

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KEMİK TOZU SOLÜSYONU, CaCl<sub>2</sub> ve IAA  
UYGULAMALARININ TUZ STRESİ ALTINDAKİ  
FASULYE (*Phaseolus vulgaris*) BİTKİSİNİN FİZYOLOJİK  
PARAMETRELERİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Mucip GENİŞEL

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ERZURUM  
2010

Her Hakkı Saklıdır

Yrd. Doç. Dr. Rahmi DUMLUPINAR danışmanlığında, Mucip GENİŞEL tarafından hazırlanan bu çalışma 13/07/2010 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından, Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Yavuz DEMİR

İmza : 

Üye : Doç. Dr. Güleray AĞAR

İmza : 

Üye : Yrd. Doç. Dr. Rahmi DUMLUPINAR

İmza : 

**Yukarıdaki sonucu onaylarım**

Prof. Dr. Ömer AKBULUT

**Enstitü Müdürü**

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### KEMİK TOZU SOLÜSYONU, CaCl<sub>2</sub> ve IAA UYGULAMALARININ TUZ STRESİ ALTINDAKİ FASULYE (*Phaseolus vulgaris*) BİTKİSİNİN FİZYOLOJİK PARAMETRELERİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Mucip GENİŞEL

Atatürk Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Rahmi DUMLUPINAR

Bu çalışmada CaCl<sub>2</sub> ve kemik tozu solüsyonu uygulamalarının, tuz (NaCl) stresine maruz bırakılmış fasulye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisine ait yaprak dokusundaki protein miktarları, fotosentetik pigment içerikleri, CAT, POD ve SOD aktiviteleri ile lipid peroksidasyonu ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarı üzerine etkileri araştırılmıştır. Bitkilerin yetiştiği ortama ekim gününü takip eden 14 günde 150 mM NaCl' ye ilave olarak farklı konsantrasyonlarda (%1, %1.5, %2) kemik tozu solüsyonu, (15, 30 mM) CaCl<sub>2</sub> ve bitki yapraklarına 10<sup>-6</sup>M IAA uygulanmıştır. Bitki yaprakları 24. gün deney materyali olarak kullanılmıştır. NaCl uygulaması, bitkinin yaprak dokusunun protein içeriğinde düşüşe neden olmuştur. Farklı konsantrasyonlarda kemik tozu solüsyonu ve CaCl<sub>2</sub> uygulamaları protein içeriğinde olumlu etki yapmıştır. NaCl uygulaması sonucu bitkinin yaprak dokusunun fotosentetik pigmentlerinin miktarlarında azalmalar görülmüştür. Ortama ilave edilen kemik tozu solüsyonu uygulaması, CaCl<sub>2</sub>'ye göre daha etkin şekilde pigmentlerin miktarlarının artmasına neden olmuştur. NaCl uygulaması, bitkinin yaprak dokusunun CAT ve POD aktivitelerinde artışa neden olmuştur. Farklı konsantrasyonlardaki kemik tozu solüsyonu ve CaCl<sub>2</sub> uygulamaları, bitkinin yaprak dokusundaki CAT ve POD aktivitelerini, tuz uygulamasında elde edilen değerlere göre azalmasına neden olmuştur. Tuz uygulamasına eklenen %2 kemik tozu solüsyonuna ek olarak bitki yapraklarına uygulanan 10<sup>-6</sup>M IAA, CAT ve POD aktivitelerini, tuz uygulamasının sonuçlarına göre artırmıştır. SOD aktivitesi de yalnız NaCl uygulamasıyla önemli artış göstermiştir. NaCl'ye ek olarak %1 kemik solüsyonu uygulaması ile SOD aktivitesi daha da arttığı belirlenmiştir. Diğer uygulamaların tümünde SOD aktivitesi, kontrol grubundaki düşük değere yakın seviyede kaydedilmiştir. NaCl uygulamasıyla, LPO seviyesinde kontrol grubuna göre % 46.7 artış kaydedilmiştir. Tuzlu ortama eklenen farklı konsantrasyonlardaki KT ve CaCl<sub>2</sub> uygulamaları, tuz uygulamasına göre ciddi oranda yaprak dokusundaki LPO seviyesini azaltmıştır. Tuz uygulaması sonucu artan LPO'nun değerinde tuzlu ortama eklenen %1 kemik tozu solüsyonu en belirgin düşüşe neden olmuştur. NaCl uygulaması, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarının artmasına neden olmuştur. Tuzlu ortama eklenen farklı konsantrasyonlarda kemik tozu solüsyonu ve CaCl<sub>2</sub> uygulamaları, NaCl uygulamasına göre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarını azalttığı belirlenmiştir. Sonuç olarak, tuz stresi altındaki bitkilerin yetiştirme ortamına destek olarak uygulanan kemik tozu solüsyonu uygulamaları, CaCl<sub>2</sub> uygulamalarına göre daha etkin bir şekilde bitkinin hem protein, pigment içerikleri, antioksidan enzim aktivitelerini hem de LPO seviyesini ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarlarını düzenleyerek bitkilere bir dereceye kadar tuz stresine karşı direnç sağlamada katkı sağladığı belirlenmiştir.

**2010, 80 Sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Tuz stresi, fasulye, *Phaseolus vulgaris*, kemik tozu solüsyonu, kalsiyum klorür, protein, pigment, antioksidan enzim, lipid peroksidasyonu, oksin

## ABSTRACT

MS Thesis

### EFFECTS OF BONE POWDER SOLUTION, CaCl<sub>2</sub> AND IAA APPLICATIONS ON PHYSIOLOGIC PARAMETERS OF BEAN (*Phaseolus vulgaris*) UNDER SALT STRESS

Mucip GENİŞEL

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

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Rahmi DURLUPINAR

In this study, it was investigated the effects of CaCl<sub>2</sub> and bone powder solution applications on quantities of protein, content of photosynthetic pigment, activities of CAT, POD, SOD, level of lipid peroxidation and quantities of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at leaf tissue belongs to bean under salt stress. The bone powder solution at different concentrations (1%, 1.5%, 2%), CaCl<sub>2</sub> (15.3 mM) and 10<sup>-6</sup>M IAA to a group of plant leaves in addition to 150 mM NaCl were applied on 14<sup>th</sup> day of seeding in growing media of plants. The plant leaves were used as research material in our study on the 24<sup>th</sup> day. Application of NaCl caused to decrease of protein content of tissue of plant leaf. Bone powder solution and CaCl<sub>2</sub> applications positively affected protein content at the different concentrations. It was determined that effect of the bone powder solutions on protein content had higher values than effect of CaCl<sub>2</sub> applications. As a result of NaCl application, it was seen a decrease at the photosynthetic pigment contents of plant's leaf tissue. Application of the bone powder solution added to the media caused to increase contents of pigments effectively according to CaCl<sub>2</sub>. Application of NaCl caused to increase at the POD and CAT activities of the plant's leaf tissue. The bone powder solution and CaCl<sub>2</sub> applications at different concentrations caused to decrease activities of POD and CAT of the plant's leaf tissue according to values gained at salt application. 10<sup>-6</sup> M IAA applied leaf tissue additionally added 2% bone powder to salt application increased activities of CAT and POD according to result of salt application. Similarly, SOD activity increased excessively only with the NaCl application. It was determined that in addition to NaCl the SOD activity with 1% application of the bone powder solution increased anymore. SOD activity, at the all other applications, was recorded at the close level of low value in control group. It was achieved 46.7% increase in lipid peroxidation level according to control group with NaCl application. The bone powder solution and CaCl<sub>2</sub> applications added to salty medium at different concentrations decreased level of lipid peroxidation at the leaf tissue severely according to the salt application. 1% bone powder solution added to salty medium caused to a significant decline LPO level as a result of the salt application. The application of NaCl caused to an increase of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> level. The bone powder solution and CaCl<sub>2</sub> applications added to salty medium at the different concentrations were determined to decrease H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> level according to NaCl application. As a result, application of the bone powder solution applied to growing medium of the plants under salt stress as a support was determined that it ensured both protein, pigment contents, the antioxidant enzyme activities and regulating LPO and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> level effectively according to CaCl<sub>2</sub> applications.

**2010, 80 Pages**

**Keywords:** Salt stress, bean, *Phaseolus vulgaris*, bone powder solution, calcium chloride, protein, pigment, antioxidant enzyme, lipid peroxidation, hydrogen peroxide, auxin

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışma Atatürk Üniversitesi Fen-Fakültesi Bitki Fiziyojisi Laboratuarında yapılmıştır. Bu araştırmanın sonuçları 20. Ulusal Biyoloji Kongresi'nde sunulmuştur.

Bu araştırma konusunu belirleyen, çalışmalarım da her türlü desteği sağlayan kıymetli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Rahmi DUMLUPINAR'a en içten şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarım sırasında bölüm imkânlarından faydalanmamı sağlayan Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Ö. Faruk ALGUR'a ilgi, yardım ve desteğini gördüğüm değerli hocam Sayın Doç. Dr. Ökkeş ATICI'ya, deneylerin planlanması ve gerçekleşmesi aşamalarında büyük emekleri olan kıymetli dostum Serkan ERDAL'a ve biyoloji bölümündeki tüm hocalarıma teşekkür ederim.

Element analizinde yardımını gördüğüm kıymetli arkadaşım Turgay KORKUT'a, her türlü desteğinden dolayı mesai arkadaşım Emir Alper TÜRKÖĞLU'na teşekkürü borç bilirim.

Ayrıca her an maddi ve manevi desteğini esirgemeyen eşime, anneme, oğullarım Ömer ve Yusuf'a şükranlarımı sunarım.

Mucip GENİŞEL

Temmuz 2010

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	ix
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. KAYNAK ÖZETLERİ .....</b>	<b>17</b>
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM .....</b>	<b>24</b>
3.1. Yararlanılan alet ve cihazlar .....	24
3.2. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanmaları .....	25
3.3. Yöntemler .....	28
3.3.1. Bitkilerin büyütülmesi .....	28
3.3.2. Çözülebilir protein miktarının tayini .....	29
3.3.3. Fotosentetik pigment miktarlarının belirlenmesi .....	30
3.3.4. Antioksidan enzim aktivitelerinin belirlenmesi .....	31
3.3.4.a. CAT aktivitesinin belirlenmesi .....	31
3.3.4.b. POD aktivitesinin belirlenmesi .....	32
3.3.3.c. SOD aktivitesinin belirlenmesi .....	33
3.3.5. LPO miktarının belirlenmesi .....	34
3.3.6. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> miktarının belirlenmesi .....	34
3.3.7. Kemik tozu hazırlanması ve inorganik element analizi .....	35
3.3.8. İstatistik analiz .....	36
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI .....</b>	<b>37</b>
4.1. Ortalama kök ve gövde uzunluğu sonuçları .....	38
4.2. Toplam protein miktarı sonuçları .....	41
4.3. Fotosentetik pigment içeriği sonuçları .....	43
4.3.1. Klorofil <i>a</i> içeriği sonuçları .....	44

4.3.2. Klorofil <i>b</i> içeriği sonuçları .....	45
4.3.3. Toplam klorofil içeriği sonuçları .....	46
4.3.4. Karotenoid içeriği sonuçları .....	48
4.4. Antioksidan enzim aktivite sonuçları .....	49
4.4.1. CAT aktivitesi sonuçları .....	49
4.4.2. POD aktivitesi sonuçları .....	51
4.4.3. SOD enzim aktivitesi sonuçları .....	53
4.5. LPO seviyesi sonuçları .....	55
4.6. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> miktarı sonuçları .....	57
4.7. Kemik tozu WDXRF sonuçları .....	59
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ .....</b>	<b>60</b>
5.1. Ortalama kök ve gövde uzunluğuna tuz, kemik tozu solüsyonu ve CaCl <sub>2</sub> 'nin etkileri .....	61
5.2. Toplam protein miktarına tuz, kemik tozu solüsyon ve CaCl <sub>2</sub> 'nin etkileri .....	61
5.3. Fotosentetik pigment içeriğine tuz, kemik tozu solüsyon ve CaCl <sub>2</sub> 'nin etkileri .....	62
5.4. Antioksidan enzim aktivitelere tuz, kemik tozu solüsyon ve CaCl <sub>2</sub> 'nin etkileri .....	64
5.4.1. CAT aktivitesine tuz, kemik tozu solüsyon ve CaCl <sub>2</sub> 'nin etkileri .....	64
5.4.2. POD aktivitesine tuz, kemik tozu solüsyon ve CaCl <sub>2</sub> 'nin etkileri .....	65
5.4.3. SOD aktivitesine tuz, kemik tozu solüsyon ve CaCl <sub>2</sub> 'nin etkileri .....	66
5.5. LPO seviyesine tuz, kemik tozu solüsyon ve CaCl <sub>2</sub> 'nin etkileri .....	68
5.6. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> miktarına tuz, kemik tozu solüsyon ve CaCl <sub>2</sub> 'nin etkileri .....	69
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>73</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>81</b>

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

CAT	: Katalaz
EDTA	: Etilendiamin tetra asetik asit
E.U	: Enzim ünitesi
KT	: Kemik tozu solüsyonu
Mm	: Milimolar
NBT	: Nitroblue tetrazolium klorür
POD	: Peroksidaz
PVP	: Polivinilpirrolidon
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SOD	: Süperoksit dismutaz
TCA	: Trikloroasetik asit
TBA	: Tiobarbutirik asit
$\mu$ L	: Mikrolitre
$\mu$ M	: Mikromolar
<i>x g</i>	: Yerçekimi ivmesinin katı
rpm	: Devir/dakika



## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 1.1.</b> Na <sup>+</sup> iyonları ile kil tanelerinin birbirine yapışması .....	12
<b>Şekil 1.2.</b> Na <sup>+</sup> iyonlarının kil tanelerin etkilemesi sonucu bitkinin durumu .....	13
<b>Şekil 1.3.</b> Ca <sup>+2</sup> iyonlarının kil tanelerini birbirinden ayırması .....	13
<b>Şekil 1.4.</b> Tuzlu ortama Ca <sup>+2</sup> ilavesi sonucu bitkinin durumu .....	14
<b>Şekil 1.5.</b> Bitki hücrelerinde tuz stresi altında iyon dengesinin sinyal iletim yolu (SOS) ve Ca <sup>+2</sup> düzeyleri tarafından düzenlenmesi .....	15
<b>Şekil 3.1</b> Protein tayini için kullanılan standart grafik .....	30
<b>Şekil 3.2</b> Katalaz aktivitesi ölçümünde kullanılan standart grafik .....	32
<b>Şekil 3.3</b> Hidrojen peroksit (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) miktarını belirlemede kullanılan standart grafik .....	35
<b>Şekil 4.1.</b> Fasulye ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ) bitkisinin ortalama kök uzunluğunun uygulamalara göre değişimi .....	39
<b>Şekil 4.2.</b> Fasulye ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ) bitkisinin ortalama gövde uzunluğunun uygulamalara göre değişimi .....	40
<b>Şekil 4.3.</b> Fasulye ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ) bitkisinin yaprak dokusunda protein miktarının uygulamalara göre değişimi .....	42
<b>Şekil 4.4.</b> Fasulye ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ) bitkisinin yaprak dokusunda klorofil <i>a</i> içeriğinin uygulamalara göre değişimi .....	45
<b>Şekil 4.5.</b> Fasulye ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ) bitkisinin yaprak dokusunda klorofil <i>b</i> içeriğinin uygulamalara göre değişimi .....	46
<b>Şekil 4.6.</b> Fasulye ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ) bitkisinin yaprak dokusunda toplam klorofil içeriğinin uygulamalara göre değişimi .....	47
<b>Şekil 4.7.</b> Fasulye ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ) bitkisinin yaprak dokusunda karotenoid içeriğinin uygulamalara göre değişimi .....	48
<b>Şekil 4.8.</b> Fasulye ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ) bitkisinin yaprak dokusunda CAT aktivitesinin uygulamalara göre değişimi .....	50
<b>Şekil 4.9.</b> Fasulye ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ) bitkisinin yaprak dokusunda POD aktivitesinin uygulamalara göre değişimi .....	52

<b>Şekil 4.10.</b> Fasulye ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ) bitkisinin yaprak dokusunda SOD aktivitesinin uygulamalara göre değişimi .....	54
<b>Şekil 4.11.</b> Fasulye ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ) bitkisinin yaprak dokusunda MDA miktarının uygulamalara göre değişimi .....	56
<b>Şekil 4.12.</b> Fasulye ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ) bitkisinin yaprak dokusunda H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> miktarının uygulamalara göre değişimi .....	58
<b>Şekil 4.13.</b> Kemik tozunun WDXRF sonuçlarına göre inorganik element içeriği (%) .....	59

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 1.1.</b> Bitkiler için başlıca stres kaynakları .....	1
<b>Çizelge 1.2.</b> Türkiye’de sorunlu toprakların dağılımı .....	3
<b>Çizelge 3.1</b> Esas elementlerden bazıları için WDXRF çalışma şartları .....	36
<b>Çizelge 4.1.</b> NaCl (150mM), IAA ( $10^{-6}$ M), iki farklı konsantrasyonda (15,30mM) CaCl <sub>2</sub> ve üç farklı konsantrasyonda (%1, %1.5, %2) kemik tozu solüsyonu uygulanan fasulye ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ) bitkisinin yaprak dokusunda belirlenen protein miktarının uygulamalara göre değişimi .....	42
<b>Çizelge 4.2.</b> NaCl (150mM), IAA ( $10^{-6}$ M), iki farklı konsantrasyonda (15,30mM) CaCl <sub>2</sub> ve üç farklı konsantrasyonda (%1, %1.5, %2) kemik tozu solüsyonu uygulanan fasulye ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ) bitkisinin yaprak dokusunda belirlenen klorofil <i>a</i> , klorofil <i>b</i> , toplamklorofil ve karotenoid miktarlarının uygulamalara göre değişimi .....	43
<b>Çizelge 4.3.</b> NaCl (150mM), IAA ( $10^{-6}$ M), iki farklı konsantrasyonda (15, 30mM) CaCl <sub>2</sub> ve üç farklı konsantrasyonda (%1, %1.5, %2) kemik tozu solüsyonu uygulanan fasulye ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ) bitkisinin yaprak dokusunda belirlenen CAT aktivitesinin uygulamalara göre değişimi .....	50
<b>Çizelge 4.4.</b> NaCl (150mM), IAA ( $10^{-6}$ M), iki farklı konsantrasyonda (15, 30mM) CaCl <sub>2</sub> ve üç farklı konsantrasyonda (%1, %1.5, %2) kemik tozu solüsyonu uygulanan fasulye ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ) bitkisinin yaprak dokusunda belirlenen POD aktivitesinin uygulamalara göre değişimi ....	52
<b>Çizelge 4.5.</b> NaCl (150mM), IAA ( $10^{-6}$ M), iki farklı konsantrasyonda (15, 30mM) CaCl <sub>2</sub> ve üç farklı konsantrasyonda (%1, %1.5, %2) kemik tozu solüsyonu uygulanan fasulye ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ) bitkisinin yaprak dokusunda belirlenen SOD aktivitesinin uygulamalara göre değişimi ....	54

- Çizelge 4.6.** NaCl (150mM), IAA ( $10^{-6}$ M), iki farklı konsantrasyonda (15, 30mM) CaCl<sub>2</sub> ve üç farklı konsantrasyonda (%1, %1.5, %2) kemik tozu solüsyonu uygulanan fasulye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisinin yaprak dokusunda belirlenen MDA düzeylerinin uygulamalara göre değişimi ..... 56
- Çizelge 4.7.** NaCl (150mM), IAA ( $10^{-6}$ M), iki farklı konsantrasyonda (15, 30mM) CaCl<sub>2</sub> ve üç farklı konsantrasyonda (%1, %1.5, %2) kemik tozu solüsyonu uygulanan fasulye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisinin yaprak dokusunda belirlenen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarının uygulamalara göre değişimi ..... 58

## 1. GİRİŞ

Stres, çevresel ve biyolojik faktörlerin ayrı ayrı ya da birlikte bitkilerde ki fizyolojik olaylarda belirgin değişimler meydana getirmesidir (Kadıoğlu 2007). Stres bitkinin veya organlarının büyümesinde ve verimliliğinde azalmaya, hatta ölümüne yol açabilir. ABD’ de optimum şartların altındaki iklim ve toprak koşullarının oluşturduğu stres nedeniyle kültür bitkilerinin kalıtsal potansiyellerinin ancak %22’sine ulaşabildiklerini bildirilmiştir (Boyer 1982).

Bir bitkinin uygun olmayan çevre şartlarına maruz kalması durumunda, hayatını devam ettirmesi ve strese tahammül etme yeteneğine tolerans (esneklik) denir. Tolerans daha çok genotiple ilgilidir. Aklimasyon (uyum), yeni bir çevreye maruz kalan bitkideki kalıtsal olmayan değişikliklerdir. Aklimasyon, dölden döle intikal etmeyen bitkideki hızlı değişimlerdir. Bitkilerdeki zamanla oluşan, kalıtsal olan veya olmayan, bitkiyi strese karşı fiziksel bir bariyer oluşturarak koruyan değişimlere avoidans (korunma) denir (Kocaçalışkan 2008).

Bir ekosistemde bitkileri etkileyen pek çok stres kaynakları bulunabilir. Bu stres kaynakları fiziksel, kimyasal ve biyolojik olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır (Çizelge 1.1) (Kocaçalışkan 2008).

**Çizelge 1.1.** Bitkiler için başlıca stres kaynakları (Kocaçalışkan 2008)

<b>A. Fiziksel</b>	<b>B. Kimyasal</b>	<b>C. Biyolojik</b>
1. Kuraklık	1. Tuzluluk	1. Allelopati
2. Sıcaklık	2. Besin	2. Rekabet
3. Işımlar	3. Hava kirliliği	3. Paratizim
4. Elektromanyetik alan	4. Pestisitler	4. İnsan tahribi
5. Rüzgâr ve Fırtına	5. Herbisitler	5. Hayvan tahribi
6. Toprak yapısı	6. Toprağın pH' sı	6. Hastalıklar

Hava sıcaklığı gibi bazı stres faktörleri birkaç dakikalığına stres oluştururken toprağın su içeriği gibi bazı faktörler ise günlerce sürebilir. Toprak tuzluluğu gibi stres faktörleri ise sürekli olarak bitki büyüme ve gelişimi üzerinde olumsuz yönde etkili olurlar (Kocaçalışkan 2008).

Belirli bitkilerde stres, kalıtım faktörlerinde olduğu gibi bir ya da daha fazla generasyonda davranışları devam ettiren etkiler meydana getirebilir. Nesiller boyunca düşük sıcaklık altında büyütülen bezelye bitkilerinin nesilden nesile küçüldüğü ve 8. nesilden sonra tamamıyla cüce oldukları, hatta eğer bu cüce bitkilerden elde edilen tohumlar normal koşullar altında büyütülse dahi yine cüce bitkilerin ortaya çıktığı, ancak bu bitkilerin normal koşullarda 8 nesilden sonra tekrar normal boylu bitkiler oluşturabileceği rapor edilmiştir (Kadıoğlu 2008).

Tuzluluk; özellikle kurak ve yarı kurak iklim bölgelerinde yıkanarak yer altı suyuna karışan çözünebilir tuzların yüksek taban suyuyla birlikte kapillarite yoluyla toprak yüzeyine çıkması ve buharlaşma sonucu suyun uçmasıyla toprak yüzeyinde tuzun birikim göstermesi olayıdır (Epstein *et al.* 1980; Ergene 1982; Kwiatowski 1998; Patel *et al.* 2002; Öz ve Karasu 2007). Nadirde olsa okyanus kenarlarındaki delta ovalarında okyanus etkisi nedeniyle tuzluluk görülebilmektedir. Öte yandan zirai amaçlı olarak aşırı sulama uygulamaları da özellikle drenaj koşullarının kötü olduğu yerlerde tuzluluğa sebep olabilmektedir (Ergene 1982).

Tuzluluk dünya topraklarının önemli sorunlarından biridir. Tarımsal ya da peyzaj amaçlı olan sulama uygulamalarının yanlış yapılması, özellikle doğal drenaj koşullarının kötü olduğu kurak ve yarı kurak yerlerde tuzluluk sorununun ortaya çıkmasına neden olabilmektedir. Sulamanın olduğu her yerde toprağa tuz iletimi de söz konusudur. Çünkü sulamada kullanılan yerüstü ve yer altı sularının tamamında çözülmüş halde olan çeşitli tuzlar bulunmaktadır. Sulamayla toprağa verilen bu tuzlar, suyun buharlaşması veya bitki kullanımıyla tüketilmesine rağmen toprağın yapısında kalmakta ve birikim göstermektedir. Gittikçe artan tuz içeriği, zamanla toprağın fiziksel ve kimyasal özelliklerini bozmakta ve bitki gelişimini üzerine olumsuz yönde etki

etmektedir. Yetiştirilen bitkinin veriminde görülecek azalmalar, toprak çözeltisindeki tuz konsantrasyonuna bağlı olmakla birlikte, bitki türünün genetiksel olarak tuza dayanıklılığı ile de ilgili olduğu bilinmektedir (Ekmekçi 2005).

Tuzluluk sorunu altında kalan topraklar yeryüzünün %7'sini oluşturmakta ve artan tuzluluktan dolayı, 21. yüzyılın ortalarına kadar mevcut tarım alanlarında %50 oranında toprak kaybı olacağı tahmin edilmektedir (Wang *et al.* 2003). Şu anda yeryüzünde ki işlenmiş arazilerin 1.5 milyar hektarı dışında, yaklaşık 77 milyon hektar (%5)' lık arazinin aşırı tuzlanma tehditi altında olduğu rapor edilmiştir (Sheng *et al.* 2008).

Ülkemiz topraklarında da bu tuzlanma sorunu giderek artan ciddi bir sorun haline gelmektedir. Ülkemizde tuzlu toprakların 2004 yılı itibariyle 1.5 milyon hektara ulaştığı bildirilmiştir (Çizelge 1.2) (Sönmez 2004).

**Çizelge 1.2.** Türkiye’de Sorunlu Toprakların Dağılımı (Sönmez 2004)

Sorunun Niteliği	Alan (ha)	Sorunlu Alanlara Göre (%)
Hafif Tuzlu	614617	41.0
Tuzlu	505603	33.0
Alkali	8641	0.5
Hafif Tuzlu-Alkali	125863	8.0
Tuzlu-Alkali	264958	17.5
Toplam	1518722	100.0

Yüksek ve düşük sıcaklık, kuraklık, toprağın asitliği, tuzluluk, UV stresi ve patojen enfeksiyonu gibi çevresel stresler bitkilerin büyüme ve gelişmesine potansiyel olarak zarar vermektedir (Breusegem *et al.* 2001). Topraktaki tuz stresi kurak ve yarı kurak bölgelerde temel streslerden biridir. Tuz stresi, bitki gelişimini ve verimliliğini ciddi şekilde kısıtlayabilir (Allahverdiev *et al.* 2000; Koca vd. 2007).

Tuzlu ortamda büyüme kapasitesine göre, bitkiler, glikofitler veya halofitler olarak sınıflandırılır. Çoğunlukla bitkiler glikofittirler ve tuz stresine tolerans gösteremezler (Sairam and Tyagi 2004).

Bitki içerisinde tuz stresinin başlaması ve gelişmesi sürecinde lipit ve enerji metabolizması, protein sentezi ve fotosentez gibi temel metabolik süreçlerin hepsi etkilenir. En erken cevap, yaprak yüzeyinin genişleme oranında azalma ve bunu takiben stresin yoğunlaşmasıyla yaprak genişlemesinin tamamen durmasıdır. Fakat stres hafiflediğinde büyüme devam eder (Wang and Nil 2000; Parida and Das 2005).

Yüksek tuz konsantrasyonları bitkilerde su stresi yaratan toprak solüsyonunun osmotik potansiyelini azaltır. Diğer taraftan özellikle tek değerlikli bir iyon olan  $\text{Na}^+$ , vakuollerin içinde hızlı bir şekilde hapsedilemediği için,  $\text{Na}^+$ 'nın yüksek tuz konsantrasyonları şiddetli iyon toksisitesine sebep olur. Sonuçta mineral besinlerle tuzların etkileşimi, beslenme eksikliğine ve dengesizliklerine sebep olabilmekte, bütün bu olayların neticesinde moleküler hasar ve bitki gelişiminin durması ve en son aşamada da bitkide ölüm meydana gelebilmektedir (McCue and Hanson 1990).

Toprağın ve suyun tuzluluğu ortamda tuzların çok fazla miktarda bulunmasıyla oluşur. Çok yaygın olarak yüksek  $\text{Na}^+$  ve  $\text{Cl}^-$ , tuz stresine sebep olan iyonlardır. Tuz stresi bitkide toksisiteye ve iyon homeostasisinde karışıklığa veya iyon dengesizliğine sebep olur ve toprağın su potansiyelini azaltır. Su potansiyelinde ki böylesi bir azalma, bitki üretiminin sınırlandırılmasına, yani büyümenin yavaşlamasına yol açar. Tuz stresi hem osmotik hem de iyonik stres oluşturduğu için (Hagemann and Erdmann 1997; Hayashi and Murata 1998), büyümenin baskılanması, toprak suyunun osmotik potansiyeli ve çözünür tuzların toplam konsantrasyonu ile doğrudan ilişkilidir (Flowers *et al.* 1977; Greenway and Munns 1980).

Tuz stresinin aynı zamanda önemli bir sonucu da yaprakların, gövdelerin ve köklerin taze ve kuru ağırlıklarında azalmadır (Hernandez *et al.* 1995; Chartzoulakis and Klapaki



2000). Tuzların çimlenme üzerinde etkisi, bazı genotiplerde aslında osmotik olmasına karşın, toksisite yoluyla da olabilmektedir (Tobe *et al.* 2003).

Tuzluluk osmotik hasar ve iyon toksitesini de içine alan birkaç olayın kombinasyonu ile bitkilere hasar verir (Nandwal *et al.* 2000). İyonik ve osmotik etkilere ek olarak tuz stresi hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), süperoksit ( $O_2^{\bullet-}$ ), hidroksil radikalleri ( $OH\cdot$ ) gibi reaktif oksijen türlerinde artışa yol açmak suretiyle bitkideki hasarların artışına yol açmaktadır (Neto *et al.* 2005).

