Gill ve Tuteja 2010).

Chunthaburee ve ark. (2016), fide dönemi aşamasında dördü beyaz sekizi siyah 12 çeltik çeşidinde tuzluluğa (100 mM NaCl) karşı oluşturulan tolerans düzeyleri ve fizyolojik değişiklikleri araştırmışlardır. Tuzluluğun tüm çeşitlerde klorofil miktarını düşürdüğünü prolin, hidrojen peroksit, peroksidaz ve antosiyaninlerin aktivitesini ise arttırdığını bildirmişlerdir. Tuza duyarlı çeşitlerle karşılaştırıldığında dayanıklı çeşitlerin yüksek katalaz aktivitesi, antosiyanin, hidrojen peroksit ve prolin miktarındaki küçük bir artıştan dolayı daha yüksek tolerans gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Çeltik bitkilerinde özellikle yaprak dokusundaki yapısal proteinlerin, SDS-PAGE tekniği ile görüntülenmesi üzerine çalışmalar sınırlı sayıda olup, farklı bitkilerde ve çeltiktedaha çok tohum depo proteinleri ilgili yapılmış çalışmalar mevcuttur.

Mangrov *Bruguiera parviflora* bitkisini NaCI'nin farklı konsantrasyonlarına maruz bırakan araştırıcılar (Parida ve ark. 2008) tuz stresi uygulamasına bağlı olarak çoğu proteinlerin band yoğunluğunda azalma olduğunu bildirmişler.

Köse (2012) tarafından tuz stresine maruz bırakılmış farklı mercimek çeşitleri (Seyran, Malazgirt, Çağıl, Çiftçi, Kafkas ve Özbek, Meyveci) üzerine yapılan çalışmada dirençli ve hassas çeşitlerde protein bandlarında oluşan yoğunluk farkı SDS-PAGE analizi ile gözlenmiştir. Kontrol grupları ile karşılaştırma sonucunda tuz uygulanan gruplarla bir farklılık gözlenmediği bildirilmiştir. Seyran çeşidinin kontrol grubunda 46 ve 63-93 kDa arasında belirgin pikler gözlenmiş fakat bunlar Malazgirt ve Seyran çeşitlerinin tuz uygulanmış gruplarında yok olmuştur. Araştırıcı bu proteinin iyon toksisitesi, dehidrasyon veya aşırı tuzluluğun sebep olduğu oksidatif strese yanıt için önemli olmadığını belirtmiştir.

2.4. Çalışmanın Amacı

Ülkemizdeki toprakların büyük bir kısmının gerek doğal yollardan gerekse yanlış tarım uygulamalarından dolayı tuzluluk sorunuyla karşı karşıya kaldığı bilinen bir gerçektir. Tuz stresi diğer bitkilerde olduğu gibi çeltik üretimini de ciddi boyutlarda sınırladığından, tuzluluğa dirençli çeltik çeşitlerinde tolerans mekanizmaları ve tuzluluğa karşı geliştirdikleri yanıtlar üzerine yapılacak çalışmalar büyük önem arz etmektedir. Ayrıca, ülkemizde tarımı yapılarak ekonomiye katkı sağlayan çeltik çeşitlerinin tuz (NaCI) stresi altında vermiş oldukları antioksidan savunma yanıtlarının aydınlatılması ve bu konuda elde edilen bilimsel veriler literatüre katkı sağlayacağından oldukça önemlidir.

Bitkiler tuz stresi altında oluşan ROT'un toksik etkisine karşı antioksidan savunma sistemlerini kullanarak ROT oluşumunu sınırlandırır veya uzaklaştırırlar. Bu nedenle araştırmadan elde edilen sonuçlar, çeltik çeşitlerinde antioksidan savunma sistemlerinin arttırılması veya işlevlerinin geliştirilmesi konularında çalışacak araştırmacılara ışık tutacaktır.

Bu amaçla çalışmada Gala, Edirne, Şumnu, Neğiş, Tunca ve Aromatik-1 çeltik çeşitleri ile Diyarbakır civarında yetiştirilen (yerel) Karacadağ çeşidinin 2 popülasyonu (Karacadağ ve Hazro) NaCI stresine maruz bırakılmıştır. Uygulama sonrasında, yapılan bazı morfolojik parametreler ile fotosentetik pigment içeriği, yaprak bağıl su içeriği ve lipid peroksidasyonu analizlerinden elde edilen sonuçlar ışığında, çeşitler hassas ve tolerant düzeyleri bakımından değerlendirilerek, tuz stresine karşı verdikleri yanıtlara göre 2'si tolerant 2'si hassas olmak üzere 4 çeşit seçilmiştir.

Seçilen **tolerant/hassas çeşitlerde** aşağıdaki deneyler yapılmıştır:

I. Tuz (NaCI) stresi bitkide savunma sistemini teşvik ettiğinden antioksidan savunma sistemindeki değişimleri belirlemek amacıyla; enzim yapısındaki antioksidanlar (süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon redüktaz, askorbat peroksidaz), ROT (hidrojen peroksit, süperoksit, hidroksil) söndürme aktivitesi ve hidrojen peroksit içeriği araştırılmıştır.

II. Prolin, plazma zar bütünlüğünün korunmasında ve serbest radikallerin uzaklaştırılmasında işlevsel olduğundan, tuz stresinin prolin birikimi üzerindeki etkisini belirlemek amacıylaçeşitlerde **Prolin birikimindeki değişimler** incelenmiştir.

III. Tuz stres faktörünün proteinler üzerindeki etkisini incelemek amacıyla, **SDS-PAGE** tekniği kullanılarak, proteinler molekül ağırlıklarına göre ayrıştırılmıştır.

IV. Ayrıca, tuz stresinin **Toplam çözünebilir protein miktarı üzerindeki etkisi** spektrofotometrik olarak da karşılaştırılmıştır.

Çalışma kapsamında seçilen çeşitler üzerine literatürde herhangi bir çalışmaya rastlanmadığından elde edilen veriler, bu konuda çalışacak araştırıcılara yeni, güncel ve temel bilgiler sunacaktır. Ayrıca, tuza toleranslı çeltik çeşitlerinin geliştirilmesiyle ilgili ıslah çalışmaları için önemli bilgi sağlayacaktır.

Bunun yanı sıra çalışmadan alınan veriler doğrultusunda, tuzluluk sorunuyla karşı karşıya kalmış yerlerde tuza toleranslı çeşitlerin ekiminin yapılması, ülke ekonomisindeki kayıpları önlemesi bakımından önemli katkı sağlayacaktır.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Bitkisel Materyal

Araştırmada, **Aromatik-1, Edirne, Gala, Şumnu, Neğiş, Tunca** ıslah çeltik çeşitleri ile Diyarbakır-Karacadağ civarında yetişen 2 Karacadağ çeltik popülasyonu (**Karacadağ** ve **Hazro**) olmak üzere toplam 8 farklı çeltik tohumu bitkisel materyal olarak kullanıldı (Şekil 3.1.). Islah çeltik çeşitlerine ait tohumlar Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsünden temin edildi.



Şekil 3.1. Bitkisel materyal olarak kullanılan çeltik tohumları

3.1.1. Çeşitlerin Genel Özellikleri

Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsünün web sitesinden alınan çeltik çeşitlerine ait genel özellikler aşağıda verildiği gibidir (Çizelge 3.1.).

Çizelge 3.1. Çeltik çeşitlerinin genel özellikleri (2015)*

Çeşit Adı	Orijini	Tescil Yılı	Verim (kg	Olgunlaşma Süresi	Bitki Boyu (cm)	Çeltik Dane Özelliği	Pirinç Yapısı	Yaprak Durumu	Salkım Durumu
Gala	Osmancık-97 Seleksiyon-2	2009	800-1000	130-135	95	Sarı-Uzun	Camsı	Dik	Y.Dik
Edirne	Baldo X Calendal	2004	650-700	125-130	100-105	Sarı-uzun	Camsı	Horizontal	Y.Yatık
Şumnu	Rialto X Koral	2006	700-750	125-130	102	Sarı-uzun	Camsı	Horizontal	Y.Yatık
Neğiş	VialoneNano X Sequial	2002	800-900	130-135	85-90	Sarı-orta	Camsı	Dik	Y.Dik
Tunca	Rocca/ Thainato	2009	800-1000	135	90	Sarı-Uzun	Camsı	Horizontal	Yatık
Aromatik-1	Introdüksiyon (YRF-204)	2007	600-700	135-140	75-80	Sarı-ince uzun	Camsı	Dik	Y.Yatık
Karacadağ	Türkiye	x	500-600	135	104	Sarı-uzun	B.Göbekli	Horizontal	Y.Yatık

*Veriler Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü web sayfasından alındı

3.2. Metot

3.2.1. Çözeltilerin Hazırlanması

Hoagland Besin Çözeltisi

¼ Hoagland (Hoagland ve Arnon 1938) besin çözeltisi için; litre başına toz haldeki "Hoagland's No. 2 Basal Salt Mixture"den 0.4 gram (g) tartılarak toplam hacim 1 lt olacak şekilde distile suda eritildi.

NaCI Çözeltileri

100 mM tuz çözeltisi için; 23.4 g toz NaCI,

200 mM tuz çözeltisi için; 46.8 g toz NaCI,

300 mM tuz çözeltisi için; 70.2 g toz NaCI

ayrı ayrı tartılarak, 4 lt ¼ Hoagland besin çözeltisine ilave edilerek eritildi.

Standart Çözeltiler

2.6-di-t-bütil-1-hidroksitoluen (BHT)**:** 10 mg BHT 10 ml etanol içinde çözülerek, 1000 ppm'lik BHT çözeltisi hazırlandı.

2-t-bütil-4-hidroksianisol (BHA): 10 mg BHA 10 ml etanolde çözülerek, 1000 ppm'lik BHA çözeltisi hazırlandı.

Askorbik Asit (AA): 10 mg L-askorbik asit 10 ml distile suda çözülerek, 1000 ppm'likAA çözeltisi hazırlandı.

3.2.2. Bitkisel Materyallerin Yetiştirilmesi

Araştırmamızda, yüzey sterilizasyonundan önce benzer büyüklük ve dolgun görünümde olan tohumlar seçilerek başlangıç materyali olarak kullanıldı. Her çeşit için ayrı ayrı gruplandırılan tohumlar, %5'lik sodyum hipokloritte (NaOCI) 3 dk bekletildikten sonra steril saf su ile çalkalanarak NaOCI'den arındırıldı. Yüzey sterilizasyonu sağlanan tohumlar, imbibisyon işlemi için yaklaşık 24 saat süre ile distile suiçerisinde bekletildi. Bu işlemden sonra tohumlar, toprak:torf:perlit (3:3:1) içeren saksılara ekilerek, kontrollü koşulların sağlandığı bitki büyüme odasında gelişmeye

bırakıldı. Saksılara ekimi yapılan tohumlar, 4 hafta süre (28 gün) ile tarla su kapasitesi baz alınarak (%65) ¼ Hoagland besin çözeltisi ile sulandı.

3.2.3. Deneme Deseni ve NaCI Stres Faktörü Uygulamaları

4 haftalık gelişim periyodundan sonra, bitkiler hazırlanan NaCI konsantrasyonları ile tuz stres faktörüne maruz bırakıldı. Bunun için, bir kontrol grubu ile birlikte tüm saksılar 10 gün boyunca 0, 100, 200 ve 300 mM NaCI ile hazırlanan ¼ Hoagland besin çözeltisi ile sulandı. Kontrol gruplarındaki bitkiler, NaCI içermeyen ¼ Hoagland besin çözeltisi ile aynı zaman ve ölçüde sulandı. 10. günü takiben bitkiler hasat edilerek toprak altı ve toprak üstü kısımları birbirinden ayrıldı ve sıvı azot ile havanda ezilerek öğütüldü. Film kutuları içerisine yerleştirilen örnekler etiketlenerek, analiz zamanına kadar -80°C'de muhafaza edildi.

Uygulamalardan sonra yapılan analizlerden elde edilen veriler, her çeşidin kendi kontrol grubu ile karşılaştırıldı. Uygulama süresi sonunda, tuzluluğun etkisini değerlendirebilmek amacıyla ilk aşamada bitkilerin kök/sürgün uzunlukları, taze ve kuru ağırlıkları ölçüldü.

100, 200 ve 300 mM NaCI uygulamaları ile oluşturulan stres faktörüne karşı çeşitlerinverdiği yanıtların araştırıldığı tez çalışması iki aşamada yürütüldü.

Birinci aşamada; çeşitlere ait sürgün-kök boyu, taze-kuru ağırlık, yaprak zararlanma durumu, bağıl su içeriği, fotosentetik pigment içerikleri ve lipid peroksidasyonu analizlerinden alınan veriler değerlendirilerek tolerant ve hassas çeşitler seçildi.

İkinci aşamada ise belirlenen çeşitlerin hassas veya tolerant durumları ile alakalı önceki verileri pekiştirmek ve çeşitlerle ilgili kesin sonuca ulaşabilmek için bazı antioksidan enzimler (SOD, CAT, APX, GR), ROT söndürme aktivitesi (H_2O_2, $O_2^{\bullet-}$, $HO^{\bullet}$), prolin içeriği, H_2O_2 içeriği ve toplam çözünebilir protein miktarındaki değişimler incelendi. Ayrıca, NaCI uygulamasının tuz stresi altındaki çeltik fidelerinin protein değişimleri üzerine olan etkisi SDS-PAGE tekniği kullanılarak araştırıldı.

3.2.4. Bazı Büyüme Parametrelerinin Ölçülmesi

Sürgün Boyu-Kök Uzunluğu

Çimlenme periyodundan itibaren stres uygulamalarının son gününe kadar çeşitlerin göstermiş oldukları morfolojik farklılıklar gözlemlenerek karşılaştırıldı. Uygulamaların sonunda, her bir grup için rastgele seçilen 10 bitkinin kök uzunlukları (cm) ve sürgün boyları (cm) ölçüldü.

Yaprak Taze-Kuru Ağırlığı

Uygulama gruplarından rastgele seçilen 6 adet bitkiden yeşil aksam ayrılarak taze ağırlıkları hassas terazi ile g cinsinden tartıldı ve daha sonra 50˚C olacak şekilde ayarlanmış bir etüvde yaklaşık 2 gün süre (ağırlık değişimi olmayıncaya kadar) ile bekletilen materyallerin son ağırlıkları alınarak kuru ağırlıkları hesaplandı.

Yapraklardaki Zararlanma Durumunun Belirlenmesi

Araştırmamızda, tuz stres faktörüne maruz bırakılan çeşitlerde morfolojik hasarın derecesini belirlemek amacıyla bir görsel skala oluşturuldu. Tuz uygulamalarının 10. gününü takiben her uygulama grubundan tesadüfen seçilen 10 adet bitki, morfolojik hasar derecesi gözönünde bulundurularak aşağıda verilen semptomlara göre 0'dan 5'e kadar olan puan ile değerlendirildi.

0: NaCI stres faktöründen kaynaklı gözle ayırt edilebilen bir hasarın bulunmaması,

1: Yaprak uçlarında sararma,

2: Bitkilerde az oranda (%25) yer yer sararma,

3: Yaklaşık olarak bitkilerin yarısında sararma,

4: Yaklaşık olarak bitkilerin yarısından daha fazlasında sararma ve kuruma,

5: Bitkilerin çoğunda yüksek oranda (%75-%100) sararma.

3.2.5. Yaprak Bağıl Su İçeriklerinin Belirlenmesi (%)

Uygulamaların 10. gününü takiben her bir gruptan rastgele seçilen 5 ayrı materyalin taze ağırlıkları (g) ölçüldü ve 6 saat süre ile dI-H_2O (de-iyonize su) içinde bekletilerek turgor ağırlıkları alındı. Materyaller 50°C'de etüvde ağırlık değişimi

olmayıncaya kadar bekletildikten sonra gruplar halinde tartıldı. Her bir gruba ait örneklerin yaprak bağıl su içeriği aşağıdaki formüle göre % olarak hesaplandı;

Yaprak Bağıl Su İçeriği (%)= [(TA – KA) / (T.A. – KA)]x100

TA=Taze ağırlık, KA=Kuru ağırlık, T.A.=Turgorlu ağırlık

3.2.6. Fotosentetik Pigment İçeriklerinin Belirlenmesi

Klorofil a, klorofil b, toplam karotenoid ve toplam klorofil içeriğindeki değişimleri belirlemek için rastgele alınan 0.25 g taze yaprak örnekleri 2 ml %80'lik aseton ile homojenize edildi (Arnon 1949). Homojenant filtre kağıdından süzdürüldükten sonra %80'lik aseton ile 5 ml'ye tamamlandı ve 5000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Daha sonra örneklerin, klorofil-a için 663, klorofil-b için 645 ve toplam karotenoid için 480 nm'de spektrofotometrik olarak örneklerin absorbans değerleri alındı.

Fotosentetik pigmentlerin miktarları aşağıdaki formüllere göre hesaplandı:

mg klorofil-a / gr doku = [ΔA_{663} x 12.70 – ΔA_{645} x 2.69] (V/1000xW)

mg klorofil-b / gr doku =[ΔA_{645} x 22.90 – ΔA_{663} x 4.68] (V/1000xW)

mg toplam klorofil / gr doku = [ΔA_{645} x 20.2 + ΔA_{663} x 8.02]V/1000xW

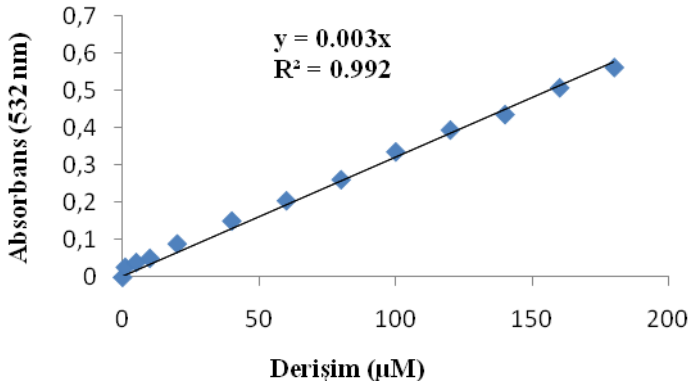
mgkarotenoid / gr doku = [ΔA_{480} +ΔA_{663} x 0.114 – ΔA_{645} x 0.638/112.50] (V/1000xW)

Eşitliklerde Δ: ekstraktın belirtilen dalga boyundaki absorbans değerini, V: %80'lik asetonun ml olarak son hacmi, W: ekstre edilen dokunun gr olarak taze ağırlığını göstermektedir.

3.2.7. Lipid Peroksidasyon Derecesinin Belirlenmesi

Yaprak dokularında meydana gelen membran hasar derecesini belirlemek içinincelenen MDA miktarı, tiyobarbütirik asit (TBA) testi ile belirlendi (Ohkawa ve ark. 1979). Bunun için kontrol ve stres grubuna ait bitkilerin yaprak dokularından alınan 0.1 g'lik örnekler sıvı azotta öğütüldükten sonra üzerlerine 2 ml %5'lik trikloroasetik asit (TCA) eklenerek homojenizasyon sağlandı ve 25 °C'de 12000 rpm'de 20 dk santrifüj edildi. 0.4 µl süpernatant ve içinde %0.5 oranında TBA bulunan %20'lik TCA çözeltisi içeren reaksiyon karışımı, 95°C'lik sıcak su banyosunda tutulduktan sonra

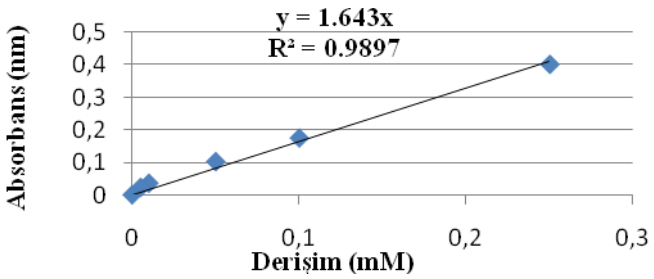
çıkarıldı ve reaksiyonu durdurmak amacıyla buz banyosuna konuldu. 1000 rpm'de 10 dk santrifüjedilen karışımların, absorbans değerleri spektrofotometre ile 532 nm dalga boyunda ölçüldü. Kör olarak %0.5 oranında TBA içeren %20'lik TCA çözeltisi kullanıldı. Aynı işlemler 1.1.3.3-Tetrametoksipropan için MDA standart eğrisi grafiği çizilerek (Şekil 3.2.) MDA miktarı hesaplandı ve sonuçlar µmol g^{-1} taze ağırlık olarak ifade edildi (Tsaknis ve ark. 1998).



Şekil 3.2. MDA standart eğrisi

3.2.8. Prolin İçeriğinin Belirlenmesi

Hassas ve tolerant çeşitlerdeprolin miktarı spektrofotometrik olarak Asit-Ninhidrin metodu ile belirlendi (Bates ve ark. 1973; Ghoulam ve ark. 2002). Uygulama gruplarından ayrı ayrı alınan 100 mg taze yaprak örneği %40'lık 2 ml metanol ile ekstrakte edilerek hazır hale getirildi. 1 ml ekstrakt, 1 ml glasiyal asetik asit ve 6 M ortofosforik asitten (3:2 v/v) oluşan karışım üzerine 25 mg ninhidrin ilave edilerek 1 saat süre ile 100 °C de inkübasyona bırakıldı. Sonraki aşamada ise karışımların bulunduğu tüpler soğutularak 5 ml toluen ilave edildi. Yapılan işlemler sonucunda tüplerde homojenizasyon sağlandı ve iki farklı faz oluşumu gözlendi. Yaprak örneklerinin prolin miktarının belirlenmesi için tüplerin üst kısmında oluşan fazın absorbans değeri 528 nm dalga boyunda ölçüldü. Örneklerin prolin miktarı, L-prolin standardı kullanılarak hazırlanan grafik yardımıyla (Şekil 3.3.) hesaplanarak mmol g^{-1} taze ağırlık olarak ifade edildi.



Şekil 3.3. L-Prolin standart eğrisi

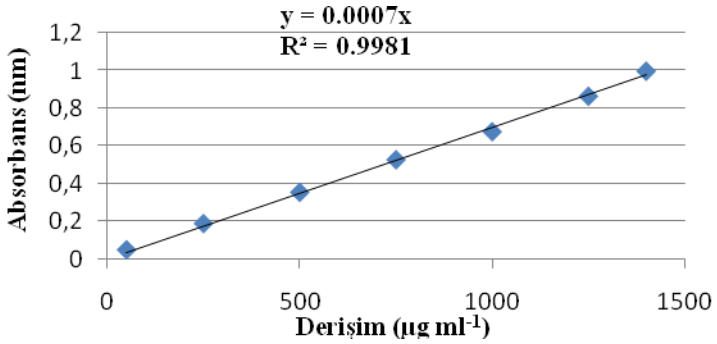
3.2.9. Antioksidan Enzim Ekstraksiyonu

Uygulamalardan sonra çeşitlerde meydana gelen enzim değişimlerini belirlemek için; -80 °C'de muhafaza edilen yaprak örneklerinden 1 gr alındı. Soğutulmuş havanda %1 w/v polivinil poli pirolidon (PVPP), 10 mM Na_2EDTA, 10 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$ ve 2 mM DTT içeren 5 ml 0.1 M fosfat tamponunda (pH 7.0) homojenize edilen bitki numuneleri filtre edildikten sonra +4°C'de 10000 rpm'de 20 dk santrifüjlendi. Elde edilen süpernatant toplam çözünebilir protein miktarı ve antioksidan enzim aktivitesi analizlerinde kullanıldı. Enzim ölçümlerinde son hacim tampon çözeltisiyle tamamlandı.

3.2.9.1. Toplam Çözünebilir Protein Miktarının Belirlenmesi

Yaprak dokularındaki toplam çözünebilir protein miktarı, Bradford (1976) metoduna göre belirlendi. Elde edilen süpernatanttan 20 µl alınarak, üzerine sırasıyla 480 µl distile su ve 5000 µl Bradford çözeltisi ilave edildi. Hazırlanan reaksiyon karışımları vorteksle karıştırılarak, karanlık bir ortamda ve oda sıcaklığında 10 dk bekletildikten sonra 595 nm dalga boyunda absonbansları spektrofotometrik (SHIMADZU, UV mini 1240 UV-VIS Spektrofotometre) olarak ölçüldü. Absorbanslar, 500 µl distile su ve 5000 µl Bradford çözeltisi kullanılarak elde edilen köre karşı okundu.

Toplam çözünebilir protein miktarı, bovine serum albumin (BSA) ile hazırlanan standart grafik yardımıyla (Şekil 3.4.) hesaplandı ve mg g^{-1} taze ağırlık olarak ifade edildi. Standart eğri 50, 100, 250, 500, 750, 1000, 1250, 1400 µg ml^{-1} BSA kullanılarak oluşturuldu.



Şekil 3.4. BSA standart eğrisi

3.2.9.2. Katalaz Enzim (CAT) Aktivitesinin Belirlenmesi

Katalaz enziminin aktivite tayini, 37°C olan ortamda 240 nm'de H_2O_2'nin tüketilme esasına dayanan metoda göre tespit edildi(Aebi 1984). 30 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7.0) ve 10 mM H_2O_2 içeren reaksiyon karışımına 450 µL enzim ekstraktının ilave edilmesi ile reaksiyon başlatıldı.

Numune ilavesi ile kuartz küvetin ağzı bekletilmeden kapatılarak hızlı bir şekilde küvet alt-üst edilip absorbans okundu. Absorbans azalması, her 30 sn'de bir defa olmak üzere 2 dakika süre ile kaydedildi. Hesaplamada 2 dakikalık lineer absorbansazalmasının en yüksek ve en düşük değerleri esas alındı. CAT aktivitesi, H_2O_2'nin ekstinksiyon katsayısı 36 mM^{-1} cm^{-1} olarak hesaplandı ve dakikada harcanan µmol H_2O_2 olarak ifade edildi.

3.2.9.3. Askorbat Peroksidaz (APX) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Askorbat peroksidaz (EC 1.11.1.11) aktivitesi Nakano ve Asada (1981)'nın önerdiği yönteme göre belirlendi. 1.6 ml 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7.0), 0.2 ml enzim ekstresi, 0.2 ml 0.5 mM askorbat ve 0.2 ml 10 mM H_2O_2 içeren reaksiyon karışımının absorbansındaki azalma, askorbik asidin okside olmasına bağlı olarak, 290 nm'de 2 dakika boyunca 10 sn aralıklarla kaydedildi. Toplam APX aktivitesi, askorbatın ekstinksiyon katsayısı (2.8 $mM^{-1}cm^{-1}$**)** kullanılarak U mg^{-1} protein olarak hesaplandı. APX aktivitesi dakikada okside olan 1 mmol ml^{-1} askorbat olarak ifade edildi.

3.2.9.4. Glutatyon Redüktaz (GR) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Çeltik çeşitlerindeki GR aktivitesi Goldberg ve Spooner (1983)'in önermiş olduğu yönteme göre yapıldı. 2.5 ml 120 mM fosfat tamponu (pH 7.2), 0.1 ml 0.015 mM Na_2EDTA, 0.1 ml 0.065 mM GSSG, 0.05 ml of 9.6 mM NADPH ve 0.1 ml enzim ekstresi içeren reaksiyon karışımının absorbansındaki azalma, 2 dakika boyunca 10 sn'lik aralıklarla 340 nm'de kaydedildi. Spesifik enzim aktivitesi, NADPH'nın ekstinksiyon katsayısı olan 6.23 mM^{-1} cm^{-1} kullanılarak hesaplandı ve dakikada indirgenen 1 mmol ml^{-1} GSSG miktarı olarak ifade edildi.

3.2.9.5. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

SOD, oksidatif enerji basamağında üretilen toksik süperoksit radikalinin ($O_2^{\bullet-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene (O_2) dismutasyonunu hızlandırmaktadır. SOD (EC 1.15.1.1) aktivitesi Giannopolitis ve Ries (1977)'e göre NBT'nin (nitroblue tetrazolium kloridin) ışık altında $O_2^{\bullet-}$ tarafından indirgenmesi yöntemine göre ölçüldü. Aktivite tayini için dört farklı konsantrasyonda (10-20-30-40 µl) enzim ektresi içeren ve enzim ekstresi içermeyen (kontrol) toplam 5 reaksiyon seti hazırlandı. Cam deney tüplerine önce enzim ekstraktı daha sonra sırasıyla; 0.5 ml 50 mM pH 10.2 Na_2CO_3 (sodyum karbonat), 12 mM metionin, 75 µM NBT, 10 µM riboflavin ve son hacmi 5 ml'ye tamamlamak için 0.1 mM EDTA içeren 50 mM fosfat tamponu (pH 6.0) eklendi. Test tüplerinin 25ºC sıcaklıkta 10 dakika süre ile beyaz ışık kaynağı altına yerleştirilmesiyle reaksiyon başlatıldı. Oluşan mavi-mor renkli reaksiyon karışımının absorbansı, 560 nm'de ölçüldü. Bir ünite SOD, deneysel koşullar altında NBT indirgenmesinde %50 inhibisyona neden olan enzim miktarı olarak ifade edildi. Toplam SOD aktivitesi U mg^{-1} protein olarak hesaplandı. Unite (U), 25°C'de 1 dakikada 1 µmol substratı ürüne dönüştüren enzim (SOD) miktarını göstermektedir.

3.2.10. ROT Aktivitesinin İncelenmesi

Ekstraktların Hazırlanması

Sıvı azotta öğütülmüş yaprak örneklerinden 10 g alındıktan sonra 120 ml metanol:su (1:1) ile 56 saat oda koşullarında çalkalamalı su banyosunda karıştırıldı. Çözünmeyen kısımlar filtre edilip süzüldü ve çözücüleri evaparatörde 40ºC'de uçurularak tartımları alındı. Aktivite denemelerinde çalışılan konsantrasyonlar için,

etanol:su karışımında çözdürülen yaprak örnekleri, analiz zamanına kadar renkli şişelerde +4 ºC'de muhafaza edildi. Diğer konsantrasyonlar bu stok çözeltilerden seyreltilerek hazırlandı.

Bitki Stoklarının Hazırlanması

Tüm ekstraktlar için ayrı ayrı stok çözeltiler hazırlandı. Stok etanol:su ekstraktı çözeltisi derişimi, hidrojen peroksit söndürme aktivitesi için 10 mg ml^{-1}, süperoksit ve hidroksil söndürme aktiviteleri için ise 500 µg ml^{-1} olacak şekilde hazırlandı. Hazırlanan tüm stok çözeltiler kullanılmadan önce 0.2 µm por çapına sahip membranfiltresinden geçirildi.

3.2.10.1. Süperoksit Radikali ($O_2^{\bullet-}$) Söndürme Aktivitesinin İncelenmesi

Süperoksit radikali giderme aktivitesi substrat olarak kullanılan NBT'nin indirgenmesi esasına dayanarak tayin edilir. Bu metod ile oluşturulan süperoksit ($O_2^{\cdot-}$) radikalleri sarı renkli NBT^{2+}'yi mavi renkli formazan türevine indirger. Ortamda antioksidan bileşik varsa mavi-mor NBT oluşumu inhibe edilir.

$O_2^{\cdot-}$radikali giderme aktivitesi Zhishen ve ark. (1999)'nın riboflavin-metiyonin-ışık-NBT metoduna göre yapıldı. Pozitif kontrol olarak askorbik asit ve BHT kullanıldı. 4, 8, 12, 16 ve 20 µg ml^{-1} konsantrasyonlarında hazırlanan bitki ekstraktlarının üzerine toplam hacimleri 500 µl olacak şekilde 0.05 M'lik fosfat tamponu (pH 7.8) ile 500 µl metiyonin (0.02 M), 500 µl riboflavin (3.10^{-3} M) ve 500 µl NBT (0.01 M) ilave edildi. Farklı konsantrasyonlardaki ekstraktlar için ayrı ayrı, içinde bitki ekstraktlarının olmadığı diğer tüm bileşiklerin bulunduğu kontrol numuneleri hazırlandı. Kontrol numuneler karanlıkta, diğerleri alimünyum folyo ile sarılmış aydınlanma şiddetinin 4000 lüx olacak şekilde ayarlandığı bir ortamda 25°C'de 10 dk süresince bekletildi ve 560 nm'de absorbanslar ölçüldü. Yüzde inhibisyon değerleri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı ve süperoksit anyonu giderebilme aktiviteleri hesaplandı.