Serbest radikaller eşleşmemiş elektron içeren moleküller olup, oldukça reaktiftirler. Tuzluluk, bitkilerdeki serbest radikallerin, özellikle reaktif oksijen türlerinin oluşumunu tetikler. Her türden kimyasal ve biyokimyasal tepkime daima atomların dış orbitallerindeki elektronlar sayesinde gerçekleşmektedir. Dış orbitallerde paylaşılmamış elektron bulunması serbest radikallerin reaktivitesini arttırdığı için, serbest radikaller kimyasal aktifliği yüksek moleküllerdir. Bu radikaller plazma membranı, mitokondri, ER membranlarında da oluşabilir (McKersie ve Lehsem, 1994). Serbest radikaller hem indirgen hem de yükseltgen olarak bazen de her iki etkiyi birlikte göstererek hücre hasarına neden olmaktadır. Serbest radikallerin DNA, hücre proteinleri ve lipidler üzerinde de zararlı etkileri vardır. Serbest oksijen radikalleri genellikle singlet oksijen, hidroksil ve süperoksit radikalleri, ayrıca elektron eksiklikleri olmadığı halde başka moleküllerle radikallerden daha zayıf şekilde birleşebilen hidrojen peroksit nonradikalinden oluşur (Erdal *et al.* 2010). Bu radikallerin yarılanma ömürleri birkaç mili saniye ile dakikalar hatta saatler arasında değişebilmektedir.

Bitkilerde singlet oksijen ( $^1O_2$ )'nin başlıca kaynağı fotosentetik elektron transport sistemindeki klorofil pigmentleridir. Singlet Oksijen ( $^1O_2$ ) moleküler oksijenin yüksek enerji ile uyarılmış formudur. Oksijenin bu formunun üzerinde ortaklaşmamış elektronu bulunmadığı için radikal özelliği yoktur. Fakat oksidan özelliği oldukça yüksektir. (Foyer *et al.* 1997; Güler 2008). Singlet Oksijen ( $^1O_2$ ), serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına sebep olabildiği gibi serbest radikal reaksiyonlarının ürünü olarak da meydana gelebilir. Ayrıca biyolojik sistemlerde çeşitli yollarla kimyasal veya

fotokimyasal olarak da üretilebildiği gibi lipid peroksidasyonu sırasında da oluşabilir (Çınar 2005). Singlet oksijen diğer moleküllerle etkileştiğinde ya içerdiği enerjiyi transfer eder, ya da kovalent tepkimelere girer. Özellikle karbon-karbon çift bağları singlet oksijenin tepkimeye girdiği bağlardır. Doymamış yağ asitleri ile de doğrudan tepkimeye girerek peroksit radikalini oluşturur ve  $\cdot\text{OH}$  kadar etkin bir şekilde lipid peroksidasyonunu başlatabilir. Hücre zarlarının glikolipid, fosfolipid, sterol ve gliserid yapısındaki doymamış yağ asitleriyle reaksiyona girerek peroksitler, aldehitler, hidroksi yağ asitleri ve pentan gibi çeşitli lipid peroksidasyon ürünlerini oluştururlar (Gechev *et al.* 2002; Minibaeva and Gordon 2003, Mutlu 2005).

Süperoksit anyonu ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), oksijene bir elektronun aktarılmasıyla oluşur. ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), oldukça reaktiftir ve lipidlerin yanı sıra diğer biyokimyasal bileşenlerin de oksidasyonuna sebep olur. Bu radikalın lipid peroksidasyonu, membran hasarı, hücrel toksisite ve DNA'daki tek zincir kırıklarına sebep olduğu belirtilmiştir (Fridovich 1995). Süperoksit radikali ayrıca, hidrojen peroksitle reaksiyona girerek çok daha toksik bir molekül olan hidroksil radikalini üretebilir. Haber-Weiss reaksiyonu olarak bilinen bu reaksiyon demir ve bakır gibi metallerin katalizörlüğünde oldukça hızlı gerçekleşir. Süperoksit radikali, yüksek katalitik etkiye sahip süperoksit dismutaz (SOD) enziminin etkisiyle dismutasyona girerek konsantrasyonu azaltılır (Halliwell 1984; Güler 2008).

Oksijenin enzimatik olarak iki elektron ile indirgenmesiyle ya da süperoksitlerin enzimatik veya enzimatik olmayan dismutasyon tepkimeleri sonucu hidrojen peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) oluşur.  $\text{H}_2\text{O}_2$ , süperoksit grubuna göre daha az etkilidir. Süperoksitin olduğu yerlerde (peroksizomlar, elektron taşıma zinciri, plazma membranı, ekstraselüler matriks) önemli miktarda  $\text{H}_2\text{O}_2$  üretilir (Slesak *et al.* 2007). Yapısında paylaşılmamış elektron içermediğinden radikal özellik taşımaz.  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'nin oksitleyici bir tür olarak bilinmesinin nedeni demir ve bakır gibi metal iyonlarının varlığında hidroksil radikalinin öncülü olarak davranmasıdır.  $\text{H}_2\text{O}_2$  özellikle proteinlerdeki hem grubunda bulunan demir ile tepkimeye girerek yüksek oksidasyon düzeyindeki reaktif demir formlarını oluşturur. Bu formdaki demir çok güçlü oksitleyici özelliklere sahip olup, hücre zarlarında lipid peroksidasyonu gibi radikal tepkimeleri başlatabilir. Oksitleyici

özelliği nedeniyle biyolojik sistemlerde oluşan  $H_2O_2$ ' nin ortamdaki uzaklaştırılması gerekir (Halliwell 1984; Güler 2008). Bu görevi katalaz ve peroksidaz gibi antioksidan enzimler  $H_2O$  ve  $O_2$  gibi ürünlere dönüştürerek yerine getirir. Oksidatif streslere tolerans sağlamada bitkilerdeki bu enzimlerin hücresele seviyelerini düzenlenmesi oldukça önemlidir (Gechev *et al.* 2002; Minibaeva and Gordon 2003; Mutlu 2005).

Hidroksil radikali ( $\cdot OH$ ), en aktif ve en toksik oksijen radikali olup üretildiği her yerde birçok molekül ile reaksiyon verir. Hidroksil radikali, iyonlaştırıcı radyasyonun (x-ışınları) etkisiyle su moleküllerinin homolitik kırılması sonucunda oluştuğu gibi hidrojen peroksit molekülünün metaller ile reaksiyonu sonucunda eksik indirgenmesi ile de oluşabilir (Stahl and Sies, 2002). Biyolojik sistemlerin tanıdığı en reaktif tür olan  $\cdot OH$ , su dahil rastladığı her molekülle tepkimeye girebilir. Bütün bu tepkimeler  $\cdot OH$ ' ın paylaşılmamış elektron içeren dış orbitaline elektron alma ilgisinden kaynaklanır (Halliwell 1984). Hidroksil radikalının sebep olduğu en önemli hasar, lipid peroksidasyonu olarak bilinen serbest radikal zincir reaksiyonudur.  $\cdot OH$ ' ın başlıca hedefi yağ asitleri olup, zar lipidlerinin peroksidasyonu zarın yapısını bozar ve geçirgenliğini artırıp hücre ölümüne sebep olabilir (Nishiyama *et al.* 1998; Güler 2008).

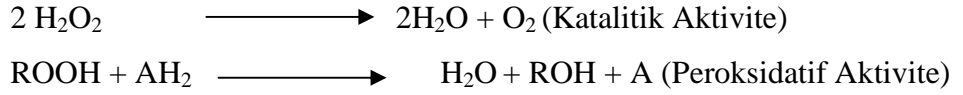
ROT' lar direkt hasara neden olabildikleri gibi birbirlerini etkileyerek, en reaktif radikal olan hidroksil radikalini ( $\cdot OH$ ) oluşturmakta ve doymamış yağ asitlerine etki etmektedirler (Wood and Smith 1991). Otoksidasyon sonucu veya daha farklı yollardan oluşan serbest radikallerin oranı, savunma mekanizmalarının kapasitesini aşacak oranda olursa, organizmadaki biyomoleküller bu durumdan olumsuz olarak etkilenmektedirler. Bu etkiye en duyarlı olan moleküller lipidlerdir. Membranlardaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyon vererek peroksidasyon ürünlerini oluştururlar. Çoklu doymamış (poliansatüre) yağ asitlerinin oksidatif yıkımı, lipid peroksidasyonu olarak bilinir ve oldukça zararlıdır ve bu reaksiyon kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler. Lipid peroksidasyonu ile oluşan membran hasarı geri dönüşümsüzdür (Akkuş 1995). Lipid peroksidasyonu membran bütünlüğünün yok olmasına, hücrenin elektrolitlere geçirgenliğinin artmasına neden olur (Halliwell 1984). Birçok hücresele hasardan sonra

meydana gelen dokuların dejenerasyonu, serbest radikaller ve lipid peroksidasyonu sonucu oluşur (Şimşek 1999). Biyolojik sistemlerde Lipid peroksidasyonu başlatan serbest radikalın, süperoksit anyonu ile özellikle de hidroksil radikali olduğu kabul edilmektedir. Serbest radikal etkisi ile yağ asidi zincirinden hidrojen atomunun uzaklaşması, bu yağ asidinin radikal özelliği kazanmasına neden olmaktadır. Böyle oluşan lipid radikali dayanıksız bir bileşiktir. Molekül içi konjuge edilen bağlarının farklı pozisyonlara gelmesi ile değişikliğe uğrayabilen kararsız lipid radikalının moleküler oksijenle tepkimesi sonucu lipid peroksit radikali meydana gelir (Spiteller 2001; Kuru 2007).

Lipid hidroperoksitlerinin yıkımı ile oluşan ve biyolojik olarak reaktif olan aldehitler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler ya da başlangıçtaki etki alanlarından diffüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar. Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda, malondialdehid (MDA) meydana gelir (Yılmaz ve Ozan 2003). MDA yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü değildir, fakat lipid peroksidasyonunun derecesi ile iyi bir korelasyon gösterir. Bu sebeple organizma da oluşan lipid peroksidasyon (LPO) düzeyini ölçmek için MDA seviyelerinin ölçümü, sıklıkla kullanılan bir yöntemdir (Yılmaz ve Ozan 2003; Kuru 2007).

Zararlı bir forma dönüşmeksizin ROT'ları temizleyebilen bileşikler antioksidan olarak adlandırılır. Bitkiler, hücrelerini oksidatif hasardan koruyan antioksidan sistemler ile birlikte ROT' un seviyesini kontrol eden ve bunların normal formlarına dönüşümünü katalizleyen antioksidan enzimlere de sahiptir (Gechev *et al.* 2002; Minibaeva and Gordon 2003; Mutlu 2005). Bu enzimler; süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon redüktaz, peroksidaz enzimleridir. Antioksidan enzimler koordineli bir şekilde ROT' ları temizlerler veya onları daha az toksik olan bileşiklere metabolize ederler. Bitkiler apoplastik boşluk dahil bütün hücre alt yapılarında antioksidan sisteme sahiptirler.

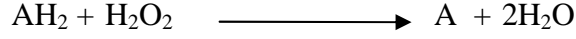
Tabiatta çok yaygın dağılım gösteren katalaz (CAT) aerobik organizmaların hepsinde omurgalılarda, omurgasızlarda, bitkilerde ve mantarlarda bulunmaktadır (Bergmeyer and Grabl 1983). CAT yüksek konsantrasyondaki  $H_2O_2$ 'nin iki elektronunu kullanarak su ve oksijene indirgenmesini katalizleyen demir porfirin içeren tetramerik ve yüksek molekül ağırlığına sahip bir enzimdir (McClung 1997; Chaudiere and Ferrari 1999). Aynı zamanda CAT, düşük  $H_2O_2$  konsantrasyonlarında alkoller, askorbat ve fenol içeren indirgenmiş substratları kullanarak peroksidatif aktivite gösterebilir (Chaudiere and Ferrari 1999). CAT'ın görev aldığı reaksiyonlar aşağıdaki gibidir.



Pek çok bitki hücresinde enzimlerin büyük bir kısmı,  $H_2O_2$ 'nin yüksek olduğu peroksizomlarda bulunur. CAT çok az miktarda mitokondri matriksinde de bulunur. CAT'ın bitki dokusunda  $H_2O_2$ 'nin uzaklaştırılmasında önemli rol oynadığı belirtilmiştir (Patykowski and Urbanek 2003). Solunum zincirinde, oksijenin eksik indirgenmesinden oluşan  $H_2O_2$ 'yi  $O_2$ 'ye indirger (Chaudiere and Ferrari 1999). CAT'ın temel fonksiyonu, moleküler  $O_2$  mevcudiyetinde metabolizmanın bazı kademelerinde sentezlenen, radikal karakterli  $H_2O_2$ 'nin radikalliğini gidererek özellikle membranlarda oluşabilecek geri dönüşümsüz hasarları engellemektedir (Scandalios 1993; Chaudiere and Ferrari 1999; Mutlu 2005). Bu özelliğine karşın CAT, kararlı bir enzim değildir. Yüksek ışık yoğunluğu ve stresli bitki hücrelerinde oluşan  $H_2O_2$ 'nin yüksek konsantrasyonlarıyla inhibe edilebilir (Feierabend *et al.* 1992; Streb *et al.* 1993; Güler 2008).

Peroksidaz (POD), hidrojen vericisi olarak birçok organik ve inorganik substratı kullanarak  $H_2O_2$ 'yi temizlerler ve  $H^+$  vericisi olarak kullandıkları substrata göre isimlendirilirler. Peroksidaz aktivitesi, dış kaynaklı sinyallere ve zor çevre koşullarına cevap olarak hızlı bir şekilde değişebilir. Çoklu moleküler formlara ve geniş bir hücre altı dağılımına sahip olan POD, bitkilerde büyük oranda bulunur. POD, elverişsiz çevresel faktörler altında üretilen zararlı oksijen radikallerinin seviyesini düzenler ve

bitki hücrelerinin en önemli koruyucu enzimlerinden birisidir (Bakardjieva and Christov 1996). POD' lar aşağıdaki reaksiyonu katalizlerler.



Bitkilerde bu reaksiyon sonucu;

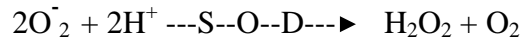
1. Serbest fenollerin oksidatif polimerizasyonu ile hücre duvarında lignin ve suberin biyosentezi gerçekleşir.
2. Hücre duvarına bağlı fenollerin oksidatif polimerizasyonu ile çapraz bağlanmalar olur ve hücre duvarı sertleşir. Sonuç olarak peroksidazlar  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'yi kontrol altında tutarak hücre duvarının yapısına katılmasını sağlarlar.

POD' ların spesifik aktivite, substrat ilgisi, kofaktörler, inhibitörlere hassasiyet ve optimum pH gibi biyokimyasal özellikleri farklı olan çok sayıda izoenzimleri bulunur. POD' lar organizmaya bağlı olmakla birlikte 3 sınıfa ayrılabilirler (Banci 1997).

1. Hücre içi (simplastik) peroksidazlar
2. Hücre dışı (apoplastik) peroksidazlar
3. Salgılanan bitki peroksidazları

Düşük sıcaklık,  $\text{SO}_2$ , tuzluluk, parazit enfeksiyonu, patojenler, UV-ışık tesirleri gibi çeşitli stres faktörlerinden yüksek seviyede etkilenen POD aktivitesi, bu enzimin stres enzimi olarak anılmasına sebep olmuştur (Kerby and Somerville 1992; Bakardjieva and Christov 1996; Lee and Lin 1996 a, b; Chanda and Singh 1997; Kim *et al.* 2000; Taşgın *et al.* 2006; Mutlu *et al.* 2009). POD enziminin çok sayıda fizyolojik olayda rol oynadığı ve birçok metabolik olayın gerçekleşmesine yardımcı olduğu açıktır. Stres altındaki bitkilerde POD aktivitesinin arttığı bilinmektedir (Gaspar *et al.*, 1991).

Süperoksit dismutaz (SOD), süperoksit serbest radikalinin hidrojen peroksit ve oksijene dönüşümünü katalizleyen bir enzimdir (Fridovich 1986; Güler 2008). SOD, ilk kez Mann ve Keilis (1938) tarafından izole edilmiş ve başlangıçta bir bakır depo proteini olduğu düşünülmüştür. Bu enzimin katalitik fonksiyonu keşfedilene kadar eritrokuprein, indofenol oksidaz ve tetrazolium oksidaz gibi isimlerle adlandırılmıştır. Canlı organizmalar SOD ile süperoksiti uzaklaştırır ve Haber-Weiss reaksiyonuyla hidroksil radikalinin oluşum riskini azaltır. SOD, süperoksit anyonlarını uzaklaştırmasına rağmen toksik bir oksijen türevini ( $O_2^{\cdot-}$ )'yi  $H_2O_2$ 'ye dönüştürür (Mehlhorn 1996). Bu reaksiyon sonucu oluşan  $H_2O_2$ , fotosentezin güçlü bir inhibitörüdür ve kloroplast fonksiyonu için risk oluşturur. Bu toksik ürün peroksidazlar tarafından temizlenebilir.



SOD bütün aerobik organizmalarda ve aktifleşmiş oksijen üreten bütün hücre alt yapılarında bulunduğu için oksidatif strese karşı savunmada merkezi bir rolünün olduğu düşünülmektedir (Bowler *et al.* 1992). SOD'un üç farklı izoenzimi vardır. Bunlar bakır/çinko (Cu/ZnSOD), mangan (MnSOD) ve demir (FeSOD) izoenzimleri olup KCN ve  $H_2O_2$ 'ye duyarlılıklarına bağlı olarak belirlenirler ve hücre alt yapılarındaki dağılımları farklıdır. MnSOD her iki inhibitöre dirençli olup prokaryotik organizmalar ve ökaryotik hücrelerin mitokondrisinde, Cu/ZnSOD her iki inhibitöre duyarlı olup yüksek bitkilerin hem sitoplazma hem de kloroplastlarında (Scandalios 1993), FeSOD ise, KCN'ye dirençli,  $H_2O_2$ 'ye duyarlı olup, prokaryotik organizmalarda ve bazı bitki türlerinin kloroplastlarında bulunabilirler (Bowler vd. 1992).

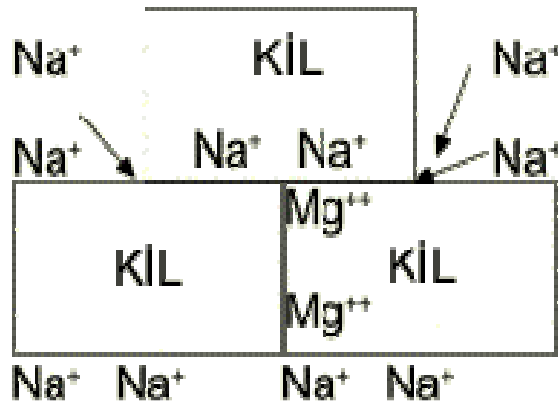
Tuza toleransı başarmak için en öncelikli görev yeni stresli ortamda hasarı önlemek veya dindirmek ya da uygun homeostatik koşulları tekrar kurmaktır. Çünkü büyüme değerindeki düşüğe rağmen büyüme sürdürülmelidir (Zhu 2001).

Tuzlu koşullarda verimliliği artırmak için toprak yıkama, topraktaki organik madde miktarını artırma, tuza toleranslı tür ve çeşit kullanımı gibi birçok uygulamalar yapılabilmektedir. Bu uygulamaların yanında topraktaki tuzun bitkilerdeki toksisitesini

azaltıcı bazı besin maddeleri uygulamaları da mevcuttur (Türkmen vd. 2002). Bitkilerde tuzun toksikliğini azaltıcı maddelerden biri de kalsiyumdur. Bitkilerin strese girdiği tuzlu koşullarda kalsiyum ilavesi tuz stresine karşı özellikle düzenleme ve bitki savunma mekanizmasında etkin olduğu kaydedilmiştir (Cramer *et al.* 1985; Li *et al* 2003). Besin çözeltisindeki  $Ca^{+2}$  hücre zarı sızıntısını indirgemesiyle ve  $Na^{+}$  iyonlarının alınımını inhibe etmesiyle NaCl nin kötü etkisini hafifletir (Tuna 2007).

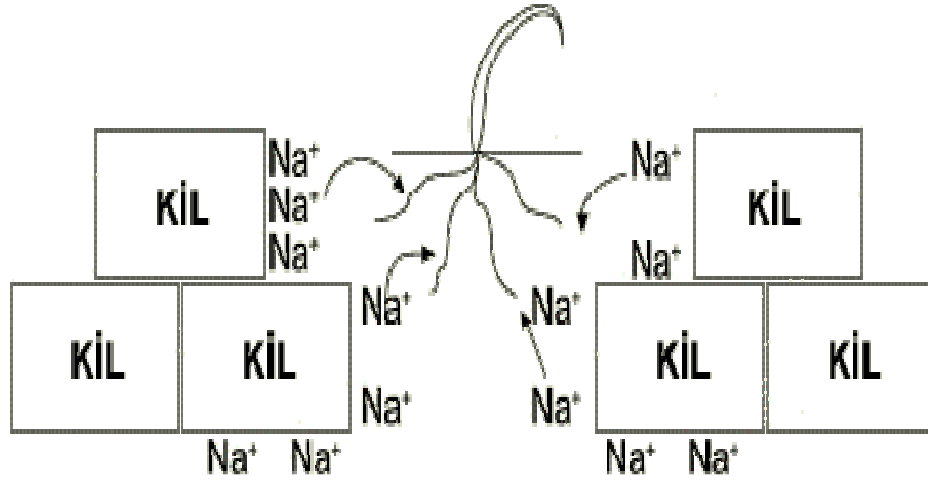
Tuzlulukla indirgenen  $K^{+}$  konsantrasyonları  $Ca^{+2}$  nin ilave edilmesiyle yeterli düzeyde yenilenebilir. Çünkü kalsiyum eklenmesi sitosolik potasyum sızıntısını azaltır ve  $Na^{+}$  nin zararlı etkisinden hücre zarlarını korur. Kalsiyum toprağın fiziksel yapısını geliştirmede ve bitkilerde iyonların ilişkisinin düzenlenmesinde hayati bir rol oynar (Qadir *et al.* 2001).

Yüksek tuz konsantrasyonları bitkilerde su stresi yaratan toprak solüsyonunun osmotik potansiyelini azaltır ve toprağın fiziksel yapısında bozulmaya yol açar (McCue and Hanson 1990). Kil paletleri sodyum ile (bazende magnezyum ile) birbirine yapışır (Şekil 1.1). Bu olay sadece toprak suyunda önemli miktarda sodyum varsa ve kil paletlerinde kalsiyumun yerini almış ise görülür.



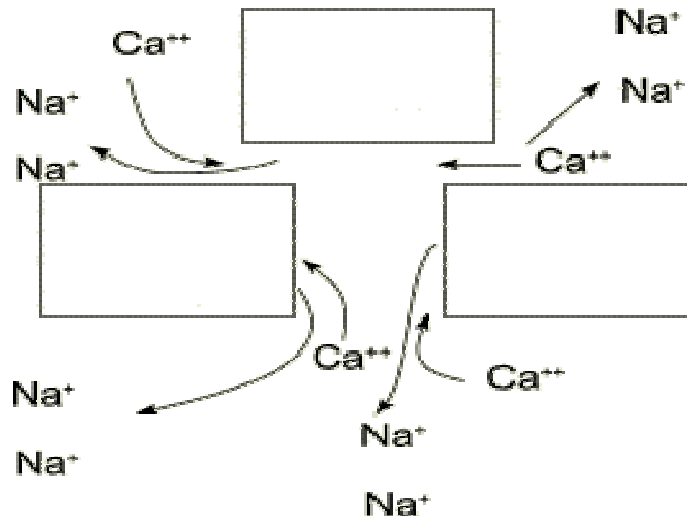
**Şekil 1.1.**  $Na^{+}$  iyonları ile kil tanelerinin birbirine yapışması



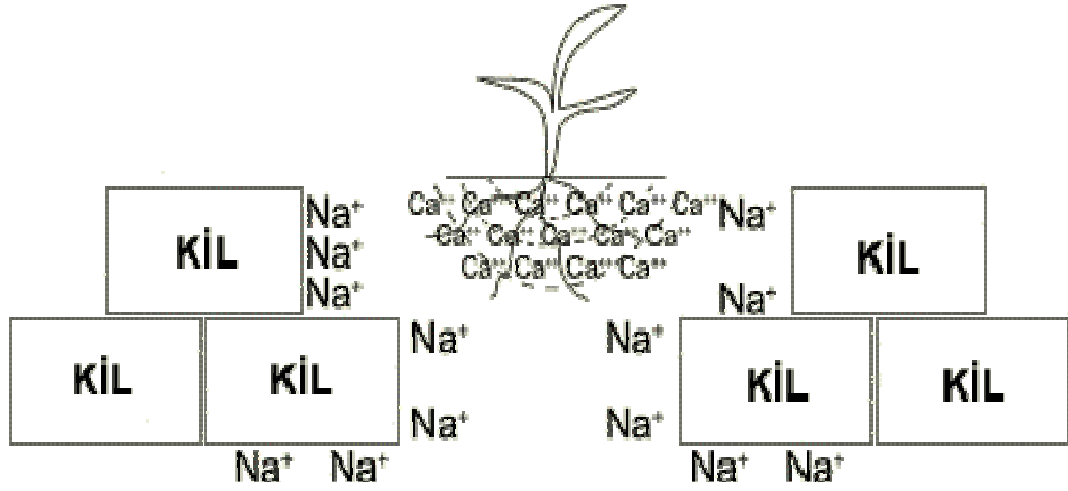


**Şekil 1.2.**  $\text{Na}^+$  iyonlarının kil tanelerin etkilemesi sonucu bitkinin durumu

Eğer toprak suyuna çözümlü kalsiyum eklenirse, kütle hareketi (Mass action) ile kalsiyum kil üzerindeki sodyumun yerini alır (Şekil 1.3). Böylece kil paletleri birbirine yapışmaz. Bitki  $\text{Na}^+$  iyonlarının toksik etkisine karşı kısmen korunmuş olabilir (Şekil 1.4) <http://www.izotar.com/teknik7.htm> (07.04.2010).



**Şekil 1.3.**  $\text{Ca}^{+2}$  iyonlarının kil tanelerini birbirinden ayırması

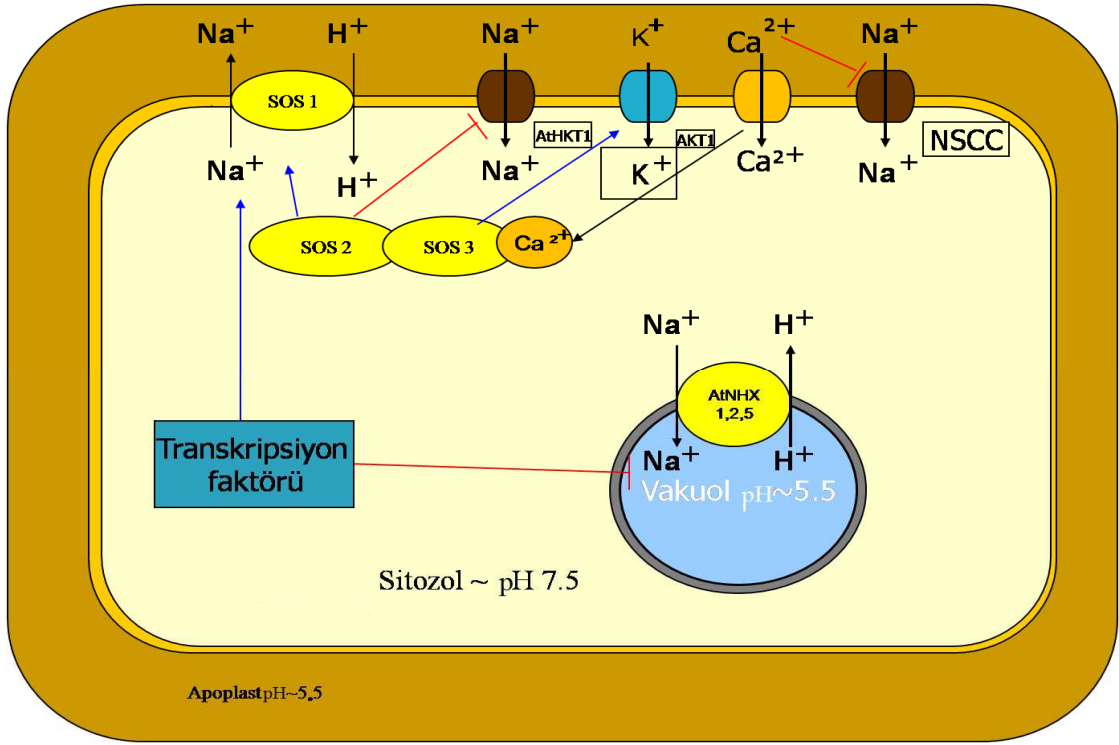


**Şekil 1.4.** Tuzlu ortama  $\text{Ca}^{+2}$  ilavesi sonucu bitkinin durumu

Farklı değerliğe sahip iyonların bitki tarafından alınmasında iyonların birbirine zıt etki göstermesine iyon antagonizması denilir.  $\text{Na}^+$  gibi tek değerlikli iyonlar hücre için toksik etki yaparken ortama az miktarda verilen  $\text{Ca}^{+2}$  iyonları hücre zarının kolloidal yapısında değişikliğe neden olarak zarın bu tek değerlikli tuz iyonlarına geçirgenliğini azaltır. Böylece  $\text{Na}^+$ 'nın alınımını azaltarak, onun yol açtığı toksik etkiyi hafifletir (Kocaçalışkan 2008).

Kalsiyum zaruri bitki besin elementlerinden biridir. Enzim aktivitelerinin kontrolü, ikinci mesajcı olarak uyum sinyalleriyle zarların dengesini koruması gibi metabolik aktivitelerde role sahiptir (Arshi *et al.* 2006).  $\text{Ca}^{+2}$ , bitkilerde tuz stresinin varlığını hücrenin ilgili yerlerine iletme işine de yardım edebilir. Kalsiyum,  $\text{Ca}^{+2}/\text{Na}^+$  ve  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  seçiciliği için gereklidir.  $\text{Ca}^{+2}$ , iyon taşıma düzenlenmesine ve zar bütünlüğünün korunmasına yardım eder (Maathuis and Amtmann 1999; Renault 2005).