Yüzde inhibisyon = (AK – A1) / AK × 100

AK: Kontrolün absorbansı, A1: Numunenin absorbansı

3.2.10.1.1. Hidroksil Radikali ($HO^{\bullet}$) Söndürme Aktivitesinin İncelenmesi

$HO^{\bullet}$ radikali büyük ölçüde Fenton reaksiyonu ile oluştuğu için *in vitro* koşullarda da Fe^{2+}/H_2O_2 sistemiyle üretilir ve antioksidanın $HO^{\bullet}$ radikalini giderebilme gücü ölçülür. Bitki ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının deoksiriboz metodu ile Fe^{2+}/askorbat/EDTA/H_2O_2 sisteminde $HO^{\bullet}$ radikalini söndürme aktivitesi ölçüldü. Bu yöntem bazı eşitliklere dayanır (Şekil 3.5.). $HO^{\bullet}$ radikali deoksiriboza saldırır, bir dizi reaksiyon sonucu MDA oluşur. Oluşan MDA, TBA (2-tiyobarbitürik asit) ile reaksiyona girerek pembe renkli ve 532 nm'de absorbans veren MDA-TBA kompleksini meydana getirir (Wang ve ark. 2003; Emen 2006).

$$Fe^{2+}\text{−EDTA} + O_2 \leftrightarrow Fe^{3+}\text{−EDTA} + O_2^{\bullet -}$$

$$2\ O_2^{\bullet -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

$$Fe^{2+}\text{−EDTA} + H_2O_2 \leftrightarrow HO^{\bullet} + OH^- + Fe^{3+}\text{−EDTA}$$

$$HO^{\bullet} + \text{deoksiriboz} \rightarrow \text{parçalanma ürünleri} \rightarrow \text{ısı} \rightarrow \text{MDA}$$

Şekil 3.5. Deoksiriboz metoduyla TBA-MDA kompleksinin oluşumu (Emen 2006)

Yaprak ekstraktlarının 500 µg ml^{-1}'lik stok çözeltileri hazırlanıp, stok çözeltilerden 1-20 µg ml^{-1} konsantrasyonlarda seyreltmeler yapıldı. Reaksiyon karışımı sırasıyla; 100 µl-1 mM EDTA, 10 µl-10 mM $FeCl_3$, 100 µl-50 mM H_2O_2, 360 µl-10 mM deoksiriboz, 1 ml ekstrakt (1-20 µg ml^{-1}), 330 µl-50 mM pH 7.4 olan fosfat tamponu ve 100 µl–1 mM askorbik asit içermektedir. Karışım 37ºC'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübe edilen karışımdan 1 ml alınıp üzerine 1 ml %10'luk TCA ve 1 ml % 0.5'lik TBA ilave edildi. Daha sonra bu karışım 100ºC'de 20 dk inkübasyona bırakıldı. Karışım buzda soğutulduktan sonra 532 nm'de UV spektroskopide absorbansı ölçüldü. Pozitif kontrol olarak BHA ve BHT kullanıldı. Negatif kontrol sadece ekstrakt ve pozitif kontrol içermeyen test örneğidir. Artan konsantrasyona karşı % inhibisyon değerleri grafiğe geçirilerek, aşağıdaki formüle göre hesaplandı (Kumar ve ark. 2005; Emen 2006).

$$\%\ I = [\ (A_{Kontrol} - A_{örnek}) / A_{Kontrol}\ ] \times 100$$

3.2.10.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2) Söndürme Aktivitesinin İncelenmesi

Yaprakların etanol:su ekstraktının H_2O_2 söndürme aktivitesi Zhao ve ark. (2006)'ye göre belirlendi. Pozitif kontrol (BHT ve askorbik asit) ve yaprak ekstraktının 10 mg ml^{-1}'lik konsantrasyonda stok çözeltileri hazırlandı ve stok çözeltilerden 100-400 µg ml^{-1} konsantrasyonlarda seyreltmeler yapılarak deneyde iki yol izlendi. -Birinci yolda 0.5 ml-0.1 mM H_2O_2 ve farklı konsanrasyonlardaki ekstrakt ve pozitif kontrolden 1 ml alındı, bu karışım üzerine 100 µl-%3'lük amonyum molibdat, 10 ml-2M sülfürik asit (H_2SO_4) ve 7 ml-1.8 M potasyum iyodür (KI) eklendi. Sarı renkli bu karışım, rengi kaybolana kadar 5.09 mM sodyum tiyosülfat ($Na_2S_2O_3$) ile titre edildi.-İkinci yolda ise 1 ml-0.1 mM H_2O_2 ve farklı konsanrasyonlardaki ekstrakt ve pozitif kontrolden 0.5 ml alınıp, karışım üzerine 100 µl-%3'lük amonyum molibdat, 10 ml-2 M sülfürik asit (H_2SO_4) ve 7 ml 1.8 M potasyum iyodür (KI) ilave edildi. Sarı renkli karışım yine rengi kaybolana kadar 5.09 mM $Na_2S_2O_3$ ile titre edildi. Her iki yolda da ekstraktın hidrojen peroksit söndürme aktivitesi aşağıdaki eşitliğe göre hesaplandı.

Hidrojen peroksit söndürme aktivitesi (%) = [(V_0- V_1) / V_0] × 100

V_0:Kontrol numunesinin titrasyonu için kullanılan $Na_2S_2O_3$ çözeltisinin hacmi

V_1:Uygulama örneklerinin etanol:su ekstraktı ve pozitif kontrol için kullanılan $Na_2S_2O_3$ çözeltisinin hacmi

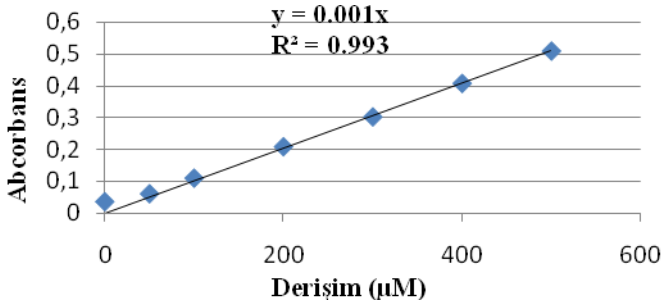
Bu metotta kontrol olarak askorbik asit ve BHT için saf su, ekstrakt için etanol:su kullanıldı.

3.2.11. Hidrojen Peroksit (H_2O_2) Miktarının Belirlenmesi

Kontrol ve tuz uygulamalarından 0.25 g yaprak örneği alındı ve 2.5 ml %1'lik (w/v) TCA ile havanda ezilerek homojenize edildi. Homojenat 12000xg'de 15 dk santrifujlendikten sonra 0.5 ml süpernatant üzerine 0.5 ml 10 mM (pH7) fosfat tamponu ve 1 ml 1 M KI ilave edildi. Reaksiyon karışımı oda sıcaklığında 1 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra 390 nm'de absorbansları ölçüldü.

Daha sonra H_2O_2 ilehazırlanan standart grafikten yararlanılarak kontrol ve uygulama gruplarında hidrojen peroksit miktarı belirlendi (Velikova ve ark. 2000). Standart grafik için 163 µM H_2O_2 stok çözeltisinden sırasıyla 50, 100, 200, 300, 400, 500 µl pipetlendi (Şekil 3.6.). Her bir tüpe 1 ml 1 M KI ilave edilerek son hacimler 10

mM fosfat tamponu ile 2 ml'ye tamamlandı. Tüplerdeki karışımın absorbansı 390 nm'de ölçüldü. Absorbans değerlerine karşılık gelen µmol H_2O_2 değerleri standart grafik halinde verildi (Ulusu 2007; Tetiktabanlar2011).



Şekil 3.6. H_2O_2 standart eğrisi

3.2.12. Proteinlerin Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ile Analizi

SDS-PAGE analizinde tamponların pH'sı, ayrılacak olan moleküllerin yükünü belirler ve moleküllerin tek yönde göç etmelerini sağlar. Çeşitlere ait protein ekstraktlarının, elektroforez için jel üzerine yerleştirilmeleri gerekmektedir. Jeller poliakrilamid yapıdadır ve iki ayrı kısımdan (Ayırma jeli ve Yükleme jeli) oluşur.

Ayırma Jeli Çözeltisi: 3.3 ml %30 Bis-akrilamid, 2.5 ml 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8), 0.1 ml %10 SDS, 4.1 ml dH_2O, 5 µl TEMED ve 50 µl amonyum persülfat ile hazırlandı (%10 olacak şekilde).

Kaset haline getirilen iki cam levha arasına hazırlanan ayırma jeli, üst kısımda tarak dişlerinin yüksekliği kadar bir boşluk bırakılacak şekilde aktarıldı. Ayırma jelinin oluşması için ortalama 30 dakika oda sıcaklığında beklenerek akrilamid monomerlerinin polimerleşmesi sağlandı. Daha sonra da yükleme jeli hazırlanarak kasetin geri kalan kısmına ilave edildi.

Yükleme Jeli Çözeltisi: 1.7 ml %30 Bis-akrilamid, 2.5 ml 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8), 0.1 ml %10 SDS, 5.7 ml dH2O, 10 µl TEMED ve 50 µl amonyom persülfat ile hazırlandı (%10 olacak şekilde).

Yükleme jeli, ayırma jeli üzerinde bulunan boşluğa iki camın en üst seviyesine kadar enjektör ile ilave edildi. Protein örneklerine yükleme kuyusu oluşturmak için

kaset düzeneğine tarak yerleştirildi. Yine yaklaşık olarak 30 dakika oda sıcaklığında beklendikten sonra tarak yavaşça çıkarıldı.

Protein Örneklerinin Hazırlanması ve Örneklerin Koşturulması: Eşit hacimde protein örneği ve protein uygulama tamponu (distile su, Tris-HCl, gliserol, SDS, ß-merkaptoetanol, bromophenol mavisi) ependorf tüpte karıştırıldıktan sonra 3 dk kaynar su banyosunda bekletildi. Örnekler marker'la birlikte, izleme boyasının (bromofenol blue) yardımıyla protein örnekleri takip edilerek jelin bitimine 2 mm kala elektroforez bitirildi. Jeller coomassie blue (% 0.1 Coomassie Blue R-250, % 45 metanol, % 10 asetik asit, % 45 distile su) boyasına alınarak protein bantlarının görünür hale gelmesi sağlandı. Son olarak protein bantları dışındaki bantların uzaklaştırılması için jeller boya giderici solüsyona alınarak protein bantlarının net görüntüsü elde edildi. Marker aracılığı ile protein bantlarının kDa değerleri hesaplanarak uygulamalar ve kontrolleri arasındaki farklar karşılaştırıldı. SDS-PAGE protein elektroforezi Laemlii (1970) metodu kullanılarak yapıldı.

3.2.12. İstatistiki Analiz

İstatistiki analizler SPSS "for Windows 20.0 Standart version" paket programı kullanılarak kontrol ve uygulama grupları arasındaki farklılıklar tek yönlü varyans analizi (ONE-WAY ANOVA) ve DUNCAN çoklu aralık testine göre $p \leq 0.05$ önemlilik değerinde yapıldı (Duncan 1955).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Tez çalışmasında, NaCI'nin farklı konsantrasyonları (0, 100, 200 ve 300 mM) ile oluşturulan stres koşullarına maruz bırakılan çeltik çeşitlerinin tuzluluk faktörüne karşı verdikleri yanıtlar bazı fizyolojik ve biyokimyasal parametreler kullanılarak araştırılmıştır.

Stres uygulamalarından sonra çeşitlere ait kök uzunluğu, sürgün boyu, taze ve kuru ağırlığı, bağıl su içeriği, fotosentetik pigment içeriği ve MDA miktarındaki değişimler karşılaştırılarak hassas ve toleranslı olduğu düşünülen çeşitler tespit edilmiştir. Belirlenen çeşitlerin (Gala, Karacadağ, Tunca ve Aromatik-1) hassas veya tolerant seviyeleri hakkında kesin bir sonuç elde etmek amacıyla antioksidan enzim aktivitesi, ROT söndürme aktivitesi, hidrojen peroksit içeriği ve SDS-PAGE tekniği kullanılarak proteinler incelenmiştir.

4.1. Kültürel İşlemler

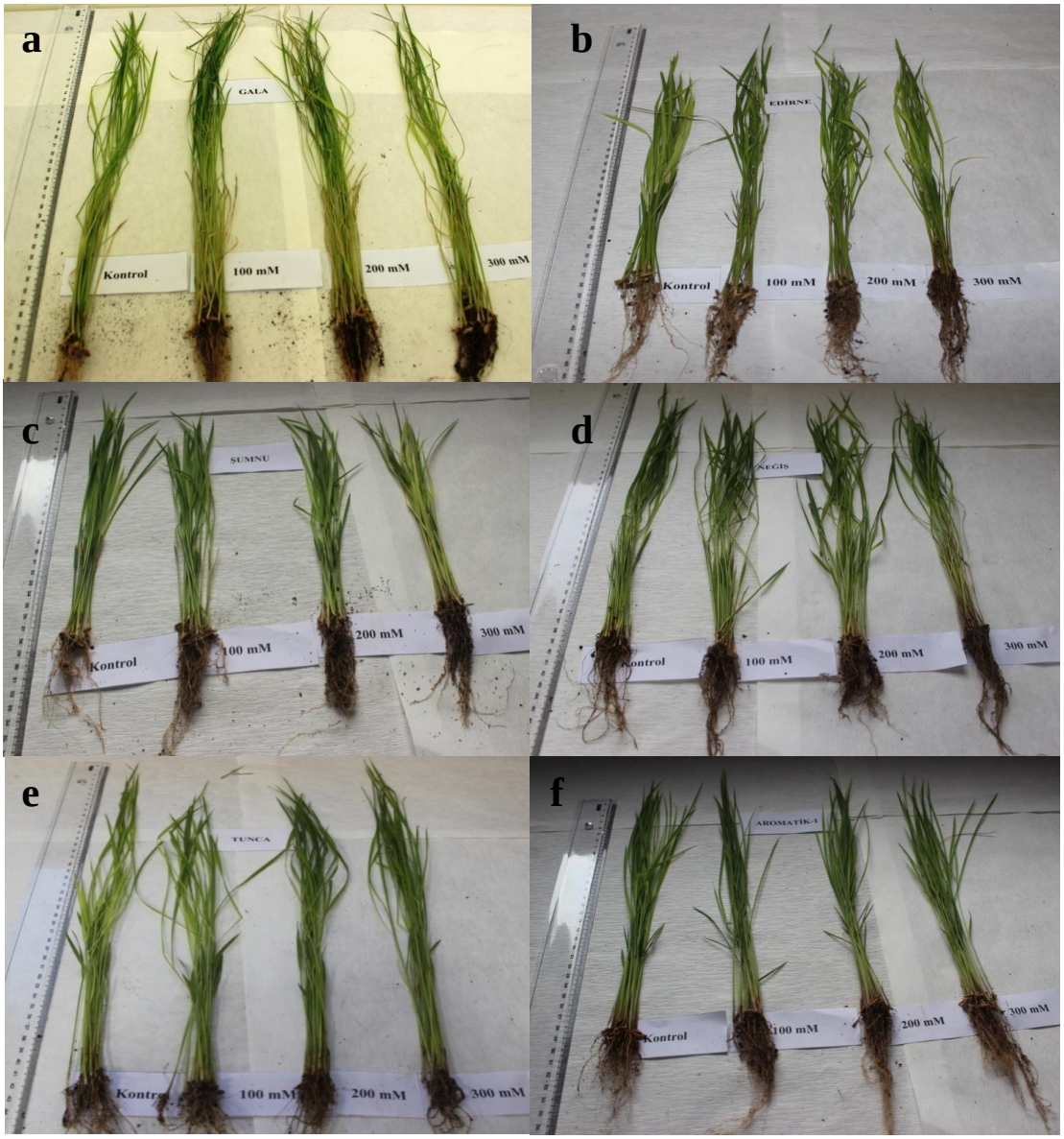
24 saat süre ile imbibisyona bırakılan çeşitlere ait tohumların saksılara ekimi gruplar halinde yapıldıktan sonra 4 hafta süre ile ¼ Hoagland besin solüsyonu ile sulanmıştır.

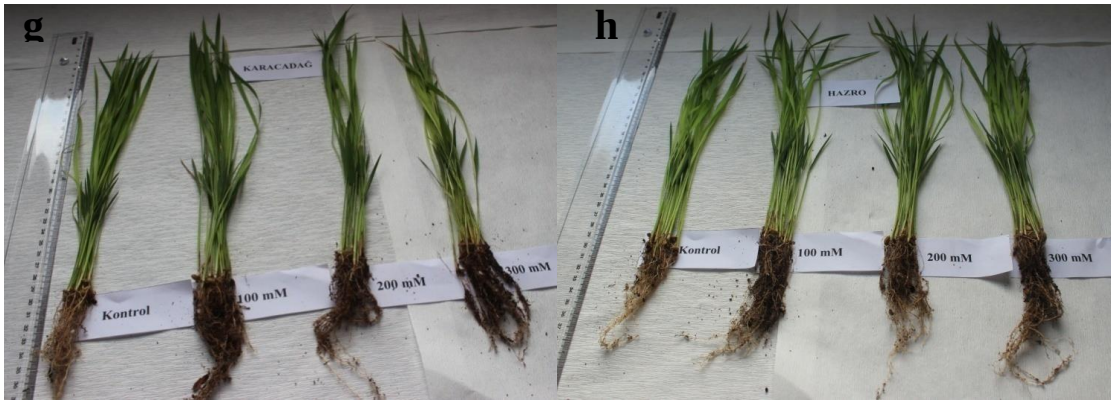
Tohum çimlenmesinin de dahil edildiği 4 haftalık gelişim periyodu sonunda, 10 gün boyunca 0, 100, 200 ve 300 mM NaCI ile yapılan uygulamalarla bitkiler tuz stres faktörüne maruz bırakılmıştır. Uygulamalar tamamlandıktan sonra yapılan gözlemlere göre, bazı çeşitlerin tamamında hafif ve yer yer sararma görülürken diğerlerinde ise yaprak sararmasının lokal olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. Çeşitlere uygulanan NaCI stres faktörünün etkisi **a.** Uygulamadan önce bitkilerin genel görünüşü **b.** Uygulamadan 10 gün sonra bitkilerin genel görünüşü

Uygulamalardan 10 gün sonra, çeşitlerde meydana gelen morfolojik değişikliklerin tespit edilmesi amacıyla uygulama grupları kendi kontrolleri ile karşılaştırılmış ve yüksek tuz konsantrasyonunda (300 mM) Şumnu ve Karacadağ çeşitlerinde sararma veya solmanın belirgin bir şekilde arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.2.c ve 4.2.g).





Şekil 4.2. NaCI uygulamalarının 10.gününü takiben çeşitlerin görünüşü; **a. Gala** çeşidinin genel görünüşü, **b. Edirne** çeşidinin genel görünüşü, **c. Şumnu** çeşidinin genel görünüşü, **d. Neğiş** çeşidinin genel görünüşü, **e. Tunca** çeşidinin genel görünüşü **f. Aromatik-1** çeşidinin genel görünüşü **g. Karacadağ** çeşidinin genel görünüşü **h. Hazro** çeşidinin genel görünüşü

4.2. Çeşitlerde Sürgün ve Kök Uzunlukları

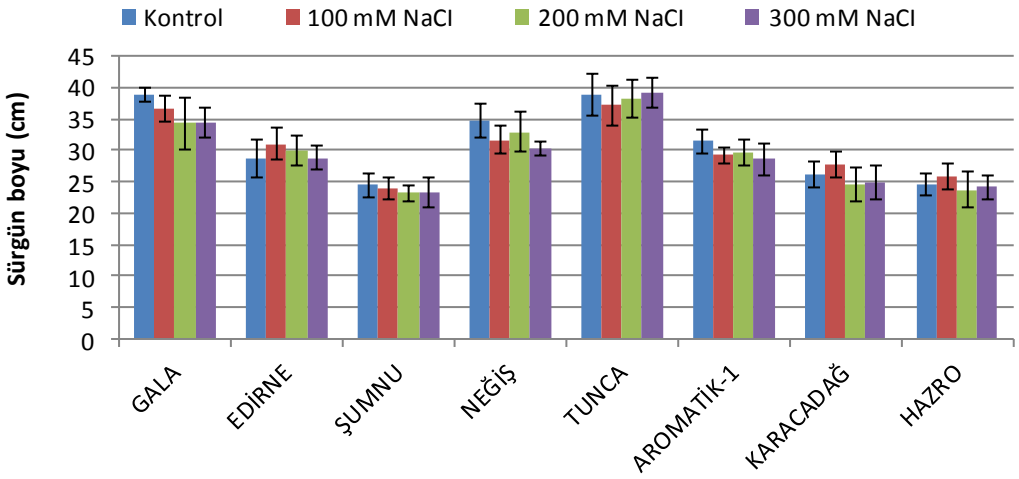
Stres uygulamalarına bağlı olarak çeşitlerin sürgün boyu ve kök uzunluklarında meydana gelen değişimler Çizelge 4.1. ve Çizelge 4.2.'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. NaCI'nin farklı konsantrasyonları ile oluşturulan stres ortamında çeşitlerin sürgün boyu uzunluğunda gözlenen değişimler (cm bitki^{-1})*

Çeşitler	Kontrol Ortalama	100 mM NaCI Ortalama	200mM NaCI Ortalama	300mM NaCI OrtalamA
Gala	38.760^{a}	36.610^{ba}	34.250^{b}	34.370^{b}
Edirne	28.730^{a}	31.040^{a}	29.870^{a}	28.790^{a}
Şumnu	24.410^{a}	23.880^{a}	23.250^{a}	23.210^{a}
Neğiş	34.620^{a}	31.620^{cb}	32.930^{ba}	30.200^{c}
Tunca	38.810^{a}	37.170^{a}	38.140^{a}	39.080^{a}
Aromatik-1	31.420^{a}	29.210^{b}	29.640^{ba}	28.540^{b}
Karacadağ	26.230^{ba}	27.700^{a}	24.660^{b}	24.990^{b}
Hazro	24.590^{a}	25.830^{a}	23.740^{a}	24.110^{a}

* Aynı satırda yer alan farklı harfler ortalamalar arasındaki önemi ($p \leq 0.05$)ifade etmektedir.

Test edilen tüm tuz konsantrasyonlarında Edirne, Şumnu, Tunca ve Hazro çeşitlerinin sürgün büyümesinde meydana gelen artış veya azalış değerleri, kendi kontrol grupları ile kıyaslandığında istatistiki açıdan önemsiz olduğu saptanmıştır. Buna karşın tuz konsantrasyonuna bağlı olarak Gala, Şumnu, Neğiş ve Aromatik-1'in sürgün boy uzunluğunda kontrollerine göre azalma tespit edilmiştir (Şekil 4.3.). 300 mM NaCI uygulamasında meydana gelen azalma Gala'da %11.3, Neğiş'te %12.7 ve Aromatik-1'de %9.1 olup, istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (Çizelge 4.1.).



Şekil 4.3. Uygulanan NaCI stres faktörünün çeşitlerde sürgün boyu uzunluğuna etkisi

Kontrol grubundaki bitkilerle uygulama grupları karşılaştırıldığında, Gala (100 ve 300 mM) ve Edirne çeşitleri (100 mM) hariç tüm konsantrasyonlarda kök uzunluklarının arttığı gözlenmiştir (Çizelge 4.2. ve Şekil 4.4.).

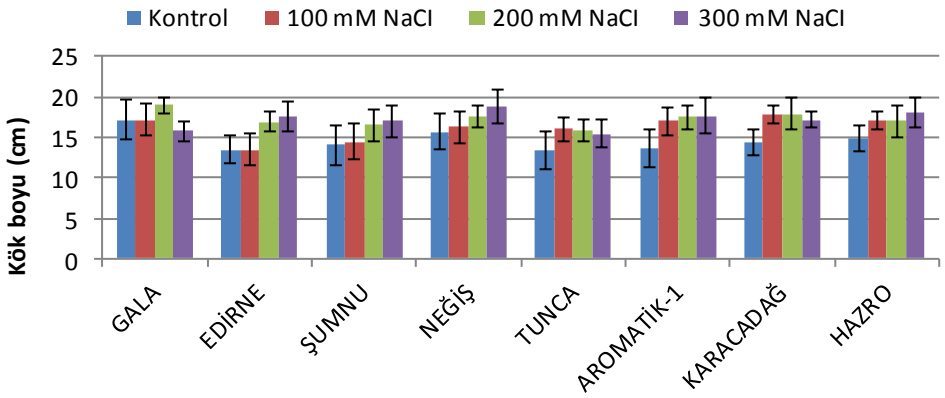
Çizelge 4.2. NaCI'nin farklı konsantrasyonları ile oluşturulan stres ortamında çeşitlerin kök uzunluklarında meydana gelen değişimler (cm bitki^{-1}) *

Çeşitler	Kontrol Ortalama	100 mM NaCI Ortalama	200 mM NaCI Ortalama	300 mM NaCI Ortalama
Gala	17.140^{b}	17.120^{b}	18.910^{a}	15.770^{b}
Edirne	13.480^{b}	13.450^{b}	16.920^{a}	17.600^{a}
Şumnu	14.000^{b}	14.430^{b}	16.480^{a}	16.990^{a}
Neğiş	15.660^{b}	16.220^{b}	17.490^{ba}	18.870^{a}
Tunca	13.380^{b}	15.980^{a}	15.840^{a}	15.460^{a}
Aromatik-1	13.710^{b}	16.940^{a}	17.500^{a}	17.630^{a}
Karacadağ	14.380^{b}	17.760^{a}	17.920^{a}	17.150^{a}
Hazro	14.900^{b}	17.040^{a}	17.020^{a}	18.110^{a}

* Aynı satırda yer alan farklı harfler ortalamalar arasındaki önemi ($p \leq 0.05$) ifade etmektedir

100 mM'lik uygulamada Edirne, Gala, Şumnu ve Neğiş çeşitlerinden kontrol grubu ile benzer sonuçlar alınmış ve bu sonuçlar istatistiki açıdan da önemsiz bulunmuştur. Geriye kalan dört çeşitte kök boyunda meydana gelen artışların $p \leq 0.05$ seviyesinde kontrollerine göre önemli olduğu görülmüştür. Tuz uygulamalarının konsantrasyonuna bağlı olarak Neğiş çeşidinin kök uzunluğunda düzenli bir artış gözlenmiş ancak istatiksel olarak farklılık sadece 300 mM'lik uygulamadan alınmıştır. Uygulamalardan sonra Tunca çeşidinde kök uzunluğu kendi kontrolüne göre artmasına rağmen her üç uygulamadan benzer sonuçlar alınmış ve istatiksel olarak fark önemsiz

bulunmuştur. 200 mM NaCI uygulamasında sadece Neğiş çeşidinde, 300 mM seviyede ise sadece Gala çeşidinde kök uzunluğunda meydana gelen değişim istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur. 200 mM NaCI uygulaması Gala çeşidinin kök uzunluğunda önemli bir artışa neden olmuş ancak bir sonraki konsantrasyonda (300 mM) ise bir düşüş saptanmıştır.



Şekil 4.4. Uygulanan NaCI stres faktörünün çeşitlerde kök uzunluğuna etkisi

Şumnu, Neğiş ve Aromatik-1 çeşitlerinde tuzluluğun artışına paralel olarak kök uzunluğunda da artış gözlenmiştir. Kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında, meydana gelen bu artışlar sadece Aromatik-1 çeşidinde tüm NaCI uygulamaları için istatistiki açıdan önemli bulunmuştur.

4.3. Çeşitlerin Yaprak Taze -Kuru Ağırlıkları

Uygulama ve kontrol gruplarından alınan yaprak taze ağırlıklarında meydana gelen değişimler Çizelge 4.3. ve Şekil 4.5.'te verilmiştir.

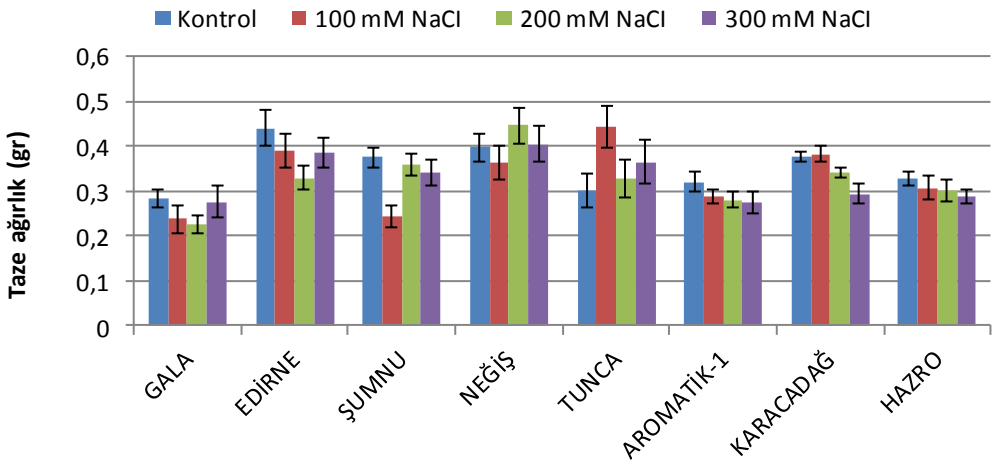
Çizelge 4.3. NaCI'nin farklı konsantrasyonları ile oluşturulan stres ortamında çeşitlerin yaprak taze ağırlıklarında meydana gelen değişimler (g)*

Çeşitler	Kontrol Ortalama	100 mM NaCI Ortalama	200 mM NaCI Ortalama	300mM NaCI Ortalama
Gala	0.281^{a}	0.237^{a}	0.226^{a}	0.276^{a}
Edirne	0.439^{a}	0.389^{a}	0.329^{a}	0.385^{a}
Şumnu	0.375^{a}	0.245^{b}	0.359^{a}	0.341^{a}
Neğiş	0.397^{a}	0.363^{a}	0.445^{a}	0.403^{a}
Tunca	0.301^{b}	0.442^{a}	0.328^{b}	0.365^{b}
Aromatik-1	0.320^{a}	0.288^{a}	0.280^{a}	0.275^{a}
Karacadağ	0.377^{a}	0.382^{a}	0.342^{ba}	0.294^{b}
Hazro	0.327^{a}	0.306^{a}	0.301^{a}	0.289^{a}

*Aynı satırda yer alan farklı harfler ortalamalar arasındaki önemi ($p \leq 0.05$) ifade etmektedir

Düşük NaCI konsantrasyonu (100 mM) Karacadağ ve Tunca hariç diğer çeşitlerin yaprak taze ağırlığında azalmaya neden olmuştur. Ancak taze ağırlık değerlerindeki bu azalmalar, Şumnu hariç diğer çeşitlerde istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Çizelge 4.3.'te görüldüğü gibi 200 ve 300 mM NaCI uygulamaları Neğiş çeşidinde artışa neden olurken Tunca'da ise 100 mM'de daha fazla olmak üzere her üç uygulamadan alınan artış değerleri birbirine yakın görülmüş ve aradaki fark önemli bulunmamıştır.

Neğiş için en yüksek artış (0.44 g) 200 mM'lik konsantrasyonda alınırken benzer sonuç (0.44 g) 100 mM uygulama ile Tunca için tespit edilmiştir. Hazro ve Aromatik-1 çeşitlerinde ise konsantrasyon artışına bağlı olarak taze ağırlık değerlerinde düzenli bir azalış meydana gelmiş ancak değerlerdeki bu azalış istatistiki açıdan önemsiz bulunmuştur(Çizelge 4.3.).



Şekil 4.5. Uygulanan NaCI stres faktörünün çeşitlerde yaprak taze ağırlığına etkisi

NaCI stres faktörüne yanıt olarak çeşitlerin yaprak kuru ağırlık değerlerinde meydana gelen değişimler istatiksel olarak değerlendirilmiş ve Çizelge 4.4. ve Şekil 4.6.'da verilmiştir.

Uygulamalardan sonra NaCI konsantrasyon artışına bağlı olarak çeşitlerin kuru ağırlıklarında farklılıklar olmuştur. Uygulama gruplarının yaprak kuru ağırlıkları kıyaslandığında, NaCI stresi Hazro, Aromatik-1 ve Gala çeşitlerinde yok denecek kadar önemsiz küçük değişikliklere yol açmıştır (Şekil 4.6.). Tuzluluk stresinin şiddetlenmesi (300 mM) ile kontrolleriyle karşılaştırıldıklarında Hazro, Karacadağ, Aromatik-1 ve

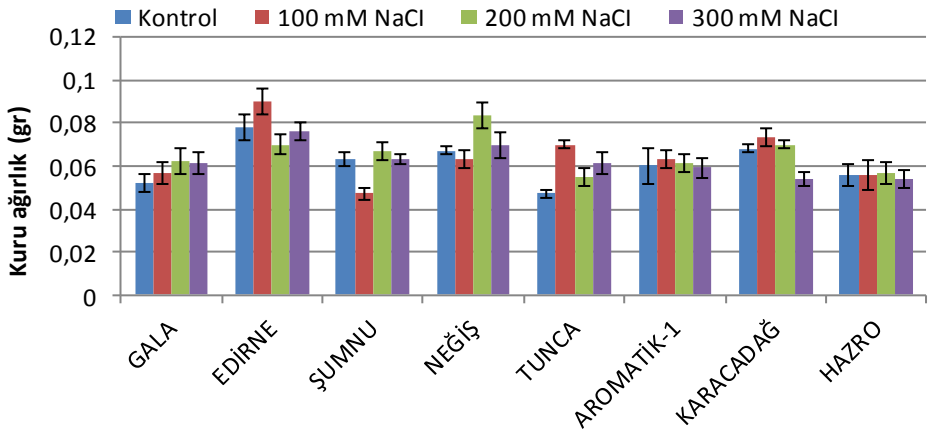
Edirne çeşitlerinin kuru ağırlığında azalma tespit edilmiş, aynı uygulamaya yanıt olarak sadece Karacadağ çeşidi için alınan değer (% 20.5) istatiksel olarak önemli bulunmuştur (Çizelge 4.4.).

Çizelge 4.4. NaCI'nin farklı konsantrasyonları ile oluşturulan stres ortamında çeşitlerin yaprak kuru ağırlıklarında meydana gelen değişimler (g)*

Çeşitler	Kontrol Ortalama	100 mM NaCI Ortalama	200 mM NaCI Ortalama	300 mM NaCI Ortalama
Gala	0.052^{a}	0.057^{a}	0.062^{a}	0.061^{a}
Edirne	0.078^{a}	0.090^{a}	0.070^{a}	0.076^{a}
Şumnu	0.063^{a}	0.047^{b}	0.067^{a}	0.063^{a}
Neğiş	0.067^{ba}	0.063^{b}	0.083^{a}	0.070^{ba}
Tunca	0.047^{c}	0.070^{a}	0.055^{cb}	0.061^{ba}
Aromatik-1	0.060^{a}	0.063^{a}	0.061^{a}	0.059^{a}
Karacadağ	0.068^{a}	0.073^{a}	0.070^{a}	0.054^{b}
Hazro	0.056^{a}	0.056^{a}	0.057^{a}	0.054^{a}

*Aynı satırda yer alan farklı harfler ortalamalar arasındaki önemi ($p \leq 0.05$) ifade etmektedir

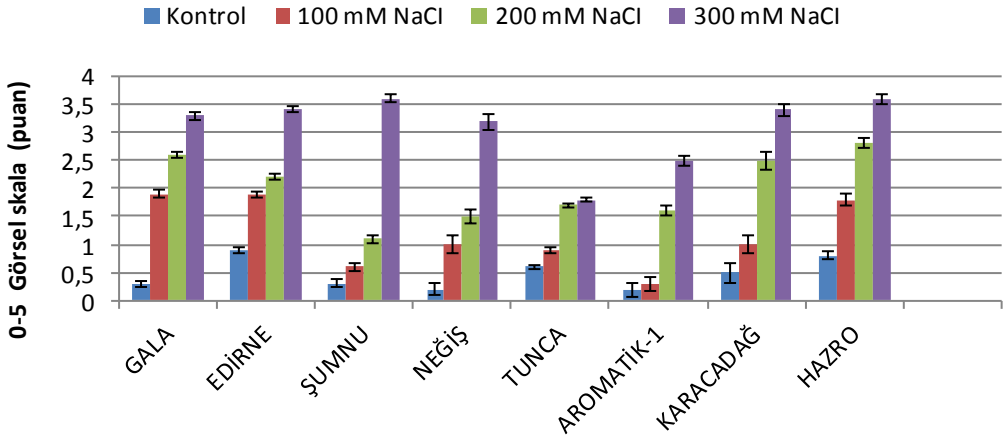
Şumnu çeşidi kendi kontrol grubundaki bitkilerle karşılaştırıldığında, en düşük konsantrasyon olan 100 mM'lik uygulama kuru ağırlığının azalmasına neden olmuş ve bu azalma istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Diğer uygulamalardan (200 ve 300 mM) elde edilen değerlerde ise artış tespit edilmiş ve belirlenen bu değerler istatistiki olarak önemli bulunmamıştır. Çizelge 4.4.'te görüldüğü gibi, Neğiş ve Tunca çeşitlerine ait değerlerdeki değişim, bazı gruplarda (100 ile 200 mM NaCI) istatiksel olarak önemli bulunmuş çünkü uygulamalara verilen yanıt birbirinden farklı olmuştur.