Ayrıca  $\text{Ca}^{+2}$ 'nin Şekil 1.5'te görüldüğü gibi, bitki hücrelerinde sinyal iletim yolunun düzenlenmesinde de aktif bir rolü vardır.



**Şekil 1.5.** Bitki hücrelerinde tuz stresi altında iyon dengesinin sinyal iletim yolu (SOS) ve Ca<sup>2+</sup> düzeyleri tarafından düzenlenmesi

Kırmızı oklar taşıyıcı proteini pozitif yönde, mavi oklar ise negatif yönde düzenlenişini göstermektedir. Sarı ile gösterilen proteinler tuz stresince aktifleşir. SOS1, plazma zarı Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporteri; SOS2, serin/treonin kinaz; SOS3, Ca<sup>2+</sup> bağlayan protein; HKT1, sodyum giriş taşıyıcısı; AKT1, K<sup>+</sup> girişi kanalı; NSCC, seçici olmayan katyon kanalı; NHX 1,2,5, hücre içi zar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporteri; turuncular ise, henüz kimliği saptanmamış olan kalsiyum kanal proteinleridir. Tuz stresi bir kalsiyum kanalını aktifleştirir. Bunun sonucu sitosolde kalsiyum konsantrasyonu artar. Bu artış, SOS3 aracılığıyla, SOS2 metabolik basamaklarını uyarır. SOS metabolik basamaklarının, HKT1'i negatif olarak düzenlenmesi gerekir. HKT1 de AKT1'i sekonder olarak düzenler. SOS metabolik basamakları, aynı zamanda SOS1 ve AKT1 aktivitelerini de artırır. Henüz tam olarak tanımlanmamış bir transkripsiyon faktörü olarak rol oynayan SOS metabolik basamakları, NHX1 gen(ler)inin transkripsiyonunu azaltıp SOS1'inkini ise artırır. Kalsiyum konsantrasyonu düşük olduğunda NSCC alternatif bir sodyum giriş sistemi olarak rol oynayabilirse de, bu taşıyıcı yüksek kalsiyum düzeylerinde engellenir (Taiz and Zeiger 2008).

Yüksek bitkilerde en bol bulunan ve fizyolojik yönden en geçerli olan oksin IAA'dır. Bitkinin uzunluğuna büyümesi için optimum oksin konsantrasyonu  $10^{-6}$  ile  $10^{-5}$ M'dir. Oksinin etki göstermesinde kalsiyumun rolü çok karmaşık olup aydınlatılmayı beklemektedir. Ancak deneysel veriler oksinin hücrede serbest kalsiyum düzeyini artırdığını göstermiştir. Oksin uygulanan bitkilerde kısa bir zaman sonra sitosolde 0,2 birimlik bir pH azalması görülmüş ve bunun sebebinin oksinin, bağlı kalsiyum formlarını ayrıştırması olabileceği düşünülmüştür (Taiz and Zeiger 2008).

Bu araştırmada; çeşitli araştırma verilerine göre en fazla ekim alanına ve üretime sahip, yararlanma ve kullanma bakımından özellikle proteince zengin bir yemeklik tane baklagil bitkisi (Sağlam vd. 2005), toprağa azot kazandırması nedeni ile ekim nöbetinde de kıymetli sayılan (Kaçar vd. 2004), ayrıca; ülkemiz bakliyat üretiminde önemli bir yere sahip olan fasulye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisi kullanılmıştır. Bu çalışmanın amacı; dünya ve ülkemiz topraklarının giderek artan sorunlarından biri olan tuzluluğa karşı WDXRF analiz sonuçlarına göre %52.7 oranında kalsiyum kaynağı olduğu tespit edilen kemik tozu solüsyonunun uygulamasının etkisi araştırılmıştır. Bu araştırmada 150 mM NaCl ile üç farklı konsantrasyonda (%1, %1.5, %2) kemik tozu solüsyonu ve aynı uygulamalara ek olarak  $10^{-6}$ M IAA uygulamaları sonucunda bitkilerin ortalama kök-gövde uzunluklarının, çözünebilir protein miktarlarının ve fotosentetik pigment miktarlarının uygulamalara göre değişimi belirlenmiştir. Stres parametreleri olarak antioksidan enzimlerin aktiviteleri, lipid peroksidasyonu ve  $H_2O_2$  miktarları ölçülmüştür. Çalışmada tuza tolerans mekanizmasının anlaşılmasına, sınırlı olanaklarla ve kısıtlı kriterlere dayalı olarak, katkıda bulunulması hedeflenmiş ve bu amaçla sığır kemik tozunun bitkilerde tuz stresine karşı kullanımı literatürü anlamda ilk olarak araştırılmıştır.

## 2.KAYNAK ÖZETLERİ

Tuz stresinin bitkilerin gelişimi üzerine etkileri ve  $Ca^{+2}$ 'nin tuz stresinin zararlı etkilerini hafifletmesi üzerine çalışmalar uzun yıllardan beri yapılmaktadır. Son yıllarda tuzluluk probleminin ciddi şekilde artması tuz stresi ile ilgili çalışmaları daha da hızlandırmıştır.

Vicente *et al.* (2004) bir halofit bitki olan *Plantago crassifolia*'da tuz stresi karşısında meydana gelen değişiklikleri araştırmışlardır. Araştırmacılar tuz konsantrasyonu arttıkça çimlenme ve kuru ağırlığın azaldığını gözlemişlerdir. Tuz stresi altında yetiştirilen 12 pamuk çeşidinde yapılan çalışmada çimlenme oranları, yaş kök ağırlıkları, yaş sürgün ağırlıkları, sürgün uzunluğu karakterlerinin hepsinde artan tuz koşullarında kontrol bitkisine göre farklı oranlarda olumsuz etki gösterdiği bildirilmiştir (Öz ve Karasu 2007).

Kalsiyumun bazı çimen türlerinin tuza toleransında ve kuru madde üretimi üzerinde olumlu etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Suhayda *et al.* 1992). Artan dozlarda tuz-kalsiyum kombinasyonu uygulamalarında domates bitkisinde tuzun oluşturduğu tohum çıkış oranı, tohum çıkış süresi, gerçek yaprak görülme süresi, kotiledon uzunluğu ve genişliği, sürgün ve kök uzunluğu ve ağırlıkları üzerine olumsuz etkiyi düşük dozlarda kalsiyum uygulaması ile kısmen tolere edildiği bildirilmiştir (Tükmen vd. 2002).

$Na^+$  kökten gövdeye  $Ca^{+2}$  ve  $K^+$ 'nın taşınmasını inhibe eder ve zar bütünlüğünü tahrip eder. Hücreler arasındaki  $Ca^{+2}$  hücre zarı seçiciliğinin sağlanmasında önemli bir etkiye sahiptir. Aynı zamanda  $Ca^{+2}$  hücre duvarının ayrılmaz bir parçasıdır.  $Ca^{+2}$  hücre zarında fosfolipidlerin karboksil gruplarına ve fosfat gruplarına bağlanarak hücre zarının dengeli yapıda kalmasını sağlar (Cramer *et al.* 1985).

Genel olarak  $\text{Ca}^{+2}$  tedariki bitki gelişimi ile ilişkili olan  $\text{Na}^+$  alınımı azaltır,  $\text{K}^+$  ve  $\text{Ca}^{+2}$  alınımını artırır. Tuz stresine maruz kalan glikofit bitkilerde orta düzeyde  $\text{Ca}^{+2}$  desteği gelişim inhibisyonunu azalttığı bildirilmiştir (Yan *et al.* 1992).

Tuz stresi altındaki bitkilere dışarıdan uygulanan Ca, K veya P içeren bileşiklerin, bitkinin yaprak ve köklerinde  $\text{Na}^+$  ile rekabete girerek onun alınımını azalttığı ve bitki bünyesinde Ca, K ve P iyonlarının strese karşı koyabilecek yeterli düzeylere ulaşmasıyla birlikte bitkinin strese karşı koyabilme kapasitesinin de arttığı bazı çalışmalarla bildirilmiştir (Kaya and Higgs 2003; Yakıt ve Tuna 2006 ).

Son zamanlardaki çalışmalarda  $\text{Ca}^{+2}$ 'nin hücre zarı bütünlüğü ve zar geçiş fonksiyonlarında önemli bir etkisi olduğunun kanıtlandığını bildirilmiştir (Renault 2005).

100 mM  $\text{L}^{-1}$  NaCl içeren ortamda yetiştirilen *Vicia faba* 0.1 ve 10mM  $\text{L}^{-1}$   $\text{CaCl}_2$  uygulamasıyla özellikle 0,1 mM  $\text{L}^{-1}$   $\text{CaCl}_2$  uygulamasının  $\text{K}^+$  kanallarının düzenlenmesinde olumlu etki yaptığı bildirilmiştir (Xiang *et al.* 2008).

Tuz stresinin bitkilerdeki protein içeriğine etkisini belirlemek amacıyla birçok çalışma yapılmıştır. Alamgir ve Ali (1999) tuz stresinin çeltik bitkisinde yaprak pigmentleri, şeker ve protein içerikleri ile kloroplast ATPaz'ı üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, protein seviyelerinin azaldığını tespit etmişlerdir.

Niknam *et al.* (2004) NaCl'nin *Nicotiana tabacum* bitkisinde proteinler üzerindeki etkisini incelemişler; araştırmacılar tuz konsantrasyonuna bağlı olarak total protein miktarının azaldığını tespit etmişlerdir.

Teixeira and Pereira (2007) yüksek tuzluluğun (250 mM NaCl) patatesin yaprak, gelişen yumru ve kökleri, çözünebilir protein ve klorofil içeriği üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmada; bu stres faktörünün, hem patates bitki gelişimi hem de

organlarının çözünebilir protein ve klorofil içeriğini olumsuz etkilediğini bildirmişlerdir.

Downton *et al.* (1985), 200 mM NaCl içeren ortamda yetiştirilen ıspanak bitkisi yapraklarının birim alanında belirlenen klorofil miktarının, kontrol bitkilerinkinin ancak %73'ü düzeyinde olduğunu; ayrıca toplam klorofil miktarı içerisinde, klorofil *a*'nın tuz stresinden daha fazla etkilendiği ve parçalandığı saptanmıştır.

Öncel ve Keleş (2002) 200 mM NaCl içeren su kültürü ortamında yaptıkları çalışmada tuz stresi koşullarında, klorofil *a*, klorofil *b* ve toplam klorofilin tüm buğday (*Triticum aestivum* L.) genotiplerinde önemli ölçüde azaldığını, fakat klorofil *a* kaybına Seri-82 ve Ç-1252 genotiplerinin daha dirençli olduklarını gözlemlemişlerdir. Bu durumu, Seri-82 ve Ç-1252 genotiplerinde klorofil *a/b* oranının artışına, diğer genotiplerde ise azalmasına bağlayıp, klorofil *a/b* oranı tuz dayanıklılığının belirlenmesinde önemli bir parametre olabileceğini bildirmişlerdir.

Parida ve ark. (2004) *Aegiceros corniculatum* bitkisinde tuzluluğun biyokimyasal olaylar üzerine etkilerini belirlemişlerdir. Araştırmacılar tuz konsantrasyonuna ve uygulama süresine bağlı olarak klorofil *a*, *b* ve karotenoid miktarlarında belirli oranlarda azalma tespit etmişlerdir. Santos (2004), ayçiçeği bitkisinde tuz stresiyle klorofil biyosentez ve bozulması üzerine bir araştırma yapmışlardır. Araştırmacılar tuz konsantrasyonu arttıkça klorofil miktarının düştüğünü ortaya koymuşlardır. Farklı kaynaklarda NaCl stresi klorofil içeriğini ve net fotosentetik oranı azalttığı bildirilmiştir (Khavarinejad and Chaparzadeh 1998; Koçer 2007).

*Grevilea*'da tuz stresi altında protoklorofil, klorofiller ve karotenoidlerin önemli düzeyde azaldığı ortaya konulmuştur (Kennedy and De Fillippis 1999; Koçer 2007). *Bruguiera parviflora* bitkisinin yapraklarında tuzluluğun klorofil *a*, klorofil *b* ve karotenoid seviyelerinde azalmaya neden olduğu belirlenmiştir (Parida *et al.* 2002; Koçer 2007).

Bununla birlikte Wang and Nil (2000) tuz stresine maruz bırakılan *Amaranthus*'ta klorofil içeriğinin arttığını rapor etmişlerdir.

Yan-Feng *et al.* (2008) 150 mM NaCl içeren ortamda yetiştirilen *Helianthus tuberosus* L. bitkisinin ortamına 10 M.L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub> eklenmesi klorofil içeriğini ciddi değerde artırdığını bildirmiştir.

Bitkilerde **CAT** enziminin aktivitesine tuz stresinin etkisi ile ilgili birçok çalışma bulunmaktadır. Gosset *et al.* (1994) pamukta tuza toleranslı çeşitlerde CAT aktivitesinin, hassas genotiplere göre daha yüksek değerlerde olduğu belirlenmiştir. Shalata *et al.* (2001) domateste tuz stresinde CAT aktivitesinin yüksek değerlerde olduğunu bildirmişlerdir. Kültür domatesi *Lycopersicon penellii* (Cor.) D'Arcy (Lpa) 100 mM'lık tuz stresine maruz bırakıldıklarında; SOD ve CAT aktivitelerinin artış gösterdiği rapor edilmiştir (Shalata *et al.* 2001).

Khedr *et al.* (2003) yaptıkları araştırmada tuz stresine maruz bırakılan *Pancreatium maritimum* bitkisinde, taze ve kuru ağırlık miktarının tuz konsantrasyonuna paralel olarak azaldığını, ayrıca CAT aktivitesinin tuz konsantrasyonunun artışıyla azaldığını, POD aktivitesinin arttığını ifade etmişlerdir.

Tuz stresi altında yapılan çalışmalarda, senna (*Cassia angustifolia*) ve soya fasulyesi bitkilerinde CAT aktivitesinin önemli derecede yüksek olduğu gözlenmiştir (Agarwal and Pandey 2004; Ghorbanli *et al.* 2004). İki mısır türünde 100 mM NaCl uygulamasından sonra yaprak dokusunda CAT aktivitesinin arttığı bildirilmiştir (Neto *et al.* 2005).



**POD** enzim aktivitesine tuz stresinin etkisi ile ilgili çalışmalar mevcuttur: Gosset *et al.* (1996) 150 mM NaCl uygulanması durumunda tuza dayanıklı pamuk genotipinin, duyarlı genotipe göre daha yüksek CAT (% 341), peroksidaz (% 319), aktivitelere sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Sreenivasulu *et al.* (2000) farklı tuz konsantrasyonlarında *Seteria italica* (akdarı) bitkisinin tuza toleranslı ve tuza hassas kültürlerinin, antioksidant kapasitesini incelemiştir. Buna göre; toplam SOD ve askorbat peroksidaz (APX) aktivitesinin tuz stresine maruz kalan tuza hassas kültürde belirgin şekilde azalırken, tuz stresi koşullarındaki tuza toleranslı kültürde ise arttığını bildirmişlerdir. Buğday, çeltik, sinameki (*Cassia angustifolia*) bitkisi ve soya fasulyesinde POD aktivitesinin tuz stresi ile önemli derecede arttığı bildirilmiştir (Agarwal and Pandey 2004; Ghorbanli *et al.* 2004).

Hernandez *et al.* (2003) NaCl ortamına eklenen  $Ca^{+2}$ 'nin POD ve CAT aktivitesini inhibe ederken, SOD aktivitesini artırmıştır.

Antioksidan sistemin diğer elemanı olan **SOD** aktivitesine tuz stresinin etkisini içeren birçok çalışma mevcuttur. Gossett *et al.* (1994) *Gossypium hirsutum* L.'de NaCl stresinin SOD aktivitesini artırdığını rapor etmişlerdir. Hernandez *et al.* (1999) bezelye (*Pisum sativum*) bitkisinde yüksek NaCl konsantrasyonlarının (110–130mM), sitosolik CuZn-SOD II, kloroplastik CuZn-SOD II ve peroksisomal veya mitokondriyal MnSOD'un aktivitesini artırdığını bildirmişlerdir.

Jalel *et al.* (2007) 80 mM NaCl ortamına ek olarak 5mM  $CaCl_2$  ilave etmesi sonucu *Catharanthus roseus* bitkisinin dokularında CAT, POD ve SOD enzimlerinin aktivitesinin artış gösterdiğini bildirmiştir.

Parida *et al.* (2004), *Bruguiera parviflora* bitkisiyle yaptıkları çalışmada artan tuz konsantrasyonlarına bağlı olarak SOD aktivitesinin artış gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Tuz uygulamasıyla SOD aktivitesinin arttığı diğer araştırıcılar tarafından da kaydedilmiştir ( Lin and Kao 2000; Shalata and Tal 1998; Eroğlu 2007).

Stresli koşullarda stresin sebep olduğu hasarın ölçütü kabul edilen **LPO** ve hücre zarlarının yapısal bütünlüğünün bozulduğunu göstermede iyi bir indikatör olan, ayrıca doymamış yağ asitlerinin peroksidasyon ürünü olarak ortaya çıkan malondialdehit (MDA) miktarındaki tuz stresinin neden olduğu değişimler üzerine birçoğ çalışma mevcuttur:

Chaoui *et al.* (2004) tarafından yapılan çalışmalarda, tuz stresi uygulanmış fasulye bitkisinde lipid peroksidasyonunun kontrol grubuna göre yükseldiği rapor edilmiştir. Neto (2005) mısır bitkisinin iki farklı genotipinde 100 mM NaCl koşulunda lipid peroksidasyon ve antioksidant enzimlerin tuzlu koşullardan etkilenme düzeylerini incelemiş, yaprak dokusunda lipid peroksidasyonunun tuza hassas genotiplerde arttığı, ayrıca kontrol gruplarına göre SOD aktivitesinin de artış gösterdiğini bildirmiştir.

*Catharanthus roseus* bitkisine farklı konsantrasyonlarda tuz uygulandığında MDA miktarı artış göstermiş, 5 mM Ca<sup>+2</sup> ilave edildiğinde MDA miktarında azalmalar olduğu rapor edilmiştir (Jalel *et al.* 2007).

Amor *et al.* (2009) yaptığı çalışmada, *Cakile maritima* bitkisine yalnız 0, 100, 200 ve 400 mM NaCl uygulamasıyla MDA miktarının arttığı, NaCl'ye ilaveten farklı konsantrasyonlarda Ca<sup>+2</sup> (0, 3.5 ve 20 mM) eklenen gruplarda ise MDA miktarının azalma gösterdiğini rapor etmiştir.

Çevresel streslerde yaprak dokusundaki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin strese cevap ile ilişkili olduğu birçoğ çalışma da rapor edilmiştir: Kadife ieği (*Calendula officinalis*) tuz stresine (100 mM) maruz bırakıldığında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seviyesinin normale göre %26 arttığı gösterilmiştir (Chaparzadeh *et al.* 2004).

Mangrov bitkisine sera şartlarında tuz verildiğinde, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seviyesinin gram dokuda %32,9 oranında arttığı bildirilmiştir (Parida and Das 2005). Tuza hassas iki mısır türünde 100 mM NaCl uygulamasından sonra hem kök hem de yaprakta H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarının arttığı bildirilmiştir (Neto et al. 2005). Yingli *et al.* (2007) artan tuz konsantrasyonuna bağlı olarak buğday bitkisinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarında artış gözlemişlerdir.

*Cakile maritima* bitkisinde 0, 100, 200 ve 400 mM NaCl içeren ortamlara eklenen farklı Ca konsantrasyonlarının (0, 3.5 ve 20 mM) antioksidant enzimlere etkisi incelenmiş, kalsiyum eklenen gruplarda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarının yalnız NaCl içeren gruplara göre azalma gösterdiğini bildirilmiştir (Amor *et al.* 2009).

Nohut (*Cicer arietinum*) bitkisinde yapılan çalışmada, 75 mM NaCl' lik tuz stresi nohut kök ve gövde uzunluklarını azaltırken dıştan uygulanan IAA' nın bu fidelerin gelişimini daha fazla indirdiği bildirilmiştir (Kaur *et al.* 2003).

Felle (1988) oksinlerin mısır epidermis hücrelerinin sitoplazmasına Ca<sup>+2</sup> salınımını artırdığını bildirmiştir.

### 3. MATERYAL ve YÖNTEMLER

#### 3.1. Yararlanılan alet ve cihazlar

İklim dolabı	: Sanyo, Japonya ve Jenotech, Kore
Masa santrifüjü	: Hettich EBA 21
Soğutmalı santrifüjü	: Hettich Micro 22 R
Spektrofotometre	: Shimadzu UVmini-1240
pH metre	: WTW unilab pH metre
Hassas terazi	: Shimadzu AY220
Buzdolabı	: Arçelik
Derin dondurucu (-30 °C)	: Arçelik
Derin dondurucu (-80 °C)	: Harris, İngiltere
Karıştırıcı	: Fisons Whirlmixer
Otomatik pipetler	: Nichipet EX ve Socorex
Manyetik karıştırıcı	: Chiltern HS31
Soğuk su banyosu	: Huber Polystat CC1
WDXRF	: Rigaku ZSX 100e Rh X ışını tüpü ile donatılmış sıralı spektrometre
Homojenizatör	: Wigggen Hauser D- 500

### 3.2. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanmaları

Araştırma süresince kullanılan çözeltilerin kullanıldığı yerler ve hazırlanış biçimleri aşağıda sunulmuştur. Çalışmalarımızda kullanılan kimyasal maddeler Sigma ve Fuluka şirketlerinden temin edilmiştir.

1. Arnon ve Hogland besi çözeltisi: 1.02 g  $KNO_3$ , 0.492 g  $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ , 0.23 g  $NH_4H_2PO_4$ , 0.49 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 2.86 g  $H_3BO_3$ , 1.81 g  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ , 0.08 mg  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ , 0.22 mg  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.6 mg  $FeSO_4$ , 0.6 mg tartarik asit saf su içerisinde çözülerek hacmi 1 litreye tamamlanmıştır.
2. 150mM NaCl çözeltisi : 17.55 g NaCl tartılıp 900 ml saf suda çözülmüş, son hacim 2000 ml' ye tamamlanmıştır.
3. 150 mM NaCl + %1 kemik solüsyonu : 150mM NaCl çözeltisinden 250 ml alınarak 4 g toz halindeki kemik katılmış, 40 °C sıcaklıkta 30 dakika karıştırıldıktan sonra, son hacim 150mM NaCl çözeltisiyle 400 ml' ye tamamlanmıştır.
4. 150 mM NaCl + %1.5 kemik solüsyonu : 150mM NaCl çözeltisinden 250 ml alınarak 6 g toz halindeki kemik katılmış, 40 °C sıcaklıkta 30 dakika karıştırıldıktan sonra, son hacim 150mM NaCl çözeltisiyle 400 ml' ye tamamlanmıştır.
5. 150 mM NaCl + %2 kemik solüsyonu : 150mM NaCl çözeltisinden 250 ml alınarak 8 g toz halindeki kemik katılmış, 40 °C sıcaklıkta 30 dakika karıştırıldıktan sonra, son hacim 150mM NaCl çözeltisiyle 400 ml' ye tamamlanmıştır.
6. 150 mM NaCl + 15mM  $CaCl_2$  çözeltisi : 150mM NaCl çözeltisinden 250 ml içinde 0,666 g  $CaCl_2$  çözülmüş, son hacim 400ml olacak şekilde 150mM NaCl çözeltisiyle tamamlanmıştır.
7. 150 mM NaCl + 30mM  $CaCl_2$  çözeltisi : 150mM NaCl çözeltisinden 250 ml içinde 1,332 g  $CaCl_2$  çözülmüş, son hacim 400ml olacak şekilde 150mM NaCl çözeltisiyle tamamlanmıştır.

8.  $10^{-4}$  M IAA çözeltisi : 0.0018 g IAA tartılıp 5ml alkolde çözülmüş, hacim saf su ile 100 ml ye tamamlanmıştır.
9.  $10^{-6}$  M IAA çözeltisi :  $10^{-4}$  M IAA çözeltisinden 4ml alınıp 396 ml saf su ile hacmi 400 ml' ye tamamlanmıştır.
10. Coomassie reaktifi (protein içeriği) : 10 mg Coomassie Blue G-250 , 5 ml etanolde çözülür, üzerine 10 ml % 85'lik fosforik asit ilave edilir ve hacim saf suyla 100 ml 'ye tamamlanmıştır.
11. % 80' lik aseton (Fotosentetik pigment analizinde kullanılan çözelti): 400 ml aseton alınıp saf su ile toplam hacim 500 ml yapılmıştır.
12. 0.1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH: 7.0), %1 PVP, 1mM EDTA (antioksidan enzimlerin homojenizasyon tamponu): 3.4 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  200 ml saf suda çözülmüş, 1 N NaOH kullanılarak pH 7.0'ye ayarlandıktan sonra hacim saf su ile 250 ml' ye tamamlanmış ve üzerine 2.5 g PVP ve 0.073 g EDTA ilave edilmiştir.
13. 103.5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH: 7.5 (CAT aktivitesi ölçümünde kullanılan tampon): 1.41 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 70 ml saf suda çözülmüş, 1 N NaOH ile pH: 7.5'e ayarlanmış ve hacim saf su ile 100 ml' ye tamamlanmıştır.
14. 40 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  çözeltisi (CAT aktivitesi ölçümünde kullanılan substrat çözeltisi): 346  $\mu\text{L}$  %35'lik  $\text{H}_2\text{O}_2$  alınıp hacmi saf su ile 100mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
15. 5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  çözeltisi (CAT aktivitesi ölçümünde standart grafik hazırlamak için kullanılan): 43  $\mu\text{L}$  %35'luk  $\text{H}_2\text{O}_2$  alınıp hacmi saf su ile 100ml 'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
16. 0.1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH: 5.5 (POD aktivitesinin ölçümünde kullanılan tampon çözeltisi): 3.55 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  alınarak 200 ml saf suda çözülmüş ve pH: 5.5'e ayarlandıktan sonra hacim saf su ile 250 ml'ye tamamlanmıştır.
17. POD aktivitesi ölçümünde kullanılan substrat çözeltisi(5mM guaikol + 5mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ ): 54  $\mu\text{L}$  quaiKol ve  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ 'dan (d=1.13 g/mol) 5 mM olacak şekilde 100 ml 0.1 M fosfat tamponu (pH: 5.5) içinde çözümlenerek hazırlanmıştır.

- 18.** 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH: 7.8) (SOD için tampon çözelti): 1.7 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  200 ml saf suda çözülmüş, pH: 7.8'e ayarlandıktan sonra ve hacim saf su ile 250 ml'ye tamamlanmıştır.
- 19.** 13 mM metionin çözeltisi (SOD reaksiyon karışımı için): 0.586 g metionin alınır, 27. maddede hazırlanmış olan 250 ml 50mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  tamponu içerisine ilave edilerek çözülür.
- 20.** 63  $\mu\text{M}$  NBT-Nitroblue Tetrazolium Klorür (SOD reaksiyon karışımı için): 0.0128 g NBT alınır, 18. maddede hazırlanmış olan 250 ml 50mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  tamponu içerisine ilave edilerek çözülür.
- 21.** 0.1 mM EDTA-Etilen Diamin Tetra Asetik asit (SOD reaksiyon karışımı için): 0.073 g EDTA alınır, 18 . maddede hazırlanmış olan 250ml 50mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  tamponu içerisine ilave edilerek çözülür.
- 22.** 13  $\mu\text{M}$  riboflavin (SOD aktivitesi için 2. çözelti): 0.019 g riboflavin, 500 ml saf suda çözülmüş, 3 ml' lik reaksiyon karışımının 13  $\mu\text{M}$  riboflavin içermesi için 390  $\mu\text{M}$  riboflavin alınmıştır.
- 23.** %5'lik TCA - trikloroasetik asit (LPO için homojenizasyon çözeltisi) : 100 ml saf su içerisine 5 g TCA ilave edilerek çözülür.
- 24.** %0.5'lik TBA-tiobarbutirik asit) (LPO için reaksiyon çözeltisi): 100 ml saf su içine 20 gram TCA çözülür ve daha sonra içerisine % 0.5 g TBA ilave edilerek iyice çözünmesi sağlanır.
- 25.** %5'lik  $\text{Ti}(\text{SO}_4)_2$  - titanyum disülfat çözeltisi ( $\text{H}_2\text{O}_2$  miktarı için): 1 gram  $\text{Ti}(\text{SO}_4)_2$  20 ml saf suda çözümlenerek hazırlanmıştır.
- 26.** %19'luk  $\text{NH}_4\text{OH}$  – amonyum hidroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$  miktarı için): 20.84 ml saf su üzerine 4.16 ml  $\text{NH}_3$  iave edilerek çözünmesi sağlanır.
- 27.** 1 M'lık  $\text{H}_2\text{SO}_4$  – sülfürik asit ( $\text{H}_2\text{O}_2$  miktarı için): 10 ml %98' lik  $\text{H}_2\text{SO}_4$  alınmış, üzerine 160 ml saf su ilave edilerek hacmi 200 ml' ye tamamlanmıştır.

### 3.3. Yöntemler

#### 3.3.1. Bitkilerin büyütülmesi

Araştırmamızda bölgemizde de ekimi yapılan, tuz stresine hassas olan fasulye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisi kullanılmıştır. Tohumlar ekilmeden önce %96'lık alkol ile kısa süreli hızlıca yıkanmış ve %5'lik sodyum hipoklorit içerisinde 5 dk yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuştur. Daha sonra 3 kez saf su ile yıkanarak, oda şartlarında saf su içerisinde yaklaşık 5 saat şişmeye bırakılmıştır. Bitkiler araştırma süresince kum kültüründe yetiştirilmiştir. Bunun için her bir saksıya eşit miktarda olacak şekilde kum konulmuş ve kum içeren saksılar önce suyla 5 kez, sonra saf su ile yıkanmıştır. Her saksıya saf su ile şişirilmiş tohumlar eşit miktarda ekilmiştir. Bitkiler iklim dolabında kontrol şartlarında (25/20°C sıcaklık ve 12/12 saat ışık-karanlık periyodunda 20.000 lüks, %70 nem) 24 gün süreyle büyütülmüştür. Her saksı, kesileceği güne kadar, günlük eşit miktarda saf su ve haftada bir kez de Hoagland besi çözeltisiyle sulanmıştır. On dördüncü günde bitkiler her bir grupta 4 tekrar olacak şekilde 13 gruba ayrılıp aşağıdaki uygulamalar yapılmıştır. 13 grup bitki de kendi arasında iki gruba ayrılmış ikinci gruptaki bitkilere, birinci gruptaki bitki uygulamalarına ek olarak yapraklarına  $10^{-6}$ M IAA püskürtme yoluyla uygulanmıştır.