Şekil 4.6. Uygulanan NaCI stres faktörünün çeşitlerde yaprak kuru ağırlığına etkisi

4.4. Çeşitlerin Yapraklarında Zararlanma Derecesinin Belirlenmesi

Araştırmamızda, NaCI uygulamalarının neden olduğu gözle görülebilen morfolojik hasarlar tespit edilerek 0-5 görsel skala oluşturulmuştur (Şekil 4.7.). Tuzluluğun artışına bağlı olarak çeşitlerin stresten etkilenme dereceleri farklı bulunmuş ve gözle görünür morfolojik hasar sararma ve yapraklarda nekroz şeklinde ortaya çıkmıştır. Düşük konsantrasyon (100 mM NaCI) altında strese maruz bırakılan çeşitler 0-5 görsel skala değerlendirilmesi bakımından karşılaştırıldığında, en fazla morfolojik hasarın Gala, Edirne ve Hazro'da olduğu belirlenmiştir. 300 mM NaCI uygulaması ise sırasıyla Şumnu ve Hazro'da en fazla hasara neden olurken ikinci sırada benzer yanıtlar Karacadağ, Gala ve Edirne çeşitlerinde tespit edilmiştir. Aynı konsantrasyonda daha az etkilenenler ise Tunca ve Aromatik-1 olarak belirlenmiştir. NaCI'nin tüm konsantrasyonlarında yaprak zararlanma derecesi bakımından en az hasar Tunca çeltik çeşidinde olmuştur (Şekil 4.7.).



Şekil 4.7. Uygulanan NaCI stres faktörünün etkisiyle çeşitlerde yaprak zararlanma derecesi

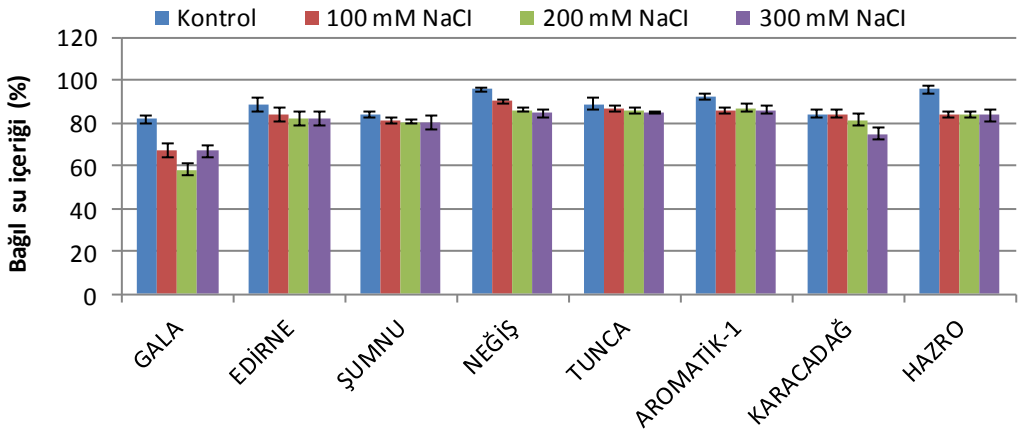
4.5. Çeşitlerde Bağıl Su İçeriklerinin Belirlenmesi (%)

Tuz uygulamalarına bağlı olarak çeşitlere ait yaprakların bağıl su içeriklerinde meydana gelen değişimler ve bunların istatistiksel verileri Çizelge 4.5.'teverilmiştir. Bağıl su içeriğine ait değerler kontrol grupları ile karşılaştırıldığında, uygulanan stres faktörüne karşı çeşitler farklı seviyelerde yanıtlar vermiş ve istatistiki açıdan değerler arasında önemli farklılıklar bulunmuştur. Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlara göre, genel olarakNaCI konsantrasyonu arttıkça tüm çeşitlerde bağıl su içeriğinin kontrol gruplarına göre azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 4.8.).

100 mM NaCI uygulamasındaki tüm çeşitler karşılaştırıldığında, % bağıl su içeriği değeri Gala çeşidinde en düşük (%67) olurken Neğiş, Tunca ve Aromatik-1'de (sırasıyla %90; %86; %85) en yüksek değerler elde edilmiştir. Yüksek tuz konsantrasyonunda (300 mM NaCI) ise en düşük bağıl su içeriğine ait değerler Gala ve Karacadağ'da (sırasıyla %66; %74); en yüksek bağıl su içeriği değerleri ise Aromatik-1 ve Tunca (sırasıyla %86; %85) çeltik çeşitlerinden alınmıştır.

Kontrol grubundaki bitkiler ile 100 mM NaCI uygulama grubundaki bitkiler karşılaştırıldığında, bu konsantrasyon Karacadağ çeşidi hariç, tüm çeşitlere ait bağıl su içeriğinde azalmaya neden olmuştur. Şekil 4.8.'de görüldüğü gibi Şumnu, Hazro, Tunca ve Aromatik-1çeşitleri için alınan değerler tüm uygulama gruplarında (100, 200 ve 300 mM) birbirine yakın bulunmuştur.

Tüm tuz uygulamalarında en az değişim ve kontrollerine yakın değerler Tunca (sırasıyla; %2.9- %3.36- %4.3 azalma) ve Şumnu (sırasıyla; %3.6- 4.02- 4.26 azalma) çeşitlerinden alındığı için bağıl su içeriği bakımından tuzluluk stresinden en az etkilenen çeşitler olarak saptanmışlardır.



Şekil 4.8. Uygulanan NaCI stres faktörünün çeşitlerde bağıl su içeriğine etkisi

Çizelge 4.5.'te verilen çeşitlere ait % azalma oranları incelendiğinde, düşük tuz konsantrasyonu olan 100 mM'de Tunca (%2.904) ve Şumnu (%3.695) çeşitlerinde azalma oranları en düşük seviyede olurken, Gala (%17.673) ve Hazro (%11.957), çeşitlerinde ise azalma oranının çok daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

Yüksek tuz konsantrasyonlarında (200 ve 300 mM) tüm çeşitler arasından en fazla % azalma oranları Gala (%18.3), Hazro (%12.3) ve Neğiş (%11.4) çeşitlerinden alınmış ve bu konsantrasyonlarda en az etkilenen çeşitlerin ise Şumnu, Aromatik-1 ve Tunca olduğu belirlenmiştir. Karacadağ çeşidi kontrolüne göre 100 ve 200 mM'lik konsantrasyonlarda (sırasıyla %+0.016 ve %-3.243) önemsiz sayılacak şekilde etkilenirken, 300 mM'lik NaCI'de bağıl su içeriği (%11.209) ani bir artış ile etkilenenler grubunda dördüncü sırada yer almıştır (Çizelge 4.5.).

Çizelge 4.5. NaCI'nin farklı konsantrasyonları ile oluşturulan stres ortamında çeşitlerin bağıl su içeriklerinde meydana gelendeğişimler (%)*

					Azalma (%)		
Çeşitler	**Kontrol Ortalama**	**100 mM NaCI Ortalama**	**200 mM NaCI Ortalama**	**300 mM NaCI Ortalama**	**Kontrol-100**	**Kontrol-200**	**Kontrol-300**
Gala	81.940^{c}	67.460^{d}	58.350^{d}	66.920^{c}	17.673	28.786	18.330
Edirne	88.820^{ba}	83.890^{cb}	81.780^{cb}	81.810^{ba}	5.542	7.922	7.884
Şumnu	83.910^{c}	80.810^{c}	80.530^{c}	80.330^{ba}	3.695	4.023	4.264
Neğiş	95.640^{a}	90.080^{a}	86.020^{ba}	84.650^{a}	5.820	10.065	11.491
Tunca	88.870^{ba}	86.290^{ba}	85.860^{ba}	85.010^{a}	2.904	3.386	4.347
Aromatik-1	92.240^{ba}	85.930^{cba}	86.750^{a}	86.100^{a}	6.844	5.948	6.659
Karacadağ	84.230^{c}	84.250^{cb}	81.500^{c}	74.790^{b}	+0.016	3.243	11.209
Hazro	95.530^{a}	84.100^{cb}	83.910^{cba}	83.730^{a}	11.957	12.162	12.351

*Aynı sütunda yer alan farklı harfler ortalamalar arasındaki önemi ($p \leq 0.05$) ifade etmektedir

4.6. Fotosentetik Pigment İçeriklerinin Belirlenmesi

Tuz stres faktörünün klorofil-a, klorofil-b, toplam klorofil ve toplam karotenoid miktarında yol açtığı değişimler Çizelge 4.6., 4.7., 4.8.ve 4.9.'da verilmiştir.

Uygulama yapılan çeşitler kendi kontrol grupları ile karşılaştırıldığında, Neğiş, Aromatik-1, Karacadağ ve Hazro çeşitlerinin **Klorofil-a içeriğine** ait değerlerde benzer artış veya azalış tespit edildiğinden istatistiki açıdan önemli bulunmamıştır.

Çizelge 4.6.'da görüldüğü gibi stres faktörüne yanıt olarak Edirne çeşidinde artan konsantrasyona bağlı olarak klorofil-a miktarındaki azalma (0.47, 0.46, 0.44, 0.42 mg g^{-1}) istatiksel olarak önemli bulunmuştur. 300 mM NaCI uygulamasında Gala çeşidinin klorofil-a miktarındaki azalma (0.34 mg g^{-1}) kontrolüne göre istatistiksel olarak önemli bulunmuştur.

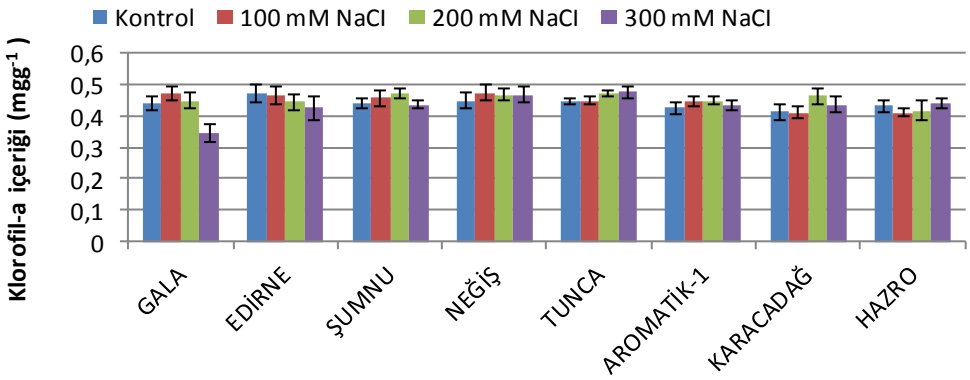
Çizelge 4.6. NaCI'nin farklı konsantrasyonları ile oluşturulan stres ortamında çeşitlerin klorofil-a içeriklerinde meydana gelen değişimler (mg g^{-1} TA)*

Çeşitler	Kontrol Ortalama	100 mM NaCI Ortalama	200 mM NaCI Ortalama	300 mM NaCI Ortalama
Gala	0.440^{a}	0.472^{a}	0.450^{a}	0.348^{b}
Edirne	0.471^{a}	0.466^{ba}	0.444^{cb}	0.425^{c}
Şumnu	0.442^{ba}	0.458^{ba}	0.475^{a}	0.437^{b}
Neğiş	0.450^{a}	0.473^{a}	0.469^{a}	0.469^{a}
Tunca	0.446^{b}	0.450^{ba}	0.472^{ba}	0.477^{a}
Aromatik-1	0.427^{a}	0.450^{a}	0.449^{a}	0.434^{a}
Karacadağ	0.413^{a}	0.412^{a}	0.464^{a}	0.437^{a}
Hazro	0.433^{a}	0.410^{a}	0.418^{a}	0.440^{a}

* Aynı satırda yer alan farklı harfler ortalamalar arasındaki önemi ($p \leq 0.05$) ifade etmektedir

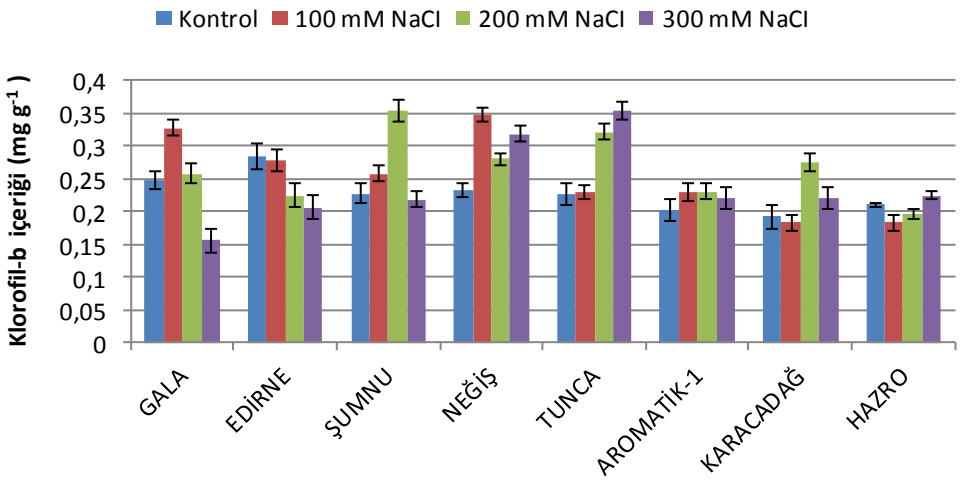
NaCI konsantrasyonunun artışına paralel olarak, Tunca çeşidinin klorofil-a içeriği için elde edilen değerlerde düzenli bir artış tespit edilmesine rağmen bu artış kendi aralarında istatistiki olarak önemli bulunmamıştır. Buna karşın gruplar ayrı ayrı kontrol ile kıyaslandığında, sadece 300 mM NaCI grubu arasındaki fark önemli bulunmuştur (Çizelge 4.6.).

Gala çeşidi 300 mM NaCI'de kontrolüne göre %20'lik azalma, Karacadağ ise 200 mM'da kendi kontrolüne göre %12'lik artma ile klorofil-a içeriği için en yüksek artış ve azalış oranları belirlenmiştir (Şekil 4.9.).



Şekil 4.9. Uygulanan NaCI stres faktörünün çeşitlerin klorofil-a içeriğine etkisi

Çeşitlerin **klorofil-b içeriği** değerlendirildiğinde; Neğiş, Aromatik-1 ve Hazro çeşitleri için tüm uygulamalardan elde edilen değerler kendi grupları içerisinde benzer olduğundan, istatistiki açıdan fark bulunmamıştır (Çizelge 4.7.). NaCI konsantrasyonu arttıkça Edirne çeşidinin klorofil-b miktarında kontrolüne göre düzenli bir azalış, Tunca çeşidinde ise artış gözlenmiştir (Şekil 4.10.).



Şekil 4.10. Uygulanan NaCI stres faktörünün çeşitlerin klorofil-b içeriğine etkisi

En düşük tuz uygulaması olan 100 mM NaCI'de Gala, Şumnu, Neğiş, Tunca ve Aromatik-1 çeşitlerinin klorofil-b içeriğinde kontrollerine göre artış kaydedilmiş ve bu artış sadece Gala çeşidinde istatiksel olarak önemli bulunmuştur (Çizelge 4.7.).

200 mM NaCI'de Edirne ve Karacadağ dışındaki tüm çeşitlerde klorofil-b içeriğine ait veriler kendi kontrol grupları ile karşılaştırıldığında istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur.

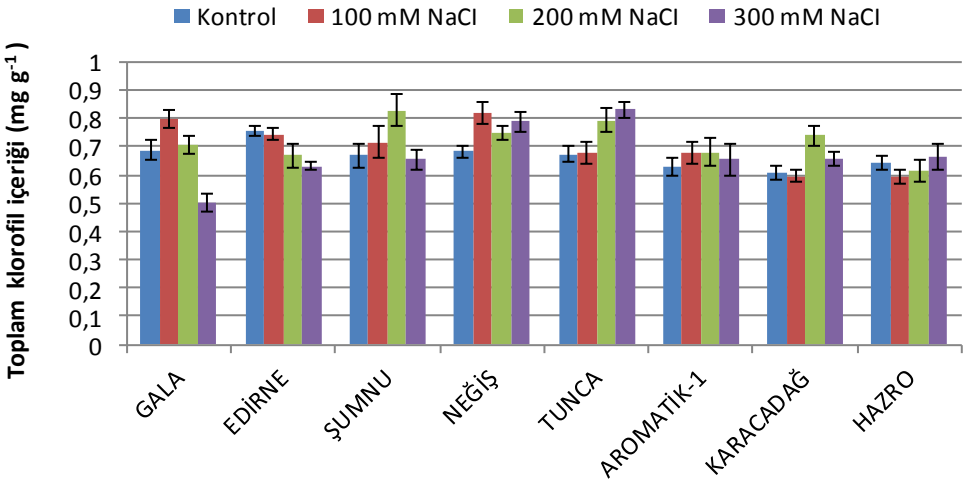
300 mM'lik tuz stresi etkisiyle Gala, Edirne ve Şumnu'da klorofil-b miktarında kontrole göre azalış, diğer çeşitlerde ise artış olduğu belirlenmiştir. Ayrıca aynı uygulamada Tunca, Gala ve Edirne dışındaki tüm çeşitlerde klorofil-b içeriğine ait veriler kendi kontrol grupları ile karşılaştırıldığında istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur.

Çizelge 4.7. NaCI'nin farklı konsantrasyonları ile oluşturulan stres ortamında çeşitlerin klorofil-b içeriklerinde meydana gelen değişimler (mg g^{-1} TA)*

Çeşitler	Kontrol Ortalama	100 mM NaCI Ortalama	200 mM NaCI Ortalama	300 mM NaCI Ortalama
Gala	0.248^{b}	0.328^{a}	0.258^{b}	0.156^{c}
Edirne	0.284^{a}	0.278^{a}	0.225^{b}	0.206^{b}
Şumnu	0.227^{ba}	0.258^{ba}	0.355^{a}	0.218^{b}
Neğiş	0.233^{a}	0.347^{a}	0.280^{a}	0.319^{a}
Tunca	0.227^{b}	0.230^{b}	0.322^{ba}	0.354^{a}
Aromatik-1	0.203^{a}	0.229^{a}	0.231^{a}	0.220^{a}
Karacadağ	0.192^{b}	0.183^{b}	0.276^{a}	0.221^{ba}
Hazro	0.211^{a}	0.183^{a}	0.197^{a}	0.225^{a}

* Aynı satırda yer alan farklı harfler ortalamalar arasındaki önemi ($p \leq 0.05$) ifade etmektedir

NaCI stres faktörüne maruz bırakılmış çeltik çeşitlerinin **toplam klorofil içeriği** değerlendirildiğinde; Neğiş, Aromatik-1 ve Hazro çeşitlerindeküçük oranda artış veya azalış olmuş ancak istatistiki olarak önemli bulunmamıştır (Çizelge 4.8.).



Şekil 4.11. Uygulanan NaCI stres faktörünün çeşitlerin toplam klorofil içeriğine etkisi

Tuz konsantrasyonu arttıkça Edirne çeşidinin toplam klorofil içeriğinde düzenli bir azalış, Tunca çeşidinde ise düzenli bir artış kaydedilmiştir (Şekil 4.11.). Kontrol ve

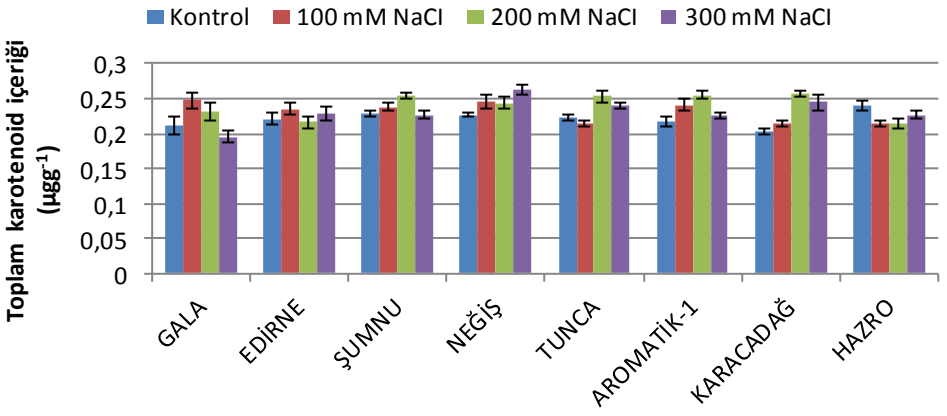
100 mM'lik uygulama grubundan alınan sonuçlar Edirne çeşidi için istatistiksel açıdan anlamsız bulunmuş ancak konsantrasyon arttıkça (200 ve 300 mM) azalan değerler arasındaki fark kontrole göre anlamlı bulunmuştur. Bununla birlikte kontrol grupları ile kıyaslandığında, 100 mM uygulama grubunda Gala, 200 mM uygulama grubunda ise Edirne ve Karacadağ çeşitlerindeki toplam klorofil içeriği istatistiki açıdan önemli bulunmuştur (Çizelge 4.8.).

Çizelge 4.8. NaCI'nin farklı konsantrasyonları ile oluşturulan stres ortamında çeşitlerin toplam klorofil içeriklerinde meydana gelen değişimler (mg g^{-1} TA)*

Çeşitler	Kontrol Ortalama	100 mM NaCI Ortalama	200 mM NaCI Ortalama	300 mM NaCI Ortalama
Gala	0.689^{b}	0.799^{a}	0.708^{b}	0.504^{c}
Edirne	0.755^{a}	0.744^{a}	0.669^{b}	0.632^{b}
Şumnu	0.669^{ba}	0.716^{ba}	0.830^{a}	0.656^{b}
Neğiş	0.683^{a}	0.820^{a}	0.748 ^{a}	0.789^{a}
Tunca	0.673^{b}	0.681^{b}	0.795 ^{ba}	0.831^{a}
Aromatik-1	0.631^{a}	0.680^{a}	0.680^{a}	0.654^{a}
Karacadağ	0.605^{b}	0.596^{b}	0.740 ^{a}	0.658^{ba}
Hazro	0.645^{a}	0.593^{a}	0.615^{a}	0.665^{a}

*Aynı satırda yer alan farklı harfler ortalamalar arasındaki önemi ($p \leq 0.05$) ifade etmektedir

Çalışmamızda, uygulama ve kontrol grupları karşılaştırıldığında, **toplam karotenoid içeriğ**inde istatistiki açıdan farklar önemli bulunmuştur. Tuz stresi koşullarında Edirne, Neğiş ve Aromatik-1 çeşitlerindeki toplam karotenoid miktarları tüm uygulamalarda istatistiki açıdan benzer bulunmuştur (Çizelge 4.9. ve Şekil 4.12.).



Şekil 4.12. Uygulanan NaCI stres faktörünün çeşitlerin toplam karotenoid içeriğine etkisi

Edirne, Neğiş, Şumnu, Tunca ve Aromatik-1 çeşitlerinin 100 ve 300 mM NaCI uygulama grupları kendi kontrolleri ile karşılaştırıldığında, toplam karotenoid içeriği yönünden oluşan fark istatistiki olarak önemli görülmemiştir.

Hazro çeşidinin toplam karotenoid içeriği uygulamaların tümünde kendi kontrolüne göre azalmıştır. Değerlerdeki bu azalma 100 ve 200 mM'lik uygulamalarda istatiksel olarak anlamlı görülürken, 300mM uygulama grubunda fark anlamsız bulunmuştur (Çizelge 4.9.).

100 mM'de kontrole göre azalma oranı Tunca çeşidinde %3.462, Hazro'da ise %10.307 olarak belirlenmiştir. Ayrıca aynı konsantrasyonda, toplam karotenoid miktarının en yüksek % artış oranı Gala ve Aromatik-1 (sırasıyla %17.669; 11.080) çeşitlerinde olmuştur. 300 mM tuz uygulamasında en yüksek artış yüzdesi Karacadağ, en düşüğü ise Edirne çeşidinde olmuştur.

Sonuç olarak, çalışmamızda kullanılan tüm çeltik çeşitlerinde fotosentetik pigment içeriklerinin (klorofil-a ve klorofil-b, toplam klorofil, toplam karotenoid) uygulanan NaCI konsantrasyonuna bağlı olarak değişkenlik gösterdiği belirlenmiştir.

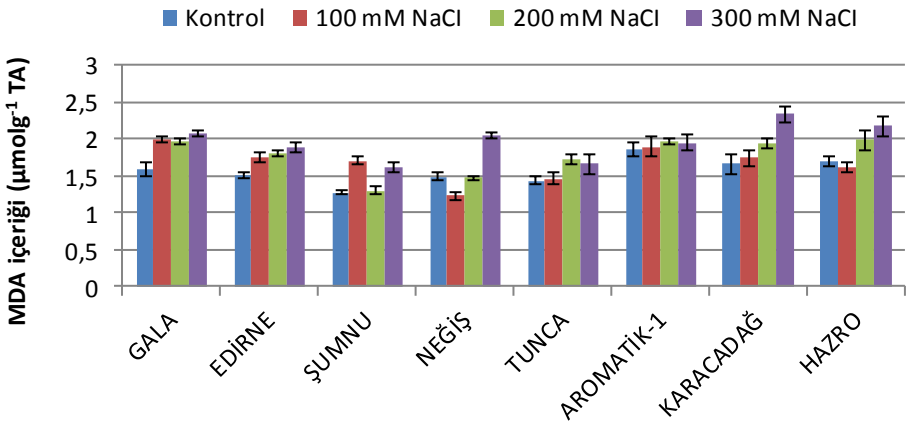
Çizelge 4.9. NaCI'nin farklı konsantrasyonları ile oluşturulan stres ortamında çeşitlerin toplam karotenoid içeriklerinde meydana gelen değişimler (µg g^{-1} TA)*

					Azalma (%)		
Çeşitler	**Kontrol Ortalama**	**100 mM NaCI Ortalama**	**200 mM NaCI Ortalama**	**300 mM NaCI Ortalama**	**Kontrol-100**	**Kontrol-200**	**Kontrol-300**
Gala	0.211^{cb}	0.248^{a}	0.231^{ba}	0.195^{c}	+17.66	+9.66	7.437
Edirne	0.221^{a}	0.235^{a}	0.216^{a}	0.229^{a}	+4.75	3.64	+1.77
Şumnu	0.228^{b}	0.238^{b}	0.254^{a}	0.227^{b}	+4.24	+11.33	0.349
Neğiş	0.227^{a}	0.246^{a}	0.244^{a}	0.263^{a}	+8.45	+7.57	+15.84
Tunca	0.222^{ba}	0.214^{b}	0.253^{a}	0.241^{ba}	3.46	+13.98	+8.45
Aromatik-1	0.217^{a}	0.241^{a}	0.255^{a}	0.227^{a}	+11.08	+17.24	+4.78
Karacadağ	0.203^{c}	0.215^{cb}	0.256^{a}	0.245^{ba}	+6.006	+26.29	+20.97
Hazro	0.240^{a}	0.215^{b}	0.215^{b}	0.227^{ba}	10.30	10.43	5.52

*Aynı satırda yer alan farklı harfler ortalamalar arasındaki önemi ($p \leq 0.05$) ifade etmektedir

4.7. Çeşitlerde Lipid Peroksidasyonu Derecesinin Belirlenmesi

Çalışmamızda, tuz stresi faktörü altında bitkilerin hücre membranında meydana gelen hasar; lipid peroksidasyonunun bir ürünü olan MDA miktarı ölçülerek belirlenmiştir. Tuz stresinin etkisiyle çeşitlerin MDA içeriğindeki değişimler Şekil 4.13. ve Çizelge 4.10.'da verilmiştir.



Şekil 4.13. Uygulanan NaCI stres faktörünün çeşitlerin MDA içeriğine etkisi

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, genel olarak stres faktörünün çeşitlerin MDA içeriğinde artışa yol açtığı ve gruplar arasında istatistiki açıdan önemli farklılıklar olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.10.). Edirne ve Karacadağ çeşitlerinde tuzluluk (NaCI) şiddetinin artışına bağlı olarak MDA miktarında düzenli bir artış görülmüştür. 300 mM'lik uygulamanın bitkilerin çoğunun MDA düzeylerinde artışa yol açtığı tespit edilmiştir. Bu konsantrasyonda MDA artışının (%) en fazla olduğu çeşitler sırasıyla Karacadağ (%40.6), Neğiş (%37.6), Gala (%29.6) ve Hazro (%27.5) olarak belirlenmiştir. Sonuçta tuzluluğun çeşitlerin hücre zarında farklı oranlarda zarara neden olduğu belirlenmiştir. µmol g^{-1}

Çizelge 4.10.'da verildiği gibi en düşük konsantrasyon olan 100 mM'de MDA miktarının en yüksek olduğu çeşit Şumnu (%34.4) ve Gala (%24.9) olarak belirlenmiştir. Hazro ve Neğiş çeşitleri ise 100 mM'lik uygulamaya diğer çeşitlerden çok daha farklı yanıt vermiştir. NaCI'nin en düşük uygulamasında söz konusu çeşitlerin MDA miktarında kontrollerine göre belirgin bir düşüş kaydedilmiştir (sırasıyla % 5.0-17.3). Sonuç olarak kontrol ile kıyaslandığında, en düşük konsantrasyonda en fazla

etkilenen çeşitlerin Şumnu ve Gala olduğu belirlenmiştir. Yüksek konsantrasyon olan 300 mM'de ise en çok etkilenen çeşitler Karacadağ, Neğiş ve Gala, en az etkilenenler ise Tunca ve Aromatik-1 çeşitleri olmuştur.

Çizelge 4.10. NaCI'nin farklı konsantrasyonları ile oluşturulan stres ortamında çeşitlerin MDA miktarında meydana gelen değişimler (μmol g^{-1} TA)*

					Azalma (%)		
Çeşitler	**Kontrol Ortalama**	**100 mM NaCI Ortalama**	**200 mM NaCI Ortalama**	**300 mM NaCI Ortalama**	**Kontrol-100**	**Kontrol-200**	**Kontrol-300**
Gala	1.594^{cba}	1.991^{a}	1.968^{a}	2.066^{ba}	+24.924	+23.463	+29.611
Edirne	1.506^{cb}	1.746^{ba}	1.794^{ba}	1.879^{cb}	+15.936	+19.123	+24.787
Şumnu	1.268^{c}	1.705^{ba}	1.301^{c}	1.612^{c}	+34.413	+2.569	+27.114
Neğiş	1.484^{cb}	1.226^{c}	1.471^{cb}	2.043^{ba}	17.377	0.902	+37.623
Tunca	1.436^{cb}	1.456^{cb}	1.718^{ba}	1.663^{c}	+1.343	+19.628	+15.772
Aromatik-1	1.859^{a}	1.892^{ba}	1.958^{a}	1.948^{cb}	+1.796	+5.308	+4.770
Karacadağ	1.656^{ba}	1.739^{ba}	1.940^{a}	2.328^{a}	+5.030	+17.149	+40.622
Hazro	1.702^{ba}	1.616^{cba}	1.977^{a}	2.170^{ba}	5.011	+16.175	+27.538

*Aynı sütunda yer alan farklı harfler ortalamalar arasındaki önemi ($p \leq 0.05$) ifade etmektedir

4.8. Tolerant ve Hassas Çeltik Çeşitlerinde Yapılan Analizler

Çalışmada, NaCI ile oluşturulan stres faktörünün çeşitler üzerindeki etkisini tespit etmek amacıyla "sürgün boyu-kök uzunluğu, yaprak taze-kuru ağırlığı, yapraklardaki zararlanma durumu, bağıl su içerikleri, fotosentetik pigment içerikleri ve lipid peroksidasyonu derecesi" analizlerinin değerlendirilmesi sonucunda;

- Tuz tolerans derecesi bakımından basit fakat etkili bir kriter olan y*aprak zararlanma durumu* değerlendirildiğinde, stres faktöründen Aromatik-1 ve Tunca çeşidinin fazla etkilenmediği, aksine Gala, Şumnu ve Karacadağ'ın en çok etkilenen çeşitler olduğu belirlenmiştir.
- *Bağıl su içeriği* yönünden en az etkilenenler Şumnu, Tunca ve Aromatik-1, en çok etkilenenler ise Gala ve Karacadağ olmuştur.
- Duyarlı ve toleranslı çeşitlerin seçilmesinde kullanılan fakat yeterli görülmeyen bir parametre olan *fotosentetik pigment içerikleri* yönünden en az etkilenen Aromatik-1 ve Hazro en çok etkilenen Gala ve Karacadağ olmuştur.
- Çalışmamızda, tuzluluk stresine bağlı olarak uygulama bitkilerinde MDA miktarında artış gözlenmiş ve hücre zarı hasarına yol açan lipid peroksidasyon derecesi bu anlamda en etkili bir gösterge olarak belirlenmiştir. Çalışmada, *lipid peroksidasyonu* yönünden en az etkilenenler Tunca ve Aromatik-1 en çok etkilenenler ise Gala, Karacadağ ve Hazro olarak belirlenmiştir.