#### **Birinci gruptaki bitkilerin uygulamaları**

1. Kontrol
2. 150 mM NaCl
3. 150 mM NaCl + %1 kemik tozu solüsyonu
4. 150 mM NaCl + %1.5 kemik tozu solüsyonu
5. 150 mM NaCl + %2 kemik tozu solüsyonu
6. 150 mM NaCl + 15 mM CaCl<sub>2</sub>
7. 150 mM NaCl + 30 mM CaCl<sub>2</sub>



### **İkinci gruptaki bitkilerin uygulamaları**

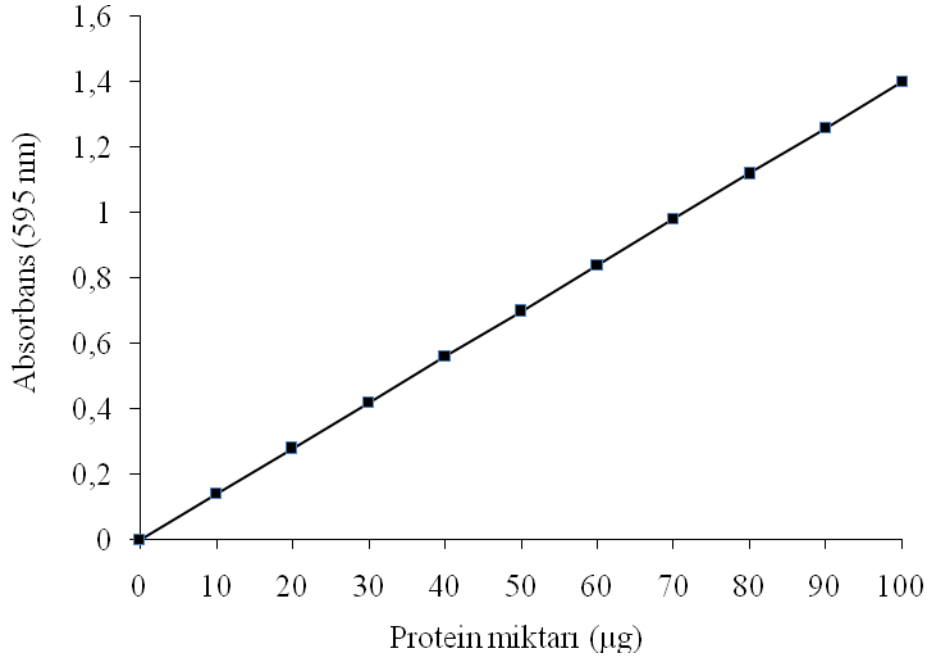
8. 150 mM NaCl +  $10^{-6}$  M IAA
9. 150 mM NaCl + %1 kemik tozu solüsyonu +  $10^{-6}$  M IAA
10. 150 mM NaCl + %1.5 kemik tozu solüsyonu +  $10^{-6}$  M IAA
11. 150 mM NaCl + %2 kemik tozu solüsyonu +  $10^{-6}$  M IAA
12. 150 mM NaCl + 15 mM CaCl<sub>2</sub>+  $10^{-6}$  M IAA
13. 150 mM NaCl + 30 mM CaCl<sub>2</sub>+  $10^{-6}$  M IAA

Uygulamalardan sonra bitkiler 10 gün daha büyütüldükten sonra, 24 günlük oldukları zaman hasat edilerek biyokimyasal parametrelerindeki değişimler çalışılmıştır.

### **3.3.2. Çözünabilir protein miktarının tayini**

Bitkilerin dokularından 0,5g'lık örnekler kullanılarak Bradford (1976) metoduna göre protein tayini yapıldı. Sonuçlar "mg protein/g taze doku cinsinden hesap edilir. Her bir muameleye ait bitkilerin, küçük parçalara ayrılmış yaprak dokusundan 0.5g alınarak 10 misli hacimdeki 0.05 M fosfat tamponunda (pH:6.5) havanda ezilerek homojenizasyon yapıldı. Homojenat dört katlı tülbentten süzüldü ve süzüntü santrifüj tüplerine alınıp, 15.000 rpm' de 20 dk. boyunca santrifüj edildi. Protein tayini için tüplerin üst kısmındaki sıvı faz (süpernatant) kullanıldı. Protein miktarı spektrofotometrik yolla tayin edildi. Metot için gerekli standart grafik şu şekilde hazırlandı; 1ml' sinde 1 mg protein içeren standart sığır albümin çözeltilisinden 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 µg protein içeren hacimler tüplere aktarılıp, saf su ile bütün tüplerin hacimleri 0.2ml'ye tamamlandı. Bu tüplere 3'er ml'de Coomassie Blue G ilave edilip vorteks ile karıştırıldı. Kör numune olarak 0.2ml aynı tampondan ve 3 ml Coomassie reaktifinden oluşan karışım kullanıldı. Yapılan spektrofotometrik ölçümler sonucunda, 595 nm' deki absorbans değerlerine karşılık gelen protein değerlerinden yararlanarak standart grafik elde edildi. Standart grafik hazırlama çalışmasında olduğu gibi, bitki organlarından elde edilen özütlerden 0.2 ml alınıp, 3 ml Coomassie reaktifiyle karıştırıldı ve 595 nm'de

absorbansları ölçülerek, standart grafikten yararlanılıp, 0.2 ml özütdeki protein miktarları belirlendi. Daha sonra, gerekli hesaplamalar yapılarak protein miktarları mg protein/g doku olarak tayin edildi.



**Şekil 3.1** Protein tayini için kullanılan standart grafik

### 3.3.3. Fotosentetik pigment miktarlarının belirlenmesi

Fidelerin klorofil *a*, klorofil *b*, karotenoid, toplam pigment miktarlarını belirlemek için Witham ve ark. (1971) tarafından verilen prosedür uygulandı. Fasulye bitkisinden alınan primer yaprak örnekleri 1'er g olacak şekilde tartılmış ve parçalanarak üzerine 2 ml %80' lik aseton konarak havanda ezildi. Daha sonra filtre kağıdından süzülerek elde edilen ekstrakt %80'lik aseton ile 10 ml'ye tamamlandı. Elde edilen ekstraktların 450, 645 ve 663 nm absorbans değeri ölçüldü. Bitki ekstraktlarının üç farklı dalga boyunda yapılan absorbans ölçümlerinden elde edilen değerlerin aşağıda verilen eşitliklerde yerlerine konmasıyla, bitki yaprak dokusunun 1 gramında bulunan klorofil *a*, klorofil *b*, toplam klorofil ve karotenoid miktarları mg/doku olarak hesaplandı.

mg klorofil *a*/g doku = [12.7 (D663) – 2.69 (D645)] (V/ 1000.W)

mg klorofil *b*/g doku = [22.9 (D645) – 4.68 (D663) ] (V/1000.W)

mg toplam klorofil/g doku =[ 20.2 (D645) + 8.02 (D663)] (V/1000.W)

mg toplam karotenoid/doku = 4.07 x D450-(0.0435 x K<sub>la</sub> miktarı + 0.367 x K<sub>lb</sub> miktarı)

Eşitliklerde: D, klorofil ekstraktının belirtilen dalga boylarındaki absorbans değerini; V, %80'lik aseton son hacmini; W, ekstre edilen dokunun gram olarak yaş ağırlığını göstermektedir.

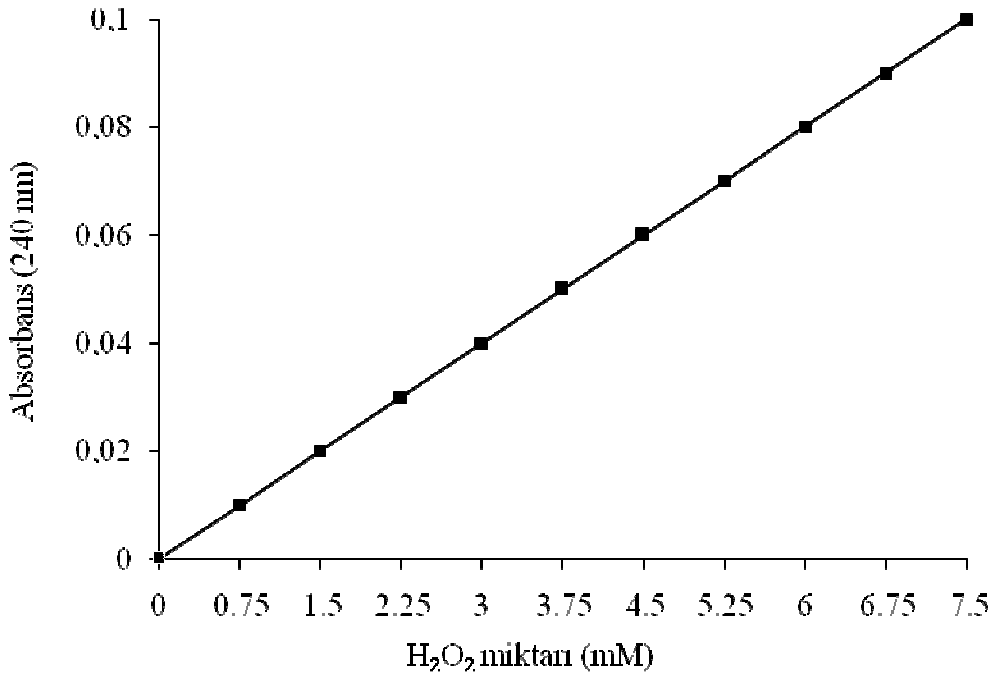
### 3.3.4. Antioksidan enzim aktivitelerinin belirlenmesi

Fasulye bitkisi yaprak doku örneklerinden 0.5'er gram alınarak 5 ml 0.1 M fosfat tamponunda homojenize edilerek 15000 rpm'de 15 dk santrifüj edilir. Süpernatant kısmı alınarak enzim kaynağı olarak kullanıldı.

#### 3.3.4.a. CAT aktivitesinin belirlenmesi

CAT aktivite tayini için Havir ve Mchale'nin (1987) Luck'e (1965) dayandırarak uyguladığı metot kullanıldı. Bu metot, CAT'ın ortamdaki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>' nin oksijen ve suya dönüşümünü sağlarken meydana gelen absorbans değişiminin 240 nm' de izlenmesi esasına dayanır (Havir *et al.* 1987; Taşgın 2004; Mutlu 2009). Önce reaksiyonda azalan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarını belirlemek için standart grafik hazırlandı. Standart grafik hazırlamak için, 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisinden 3 ml'lik spektrofotometre tüplerine sırasıyla; 0.15, 0.3, 0.45, 0.6, 0.75, 0.9, 1.05, 1.2, 1.35 ve 1.5 ml konulmuş, tüplerin hacimleri saf su ile 1.5 ml 'ye tamamlanmış ve her tüpe 1.47 ml 103.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ve 30 µL su ilave edilmiştir. Kör H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içermeyen numunedir. Küvet spektrofotometreye yerleştirildikten sonra 240 nm' de absorbans köre karşı okunmuş ve absorbans değerlerine karşılık gelen mM doku H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> değerleri kullanarak standart grafik elde edilmiştir.

Aktivite ölçümü için 3 ml'lik spektrofotometre küvetine, 103 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  tamponundan 1.475 ml ve 40 mM'lık  $\text{H}_2\text{O}_2$  substrat çözeltisinden 1.5 ml konulduktan sonra, 25  $\mu\text{L}$  enzim ekstraktı ilave edilmiştir. Küvet spektrofotometreye yerleştirildikten sonra 240 nm'de 3 dakika boyunca 1 dakika aralıklarla köre karşı absorbansı okunmuştur. Ölçümlerde absorbansın doğrusal olarak azaldığı aralıktan dakika başına absorbans azalması hesaplanmıştır. Bu ortalama absorbans değerleri, standart grafik yardımıyla  $\mu\text{mol}$  cinsinden  $\text{H}_2\text{O}_2$  miktarına dönüştürülmüştür. 25°C'de, 1 dakika içinde, absorbansı 1  $\mu\text{mol}$  azaltan enzim miktarı 1 enzim ünitesi olarak kabul edilmiş ve sonuçlar g yaprak başına düşen enzim ünitesi ( $\text{EU.g}^{-1}$  yaprak) olarak sunulmuştur (Gong *et al.* 2001; Mutlu 2005).



**Şekil 3.2** CAT aktivitesi ölçümünde kullanılan standart grafik

### 3.3.4.b. POD aktivitesinin belirlenmesi

POD aktivite tayini, guaikol ve  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'nin substrat olduğu reaksiyonun ürünü olan renkli bileşiğin meydana getirdiği absorbans artışının 470 nm' de izlenmesi esasına dayanmaktadır (Angelini *and* Federico 1989; Taşgın 2004; Mutlu 2009).

Aktivite ölçümü için spektrofotometre küvetine; 100 ml 0.1 M, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH: 5.5) ve 5 mM guaikol ve 5mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeren substrat çözeltisinden 3 ml konulduktan sonra, üzerine 10 µL enzim ekstraktı ilave edilmiştir. 470 nm’de 5 dakika boyunca absorbans artışı 1 dakika aralıklarla kaydedilmiş ve absorbansın doğrusal olarak arttığı kısımdaki absorbans artışı 1 dakikaya oranlanmıştır. 25°C’de 1 dakikada, absorbansı 0.01 artıran enzim miktarı 1 enzim ünitesi olarak kabul edilmiş ve sonuçlar g yaprak başına düşen enzim ünitesi (EU/g yaprak) olarak sunulmuştur (Yee *et al.* 2003; Mutlu 2005).

### 3.3.4.c. SOD aktivitesinin belirlenmesi

SOD aktivitesi, nitro blue tetrazoliumun (NBT) süperoksit radikalleri ile mavi renkli formazona fotokimyasal indirgenmesi reaksiyonunun SOD enzimi tarafından engellenmesinin spektrofotometrik olarak belirleme esasına dayanır (Agarwal and Pandey 2004; Mutlu *et al.* 2009).

Reaksiyon karışımı (3 ml); 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH: 7.8), 13 mM metiyonin, 63 µM NBT, 13 µM riboflavin ve 0.1 mM EDTA içermektedir. Aktivite ölçümü için 3 ml spektrofotometre küvetine yukarıdaki riboflavin içermeyen reaksiyon karışımından 2,58 alınmış ve üzerine 30 µM enzim ekstraktı pipetlenmiştir. Reaksiyon, tüp üzerine 13 µM’lık riboflavin çözeltisinden 390 µM pipetlenip karıştırıldıktan hemen sonra, beyaz bir ışık kaynağı önüne yerleştirmek suretiyle başlatılmıştır. Tüp, ışık kaynağının karşısında 15 dk. tutulmuş ve reaksiyon ışık kaynağının kapatılmasıyla durdurulmuştur. 15 dk. içerisinde NBT’ nin renk açılma yoğunluğu 560 nm’ de köre karşı okunmuştur. Kör; aynı işlemin enzimsiz örneğinden oluşmaktadır. SOD aktivitesinin 1 ünitesi, 560 nm’ de gözlenen NBT indirgenmesinin %50 inhibisyonuna neden olan enzim miktarı, 1 enzim ünitesi olarak kabul edilmiş ve değerler EU/g yaprak olarak sunulmuştur.

### 3.3.5. LPO miktarının belirlenmesi

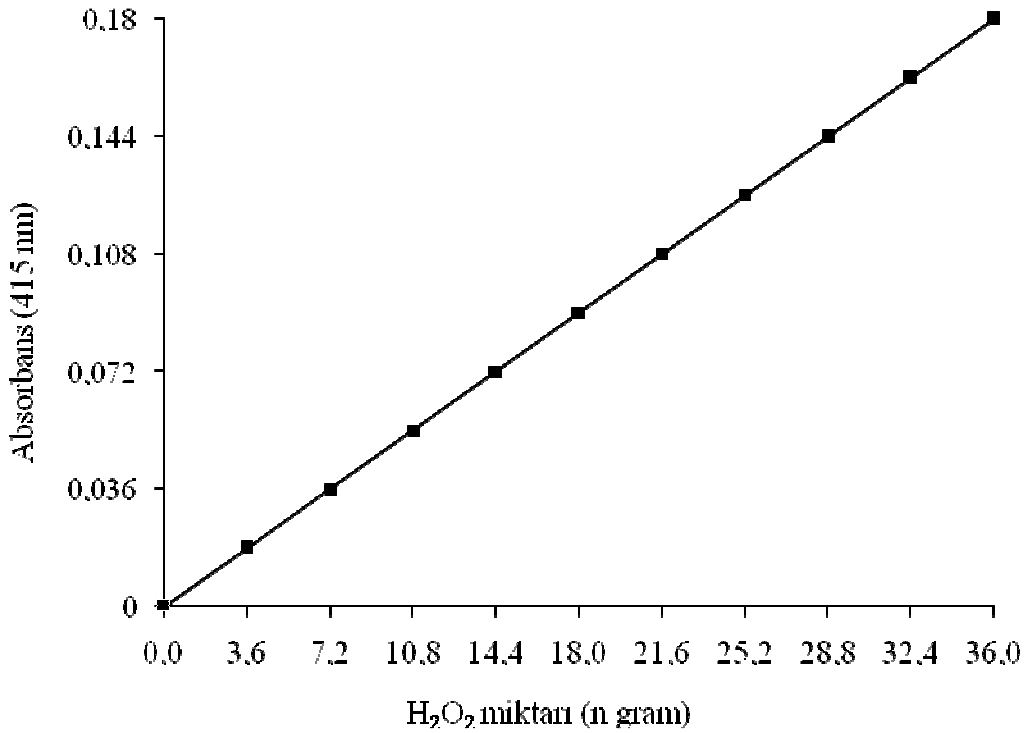
LPO için 0.5 g yaprak alınarak 10 ml % 0.1'lik TCA (trikloro asetik asit) içinde homojenize edildikten sonra homojenat 15.000 rpm' de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Tüpün süpernatant kısmından 1 ml alınarak üzerine 4 ml %0.5'lik TBA çözeltisi ilave edilmiştir. Reaksiyon karışımı kaynar suda 30 dakika inkübe edilmiş ve reaksiyon tüplerin buz banyosuna alınmasıyla durdurulmuştur. Örnekler 10000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısmı alınmış ve 532 nm absorbans değeri ve 600 nm deki non-spesifik absorpsiyon için absorbans değeri okunmuştur (Heath and Packer 1968; Jalel *et al.* 2007).

LPO'nun hesaplanması için; 532 nm'de ölçülen absorbans değerinden 600 nm' de belirlenen değeri çıkarılmış ve 1ml çözeltideki MDA (nmol/ml):  $[(A_{532} - A_{600})/155000] \times 10^6$  formülüyle hesaplanmıştır. Sonuçlar MDA (nmol/gram doku) şeklinde verilmiştir.

### 3.3.6. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarının belirlenmesi

0.5 gram bitki dokusu alınarak 10 ml soğuk aseton içinde homojenize edildikten sonra homojenat 3.000 x g'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra elde edilen süpernatantın 1.5 ml' sine 0.15 ml %5'lik Ti(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (titanyum disülfat) ve 0.3 ml %19'luk NH<sub>4</sub>OH (amonyum hidroksit) ile karıştırılmıştır. Çökelek oluştuktan sonra karışım 4 °C' de 3.000 x g' de 10 dakika daha santrifüj edilmiştir. Tüpün süpernatant kısmı uzaklaştırılır ve elde edilen pelet 3 ml 1 M' lık H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (sülfürik asit) ile çözülerek absorbansı 415 nm' de ölçülüp kaydedilmiştir. Sonuçlar standart grafikte oranlanarak g doku başına düşen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarı (ngram/g yaprak) olarak hesaplanmıştır (He *et al.* 2005 modifiye).

Standart grafiğın hazırlamak için, 3mM'lık  $H_2O_2$  çözeltilisinden ependorf tüplerine sırasıyla; 3.6, 7.2, 10.8, 14.4, 18, 21.6, 25.2, 28.8, 32.4 ve 36 nanogram olacak şekilde konulmuştur. Tüpün hacmi aseton ile 1.5 ml'ye tamamlanarak, her tüpe 0.15 ml %5'lik  $Ti(SO_4)_2$  ve 0.3ml %19'luk  $NH_4OH$  ilave edilmiştir. Çökelek oluşuktan sonra karışım  $3.000 \times g$ 'de 5 dakika daha santrifüj edilmiştir. Tüpün süpernatant kısmı uzaklaştırıldıktan sonra elde edilen pelet 3 ml 1 M'lık  $H_2SO_4$  içinde çözülmüş ve 415 nm' de absorbanıs köre karşı okunmuştur. Absorbans değerlerine karşılık gelen nanogram  $H_2O_2$  değerleri kullanarak standart grafik elde edilmiştir.



Şekil 3.3  $H_2O_2$  miktarını belirlemede kullanılan standart grafik

### 3.3.7. Kemik tozu hazırlanması ve inorganik element analizi

Çalışmamızda sığır kemikleri kullanılmıştır. Kemikler  $50^\circ C$ 'ye ayarlı etüvde iyice kuruttuktan sonra, dövülerek küçük parçalara ayrılmıştır. Daha sonra küçük parçalar havanda iyice öğütüldükten sonra, toz haline gelinceye kadar homojenizatörle

parçalanmıştır. Toz haline getirilen kemik tozunun inorganik element analizi için örnekler alınmış, örnekler 3 cm çapında polietilen film diskinde konulmuştur. Alüminyumdan yapılmış 3 cm çapında metal numune kabı kullanılmıştır. Örnekler WDXRF cihazına konularak yüzde oranları belirlenmiştir.

**Çizelge 3.1** Esas elementlerden bazıları için WDXRF çalışma şartları

Element	Çizgi	Kristal	İndirgeyici	Aralık	Dedektör	V(kV)	I(mA)
K	K $\alpha$	LiF	1-1	STD	Flow	40	90
Na	K $\alpha$	TAP	1-1	STD	Flow	30	120
P	K $\alpha$	Ge	1-1	STD	Flow	30	90
S	K $\alpha$	Ge	1-1	STD	Flow	30	120
Mg	K $\alpha$	TAP	1-1	STD	Flow	30	120
Cl	K $\alpha$	Ge	1-1	STD	Flow	30	120
Ca	K $\alpha$	LiF	1-1	STD	Flow	40	90

### 3.3.8. İstatistiksel analiz

Tez içerisinde sunulan sonuçlar, her bir uygulamadan dört örnek (4 paralel) yapıldıktan sonra elde edilen 4 değerlerin ortalamasıdır. Sonuçların karşılaştırılması, SPSS 15.0 paket programı kullanılarak tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile yapılmış  $P < 0.05$  önem seviyesinde Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma Testi kullanılarak belirlenmiştir.



#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu bölümde araştırmamızda kullanılan fasulye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisinin ortalama kök-gövde uzunlukları, bitkinin yaprak dokusundaki protein miktarları, fotosentetik pigment içerikleri, lipid peroksidasyonun son ürünü olan MDA miktarları, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarları ve antioksidan enzimlerden CAT, POD ve SOD aktivitelerinin uygulamalara göre değişen değerlerini gösteren bulgular Şekil ve tablo halinde verilmiştir. Kemik tozu içeriğine WDXRF (Wavelength Dispersive X-Ray Fluorescence) ile bakılmıŐ mineral içeriği grafik halinde verilmiştir.

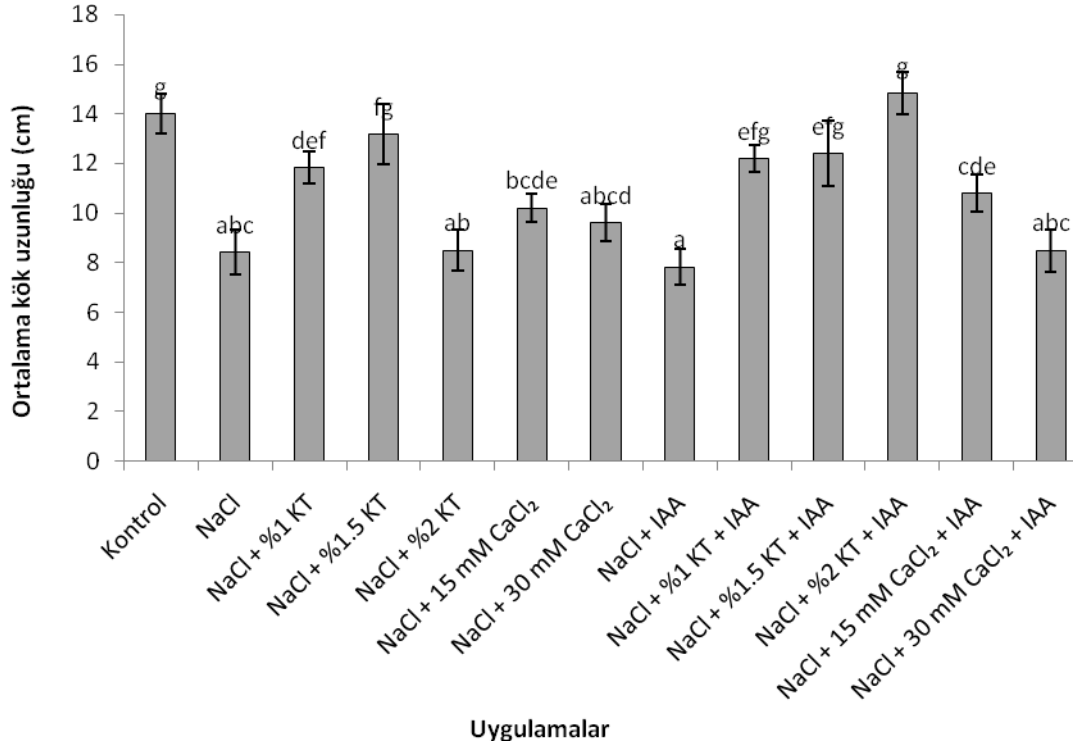
Şekil ve tablolarda kullanılan kodlamalar;

- K T** Kemik tozu solüsyonu  
**NaCl** 150 mM NaCl  
**IAA** 10<sup>-6</sup>M İndol 3 asetik asit

#### 4.1. Ortalama kök ve gövde uzunluğu sonuçları

Fasulye bitkisinin yetiştirme ortamına NaCl uygulaması, ortalama kök uzunluğunun kontrol grubuna göre % 40 oranında düşmesine neden olmuştur ( $P<0.05$ ). NaCl'ye ilave olarak farklı konsantrasyonlarda KT (% 1, % 1.5) uygulanan grupların ortalama kök uzunluklarında yalnız NaCl uygulamasına nispeten sırasıyla %40.3, %56.2 oranlarında artış görülmüştür ( $P<0.05$ ). NaCl+%2KT uygulamasının ortalama kök uzunluğunda yalnız NaCl uygulamasına göre neden olduğu artış istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ( $P>0.05$ ). NaCl ilave olarak iki farklı konsantrasyonda CaCl<sub>2</sub> (15, 30 mM) uygulanan grupların ortalama kök uzunluklarında yalnız NaCl uygulamasına nispeten sırasıyla %21, %13,9 oranlarında artış görülmüştür ancak istatistiksel anlamda önemsiz olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.1) ( $P>0.05$ ).

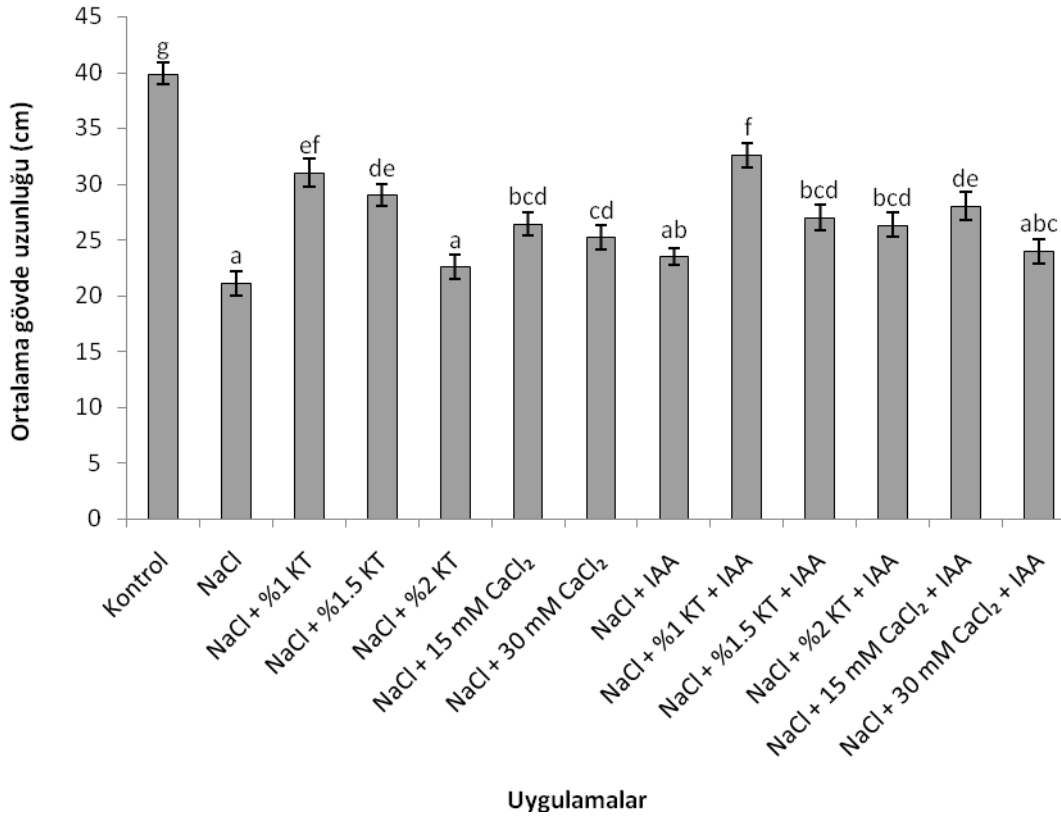
İkinci grupta bulunan bitkilere birinci gruptakilere ek olarak yapraklarına 10<sup>-6</sup> M IAA uygulanmıştır. NaCl+IAA uygulaması kontrole göre ortalama kök uzunluğunun %44 oranında düşmesine yol açmıştır ( $P<0.05$ ). NaCl+IAA uygulamasına ilave olarak farklı konsantrasyonlarda KT (% 1, % 1.5, %2) uygulamaları ortalama kök uzunluğunda yalnız NaCl uygulamasına nispeten sırasıyla %44.7, %47.1, %75.9 oranlarında artışa neden olduğu belirlenmiştir ( $P<0.05$ ). NaCl+IAA+15mM CaCl<sub>2</sub> uygulaması yalnız NaCl uygulamasına göre ortalama kök uzunluğunu %28.1 oranında artırmıştır ( $P<0.05$ ). NaCl+IAA+30mM CaCl<sub>2</sub> uygulaması yalnız NaCl uygulamasına göre ortalama kök uzunluğunda neden olduğu %0.8'lik artış istatistiksel anlamda önemsiz olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.1) ( $P>0.05$ ).



**Şekil 4.1.** Fasulye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisinin ortalama kök uzunluğunun uygulamalara göre değişimi

Fasulye bitkisinin yetiştirme ortamına NaCl uygulaması, ortalama gövde uzunluğunun kontrol grubuna göre %47 oranında düşmesine neden olmuştur ( $P < 0.05$ ). NaCl'ye ilave olarak farklı konsantrasyonlarda KT (%1, %1.5) uygulanan grupların ortalama gövde uzunluklarında yalnız NaCl uygulamasına nispeten sırasıyla %46.7, %37.2 oranlarında artışa neden olduğu tespit edilmiştir ( $P < 0.05$ ). NaCl+%2KT uygulamasının ortalama gövde uzunluğunda yalnız NaCl uygulamasına göre neden olduğu %7'lik artış istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ( $P > 0.05$ ). NaCl'ye ilave olarak iki farklı konsantrasyonda CaCl<sub>2</sub> (15,30 mM) uygulanan grupların ortalama gövde uzunluklarında yalnız NaCl uygulamasına nispeten sırasıyla %24, %19.3 oranlarında artış gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.2) ( $P < 0.05$ ).

NaCl+IAA uygulaması kontrole göre ortalama gövde uzunluğunun %41 oranında düşmesine yol açmıştır ( $P<0.05$ ). NaCl+IAA uygulamasına ilave olarak farklı konsantrasyonlarda KT (%1, %1.5, %2) uygulamaları ortalama gövde uzunluğunda yalnız NaCl uygulamasına nispeten sırasıyla %54.3, %27.8, %24.6 oranlarında artışa neden olduğu belirlenmiştir ( $P<0.05$ ). NaCl+IAA uygulamasına ilave olarak iki farklı konsantrasyonlarda (15,30mM)  $CaCl_2$  uygulamaları yalnız NaCl uygulamasına göre ortalama gövde uzunluğunda sırasıyla %32.5, %13.6 oranlarında artışa neden olduğu tespit edilmiştir ( $P<0.05$ ).



**Ş**  
**ekil 4.2.** Fasulye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisinin ortalama gövde uzunluğunun uygulamalara göre değişimi

#### 4.2. Toplam çözülebilir protein miktarı sonuçları

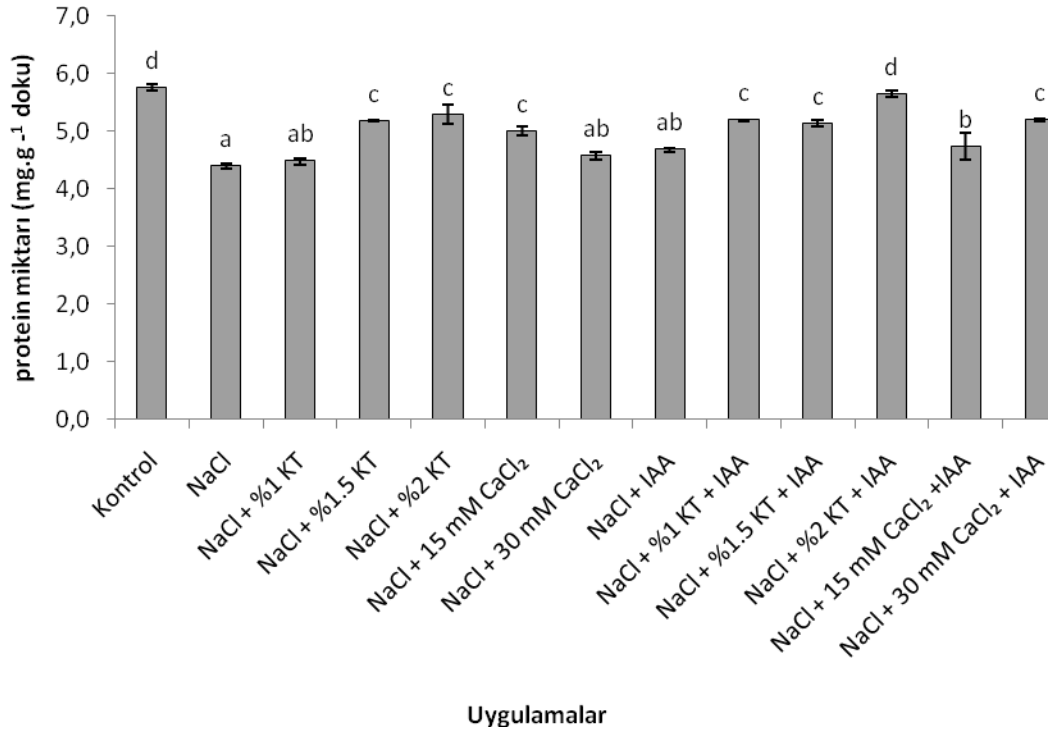
Fasulye bitkisinin yetiştirme ortamına NaCl uygulaması, yaprak dokusunun çözülebilir protein içeriğinde kontrol grubuna göre %24 oranında düşüğe neden olmuştur ( $P<0.05$ ). NaCl+KT (%1, %1.5, %2) uygulamaları yalnız NaCl uygulamasına göre protein içeriğinde sırasıyla %1.8, %17.9, %20.2 oranlarında artışa neden olmuştur. NaCl+15 mM  $CaCl_2$  uygulaması ise yalnız NaCl uygulamasına göre protein içeriğini %13.7 oranında artırmıştır ( $P<0.05$ ). NaCl+30 mM  $CaCl_2$  uygulaması yalnız NaCl uygulamasına göre %4 oranında artırmış ama istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur (Çizelge 4.1) ( $P>0.05$ ).

İkinci grupta bulunan bitkilere birinci gruptakilere ek olarak yapraklarına  $10^{-6}$  M IAA uygulanmıştır. Bu uygulamalar yalnız NaCl uygulamasına göre kıyaslandığında NaCl+IAA'ya ek olarak farklı konsantrasyonlarda KT (%0, %1, %1.5, %2) uygulamaları çözülebilir protein miktarını sırasıyla %6.3, %17.9, %16.7 ve %28.4 oranlarında artırmıştır. Çizelge 4.1'de görüldüğü gibi NaCl+IAA'ya ilave olarak farklı iki konsantrasyonda  $CaCl_2$  (15, 30 mM) uygulamaları ise yalnız NaCl uygulamasına göre sırasıyla %7.6, %17.9 oranlarında protein içeriğini artırmıştır ( $P<0.05$ ).

**Çizelge 4.1.** NaCl (150 mM), IAA ( $10^{-6}$  M), iki farklı konsantrasyonda (15,30mM) CaCl<sub>2</sub> ve üç farklı konsantrasyonda (%1, %1.5, %2) kemik tozu solüsyonu uygulanan fasulye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisinin yaprak dokusunda belirlenen protein miktarının uygulamalara göre değişimi

Uygulamalar	Toplam Protein İçeriği (mg.g <sup>-1</sup> )	NaCl'ye göre değişim (%)
Kontrol	5.763 ± 0.055d*	31,0
NaCl	4.401 ± 0.044 a	0,0
NaCl + %1 KT	4.480 ± 0.053 ab	1,8
NaCl + %1.5 KT	5.187 ± 0.015 c	17,9
NaCl + %2 KT	5.289 ± 0.171 c	20,2
NaCl + 15 mM CaCl <sub>2</sub>	5.003 ± 0.084 c	13,7
NaCl + 30 mM CaCl <sub>2</sub>	4.576 ± 0.064 ab	4,0
NaCl + IAA	4.678 ± 0.033 ab	6,3
NaCl + %1 KT + IAA	5.190 ± 0.014 c	17,9
NaCl + %1.5 KT + IAA	5.135 ± 0.050 c	16,7
NaCl + %2 KT + IAA	5.649 ± 0.046 d	28,4
NaCl + 15 mM CaCl <sub>2</sub> + IAA	4.734 ± 0.235 b	7,6
NaCl + 30 mM CaCl <sub>2</sub> + IAA	5.190 ± 0.027 c	17,9

\* Tablo incelenirken aynı sütun kendi içinde değerlendirilmelidir. Bir sütun içindeki aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar P < 0.05 derecesinde önemsizdir.



**Şekil 4.3.** Fasulye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisinin yaprak dokusundaki çözülebilir protein miktarının uygulamalara göre değişimi

### 4.3. Fotosentetik pigment içeriği sonuçları

Fasulye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisinin yaprak dokusunda klorofil *a*, klorofil *b*, toplam klorofil ve karotenoid miktarları Çizelge 4.2' de belirtilmiştir.

**Çizelge 4.2.** NaCl (150 mM), IAA ( $10^{-6}$  M), iki farklı konsantrasyonda (15, 30mM) CaCl<sub>2</sub> ve üç farklı konsantrasyonda (%1, %1.5, %2) kemik tozu solüsyonu uygulanan fasulye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisinin yaprak dokusunda belirlenen klorofil *a*, klorofil *b*, toplam klorofil ve karotenoid miktarlarının uygulamalara göre değişimi

Uygulamalar	Klorofil <i>a</i>	Klorofil <i>b</i>	Toplam Klorofil	Karotenoid
Kontrol	1.436±0.016 c*	0.549±0.019 def*	1.985±0.006 d*	0.527± 0.003 c*
NaCl	1.307±0.032 ab	0.453±0.014 bc	1.760 ±0.040 bc	0.448 ±0.006 a
NaCl + %1 KT	1.331±0.008 b	0.482 ±0.016 cd	1.812± 0.023 c	0.477±0.002 b
NaCl + %1.5 KT	1.768± 0.003 fg	0.682±0.023 g	2.449±0.026 h	0.619±0.003 e
NaCl + %2 KT	1.847±0.012 h	0.629 ± 0.032 fg	2.475±0.020 h	0.639± 0.005 f
NaCl + 15 mM CaCl <sub>2</sub>	1.716±0.013 e	0.528±0.023 cde	2.253±0.035 f	0.571± 0.007 d
NaCl + 30 mM CaCl <sub>2</sub>	1.786± 0.018 g	0.57 ±0.038 ef	2.361±0.026 g	0.61±0.009 e
NaCl + IAA	1.276 ±0.012 a	0.32 ±0.033 a	1.598±0.028 a	0.451±0.009 a
NaCl + %1 KT + IAA	1.622±0.015 d	0.482±0.031 cd	2.103± 0.016 e	0.569±0.005 d
NaCl + %1.5 KT + IAA	1.574 0.015 d	0.581±0.033 cde	2.155±0.033 e	0.57 ±0.008 d
NaCl + %2 KT + IAA	1.736±0.013 ef	0.566±0.027 def	2.302±0.014 fg	0.587±0.008 d
NaCl + 15 mM CaCl <sub>2</sub> + IAA	1.322±0.011 ab	0.378± 0.018 ab	1.700±0.021 b	0.454±0.006 a
NaCl + 30 mM CaCl <sub>2</sub> + IAA	1.426±0.015 c	0.501±0.029 cde	1.926±0.015 d	0.482±0.005 b

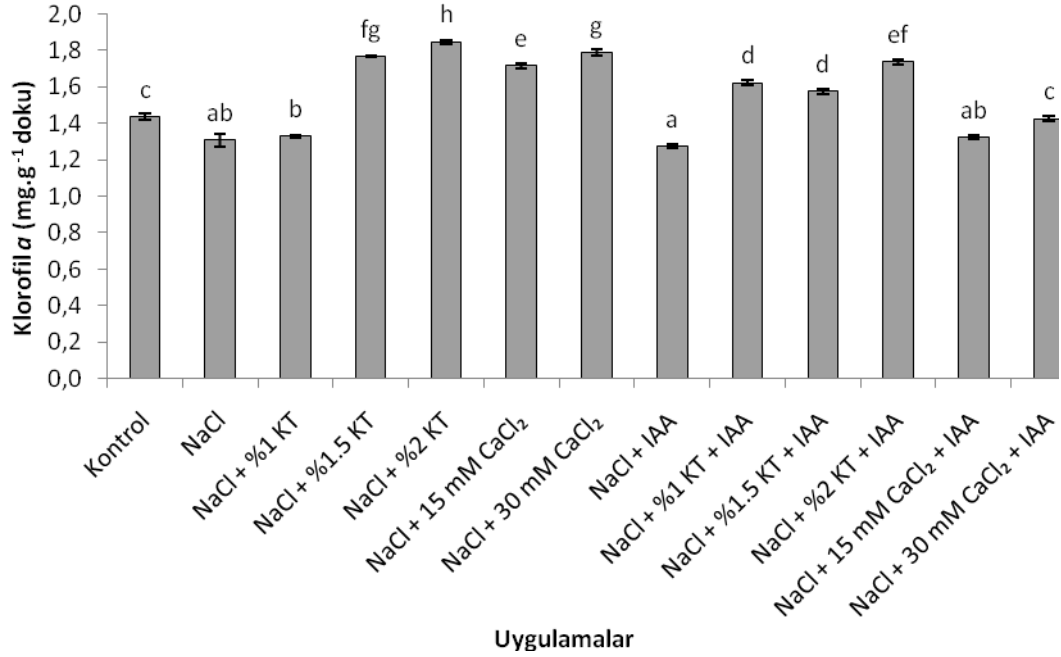
\* Tablo incelenirken aynı sütun kendi içinde değerlendirilmelidir. Bir sütun içindeki aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar  $P < 0.05$  derecesinde önemsizdir.

#### 4.3.1. Klorofil *a* içeriği sonuçları

Fasulye bitkisi yaprak dokusunun NaCl uygulaması, klorofil *a* içeriğinde kontrol grubuna göre % 9 oranında düşüŖe neden olmuŖtur ( $P<0.05$ ). NaCl ilaveten % 1 KT uygulaması, yalnız NaCl uygulamasına göre %1.8 artışa neden olduğu saptanmıŖtır ( $P>0.05$ ). NaCl ilaveten %1.5 ve %2 KT uygulamaları, yalnız NaCl uygulamasına göre sırasıyla %35.3 ve %41.3 artışa neden olduğu gözlenmiŖtir ( $P<0.05$ ). NaCl'ye ilave olarak iki farklı konsantrasyonda  $\text{CaCl}_2$  (15, 30 mM) uygulanan gruplarda ise klorofil *a* miktarı, yalnız NaCl uygulamasına göre sırasıyla %31.3 ve %36.3 oranlarında arttığı belirlenmiŖtir (Çizelge 4.2) ( $P<0.05$ ).

İkinci grupta bulunan bitkilerden NaCl + IAA uygulaması, klorofil *a* içeriğinde kontrole göre %11.1 oranında düşüŖe neden olduğu, NaCl + IAA uygulamasına ek olarak farklı konsantrasyonlarda KT (%1, %1.5, %2) uygulamaları, klorofil *a* içeriğinde yalnız NaCl uygulamasına göre sırasıyla %24.1, %20.4, %32.8 oranlarında artışa neden olduğu gözlenmiŖtir ( $P<0.05$ ). NaCl + IAA ilave olarak 15 mM  $\text{CaCl}_2$  uygulaması NaCl uygulamasına göre %1.1 artışa neden olduğu saptanmıŖtır ( $P>0.05$ ). Çizelge 4.2'de görüldüğu gibi NaCl + IAA ilave olarak 30 mM  $\text{CaCl}_2$  uygulaması NaCl uygulamasına göre %9.1 artışa neden olduğu saptanmıŖtır ( $P<0.05$ ).





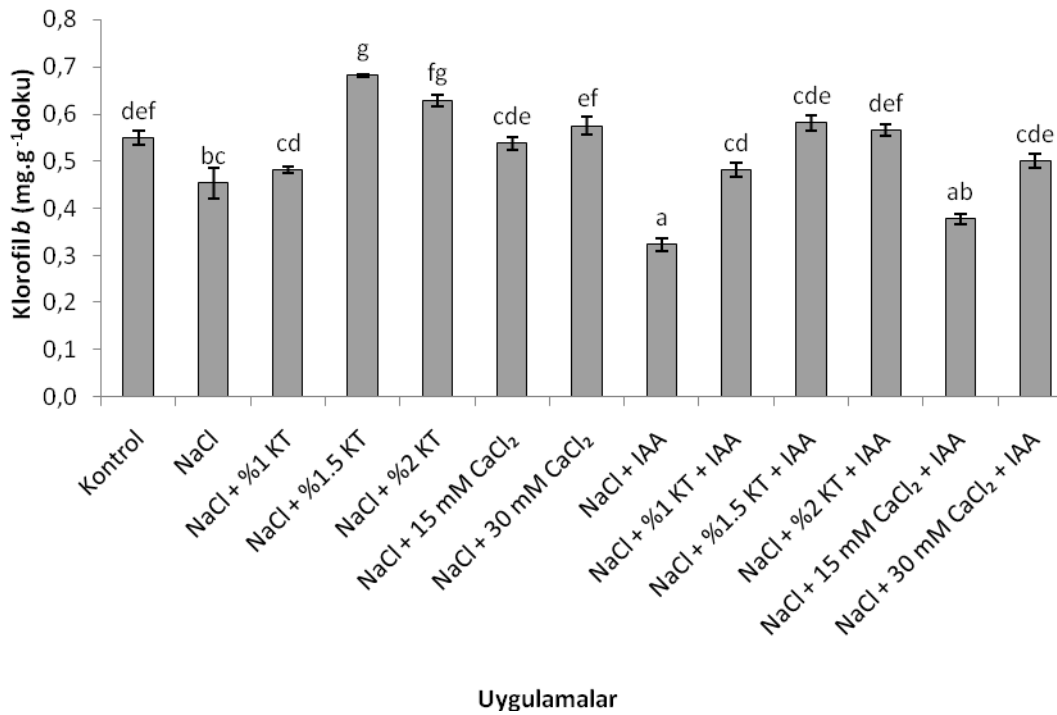
**Şekil 4.4.** Fasulye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisinin yaprak dokusunda klorofil *a* içeriğinin uygulamalara göre değişimi

#### 4.3.2. Klorofil *b* içeriği sonuçları

Yaprak dokusundaki klorofil *b* içeriğinde NaCl uygulamasının, kontrole göre %17.5 oranında düşüşe neden olduğu belirlenmiştir ( $P < 0.05$ ). NaCl'ye ilaveten farklı konsantrasyonlarda KT (%1, %1.5, %2) uygulamaları klorofil *b* içeriğinde yalnız NaCl uygulamasına göre sırasıyla %6.4, %50.6, %38.9 oranlarında artışa neden olduğu gözlenmiştir ( $P < 0.05$ ). NaCl ilave olarak iki farklı konsantrasyonda CaCl<sub>2</sub> (15, 30 mM) uygulanan gruplarda ise klorofil *b* miktarı, yalnız NaCl uygulamasına göre sırasıyla %16.6 ve %26.9 oranlarında arttığı belirlenmiştir (Çizelge 4.2) ( $P < 0.05$ ).

Çizelge 4.2'de de görüldüğü gibi İkinci grupta bulunan bitkilerden NaCl + IAA uygulaması, klorofil *b* içeriğinde kontrole göre %41.2 oranında düşüşe neden olduğu, NaCl + IAA uygulamasına ek olarak farklı konsantrasyonlarda KT (%1, %1.5, %2) uygulamaları klorofil *b* içeriğinde yalnız NaCl uygulamasına göre sırasıyla %6.4,

%28.3, %24.9 oranlarında artışa neden olduğu gözlenmiştir ( $P<0.05$ ). NaCl + IAA ilave olarak 15mM CaCl<sub>2</sub> uygulaması NaCl uygulamasına göre sırasıyla %16.6 azalmaya neden olduğu, NaCl + IAA ilave olarak 30 mM CaCl<sub>2</sub> uygulaması NaCl uygulamasına göre %10.6 oranında artışa neden olduğu saptanmıştır, ancak istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur (Çizelge 4.2) ( $P> 0.05$ ).



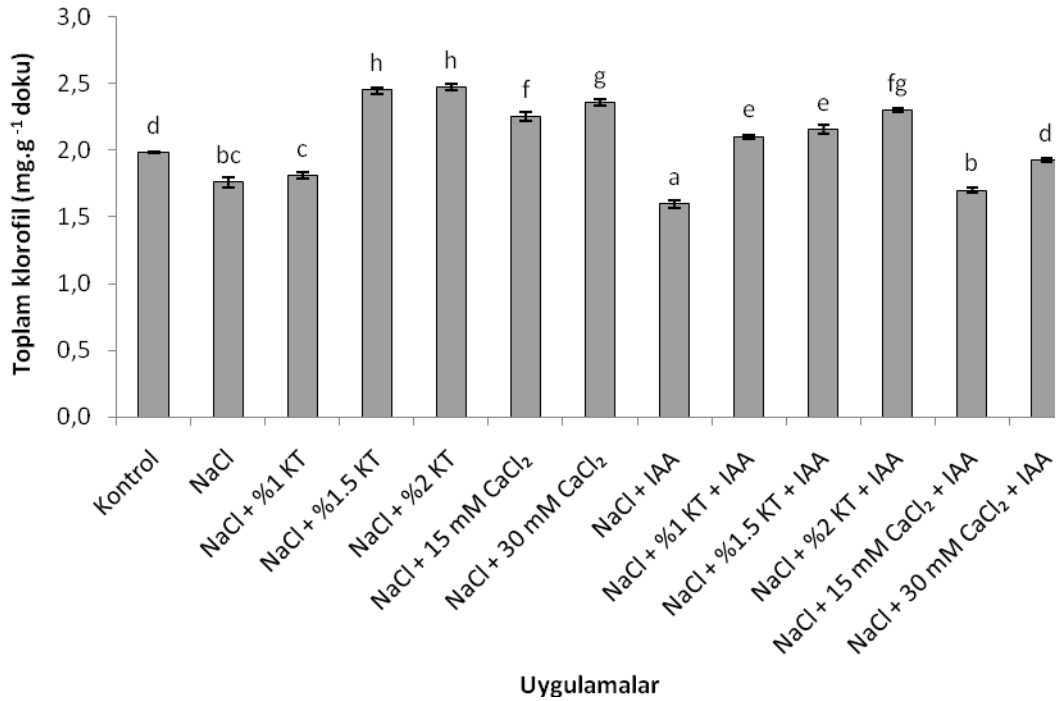
**Şekil 4.5.** Fasulye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisinin yaprak dokusunda klorofil *b* içeriğinin uygulamalara göre değişimi

#### 4.3.3. Toplam klorofil içeriği sonuçları

Çizelge 4.2’de görüldüğü gibi fasulye bitkisi yaprak dokusunun NaCl uygulaması, toplam klorofil içeriğinde kontrol grubuna göre %11.3 oranında düşüşe neden olmuştur ( $P<0.05$ ). NaCl’ye ilaveten %1 KT uygulaması, yalnız NaCl uygulamasına göre %3 artışa neden olduğu saptanmış, ancak istatistiksel olarak önemsiz kaydedilmiştir ( $P>0.05$ ). NaCl ilaveten % 1.5 ve % 2 KT uygulamaları, yalnız NaCl uygulamasına göre sırasıyla %39.1 ve %40.6 artışa neden olduğu gözlenmiştir ( $P<0.05$ ). NaCl ilave olarak

iki farklı konsantrasyonda  $\text{CaCl}_2$  (15, 30 mM) uygulanan gruplarda ise toplam klorofil miktarı, yalnız NaCl uygulamasına göre sırasıyla % 28 ve %34.1 oranlarında artış belirlenmiştir ( $P<0.05$ ).

İkinci grupta bulunan bitkilerden NaCl + IAA uygulaması, toplam klorofil içeriğinde kontrole göre %19.5 oranında düşüğe neden olduğu, NaCl + IAA uygulamasına ek olarak farklı konsantrasyonlarda KT (%1, %1.5, %2) uygulamaları, toplam klorofil miktarında, yalnız NaCl uygulamasına göre sırasıyla %19.5, %22.4, %30.8 oranlarında artışa neden olduğu belirlenmiştir ( $P<0.05$ ). NaCl+IAA ilave olarak 15 mM  $\text{CaCl}_2$  uygulaması NaCl uygulamasına göre %3.4 düşüğe neden olduğu saptanmış, ama istatistiksel anlamda önemsiz kaydedilmiştir ( $P>0.05$ ). NaCl + IAA ilave olarak 30 mM  $\text{CaCl}_2$  uygulaması NaCl uygulamasına göre %9.4 oranında artışa neden olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.2) ( $P<0.05$ ).

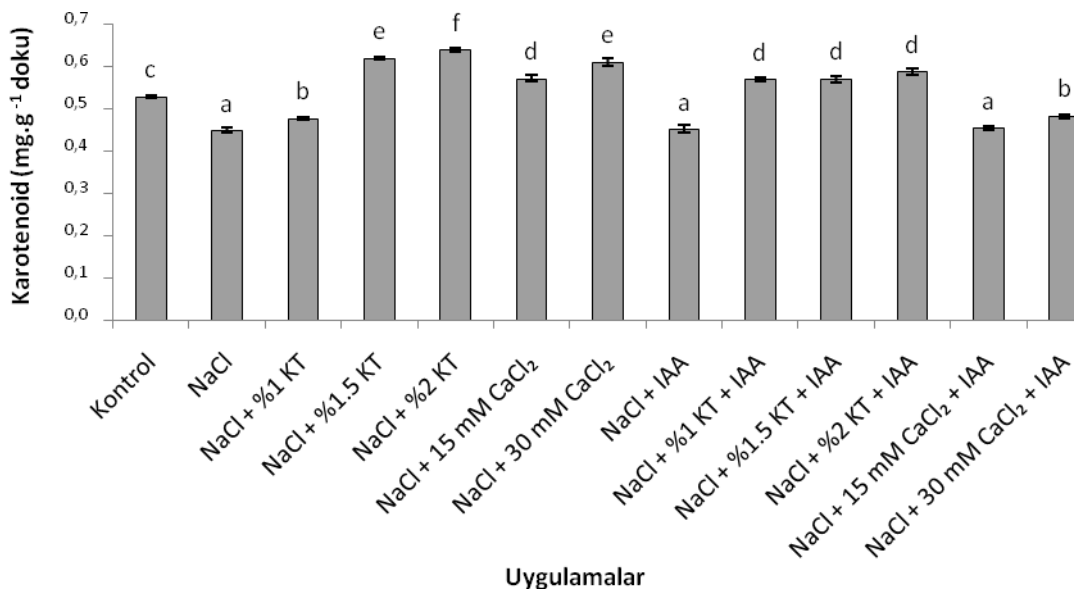


**Şekil 4.6.** Fasulye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisinin yaprak dokusunda toplam klorofil içeriğinin uygulamalara göre değişimi

#### 4.3.4. Karotenoid içeriği sonuçları

Bitkinin yaprak dokusundaki karotenoid miktarında NaCl uygulaması, kontrol grubuna göre % 15 oranında düşüğe neden olduğu gözlenmiştir ( $P<0.05$ ). NaCl ilaveten üç farklı konsantrasyonda (% 1, % 1.5 ve % 2 ) KT uygulamaları, yalnız NaCl uygulamasına göre sırasıyla %6.5, %38.2 ve %42.6 oranlarında artışa neden olduğu gözlenmiştir ( $P<0.05$ ). NaCl ilave olarak iki farklı konsantrasyonda  $\text{CaCl}_2$  (15, 30 mM) uygulanan gruplarda karotenoid miktarı, yalnız NaCl uygulamasına göre sırasıyla % 27.5 ve % 36.2 oranlarında artış gösterdiği belirlenmiştir ( $P<0.05$ ).

İkinci grupta bulunan bitkilerden NaCl + IAA uygulaması, karotenoid içeriğinde kontrole göre %14.4 oranında düşüğe neden olduğu, NaCl + IAA uygulamasına ek olarak farklı konsantrasyonlarda KT (%1, %1.5, %2) uygulamaları karotenoid içeriğinde yalnız NaCl uygulamasına göre sırasıyla %27, %27.2 ve %31 oranlarında artışa neden olduğu gözlenmiştir ( $P<0.05$ ). NaCl + IAA ilave olarak 15mM  $\text{CaCl}_2$  uygulaması NaCl uygulamasına göre % 13.9 azalmaya neden olduğu gözlenmiştir ( $P>0.05$ ). NaCl + IAA ilave olarak 30 mM  $\text{CaCl}_2$  uygulaması NaCl uygulamasına göre %7.6 oranında artışa neden olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.2) ( $P<0.05$ ).