Tuzluluğa karşı hassas veya tolerant olan çeşitlerin seçimi için yapılan analizler sonucunda çeşitler arasında, 8 çeşit içerisinden (Gala, Edirne, Şumnu, Neğiş, Tunca, Aromatik-1, Karacadağ, Hazro) **Gala** ve **Karacadağ** hassas, **Tunca** ve **Aromatik-1** çeşitleri ise tolerant olarak seçilmiştir.

Hassas ve tolerant olduğu düşünülen bu çeşitlerde prolin içeriği, antioksidan enzim aktivitesi, ROT söndürme aktivitesi, H_2O_2 içeriği ve SDS-PAGE tekniği ile protein analizleri yapılarak tuz stres faktörü altında hassas ve tolerant çeşitlerin vermiş oldukları yanıtlar araştırılmıştır.

4.8.1. Prolin İçeriğinin Belirlenmesi

Çeşitli çevresel strese maruz kalan bitkilerde biriken prolin, hassas veya tolerant seviyesinin belirlenmesinde yaygın bir deneysel parametre olarak kullanılan

ozmolitlerden bir tanesidir. Stres koşullarında bitkiye direnç yeteneği sağlayan prolin, genellikle dokularda farklı oranlarda miktarı artan ve suda çözünebilir bir aminoasittir. Bu nedenle bitkisel dokularda prolin birikimi söz konusu bitkinin stresten etkilendiğini gösteren bir parametre olarak kabul edilir.

Oluşturulan tuz stresi ortamında çeşitlerin prolin içeriğinde meydana gelen değişimler Çizelge 4.11. ve Şekil 4.14.'te gösterilmiştir.

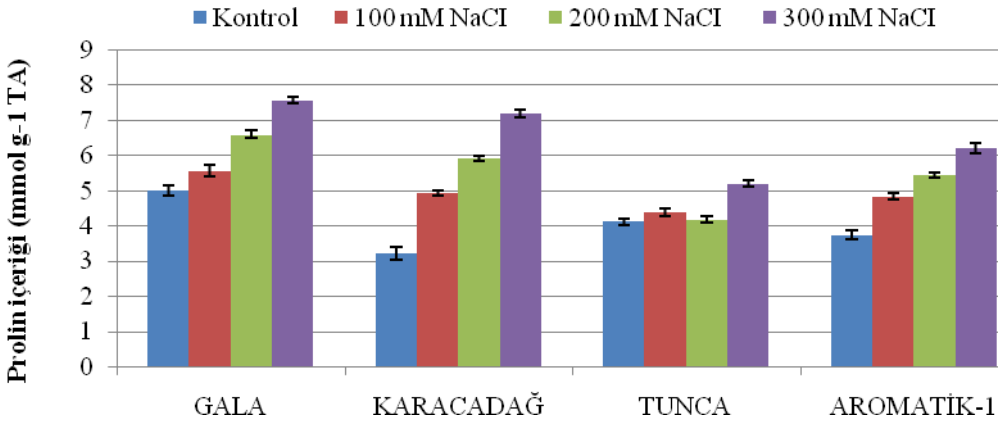
Çizelge 4.11. NaCI'nin farklı konsantrasyonları ile oluşturulan stres ortamında çeşitlerin prolin içeriklerinde meydana gelen değişimler (mmol g^{-1} TA)*

Çeşitler	Kontrol Ortalama	100 mM NaCI Ortalama	200 mM NaCI Ortalama	300 mM NaCI Ortalama
Gala	5.007^{d}	5.573^{c}	6.600^{b}	7.570^{a}
Karacadağ	3.212^{d}	4.937^{c}	5.910^{b}	7.204^{a}
Tunca	4.119^{b}	4.386^{b}	4.185^{b}	5.204^{a}
Aromatik-1	3.746^{d}	4.838^{c}	5.434^{b}	6.214^{a}

* Aynı satırda yer alan farklı harfler ortalamalar arasındaki önemi ($p \leq 0.05$) ifade etmektedir

Çizelge 4.11'de verilen değerlere göre, çeşitlerin içerdiği prolin miktarlarında konsantrasyon ve genotipe bağlı olarak kontrol gruplarına kıyasla farklı oranlarda artışlar gözlenmiştir.

Kontrol grubundaki bitkilerle karşılaştırıldığında, Gala, Karacadağ ve Aromatik-1 çeşitlerinin prolin miktarındaki artış değerleri istatistiksel olarak önemli bulunurken, Tunca çeşidinde 300 mM'lik uygulama hariç gruplar arasında istatistiki fark bulunmamıştır. Bununla birlikte Gala ve Karacadağ çeşitlerindeki prolin birikim oranı Tunca ve Aromatik-1'dekine göre daha fazla bulunmuştur (Şekil 4.14.). Uygulamaların tümünde en yüksek prolin miktarı Gala (sırasıyla; 5.57 - 6.6 ve 7.57 mmol g^{-1}) en düşük ise Tunca çeşidinde (sırasıyla; 4.38 - 4.18 ve 5.20 mmol g^{-1}) olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.11.).



Şekil 4.14. NaCl stres faktörünün etkisiyle çeşitlerin prolin içeriğindeki değişimler

4.8.2. Toplam Çözünebilir Protein Miktarının Belirlenmesi

Tuz stresi koşullarında hücreye fazla miktarda giren Na^+ ve Cl^- iyonları proteinlerin yapılarında biçimsel değişikliklere yol açar. 100, 200, 300 mM NaCl uygulamalarının çeşitlere ait protein içeriğinde meydana getirdiği değişimler kontrol grupları ile birlikte Şekil 4.15. ve Çizelge 4.12.'de gösterilmiştir.

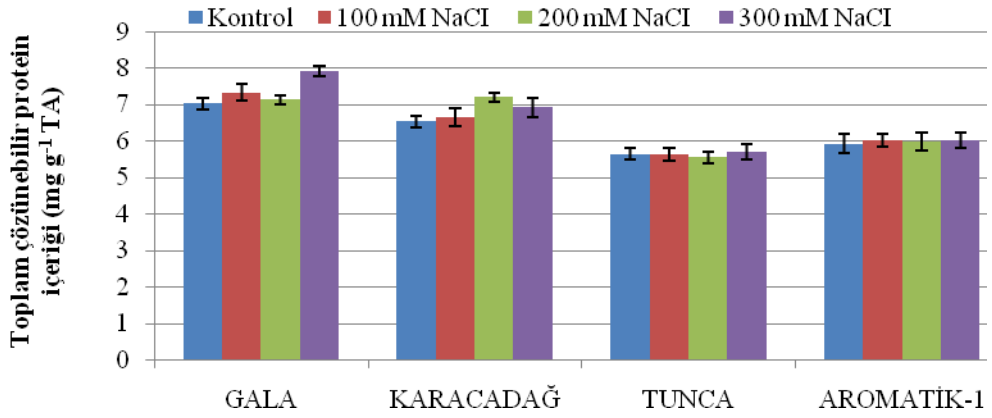
Çizelge 4.12. NaCl'nin farklı konsantrasyonları ile oluşturulan stres ortamında çeşitlerin toplam çözünebilir protein içeriklerinde meydana gelen değişimler (mg g^{-1} TA)*

Çeşitler	Kontrol Ortalama	100 mM NaCl Ortalama	200 mM NaCl Ortalama	300 mM NaCl Ortalama
Gala	7.02[a]	7.32[a]	7.12[a]	7.92[a]
Karacadağ	6.53[a]	6.65[a]	7.19[a]	6.92[a]
Tunca	5.64[a]	5.63[a]	5.55[a]	5.70[a]
Aromatik-1	5.92[a]	6.02[a]	5.99[a]	6.01[a]

*Aynı satırda yer alan farklı harfler ortalamalar arasındaki önemi ($p \leq 0.05$) ifade etmektedir

Çizelge 4.12'de görüldüğü gibi, uygulamalara bağlı olarak çeşitlerin protein miktarında farklı oranlarda artış ve azalış olmasına rağmen değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($p \leq 0.05$). Gala ve Karacadağ çeşitlerinde protein artışı Tunca ve Aromatik-1'e göre daha fazla bulunmuştur (Şekil 4.15.). Kontrol grupları ile karşılaştırıldığında, 100 mM NaCl'de en yüksek artış yüzdesi %4.3 ile Gala çeşidinde, %0.15'lik bir azalma ise Tunca'da olmuştur. 300 mM'de ise en yüksek artış

yine Gala çeşidinde (%12.9) gözlenirken aynı konsantrasyonda en düşük artış Tunca'da (%1.06) olmuştur.



Şekil 4.15. NaCI stres faktörünün etkisiyle çeşitlerin toplam çözünebilir protein içeriğindeki değişimler

4.8.3. Antioksidan Enzim Aktivitelerinin İncelenmesi

4.8.3.1. CAT Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

CAT sitosol, mitokondri, kloroplast ve peroksizomlarda oluşan H_2O_2'yi uzaklaştırmada rol alan önemli bir antioksidan savunma sistemi enzimlerinden bir tanesi olduğu bildirilmiştir (Miller ve ark. 2010).

NaCI'nin farklı konsantrasyonunu içeren ortamlarda bitki yapraklarında CAT enzim aktivitelerinde meydana gelen değişiklikler Çizelge 4.13**.** ve Şekil 4.16.'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.13. NaCI'nin farklı konsantrasyonları ile oluşturulan stres ortamında çeşitlerin katalaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişimler (U mg^{-1} protein TA)*

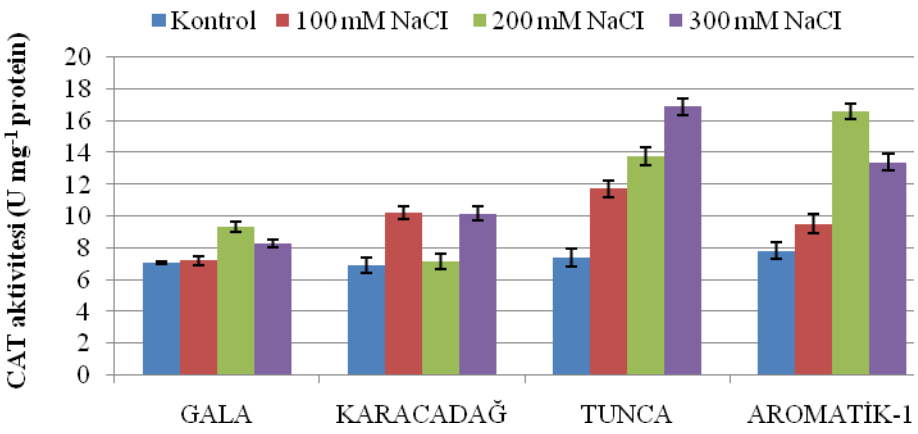
Çeşitler	Kontrol Ortalama	100 mM NaCI Ortalama	200 mM NaCI Ortalama	300 mM NaCI Ortalama
Gala	7.10^{b}	7.23^{b}	9.38^{a}	8.29^{b}
Karacadağ	6.92^{b}	10.22^{a}	7.14^{b}	10.20^{a}
Tunca	7.44^{a}	11.75^{b}	13.77^{c}	16.90^{d}
Aromatik-1	7.86^{c}	9.52^{c}	16.61^{a}	13.41^{b}

*Aynı satırda yer alan farklı harfler ortalamalar arasındaki önemi ($p \leq 0.05$) ifade etmektedir

Şekil 4.16.'da görüldüğü gibi NaCI konsantrasyonu arttıkça çeşitlere ait CAT aktivitelerinde kontrol grubuna göre artış tespit edilmiştir. Konsantrasyon artışına bağlı olarak Gala ve Karacadağ çeşitlerinde CAT aktivitesindeki artış veya azalış, Tunca ve Aromatik-1 çeşitlerine göre daha az olmuştur.

200 mM NaCI uygulaması ile Gala çeşidinde CAT enzim aktivitesinin en yüksek değeri (9.38 U mg^{-1} protein) elde edilmiş ve istatistiki olarak önemli bulunmuştur. Oysa 300 mM'de enzim aktivitesinde tekrar bir düşüş gözlenmiş ve kontrol grubu ile aralarındaki fark önemsiz bulunmuştur.

Tunca çeşidinde konsantrasyon arttıkça CAT aktivitesinde düzenli bir artış gözlenmiş (Çizelge 4.13.) ve uygulamalardan elde edilen CAT aktivitesi sonuçları istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p \leq 0.05$). Çeşitler karşılaştırıldığında en fazla artış Tunca için 300 mM, Aromatik-1 çeşidi için ise 200 mM'lik uygulamalardan alınmıştır. Kontrollerine göre en düşük enzim aktivitesi Gala çeşidinin 100 mM uygulamasından alınırken benzer sonuçlar 200 mM uygulama yapılan Karacadağ çeşidinde olmuştur.

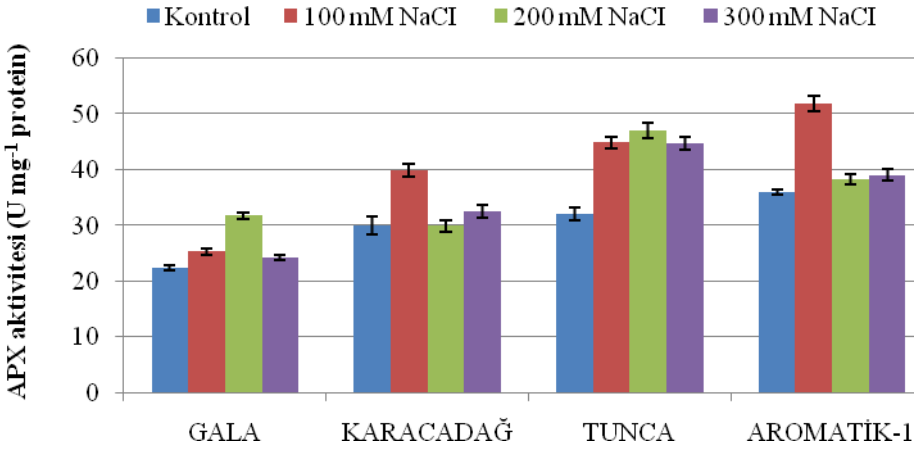


Şekil 4.16. NaCI stres faktörünün etkisiyle çeşitlerin CAT enzim aktivitesindeki değişimler

4.8.3.2. APX Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Uygulama yapılan çeşitlerin APX enzim aktivite sonuçları değerlendirilmiş ve tuz seviyeleri ile çeşitler arasındaki istatistiki farklar ($p \leq 0.05$) Çizelge 4.14.'te gösterilmiştir.

APX enzim aktiviteleri incelendiğinde; 52.0 U mg^{-1} protein değeri ile en yüksek miktar Aromatik-1 çeşidinin 100 mM NaCI seviyesinde ve bunu takiben sırasıyla Tunca'nın 200 mM ve 100 mM NaCI (sırasıyla; 47.0 ve 44.9 U mg^{-1} protein) uygulamalarından elde edilmiştir (Şekil 4.17.).



Şekil 4.17. NaCI stres faktörünün etkisiyle çeşitlerin APX enzim aktivitesindeki değişimler

Karacadağ hariç diğer çeşitlerde APX enzim aktivitelerine ait sonuçlar kontrollerine göre daha yüksek bulunmuştur. Uygulamalara yanıt olarak Karacadağ çeşidinin APX enzim aktivitesinde değişen artışlar olmasına rağmen veriler arasındaki fark önemli bulunmamaıştır. Çeşitler kendi aralarında karşılaştırıldığında, 200 mM NaCI seviyesi hariç en düşük APX aktivite değerleri Gala çeşidinden elde edilmiştir (Çizelge 4.14).

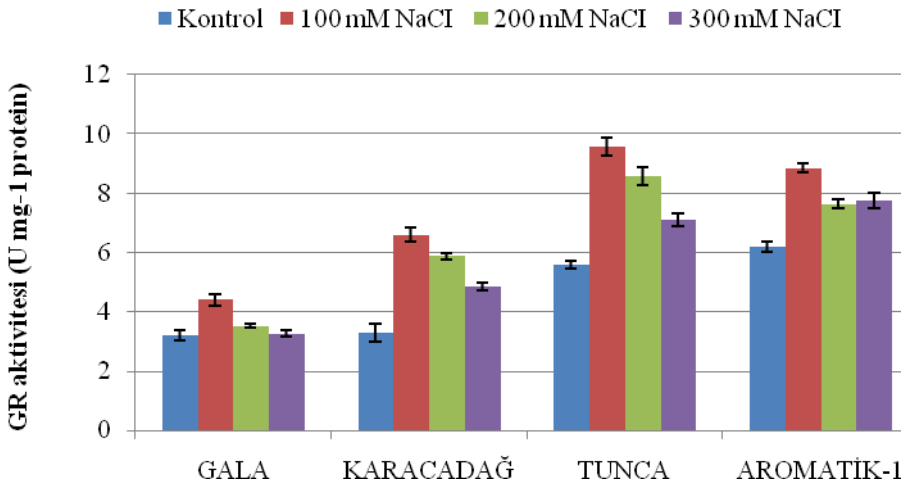
Çizelge 4.14. NaCI'nin farklı konsantrasyonları ile oluşturulan stres ortamında çeşitlerin askorbat peroksidaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişimler (U mg^{-1}protein TA)*

Çeşitler	Kontrol Ortalama	100 mM NaCI Ortalama	200 mM NaCI Ortalama	300 mM NaCI Ortalama
Gala	22.40^{d}	25.35^{b}	31.78^{a}	24.23^{c}
Karacadağ	29.99^{a}	39.94^{a}	29.97^{a}	32.57^{a}
Tunca	32.15^{c}	44.90^{b}	47.05^{a}	44.79^{b}
Aromatik-1	35.98^{a}	52.00^{a}	38.34^{a}	39.09^{a}

*Aynı satırda yer alan farklı harfler ortalamalar arasındaki önemi ($p \leq 0.05$) ifade etmektedir

4.8.3.3. GR Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Hassas ve tolerant olarak seçilen çeşitlerde GR enzim aktivitesine ilişkin veriler incelendiğinde; tüm uygulamalarda Tunca ve Aromatik-1 çeşitlerinin Gala ve Karacadağ'a göre daha yüksek değerlere sahip olduğu görülmektedir (Şekil 4.18.).



Şekil 4.18. NaCI stres faktörünün etkisiyle çeşitlerin GR enzim aktivitesindeki değişimler

100 mM NaCI stres uygulamaları çeşitlerin tümünde GR enzim aktivitesinde hızlı bir artışa neden olmuş ancak diğer uygulama gruplarında (200 ve 300 mM) Aromatik-1 çeltik çeşidi hariç konsantrasyon artışına paralel olarak düşüş gözlenmiştir (Çizelge 4.15.).

Çizelge 4.15. NaCI'nin farklı konsantrasyonları ile oluşturulan stres ortamında çeşitlerin glutatyon redüktaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişimler (U mg^{-1}protein TA)*

Çeşitler	Kontrol Ortalama	100 mM NaCI Ortalama	200 mM NaCI Ortalama	300 mM NaCI Ortalama
Gala	3.20^{a}	4.40^{a}	3.52^{a}	3.26^{a}
Karacadağ	3.30^{b}	6.60^{a}	5.88^{ba}	4.86^{ba}
Tunca	5.60^{b}	9.57^{a}	8.57^{ba}	7.10^{ba}
Aromatik-1	6.20^{a}	8.85^{a}	7.63^{a}	7.75^{a}

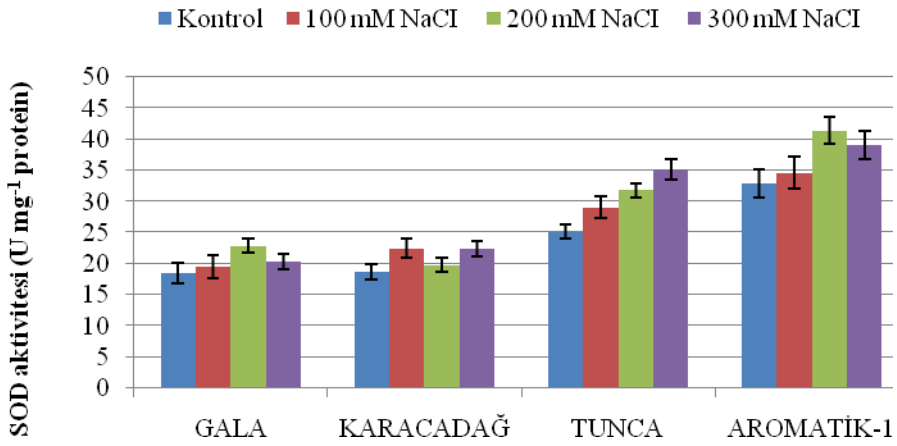
*Aynı satırda yer alan farklı harfler ortalamalar arasındaki önemi ($p \leq 0.05$) ifade etmektedir

GR aktivitesi bakımından gruplar arasından en yüksek değer Tunca çeşidinin 100 mM NaCl (9.57 U mg^{-1} protein) grubunda olmuş ve bunu 8.85 U mg^{-1} protein

aktivite değeri ile Aromatik-1 çeşidinin aynı uygulaması takip etmiştir. Buna karşın, GR enzim aktivitesi için en düşük değer 3.26 U mg^{-1}ile Gala çeşidinin 300 mM NaCI uygulamasında olmuş ve gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur.

4.8.3.4. SOD Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

NaCI'nin farklı konsantrasyonlarını içeren ortamda yetiştirilen bitkilerin SOD aktivite değerlerinde oluşan değişiklikler kontrol grubu ile birlikte Çizelge 4.16. ve Şekil 4.19.'da verilmiştir.



Şekil 4.19. NaCI stres faktörünün etkisiyle çeşitlerin SOD enzim aktivitesindeki değişimler

Kontrol grubundaki bitkilerle karşılaştırıldığında, tuzluluğun SOD enzim aktivitesi üzerine etkisinin önemli olduğu ve konsantrasyon artışı ile enzim aktivitesinde de artış olduğu belirlenmiştir.

Düşük tuz konsantrasyonunda (100 mM) kontrol grubuna göre, SOD aktivite değerinde artış görülmesine rağmen Gala ve Aromatik-1 çeşitlerinde bu değerler istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. Tunca'da ise enzim aktivite değerleri tüm uygulamalarda konsantrasyon artışına paralel olarak düzenli bir artış göstermiş ve istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur (Çizelge 4.16.).

Çizelge 4.16. NaCI'nin farklı konsantrasyonları ile oluşturulan stres ortamında çeşitlerin süperoksit dismutaz enzim aktivitelesinde meydana gelen değişimler (U mg^{-1} protein TA)*

Çeşitler	Kontrol Ortalama	100 mM NaCI Ortalama	200 mM NaCI Ortalama	300 mM NaCI Ortalama
Gala	18.490[b]	19.590[b]	22.881[a]	20.361[b]
Karacadağ	18.710[b]	22.511[a]	19.798[b]	22.440[a]
Tunca	25.130[d]	29.060[c]	31.868[b]	35.269[a]
Aromatik-1	32.920[c]	34.648[c]	41.440[a]	39.040[b]

* Aynı satırda yer alan farklı harfler ortalamalar arasındaki önemi ($p \leq 0.05$) ifade etmektedir

Uygulamalarda en yüksek SOD aktivite değeri Aromatik-1 çeşidinde tespit edilmiştir. 100 ve 300 mM'de en düşük değer Gala çeşidinde, benzer sonuç ise Karacadağ çeşidinin 200 mM uygulamasından alınmıştır. Dolayısıyla, diğer antioksidan enzim aktivitelerinde olduğu gibi SOD için en düşük aktivite değerleri Gala ve Karacadağ çeşitlerinde, en yüksek değerler ise Aromatik-1 çeltik çeşidinde belirlenmiştir.

4.9. ROT Aktivitesinin İncelenmesi

4.9.1. $O_2^{\cdot -}$ Radikali Söndürme Aktivitesinin İncelenmesi

Çizelge 4.17.'de verildiği gibi en yüksek $O_2^{\cdot -}$ radikali giderme aktivitesi Aromatik-1 çeşidinin 200 mM NaCI uygulamasının 20 µg ml^{-1} konsantrasyonunda (%97.12) olmuştur. 100 mM NaCI uygulamasında Karacadağ çeşidinin 4 µg ml^{-1} konsantrasyonlu ekstresi aktivite bakımından en düşük yüzdenin oluşmasına yol açmıştır. Uygulama yapılan tüm çeşitler ile kontrol grupları karşılaştırıldığında, $O_2^{\cdot -}$ radikali bakımından en yüksek süpürme aktivitesi genel olarak 200 mM NaCI koşullarında olmuştur.

Çizelge 4.17. NaCI'nin farklı konsantrasyonları ile oluşturulan stres ortamında çeşitlerin $O_2^{\cdot-}$ radikali söndürme aktivitesinde meydana gelen değişimler (%)

Ekstraktlar		Konsantrasyon Aralığı (µg ml^{-1})				
		4	8	12	16	20
Gala	Kontrol	45.24±1.8	49.910±1.17	66.42±1.56	67.50±0.87	73.24±1.2
	100mM	45.06±0.4	49.910±1.28	63.55±0.21	66.78±2.22	68.40±1.1
	200mM	54.03±1.2	62.118±0.26	67.68±0.29	69.83±0.21	73.60±0.7
	300mM	42.90±1.7	53.321±1.79	54.75±1.27	64.09±1.13	73.42±1.4
Karacadağ	Kontrol	46.14±1.6	49.91±30.83	61.22±0.90	61.75±0.82	63.19±0.6
	100mM	42.54±0.8	57.09±0.18	60.50±0.80	61.93±1.78	63.01±2.2
	200mM	48.29±0.6	67.14±0.27	69.65±0.69	71.45±0.73	71.81±2.45
	300mM	44.70±1.2	55.11±1.46	61.57±1.28	64.81±0.87	66.78±0.1
Tunca	Kontrol	49.55±2.8	57.98±0.57	66.06±0.26	68.04±1.78	82.40±1.1
	100mM	56.79±1.6	60.20±1.43	67.50±1.59	69.12±1.39	67.02±1.73
	200mM	67.38±0.9	68.82±2.57	74.32±0.80	74.56±1.11	74.26±1.56
	300mM	45.24±1.2	56.91±2.41	62.47±0.60	67.14±0.81	68.04±0.6
Aromatik-1	Kontrol	54.21±0.8	58.16±1.79	65.52±1.27	68.58±0.68	69.12±0.6
	100mM	48.83±1.2	60.68±2.56	66.78±0.89	67.32±0.80	67.50±1.8
	200mM	59.24±0.7	61.75±0.13	73.07±2.21	85.09±2.20	97.12±0.36
	300mM	45.24±1.1	57.27±1.13	63.01±2.20	65.17±0.23	68.94±0.2
BHT		31.23±0.7	39.31±1.11	45.78±1.11	50.65±1.11	59.78±0.43
Askorbik Asit		65.88±1.7	73.24±2.23	74.50±0.71	75.58±0.41	76.30±1.14

Pozitif kontrol olarak kullanılan BHT ve askorbik asit ile kıyaslandığında, tüm çeşitlerin genel olarak $O_2^{\cdot-}$ radikali giderme aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir. 4 ile 20µg ml^{-1}konsantrasyon aralığında uygulama yapılan tüm çeşitlerin söndürme aktivitesi pozitif kontrol olarak kullanılan BHT'ye göre yüksek bulunmuştur. Çizelge 4.13.'te görüldüğü gibi kontrol grubundaki bitkilerden de benzer sonuçlar alınmıştır. Diğer pozitif kontrol olan askorbik asit ile kıyaslandığında; 4-12 µg ml^{-1} konsantrasyon aralığında Tunca çeşidi hariç tüm çeşitlerdeki radikal giderme aktivitesi askorbik asitten düşük bulunmuştur. 12 µg ml^{-1} konsantrasyonda askorbik asidin aktivite değeri % 74.50 iken aynı konsantrasyonda Tunca ve Aromatik-1 çeşitlerinin 200 mM NaCI gruplarından alınan aktivite yüzdeleri bakımından sonuçlar (sırasıyla %74.32 ve %73.07) pozitif kontrole yakın bulunmuştur. 16 µg ml^{-1} konsantrasyonda askorbik asit, Tunca ve Karacadağ'da aktivite yüzdeleri sırasıyla %75.5; %74.5; %71.4 şeklinde olup, birbirine yakın değerlerde bulunmuştur. 16 ve 20 µg ml^{-1} konsantrasyondaki ekstrede Aromatik-1 çeşidinin 200 mM NaCI uygulaması (sırasıyla; %85 ve %97.12) askorbik asitten (sırasıyla; %75.58 ve %76.3) yüksek radikal söndürme aktivitesi göstermiştir. Gala çeşidinin 20 µg ml^{-1}konsantrasyondaki ekstreleri arasından yüksek uygulamalarda (200 ve 300 mM) radikal söndürme aktivitesi kendi kontrol grubu da dahil olmak üzere pozitif kontrole (Askorbik asit) yakın bulunmuştur.

4.9.2. $HO^{\cdot}$ Radikali Söndürme Aktivitesinin İncelenmesi

Çalışmada kullanılan çeltik çeşitlerinin etanol:su (1:1) ekstraktlarının $HO^{\cdot}$ radikali giderme aktivitesi, *in vitro* koşullarda Fe^{2+}/askorbat/EDTA/H_2O_2 sisteminde $HO^{\cdot}$ radikali oluşturularak çalışılmış ve ekstraktların bu radikali etkisizleştirebilme kapasiteleri belirlenmiştir. Ekstraktların ve $HO^{\cdot}$ radikali söndürme özelliği olduğu bilinen pozitif kontrollerin (BHT ve BHA) radikal söndürme aktivitesi konsantrasyona karşı % inhibisyon olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.18.).

Ekstraktların ve pozitif kontrollerin $HO^{\cdot}$ radikalini söndürme aktivitesi incelenirken 1-20 μg ml^{-1} konsantrasyon aralığında çalışılmıştır. Pozitif kontrol olarak kullanılan BHT ve BHA'nın 1-20 μg ml^{-1} konsantrasyon aralığında hidroksil radikali süpürücü aktiviteleri benzer sonuçlar göstermiştir (sırasıyla %52.8- %61.8 aralığında; %43.3- %64.3 aralığında).

Tüm tuz uygulamalarında Gala çeşidinin $HO^{\cdot}$ radikalini söndürme aktivitesi %9.56-%45.9 aralığında; Karacadağ çeşidinin %3.83-%46.98 aralığında; Tunca çeşidinin %16.52-%52.13 aralığında; Aromatik-1 çeşidinin %18.40-%49.18 aralığında olduğu belirlenmiştir. Ancak bu değerler tüm konsantrasyon aralıklarında (1-20 μg ml^{-1}) pozitif kontrol olarak kullanılan BHT ve BHA değerlerlerinin altında kaldığından, bu durumda çeltik çeşitlerinin $HO^{\cdot}$ radikali söndürme aktivitesi göstermediği sonucu alınmıştır.

Hidroksil radikali bakımından en düşük aktivite yüzdesi %3.83 ile Karacadağ çeşidinin 300 mM NaCI uygulamasının 1 μg ml^{-1} konsantrasyonunda görülürken, en yüksek aktivite Tunca çeltik çeşidinin 100 mM NaCI uygulamasının 20 μg ml^{-1} konsantrasyonunda (%52.13) görülmüştür.

Çizelge 4.18. NaCI'nin farklı konsantrasyonları ile oluşturulan stres ortamında çeşitlerin HO˙ radikali söndürme aktivitesinde meydana gelen değişimler (%)

Ekstraktlar		Konsantrasyon Aralığı(µgml^{-1})					
		1	**2**	**4**	**8**	**12**	**20**
Gala	Kontrol	7.24±1.00	25.13±2.00	29.09±3.21	39.34±1.32	41.45±2.00	43.87±1.19
	100 mM	9.56±2.23	28.82±1.46	31.01±1.00	35.79±2.23	38.52±1.20	40.98±0.96
	200 mM	10.38±1.00	34.01±1.61	38.66±2.51	43.57±1.42	45.49±1.40	45.90±2.64
	300 mM	14.89±3.21	24.72±1.17	30.87±2.00	38.66±2.41	42.21±0.60	45.62±0.41
Karacadağ	Kontrol	7.94±2.00	19.315±1.00	30.000±1.41	35.342±1.53	43.15±1.8	44.52±1.71
	100 mM	14.79±1.54	20.684±1.13	32.191±2.14	38.082±2.31	41.7±0.60	44.10±0.17
	200 mM	13.69±1.54	18.35±1.38	28.35±1.00	34.79±1.00	41.3±2.30	46.98±0.71
	300 mM	3.83±1.00	18.63±1.26	23.69±2.31	36.43±1.21	40.82±0.90	43.28±1.29
Tunca	Kontrol	13.81±1.58	28.63±2.00	28.49±1.37	36.89±2.21	45.35±2.3	47.26±0.90
	100 mM	20.37±2.2	27.49±1.00	34.75±0.80	44.72±1.49	45.5±1.43	52.13±1.73
	200 mM	16.52±1.47	25.07±2.84	31.76±1.60	39.601±1.91	42.02±0.9	44.30±0.32
	300 mM	19.65±2.19	24.78±1.48	39.74±0.60	45.218±2.00	46.58±1.5	47.57±1.71
Aromatik-1	Kontrol	17.07±1.0	37.158±2.00	38.38±1.57	43.03±0.90	46.03±2.6	49.18±0.80
	100 mM	24.09±1.73	27.86±1.21	28.82±2.00	36.74±1.83	44.53±1.5	48.22±1.45
	200 mM	18.40±2.00	27.04±1.00	26.50±0.80	34.01±2.38	40.57±0.2	47.13±0.53
	300 mM	20.25±1.55	23.63±1.18	26.50±1.26	36.20±2.68	42.48±1.5	47.13±1.32
BHT		52.84±1.1	56.42±1.28	58.06±1.78	59.15±0.60	59.69±0.8	61.88±1.28
BHA		43.30±1.6	53.84±2.36	56.83±2.25	59.82±1.62	62.39±0.7	64.38±2.36

4.9.3. H_2O_2 Söndürme Aktivitesinin İncelenmesi

Çeltik çeşitlerinin etanol:su (1:1) ekstraktlarının ve pozitif kontrol olarak kullanılan BHT ve askorbik asidin H_2O_2 giderme yetenekleri Çizelge 4.19.'da verilmiştir.