**Şekil 4.7.** Fasulye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisinin yaprak dokusunda karotenoid içeriğinin uygulamalara göre değişimi

#### 4.4. Antioksidan enzim aktivite sonuçları

##### 4.4.1. CAT aktivitesi sonuçları

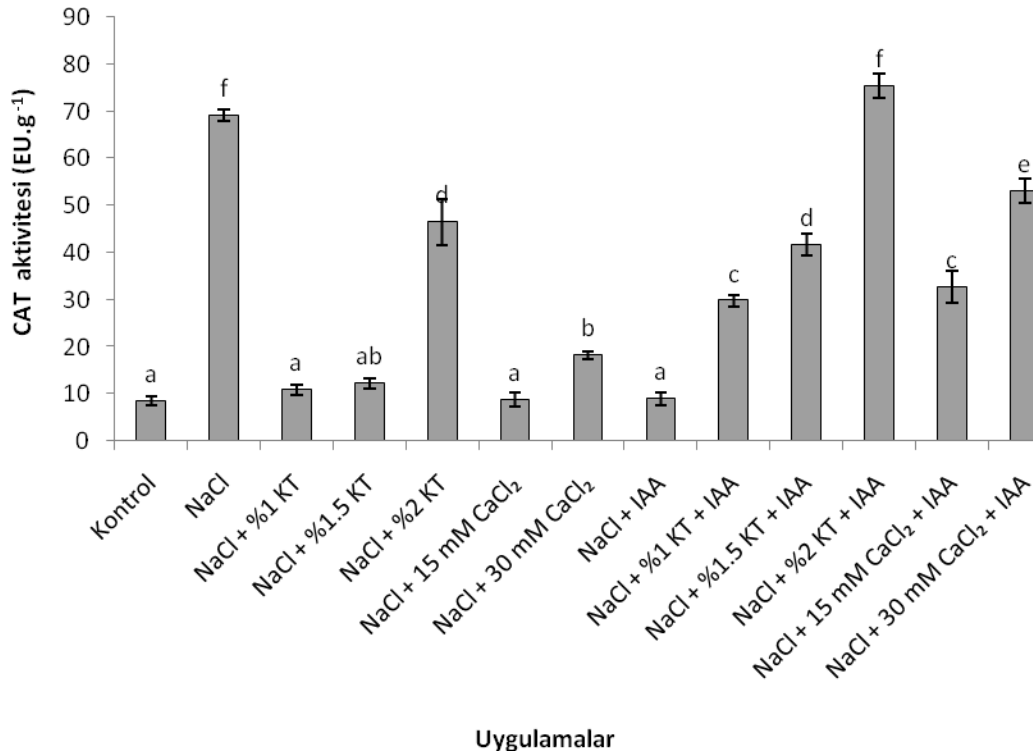
Fasulye bitkisine uygulanan NaCl, bitkinin yaprak dokusundaki CAT aktivitesinde kontrol grubuna göre %714 oranında artışa neden olmuştur ( $P<0.05$ ). NaCl'ye ilave olarak farklı konsantrasyonlarda KT (%1, %1.5, %2) uygulamaları, yalnız NaCl uygulamasına göre kıyaslandığında sırasıyla %84, %82, %33 oranlarında CAT aktivitesi azalmasına neden olduğu belirlenmiştir. NaCl' ye ek olarak 15 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 mM CaCl<sub>2</sub> uygulamalarında ise yalnız NaCl uygulamasına göre sırasıyla %87, %74 oranlarında CAT aktivitesini azalttığı belirlenmiştir (Çizelge 4.3) ( $P<0.05$ ).

İkinci grupta bulunan bitkilere birinci gruptakilere ek olarak yapraklarına 10<sup>-6</sup> M IAA uygulanmıştır. NaCl+IAA+KT (%0, %1, %1.5, %2) uygulamaları yalnız NaCl uygulamasına göre CAT aktivitesinde sırasıyla %87, %57, %40 ve %9 oranlarında azalmaya neden olduğu belirlenmiştir. NaCl+IAA+CaCl<sub>2</sub> (15, 30 mM) uygulamaları ise yalnız NaCl uygulamasına göre sırasıyla %53, %23 oranlarında CAT aktivitesini azalttığı saptanmıştır (Çizelge 4.3) ( $P<0.05$ ).

**Çizelge 4.3.** NaCl (150 mM), IAA (10<sup>-6</sup>M), iki farklı konsantrasyonda (15, 30 mM) CaCl<sub>2</sub> ve üç farklı konsantrasyonda (%1, %1.5, %2) kemik tozu solüsyonu uygulanan fasulye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisinin yaprak dokusunda belirlenen CAT aktivitesinin uygulamalara göre değişimi

UYGULAMALAR	CAT aktivitesi (EU.g <sup>-1</sup> )	NaCl'ye göre değişim (%)
Kontrol	8.542 ± 1.031 a*	-88
NaCl	69.167 ± 1.284 f	0
NaCl + %1 KT	10.833 ± 1.151 a	-84
NaCl + %1.5 KT	12.292 ± 1.031ab	-82
NaCl + %2 KT	46.458 ± 4.904 d	-33
NaCl + 15 mM CaCl <sub>2</sub>	8.750 ± 1.552a	-87
NaCl + 30 mM CaCl <sub>2</sub>	18.125 ± 0.765 b	-74
NaCl + IAA	8.958 ± 1.284 a	-87
NaCl + %1 KT + IAA	29.792 ± 1.179 c	-57
NaCl + %1.5 KT + IAA	41.667 ± 2.371 d	-40
NaCl + %2 KT + IAA	75.417 ± 2.680f	9
NaCl + 15 mM CaCl <sub>2</sub> + IAA	32.708 ± 3.445 c	-53
NaCl + 30 mM CaCl <sub>2</sub> + IAA	53.125 ± 2.664e	-23

\* Tablo incelenirken aynı sütun kendi içinde değerlendirilmelidir. Bir sütun içindeki aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar P < 0.05 derecesinde önemsizdir.



**Şekil 4.8.** Fasulye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisinin yaprak dokusunda CAT aktivitesinin uygulamalara göre değişimi

#### 4.4.2. POD aktivitesi sonuçları

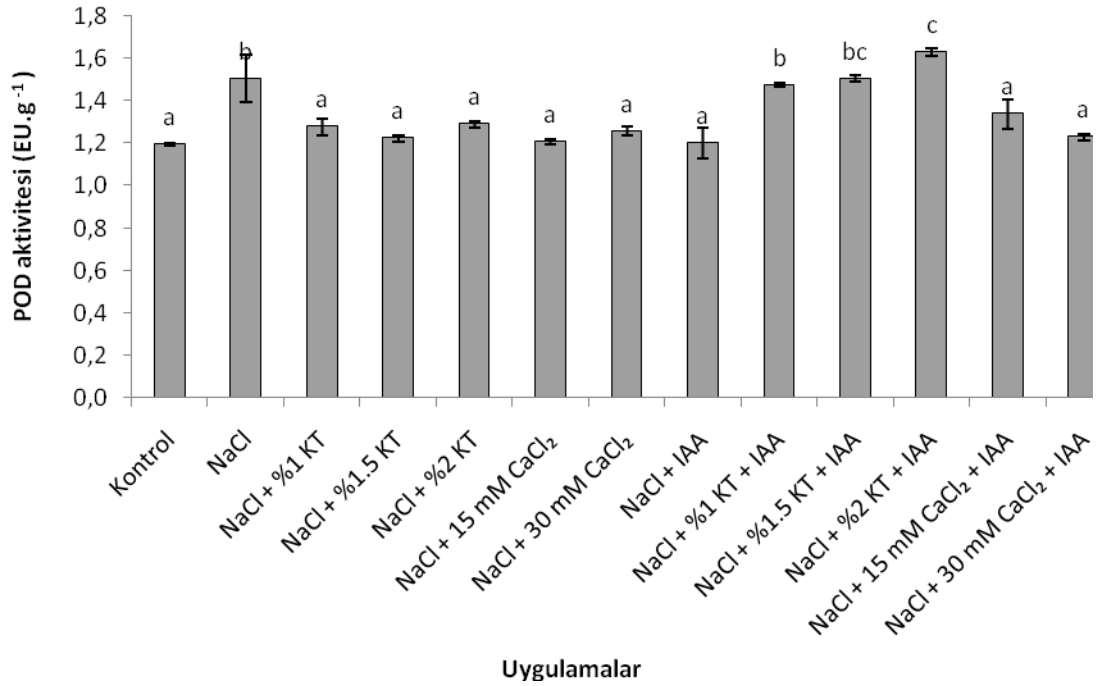
Fasulye yaprak dokusundaki POD enzim aktivitesinde NaCl uygulaması, kontrol grubuna göre %27 oranında artışa neden olmuştur ( $P<0.05$ ). NaCl' ye ilave olarak üç farklı konsantrasyonda KT (%1, %1.5, %2) uygulamaları yalnız NaCl uygulamasına göre kıyaslanırsa POD aktivitesinde sırasıyla %15, %19, %15 oranlarında düşüğe neden olmuştur. NaCl'ye ilave olarak iki farklı konsantrasyonda  $\text{CaCl}_2$  (15, 30 mM) uygulamaları ise yalnız NaCl uygulamasına göre sırasıyla %20, %17 oranlarında POD aktivitesinin azalmasına neden olduğu belirlenmiştir ( $P<0.05$ ).

NaCl+IAA uygulaması yalnız NaCl uygulamasına göre POD aktivitesinde %21 oranında azalmaya neden olduğu belirlenmiştir ( $P<0.05$ ). NaCl+IAA+%1 KT uygulaması %2'lik bir azalmaya neden olmuştur ( $P>0.05$ ). NaCl+IAA+%1.5 KT uygulaması ise POD aktivitesinde değişikliğe neden olmamıştır. NaCl+IAA+%2 KT uygulaması, yalnız NaCl uygulamasına göre POD aktivitesinde %8 oranında azalmaya neden olduğu belirlenmiştir ( $P<0.05$ ). NaCl+IAA+ $\text{CaCl}_2$  (15, 30 mM) uygulamaları ise yalnız NaCl uygulamasına göre sırasıyla %11, %19 oranlarında POD aktivitesini azaltmıştır (Çizelge 4.4) ( $P<0.05$ ).

**Çizelge 4.4.** NaCl (150mM), IAA ( $10^{-6}$ M), iki farklı konsantrasyonda (15, 30mM) CaCl<sub>2</sub> ve üç farklı konsantrasyonda (%1, %1.5, %2) kemik tozu solüsyonu uygulanan fasulye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisinin yaprak dokusunda belirlenen POD aktivitesinin uygulamalara göre değişimi

UYGULAMALAR	POD aktivitesi (EU.g <sup>-1</sup> )	NaCl'ye göre değişim (%)
Kontrol	1.194±0.01 a*	-21
NaCl	1.516±±0.11 b	0
NaCl + %1 KT	1.279±0.04 a	-15
NaCl + %1.5 KT	1.224±0.01 a	-19
NaCl + %2 KT	1.290±0.02 a	-15
NaCl + 15 mM CaCl <sub>2</sub>	1.207±0.01 a	-20
NaCl + 30 mM CaCl <sub>2</sub>	1.257±0.02 a	-17
NaCl + IAA	1.202±0.07 a	-21
NaCl + %1 KT + IAA	1.476±0.01 b	-2
NaCl + %1.5 KT + IAA	1.507±0.02 bc	0
NaCl + %2 KT + IAA	1.629±0.02 c	8
NaCl + 15 mM CaCl <sub>2</sub> + IAA	1.339±0.07 a	-11
NaCl + 30 mM CaCl <sub>2</sub> + IAA	1.230±0.01 a	-19

\* Tablo incelenirken aynı sütun kendi içinde değerlendirilmelidir. Bir sütun içindeki aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar P < 0.05 derecesinde önemsizdir.



**Şekil 4.9.** Fasulye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisinin yaprak dokusunda POD aktivitesinin uygulamalara göre değişimi



#### 4.4.3. SOD aktivitesi sonuçları

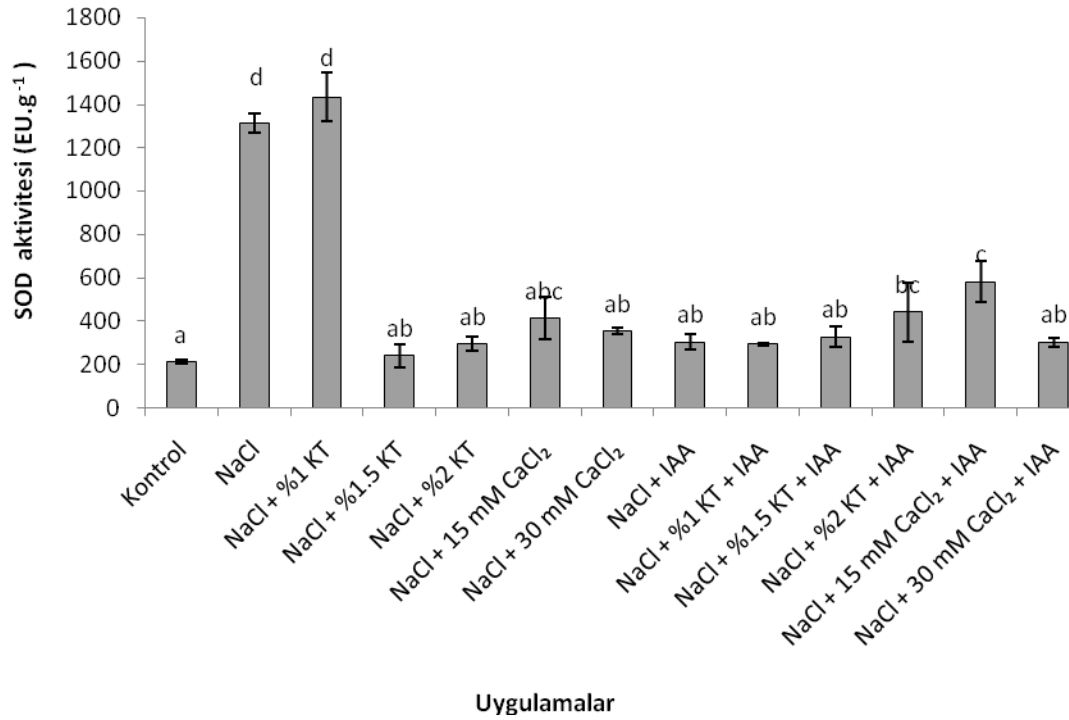
Fasulye bitkisinin yaprak dokularında SOD enzim aktivitesinde NaCl uygulaması, kontrol grubuna kıyasla %519 oranında artışa neden olduğu belirlenmiştir ( $P<0.05$ ). NaCl'ye ek olarak üç farklı konsantrasyonda KT (%1, %1.5, %2) uygulamaları yalnız NaCl uygulamasına göre sırasıyla %9 artış ve %82, %78 oranlarında SOD aktivitesinde düşüşe neden olduğu belirlenmiştir ( $P<0.05$ ). NaCl'ye ilave olarak CaCl<sub>2</sub> (15, 30 mM) uygulamalarında ise yalnız NaCl uygulamasına göre sırasıyla %69, %73 oranlarında SOD aktivitesini azalttığı belirlenmiştir (Çizelge 4.5) ( $P<0.05$ ).

İkinci grupta bulunan bitkilere birinci gruptakilere ek olarak yapraklarına  $10^{-6}$  M IAA uygulanmıştır. NaCl+IAA+KT (%0, %1, %1.5, %2) uygulamaları yalnız NaCl uygulamasına göre sırasıyla %77, %78, %75 ve %66 oranlarında SOD aktivitesinde azalmaya neden olduğu belirlenmiştir. NaCl+IAA+CaCl<sub>2</sub> (15, 30 mM) uygulamaları ise yalnız NaCl uygulamasına göre sırasıyla %56, %77 oranlarında SOD aktivitesini azaltmıştır (Çizelge 4.5) ( $P<0.05$ ).

**Çizelge 4.5.** NaCl (150 mM), IAA ( $10^{-6}$  M), iki farklı konsantrasyonda (15, 30 mM)  $\text{CaCl}_2$  ve üç farklı konsantrasyonda (%1, %1.5, %2) kemik tozu solüsyonu uygulanan fasulye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisinin yaprak dokusunda belirlenen SOD aktivitesinin uygulamalara göre değişimi

UYGULAMALAR	SOD aktivitesi ( $\text{EU.g}^{-1}$ )	NaCl'ye göre değişim (%)
Kontrol	211.9±8.0 a*	-84
NaCl	1312.5±43.1 d	0
NaCl + %1 KT	1434.0±110.8 d	9
NaCl + %1.5 KT	240.3±51.8 ab	-82
NaCl + %2 KT	294.5±30.5 ab	-78
NaCl + 15 mM $\text{CaCl}_2$	413.4±96.9 abc	-69
NaCl + 30 mM $\text{CaCl}_2$	354.0±15.6 ab	-73
NaCl + IAA	304.9±36.5 ab	-77
NaCl + %1 KT + IAA	294.5±5.5 ab	-78
NaCl + %1.5 KT + IAA	328.1±47.4 ab	-75
NaCl + %2 KT + IAA	441.8±137.1 bc	-66
NaCl + 15 mM $\text{CaCl}_2$ + IAA	581.3±95.1 c	-56
NaCl + 30 mM $\text{CaCl}_2$ + IAA	302.3±19.2 ab	-77

\* Tablo incelenirken aynı sütun kendi içinde değerlendirilmelidir. Bir sütun içindeki aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar  $P < 0.05$  derecesinde önemsizdir.



**Şekil 4.10.** Fasulye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisinin yaprak dokusunda SOD aktivitesinin uygulamalara göre değişimi

#### 4.5. LPO seviyesi sonuçları

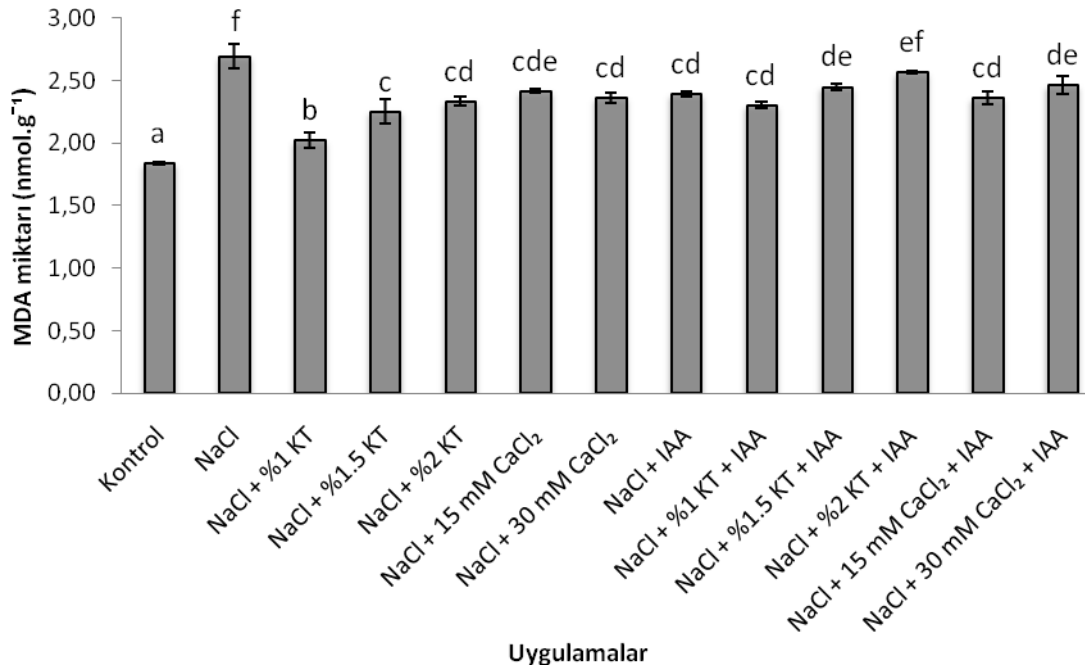
Farklı konsantrasyonlarda kemik tozu solüsyonu. 150 mM NaCl ve oksin (IAA) uygulanan fasulye bitkisinin yaprak dokusundaki LPO seviyesi, kontrole kıyasla tüm uygulamalarda önemli derecede arttığı saptanmıştır ( $P<0.05$ ). 150mM NaCl uygulamasında %46.7 artış belirlenmiştir ( $P<0.05$ ). NaCl (150 mM) grubuna ilave olarak farklı konsantrasyonlarda (%1, %1.5, %2) kemik tozu solüsyonu uygulanan gruplar yalnız NaCl grubuna göre sırasıyla LPO'yu %25, %16, %13 azalttığı belirlenmiştir. Çizelge 4.5 ve Şekil 4.5'e dikkat edilirse yalnız NaCl uygulanan bitkideki hasarı NaCl+%1KT uygulaması en aza indirmiştir ( $P<0.05$ ). NaCl' ye ek olarak  $\text{CaCl}_2$  (15 ve 30 mM) grupları yalnız NaCl grubuna göre LPO seviyesini sırasıyla % 10, %12 düşürmüştür (Çizelge 4.6) ( $P<0.05$ ).

Yapraklarına  $10^{-6}$ M IAA uygulanan gruplara bakılırsa NaCl+IAA grubu LPO'yu yalnız NaCl grubuna göre %11 düşürmüştür ( $P<0.05$ ). NaCl+IAA'ya ek olarak farklı konsantrasyonlarda KT (%1, %1.5, %2) uygulamaları LPO seviyesini yalnız NaCl uygulamasına göre sırasıyla %15, % 9, %5 oranlarında düşürmüştür ( $P<0.05$ ). NaCl+ IAA'ya ek olarak iki farklı konsantrasyonda  $\text{CaCl}_2$  (15, 30 mM) uygulamaları LPO seviyesini yalnız NaCl grubuna göre %13, %9 oranlarında azalttığı görülmüştür (Çizelge 4.6) ( $P<0.05$ ).

**Çizelge 4.6.** NaCl (150 mM), IAA ( $10^{-6}$  M), iki farklı konsantrasyonda (15, 30 mM)  $\text{CaCl}_2$  ve üç farklı konsantrasyonda (%1, %1.5, %2) kemik tozu solüsyonu uygulanan fasulye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisinin yaprak dokusunda belirlenen MDA düzeylerinin uygulamalara göre değişimi

Uygulamalar	MDA miktarı (nmol.g <sup>-1</sup> doku)	NaCl'ye göre değişim (%)
Kontrol	1.836±0.01a*	-33
NaCl	2.694±0.10 f	0
NaCl + %1 KT	2.021±0.06 b	-25
NaCl + %1.5 KT	2.255±0.10 c	-16
NaCl + %2 KT	2.337±0.04cd	-13
NaCl + 15 mM $\text{CaCl}_2$	2.417±0.02 cde	-10
NaCl + 30 mM $\text{CaCl}_2$	2.365±0.04 cd	-12
NaCl + IAA	2.393±0.02 cd	-11
NaCl + %1 KT + IAA	2.303±0.03 cd	-15
NaCl + %1.5 KT + IAA	2.451±0.03 de	-9
NaCl + %2 KT + IAA	2.567±0.01 ef	-5
NaCl + 15 mM $\text{CaCl}_2$ + IAA	2.363±0.05 cd	-13
NaCl + 30 mM $\text{CaCl}_2$ + IAA	2.462±0.07 de	-9

\* Tablo incelenirken aynı sütun kendi içinde değerlendirilmelidir. Bir sütun içindeki aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar  $P < 0.05$  derecesinde önemsizdir.



**Şekil 4.11.** Fasulye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisinin yaprak dokusunda MDA miktarının uygulamalara göre değişimi

#### 4.6. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarı sonuçları

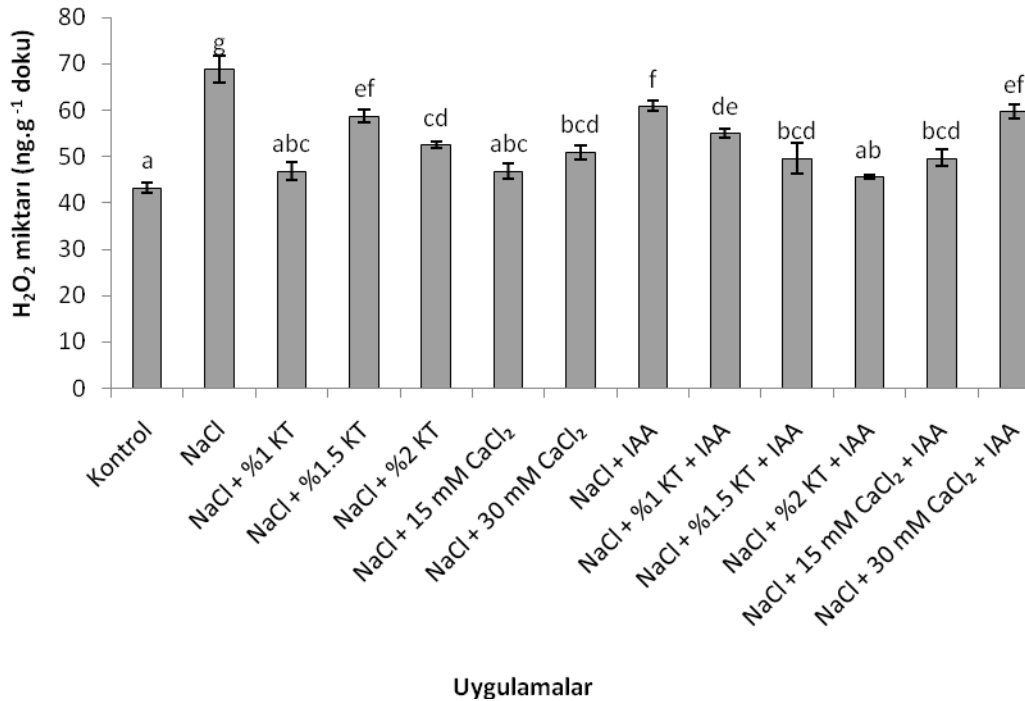
NaCl uygulaması fasulye bitkisinin yaprak dokularının H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeriğinde, kontrol grubuna göre %59 oranında artışa neden olduğu belirlenmiştir (P<0.05). NaCl'ye ek olarak KT (%1, %1.5, %2) uygulamaları yalnız NaCl uygulamasına göre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarında sırasıyla %32, %15, %24 oranlarında düşüşe neden olmuştur. NaCl+CaCl<sub>2</sub> (15, 30 mM) uygulamaları yalnız NaCl uygulamasına göre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeriğini sırasıyla %32 ve %26 oranlarında azaltmıştır (Çizelge 4.7) (P<0.05).

NaCl+IAA+KT (%0, %1, %1.5, %2) uygulamaları yalnız NaCl uygulamasına göre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarında sırasıyla %12, %20, %28 ve %34 oranlarında azaltmıştır. NaCl+IAA'ya ilave olarak iki farklı konsantrasyonda CaCl<sub>2</sub> (15, 30 mM) uygulamaları ise yalnız NaCl uygulamasına göre sırasıyla %28, %13 oranlarında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeriğinde düşüşe neden olmuştur (Çizelge 4.7) (P<0.05).

**Çizelge 4.7.** NaCl (150 mM), IAA ( $10^{-6}$  M), iki farklı konsantrasyonda (15, 30 mM) CaCl<sub>2</sub> ve üç farklı konsantrasyonda (%1, %1.5, %2) kemik tozu solüsyonu uygulanan fasulye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisinin yaprak dokusunda belirlenen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarının uygulamalara göre değişimi

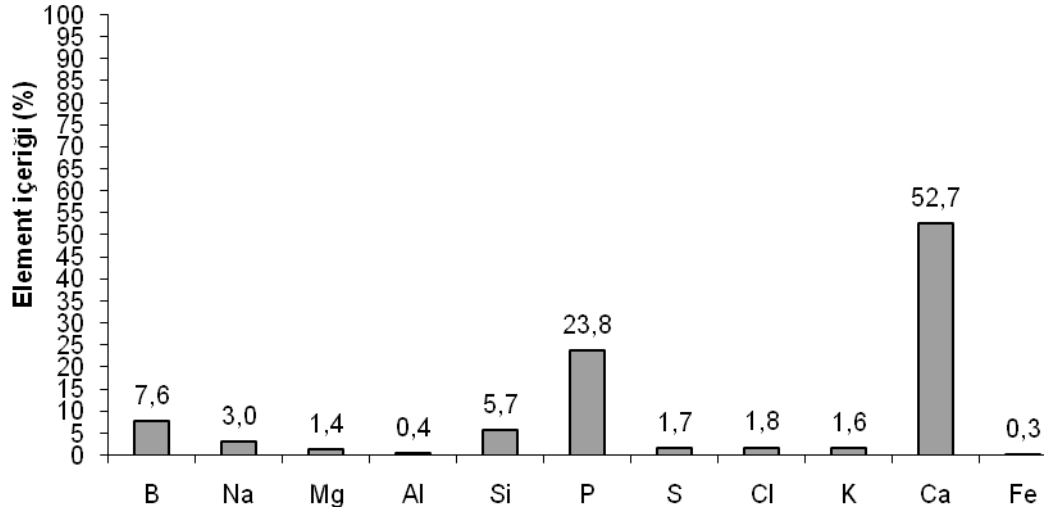
UYGULAMALAR	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> miktarı (ng.g <sup>-1</sup> doku)	NaCl'ye göre değişim (%)
Kontrol	43.267±1.13 a*	-37
NaCl	68.867±2.94 g	0
NaCl + %1 KT	46.867±1.96 abc	-32
NaCl + %1.5 KT	58.733±1.43 ef	-15
NaCl + %2 KT	52.467±0.66 cd	-24
NaCl + 15 mM CaCl <sub>2</sub>	46.867±1.70 abc	-32
NaCl + 30 mM CaCl <sub>2</sub>	50.933±1.52 bcd	-26
NaCl + IAA	60.867±1.10f	-12
NaCl + %1 KT + IAA	55.000±0.94 de	-20
NaCl + %1.5 KT + IAA	49.600±3.41 bcd	-28
NaCl + %2 KT + IAA	45.667±0.48 ab	-34
NaCl + 15 mM CaCl <sub>2</sub> + IAA	49.667±1.79 bcd	-28
NaCl + 30 mM CaCl <sub>2</sub> + IAA	59.733±1.43 ef	-13

\* Tablo incelenirken aynı sütun kendi içinde değerlendirilmelidir. Bir sütun içindeki aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar P < 0.05 derecesinde önemsizdir.



**Şekil 4.12.** Fasulye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisinin yaprak dokusunda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarının uygulamalara göre değişimi

#### 4.7. Kemik tozu WDXRF sonuçları



**Şekil 4.13.** Kemik tozunun WDXRF sonuçlarına göre inorganik element içeriği (%)

Kemik tozunda WDXRF sonuçlarına göre %52.7 oranında  $Ca^{+2}$  iyonu bulunduğu belirlenmiştir (C,O,N ihmal edilmiştir).

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu araştırmada 150 mM NaCl ortamında yetiştirilen fasulye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisinin yetişme ortamına ilave olarak üç farklı konsantrasyonda (%1, %1.5, %2) kemik tozu solüsyonunun ve iki farklı konsantrasyonda (15, 30 mM) CaCl<sub>2</sub>'nin etkileri araştırılmıştır. Literatür verilerine göre tuz stresinin olumsuz etkilerini hafiflettiği belirlenen ılımlı Ca<sup>+2</sup> düzeylerinin etkisi ile ilgili bir çok çalışma mevcuttur (Maathuis and Amtmann 1999; Qadir *et al.* 2001; Arshi 2006; Tuna 2007). Bu çalışmada ise Ca<sup>+2</sup> kaynağı olduğu WDXRF analizlerine göre belirlenen kemik tozu solüsyonunun etkileri ile CaCl<sub>2</sub> etkileri karşılaştırılmıştır. Ayrıca çalışmada NaCl ortamına eklenen kemik tozu (KT) solüsyonu ve CaCl<sub>2</sub>'ye ek olarak yapraklara ekzojen olarak uygulanan 10<sup>-6</sup> M IAA' nın etkileri de araştırılmıştır.

Birçok araştırıcı Ca<sup>+2</sup>'nin tuz stresi altındaki bitkilerde zar bütünlüğünün korunmasında etkin olduğunu rapor etmişlerdir (Maathuis and Amtmann 1999; Renault 2005). Ca<sup>+2</sup> hücre zarında fosfolipidlerin karboksil gruplarına ve fosfat gruplarına bağlanarak hücre zarının dengesini sağladığı bildirilmiştir (Cramer *et al.* 1985). Literatür taramasında tuz stresinin olumsuz etkisini hafifletmek için herhangi bir organik materyalin kalsiyum kaynağı olarak kullanıldığı bilgisine rastlanılmamıştır. Bu açıdan ele alındığında, araştırma ilk olacaktır.

Tuz stresi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, süperoksit (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), hidroksil radikalleri (•OH) gibi reaktif oksijen türlerinde artışa yol açar (Neto *et al.* 2006). Bu reaktif oksijen türlerinin artması bitkiler üzerine birçok olumsuz etkiye neden olur. Bitkiler ROT' ların olumsuz etkilerini yok etmek için ROT' ları yok eden veya dengeleyen antioksidan enzimlere (CAT, POD ve SOD) sahiptir.

Bu araştırmada bitkinin ortalama kök gövde uzunluklarının, yaprak dokusundaki toplam protein miktarlarının, fotosentetik pigment miktarlarının, ayrıca stres parametreleri



olarak antioksidan enzimlerin (CAT, POD ve SOD) aktivitelerinin, LPO'nun ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarlarının uygulamalara göre değişimi belirlenmiştir.

### **5.1. Ortalama kök ve gövde uzunluğuna tuz, kemik tozu solüsyonu ve CaCl<sub>2</sub>'nin etkileri**

Kontrole kıyasla 150 mM NaCl uygulaması ortalama kök uzunluğunda %40, ortalama gövde uzunluğunda ise %47 oranında azalmaya neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.1). Bu bulgularla uyum içinde olan bilgiler vardır: Greenway and Munns 1980, tuz stresine maruz kalan bitkilerde genel olarak karşılaşılan farklılıklar arasında kök, gövde ve sürgün uzunluğunda azalma olduğunu bildirmişlerdir. Mevcut çalışmada NaCl'ye ilave olarak KT ve CaCl<sub>2</sub> eklenen gruplarda kök ve gövde uzunluğu yalnız NaCl uygulamasına göre önemli değerlerde artmıştır. Kök uzunluğunda yalnız NaCl uygulamasına göre %75.9 oranında en fazla artış NaCl+IAA+%2KT uygulamasıyla elde edilmiştir. Bu bulgu kök uzunluğunda NaCl'ye ilave olarak KT uygulamasının CaCl<sub>2</sub>'ye nispeten daha etkili olduğu sonucu çıkarılmıştır. Ortalama gövde uzunluğunda yalnız NaCl uygulamasına göre NaCl+IAA+%1KT uygulamasında %54.3'lük bir artış tespit edilmiş, bu değer NaCl uygulamasına nispeten en önemli artış olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.2). Bu bulgular ışığında kök ve gövde uzunluğunda NaCl'ye ilave olarak KT uygulamalarının NaCl+CaCl<sub>2</sub> (15,30mM) uygulamalarına nispeten daha etkili olduğu sonucu çıkarılmıştır.

### **5.2. Toplam çözülebilir protein miktarına tuz, kemik tozu solüsyonu ve CaCl<sub>2</sub>'nin etkileri**

Kontrole kıyasla 150 mM NaCl uygulaması % 24 oranında çözülebilir protein içeriğinde azalmaya neden olduğu belirlenmiş olup literatür verilerinde çalışmamızın bu sonucu ile uyum içinde birçok çalışma mevcuttur. Tuz stresinin *Nicotiana tabacum* bitkisinin total proteinlerini azalttığı Niknam *et al.* (2004) tarafından bildirilmiştir.

Benzer olarak yüksek tuzluluğun (250 mM NaCl) patatesin yaprak çözünebilir proteini üzerine etkileri araştırılan çalışmada; bu stres faktörünün, hem patates bitki gelişimi hem de organlarının çözünebilir protein içeriğini olumsuz etkilediği bildirilmiştir (Teixeira and Pereira 2007).

Literatür verilerinde tuzlu koşullara eklenen herhangi bir  $Ca^{+2}$  kaynağının toplam çözünebilir protein içeriği üzerine etkisi ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. NaCl' ye ilave olarak %2 KT uygulaması %20.2 oranında , NaCl+15 mM  $CaCl_2$  uygulamasının ise yalnız NaCl uygulamasına göre protein içeriğinde %13.7 oranında artışa neden olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.1). Bu sonuçlara göre NaCl'ye ilave olarak %2 KT uygulamasının, tuz stresinin olumsuz etkisini hafifletmede, kullanılan ticari  $CaCl_2$  çözeltisinden daha fazla etkili olduğu sonucu çıkmaktadır. NaCl uygulamasına göre protein içeriğinde en ciddi artış ise NaCl+IAA +%2 KT uygulamasından (%28.4) elde edilmiştir (Çizelge 4.1).

### **5.3. Fotosentetik pigment içeriğine tuz, kemik tozu solüsyonu ve $CaCl_2$ 'nin etkileri**

Kontrol bitkisine kıyasla NaCl uygulamasının klorofil *a*, klorofil *b*, toplam klorofil ve karotenoid miktarlarında sırasıyla %9, %17.5, %11.3 ve %15 azalmaya neden olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.2). Fotosentetik pigmentlerin, tuz stresi etkisiyle azalma gösterdiğine dair birçok araştırma bulgusu mevcuttur: Tuzlu koşullarda bitkilerde klorofil miktarının azalması, klorofili parçalayan klorofillaz enziminin aktivite artışına bağlı olarak açıklanmıştır (Rao ve Rao, 1981; Eroğlu 2007). Alamgir ve Ali (1999) tuz stresinin çeltik bitkisinin yaprak dokusunda pigment miktarını azalttığını bildirmişlerdir. Yine Öncel ve Keleş (2003) 200 mM NaCl ortamında yetiştirilen buğday genotiplerinde klorofil *a*, klorofil *b* ve toplam klorofil miktarının azaldığını bildirmişlerdir. Farklı kaynaklarda da tuz stresinin pigment biyosentez mekanizmasını bozduğu ve bunun sonucu olarak pigment miktarında azalma görüldüğü rapor edilmiştir (Khavarinejad ve Chaparzadeh, 1998; Santos 2004; Koçer 2007).

Bununla birlikte Wang and Nil (2000) tuz stresine maruz bırakılan *Amaranthus*' ta klorofil içeriğinin arttığını rapor etmişlerdir. Bu sonucun çalışmamızın sonucu ile karşıtlığı kullanılan bitki türlerinin farklı olması ve bu nedenle tuzluluğa dirençlerinin farklı olmasından kaynaklandığı düşünülebilir. Ayrıca Wang and Nil (2000), çalışmalarında klorofil içeriğinin artmasını yaprak alanlarındaki su içeriğinin azalmasına bağlamışlardır.

Klorofil *a* miktarında yalnız NaCl uygulamasına göre en yüksek sonuçlar, % 41.3' lük bir artışla NaCl+%2 KT uygulamasında kaydedilmiştir. Bu sonuca en yakın veri ise NaCl+30mM CaCl<sub>2</sub> uygulamasının neden olduğu %36.3' lük artıştır (Çizelge 4.2). Klorofil *b* miktarında yalnız NaCl uygulamasına göre en yüksek sonuçlar NaCl+% 1.5 KT ve NaCl+% 1.5 KT uygulamalarında kaydedilmiştir. Bu sonuca en yakın veri ise NaCl+30mM CaCl<sub>2</sub> uygulamasının neden olduğu artıştır. Toplam klorofil miktarında yalnız NaCl uygulamasına göre en yüksek sonuçlar, % 40.6' lık bir artışla NaCl+%2 KT uygulamasında kaydedilmiştir. Bu sonuca en yakın veri ise NaCl+30mM CaCl<sub>2</sub> uygulamasının neden olduğu % 34.1' lik artış olmuştur. Karotenoid miktarında yalnız NaCl uygulamasına göre en yüksek sonuçlar, % 42.6' lık bir artışla NaCl+%2 KT uygulamasında kaydedilmiştir. Bu sonuca en yakın veri ise NaCl+30mM CaCl<sub>2</sub> uygulamasının neden olduğu % 36.2' lik artıştır. Uygulamalara ek olarak fasulye bitkisi yapraklarına IAA'nın püskürtülerek uygulaması karotenoid içeriğinin düşmesine neden olmuştur.

Araştırmamızın bu sonuçlarına göre klorofil *a*, klorofil *b*, toplam klorofil ve karotenoid miktarlarında tuz stresinin oluşturduğu azalmaları ortama eklemiş olduğumuz kalsiyum kaynaklarının azalttığı hatta yok ettiği belirgindir. Tuz stresinde Ca<sup>+2</sup>'nin klorofil içeriğinde artışa neden olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur: Yan-Feng *et al.* (2008) 150 mM NaCl içeren ortamda yetiştirilen *Helianthus tuberosus* L. bitkisinin ortamına 10 M.L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub> eklenmesinin klorofil içeriğini ciddi degerde artırdığını bildirmiştir. Bizim çalışmamız da bu çalışmayla uyum içerisindedir. Fotosentetik pigment içeriğindeki tuzun oluşturduğu olumsuz etki üzerine NaCl+%2 KT uygulaması NaCl+CaCl<sub>2</sub> uygulamalarına göre daha etkili olduğu söylenebilir.

#### 5.4. Antioksidan enzim aktivitelere tuz, kemik tozu solüsyonu ve CaCl<sub>2</sub>'nin etkileri

##### 5.4.1. CAT aktivitesine tuz, kemik tozu solüsyonu ve CaCl<sub>2</sub>'nin etkileri

CAT aktivitesinin 150 mM NaCl uygulamasıyla kontrol bitkisine kıyasla % 714 oranında artış gösterdiği belirlenmiştir (Çizelge 4.3). Literatür verilerine bakıldığında CAT aktivitesinin tuzlu koşullarda arttığını bildiren birçok çalışma tespit edilmiştir. Shalata and Tal (1998) domateste tuz stresinde CAT aktivitesinin yüksek değerlerde olduğu bildirmişlerdir. Tuz stresi altında yapılan çalışmalarda, senna (*Cassia angustifolia*) ve soya fasulyesi bitkilerinde CAT aktivitesinin önemli derecede yüksek olduğu gözlenmiştir (Agarwal and Pandey 2004; Ghorbanli *et al.* 2004). Bu bilgiler bizim çalışmamızın sonucu ile uyum içerisindedir.

Bu verilere zıt olarak Khedr *et al.* (2003) yaptıkları araştırmada tuz stresine maruz bırakılan *Pancreatium maritimum* bitkisinde CAT aktivitesinin tuz konsantrasyonunun artışıyla azaldığını ifade etmişlerdir. Bu sonucun bizim bulgularımızla zıt olması kullanılan bitki türlerinin farklılığından kaynaklandığı düşünülebilir.

NaCl' ye ilave olarak KT ve ticari CaCl<sub>2</sub> uygulamasının yalnız NaCl uygulamasına göre CAT aktivitesinde ciddi oranda azalmaya neden olduğu saptanmıştır. NaCl' ye ilave olarak %1 KT uygulaması yalnız NaCl uygulamasının neden olduğu CAT aktivitesinin kontrol bitkisinde ölçülen değeri düşürdüğü belirlenmiştir. KT konsantrasyonlarında ki artışla birlikte, enzim aktivite değerlerinin de giderek yükseldiği görülmüştür. NaCl+15 mM CaCl<sub>2</sub> uygulaması da enzim aktivitesini kontrol bitkisinin değerlerine indirgemıştır.

NaCl uygulaması, istatistiki olarak önemli düzeyde CAT aktivitesini artırmıştır. Bitkinin strese girmesi ve bunun sonucunda da bitkide savunma mekanizması olarak CAT aktivitesinin arttığı söylenebilir. NaCl+KT uygulamasının ve NaCl+CaCl<sub>2</sub> uygulamaları sonucu CAT aktivitesinin kontrol bitkisindeki değere yaklaşması ise

bitkiye  $\text{Na}^+$  iyonlarının alınımının  $\text{Ca}^{+2}$  iyonları tarafından inhibe edilmesi ile ROT türlerinin üretilmeyişi sonucu olduğu söylenebilir.  $\text{Ca}^{+2}$  iyonlarının ortamdaki  $\text{Na}^+$  iyonlarının alınımını inhibe ettiğini bildiren birçok çalışma mevcuttur (Yan *et al.* 1992; Kaya and Higgs 2003; Yakıt ve Tuna 2006). Bu sonucu daha iyi belirlemek için bizim çalışmamıza ek olarak element içeriği analizlerine ihtiyaç olabilir.

Bu uygulamalara ek olarak yapraklara IAA uygulaması daha yüksek CAT aktivitesinin oluşmasına yol açmıştır. IAA uygulamasının  $\text{Ca}^{+2}$  alınımını artırması sonucu bitkinin  $\text{Na}^+$  toksik etkisine karşı savunma kapasitesini artırdığı düşünülmektedir. Felle (1988) oksinlerin mısır epidermis hücrelerinin stoplazmasına  $\text{Ca}^{+2}$  salınımını artırdığını bildirmiştir.

Yan-Feng *et al.* (2008) 150 mM NaCl içeren ortamda yetiştirilen *Helianthus tuberosus* L. bitkisinin ortamına  $10 \text{ M.L}^{-1}$   $\text{CaCl}_2$  eklenmesi CAT aktivitesini tuz uygulamasına nisbetle artırdığını bildirmiştir. Bu sonuç, bizim bulgularımızla uyum göstermektedir.

NaCl+IAA+%2 KT uygulaması sonucu en yüksek CAT enzim aktivitesi görülmüştür. Bu değerden yola çıkarak, NaCl +IAA+%2 KT uygulamasının bitkinin tuz stresine karşı savunma mekanizmasını en fazla artıran uygulama olduğu söylenebilir.

#### **5.4.2. POD aktivitesine tuz, kemik tozu solüsyonu ve $\text{CaCl}_2$ 'nin etkileri**

NaCl uygulaması kontrol grubuna kıyasla POD aktivitesini artırıcı etki göstermiştir. Önceki araştırmalarda bu sonuçla uyumlu olan birçok araştırma bulgusu mevcuttur: Buğday, çeltik, sinameki (*Cassia angustifolia*) bitkisi ve soya fasulyesinde POD aktivitesi tuz stresi ile önemli derecede arttığı bildirilmiştir (Agarval and Pandey 2004; Ghorbanli *et al.* 2004).

NaCl+KT ve NaCl+CaCl<sub>2</sub> uygulamaları, POD aktivitesini genelde kontrol bitkisinde ki seviyede olmasını sağlamıştır. Bu durum bitkininin Ca<sup>+2</sup>'nin sodyum iyonlarının alınımını inhibe etmesiyle bitkinin stresten kurtulduğu şeklinde yorumlanabilir. Literatürde tuzlu koşullarda Ca<sup>+2</sup> eklenmesi sonucunda POD aktivitesinin düşüş gösterdiği rapor edilen araştırmalar mevcuttur. Nitekim Hernandez *et al.*(2003), tuzlu ortama eklenen Ca<sup>+2</sup>'nin POD aktivitesini azaltıcı etki gösterdiğini bildirmiştir. Bu çalışma araştırmamızın belirtilen sonuçlarıyla uyum içerisindedir.

Amor *et al.* (2009) *Cakile maritima* bitkisinde 0, 100, 200 ve 400 mM NaCl içeren ortamlara eklenen farklı Ca konsantrasyonlarının (0, 3.5 ve 20 mM) POD aktivitesinin, kalsiyum eklenen gruplarda yalnız NaCl içeren gruplara göre artış gösterdiğini bildirmiştir. Bizim çalışmamızda tuza ek olarak CaCl<sub>2</sub> eklenen gruplarda bu sonuç oluşmamış ancak NaCl+IAA+KT uygulamalarında yukarıdaki çalışmanın sonucu ile uyum içinde olan veriler elde edilmiştir. POD aktivitesinin en yüksek olduğu uygulamanın NaCl +IAA+%2 KT uygulaması olduğu belirlenmiştir. Bu sonuç dikkate alındığında, NaCl +IAA+%2 KT uygulamasının bitkide tuz stresini azaltmada etkili olabileceği sonucu çıkmaktadır.

#### 5.4.3. SOD aktivitesine tuz, kemik tozu solüsyonu ve CaCl<sub>2</sub>'nin etkileri

NaCl uygulaması bitkinin yaprak dokusundaki SOD enzim aktivitesini kontrole kıyasla %519 gibi yüksek bir değerle artırdığı kaydedilmiştir (Çizelge 4.5). Bu bulgumuz literatür verilerine göre de desteklenmektedir. Gossett *et al.* (1994) yaptıkları araştırmada *Gossypium hirsutum* L.'de NaCl stresinin SOD aktivesini artırdığını rapor etmişlerdir. Hernandez *et al.* (1999) bezelye (*Pisum sativum*) bitkisinde yüksek NaCl konsantrasyonlarının (110–130mM) sitosolik CuZn-SOD II, kloroplastik CuZn-SOD II ve peroksisomal veya mitokondriyal MnSOD' un aktivitesini artırdığını bildirmişlerdir. Parida *et al.* (2004), *Bruguiera parviflora* bitkisiyle yaptıkları çalışmada artan tuz konsantrasyonlarına bağlı olarak SOD aktivitesinin artış gösterdiğini tespit etmişlerdir. Tuz uygulamasıyla SOD aktivitesinin arttığı diğer araştırmacılar tarafından da kaydedilmiştir (Lin and Kao, 2000; Shalata and Tal, 1998; Eroğlu 2007). Bu bilgiler

ışığında tuz stresi altında bitkilerde oluşan reaktif oksijen türlerinin bertaraf edilmesi için savunma mekanizması olarak SOD enzim aktivitesinin artış gösterdiği düşünülmektedir.

NaCl+%1 KT uygulaması yalnız NaCl uygulamasına göre %9' luk bir enzim aktivitesi artışı sağlamıştır. Çalışmamızın bu sonucu ile paralellik gösteren tuzlu koşullara ilave edilen  $Ca^{+2}$  çözeltilisinin SOD enzim aktivitesini tuz uygulamasına nispetle daha fazla artırdığına dair veriler mevcuttur (Yan-Feng *et al.* 2008; Amor *et al.* 2009).

NaCl+%1 KT solüsyonu uygulaması dışında, KT'nin farklı konsantrasyonlarda (%1.5 ve 2) uygulandığı diğer NaCl+KT ve NaCl+CaCl<sub>2</sub> (15,30mM) uygulamalarının hepsinde SOD aktivitesi yalnız NaCl uygulamasına göre ciddi düşüşler göstermiştir. NaCl+%1.5 KT uygulaması SOD enzim aktivitesini neredeyse kontrol bitkisindeki değere kadar indirgemıştır.

Tuz stresi altındaki bitkilere dışarıdan uygulanan Ca, K veya P içeren bileşiklerin bitkinin yaprak ve köklerinde Na<sup>+</sup> ile rekabete girerek onun alınımını azalttığı ve bitki bünyesinde Ca, K ve P iyonlarının strese karşı koyabilecek yeterli düzeylere ulaşmasıyla birlikte bitkinin strese karşı koyabilme kapasitesinin de arttığı bazı çalışmalarla bildirilmiştir (Kaya ve Higgs 2003; Yakıt ve Tuna 2006 ). Çalışmamızın bu sonuçlarına göre kemik solüsyonu ve CaCl<sub>2</sub>' nin bitkiye Na<sup>+</sup> iyonlarının alınımını inhibe etmesi sonucu bitkiyi strese girmekten koruduğu, bunun sonucu olarak antioksidan enzim aktivitesinin artmaya gereksinim duymadığı sonucunu çıkarabilir.

Bu sonucu daha net söyleyebilmek için element içeriği analizi yapılmasına ve hücre zarlarının gördüğü zararı gösteren LPO sonuçlarına bakmak gerektiği gereklidir.

### 5.5. LPO seviyesine tuz, kemik tozu solüsyonu ve CaCl<sub>2</sub>'nin etkileri

Fasulye bitkisinin yaprak dokusunda NaCl uygulamasıyla MDA düzeyi, kontrol bitkisine göre % 46.7' lik yüksek bir artış göstermiştir (Çizelge 4.6). Bu sonuçla uyum içinde olan birçok araştırma bulgusu mevcuttur: Chaoui *et al.* (2004) tarafından yapılan çalışmalarda, tuz stresi uygulanmış fasulye bitkisinde LPO'nun kontrol grubuna göre yükseldiği rapor edilmiştir. Neto (2006) mısır bitkisinin iki farklı genotipinde 100 mM NaCl ilave edilen ordamda ki bitkilerde LPO seviyesinin tuzlu koşullardan etkilenme düzeylerini incelemiş, yaprak dokusunda LPO'nun tuza hassas genotiplerde geliştiği bildirmiştir.

Tuzlu koşullara direnç kazandırma amaçlı olarak ilave edilen ticari Ca<sup>+2</sup> çözeltilerinin LPO seviyesine etkisi ile ilgili araştırma bulguları mevcuttur. *Catharanthus roseus* bitkisine farklı konsantrasyonlarda tuz uygulandığında MDA miktarı artış göstermiş, 5 mM Ca ilave edildiğinde MDA miktarında azalmalar olduğu rapor edilmiştir (Jalel *et al.* 2007). Bizim çalışmamızda da NaCl+KT grupları ve NaCl+CaCl<sub>2</sub> uygulamalarının hepsi LPO düzeyini yalnız NaCl uygulamasına göre önemli ölçülerde azalttığı belirlenmiştir. Literatüre bakılınca tuz stresi olan ortamda yetişen bitkilerde ılımlı Ca<sup>+2</sup> kaynaklarının LPO seviyesinde etkili olduğu ile ilgili çalışmalar görülebilir. Amor *et al.* (2009) yaptığı çalışmada *Cakile maritima* bitkisine yalnız 0, 100, 200 ve 400 mM NaCl uygulamasının MDA miktarını artırdığını, NaCl' ye ilaveten farklı konsantrasyonlarda Ca (0, 3.5 ve 20 mM) eklenen gruplarda ise MDA miktarını azalttığını rapor etmiştir.

Bu araştırmadaki uygulamalardan LPO düzeyini azaltmada en olumlu etkiyi gösteren grup ise NaCl+%1 KT olmuştur. Bitkiler strese maruz kaldıklarında, doymamış yağ asitlerinin bozulmasıyla son ürün olarak oluşan malondialdehit (MDA) miktarındaki artış, hücrelerde zarların yapısal bütünlüğünün bozulduğunu gösteren iyi bir indikatördür (Posmyk *et al.* 2005). Bu bağlamda KT solüsyonunun hücre membranı zararının belirleyicisi olduğu kabul edilen LPO'nun son ürünü olan MDA düzeyleri üzerine saf haldeki CaCl<sub>2</sub>' den daha olumlu bir etki yaptığı söylenebilir. Tuzlu ortama eklenen KT nin membran bütünlüğünü koruması sonucu tuz koşullarının oluşturduğu



MDA artışının inhibe edildiği sonucu çıkarılabilir. Bu bulgunun kemik tozu içindeki yüksek orandaki  $Ca^{+2}$  ve diğer inorganik elementler ayrıca organik bileşimlerden kaynaklandığı düşünülmektedir.

### 5.6. $H_2O_2$ miktarına tuz, kemik tozu solüsyonu ve $CaCl_2$ 'nin etkileri

Çevresel streslerde yaprak dokusundaki  $H_2O_2$ 'nin strese cevapta etkili olduğu ile ilgili birçok araştırma mevcuttur. Kadife çiçeği (*Calendula officinalis*) tuz stresine (100 mM) maruz bırakıldığında  $H_2O_2$  seviyesinin normale göre %26 arttığı gösterilmiştir (Chaparzadeh *et al.* 2004). Mangrov bitkisine sera şartlarında tuz verildiğinde,  $H_2O_2$  seviyesinin gram dokuda %32,9 oranında arttığı bildirilmiştir (Parida and Das 2005). Tuza hassas iki mısır türünde 100 mM NaCl uygulamasından sonra hem kök hem de yaprakta  $H_2O_2$ 'nin arttığını bildirilmiştir (Neto *et al.* 2005). Yingli *et al.*(2007) artan tuz konsantrasyonuna bağlı olarak buğday bitkisinde  $H_2O_2$  miktarında artış gözlemişlerdir. Bizim araştırmamızda da NaCl uygulaması,  $H_2O_2$  seviyesinin kontrol grubuna göre % 59 oranında artışına neden olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.7).

Literatürde tuzlu ortama eklenen  $Ca^{+2}$  ile  $H_2O_2$  seviyesini arasında ki etkileşim üzerine yapılan çalışmalardan elde edilen bulgular, bizim bulgularımızla paralellik arz etmektedir. *Cakile maritima* bitkisinde 0, 100, 200 ve 400 mM NaCl içeren ortamlara eklenen farklı Ca konsantrasyonlarının (0, 3.5 ve 20 mM) kalsiyum eklenen gruplarda ki  $H_2O_2$  miktarının kontrole göre azalma gösterdiği bildirilmiştir (Amor *et al.* 2009).

Araştırmamızda NaCl+IAA+%2 KT uygulaması  $H_2O_2$  miktarını NaCl uygulamasına göre %34 azaltmıştır (Çizelge 4.7). Bütün uygulamaların en belirgin sonucu bu gruba aittir. Elde edilen verilere göre, tuzlu ortama  $CaCl_2$  eklemektense ılımlı konsantrasyonlarda KT solüsyonu eklemenin  $H_2O_2$  miktarını daha fazla azalttığı, yani tuz stresini hafifletmede KT uygulamasının daha etkili olduğunu söylemek mümkündür.

Eksojen olarak ilave edilen  $Ca^{+2}$  nin bitkide  $H_2O_2$  seviyesinin düşük bulunması,  $Ca^{+2}$  nin bu serbest radikali ortadan kaldıran antioksidant mekanizmaları daha etkin kılmasıyla, veya  $Ca^{+2}$  nin,  $Na^{+}$  iyonlarının hücre zarlarından geçişini azaltması ve dolayısıyla  $Na^{+}$  iyonlarının hücre zarlarının geçirgenlik özelliği üzerine yaptığı tahribatın önüne geçilmesi ve böylece hücrede daha fazla  $H_2O_2$  oluşumunun engellenmesi sağladığı şeklinde izah edilebilir.

### **Sonuçlar ve öneriler;**

1. NaCl uygulaması sonucu fasulye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisinin ortalama kök ve gövde uzunluk değerlerinde önemli düşüşler görülmüştür. NaCl'ye ilave olarak (%1, %1.5, %2) KT solüsyonu ve  $CaCl_2$  (15, 30 mM) uygulamaları tuzlu koşulların ortalama kök ve gövde uzunluğu değerlerinde oluşturduğu olumsuz etkiyi önemli ölçüde bertaraf etmiştir. NaCl'ye ilave olarak KT ve  $CaCl_2$  uygulamaları kıyaslanırsa KT uygulamalarının  $CaCl_2$ 'ye göre çok daha etkili olduğu belirlenmiştir. Bu sonuç KT'de bulunan önemli orandaki  $Ca^{+2}$  ve çok sayıdaki inorganik elemente ayrıca KT içindeki kimliği belirlenmemiş organik elementlere bağlanabilir.

2. Tuz stresi altında yetiştirilen zengin bir protein kaynağı olan fasulye bitkisinin protein içeriği tuzlu koşullarda önemli değerlerde düşüş göstermektedir. NaCl' nin bu olumsuz etkisini hafifletmede uygulanan (%1, %1.5, %2) KT solüsyonun ve  $CaCl_2$ ' nin düşük konsantrasyonları (15,30 mM) etkili olmuştur. Tuzlu koşullarda ciddi oranda azalan protein içeriği üzerine kemik tozu solüsyonunun olumlu etkisi ticari olarak üretilen saf  $CaCl_2$ 'nin etkisine göre % 50 daha fazla olmuştur.

3. NaCl uygulaması bitkinin yaprak dokusundaki klorofil *a*, klorofil *b*, toplam klorofil ve karotenoid miktarlarının azalmasına neden olmuştur. Ortama ilave edilen kemik tozu solüsyonu ve  $CaCl_2$  fotosentetik pigment miktarlarında tuz stresinin oluşturduğu olumsuz etkiyi ortadan kaldırarak pigment miktarını artırdığı belirlenmiştir.

Fotosentetik pigment miktarlarında artış  $\text{CaCl}_2$  gruplarına göre KT uygulanan bitkilerde daha fazla olmuştur.

**4.** NaCl uygulamasının CAT enzim aktivitesini önemli oranda artmasına neden olduğu belirlenmiştir. CAT aktivitesinin en yüksek değeri, NaCl +IAA+% 2 KT uygulamasıyla saptanmıştır. Bu sonuca göre, KT uygulamasının bitkinin tuzluluğa savunma kapasitesini artırdığı söylenebilir. NaCl' ye ilave olarak diğer uygulamalardan bazılarının (%1 KT, %1.5 KT, 15 mM  $\text{CaCl}_2$ ) CAT enzim aktivitesini kontrol seviyesine yaklaştırdığı görülmüştür.