Çizelge 4.19. NaCI'nin farklı konsantrasyonları ile oluşturulan stres ortamında çeşitlerin H_2O_2 söndürme aktivitesinde meydana gelen değişimler (%)

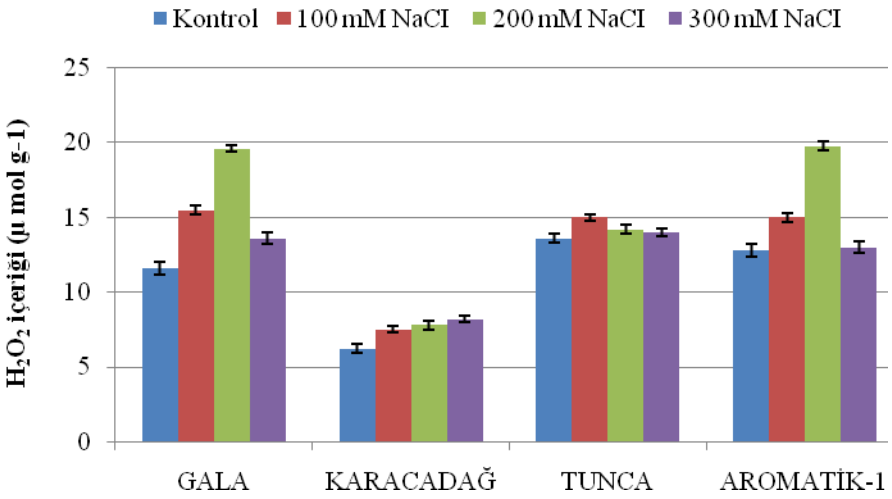
Ekstraktlar		Konsantrasyon Aralığı (µg ml^{-1})			
		100	200	300	400
Gala	Kontrol	10.344±0.50	24.482±1.21	41.379±3.79	48.275±0.60
	100mM	27.586±1.12	37.931±0.80	38.827±1.73	44.931±0.29
	200mM	24.137±1.95	37.931±1.84	31.034±0.70	44.827±1.53
	300mM	24.137±1.74	31.034±0.90	41.379±0.80	48.275±2.23
Karacadağ	Kontrol	20.689±1.25	27.586±1.41	41.379±0.60	48.275±3.32
	100mM	27.586±1.89	34.482±1.41	24.137±1.79	38.275±4.54
	200mM	24.137±1,78	31.034±2.73	41.379±1.47	55.172±5.45
	300mM	27.586±1.23	31.034±1.48	44.827±4.80	51.724±1.61
Tunca	Kontrol	24.137±1.45	27.586±1.81	44.827±3.60	51.724±1.16
	100mM	31.034±0.73	37.931±0.90	44.827±2.71	51.724±2.8
	200mM	41.379±0.80	51.724±0.71	65.517±1.58	68.965±3.10
	300mM	34.482±0.60	41.379±1.89	48.275±3.63	58.620±1.10
Aromatik-1	Kontrol	27.586±1.30	34.482±2.57	44.827±0.60	51.724±0.52
	100mM	33.793±1,52	41.379±0,29	44.827±1.46	55.172±2.50
	200mM	37.931±2,57	41.379±2.79	55.172±4.57	65.517±4.61
	300mM	37.931±0,79	41.379±1.85	48.275±3.33	58.620±0.33
BHT		23.793±1.51	27.580±1.25	45.379±2.47	62.068±3.45
Askorbik Asit		44.827±2.21	61.965±3.25	81.206±3.79	94.103±4.70

Çeltik çeşitlerinin ekstraktlarını, standart olarak kullanılan BHT ve Askorbik Asit ile karşılaştırıldığımızda, tüm uygulamalarda (100, 200 ve 300 mM NaCI) Tunca ve Aromatik-1 çeşitlerine ait ekstraktların tüm parametrelerde (100, 200, 300 ve 400 µg ml^{-1}) farklı oranlarda H_2O_2 giderme aktivitesi gösterdikleri belirlenmiştir. Bu çeşitlerde, tüm tuz uygulamalarının 100 ve 200 µg ml^{-1} ekstrelerindeki aktivite değerleri BHT'den yüksek bulunmuştur. Bununla birlikte 300 µg ml^{-1}'lik ekstrede 200 ve 300 mM NaCI uygulamasındaki H_2O_2 giderme aktivitesi BHT'den yüksek bulunurken; 400 µg ml^{-1}'lik ekstrede ise sadece 200 mM NaCI uygulamasındaki giderme aktivitesi yüksek bulunmuştur. Diğer bir pozitif kontrol olan askorbik asit ile kıyaslandığında ise, uygulama yapılan Tunca ve Aromatik-1 çeşitlerinin tüm ekstrelerinde H_2O_2 giderme aktiviteleri daha düşük bulunmuştur (Çizelge 4.19.).

Gala ve Karacadağ çeşitlerinin 100 ve 200 µg ml^{-1}ekstrelerinin H_2O_2 giderme aktivitesi pozitif kontrol olarak kullanılan BHT'den yüksek bulunurken, 300 ve 400 µg ml^{-1}ekstrelerinde düşük bulunmuştur. Askorbik asit ile kıyaslandığında ise, bu çeşitlerin tüm tuz uygulamalarının tüm konsantrasyon aralıklarında H_2O_2 giderme aktiviteleri daha düşük bulunmuştur. H_2O_2 giderme aktivitesi bakımından en düşük aktivite yüzdesi %24.1 ile Karacadağ ve Gala çeşitlerinde görülürken, en yüksek aktivite Tunca çeşidinin 200 mM NaCI uygulamasının 400 µg ml^{-1} ekstresinde (%68.9) görülmüştür.

4.10. H_2O_2 Miktarının Belirlenmesi

Tuz uygulanan çeltik çeşitlerindeki H_2O_2miktarları kontrol grupları ile birlikte Çizelge 4.20. ve Şekil 4.20.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.20. NaCI stres faktörünün etkisiyle çeşitlerin hidrojen peroksit içeriğindeki değişimler

Uygulama yapılan tüm çeşitlerin H_2O_2 içeriğinde kontrollerine göre artış görülmüş ve tuz konsantrasyonu arttıkça hidrojen peroksit miktarındaki değişimler çeşitlere göre değişkenlik göstermiştir. Gala çeşidindeki bu artış tüm tuz uygulamalarında genel olarak yüksek değerlerde (sırasıyla 15.5; 19.6; 13.6 µ mol g^{-1}) ve istatistiki açıdan da anlamlı bulunmuştur.

Çizelge 4.20. NaCI'nin farklı konsantrasyonları ile oluşturulan stres ortamında çeşitlerin H_2O_2 içeriklerinde meydana gelen değişimler (µ mol g^{-1} TA)*

					Artma (%)		
Çeşitler	**Kontrol Ortalama**	**100 mM NaCI Ortalama**	**200 mM NaCI Ortalama**	**300 mM NaCI Ortalama**	**Kontrol-100**	**Kontrol-200**	**Kontrol-300**
Gala	11.6 ±2.0^{d}	15.5±2.0^{b}	19.6 ±2.0^{a}	13.6 ±2.0^{c}	33.621	68.966	17.241
Karacadağ	6.2±1.00 ^{b}	7.5±2.00 ^{a}	7.8±1.00 ^{a}	8.2±2.00 ^{a}	20.968	25.806	32.258
Tunca	13.6±2.0^{b}	15.0±3.0^{a}	14.2±2.0^{ba}	14.0±3.0^{b}	10.294	4.412	2.941
Aromatik-1	12.8±2.0^{c}	15.0±2.0^{b}	19.8±2.0^{a}	13.0±2.0^{c}	17.188	54.688	1.563

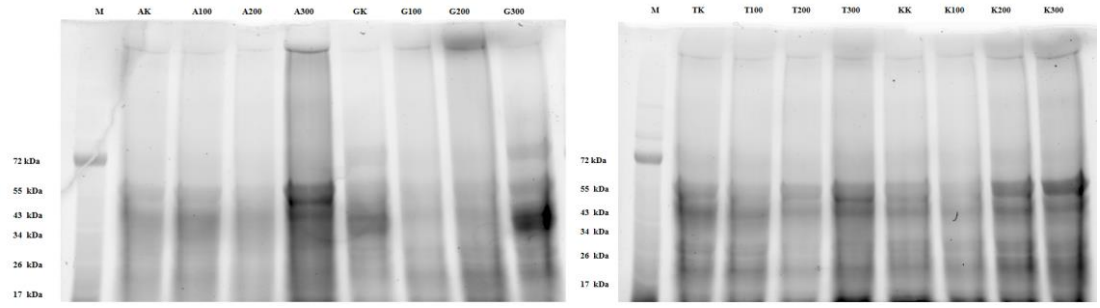
*Aynı satırda yer alan farklı harfler ortalamalar arasındaki önemi ($p \leq 0.05$) ifade etmektedir

Karacadağ çeşidinin H_2O_2 miktarı, tuz stresine bağlı olarak tüm uygulamalarda düzenli olarak artmış ve bu artış kontrole göre istatistiki açıdan önemli fakat kendi aralarında anlamsız bulunmuştur. Diğer çeltik çeşitleriyle karşılaştırıldığında Tunca'da H_2O_2 miktarında meydana gelen artışın genel olarak daha düşük olduğu ve istatistiki olarak da önemli olmadığı görülmüştür. Aromatik-1 çeşidi ise kontrol ile kıyaslandığında, 300 mM NaCI uygulamasında H_2O_2 miktarı istatistiki açıdan önemsiz, 100 ve 200 mM NaCI uygulamalarında ise önemli olmuştur.

100 ve 200 mM NaCI konsantrasyonlarında tüm çeşitler kontrol grupları ile kıyaslandığında, en yüksek artış Gala çeşidinde (sırasıyla %33.6; %68.9), aynı konsantrasyonlarda en düşük artış ise sırasıyla %10.29 ve %4.41 ile Tunca çeşidinde olmuştur. 300 mM NaCI'lik konsantrasyonda, kontrole göre en yüksek artış yüzdesi Karacadağ çeşidinde (%32.2) en düşük artış %1.56 ile Aromatik-1 çeşidinde olmuştur. H_2O_2 içeriği bakımındantuzdan etkilenme durumlarına bakıldığında, en fazla etkilenen çeşitlerin Gala ve Karacadağ, en az etkilenenlerin ise Aromatik-1 ve Tunca olduğu görülmektedir (Çizelge 4.20.).

4.11. SDS-PAGE

Gala, Karacadağ, Tunca ve Aromatik-1 çeltik çeşitlerinde tuz toleransının moleküler temelini anlayabilmek için, toplam çözünebilir proteinlere ait bandlar SDS-PAGE tekniği ile görüntülenmiştir. SDS-PAGE tekniği kullanılarak uygulama ve kontrol grubu bitkilerinin yaprak dokularından elde edilen çözünebilir proteinlerin profillleri karşılaştırılmış ve önemli değişiklikler olduğu görülmüştür (Şekil 4.21.).



Şekil 4.21. Uygulanan NaCI stres faktörünün etkisiyle çeşitlerin protein profillerindeki (SDS-PAGE tekniği ile) değişimler (M, marker; AK, Aromatik-1-Kontrol; A100, Aromatik-1-100 mM NaCI; A200, Aromatik-1-200 mM NaCI; A300, Aromatik-1-300 mM NaCI; GK, Gala-Kontrol; G100, Gala-100 mM NaCI; G200, Gala-200 mM NaCI; G300, Gala-300 mM NaCI; KK, Karacadağ-Kontrol; K100, Karacadağ-100 mM NaCI; K200, 200 mM NaCI; Karacadağ-K300, Karacadağ-300 mM NaCI; TK, Tunca-Kontrol; T100, Tunca-100 mM NaCI; T200, Tunca-200 mM NaCI; T300, Tunca- 300 mM NaCI)

Molekül ağırlığı bilinen protein markerı kullanılarak, tuz uygulaması sonucu çeltik fidelerinde çözünebilir proteinlerin moleküler ağırlıkları incelendiğinde, genel olarak tüm çeşitlerde 26-55 kDa aralığındaki band bölgelerinde yoğunluklar gözlenmiştir. Genel olarak tüm çeşitlerde bantların özellikle 34 kDa'lık bölgede yoğunlaştığı belirlenmiştir.

Hassas oldukları düşünülen çeşitlerden olan Gala'da kontrol ve 300 mM NaCI uygulamasında 34-43, 43-55 ve 72 kDa bölgelerinde band yoğunluğunun arttığı gözlenirken, tolerant olarak kabul edilen Aromatik-1'de ise en yüksek tuz uygulaması olan 300 mM'da sadece 34-55 kDa'lık bölgede bandların yoğunlaştığı görülmüştür.

Ayrıca tolerant oldukları düşünülen çeşitlerden bir diğeri olan Tunca'nın kontrol ve 300 mM NaCI uygulaması ile hassas olan Karacadağ çeltik çeşidinin 200 ve 300 mM NaCI uygulamalarında 17-26 ve 34-55 kDa'lık bölgelerde protein bandlarının yoğunlaştığı gözlenmiştir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Ciddi boyutta tehdit oluşturan ve bitkilerde ürün kaybına yol açan tuz stresi, her yıl büyük oranda ekonomik zarara da neden olmaktadır. Nüfus yoğunluğunun gittikçe artmasına bağlı olarak ekilebilir alanların azalması ve gelecek yıllarda besin sıkıntılarının yaşanabileceği düşünüldüğünde, stres faktörüne bağlı ürün kayıplarının azaltılması için yapılan araştırmalar tüm bilim camiası için oldukça önem kazanmıştır. Araştırıcılar bilimsel veriler doğrultusunda, insan beslenmesinde önemli olan bitki türlerindestres faktörlerine dayanıklı savunma mekanizmalarını anlamaya ve ürün kayıplarını minumum seviyeye indirebilecek çalışmalara odaklanmıştır.

Bitkilerin doğal yaşam ortamlarında tuz konsantrasyonu kullanılabilir su potansiyelini düşürmeye yetecek kadar (0.5-1.0 bar) olduğunda bitki strese girer ve bu "Tuz stresi" olarak ifade edilir (Levitt 1980). Bitkilerin maruz kaldığı stres faktörlerinden olan tuzluluğun etki derecesi iklim koşullarına, bitki türüne veya toprak koşullarına bağlı olarak değişebilmektedir (Tang ve ark. 2015). Söz konusu bu durum, toprak içeriğinde tuz seviyesinin artışına neden olduğundan bitkilerde su alımı kısıtlanır ve dolaylı olarak bitkilerin büyüme ve gelişimi olumsuz etkilenir.

Tuz stres faktörünün etkisi altında bitkilerde sürgün, kök gelişimi ve yaprak büyümesi geriler, tomurcuk oluşumu azalır. Ayrıca yapraklardaki mevcut klorofil, protein miktarı veya fotosentez oranında azalmanın aksine antioksidan enzimlerin miktarında artışların meydana geldiği bildirilmiştir (Ekmekçi ve ark. 2005; Frary ve ark. 2010; Tetiktabanlar 2011).

Tuz stres faktörüne karşı hassas olan bitki grupları arasında çeltik bitkisinin de bulunduğu bilgisi (Maas ve Grattan 1999) yapılan tarla ve sera çalışma sonuçları ile desteklenmiştir (Grattan ve ark. 2002).

Tuzluluk koşulları altında, bitkiler stresle baş etmek için farklı fizyolojik ve biyokimyasal mekanizmalarını aktive etmek zorunda kalırlar. Morfoloji veya anatomilerindeki değişiklikler fotosentez hızında azalma, hormonal değişim, toksik iyon dağılımı ve biyokimyasal adaptasyon (antioksidatif metabolizma yanıtı gibi) söz konusu mekanizmalar olarak bildirilmiştir (Hernández ve ark. 2001; Parida ve Das 2005; Ashraf ve Harris 2013; Acosta-Motos ve ark. 2015).

2 aşamalı olarak yürütülen çalışmamızın birinci aşamasında, çeltik çeşitlerine uygulanan stres faktöründen sonra sürgün boyu ve kök uzunlukları kontrol grupları ile karşılaştırılıp değerlendirildiğinde, genel olarak NaCI'nin tüm çeşitlerde gelişimi olumsuz etkilediği gözlenmiştir. Tuz konsantrasyonu arttıkça çeşitlere ait kök uzunluğu ve sürgün boyu değerlerinde küçük farklılıklar gözlenmiş ancak bu farklılıklar istatistiki açıdan önemli bulunmamıştır. Benzer şekilde Demiral ve Türkan (2005) tolerant Pokkali, duyarlı IR-28 çeşitleri ile yaptıkları çalışmada; tuzluluğun artmasıyla IR-28'in kök uzunluğunda bir azalış gözlenmesine rağmen, her iki çeşit için de tuzluluğun önemli bir etkisinin olmadığını vurgulamışlardır. Tatar (2006) yaptığı araştırmada, tuzluluğun artmasına bağlı olarak sürgün-kök uzunluklarında bir azalma olduğunu ancak bu azalmanın istatistiki olarak önemli olmadığını rapor etmiş, dayanıklı/hassas çeşitlerin seçiminde sürgün-kök uzunluğunun tek bir ölçüt olarak kullanılabilmesinin mümkün olmadığını belirtmiştir. Vaidyanathan ve ark. (2003) aynı çeşitlerde, kısa süreli tuz stresinin çeşitlerin kök uzunlukları üzerinde dikkate değer etki gösterdiğini ancak tuzluluğun Pokalli'ye göre IR-28'de kök gelişimini daha fazla engellediğini rapor etmişlerdir.

Tuz stresinin aşırı olduğu durumda; yapraklar küçük kalır ve aynı zamanda yaprak kenarlarında ya da tamamında lekeler oluşur, çünkü tuzluluk stresinde yapraklar, bitkide olumsuz etkilerin gözlemlendiği ilk organlardır (Munns 2002). Araştırmamızda tuz stresi koşullarında, çeşitlerde görülen olumsuz etkinin şiddeti birbirinden farklılık göstermiş ve bazı çeşitlerin tamamında hafif sararma, bazılarında ise lokal sararma gözlenmiştir. Önceki çalışmalarda araştırmacılar tuzluluğun ilerleyen safhalarında yaşlı yaprakların uç ve kenar kısımlarında sararma ve kloroz olduğunu, daha ileri safhada klorozun nekroza dönüşmesi ile yaprakta kurumanın gerçekleştiğini bildirmişlerdir (Bergmann 1992; Karanlık 2001; Sevengör 2010). Benzer şekilde Tatar (2006) tuzluluğun çeltik çeşit ve hatlarının [IR31785 (tuzluluğa hassas), IR4630 (tuzluluğa toleranslı), Demir, Osmancık, Kral, Yavuz ve Baldo] çimlenme ve fide gelişimi üzerine etkisini araştırdığı çalışmasında, özellikle yüksek tuz seviyesinde aynı belirtileri gözlediğini rapor etmiştir. Yapılan araştırma sonuçlarına benzer şekilde çalışmamızda da tuz uygulamasının ilk belirgin etkisi tuzluluğun şiddetine bağlı olarak farklı derecelerde sararma, solma ve kloroz gibi morfolojik hasarlar şeklinde ortaya çıkmıştır. Gala, Hazro, Karacadağ ve Edirne 3.60-3.40 görsel skala değeri ile tuzluluğun tüm

parametrelerinden en çok etkilenen çeşitler olarak belirlenirken, 1.80 ve 2.50 skala değeri ile en az hasar gören Tunca ve Aromatik-1 olmuştur. En yüksek konsantrasyon olan 300 mM NaCI'de bile yaprak zararlanma derecesi bakımından en az etkilenen çeşitlerin Tunca ve Aromatik-1 olduğu hasat anında belirlenmiştir. Lee ve ark. (2013) tarafından yapılan çalışmada, tuza duyarlı (IR-29) ve toleranslı (Pokkali) çeltik çeşitleri 7 gün süre ile 100 mM NaCl uygulamasına maruz bırakılmıştır. Araştırıcılar duyarlı çeşidin uygulamadan sonra 48 saat içinde solduğunu, toleranslı çeşitte ise uzun bir süre (1 hafta kadar) herhangi bir görünür semptom ya da solma olmadığını belirtmişlerdir. Biber, domates, patlıcan, kavun ve fasülye gibi farklı bitkilerle yapılan çalışmalarda ise elde edilen skala değerlerinin tuzluluğa karşı tolerant genotip seçiminde ön bilgi oluşturması açısından kullanılabilecek bir parametre olduğu belirtilmiştir (Aktaş 2002; Daşgan ve ark. 2002; Yaşar 2003; Kuşvuran 2004; Koç 2005). Araştırmamızda ise aynı bitki çeşitlerinin tuzdan etkilenme derecesi, genotipe bağlı olarak farklı seviyelerde olmuştur. Genotipe bağlı olarak etkilenme derecesi çeşitlerin tuz stresine karşı geliştirdikleri metabolik değişim ve farklı savunma sistemlerinden kaynaklandığını ifade etmek mümkündür. Çalışmamızda 0-5 görsel skalasonuçlarının, hassas ve tolerant çeşit seçiminde ilk aşamada kullanılabilecek basit ancak ön bilgi edinmede fayda sağlayacağı kanısındayız.

Tuz stresinin yaprak ve köklerde kuru ve taze ağırlıkta azalmaya yol açtığı bazı araştırıcılar tarafından bildirilmiştir (Hernandez ve ark. 1995; Chartzoulakis ve Klapaki 2000). Demiral ve Türkan (2005) çeltik bitkisinde tuzluluğun etkisini araştırdıkları çalışmalarında, tuza tolerant Pokkali ve tuza hassas IR-28 çeltik çeşitlerini 0, 60 ve 120 mol m^{-3} NaCI ile oluşturdukları stres ortamında 7 gün süreyle tutmuşlardır. 120 mol m^{-3} NaCI ortamında Pokkali köklerinde taze ağırlıkta önemli bir düşüş (%43'lük), IR-28'de önemli değişiklik olmadığını bildirmişlerdir. Ayrıca, yüksek NaCI koşullarında (60 ve 120 mol m^{-3}) IR-28'in kök kuru ağırlığında önemli bir düşüş olduğunu Pokkali'de ise değişiklik olmadığı sonucunu rapor etmişlerdir. Benzer şekilde araştırmamızda, yaprak taze ağırlığındaki değişimleri tespit etmek amacıyla uygulama yapılan çeşitler kontrol grupları ile karşılaştırılmış ve taze ağırlık oranlarındaki düşüş araştırıcıların belirttiği sonuçlarla örtüşür şekilde ve genel olarak istatistiki açıdan önemli bulunmamıştır. Kuru ağırlık verileri değerlendirildiğinde ise tuz konsantrasyonu arttıkça çeşitlerde değişen ve genellikle istatistiki açıdan önemli olmayan oranlar (artma

veya azalma) elde edilmiştir. Amirjani (2010), Tatar ve ark. (2010), Senadheera ve ark. (2012) tarafından çeltik çeşitleri ile yapılan çalışmalarda, tolerant çeşitler de dahil olmak üzere tuzluluğun artışının kök ve sürgün taze-kuru ağırlığında gerilemelere yol açtığı bidirilmiştir. Aynı şekilde 12 çeltik çeşidi üzerinde tuzluluğun etkisini inceleyen Chunthaburee ve ark. (2016) kök ve sürgünlerin taze-kuru ağırlık değerlerinde önemli ölçüde azalmalar olduğunu bildirmişlerdir. Literatür araştırmalarında, tuz stresinin yarattığı etki ile ilgili benzer çalışmalar farklı bitkiler için de tespit edilmiş ve araştırıcılar tuzluluk faktörüne karşı toleranslı olan çeşidin hassas olan çeşide oranla daha yüksek kuru ağırlığa sahip olduğunu bildirmişlerdir. Kabak, buğday, kavun, patlıcan, bamya ve biber bitkileri üzerine yapılan çalışmalarda, stres sonucunda bitkilerin yeşil aksam ve kök taze ve kuru ağırlıklarında kayıpların meydana geldiği bildirilmiştir (Karanlık 2001; Aktaş 2002; Daşgan ve ark. 2002; Yaşar 2003; Asraf ve ark. 2003; Kuşvuran 2004; Sevengör 2010). Çalışma sonuçlarımıza göre, genel olarak tüm çeşitlerde yaprak taze ağırlıklarında kontrollerine göre düşüş, Tunca çeşidinde ise artış olduğu belirlenmiştir.

Bitkilerde tuz stresinin yaprak gelişiminin yanısıra su durumunu da etkilediği bilinmektedir. Toprak tuzluluğundan kaynaklı olarak oluşan ozmotik etki, hücrelerde turgor basıncının azalmasına ve dolaylı olarak gelişimi yavaşlatıp bitkinin su dengesinde aksaklıklara yol açabilmektedir (Hernandez ve ark. 2000). Khan ve Panda (2008) Lunishree ve Begunbitchi çeltik çeşitlerinin köklerini farklı konsantrasyonlarda NaCI'nin etkisine 24 saat süreyle maruz bırakmışlardır. Bağıl su içeriği bakımından her iki çeşidin değerlerinde azalış kaydetmişler ve bu azalış özellikle Lunishree'de daha güçlü olmuştur. Çalışmamızda uygulamalardan alınan verilere göre, NaCI konsantrasyonuna bağlı olarak bağıl su değerleri bakımından çeşitler farklı seviyelerde yanıt vermiştir. Tuz konsantrasyonu arttıkça tüm çeşitlerde genel olarak bağıl su değerlerinde kontrole göre azalma olduğu ve çeşitlerin vermiş olduğu yanıtların istatistiki açıdan önemlilik derecesinin de çeşitlere göre farklılaştığı tespit edilmiştir. Uygulama grupları ve kontrol bitkilerinden elde edilen veriler çok yakın bulunduğundan, bağıl su içeriği bakımından yüksek tuz konsantrasyonunda en az etkilenen çeşitlerin Tunca (%85) ve Aromatik-1 (%86) olduğu tespit edilmiştir. Gala (%66) ve Karacadağ (%74) ise kontrole göre en çok etkilenen çeşitler olarak belirlenmiştir. Çeşitlerde değişen bağıl su değerleri kontrolleri ile karşılaştırıldığında ve

çeşitler arasında bariz farklılıklar gözönünde bulundurulduğunda, bu parametrenin tolerant/hassas çeşit seçiminde önemli ve belirleyici ölçütlerden biri olduğu sonucuna varılmıştır. Tuz stresi koşullarında Sakha 102 ve Egyptian Yasmine mısır çeşitlerini 14 gün süre ile 50 mM NaCI'ye maruz bırakan Mekawy ve ark. (2015) çeşitlerin gelişimi ve fizyolojik adaptasyonunu araştırmışlardır. Sakha 102 bitkilerinin bağıl su değerleri kontrol bitkilerinde %97.0 olurken uygulama yapılanlarda ise %71.0'e varan bir düşüş kaydetmişlerdir. Bununla birlikte, Egyptian Yasmine'nin bağıl su değerlerinde tuzluluğa-maruz bitkiler (%86.0) ile kontrol grubu (%88.0) arasında önemli farklılık olmadığı aynı araştırıcılar tarafından rapor edilmiştir.

Tuz stresine maruz kalan bitkilerde gelişim evresi ve genotipe bağlı olarak yaprak birim alanındaki CO_2 fiksasyonunda meydana gelen azalmanın; fotosentez etkinliğinde yavaşlamaya ve dolasıyla bitki gelişiminde gerilemelere neden olduğu bildirilmiştir (Zhu 2001; Yaşar 2003).Tuz stresi koşullarında, bitki hücre zarını oluşturan lipid yapısında oksijen radikallerinin yol açtığı tahribat sonucunda nekrozun oluştuğu; klorozun ise oksijen radikallerinin klorofili parçalamasından kaynaklandığı bazı çalışmalarda bildirilmiştir (Gossett ve ark. 1994; Tunçer 2007). Yüksek tuz stresi altında farklı bitki türlerinde klorofil miktarının kontrol gruplarına göre azaldığı araştırıcılar tarafından bildirilmiştir (Tıpırdamaz ve Ellialtıoğlu 1994; Sivritepe 1995). Çalışmamızda, çeşitlerin fotosentetik pigment içerikleri (*klorofil-a, klorofil-b, toplam klorofil, toplam karotenoid*) için elde edilen değerler arasında farklılıklar bulunmuştur. NaCI'nin yüksek konsantrasyonu (300 mM) uygulamalarında Neğiş, Tunca, Aromatik-1, Karacadağ ve Hazro çeşitlerinin toplam klorofil içeriğine ait değerde kontrol grubuna göre artış gözlenirken Gala, Edirne ve Şumnu çeşitlerinde ise azalış tespit edilmiştir. Toplam karotenoid içeriğinde ise yine yüksek tuz seviyesinde artış gösteren çeşitler Edirne, Neğiş, Tunca, Aromatik-1 ve Karacadağ olmuştur. Araştırma sonuçlarımıza benzer şekilde Lutts ve ark. (1996a) tuz stresinin çeltik bitkisinin klorofil miktarında azalmaya neden olduğunu bildirmişlerdir. Daha önce rapor edilmiş başka bir çalışmada, tuz stresine duyarlı çeşit olan IR-29'da klorofil içeriği düşerken karotenoid içeriğinin arttığı, tuza toleranslı Pokkali'nin ise toplam karotenoid ve toplam klorofil içeriği bakımından tuz stresinden etkilenmediği rapor edilmiştir (Lee ve ark. 2013). Araştırıcılar; IR-29'da klorofil içeriğindeki düşüşün fotosentetik mekanizmada meydana gelen zarardan kaynaklandığını belirtmişlerdir. Araştırmamızın sonuçlarına göre, NaCI

konsantrasyonu arttıkça fotosentetik pigment içeriği yönünden Gala ve Karacadağ diğer çeşitlere göre tuzdan daha fazla etkilenmiş ve tuz uygulaması özellikle bu çeşitlerde yaprakta sararmaya yol açmıştır. Aromatik-1 çeşidi ise tuzdan daha az etkilenmiştir. Tuz stresi uygulamaları çeşitlerde farklı düzeylerde oksidatif strese yol açmıştır. Dolayısıyla bu durumun klorofil yapısındaki bozulmaya bağlı olarak fotosentetik pigment içeriğinde azalmaya neden olduğunu ifade edebiliriz. Çeşitlerde fotosentetik pigment içeriği değerlerinin farklı olması, üretilen ROT miktarı ve antioksidan enzim aktivitelerine bağlı olarak çeşitlerin tuzluluğa karşı hassas veya tolerant olmaları ile ilişkilendirilebilinir. Ayrıca, düşük tuzluluk etkisi ile bitkide klorofil içeriği artarken, yüksek tuzluluğun klorofilin moleküler yapısını bozduğu araştırıcılar tarafından bildirilmiştir (Ashraf ve Harris 2004; Munns 2005).

Stres koşullarında hücre membran hasarının ölçüsü, çoklu doymamış yağ asitleri membranda peroksidasyona yol açtığında, üretilen tiyobarbutirik asit reaktif maddesi olan MDA miktarı ölçülerek belirlenebilir. Stres durumunda hücredeki MDA miktarı lipid peroksidasyonundaki artış ile orantılı bir şekilde artar (Meloni ve ark. 2003; Xue ve Liu 2008). Bu nedenle stres çalışmalarında, bitkilerde lipid peroksidasyonunun bir ürünü olan MDA seviyesi, membranlardaki oksidatif hasarın bir göstergesi olarak sıklıkla kullanılmıştır (Li ve ark. 2010). Çalışmamızda, kontrol grupları ile uygulama grupları karşılaştırıldığında, NaCI stres faktörü genel olarak tüm çeşitlerde MDA içeriğini arttırmıştır. Sonuçlarımızı destekler nitelikte Khan ve Panda (2008) artan tuzluluğa yanıt olarak MDA düzeyinde bir artış olduğunu çalışmalarında rapor etmişlerdir. Tuzluluk etkisi altında tolerant ve hassas çeşitlerin verdiği yanıtlar araştırıldığında; tuz stresinin artmasıyla hassas çeşitlerde MDA miktarında da artış olduğu birçok araştırıcı tarafından rapor edilmiştir (Khan ve ark. 2002; Demiral ve Türkan 2005). Lutts ve ark. (1996a) çeltik bitkisinde yaptıkları bir araştırmada, tuza dayanıklı çeşitte MDA miktarının en düşük değerde, tuza duyarlı çeşitte ise çok daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir. Vaidyanathan ve ark. (2003) NaCI'nin farklı konsantrasyonlarında; tuza duyarlı Pusa Basmati-1 (PB-1) ve tuza toleranslı Pokkali (PK) çeltik fidelerinde lipid peroksidasyonunda meydana gelen değişiklikleri incelemişler ve araştırıcılarkonsantrasyon artışına bağlı olarak duyarlı ve toleranslı çeşitlerin lipid peroksidasyon değerlerinde artış olduğunu ve bu artışın tüm konsantrasyonlarda tuza duyarlı PB-1'de daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Demiral

ve Türkan (2005) yaptıkları çalışmada, duyarlı (IR-28) ve tolerant (Pokkali) çeltik köklerinde, tuz uygulamalarından 7 gün sonra her iki çeşidin MDA değerlerinde küçük bir artış olduğunu ancak Pokkali'deki artışın önemli olmadığını bildirmişlerdir. Turan ve Tripathy (2013) tuz stresinin erken safhalarında tuza duyarlı PB-1 çeltik çeşidinde lipid peroksidasyonu derecesinin yüksek olduğunu, tuza toleranslı genotipin (CSR10) ise MDA birikimini azalttığı için strese direnç gösterdiğini bildirmiştir. Çimlenmeden sonra (72 saat) çeşitlerin MDA düzeyinde önemli ölçüde artış olduğunu ve bu artışın duyarlı PB-1'de daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir. CSR10'da lipid peroksidasyon derecesinin daha düşük olması, toleranslı bitkilerin hassas olanlara göre oksidatif hasardan daha iyi korunuyor olabildiğini ancak uzun süre devam eden uygulamalarda toleranslı ve duyarlı genotipler arasındaki farkın bulanıklaştığı ifade edilmiştir. Tuz stresinin çeltik bitkileri üzerindeki etkilerinin araştırıldığı önceki çalışmalardan ulaştığımız sonuç, toleranslı çeşitlerde MDA miktarının duyarlı çeşitlere göre daha az miktarlarda olduğudur. Toleranslı çeşitlerde MDA miktarının düşük olması membranda meydana gelen hasarın daha az olduğunun göstergesi olarak kabul edilmektedir. Literatür bilgileri ile örtüşen sonuçlarımıza göre, tuz stres faktörüne karşı dayanıklı olduğu düşünülen Aromatik-1'in MDA miktarı düşük (%4.7), hassas olarak değerlendirilen Karacadağ çeşidinde ise bu oran oldukça yüksek (%40.6) olarak tespit edilmiştir. Çalışmamızın ilk aşamasında toleranslılık seviyesini belirlemek için yapılan analizler arasından en ayırt edici bilgiyi veren parametre lipid peroksidasyon analizleri olmuştur. Çalışmamızın 100 ve 200 mM NaCI uygulamalarında en yüksek MDA artışının Şumnu ve Gala çeşitlerinde, 300 mM'da ise benzer artışların Karacadağ, Neğiş ve Edirne çeşitlerinde olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte, 300 mM NaCI uygulamasında Tunca ve Aromatik-1 çeşitlerinde çok düşük MDA artışı gözlenmiştir. Tuz stresinin MDA içeriği üzerine etkisinin incelendiği başka çalışmalarda oksidatif stresin oluşması sonucu lipid peroksidasyonunun ortaya çıktığı, antioksidatif enzimlerini daha yüksek düzeyde çalıştıran dayanıklı çeşitlerde, MDA'nın düşük seviyelerde bulunduğu rapor edilmiştir (Karanlık 2001; Yaşar 2003; Kuşvuran 2004; Sevengör 2010). Uygulamalarımızda artan tuzluluk derecesine yanıt olarak bazı çeşitlerde MDA düzeyindeki artış, söz konusu bitkilerin daha fazla hasara maruz kaldığını işaret etmektedir. Kontrol grupları ile karşılaştırıldığında, çeşitlere ait MDA miktarının Gala, Karacadağ ve Hazro'da daha fazla olması bu çeşitlerin daha hassas,

Tunca ve Aromatik-1 çeşitlerinin ise daha toleranslı olabileceğini göstermektedir. Tunca ve Aromatik-1 çeşitlerinde MDA seviyesinin daha düşük olması, bu çeşitlerde tuz stresinin neden olduğunoksidatif hasara karşı daha iyi korundukları sonucunu çıkarabiliriz. Stres faktörleri ROT üretimini arttırır ve genellikle lipid peroksidasyonuna neden olur ve lipid peroksidasyonunun bir ürünü olan MDA seviyesi membranlardaki oksidatif hasarın bir göstergesi (Li ve ark. 2010) olduğundan, çalışmamızda tespit ettiğimiz MDA sonuçlarının çeşitlerin dayanıklılığı hakkında doğru sonuca götüren bir parametre olarak kullanılabileceği düşücesindeyiz. Köse (2012) yaptığı çalışmada, 6 adet kırmızı mercimek çeşidi arasından Malazgirt çeşidinde MDA ve H_2O_2 içeriğinin arttığını Seyran'da ise düşüş olduğunu ve bu parametrelerin stres belirleyici olarak kullanılabileceğini ileri sürmüştür.

Çalışmamızın ikinci aşamasında; ilk aşamada yapılan analizlerin değerlendirilmesi sonucunda; tolerant (Tunca ve Aromatik-1) ve hassas (Gala ve Karacadağ) olduğu düşünülen çeşitlerde tuz stresinin yarattığı oksidatif hasarın seviyesini belirlemek amacıyla; prolin içeriği, toplam çözünebilir protein içeriği ve antioksidan enzimlerden APX, GR, SOD, CAT aktivitesi araştırılmıştır. Bununla birlikte aynı çeşitlerde stres faktörü etkisi altında oluşan ROT söndürme aktivitesi, H_2O_2 miktarı ve SDS-PAGE tekniği ile protein bandları değerlendirilmiştir.

Bitkilerin bulunduğu ortamlarda yüksek konsantrasyonlarda NaCI bulunması su potansiyelini düşürdüğünden bitkilerin su alması zorlaşır ve bu durum ozmotik stres ile sonuçlanır. Bitkiler ozmotik stresle başa çıkabilmek için prolin (Pro) ve glisin-betain gibi uyumlu çözünenleri biriktirme eğiliminde olurlar (Holmström ve ark. 2000; Qureshi ve ark. 2013). Chunthaburee ve ark. (2016) 12 çeltik çeşidinin tolerans düzeyini tolerant Pokkalive hassas IR-29 ile karşılaştırdıkları çalışmalarında, tuz stresinin tüm çeşitlerde prolin birikiminde belirgin bir artışa yol açtığını bildirmişlerdir. Benzer şekilde, yaptığımız çalışmada da 100, 200 ve 300 mM konsantrasyonlarda NaCI uygulamasına maruz bırakılan çeşitlerin prolin içeriğinde artan tuz konsantrasyonuna bağlı olarak artış belirlenmiş ve kontrol gruplarına kıyasla bütün uygulamalar yüksek prolin birikimine yol açmıştır. Çalışmamızda, stres faktörüne karşı yanıt olarak artan prolin birikimi, Mansour (2000)'un belirttiği gibi "serbest prolinin hızlı birikimi tuz stresine tipik bir yanıttır" ifadesi ile örtüşmektedir. Diğer bir çalışmada çevresel strese karşı bitki savunma sisteminde işlevsel ve önemli bir aminoasit olan prolinin (Rai

2002), özellikle tuz stresine maruz bitkilerde diğer amino asitlere göre daha yüksek oranda biriktiği belirlenmiştir. Lutts ve ark. (1999) iki çeltik çeşidinde osmotik düzenleme ve prolin akümülasyonu üzerine tuz stresinin etkisini incelemişlerdir. 3 ve 10 günlük çeltik fidelerine uyguladıkları 50 ve 100 mM NaCI'nin hassas çeşitte daha yüksek oranda prolin birikimine neden olduğunu, prolin birikiminin tolerans mekanizmasında ve osmotik düzenlemede rol almadığını ancak tuzluluk stresinin bir göstergesi olabileceğini belirtmişlerdir. Araştırıcıların belirttiği gibi çalışmamızda da hassas olarak düşünülen Gala ve Karacadağ çeşitlerindeki prolin birikiminin, tolerant olarak belirlenen Tunca ve Aromatik-1'den daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Prolin miktarının daha yüksek olduğu çeşitlerin tuzluluktan dolayı yeterince su alamadığı ve strese bağlı olarak bitkilerde ozmotik stresin yaşandığı sonucunu çıkarabiliriz. Sultana ve ark. (1999) tuz stresi altındaki pirinç bitkilerinde prolinin birikiminin osmotik ayarlamada etkili olduğunu bildirmişlerdir. Hien ve ark. (2003) ise tuzluluğa karşı toleransları farklı üç çeltik çeşidi ile tarla koşullarında gerçekleştirdikleri çalışmada, bitki köklerinde prolin birikiminin arttığını, bu artışın dayanıklı çeşitlerde daha önce başlayıp yüksek seviyelere ulaştığını bildirmişlerdir. Bhattacharjee ve Mukherjee (2002), tuza dayanıklı (Hamilton, SR26B) ve hassas (Ratna) çeltik çeşitleri üzerine yaptıkları çalışmada, 100 mM NaCI uygulamasına maruz bırakılan çeşitlerde prolin birikiminin arttığını, dayanıklı olan 'Hamilton' ve 'SR26B' çeşitlerinde daha yüksek düzeylerde olduğunu rapor etmişlerdir. Nakamura ve ark. (2002), iki yabani (*O. latifolia* Desv. ve *O. rufipogon* Griff.) ile 2 kültür çeltik çeşidinin (dayanıklı 'SR26B' ve hassas 'IR28') fizyolojik reaksiyonlarını araştırdıkları çalışmalarında, osmotik potansiyel ile prolin birikimi arasında ters bir ilişki olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmaların sonuçlarına göre tuz ve kuraklık stresinde bir osmoprotektan olarak prolinin koruyucu rolünün hala tartışmalı bir konu olduğu düşünülmektedir.

Tuzluluk şartları çoğunlukla bitki yapraklarında erken yaşlanmaya neden olmaktadır (Yeo ve ark. 1991). Tuz stresinin etkisiyle osmotik ve iyon homeostasileri etkilenen hücreye, Na^+ ve CI^- iyonlarının fazla miktarda girişi proteinlerin yapılarında biçimsel olarak ya da plazma membranında elektriksel olarak değişimlere yol açar. Proteinlerdeki bu değişimler osmotik stresin algılanmasını sağlar. İyon kanalları, iyon taşıyıcıları, hücre içi ya da plazma membranı üzerindeki iyon bağlı proteinler iyonik stresin ilk algılayıcıları olarak bilinir. Aynı zamanda, iyonların geçişi ve osmotik stresle

ortaya çıkan turgor değişiklikleri bitkilerde tuz stres sinyali için başlangıç görevi görür (Hirt ve Shinozaki 2004). Tuz stresi altında oluşan serbest oksijen radikalleri, proteinleri (Davies 1987) parçalamakta ve sonuçta protein sentezi gerilemektedir (Çakmak ve ark. 1995; Eker 2002). Tuzluluk ve kuraklık stres faktörünün etkisiyle çeşitli bitkilere ait toplam protein içeriğindeki değişimleri rapor eden çalışmalar mevcut olmasına rağmen çeltik çeşitlerinde toplam çözünebilir protein konsantrasyonu üzerine tuz stresinin etkisi ile ilgili çalışmalar oldukça yetersiz bulunmuştur. Öncel ve Keleş (2002) tuz stresi altındaki buğday genotiplerinde çözünebilir protein miktarının genel olarak artış gösterdiğini fakat bu artışın istatistiksel olarak önemsiz olduğunu bildirmişlerdir. Araştırıcıların sonuçlarına benzer şekilde çalışmamızda, genel olarak tüm çeşitlerde toplam çözünebilir protein miktarının değişen oranlarda arttığı ancak istatistiksel anlamda önemsiz olduğu saptanmıştır ($p \leq 0.05$). Bununla birlikte hassas olduğu düşünülen Gala ve Karacadağ çeşitlerinde çözünebilir protein içeriğinde meydana gelen artış değerleri Tunca ve Aromatik-1'e göre daha fazla bulunmuştur. Elde ettiğimiz sonuçların aksine, *Papaver somniferum* L. çeşidinde (Kılınç 2011) stres koşullarında tuzluluk artışına paralel olarak bitkilerin protein miktarlarında azalma gözlenmiştir. Aynı şekilde, Lee ve ark. (2013) tolerant (Pokkali) ve duyarlı (IR 29) çeltik fidelerinde tuz stresinin etkilerini inceledikleri çalışmalarında, IR 29'un kök ve yapraklarına ait çözünebilir protein içeriğinde önemli bir düşüş, Pokkali'nin köklerinde ise ihmal edilebilen bir azalış olduğunu belirtmişlerdir.

Bitkilerin çeşitli abiyotik stres faktörleri altında stres tolerans mekanizmaları ile ilişkili proteinler sentezledikleri bilinmektedir (Muşlu 2010). Bu proteinler genellikle "stres proteinleri" grubu olarak adlandırılırken, bu grup içerisinde tuz stresiyle ilişkili proteinler de yer almaktadır. Tuz stresiyle ilişkili proteinlerin de yer aldığı birçok protein grubu (ROT'larla savaşan proteinler, hücre iskeleti kararlılığını sağlayan proteinler, protein sentezi, işlenmesi, etkinliği ve parçalanmasını kapsayan diğer proteinler, fotosentetik işlevle ilgili olarak klorofil biyosentezi ile ilişkili proteinler, vb.) bazıaraştırıcılar tarafından (Suzuki ve ark. 2012; Barkla ve ark. 2013; Yıldız ve ark. 2014) rapor edilmiştir. Arpa kökleri (Hurkman 1991), çeltiğin kök (Salekdeh ve ark. 2002), sürgün, kültüre alınmış hücreleri (Shirata ve Takagishi 1990) ve çimlenmiş tohumları (Rani ve Reddy 1994), gibi birçok bitkisel organda tuz stresi proteinleri çalışılmıştır. Ancak çeltik yaprağında tuz stresine yanıt olarak protein değişiklikleri

üzerine yapılan çalışmalar yetersizdir. Montalvan ve ark. (1998) SDS-PAGE yöntemini kullanarak 58 Brezilya ve 2 Japon upland *O. sativa* L. çeşidinde tohum proteinlerini incelemiş ve elektroforez profillerinin taranması sonucu 16 protein fraksiyonuna ait konsantrasyonlar ele alınarak çeşitler birbirinden ayrılmıştır. Kong-ngern ve ark. (2005) tuz stresine yanıt olarak SDS-PAGE tekniği ile Tayland çeltiği Thai rice cv. Leaung Anan'ın kök, yaprak kını ve yaprak zarında protein profillerini Pokkali (tolerant) ve Khao Dawk Mali 105 (hassas) ile karşılaştırmalı olarak incelemişlerdir. Özellikle 12 dS m^{-1} NaCI uygulaması, protein deseninde önemli değişikliklere yol açmıştır. Köklerde 90 kDa protein band yoğunluğu ve yaprak kınlarında ise 22 ve 31 kDa protein band yoğunlukları tuz uygulanan bitkilerde kontrollere göre daha baskın olmuştur. Yaprak zarlarında ise tuz uygulaması 55 kDa protein bandından azalmalara yol açmıştır. Araştırıcılar 22-24 kDa protein içeriğinde stresle ile birlikte azalmasını protein sentez oranında azalma, hidroliz enzimlerin aktivitesindeki artma, amino asit kullanılabilirliğinde azalma veya protein ve aminoasit sentezinde rol alan enzimlerde denatürasyon ile ilişkilendirmişlerdir. Çalışmamızda, spektrofotometrik olarak belirlenen çözünebilir protein miktarlarını desteklemek amacıyla hassas ve tolerant çeltik çeşitlerinde SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi yapılmıştır. Çeltik fidelerinin elektroforez sonuçları incelendiğinde, genel olarak tüm çeşitlerde 26-55 kDa'lık protein bölgelerinde band yoğunlukları gözlenmiştir. Ayrıca, hassas olarak kabul edilen Gala çeşidindeki protein band yoğunluğunun tolerant olan Aromatik-1'e göre daha fazla olduğu gözlenmiştir. Çözünebilir proteinlerin spektrofotometrik analizleri incelendiğinde ise, Gala çeşidinde tüm tuz uygulamaları için kontrole göre artma görülmüştür. Buna karşın Aromatik-1 çeşidinde ise tuz konsantrasyonuna bağlı olarak çözünebilir protein miktarları düşük miktarda da olsa azalma göstermiştir. Bu bağlamda, genel olarak SDS-PAGE sonucu çözünebilir protein miktarlarına ait bandlarda meydana gelen değişimler, spektrofotometrik ölçümleriyle de uygunluk göstermiştir. Bay (2009) tarafından yapılan çalışmada elde edilen 20 çeşit çeltiğin tohum depo proteinleri protein markerı (standard) kullanılarak SDS-PAGE ile incelenmiştir. 45 kDa civarinda Glutelin öncüleri, 37-39 kDa civarinda asidik glutelin alt üniteleri, 26 kDa civarinda α-Globulinler, 22-23 kDa civarında bazik glutelin alt üniteleri ve 16-10 kDa aralığında ise prolaminler gözlenmiştir. Araştırıcının sonuçları, SDS-PAGE sistemi ile çeltik çeşitlerinden elde edilen profillerin tüm çeşitler için

genelde birbirine benzediğini göstermiştir. Santos ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada yabani bir pirinç türü olan *O. glumaepatula*'nın 29 genotipinin toplam protein profillerini ve 4 temel protein bileşenini (albümin, globulin, prolamin ve glutelin) 2 ticari çeşitle (*O. sativa*) karşılaştırmalı olarak çalışmışlardır. SDS-PAGE sonucu tüm *Oryza glumaepatula* genotipleri arasındaki albümin profilleri benzer fakat *O. sativa*'dan farklı bulunmuştur. Banerjee ve ark. (2014) tuz stresine yanıt olarak çeltik çeşitlerinde (Swarna, Basmati, CR25) protein düzeylerinde oluşan farklılıkları araştırdıkları çalışmada, çeşitlerde 22&24 KD protein bandlarında değişiklik olduğunu bildirmişler ve tuz konsantrasyonu artışının protein bandı miktarında azalmalara yol açtığını net bir şekilde ortaya koymuşlardır. Abbasi ve Komatsu (2004) çeltiğin bazı bölgelerinde tuzluluğa cevap olarak ifade edilen 5 protein tanımlamışlardır. Bunlardan birincisi (LSY262) yaprak kını ve kökte, üç tanesi (44.8 kDa, fruktoz bifosfat aldolaz; 35.4 kDa, Fotosistem II oksijen dönüştüren kompleks protein; 27.1 kDa, oksijen dönüştüren arttırıcı protein 2) yaprak ayasında ve diğeri de (LSY363) yaprak ayası ve kökte fakat düşük düzeyde belirlenmiştir. Araştırıcılar bu proteinlerin ayrıca düşük sıcaklık ve kuraklık gibi diğer stres faktörleri varlığında da arttığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda da tüm çeşitlerde genel olarak 34-43 kDa'lık bölgede protein bandının daha belirgin olduğu gözlenmiştir. Bu bağlamda, söz konusu band bölgelerinde yoğunluğu olan proteinlerin tuz stresiyle uyarılmış olabileceği sonucu çıkarılabilir. de Souza Filho ve ark. (2003) tarafından yapılan çalışmada 170 mM NaCI stresine maruz bırakılan çeltik bitkilerinin kök, sürgün ve yapraklarında 14.5 kDa SALT proteini ifadesinin uyarıldığı bildirilmiştir. Claes ve ark. (1990) tuza duyarlı cv.Taichung native 1. çeltik çeşidinin hem kök hem yaprak kınlarında çokça üretilen 15 kDa proteinin sentezinde tuzla uyarılan değişiklikler olduğunu bildirmişlerdir. Yaptığımız çalışmada da Karacadağ çeltik çeşidinin 200 ve 300 mM NaCI uygulamalarında tuz stresine bağlı olarak 17-26 kDa arası protein bölgesinde band yoğunluğu gözlenmiştir.

Tuz stres faktörüne maruz kalan bitkiler yaşamsal faaliyetlerini yavaşlatmanın yanısıra stomalarını kapatarak su alımını azaltırlar. Bu şartlar altında bitkilerin CO_2 alımı azalmakta, yeterli CO_2 bulamayan fotosentetik elektronların oksijen (O_2) molekülüne aktarımı gerçekleşmekte ve böylece serbest oksijen radikalleri oluşmaktadır (Sairam ve ark. 2005). Canlı hücrelerdeki serbest oksijen radikallerinin bir kaynağı olan ROT'un; DNA, protein, yağ, fotosentetik pigmentler gibi makro moleküllere ve

membranlara zarar verdiği bildirilmiştir. Stres altındaki bitkilerde antioksidatif savunma sisteminin artışı ROT'ların süpürülmesini sağlar ve böylece tuzluluğa karşı toleransgeliştirilir (Alscher ve ark. 2002). ROT'lara karşı SOD, APX, GR ve CAT gibi enzimler bu radikallerin yok edilmesinde en etkin antioksidatif enzimler olarak bilinmektedir (Sreenivasulu ve ark. 2000; Yasar 2003). Çalışmamızda, tuz stres faktörüne karşı hassas (Gala ile Karacadağ) ve tolerant (Tunca ile Aromatik-1) olduğu düşünülen çeşitlerde antioksidan enzim aktiviteleri (SOD, APX, CAT ve GR) araştırılıp değerlendirilmiştir. Su ve moleküler oksijen için güçlü ve potansiyel olarak zararlı oksitleyici bir ajan olarak H_2O_2 dönüşümünü katalizleyen CAT, bilinen en güçlü katalizördür ve katalizlediği reaksiyonlar yaşam için önemlidir. Tuz stresine yanıt olarak çeşitlerin tümünde NaCI konsantrasyonu arttıkça CAT enzim aktivitesi de kontrol grubuna göre artış göstermiş ancak bu artış sadece Tunca çeşidinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Tolerant olarak belirlenen Tunca ve Aromatik-1 çeşidi için elde ettiğimiz sonuçlara benzer şekilde araştırıcılar, dayanıklı çeşitlerde CAT aktivitesinin duyarlı çeşitlere göre daha yüksek olduğunu ve bu enzim aktivitesinin tuz uygulaması ile arttığını bildirmiştir (Shalata ve Tal 1998; Yasar 2003). Sonuç olarak, stres koşullarında Tunca ve Aromatik-1 çeşitlerindeki CAT artışının, hassas olarak seçilen Gala ve Karacadağ'dan daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda tuz stres faktörüne yanıt olarak antioksidatif enzim aktivitelerinde değişen artışların olduğunu bildiren çalışmalar (Kim ve ark. 2005; Sekmen ve ark. 2007; Noreen ve Ashraf 2009; Tarchoune ve ark. 2010) sonuçlarımızı destekler niteliktedir.

Askorbat-glutatyon döngüsünün son enzimi olan glutatyon redüktaz (GR), bitkilerin oksidatif stresten korunmalarında önemli rol oynar (Foyer ve ark. 1991). Araştırmamızda tuz stresinin çeşitlerde neden olduğu oksidatif streste işlevsel olan GRenzim aktivitesinin tüm çeşitlerde arttığı belirlenmiştir. Ancak hassas olduğu düşünülen Gala ve Karacadağ çeşitlerinde ise söz konusu aktivite değerleri daha düşük bulunmuştur. *Bruguiera parviflora* bitkisinde tuz stresine yanıt olarak GR aktivitesindeki artış, elde ettiğimiz sonuçlarla benzerlik göstermektedir (Parida ve ark. 2004). Diğer bir çalışmada (Shalata ve Tal 1998), tuz stresi altında duyarlı ve toleranslı iki domates çeşidinin yapraklarında GR aktivitesinde düşüş gözlendiği bildirilmiştir. Duyarlı genotiplerde tolerant olanlara göre GR aktivitesinde görülen daha yüksek orandaki düşüş, bu genotiplerde yapısal düzenlemenin daha hassas olduğunu (Demiral

ve Türkan 2005) ve düşen GR aktivitesinin strese duyarlılığı artırmış olabileceği fikrini doğurmuştur (Aono ve ark. 1995).

SOD; H_2O_2'yi üretmek için süperoksit radikalleri ($O_2^{\bullet-}$) ile tepkimeye girerek (Bowler ve ark. 1992) $O_2^{\bullet-}$'nin yok edilmesinde belirleyici enzimdir. SOD enzimi, $O_2^{\bullet-}$ 'yi ortadan kaldırmakta fakat bunun sonucunda toksik özelliği yine çok yüksek olan bir başka madde olan hidroksil radikali ($HO^{\bullet}$) oluşmaktadır. Birçok çalışmada tuz uygulamalarının SOD aktivitesini arttırdığı (Lin ve Kao 2000; Yasar 2003; Yasar ve ark. 2008) ve tuza dayanıklı genotiplerin SOD aktivitesinin hassaslara göre daha yüksek çıktığı belirtilmektedir (Shalata ve Tal 1998; Aktas 2002). Uygulama yapılan tüm çeşitlerde, NaCl konsantrasyonunun artışı diğer enzimlerde olduğu gibi SOD aktivitesi bakımından da farklı değişimlere yol açmıştır. Kontrol ile kıyaslandığında tuzluluğun artışı tüm çeşitlerde; SOD enzim aktivitesini arttırmıştır. Turan ve Tripathy (2013) tolerant CSR 10 ve hassas PB-1 çeltik çeşitlerinin antioksidan enzim aktiviteleri üzerine tuzluluğun etkisini araştırdıkları çalışmada, CSR10'un kontrol koşullarında duyarlı PB-1'den daha yüksek SOD aktivitesi gösterdiğini bildirmişlerdir. Yaptığımız çalışmada, diğer antioksidan enzim aktivitelerinde olduğu gibi SOD için de en düşük değerler hassas olarak seçilen Gala ve Karacadağ çeşitlerinden alınırken en yüksek değerlere Tunca ve Aromatik-1 çeşitleri sahip olmuştur.

H_2O_2'yi suya indirgeyen APX, bitkilerde askorbat-glutatyon döngüsünde kilit rol oynar (Foyer ve Lelandais 1996; Asada 1997). Bitkilerde APX aktivitesinin tuz stresi altında artmış olduğu ve meydana gelen bu artışın tolerant çeşitlerde daha yüksek bulunduğu önceki çalışmalarda bildirilmiştir (Shalata ve Tal 1998; Sreenivasulu ve ark. 2000; Karanlık 2001). Deneysel sonuçlarımıza göre APX enzim aktivitesi, tolerant olarak seçilen Aromatik-1 ve Tunca çeşitlerinde daha yüksek bulunmuştur. Diğer çeşitler ile kıyaslandığında, APX aktivite değerleri Gala çeşidinde düşük bulunmuş ve 300 mM NaCI uygulamasına yanıt olarak söz konusu çeşit için en düşük aktivite değeri alınmıştır. Çalışmamızın sonuçlarına benzer şekilde *Hordeum vulgare* (Kim ve ark. 2005), *Plantago maritima* (Sekmen ve ark. 2007) ve *Brassica campestris* (Hernández ve ark. 2010) bitkilerinde tuz stresi altında APX aktivitesinde artış olduğu araştırıcılar tarafından bildirilmiştir.

Tuz stresinin çeltik bitkisinde yarattığı antioksidatif enzim değişmelerini araştıran Dioinisio-Sese ve Tobita (1998) duyarlı Hitomebore genotipinin SOD aktivitesinde azalma, APX aktivitesinde ise artış olduğunu aksine tuza dayanıklı Pokkali'de ise SOD aktivitesinin çok az artmasına karşın, APX aktivitesinde çok az düşüş olduğunu bildirmişler. Araştırıcılar tuz toleransına bağlı olarak çeltik çeşitlerinde değişen prolin içeriği, lipid peroksidasyonu ve antioksidan savunma sistemlerinin karşılaştırılmasından elde edilen sonuçların, bitkilerde tolerans mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasında yararlı olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Önceki araştırmaların sonuçlarına benzer şekilde çalışmamızda, stres faktörüne karşı Tunca ve Aromatik-1'de lipid peroksidasyonu seviyesinin düşük; GR, SOD, CAT ve APX enzim aktivitelerinin ise yüksek olmasının korunma amaçlı olduğunu ve bu çeşitlerin daha etkili bir antioksidatif sisteme sahip olduğunu ifade edebiliriz. Araştırmamızdan elde ettiğimiz sonuçlara benzer şekilde Vaidyanathan ve ark. (2003), tolerant Pokkali çeltik çeşidinin yapraklarında CAT, APX ve GR enzimlerinin aktivite değerlerinin yüksek olduğunu, SOD aktivitesinde ise çok az bir artış meydana geldiğini bildirmişlerdir.

Normal büyüme koşulları altında bitkilerde ROT'un üretimi ile süpürülmesi arasında bir denge vardır. Bitki çevresel stres faktörü ile karşılaştığında bu denge bozulur ve oksidatif strese yol açan ROT elemanları hücrede birikir. Her bir antioksidan enzim (SOD, CAT, APX, GR) belirli bir işlevi yerine getirir ve aktiviteleri ROT detoksifikasyonunda belirli bir role sahiptir (Abogadallah 2010).SOD, $O_2^{\bullet-}$'yi daha çok CAT ve çeşitli peroksidazlar tarafından süpürülen H_2O_2'ye dönüştürür. APX, H_2O_2'nin eliminasyonundan, CAT ise H_2O_2'nin suya ve oksijene dismutasyonundan sorumludur. Sharma ve ark. (2012) APX'in H_2O_2'ye duyarlılığının CAT enziminden daha fazla olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca APX, GR ile birlikte Halliwell–Asada yolu ile H_2O_2'yi suya indirgemede anahtar rol oynar (Noctor ve Foyer 1998). Bitkilerde metabolizmanın antioksidanları aktif formlarında tutma yeteneği antioksidan savunma sisteminin etkinliği tarafından belirlenmektedir. Bu durum bitkilerin ROT'lara karşı gösterdikleri cevaplardaki farklılıkları ve tolerans seviyelerini ortaya çıkarmaktadır. Son yıllarda tuz stresinin oksidatif zararları ile ilgili yapılan araştırmalarda, toksik O_2 türevlerini yok etmekten sorumlu antioksidatif enzimlerin, dayanıklı genotiplerde duyarlılara göre daha yüksek düzeyde bulunduğu ve tuz stresine dayanıklı genotiplerin daha az lipid ve protein tahribatına uğradıkları bildirilmiştir (Hernández ve ark. 2000; Akçalı 2014).

Çalışmamızda, $O_2^{\bullet-}$ giderme aktivitesi bakımından yapılan analizde; tüm çeşitlerin genel olarak $O_2^{\bullet-}$ radikali giderme aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir. Uygulanan tüm tuz konsantrasyonlarında, çeşitlerin söndürme aktivitesi pozitif kontrol olarak kullanılan BHT'ye göre yüksek bulunmuştur. Deneysel sonuçlarımıza göre, tuza tolerant çeşitlerin $O_2^{\bullet-}$' söndürme aktivitesinin yüksek olması tuz stresi sonucu üretilen $O_2^{\bullet-}$'yi yok etmek için SOD'un yeterli olabileceğini göstermiştir.

$HO^{\bullet}$ radikallerinin mevcut biyolojik sistemlerde birçok bileşikle reaksiyona girdiği ve biyolojik membranlarda hasara yol açtığı bilinmektedir (Halliwell ve Gutteridge 1989). Araştırmamızda bitki ekstraktlarının $HO^{\bullet}$ radikalini söndürme aktivitesi incelendiğinde; pozitif kontrollerde (BHT ve BHA) olduğu gibi çeşitlerin tüm uygulamalarında benzer ve düşük değerler elde edilmiştir. $HO^{\bullet}$ bakımından en düşük inhibisyon yüzdesi, 300 mM NaCI uygulama grubundaki Karacadağ çeşidine ait 1 µg ml^{-1} ekstresinde görülürken, yüksek ve pozitif kontrollere en yakın aktivite değerleri ise 100 mM NaCI'ye maruz bırakılan Tunca çeşidinin 20 µg ml^{-1} ekstresinden alınmıştır.

Üretildiği yerden diğer hücrelere ve hücre içindeki çeşitli organellere taşınabilen H_2O_2, sekonder haberci gibi davranabilen bir metabolittir, CAT (Prasad ve ark., 1994) ve APX (Morita ve ark. 1999) gibi stres koruyucuları içeren genleri ve proteinleri uyardığı bilinmektedir. Yüksek konsantrasyonlardaki H_2O_2 Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonlarıyla ayrıca HO• radikaline dönüşerek lipid peroksidasyonunun artmasına, nükleik asit, lipid ve protein gibi hücresel moleküllerde oksidatif zarara yol açar (Michalak 2006; Hichem ve ark. 2009). Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlara göre, uygulama (0-300 mM NaCI) yapılan Gala ve Karacadağ çeşitlerinde genel olarak bitki ekstraktlarınıntüm konsantrasyonlarında H_2O_2 giderme aktivitesi zayıf bulunmuştur. Bu çeşitlerde süpürme aktivitesinin zayıf olması, H_2O_2'nin süpürme enzimi olan CAT ve APX'in yeterli seviyede aktivite gösteremediğinden kaynaklanmış olabilir**.** Bununla birlikte H_2O_2 süpürülmesi bakımından en yüksek aktivite Tunca çeltik çeşidinin 200 mM NaCI uygulamasının 400 µg ml^{-1} ekstresinde görülmüştür.

Tuzluluğa yanıt olarak bitkilerde H_2O_2 üretimi ile alakalı farklı çalışmalar literatürde yer almıştır. Tuzluluk stresi altında H_2O_2 içeriğinin *Brassica oleracea*'da (Hernández ve ark. 2010) arttığı veya *Pisum sativum*'da değişmeden kaldığı (Noreen ve Ashraf 2009), veya arpada azaldığı (Kim ve ark. 2005) rapor edilmiştir. Çalışmamızda,

test edilen uygulamalardan sonra tüm çeşitlerin H_2O_2 içeriğinde artış görülmüş ve H_2O_2 miktarları kontrol grubuna göre yüksek değerlerde bulunmuştur. Senadheera ve ark. (2012) tarafından yapılan çalışmada tuz stresine yanıt olarak (50 mM NaCI) tuza toleant FL478 çeltik çeşidinin köklerinde duyarlı IR-29 çeşidine göre daha fazla H_2O_2 birikimi olduğu belirtilmiştir. Chuan ve Ching (1999), NaCI etkisindeki çeltik fidelerinin köklerinde H_2O_2 miktarında görülen değişimleri inceledikleri çalışmalarında, yüksek NaCI uygulamasında H_2O_2 seviyesinin arttığını bildirmişlerdir. Singha ve Choudhuri (1990), tuzluluk stresi altında *Vigna* ve *Oryza* fidelerinin yapraklarında H_2O_2 birikiminin CAT aktivitesinde düşüşle ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Araştırıcıların bu sonucu ile uyumlu olarak; çalışmamızda hassas olarak seçilen Gala ve Karacadağ çeşitlerinde H_2O_2 içeriğinde meydana gelen artışlar, söz konusu çeşitlerdeki daha düşük CAT aktivitesi ile ilişkilendirilebilir. Diğer bir ifade ile yüksek seviyede toksik olan H_2O_2'nin uzaklaştırılması katalaz ve peroksidaz enzimleri aracılığıyla gerçekleştirilir. Peroksizomlarda yer alan katalaz, H_2O_2'nin su ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizler. Peroksidaz enzimi aynı işlevi, fenolik birleşikler veya antioksidanlar gibi substratların oksidasyonuyla gerçekleştirir (Pan ve ark. 2006). En yüksek (300 mM) tuz konsantrasyonunda tolerant oldukları düşünülen Tunca ve Aromatik-1 çeltik çeşitlerinin H_2O_2 miktarı kontrollerine göre çok düşük miktarlarda artış göstermiştir. Literatür bilgilerine göre çalışmamızda daha düşük miktardaki H_2O_2, artan CAT ve APX aktivitelerinin SOD tarafından üretilen H_2O_2'yi detoksifiye etmiş olabileceğinin bir kanıtıdır. Khan ve Panda (2008) yaptıkları çalışmada, NaCI uygulaması ile strese tabi tutulan Lunishree ve Begunbitchi'nin köklerinde CAT ve SOD aktivitelerinde düşüş meydana geldiğini bildirmişlerdir. Araştırıcılar, her iki çeşitte de azalan CAT aktivitesinin, Haber–Weiss reaksiyonu sonucu $HO^{\bullet}$ radikallerine dönüşen, H_2O_2 birikimini teşvik etmiş olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Chawla ve ark. (2013) tuza tolerant ve hassas çeltik çeşitlerinde tuzluluğun oksidatif strese etkisini incelemişlerdir. Tuzluluğun artışıyla birlikte tüm çeşitlerde $O_2^{\bullet-}$ ve H_2O_2 miktarlarında artış olduğunu ve bunun duyarlı çeşitlerde daha fazla ve önemli, tolerant olanlarda ise önemsiz olduğunu bildirmişlerdir. Araştırıcı tuz koşullarında duyarlı çeşitlerde daha fazla artan $O_2^{\bullet-}$ ve H_2O_2 miktarlarının bu çeşitlerde, membran lipidlerine saldırararak oksidatif stresin oluşmasında önemli rol oynuyor olabileceğini bildirmiştir. Oksidatif stresle başa çıkmada ROT süpürücü sistemin rolünü belirlemek için tuza tolerant ve hassas

çeşitlerde SOD, CAT, GR, APX ve POX enzim aktiviteleri de incelenmiştir. Tuza toleranslı çeşitlerde enzim aktiviteleri tuzluluğun artışıyla beraber artış gösterirken, duyarlı olanlarda gerilemiştir. Çalışmamızda da tolerant olarak seçilen Tunca ve Aromatik-1 çeltik çeşitlerinde SOD, GR, APX ve CAT enzim aktivitelerinde hassas olarak seçilen Gala ve Karacadağ'dan daha yüksek seviyelere çıkmıştır. Lee ve ark. (2013) tuza tolerant (Pokkali) ve hassas (IR-29) iki çeltik çeşidinde antioksidan cevaplar üzerine tuzluluğun etkisin inceledikleri çalışmada IR-29'da APX, CAT ve POD aktivitelerinde yüksek artışlar olduğunu belirtmişlerdir. Meydana gelen bu artışların, tuza toleranstan ziyade tuz duyarlılığı ile ilişkili olarak oksidatif stres ile ilişkili sinyal yolları vasıtasıyla uyarılmış olabileceği araştırıcılar tarafından vurgulanmıştır. Chunthaburee ve ark. (2016) 12 çeltik çeşidini, tolerans düzeyleri uluslararası olarak tescillenmiş 2 çeşit ile (tolerant Pokkali, hassas IR 29) karşılaştırdıkları çalışmalarında, tuza duyarlı çeltik çeşitlerinde H_2O_2 birikiminin, tolerant olanlara kıyasla daha fazla olduğunu belirtmişlerdir.

Turan ve Tripathy (2013) tarafından yapılan bir çalışmada, kontrol koşullarında, tuza tolerant CSR10'un SOD, GR, APX ve CAT aktiviteleri, tuza duyarlı PB-1'den daha yüksek bulunmuştur. Araştırıcılar antioksidatif enzim artışının, stresin etkisini gidermek için tuza toleranslı çeşitte erken başlamasından kaynaklı olabileceğini bildirmişlerdir. Stres faktörüne karşı bitkilerde oluşan antioksidatif yanıt; üretilen reaktif oksijen türleri, bazı enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar tarafından yönetilen karmaşık bir süreçtir. Tuz stresine yanıt olarak tolerant çeşitlerde bulunan daha iyi antioksidan koruma mekanizması ve dolayısıyla daha yüksek radikal süpürme gücü, lipid peroksidasyonu derecesinin daha düşük düzeylerde olmasının bir sonucudur. Çalışmamızda, çeltik çeşitlerinde tuz stresine yanıt olarak antioksidan enzim aktivite değerlerinde oluşan farklılığın, çeşitlerin tolerant veya hassaslık durumları ile yakından ilişkili olduğunu düşündürmektedir. Tuz stresi ile karşı karşıya kalan bitkilerde toksik radikallerin ortadan kaldırılmasında etkili olan bu antioksidatif enzim aktivitelerinde artış sağlayabilen çeşitlerin tuz stresine dayanımı da yüksek olmaktadır (Gossett ve ark. 1994; Sreenivasulu ve ark. 2000). Tuza dayanımdaki farklılıkların geçerliliğini belirlemek için birçok çalışma yapılmalıdır. Böylece, farklı bitki türlerinde oksijen türevlerine karşı korunma mekanizmalarındaki değişiklikler ile ilgili görüşlerin ortaya çıkması sağlanabilir (Ashraf ve Harris 2004).

Tüm bu literatür bilgileri ışığında; çalışmamızda tuza duyarlı olarak seçilen Gala ve Karacadağ çeşitlerinde radikallerin, membran hasarı ve lipid peroksidasyonunu hızlandırmış olabileceği fikrini doğurmuştur. ROT söndürmede kullanılan enzim piramidi abiyotik strese toleranslı bitki elde etmede kullanılabilir. Bu nedenle, ROT söndürme kabiliyeti olan ve hücresel ROT düzeyini kontrol edebilen bitkiler gelecekte zorlu çevresel streslerle başa çıkmada yararlı olabilir (Gill ve Tuteja 2010). Bu bağlamda, yapılan bu tez çalışması farklı/aynı türlerde tuzluluk toleransı ile ilgili mekanizmaların karşılaştırılması; tuzluluk toleransını büyük ölçüde sağlayan ve moleküler mekanizmaları belirleyen düzenleyici noktaları anlamak için temel olabilir.

Önceki çalışmalar doğrultusunda sonuçlarımızı değerlendirdiğimizde, hücresel seviyedeki biyokimyasal göstergelerle ilgili yeni bilimsel verilerin tuzluluğa karşı toleranslı tarımsal ürünlerin seçiminde güçlü bir kriter olabileceğini söyleyebiliriz. Bu nedenle, tüm dünyada önemli bir besin kaynağı olarak tüketilen çeltik bitkisinde antioksidatif yanıtlar üzerine tuzluluğun etkisini çalışmak oldukça önemli bir hale gelmiştir. Araştırmalardan elde edilecek bilimsel sonuçlar tuza toleranslı çeltik çeşitlerinin üretilmesine ve seçilmesine katkıda bulunabilir.

6. KAYNAKLAR

Abbasi, F., Komatsu, S. 2004. A proteomic approach to analyze salt-responsive proteins in rice leaf sheath. ***Proteomics,*** 4: 2072-81.

Abogadallah, G.M. 2010. Antioxidative defense under salt stres. ***Plant Signal Behav.***, 5: 369-374.

Acosta-Motos, J.R., Diaz-Vivancos, P., Alvarez, S., Fernandez-Garcia, N., Sanchez-Blanco, M.J., Hernandez, J.A. 2015. Physiological and biochemical mechanisms of the ornamental Eugenia myrtifolia L. plants for coping with NaCl stress and recovery. ***Planta***, 242: 829–846.

Aebi, H. 1984. Catalase *in vitro*. ***Methods In Enzymol.***, 105: 121-126.

Ahmadi, A., Emam, Y., Pessarakli, M. 2009. Response of various cultivars of wheat and maizeto salinity stress. J. ***Agric. Environ.***, 7 (1): 123-128.

Akçalı, N. 2014. Tuz stresi altındaki kanola fidelerinde lipoik asit ve salisilik asit uygulamalarının bazı biyokimyasal parametreler ve proteom değişimleri üzerine etkilerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Afyon.

Aktaş, H. 2002. Biberde tuza dayanıklılığın fizyolojik karakterizasyonu ve kalıtımı. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.

Alia, P., Pardha, S. 1991. Proline accumulation under heavy metal stress. ***J. Plant Physiol.***, 138 (5): 554-558.

Alia, P.,Hayashi, H., Sakamoto, A., Murata, N. 1998. Enhancement of the tolerance of Arabidopsis to high temperatures by genetic engineering of the synthesis of glycinebetaine. ***Plant J.,*** 16 (2): 155–161.

Alia, P.,Kondo, Y., Sakamoto, A., Nonaka, H., Hayashi, H., Saradhi, P.P., Chen, T.H.H., Murata, N. 1999. Enhanced tolerance to light stress of transgenic Arabidopsis plants that express the codA gene for a bacterial choline oxidase. ***Plant Mol. Biol.,*** 40 (2): 279–288.

Alian, A., Altman, A., Heuer, B, 2000. Genotypic Difference in Salinity and Water Stress Tolerance of Fresh Market Tomato Cultivars. ***Plant Sci.***, 152 (1): 59-65.

Amirjani, M.R. 2010. Effects of salinity stress on growth, mineral composition, proline content, antioxidant enzymes of soybean. ***Am. J. Physiol.***, 5 (6): 350-360.

Alamgir A.N.M., Ali M.Y. 1999. Effect of salinity on leaf pigments, sugar and protein concentrations and chloroplast ATPAase activity of rice (*Oryza sativa* L.). ***Bangl. J. Bot.***, 28 (1): 145–149.

Aloni, B., Rosenstein, G. 1984. Prolin accumulation: a prameter for evaulation of sensitivity of tomato varieties to drought stress. ***Physiol. Plant.***, 61 (2): 231-235.

Alscher, R.G., Erturk, N., Heatrh, L.S. 2002. Role of superoxide dismutases (SODs) incontrolling oxidative stress in plants. ***J. Exp. Bot.***, 53 (372): 1331-1341.

Anonim. 2011.Ulusal Hububat Konseyi Çeltik Raporu Erişim: [http://www.pdd.org.tr/libs/filemanager/28_11_2011_ELT_K_ULUSAL_HUBUBAT_KONSEY_RAPORU.pdf]. Erişim Tarihi: 11.11.2013.

Aono, M., Saji, H., Sakamoto, A., Tanaka, K., Kondo, N., Tanaka, K. 1995. Paraquat tolerance of transgenic *Nicotiana tabacum* with enhanced activities of glutathione reductase and superoxide dismutase. ***Plant Cell Physiol.,*** 36 (8): 1687–91.

Arnon, D.I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in Beta vulgaris. ***Plant Physiol.***, 24 (1): 1-15.

Asada, K. 1997. The role of ascorbate peroxidase and monodehydroascorbate reductase in H_2O_2 scavenging in plants. Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses. ***Cold Spring Harb Perspect Biol.***, 34 (1): 715–735.

Asch, F., Dörfling, K., Dingkun, M. 1995. Response of rice varieties to soil salinity ve air humidity: A possible involvement of root- borne ABA. ***Plant Soil***, 177 (1): 11- 19.

Ashraf, M. 1994. Breeding for salinity tolerance in plants.***CRC Crit. Rev. Plant Sci.,*** 13(1): 17-42.

Asraf, M., Arfan, M., Ahmad, A. 2003. Salt Tolerance in Okra: Ion Relations and Gas Exchanges Characteristics. ***J. Plant Nutr.***, 26 (1): 63-79.

Ashraf, M., Harris, P.J.C. 2004. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. ***Plant Sci.***, 166 (1): 3-6.

Ashraf, M., Foolad, M.R. 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. ***Environ. Exp. Bot.***, 59 (2): 206-216.

Ashraf, M., Harris.,P.J.C. 2013. Photosynthesis under stressful environments: An Overvie. ***Photosynthetıca***, 51 (2): 163-190.

Aslan, A. 2004. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi ile proteinlerin analizi, Yüksek Lisans Semineri, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.

Aspinall, D., Paleg, L.G. 1981. Proline accumulation: physiological aspects. The Physiology and Biochemistry of Drought Resistance in Plants. ***Plant Physiol.***, 135(3): 205–241.

Bal, A.R., Qadar, A., Joshi, Y.C., Rana, R.S. 1984. Free proline accumulation under salt strees in wheat and barley. ***J. Agric. Food Chem.***, 8 (1): 91-95.

Banerjee, S., Beura, R., Mishra, A.B. 2014. Variation in proteın level of rıce due to salt stres. ***WJPPS,*** 4 (1): 1460-1465.

Barkla, B., Vera-Estrella, R., Pantoja, O. 2013. Progress and challenges for abiotic stress proteomics of crop plants. ***Proteomics***, 13 (12-13): 1801-1815.

Basak, B., Pramanik, A.H., Rahman, M.S., Tarafdar, S. U., Roy, B.C. 2002. Azolla (Azolla pinnata) as a feed ingredient in broiler ration. ***Intern. J. Poult. Sci.***, 1 (3): 29-34.

Bates, L.S., Waldren, R.P. and Teare, I.D. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. ***Plant Soil,*** 39 (1): 205-207.

Bay, S. 2009. Türk Çeltik Çeşitlerinin (*Oryza satıva* L.) Tohum Depo Proteinleri ve Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Belirleyicileri ile Genetik Analizi. Yüksek Lisans Tezi, Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş.

Ben Hassine, A., Ghanem, M.E., Bouzid, S., Lutts, S. 2008. An inland and a coastal population of the Mediterranean xero-halophyte species Atriplex halimus L. differ in their ability to accumulate proline and glycinebetaine in response to salinity and water stress. ***J. Exp. Bot.,*** 59 (6): 1315–1326.

Bergmann, W. 1992. Nutrition disorders of plants-development. ***Visiual and Analitycal Diagnosis,*** 72 (1): 91-95.

Bertin, J., Hermardinquer, J.J., Keul, M. and Randles, W.G.L. 1971. Atlas of Food Crops. Geographical and chronological survey for an atlas of world history. ***Mouton***, 41p, 18 maps.

Bhattacharjee, S., Mukherjee, A.K. 2002. Salt stress-induced cytosolute accumulation, antioxidant response and membrane deterioration in three nice cultivars during early germination. ***Seed Sci. Technol.***, 30 (1): 279-287.

Bhattachrjee, S. 2005. Reactive oxygen species and oxidative burst: roles in stress, senescence and signal transduction in plant. ***Curr. Sci.***, 89 (7): 1113-1121.

Bonilla, I., El-Hamdaoui, A., Bolanos, L. 2004. Boron and calcium increase Pisum sativum seed germination and seedling development under salt stres. ***Plant Soil***, 267(1-2): 97-107.

Bowler, C., Van montagu, M., Inze, D. 1992. Superoxide dismutase and stres tolerance. ***AnnuRev Plant Physiol Plant Mo. Biol.***, 43 (1): 83-116.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. ***Anal Biochem.***, 72 (1-2): 248-254.

Bressan, M., Mougel, C., Dequiedt, S., Maron, P.A., Lemanceau, P., Ranjard, L. 2008. Response of soil bacterial community structure to successive perturbations of different types and intensitie. ***Wiley Online Library***, 10 (8): 2184–2187.

Britt, A.B. 1999. Molecular genetics of DNA repair in higher plants. ***Trends Plant Sci.***, 4 (1): 20–25.

Cavailari, A. J., Huang, A.H.C. 1976. Evaluation of prolin accumulation in the adaptation of diverse spcies of marsh hallophytes to the saline environment. ***Am J Bot.***, 66 (3): 307-312.

Chalapathi Rao, A.S.V., Reddy, A.R. 2008. Glutathione Reductase: a Putative Redox Regulatory System in Plant Cells Sulfur Assimilation and Abiotic Stress in Plants. ***Elsevier,*** Chapter 6: 111-147.

Chang, T.T., Bardenas, E.A. 1965. The morphology and varietalcharacteristic of the rice plant. ***Ins. Rice Tech. Bull.***, 4 (6): 5-166.

Chartzoulakis, K., Klapaki, G. 2000. Response of two green house pepper hybrids to NaCl salinity during different growth stages. ***Sci. Horti.***, 86 (3): 247-260.

Chawla, A., Batra, C. 2013. Recent advances of Quinazolinone derivatives as marker for various biological activities. ***IRJB***, 4 (3):49-58.

Chen, T. H., Murata, N. 2002. Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. ***Curr. Opin. Plant Biol.***, 5(3): 250-257.

Chen, C., Marcus, A., Li, W., Hu, Y., Calzada, J.P., Grossniklaus, U., Cyr, R.J., Ma, H. 2002. The *Arabidopsis* ATK1 gene is required for spindle morphogenesis in male meiosis. ***Development***, 129 (10): 2401-2409.

Chen, C., Dickman, M.B. 2005. Proline suppresses apoptosis in the fungal pathogen *Colletotrichum trifolii*. ***PMCID,*** 102 (9): 3459- 3464.

Chen, H.J., Chen, J.Y., Wang, S.J. 2008. Molecular regulation of starch accumulation in rice seedling leaves in response to salt stres. ***Acta Physiol Plant.***, 30 (2): 135-142.

Chinnusamy, V., Zhu, J.-K. 2003. Plant salt tolerance. Topics calcium-binding protein SOS3. ***Curr. Genet.***, 4 (9): 241–270.

Chuan, C.L., Ching, H.K. 1999. NaCI induced changes in ionicallybound peroxidase activity in roots of rice seedlings. ***Plant and Soil***, 216 (1-2): 147-153.

Chunthaburee, S., Dongsansuk, A., Sanitchon, J., Pattanagul, W., Theerakulpisut, P. 2016. Physiological and biochemical parameters for evaluation and clustering of rice cultivars differing in salt tolerance at seedling stage. ***Saudi J Biol Sci.***, 23 (4): 467–477.

Claes, B., Dekeyser, R., Villarroel, R., Van den Bulcke, M., Bauw, G., Van Montagu, M., Caplan, A. 1990. Characterization of rice gene showing organ-specific expression in response to salt stress and drought. ***The Plant Cell,*** 2 (1): 19-27.

Corpas, F.J., Palma, J. M. 2008. Peroxisomal xanthine oxidoreductase: Characterization of the enzyme from pea (*Pisum sativum* L.) leaves. ***J.Plant Physiol.***, 165(13): 1319-1330.

Creissen, G., Edwards, E.A., Mullineaux, P.M. 1994. Glutathione reductase and ascorbate peroxidase. In Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants. Editors: Foyer, C.H. and Mullineaux, P.M. Boca Raton, FL: ***CRC,*** Chapter 2: 343-364.

Çakmak, İ., Atlı, M., Kaya, R., Evliya, H., Marschner, H. 1995. Association of high light and zinc deficiency in cold induced leaf chlorosis in grapefruit and mandarin trees. ***J. Plant Physiol.,*** 146 (3): 355-360.

Çavdar, C., Sifil, A., Çamsarı, T. 1997. Doğal antoksidanların önemi. ***Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi***, 92: 3-4.

Daşgan, H.Y., Aktaş, H., Abak, K., Çakmak, İ. 2002. Detemination of screening techniques to salinity tolerance in tomatoes and investigation of genotype reponses. ***Plant Sci.***, 163 (4): 695-703.

Davies, K.J. 1987. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. ***J. Biol. Chem.***, 262(20): 9895-901.

Davies, K.J.A. 2001. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. ***IUBMB Life,*** 50 (4-5): 279-289.

Davenport, R., James, R.A., Zakrisson-Plogander, A., Tester, M., Munns, R. 2005. Control of sodium transport in durum wheat. ***Plant Physiol.,*** 137 (3): 807–818.

de Souza Filho, G.A., Frreiraa, B.S., Diasa, J.M., Queiroza, K.S., Brancoa, A.T., Bressan-Smithb, R.E., Oliveirab, J.G., Garciaa, A.B. 2003. Accumulation of SALT protein in rice plants as a response to environmental stresses. ***Plant Sci.***, 164 (4): 623- 8.

Del Rio, L.A., Sandalio, L.M., Corpas, F.J., Palma, J.M., Barroso, J.B. 2006. Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. ***Plant Physiol.***, 141 (2): 330-335.

Demiral, T., Türkan, I. 2005. Comparative lipid peroxidation, antioxidant defensesystems and proline content in roots of two ricecultivars differing in salt tolerance. ***Environ. Exp. Bot.***, 53 (3): 247–257.

Desikan, R., Hancock, J. 2004. Oxidative stress signalling plant responses to abiotic stress. Editors: Hirt, H., Shinozaki, K. ***Springer***, 4 (3): 121-149.

Dionisiosese, M.L., Tobita, S. 1998. Antioxidant response of rice seedlingsto salinity streess. ***Plant Sci.***, 135 (1): 1-9.

Donduran, Ö.D. 2014. Ülkemizde işlenen bazı çeltik çeşitlerinin kalite ve biyoaktif özelliklerinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Çanakkale.

Du, N., Liu, X., Li, Y., Chen, S., Zhang, J., Ha, D., Deng, W., Sun, C., Zhang, Y., Pijut, P.M. 2011. Genetic transformation of Populus tomentosa to improve salt tolerance. ***Plant Cell Tissue Organ Cult.,*** 108 (2): 181– 189.

Dubey, R.S. 1997. Protein synthesis by plants under stres fulconditions, ***Handbook of Plant and Crop Stress,*** Editor: Pessarakli, M., Dekker, M. 859-875. New York.

Duncan, D.B. 1955. Multiple range and multiple F test. ***Biometrics***, 11 (1): 1-42.

Edwards, E.A., Rawsthorne, S., Mullineaux, P.M. 1990. Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum* L.). ***Planta,*** 180 (2): 278-284.

Eker, S. 2002. Yapraktan Azot Uygulamasının Limon ve Mandarinde Düşük Sıcaklık Stresine Etkisinin Antioksidatif Savunma Mekanizmaları Açısından Araştırılması. Doktora Tezi. Çukurova Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Adana.

Ekmekçi, E., Apan, M., Kara, T. 2005. Tuzluluğun bitki gelişimine etkisi. ***J. Fac. Agric.***, OMU, 20 (3): 118-125.

El-Hendawy, S.E., Hu, Y., Yakout, G.M., Awad, A.M., Hafiz, S.E., Schmidhalter, U. 2005. Evaluating salt tolerance of wheat genotypes using multiple parameters. ***Eur J Agron.,*** 22 (3): 243-253.

Ellialtıoğlu, Ş., Tıpırdamaz, R. 1998. Doku kültürünün tuz stresine dayanıklılıkta kullanımı. Bitkilerde Stres Fizyolojisinin Moleküler Temelleri Sempozyumu, 22-26 Haziran 1998, Bornova-İzmir, 70-81.

Emen, S. 2006. *Cyclotrichium niveum* bitkisinin farklı polariteye sahip çözücüler ile hazırlanan ekstraktlarının antioksidant ve DNA'yı serbest radikallerden koruma etkilerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Dicle Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır.

Ergene, A. 1982. Toprak Bilgisi. Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Yayınları, Erzurum.

Eyidogan, F., Öz, M. 2007. Effect of salinity on antioxidant responses of chickpea seedlings. ***Acta Physiol. Plant.***, 29 (1): 485-493

Fam, S.S.,Morrow, J.D. 2003. The isoprostanes: unique products of arachidonic acid oxidation-A Review. ***Curr. Chem.***, 10 (17): 1723-1740.

FAO, 2009. Rice Market Monitor, December 2009, Volume VII, Issue No. Rome. FAO, www.fao.org/economic/est/publications/rice-publications/rice-market-monitor-rmm/en/

Flowers, T.J.,Troke, P.F., Yeo, A.R. 1977. The mechanism of salt tolerance in halophytes. ***Annu Rev Plant Physiol.***, 28 (1): 89–121.

Flowers, T. 2006. Plants and salinity – preface. ***J. Exp. Bot.***, 57 (5): 512 p.

Foyer, C.H., Descourvières, P., Kunert, K.J. 1994. Protection against oxygen radicals: An important defence mechanism studied in transgenic plants. ***Plant Cell Environ.***, 17 (5): 507–523.

Foyer, C.H., Lelandais, M. 1996. A comparison of the relative rates of transport of ascorbate and glucose across the thylakoid chloroplast and plasmalemma membranes of pea leaf mesophyll cells (special issue: Vegetation Stress). ***J. Plant Physiol.***, 148 (1): 391-398

Foyer, C.H., Lopez-Delgado, H. Dat, J.F., Scott, I.M. 1997. Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. ***Physiol. Plant.,*** 100 (2): 241-254.

Franco, J.A., Esteban, C., Rodriguez, C. 1993. Effect of salinity on various growth stages of muskmelon cv. Revigal. ***J Horti. Sci.***, 68 (6): 899-904.

Frary, A., Göl, D., Keleş, D., Ökmen, B., Pınar, H., Şığva, H. Ö., Yemenicioğlu, A., Doğanlar, S., 2010. Salt tolerance in Solanum pennellii: antioxidant response and related QTL. ***BMC Plant Biol.,*** 10 (58): 2-16.

Fukutoku, Y., Yamada, Y. 1984. Sources of prolin-nitrogen in water stressed soybean (*Glycine max*). II. Fate of 15N-labelled protein. ***Physiol. Plant.***, 61 (4): 622–628.

Gambarova, N.G.,Gins, M.S. 2008. Characteristics of oxidative stress of plants with C3 and C4 photosynthesis during salinization. ***Russ Agric Sci.***, 34 (2): 77-80.

Gapinska, M., Sklodowska, M., Gabara, B. 2007. Effect of short- and long-termsalinity on the activities of antioxidative enzymes and lipid peroxidation intomato roots. ***Acta Physiol Plant.***, 30 (1): 11-18.

Garg, N., Manchanda, G. 2009. ROS generation in plants: boon or bane? ***Plant Biosyst.***, 143 (19: 8-96.

Garrison, W.M. 1987. Reaction mechanisms in the radiolysis of peptides, polypeptides, and proteins. ***Chem. Rev.***, 87 (2): 381-398

Ghoulam, C., Foursy, A., Fares, K. 2002. Effects of salt stress on growth, inorganic ions and prolinea ccumulation in relation to osmotic adjustment in five sugar beet cultivars. ***EEB***, 47 (1): 39-50.

Giannopolitis, C.N., Ries, S.K. 1977. Superoxide dismutase I. Occurrence in higher plants**.** ***Plant Physiol.***, 59 (2): 309–314.

Gill, S.S., Khan, N.A., Anjum, N.A., Tuteja, N. 2010. Amelioration of cadmium stress in crop plants by nutrients management: Morphological, physiological and biochemical aspects. ***Plant Stress,*** 5 (Special Issue 1): 1-23.

Gill, S.S., Tuteja, N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. ***Plant Physiol Biochem.***, 48 (12): 909–930.

Gill, S.S., Khan, N.A., Anjum, N.A., Tuteja, N. 2011. Amelioration of cadmium stress in crop plants by nutrients management: morphological, physiological and biochemical aspects. ***Plant Stress***, 5 (1): 1-23.

Goldberg, D.M., Spooner, R.J. 1983. Glutathione reductase. Editor: Bergmeyer U.H. Methods of enzymatic analysis. ***Academic Press***, 3 (2): 258–265.

Gossett, D.R., Millhollon, E.P., Lucas, M.C. 1994. Antioxidant Response to NaCI Stress in Salt-Tolerant ve Salt-Sensitive Cultivars of Cotton. ***Crop Sci.***, 34 (3): 706- 714.

Gossett, R. Banks, S.W. Millhollon, E.P., Lucas,M.C. 1996. Antioxidant Response to NaCl Stress in a Control and an NaCl-Tolerant Cotton Cell Line Grown in the Presence of Paraquat, Buthionine Sulfoximine, and Exogenous Glutathione, ***Plant Physiol.***, 112 (2): 803-809.

Grattan, S.R., Zeng, L., Shannon M.C., Roberts, S.R. 2002. Rice is more sensitive to salinity than previously thought. ***California Agric.***, 56 (6): 189–195.

Greenway, H., Munns, R. 1980. Mechanism of salt tolerance in nonhalophytes. ***Annu Rev Plant Physiol.,*** 31 (1):149-190.

Gupta, U. S. 2006. Physiology of Stressed Crops: Osmoregulation and protection. ***CRC Press,*** 4 (1): 244 p.

Gürel A., Avcıoğlu, R. 2001. Bitkilerde Strese Dayanıklılık Fizyolojisi, 21. bölüm, Editörler: Özcan, S., Gürel, E., Babaoğlu, M., Bitki Biyoteknolojisi II, Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları, ***Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları***, Konya, 308-313.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. 1989. Free radicals in biology and medicine. ***Elsevier***, 112 (1): 944 p.

Hare, P.D., Cress, W.A. 1997. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. ***Plant Growth Regul.***, 21 (2): 79-102.

Harinasut, P., Poonsopa, D., Roengmongkol, K., Charoensataporn, R. 2003. Salinity effects on antioxidants enzymes in mulbery cultivar. ***Asia Sci.***, 29 (1): 109-113.

Hawkesford, M.J., Buchner, P. 2001. Molecular analysis of plant adaptation to the environment. ***Plant Ecophysiol.,***. 1 (1): 1-15

Hayashi, H., Alia., Mustardy, L. Deshnium, P., Ida, M., Murata, N. 1997. Transformation of Arabidopsis thaliana with the codA gene for choline oxidase: accumulation of glycinebetaine and enhanced tolrerance to salt and cold stres. ***Plant J.***, 12 (1): 133-142.

Hayashi, H., Alia, Sakamoto, A., Nonaka, H., Chen, T.H.H., Murata, N. 1998. Enhanced germination under high-salt conditions of seeds of transgenic Arabidopsis with a bacterial gene (codA) for choline oxidase. ***J. Plant Res.***, 111 (1): 357-362.

Heath, R.L.,Packer, L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. ***Arch. Biochem. Biophys***, 125 (1): 180-198.

Heimler, D.,Tattini, M., Ticci, S., Coradeshi, M.A., Traversi, M.L. 1995. Growth, ion acumulation ve lipid composition of two olive genotypes under salinity. ***J. Plant Nutr.,*** 18 (8): 1723-1734.

Hemavathi, U.C.P.,Young, K.E., Akula, N., Kim, H.S., Heung, J.J., Oh, O.M., Aswath, C.R., Chun, S.C., Kim, D.H., Park, S.W. 2009. Over-expression of strawberry D-galacturonic acid reductase in potato leads to accumulation of vitamin C with enhanced a biotic stres tolerance, ***Plant Sci.,*** 177: 659–667.

Hernández, J.A., Olmos, E., Corpas, F.J., Sevilla, F., del Río, L.A. 1995. Salt-induced oxidative stress in chloroplast of pea plants. ***Plant Sci.***, 105:151–167.

Hernández, J.A., Jiménez, A., Mullineaux, P.M., Sevilla, F. 2000. Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defenses. ***Plant Cell Environ.,*** 23: 853–862.

Hernández, J.A., Ferrer, M.A., Jiménez, A., Barceló, A.R., Sevilla, F.2001. Antioxidant Systems and $O_2^{\cdot-}/H_2O_2$ Production in the Apoplast of Pea Leaves. Its Relation with Salt-Induced Necrotic Lesions in Minor Veins.***Plant Physiol***., 127(3): 817–831.

Hernandez, E., Vilagrosa, A., Pausas, J.G., Bellot, J. 2010. Morphological traits and water use strategies in seedlings of Mediterranean coexisting species. ***Plant Ecol.***, 207: 233–244.

Hichem, H., Mounir, D., Naceur, E. 2009. Differential responses of two maize (*Zea mays* L.) varieties to salt stress: changes on polyphenols composition of foliage and oxidative damages. ***Ind Crops Prod.,*** 30: 144–151.

Hien, D.T., Jacobs, M., Angenon, G., Hermans, C., Thu, T.T., Van Son, L., Roosens, N.H. 2003. Proline accumulation and D1 -pyrroline-5- carboxylate synthetase gene properties in three rice cultivars differing in salinity and drought tolerance. ***Plant Sci.***, 16: 1059–1068.

Hirt, H., Shinozaki, K. 2004. Plant responses to abiotic stress. ***Springer,*** 241-270.

Hoagland, D.R., Arnon, D.I. 1938. The water-culture method for growing plants without soil. ***Calif. Agr. Exp. Sta. Circ.***, 347: 1910-1994.

Holmström, K.O., Somersalo. S., Mandal. A., Palva, E.T., Welin, B. 2000. Improved tolerance to salinity and low temperature in transgenic tobacco producing glycine betaine.***J Exp. Bot.,*** 51: 177–185.

Hsu, S.Y., Hsu, Y.T., Kao, C.H. 2003. The effect of polyethylene glycol on proline accumulation in rice leaves. ***Biol. Plant.***, 46: 73–78.

Hu, Y., Schmidhalter, U. 2005, Drought and salinity: A comparison of their effects on mineral nutrition of plants, ***J Plant Nutr. Soil Sci.***, 168: 541549 p.

Hurkman, W.J., Tao, H.P., Tanaka, C.K. 1991. Germin-like polypeptides increase in barley roots during salt stress. ***Plant Physiol.***, 97: 366-74.

James, D.W., Hanks, R.J., Jurinak, J.J. 1982. Modern irrigated soils. ***Wiley***, 235 p.

Juliano, B.O. 1972. Physicochemical properties of starch and protein in relation to grain quality and nutritional value of rice. In IRRI Rice Breeding. IRRI, Los Baños, ***Philippines***, 389-405

Kaçar, B., Katkat, A.V. Öztürk, Ş. 2002. Bitki Fizyolojisi, ***Uludağ Üniversitesi Güçlendirme Vakfı,*** Yayın No:198, Bursa.

Kadıoğlu, A. 2004. Bitki fizyolojisi. Trabzon: ***Lokman Yayın***; 453

Kalaj, M.H., Pietkiewicz, S. 1993. Salinity effects on plant growth and other physiological processes. ***Acta Physiol. Plant,*** 143: 89–124.

Karanlık, S. 2001. Değişik Buğday Genotiplerinde Tuz Stresine Dayanıklılık Ve Dayanıklılığın Fizyolojik Nedenlerinin Araştırılması. Çukurova Üniversitesi FenBilimleri Enstitüsü, Doktora tezi, Adana,162s.

Kavi Kishore, P.B., Sangam, S., Amrutha, R.N., Laxmi, P.S., Naidu, K.R., Rao, K.R.S.S., Rao, S., Reddy, K.J., Theriappan, P., Sreenivasulu, N. 2005. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. ***Curr. Sci.***, 88: 424–438.

Khan, M.A., Marwat, K.B., Hassan, G., Khan, N. 2002. Impact of weed management on maize (*Zea mays* L.) planted at night. ***Pakistan J Weed Sci. Res.***, 8: 57-61.

Khan, M.A., Abdullah, Z. 2003. Salinity/sodicity induced changes in reproductive physiology of rice (*Oryza sativa*) under dense soil conditions. ***EEB***, 49: 145-157.

Khan, M.H., Panda, S.K. 2008. Alterations in root lipid peroxidationand antioxidative responses in two rice cultivars under NaCl-salinity stress, ***Acta Physiol. Plant.***, 30: 81-89.

Khan, A.S., Singh, Z. 2008. 1-Methylcyclopropene application and modified atmosphere packaging affect ethylene biosynthesis, fruit softening, and quality of 'Tegan Blue' Japanese plum during cold storage. ***J Am Soc Hortic Sci.,*** 133:290–299

Khan, M.I.R., Iqbal, N., Masood, A., Khan, N.A. 2012. Variation in salt tolerance of wheatcultivars: role of glycine betaine and ethylene, ***Pedosphere***, 22: 746–754.

Kılınç, Y. 2011. Tescilli Haşhaş (*Papaver somniferum* L.) Çeşitlerinde Su Stresinin Antioksidant Enzimler Üzerine Etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Gaziosmanpaşa Üniversitesi. Tokat.

Kim, S.Y., Lim, J.H., Park, M.R., Kim, Y.J., Park, T.I., Seo, Y.W., Choi, K.G., Yun,.S.J. 2005. Enhanced antioxidant enzymes are associated withreduced hydrogen peroxide in barley roots under saline stress. ***J Biochem. Mol. Bio.***, 38:218–224

Kong-ngern, K., Daduang, S., Wongkham, C., Bunnag, S., Kosittrakun, M., Theerakulpisut, P. 2005. Protein profiles in response to salt stress in leaf sheaths of rice seedlings. ***Asia Sci.***, 31: 403-408.

Koca, A.F., Anıl, M. 2001. Çeltikte Kalite Özellikleri ve Değerlendirilmesi. ***O.M.Ü Ziraat Fakültesi Dergisi,*** 16 (1):103-108.

Koç, S. 2005. Fasulyelerde Tuzluluğa Tolerans Bakımından Genotipsel Farklılıkların ErkenBitki Gelişimi Aşamasında Belirlenmesi. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Adana, 98 s.

Köse, F.S. 2012. Physiological &Biochemical Screening Different Turkish Lentil (*Lens Culinaris* M.) Cultivars Under Salt Stress Condition. In Partıal Fulfıllment Of The Requırements For The Degree Of Master Of Scıence In Bıotechnology. A Thesıs Submıtted To The Graduate School Of Natural And Applıed Scıences Of Mıddle East Technıcal Unıversıty.

Kukreja, S.,Nandval, A.S., Kumar, N., Sharma, S.K., Sharma, S.K.,Unvi, V., Sharma, P.K. 2005. Plant water status, H_2O_2 scavenging enzymes, ethylene evolution and membrane integrity of Cicer arietinum roots as affected by salinity, ***Bio. Plant.***, 49: 305-308.

Kumar, R.S., Sivakumar, T., Sunderam, R.S., Gupta, M., Mazumdar, U.K., Gomathi,P.Y., Rajeshwar, S., Saravanan, S., Kumar, M.S., Murugesh, K., Kumar,K.A. 2005.Antioxidant and antimicrobial activities of *Bauhinia racemosa* L. stem bark. ***Braz. J. Med. Biol. Res.***, 38: 1015-1024.

Kuşvuran, Ş. 2004. Kavunda (*Cucumis melo* L.) Tuz Stresine Toleransın Belirlenmesinde Antioksidant Enzim Aktivitesi ve Lipid Peroksidasyonundan Yararlanma Olanakları. Ankara Üniversitesi Fen Bil. Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 104s,

Kün, E. 1985. Sıcak iklim Tahılları. ***Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları***, pp 317, Ankara.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. ***Nature***, 227 (5259): 680-685.

Läuchli, A., Grattan, S.R. 2007. Plant growth and development under salinity stres.Advances in Molecular Breeding Toward Drought and Salt Tolerant Crops. M.A. Jenks et al. (eds.). ***Springer***, 1: 1-32.

Lee, D.H., Kim, Y.S., Lee, C.B. 2001. The inductive responses of the antioxidant enzymes by salt stress in the rice (*Oryza sativa* L.), ***J. Plant Physiol.***, 158: 737–745.

Lee, M.H., Cho, E.J., Wi, S.G., Bae, H., Kim, J.E., Cho, J-Y., Lee, S., Kim, J-H., Chung, B.Y. 2013. Divergences in morphological changes and antioxidant responses in salt-tolerant and salt-sensitive rice seedlings after salt stres, ***Plant Physiol. Biochem.***, 70: 325335.

Levitt, J. 1980. Responses of Plants to Environmental Stress, 2nd Edition, Volume 1: Chilling, Freezing and High Temperature Stresses, ***CABI***, 497 pp.

Li, N., Lee, B., Liu, R.J., Banasr, M., Dwyer, J.M., Iwata, M., Li, X.Y. 2010. mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. ***Science***, 329 (5994):959-64.

Lichtenhaler, H.K. 1996. VegetationStress: an IntroductiontotheStressConcept in Plants. ***J.Plant Physiol.,***148 (1-2): 4-14.

Lin, C.C., Kao, C.H. 2000. Effect of NaCl stress on H_2O_2 metabolism in rice leaves. ***J. Plant Growth Regul.***, 30: 151–155.

Lutts, S., Kinet, J.M., Bouharmont, J. 1996a. NaCl-induced senescence in leaves of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance. ***Ann. Bot.***, 78: 389-398.

Lutts, S., Kinet, J.M., Bouharmont, J. 1996b. 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. ***J. Plant Growth Regul.***, 19 (3): 207–218

Lutts, S., Majerus, V., Kinet, J.M. 1999. NaCl effects on proline metabolism in rice (*Oryza sativa*) seedlings. ***Physiol. Plant.***, 105(3): 450-458.

Maas, E.V., S.R. Grattan. 1999. Crop yields as affected by salinity. In: Agricultural Drainage, ASA Monograph No. 38. J. van Schilfgaarde and W. Skaggs (eds.). American Soc. ***Agronomy***, Madison, WI. 55-108.

Mahajan, S., Tuteja, N. 2005. Cold, salinity and drought stresses. An Overview, ***Arch. Biochem.***, 444: 139- 158.

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

Marschner, H. 1995. Mineral Nutrition of Higher Plants, ***Academic Press***, 78(4): 527-528.

Martinez, C.A., Maestri, M., Lani, E.G. 1996. In vitro salt tolerance and proline 410 accumulation in Andean potato (*Solanum spp*.) differing in frost resistance. ***Plant Sci.***, 116: 177-184.

McCue, K.F., Hanson, A.D. 1990. Drought and salt tolerance: towards understanding and application. ***Trends Biotechnol.***, 8: 358-362.

Mekawy, A.M.M., Assaha, D.V.M., Yahagi, H., Tada, Y., Ueda, A., Saneoka, H. 2015. Growth, physiological adaptation, and gene expression analysis of two Egyptian rice cultivars under salt stress. ***Plant Physiol. Biochem.***, 87: 17-25,

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

Michalak, A. 2006. Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Plants Growing under Heavy Metal Stress. ***J. Environ. Stud.***, 15(4): 523-530

Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. ***Trends Plant Science***, 7(9): 405-10.

Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., Van Breusegem, F. 2004. Reactive oxygen gene network of plants. ***Trends Plant Sci.***, 9: 490–498.

Miller, G.H., Alley, R.B., Brigham-Grette, J., Fitzpatrick, J.J., Polyak, L., Serreze, M., White, J.W.C. 2010. Arctic Amplification: can the past constrain the future? ***Quat. Sci. Rev.,*** 29: 1779-1790

Miller, G., Shulaev, V., Mittler, R. 2008. Reactive oxygen signaling and abiotic stress. ***Physiol. Plant.,*** 133(3): 481-9.

Mishra S., Dubey R.S. 2006. Inhibition of ribonuclease and protease activities in arsenic exposed rice seedlings: role of proline as enzyme protectant. ***J.Plant Physiol.***, 163: 927–936.

Mittler, R., Zilinskas, B.A. 1992. Molecular cloning and characterization of a gene encoding pea cytosolic ascorbate peroxidase, ***J.Bio. Chem.***, 267: 21802-21807.

Mitsuya, S., Kawasaki, M., Taniguchi, M., Miyake, H. 2003. Relationship between salinityinduced damages and aging in rice leaf tissues, ***Plant Prod. Sci.***, 6: 213218 p.

Moller, I.M., Jensen, P.E., Hansson, A. 2007. Oxidative modifications to cellular components in plants. ***Ann. Rev. Plant Biol.***, 58: 459-481.

Montalvan, R., Ando, A., Echeverrıgaray, S. 1998. Use of Protein Polymorphism for Discrimination of Improvement Level and Geographic Origin of Upland Rice Cultivars. ***Gene. Mol. Biol.***, 21:531-535.

Morita, S.,Kaminaka, H., Masumura, T., Tanaka, K. 1999. Induction of Rice Cytosolic Ascorbate Peroxidase mRNA by Oxidative Stress; the Involvement of Hydrogen Peroxide in Oxidative Stress Signalling. ***Plant Cell Physiol.***, 40 (4): 417-422.

Munns, R., D. P. Schachtman, AG Condon, A.G. 1995. The Significance of a Two-Phase Growth Response to Salinity in Wheat and Barley. ***Funct. Plant Biol.***, 22: 561-569.

Munns, R. 2002. Salinity, growth and phytohormones. Chapter, Salinity: ***Environ. Plant Mol.,*** 1 (4): 271-290.

Munns, R. 2005. Genes and salt tolerance: bringing them together. ***New Physiol.,*** 167 (3): 645–663.

Muşlu, A. 2010. Buğday (*Triticum aestivum* L.) Fidelerinde Sıcaklık–Ağır Metal Etkileşimlerinin Bitki Büyümesi Ve Çözünür Protein Miktarı Üzerine Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Mustafa Kemal Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Biyoloji Anabilim Dalı.

Nakamura, I., Murayama, S., Tobita, S., Bong, B.B.,Yanagihara, S., Ishimine, Y. 2002. Effect of NaCl on the Photosynthesis, Water Relations and Free Proline Accumulation in the Wild *Oryza* Species. ***J. Plant Prod. Sci.***, 5(4):305-310

Nakano, Y., Asada, K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged byascorbate specific peroxidase in spinach chloroplast***. Plant Cell Physiol.***, 22:867–80.

Navrot, N., Rouhier, N., Gelhaye, E., Jaquot, J.P. 2007. Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria, ***Physiol. Plant.***, 129:185-195.

Noctor, G., Foyer, C.H. 1998. A re-evaluation of the ATP: NADPH budget during C3 photosynthesis. A contribution from nitrate assimilation and its associated respiratory activity? ***J. Exp. Bot.***, 49: 1895-1908.

Noctor, G., Mhamdi, A., Chaouch, S., Han, Y., Neukermans, J., Marquez-Garcia, B., Queval, G., Foyer, C.H. 2012. Glutathione in plants: an integratedoverview, ***Plant Cell Environ.***, 35: 454–484.

Noreen, Z., Ashraf. M. 2009. Changes in antioxidant enzymes and somekey metabolites in some genetically diverse cultivars of radish (*Raphanus sativus* L.). ***Environ. Exp. Bot.,*** 67: 395-402.

Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. ***Anal Biochem.***, 95(2): 351-358.

Osborne, D.J. 1982. Deoxyribonucleic Acid Integrity and Repair in Seed Germination: The Importance in Viability and Survival. In "The Physiology and Biochemistry of Seed Development, Dormancy and Germination" (Ed. A.A. Khan). ***Elsevier***, Amsterdam, 435-463 pp.

Öncel, I., Keleş, Y. 2002. Tuz stresi altındaki buğday genotiplerinde büyüme, pigment içeriği ve çözünür madde kompozisyonunda değişmeler. C.Ü. Fen–Edb. Fak. Fen Bilimleri Dergisi, 23: 1–16.

Özbolat, G. 2010. Türkiye *Rorıppa scop*. (Brassıcaceae) Türlerinin Tohum Protein Profillerinin SDS-PAGE ile Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Konya.

Pakyürek, A.Y. 2006. GAP Bölgesinde organik tarımın potansiyeli ve geliştirilme olanakları, 3. Organik Tarım Sempozyumu, 1-3 Kasım, Yalova, s, 164.

Paleg, L.G., Aspınall, D. 1981. Physiology and Biochemistry of Drought Resistance in Plants. ***Academic Press***, New York.

Pan, Y., Wu, L.J., Yu, Z.L. 2006. Effect of salt and drought stress on antioxidantenzymes activities and SOD isoenzymes of liquorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch), ***Plant Growth Regul.***, 49: 157-165.

Parida, A.K., Das, A.B., Mittra, B. 2004. Effects of salt on growth, ion accumulation, photosynthesis and leaf anatomy of the mangrove *Bruguiera parviflora*. ***Trees-Struct. Funct.***, 18: 167–174.

Parida, K.A., Das, A.B. 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review, ***Ecotoxicol Environ. Saf.***, 60: 342349p.

Parida, A.K., Dagaonkar, V.S., Phalak, M.S., Aurangabadkar, L.P. 2008. Differential responses of the enzymes involved in proline biosynthesis and degradation in drought tolerant and sensitive cotton genotypes during drought stress and recovery. ***Acta Physiol. Plant***, 30 (5): 619-627.

Peltier, W.R., Tushingham, A.M. 1989. Global sea level rise and the greenhouse effect: might they be connected? ***Science***, 244: 806–810.

Pessarakli, M., Szabolcs, I. 1999. Soil salinity and sodicity as particular plant/crop stres factors. In: Handbook of Plant and Crop Stress, 2nd ed. (Ed. M Pessarakli). ***CRC Press***, 1-15 p.

Pinto, E., Sigaud-kutner, T., Leitao, M. 2003. Heavy Metal–Induced Oxıdatıve Stress In Algae 1. ***J. Phycol.***, 39 (6): 1008-1018.

Polle, A., Chakrabarti, K., Chakrabarti, S., Seifert, F., Schramel, P., Rennenberg, H. 1992 Antioxidants and manganese deficiency in needles of Norway spruce (*Picea abies* L.) trees. ***Plant Physiol.***, 99 (3): 1084-1089.

Prasad, T.K.,Anderson, M.D., Martin, B.A., Stewart, C.R. 1994. Evidence for Chilling-Induced Oxidative Stress in Maize Seedlings and a Regulatory Role for Hydrogen Peroxide. ***Plant Cell***, 1 (6): 65-74.

Puntarulo, S., Sánchez, R.A., Boveris, A. 1988. Hydrogen peroxide metabolism in soybean embryonic axes at the onset of germination. ***Plant Physiol.***, 88 (2): 626–630.

Quan, L.J., Zhang, B., Shi, W.W., Li, H.Y. 2008. Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network. ***J. Integrat. Plant Biol.***, 50 (1): 2-18.

Qureshi, M.A., Shahzad, H., Imran, Z., Mushtaq, M., Akhtar, N., Ali, M.A., Mujeeb, F. 2013. Potentıal Of Rhızobıum Specıes To Enhance Growth And Fodder Yıeld Of Maıze In The Presence And Absence Of L-Tryptophan. ***JAPS***, 23(5): 1448-1454.

Rani, U.R., Reddy, A.R. 1994. Salt stress-responsive polypeptides in germinating seeds. ***J.Plant Physiol.,*** 143 (2): 250-2533.

Rai, V.K. 2002. Role of Amino Acids in Plant Responses to Stresses. ***Biol. Plant.***, 45 (4): 481–487.

Romero-Puertas, M.C., Corpas, F.J., Sandalio, L.M., Leterrier, M., Rodríguez-Serrano, M., del Río, L.A., Palma, J.M. 2006. Glutathione reductase from pea leaves: response to abiotic stress and characterization of the peroxisomal isozyme. ***New Phytol.***, 170 (1): 43–52.

Sairam, R.K., Srivastava, G.C., Agarwal, S., Meena, R.C. 2005. Differences in antioxidant activity in response to salinity stress in tolerant and susceptible wheat genotypes. ***Biol Plant.***, 49 (1): 85-91.

Sakamoto, A., Valverde, R., Alia, A., Chen T.H.H., Murata, N. 2000. Transformation of Arabidopsis with the codA gene for choline oxidase enhances freezing tolerance of plants. ***Plant J.***, 22 (5): 449–453.

Salekdeh, G.H., Siopongco, J., Wade, L.J., Ghareyazie, B., Bennett, J. 2002. A proteomic approach to analyzing droughtand salt-responsiveness in rice. ***Field Crops Res.***, 76 (2-3): 199-219.

Santos, K.F.D.N., Silveira, R.D.D., Martin-Didonet, C.C.., Brondani, C. 2013. Storage protein profile and amino acid content in wild rice *Oryza glumaepatula*. ***CPATU,*** 48 (1): 66-72.

Schulze, S.R., Sinclair, D.A.R., Fitzpatrick, K.A., Honda, B.M. 2005. A genetic and molecular characterization of two proximal heterochromatic genes on chromosome 3 of Drosophila melanogaster. ***Genetics***, 169(4): 2165-2177.

Sekmen, A.H., Turkana, I., Takiob, S. 2007. Differential responses of antioxidative enzymes and lipid peroxidation to salt stress in salt-tolerant *Plantago maritime* and salt-sensitive *Plantago media.* ***Physiol. Plant.***, 131(3): 399-411.

Senadheera, P., Tırımanne, S., Maathuıs, F.J. 2012. Long Term Salinity Stress Reveals Variety Specific Differences in Root Oxidative Stress Response Rice Science. ***Elsevier***, 19 (1): 36-43.

Sevengör, S.T. 2010. Kabakta (*Cucurbita pepo* L.) Tuz Stresine Toleransın Belirlenmesinde Antioksidan Enzim Aktivitelerinin in vitro ve in vivo Olarak İncelenmesi. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi/ Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Ankara.

Shalata, A., Tal, M. 1998. The effects of salt stress on lipid peroxidationand antioxidants in the leaf of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii*. ***Physiol. Plant.***, 104 (2):169–174.

Sharma, P., Dubey, R.S. 2005. Modulation of nitrate reductase activity in rice seedlings under aluminium toxicity and water stress: role of osmolytes as enzyme protectant. ***J. Plant Physiol.,*** 162 (8): 854-864.

Sharma, P., Jha, A.B., Dubey,R.S., Pessarakli, M. 2012. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. ***J. Bot.***, 26 p.

Shirata, K., Takagishi, H. 1990. Salt-induced accumulation of 26 and 27 kD proteins in cultured cells of rice plant. ***Soil Sci. Plant Nutr.***, 36 (1): 153-157

Singh, A.K., Dubey, R.S. 1995. Changes in chlorophyll a and b contents and activities of photosystems 1 and 2 in rice seedlings induced by NaCI. ***Photosynthetica***, 31 (1): 489-499.

Singh, S.. Khan, N.A., Nazar, R., Anjum, N.A. 2008. Photosynthetic traits and activities of antioxidant enzymes in blackgram (*Vigna mungo* L. Hepper) under cadmium stress, ***Am. J. Plant Physiol.,*** 3 (1): 25-32.

Singha, S., Choudhuri, M.A. 1990. Effect of salinity (NaCI) stress on H_20, metabolism in Vigna and *Oryza* seedlings. ***Biochem. Physiol. Pflanz***, 186 (1): 69-74.

Siripornadulsil, S., Traina, S., Verma, D.P.S., Sayre, R.T. 2002. Molecular mechanisms of proline-mediated tolerance to toxic heavy metals in transgenic microalgae. ***The Plant Cell***, 14 (11): 1-11.

Sivritepe, N. 1995. Asmalarda Tuza Dayanıklılık Testleri ve Tuza Dayanımda Etkili Bazı Faktörler Üzerinde Araştırmalar. Doktora tezi, Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Bursa, 176s.

Sreenivasulu, N., Grimm, B., Wobus, U., Weschke, W. 2000. Differential response of antioxidant compounds to salinity stress in salt tolerant and salt sensitive seedlings of foxtail millet (*Setaria italica*). ***Physiol. Plant.***, 109 (4): 435-442.

Srivastava, A.K., Bhargava, P., Rai, L.C. 2005. Salinity and copper-induced oxidativedamage and changes in antioxidative defense system of *Anabaena doliolum.* ***J Microbiol Biotechnol.***, 21(6-7): 1291-1298.

Streb, P., Feierabend, J. 1996. Oxidative Stress Responses Accompanying Photo inactivation of Catalase in NaCI-treated Rye Leaves. ***Plant Biol.***. 109 (2): 125–132

Su, J., Wu, R. 2004. Stress inducible synthesis of proline in transgenic rice confers faster growth under stress conditions than with constitutive synthesis***.*** ***Plant Sci.***, 166 (4): 941-948.

Sugimoto, M., Takeda, K. 2009. Proteomic analysis of specific proteins in the root of salt-tolerant barley. ***Biosci Biotechno Biochem.***, 73 (12): 2762–2765.

Sultana, N., Ikeda, T., Itoh, R. 1999. Effect of NaCI Salinity on Photosynthesis and Dry Matter Accumulation in Developing Rice Grains. ***EEB***, 42 (3): 211- 220.

Suzuki, N., Koussevitzky, S., Mittler, R., Miller, G. 2012. ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. ***Plant Cell Environ.***, 35 (2): 259–270.

Sürek, H. 1994. Çeltikte (*Oryza sativa* L.) Bazı önemli Agronomik karakterlerin kalıtımı üzerine araştırmalar. Doktora Tezi, Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Ana Bilim Dalı, Tekirdağ.

Tang, M.I., Posner, M.K., Rothbart, N.D. 2015 Volkow Circuitry of self-control and its role in reducing addiction Trends Cogn. ***Science***, 19 (8): 439–444.

Tanoua, G., Molassiotis, A., Diamantidis, G. 2009. Hydrogen peroxide and nitric oxide-induced systemic antioxidant prime-like activity under NaCI-stress and stress-free conditions in citrus plants. ***J. Plant Physiol.***, 166 (17): 1904-1913.

Tarchoune, I., Sgherri, C., Izzo, R., Lachaal, M., Ouerghi, Z., Navari-Izzo, F. 2010. Antioxidative responses of *Ocimum basilicum* to sodium chloride or sodium sulphate salinization. ***Plant Physiol Biochem.***, 48 (9): 772-777.

Tatar, M.Ö. 2006. Tuzluluğun Bazı Çeltik Çeşit ve Hatlarının Çimlenme ile Fide Gelişimi Üzerine Etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı. Bornova, İzmir.

Tatar, Ö., Brueck, H., Gevrek, M.N., Asch, F. 2010. Physiological responses of two Turkish rice (*Oryza sativa* L.) varieties to salinity. ***Turk J Agric For.***, 34 (6): 451–459.

Temizkan, G., Yılmazer, S., Öztürk, M., Arı, Ş., Ertan, H., Topal Sarıkaya, A., Arda, N. 2004. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, (genişletilmiş 2. Baskı), (Editörler: G. Temizkan, N. Arda). İ.Ü.Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Araştırma ve Uygulama Merkezi (BİYOGEM), ***Nobel Tıp Kitabevleri***, 2: 345 s.

Tester, M., Davenport, R. 2003. Na^+ tolerance and Na^+ transport in higher plants. ***Ann. Bot.,*** 91 (5): 503–527.

Tetiktabanlar, İ. 2011. Tuz Stresinin Bezelyede (*Pisum sativum* L.) Fenolik Bileşikler Üzerine Etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Tokat.

Tıpırdamaz, R., Ellialtıoğlu, Ş. 1994. Domates genotiplerinde tuza dayanıklılığın belirlenmesinde değişik tekniklerin kullanimi. Ankara Üniversitesi, ***Ziraat Fakültesi Yayınları***, Yayın No: 1358, 752, 21s.

Tıpırdamaz, R., Ellialtıoğlu, Ş. 1997. Some physiological and biochemical changes in *Solanum melongena* L. genotypes grown under salt conditions. First Balkan Botanical Congress, Thessaloniki, Greece, 19-22 September, 121 s.

Tiwari, B.S., Bose, A., Ghosh, B. 1997. Photosynthesis in rice under salt stress. ***Photosynthetica***, 34 (2): 303–306.

TMO, 2012. Toprak Mahsulleri Ofisi Hububat Sektör Raporu http://www.tmo.gov.tr/Upload/Document/raporlar/HububatSektorRaporu2012.pdf

Triantaphylides, C., Krischke, M., Hoeberichts, F.A., Ksas, B., Gresser, G., Havaux, M., Van Breusegem, F., Mueller, M.J. 2008. Singlet oxygen is the major reactive oxygen species involved in photooxidative damage to plants. ***Plant Physiol.***, 148 (2): 960–968.

Tripathy, B.C., Pattanayak, G.K. 2010. Singlet oxygen-induced stress in plants. In: Rebeiz C.A., Benning C., Bohnert H.J., Daniell H., Hoober J.K., Lichtenhaler H.K., Portis A.R., and Tripathy B.C. (Eds.) The Chloroplast: Basics and Applications. ***Springer,*** 31 (1): 397–412

Trovato, M., Mattioli, R., Costantino, P. 2008. Multiple roles of proline in plant stres tolerance and development, ***Rend. Lincei,*** 19 (4): 325-346.

Tsaknis, J., Lalas, S., Tychopoulos, V., Tsaknis, J., Hole, M., Smith, G. 1998. Rapid high-performance liquid chromatographic method of determining malondialdehyde for evaluation of rancidity in edible oils**.** ***Analyst*.,** 123 (2): 325-327.

TUİK, 2013. Türkiye İstatistik Kurumu Bitkisel Üretim İstatistikleri Veri Tabanı http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1001, 01.04.2014.

Tunçer, N. 2007. Patlıcanda Tuza Toleransın Kalıtımı Üzerinde Araştırmalar. Yüksek Lisans Tezi, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı.

Tuteja, N. 2007. Mechanisms of high salinity tolerance in plants. ***Elsevier,*** 428 (3): 419-438.

Turan, S., Tripathy, B.C. 2013. Salt and genotype impact on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in two rice cultivars during de-etiolation. ***Protoplasma,*** 250 (1): 209–222

Tutar, Y., Geçkil, H., Karataş, A. 2010. Biyokimya,. ***Nobel Yayınevi***, Ankara, 438 s.

Tuteja, N., Ahmad, P., Panda, B.B., Tuteja, R. 2009. Genotoxic stress in plants: Shedding light on DNA damage, repair and DNA repair helicases. ***Mutat. Res.***, 681 (2-3): 134-149.

Ulusu, Y. 2007. Farklı dozlarda kadmiyumun maydanoz (*Petroselinum hotense* Hoffm) bitkisinde fotosentetik pigmentler ve oksidatif enzim aktivitelerine etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Tokat.

Vaidyanathan, H., Sivakumar, P., Chakrabarty, R., Thomas, G. 2003. Scavenging of reactive oxygen species in NaCI-stressed rice (*Oryza sativa* L.) differential response in salt-tolerant and sensitive varieties. ***Plant Sci.***, 165 (6): 1411–1418.

Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. ***Chem. Biol. Interact.***, 160 (1):1-40.

Vaughan, K., Armstrong, M.S., Gold, R., O'Connor, N., Jenneke, W., Tarrier, N.A. 1994. Trial of eye movement desensitization compared to image habituation training and applied muscle relaxation in post-traumatic stress disorder. ***J Behav Ther Exp Psychiatry,*** 25 (4): 283-91.

Velikova, P., Yordanov, I., Edreva, A. 2000. Oxidative stress and some antioxidantsystems in acid rain-treated bean plants. Protective role of exogenouspolyamines. ***Plant Sci.***, 151 (1): 59–66.

Verbruggen, N., Hermans, C. 2008. Proline accumulation in plants: a review, ***Amino Acids,*** 35 (4): 753-759.

Vranova, E., Atichartpongkul, S., Villarroel, R., Montagu, M.V., Inze, D., Camp, W.V. 2002. Comprehensive analysis of gene expression in Nicotiana tabacum leaves acclimated to oxidative stres. ***Proc. Natl Acad Sci.***, 99 (16): 870-875.

Wang, W., Vinour, B., Altman, A. 2003. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. ***Planta***, 218 (1): 1-14.

Wang, F.R., Dong, X.F., Tong, J.M., Zhang, X.M., Zhang, Q., Wu, Y.Y. 2009. Effects of dietary taurine supplementation on growth performance and immune status in growing Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). ***Poult Sci.***. 88 (7): 1394-1398.

Wassmann, R., Hien, N.X., Hoanh, C.T., Tuong, T.P. 2004. Sea level rise affecting the Vietnamese Mekong Delta: Water elevation in the flood season and implications for rice production. ***Clim. Change***, 56 (1-2): 89-107.

Witzel, K., Weidner, A., Surabhi, G.K., Börner, A., Mock, H.P. 2009. Salt stress-induced alterations in the root proteome of barley genotypes with contrasting response towards salinity. ***J Exp. Bot.***, 60 (12): 3545-3557.

Xue, Y.F., Liu, Z.P. 2008. Antioxidant enzymes and physiological characteristics in two Jerusalem artichoke cultivars under salt stress. ***Russ J Plant Physiol.,*** 55(6): 776-781.

Yaşar, F. 2003. Tuz stresi altındaki patlıcan genotiplerinde bazı antioksidant enzimaktivitelerinin in vitro ve in vivo olarak incelenmesi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Van. 146.

Yaşar, F., Ellialtioglu, Ş., Yildiz, K. 2008. Effect of salt stress on antioxidant defense systems, lipid peroxidation, and chlorophyll content in green bean. ***Russ J Plant Physiol.,*** 55 (6): 782-786.

Yeo, A.R., Lee, K.S., Izard, P., Boursier, P.J., Flowers, T.J. 1991. Short and long term effects of salinity on leaf growth in rice (*Oryza sativa* L.), ***J. Exp. Bot.***, 42 (7): 881–889.

Yıldız, M., Terzi, H., Akçalı, N. 2014. Tuz Stresi Altındaki Bitkilerin Metabolik Yollarındaki Proteom Değişimleri. ***Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi***, 3(1): 81-93.

Zeng, L.,Shannon, M.C. 2000. Salinity effects on seedling growth and yield components of rice. ***Crop Sci.***, 40 (4): 996-1003.

Zhao, G.R., Xiang, Z.J., Ye, T.X., Yuan, Y.J., Guo, Z.X. 2006. Antioxidant activities of *Salvia miltiorrhiza* and *Panax notoginseng*. ***Food Chem.***, 99 (4): 767–774

Zhishen, J., Mengcheng T. and Jianming W. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. ***Food Chem.***, 64 (4): 555-559.

Zhou, Z., Robarda K., Helliwell S., Blanchard C. 2002. Composition and Functional Properties of Rice. ***IETSI***, 37(8): 849-868.

Zhu, J.K. 2001. Plant salt tolerance. ***Trends Plant Sci.***, 6 (2): 66-71.

Zhu, J.K. 2007. Plant salt stress. In Encylcopedia of Life Sciences. ***John Wiley & Sons***, Ltd.

http://arastirma.tarim.gov.tr/ttae/Link/1/Cesitlerimiz.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, Adı	: ORCAN, Pınar
Uyruğu	: T.C.
Doğum Yeri	: Diyarbakır
Doğum Tarihi	: 20.05.1985
E-Posta	: karakus85@gmail.com pinar.karakus@batman.edu.tr

Eğitim Bilgileri

Eğitim Derecesi	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Dicle Üniversitesi- Fen Bilimleri Enstitüsü	2010
Lisans	Dicle Üniversitesi–Fen Fakültesi-Biyoloji	2008
Lise	Diyarbakır Fatih Süper Lisesi	2003

İş Deneyimi

Görev	Yer	Yıl
Araştırma Görevlisi	Batman Üniversitesi	2010-Devam ediyor

Yabancı Dil : İngilizce

T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI İNTİHAL RAPORU FORMU

ÖĞRENCİ BİLGİLERİ	
ADI VE SOYADI	Pınar ORCAN
ÖĞRENCİ NO	11801511
EĞİTİM – ÖĞRETİM YILI	2016-2017
YARIYIL	☐ Güz ☒ Bahar
ANABİLİM DALI	BİYOLOJİ
PROGRAM	DOKTORA
TEZ KONUSU	Tuz Stresine Maruz Bırakılan Çeltik (*Oryza sativa* L.) Çeşitlerinde Radikal Söndürme ve Antioksidan Enzim Aktiviteleri
İNTİHAL RAPORU BİLGİLERİ	
RAPOR TÜRÜ	Tez Savunma Sınavı Sonrası
SAYFA SAYISI	119
BENZERLİK ORANI	% 11
RAPORLAMA TARİHİ	18/09/ 2017

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın kapak sayfası, giriş, ana bölümler, sonuç ve tartışma kısımlarından oluşan toplam 119 sayfalık kısmına ilişkin, 18/09/2017 tarihinde şahsım tarafından *Turnitin* adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan intihal raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 11 'dir.

Uygulanan filtrelemeler:

☒ Kabul/Onay sayfaları hariç,
☒ Kaynakça hariç
☐ Alıntılar hariç/dâhil
☐ Diğer

Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Programlarda Tez Çalışması İntihal Raporu Uygulama Esaslarını inceledim ve bu Uygulama Esaslarında belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edilmesi durumunda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

Pınar ORCAN

(İmza)
20/09/ 2017

Doç. Dr. Çiğdem IŞIKALAN
Tez Danışmanı

(İmza)
20/09/ 2017

Prof. Dr. Hasan Çetin ÖZEN
Anabilim Dalı Başkanı