**5.** Tuz uygulaması POD aktivitesinde önemli değerde artışa neden olmuştur. POD aktivitesinin en yüksek değeri, NaCl +IAA+% 2 KT uygulamasında tesbit edilmiş olup bu uygulamanın, bitkinin savunma kapasitesini artırdığına dair bir işaret olarak kabul edilebilir.

**6.** NaCl uygulaması, bitkilerde süperoksit dismutaz enzim aktivitesini önemli ölçüde artırmıştır. SOD enzim aktivitesinin en yüksek değeri ise NaCl+% 1 KT uygulaması ile ortaya çıkmıştır. Diğer uygulamaların tümü enzim aktivitesinin düşmesine hatta kontroldeki değerlere yaklaşmasına neden olmuştur. Bu sonuçlara göre NaCl+% 1 KT uygulamasının bitkinin strese karşı koyma kapasitesini artırdığı anlamına gelmektedir. Ayrıca tuzlu koşullara ilave edilen  $\text{Ca}^{+2}$  kaynakları sonucu antioksidan enzimlerin aktivitesinin artması kalsiyum kaynaklarının antioksidan enzimlerin sentezini artırdığı sonucu çıkarılabilir. Ancak NaCl+% 1 KT uygulaması dışındaki tüm uygulamalarda SOD enzim aktivitelerinin kontrol bitkisindeki seviyeler kadar düşük olması ise  $\text{Ca}^{+2}$ 'nin ikinci görevi olarak kabul edilen, ilgili gen merkezlerine mesaj götürmesi ve bunun sonucu olarak zarlardaki iyon kanallarının düzenlenmesiyle  $\text{Na}^{+}$  iyonuna geçirgenliğin azaltılması ve böylece söz konusu tuz stresine direnci oluşturduğu, yani antioksidan mekanizmanın devreye girmesine gerek kalmadığı şeklinde izah edilebilir. Bu sonuçlar da element içeriği analizlerinin gerekliliğini göstermektedir.

7. Araştırmamızın sonucunda da antioksidan enzimler açısından en yüksek sonuçlar fasulye bitkisi yapraklarına IAA uygulanan gruplarda belirlenmiştir Tuzlu koşullara eklenen kemik tozu solüsyonuna ek olarak yapraklara uygulanan IAA, bitkide  $Ca^{+2}$ 'nin alınımını artırmak suretiyle bitkinin savunma kapasitesini artırdığı düşünülmektedir. Literatürde oksinlerin  $Ca^{+2}$  alınımını artırdığına dair araştırma bulguları mevcuttur (Felle *et al.* 1988).

8. NaCl uygulaması  $H_2O_2$  miktarının önemli değerde artmasına yol açmıştır. Tuzlu koşullara gerek KT ve gerekse  $CaCl_2$  eklenmesi sonucunda bu serbest radikal oluşumunun azaldığı belirlenmiş, ancak KT uygulamasının  $H_2O_2$  oluşumunu  $CaCl_2$  ye nazaran daha fazla düşürdüğü tesbit edilmiştir. Bu sonuç, kemik solüsyonun  $Na^+$ 'nın bitkiye alınımını  $CaCl_2$ ' ye göre daha fazla inhibe ettiği şeklinde yorumlanabilir.

9. NaCl uygulaması, stresli ortamda stresin sebep olduğu hasarın indikatörü olarak kabul edilen LPO seviyesini önemli ölçülerde artırmıştır. Oysa, ortama ilave edilen kemik tozu solüsyonu ve  $CaCl_2$  LPO seviyesini düşürmüştür. Bu sonuç bitkiye alınan  $Ca^{+2}$ 'nin membran kararlılığının korunmasında etkin olabileceği anlamına gelmektedir. Kemik tozu solüsyonunun LPO seviyesi üzerine olumlu etkisi,  $CaCl_2$ 'nin etkisine göre daha yüksek değerlerde olduğu belirlenmiştir. Bu sonuca göre, kemik tozu solüsyonu stres şartlarını daha etkin şekilde hafiflettiği söylenebilir.

10. Tuzlu koşullara ilave edilen  $CaCl_2$ 'nin tuzluluğun olumsuz etkilerini hafiflettiği önceki araştırmalarda rapor edilmiş olan bir gerçektir. Bizim çalışmamızda yüksek  $Ca^{+2}$  ve birçok inorganik element kaynağı olduğu WDXRF analizlerine göre belirlenen ayrıca kimliği belirlenmemiş organik bileşimlerden oluşan kemik tozu solüsyonunun, tuzlu koşullarda NaCl'nin olumsuz etkilerini hafifletmede ve bitkinin tuza toleransını artırmada  $CaCl_2$ 'ye göre daha etkili olduğu saptanmıştır. Bulgularımızın literatür açısından ilk olması arz etmektedir.

**KAYNAKLAR**

- Agarwal, S., and Pandey, V., 2004. Antioxidant enzyme responses to NaCl stress in *Cassia angustifolia*. *Biologia Plantarum*, 48(4), 555-560.
- Akkus, İ., 1995. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza Yayınları, Konya.
- Allakhverdiev, S.I., Sakamoto, A., Nishiyama, Y., Inaba, M., Murata, N., 2000. Ionic and osmotic effects of NaCl induced inactivation of photosystems I and II in *Synechococcus* sp. *Plant Physiol*, (123), 1047–1056.
- Alamgir, A.N.M., and Ali, M.Y., 1999. Effect of salinity on leaf pigments, sugar and protein concentrations and chloroplast ATPase activity of rice (*Oryza sativa* L.). *Bangladesh J. Bot.*, (28), 145-149.
- Amor, N. B., Megdiche, W., Jimenez, A., Sevilla, F., Abdelly, C., 2009. The effect of calcium on the antioxidant systems in the halophyte *Cakile maritima* under salt stress. *Acta Physiol Plant*, DOI 10.1007/s11738-009-0420-2.
- Arshi, A., Abdin, M.Z., Iqbal, M., 2006. Sennoside content and yield attributes of *Cassia angustifolia* Vahl. as affected by NaCl and CaCl<sub>2</sub>. *Sci. Hortic*, (111), 84–90.
- Angelini, R., and Federico R., 1989. Histochemical evidence of polyamin oxidation and generation of hydrogen peroxide in the cell wall. *J. Plant Physiol.*, (135), 212-217.
- Bakardjieva, N., and Christov, K., 1996. Effect of calcium and zinc ions on the sensitivity of peroxidase from moses (*Mnium* sp.) and ferns (*Polydium vulgare*) to high temperature. *Can. J. Bot.*, (74), 1665-1670.
- Banci, L., 1997. Structural properties of peroxidase. *J. Biotech.*, (53), 253-263.
- Bergmeyer, J., and Grabl, M., 1983. *Methods of Enzymatik Analysis* (Third Edition), 190-302, Germany.
- Boyer, J.S., 1982. Plant productivity and environment. *Science*, (218), 443-48.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Biochem.*, 72, 248-254.
- Breusegem, F.V., Vranova, E., Dat, J.F., Inze, D., 2001. The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Sci*, (161), 405–414.
- Bowler, C., Van Maontague, M., Inze, D., 1992. Superoxide Dismutase and Stress Tolerance. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, (43), 83-116.
- Chanda, S.V., and Singh, Y.D., 1997. Changes in peroxidase and IAA oxidase activities during wheat grain development. *Plant Physiol. Biochem.*, (35), 245-250.
- Chaoui, A., Jarrar, B., Ferjani, E.E.V., 2004. Effects of cadmium and copper on peroxidase, NADH oxidase and IAA oxidase activities in cell wall soluble and microsomal membrane fractions of pea roots. *Journal of Plant Physiology*, (161), 1225-1234.
- Chaparzadeh, N., D'Amico M.L., Khavari-Nejad, R.A., Izzo, R., Navari-Izzo, F., 2004. Antioxidative responses of *Calendula officinalis* under salinity conditions. *Plant Physiology and Biochemistry*, (42), 695–701.

- Chartzoulakis, K., Klapaki, G., 2000. Response of two green house pepper hybrids to NaCl salinity during different growth stages. *Sci. Hortic*, (86), 247–260.
- Chaudiere, J., and Ferrari-Iliou, R., 1999. Intracellular antioxidants from chemical to biochemical mechanism. *Food Chem. Toxicol.*, (37), 949-962.
- Cramer, G., Lauchli, R.A., Polito, V.S., 1985. Displacement of  $\text{Ca}^{+2}$  by  $\text{Na}^{+}$  from the plasmalemma of root cells. A primary response to salt stress. *Plant Physiol*, (79), 207–211.
- Çınar, S., 2005. Mangan ve Demir Stresi Uygulanmış Roka (*Eruca sativa*) Bitkisinde Bazı Antioksidan Enzim Aktivitesindeki ve Lipid Peroksidasyon Düzeylerindeki Değişiminin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Manisa.
- Downton, W.J.S., Grant, W.J.R., Robinson, S.P., 1985. Photosynthesis and stomatal responses of spinach leaves to salt. *Plant Physiol.*, (78), 85-88.
- Ekmekçi, E., Apan, M., Kara, T., 2005. Tuzluluğun bitki gelişimine etkisi. *OMÜ Zir. Fak. Dergisi*, 20(3),118-125.
- Epstein, E., Norlyn, J., Rush, D., Kingsburg, R., Kelley, D., Cunningham, G., Wrona, A., 1980. Saline culture of crops: a genetic approach. *Science*, (210), 399-404.
- Erdal, S., Dumlupinar, R., Çakmak, T., Genisel, M., 2010. Mammalian sex hormones influence germination velocity and enzyme activities in germinating maize seeds. *Fresenius Environmental*, 19, 1458-1465.
- Ergene, A., 1982. Toprak Bilgisi. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları,(267), Ders Kitapları Serisi (42), Erzurum.
- Eroğlu, İ., 2007. Tuz Stresinin Bazı Fasulye (*Phaseolus vulgaris L.*) Kültür Çeşitlerinde Tohum Çimlenmesi ve Fide Gelişimi Üzerine Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, İzmir.
- Feierabend, J., Schaan, C., Hertwig, B., 1992. Photoinactivation of Catalase Occurs Under Both High and Low Temperature Stress Conditions and Accompanies Photoinhibition of Photosystem II. *Plant Physiol.*, (100), 1554-1561.
- Felle. H., 1988. Auxin causes oscillations of cytosolic free calcium and pH in *Zea mays* coleoptiles. *Planta*. 174, 495-499.
- Flowers, T.J., Troke, P.F., Yeo, A.R., 1977. The mechanism of salt tolerance in halophytes. *Annu. Rev. Plant Physiol*, (28), 89–121.
- 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), 241-254.
- Fridovich, L., 1986. Biological Effect of Superoxide Radical. *Arch. Biochem. Biophys.*,(247), 1-11.
- Fridovich, I., 1995. Superoxide Radical and Superoxide Dismutases. *Annu. Rev. Biochem.*,(64), 97-112.
- Gaspar, T., Penel, C., Hagege, D., Greppin, H., 1991. Peroxidases in Plant Growth Differentiation and Development Processes. Univ. M. Curie-Sklodowska, Lublin, Poland and Univ., Geneva, Switzerland.
- Gechev, T., Gadjev I., Breusegem, F. V., Inze, D., Dukiandjiev, S., Taneve, V., Minkov, I., 2002. Hydrogen peroxide protect tobacco from oxidative stress by inducing a set of antioxidant enzymes. *CMLS*, (59), 708-714.
- Ghorbanli, H., Ebrahimzadeh, H., Sharifi, M., 2004. Effect of NaCl and mycorrhizal fungi on antioxidative enzymes in soybean. *Biologia Plantarum*, 48(4), 575-581.

- Gong, Y., Toivonen, P.M.A., Lau, O.L., Wiersma, P.A., 2001. Antioxidant system level in 'Braeburn' apple in related to its browning disorder. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, (42), 259-264.
- Gosset, D.R., Banks, S.W., Millhollon, E.P., Lucas, C., 1996. Antioksidant response to NaCl stres in a control and an NaCl-tolerant cotton cell line grown in the presence of paraquat, buthionine, sulfoximine and exogenous glutathione. *Plant Physiol.*, (112), 803-804.
- Gosset, D.R., Millhollon, E.P., Lucas, M.C., 1994. Antioxidant Response to NaCl Stress in Salt-Tolerant an Salt-Sensitive Cultivars of Cotton. *Crop Sci.*, (34), 706-714.
- Greenway, H., and Munns, R., 1980. Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. *Annu. Rev. Plant Physiol*, (31), 149-190.
- Güler, N.S., 2008. *Ctenanthe setosa*'da yaprak kıvrılması sırasında apoplastik ve simplastik alanlarda antioksidan sistemde meydana gelen değişimler. Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Hagemann, M., Erdmann, N., 1997. Environmental stresses. In: Rai, A.K. (Ed.), *Cyanobacterial Nitrogen Metabolism and Environmental Biotechnology*. Springer, Heidelberg, Narosa Publishing House, NewDelhi, India, 156-221.
- Halliwell, B., 1984. Toxic Effects of Oxigen on Plant Tissues, In: *Chloroplast Metabolism, The Structure and Function of Chloroplasts in Green Leaf Cells*. Oxford Press, Oxford. 180-206.
- Havir, E.A. and Mchale, N.A., 1987. Biochemical and developmental characterization of mutiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiol.*, (84), 1291-1294.
- Hayashi, H., Murata, N., 1998. Genetically engineered enhancement of salt tolerance in higher plants. In: Sato, K., Murata, N., (Ed.), *Stress Response of Photosynthetic Organisms: Molecular Mechanisms and Molecular Regulation*. Elsevier, Amsterdam, 133-148.
- He, Y., Liu, Y., Cao, W., Huai, M., Xu, B., and Huang, B. 2005. Effects of salicylic acid on heat tolerance associated with antioxidant metabolism in *Kentucky bluegrass*. *Crop Sci.*, 45, 988 - 995.
- Heath, R.L., Packer, L., 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplast I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 25, 189-198.
- Hernandez, J. A., Aguilar, A. B., Portillo, B., López-Gómez, E., Beneyto, J. M., García-Legaz, M. F., 2003. The effect of calcium on the antioxidant enzymes from salt-treated loquat and anger plants. *Functional Plant Biology*, (30), 1127-1137.
- Hernandez, J. A., Campillo, A., Jimenez, A., Alarcon, J. J., Sevilla, F., 1999. Response of antioxidant systems and leaf water relations to NaCl stress in pea plants. *New Phytol.*, (141), 241-251.
- Hernandez, J.A., Olmos, E., Corpas, F.J., Sevilla, F., Rio, L.A.D., 1995. Salt-induced oxidative stress in chloroplasts of pea plants. *Plant Sci*, (105), 151-167.
- <http://www.izotar.com/teknik7.htm>. (07.04.2010).
- Jalel, C.A., Manivannan, P., Sankar, B., Kishorekumar, A., Panneerselvam, R., 2007. Calcium chloride effects on salinity-induced oxidative stress, proline metabolism and indole alkaloid accumulation in *Catharanthus roseus*. *C. R. Biologies*, (330), 674-683.
- Kaçar, O., Çakmak, F., Çöplü, N., Azkan, N., 2004. Bursa Koşullarında Bazı Kuru Fasulye Çeşitlerinde (*Phaseolus vulgaris* L.) Bakteri Aşılama ve Değişik Azot

- ozlarının Verim ve Verim Unsurları Üzerine Etkisinin Belirlenmesi. Uludağ Üniv. Zir. Fak. Derg., 18(1), 207-218.
- Kadıoğlu, A., 2007. Bitki Fizyolojisi . 406, 407 s., Karadeniz Teknik Üniversitesi. Trabzon.
- Kaur, S., Gupta, A.K., and Kaur, N., 2003. Indole acetic acid mimics the effect of salt stress in relation to enzymes of carbohydrate metabolism in chickpea seedlings. *Plant Growth Regulation*, 39, 91–98.
- Kaya, C., and Higgs, D., 2003. Supplementary Potassium Nitrate Improves Salt Tolerance in Bell Pepper Plants. *Journal of Plant Nutrition*, 26(7), 1367–1382.
- Kennedy, B.F., De Fillippis, L.F. 1999. Physiological and oxidative response to NaCl of the salt tolerant *Grevillea ilicifolia* and the salt sensitive *Grevillea arenaria*. *J. Plant Physiol.*, 155, 746–754.
- Kerby, K., and Somerville, S.C., 1992. Purification of an infection-related, extracellular peroxidase from barley. *Plant Physiol.*, (100), 397-402.
- Khavarinejad, R.A., Chaparzadeh, N., 1998. The effects of NaCl and CaCl<sub>2</sub> on photosynthesis and growth of alfalfa plants. *Photosynthetica*, 35, 461–466.
- Khedr, A. H. A., Abbas, M. A., Abdel Wahid, A. A. A., Quick, W. P., Abogadallah, G. M., 2003. Proline induces the expression of salt-stress-responsive proteins and may improve the adaptation of *Pancratium maritimum* L. to salt-stress. *Journal of experimental Botany*, 392, 2553-2562.
- Kim, K.Y., Kwon, S.Y., Lee, H.S., Hur, Y., Bang, C.W., Choi, K.S., Kwak, S.S., 2000. Differential expression of four sweet potato peroxidase genes in response to abscisic acid and ethaphon. *Phytochemistry*, (54), 19-22.
- Koca, M., Bor, M., Ozdemir, F., Turkan, I., 2007. The effect of salt stress on lipid peroxidation, antioxidative enzymes and proline content of sesame cultivars. *Environ. Exp. Bot.*, (60), 344–351.
- Kocaçalışkan, İ., 2008. Bitki Fizyolojisi. 38, 219, 220 s., Dumlupınar Üniversitesi. Kütahya.
- Koçer, M.C., 2007. Tuz Stresine Maruz Bırakılan Mısır (*Zea Mays* L.) Bitkisinde, Eksojen Olarak Uygulanan Absisik Asit (ABA) ve Salisilik Asit (SA)' in Etkilerinin Belirlenmesi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Van.
- Kuru, H.İ., 2007. Arseniğin insan ve bazı canlılarda oksidatif enzimler üzerine etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kütahya.
- Kwiatowski, J., 1998. Salinity Classification, Mapping and Management in Alberta <http://www.agric.gov.ab.ca/sustain/soil/salinity>
- Lee, T.M., and Lin Y.H., 1996a. Peroxidase activity in ethylene-induced rice (*Oryza sativa* L.) coleoptil elongation. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, 37(4), 239-245.
- Lee, T.M., and Lin, Y.H., 1996b. Peroxidase activity in ethylene, ABA, or MeJA, treated rice (*Oryza sativa* L.) roots. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, (37), 201-207.
- Lin, C.C. and Kao, C.H., 2000. Effect of NaCl Stress on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Metabolism in Rice Leaves. *Plant Growth Regul.*, 30, 151-155.
- Li, M., Wang, G.X., Lin, J.S., 2003. Application of external calcium in improving the PEG-induced water stress tolerance in liquorice cells. *Bot Bull Acad Sin*, (44), 275–284.



- Mehlhorn, H., Lelandais, M., Korth, H.G., Foyer, C.H., 1996. Comparison of Ascorbate- Dependent Peroxidase Activity in Horseradish Peroxidase Types I and II and in Leaf Extracts, *FEBS Letts.*, (378), 203-206.
- Maathuis, F.J.M., Amtmann, A., 1999. K<sup>+</sup> nutrition and Na<sup>+</sup> toxicity: the basis of cellular K<sup>+</sup>/ Na<sup>+</sup> ratios. *Ann. Bot.*, (84), 123–133.
- McCue, K. F., and Hanson, A. D., 1990. Salt-inducible betaine aldehyde dehydrogenase from sugar beet: cDNA cloning and expression. *Trends Biotechnol.*, ( 8), 358–362.
- McClung, C.R., 1997. Regulation of catalases in *Arabidopsis*. *Free Radical Bio. Med.*, (23), 489-496.
- McKersie, B.D., and Lehsem, Y., 1994. *Stress and Stress Coping in Cultivated Plants*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Minibaeva, F.V., and Gordon, L.K., 2003. Superoxide production and the activity of extracellular peroxidase in plant tissues under stress conditions. *Russ. J. of Plant Physiology*, 50(3), 411-416.
- Mutlu, S., 2005. Tuz stresi ve salisilik asitin buğday yapraklarında apoplastik ve simplastik antioksidan enzimler üzerine etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Mutlu, S., Atici Ö., Nalbantoglu, B., 2009. Effects of salicylic acid and salinity on apoplastic antioxidant enzymes in two wheat cultivars differing in salt tolerance. *Biologia Plantarum*, 53 (2), 334-338.
- Nandwal, A.S., Godara, M., Sheokand, S., Kamboj, D.V., Kundu, B.S., Kuhad, M.S., Kumar, B., Sharma, S.K., 2000. Salinity induced changes in plant water status, nodule functioning and ionic distribution in phenotypically differing genotypes of *Vigna radiata* L. *J Plant Physiol*, (156),350–359.
- Neto, A. D. A., Prisco, J. T., Enéas-Filho, J., Abreu, C. E. B., Gomes-Filho, E., 2006. Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes. *Environmental and Experimental Botany*, (56), 87–94.
- Neto, D.A., Prisco, J.T., Enéas-Filho, J., Abreu, C.E.B., Gomes-Filho, E., 2005. Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes. *Environ Exp Bot*, (56), 87–94.
- Niknam, V., Bagherzadeh, M., Ebrahimzadeh, H., Sokhansanj, A., 2004. Effect of NaCl on biomass and contents of sugars, proline and proteins in seedlings and leaf explants of *Nicotiana tabacum* grown in vitro. *Biologia Plantarum*, 48, 618-615.
- Nishiyama, Y., Ikeda, H., Haramaki, N., 1998. Oxidative Stress is Related to Exercise in Tolerance in Patients With Heart Failure. *Am. Heart. J.*, (135), 115.
- Öncel, I., Keleş, Y., 2002. Tuz Stresi Altındaki Buğday Genotiplerinde Büyüme, Pigment İçeriği ve Çözünür Madde Kompozisyonunda Değişmeler. *C.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi Fen Bilimleri Dergisi*, (2), 23.
- Öz, M., ve Karasu A., 2007. Pamuğun çimlenmesi ve erken fide gelişimi üzerine tuz stresinin etkisi. *U.Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi*, 21 ( 1), 9-21.
- Parida, A. K., Das, A.B., 2005. Prasanna Mohanty Defense potentials to NaCl in a mangrove, *Bruguiera parviflora*: Differential changes of isoforms of some antioxidative enzymes. *J. Plant Physiol*, (161), 531–542.

- Parida, A.K., Das, A.B., Mitra, B., Mohanty, P., 2004. Salt-stress induced alterations in protein profile and protease activity in the mangrove, *Bruguiera parviflora*. *Z. Naturforsch.*, 59, 408–414.
- Patel, R., Prasher, S., Bonnell, R., Boughton, R., 2002. Development of comprehensive soil salinity index. *J. of Irrigation and Drainage Engineering- ASCE*, (128), 185–188.
- Patykowski, J., Urbanek H., 2003. Activity of enzymes related to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation and metabolism in leaf apoplastic fraction of tomato leaves infected with *Botrytis cinerea*. *Journal of Phytopathology*, (151), 153–161.
- Posmyk, M.M., Bailly, C., Szafranska, K., Janas, K.M., Corbineau, F., 2005. Antioxidant enzymes and isoflavonoids in chilled soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) seedlings. *J. Plant Physiol.*, (162), 403–412.
- Qadir, M., Schubert, S., Ghafoor, A., Murtaza, G., 2001. Amelioration strategies for sodic soil: a review, *Land Degrad. Dev*, (12) , 357–386.
- Rao, G.G., and Rao, G.R., 1981. Pigment composition and chlorophyllase activity in Pigeon pea (*Cajanus indicus* Spreng.) and gingelly (*Sesamum indicum* L.) under NaCl salinity. *Indian J.Exp. Biol.*, (19), 768–770.
- Renault, S., 2005. Response of red-osier dogwood (*Cornus stolonifera*) seedlings to sodium sulphate salinity: effects of supplemental calcium. *Physiol. Plant.*, (123), 75–81.
- Sağlam, S., Çiftçi, C.Y., Khawar, K.M., Atak, M., Özcan, S., 2005. In Vitro Koşullarda Fasulye Bitkisine Dört Yapraklı Aşamada Transformasyon Çalışmaları. *Akdeniz Üniv. Ziraat Fak. Dergisi*, 18(2), 291–294.
- Sairam, R.K., Tyagi, A., 2004. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Curr. Sci*, (86). 407–421.
- Santos, C. V., 2004. Regulation of chlorophyll biosynthesis, degradation by stress in sunflower leaves. *Scientia Horticulturae*, 103, 93–99.
- Scandalios, J.G., 1993. Oxygen Stress and Superoxide Dismutase. *Plant Physiol.*, (101), 7–12.
- Shalata, A., Mittova, V., Volokita, M., Guy, M., Tal, M.V., 2001. Response of the cultivated tomato and its wild salt – tolerant relative *Lycopersicon pennelli* to salt dependent oxidative stress: The root antioxidative system. *Physiologia Plantarum*, (112), 487 – 494.
- Sheng, M., Tang, M., Chan, H., Yang, B., Zhang, F., Huang, Y., 2008. Influence of arbuscular mycorrhizae on photosynthesis and water status of maize plants under salt stress. *Mycorrhiza*, (18), 287–296.
- Slesak, I., Libik, M., Karpinska, B., Karpinski, S., Miszalski, Z., 2007. The Role of Hydrogen Peroxide in Regulation of Plant Metabolism and Cellular Signalling in Response to Environmental Stresses. *Acta Biochim. Pol.*, (54), 39–50.
- Sönmez, B., 2004. Türkiye Çoraklık Kontrol Rehberi. Toprak ve Gübre Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Teknik Yayın ( 33).
- Spiteller, G., 2001. Peroxidation of lineoleic acid and its relation to aging and age dependent diseases. *Mechanisms of Ageing and Development*, (122), 617–657.
- 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*). *Physiologia Plantarum*, (109), 435 – 442.
- Stahl, W., and Sies, H., 2002. Introduction: Reactive Oxygen Species, Research Monographs, 1-2.
- Streb, P., Michael-Knauf, A., Feierabend, J., 1993. Preferential Photoinactivation of Catalase and Photoinhibition of Photosystem II are Common Early Symptoms under Various Osmotic and Chemical Stress Conditions. *Physiol. Plant.*, (88), 590-598.
- Şimsek, F., 1999. Serbest oksijen radikalleri, antioksidanlar ve lipit peroksidasyonu. *Türkiye Klinikleri J Pediatr*, 8(1), 42-47.
- Suhayda, C.G., Redmann, R.E., Harvey, B.L. & Cipywnyk, A.L. 1992. Comparative response of cultivated and wild barley species to salinity stress and calcium supply. *Crop Science*, 32, 154-163.
- Taiz, L., and Zeiger, E., Çeviri; Türkan, İ., 2008. *Bitki fizyolojisi*. 615 s., İzmir.
- Taşgın E., Atıcı Ö., Nalbantoğlu, B., Popova, L.P., 2006. Effects of salicylic acid and cold treatments on protein levels and on the activities of antioxidant enzymes in the apoplast of winter wheat leaves. *Phytochemistry*, (67), 710-715.
- Teixeira, J., and Pereira, S., 2007. High Salinity and Drought Act on an Organ-Dependent Manner on Potato Glutamine Synthetase Expression and Accumulation. *Environmental and Experimental Botany*, (60), 121-126.
- Tobe, K., Li, X., Omasa, K., 2002. Effect of sodium magnesium and calcium salts on seed germination and radicle survival of a halophyte, *Kalidium caspicum* (Chenopodiaceae). *Australian Journal of Botany*, (50), 163-169.
- Tuna, A.L., Kaya, C., Ashraf, M., Altunlu, H., Yokas, I., Yagmur, B., 2007. The effects of calcium sulphate on growth, membrane stability and nutrient uptake of tomato plants grown under salt stress. *Environ. Exp. Bot.*, (59), 173–178.
- Türkmen, Ö., Şensoy, S., Erdal, İ., Kabay T., 2002. Kalsiyum uygulamalarının tuzlu fide yetiştirme ortamlarında domates çıkış ve fide gelişimi üzerine etkileri. *Y.Y.Ü. Ziraat Fak. Tarım Bilgileri Dergisi*, 12 (2), 53-57.
- Vicente, O., Boscaiu, M., Naranjo, M. A., Estrelles, E., Belles, J. M. ve Soriano, P., 2004. Responses to salt stress in the halophyte *Plantago crassifolia* (Plantaginaceae). *Journal of Arid Environments*, 58, 463–481.
- Wang, Y., and Nil, N., 2000. Changes in chlorophyll, ribulose biphosphate carboxylase–oxygenase, glycine betaine content, photosynthesis and transpiration in *Amaranthus tricolor* leaves during salt stress. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.*, (75), 623–627.
- Wang, W., Vinocur, B., Altman, A., 2003. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: toward genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, (218), 1–14.
- Wood, E. S., and Simith, C. A., 1991. *Molecular and Cell Biochemistry*. Chapman & Hail, Hong Kong.
- Witham, F.H., Blayles, D.F. and Devlin, R.M., 1971. *Experiments in Plant Physiology*. Van Nostrand Reinhold Company, 55-56. New York.
- Xiang, Z., Yan-Liang, W., Ya-Jing, W., Xi-Li, W., Xiao, Z., 2008. Extracellular Ca<sup>2+</sup> Regulating Stomatal Movement and Plasma Membrane K<sup>+</sup> Channels in Guard Cells of *Vicia faba* Under Salt Stress. *Acta Agron Sin*, 34(11), 1970–1976.

- Yakıt, S., ve A.L., 2006. Tuz stresi altındaki mısır bitkisinde (*Zea mays* L.) Stres Parametreleri üzerine Ca, Mg ve K'nın etkileri. Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 19(1), 59-67.
- Yan, F., Schubert, S., Mengel, K., 1992. Effect of low root medium pH on net proton release, root respiration and root growth of corn (*Zea mays* L.) and broad bean (*Vicia faba* L.). Plant Physiol., 99, 415–421.
- Yan-Feng, X., Ling, L., Zhao-Pu1, L., Mehta, S. K., Geng-Mao, Z., 2008. Protective Role of Ca Against NaCl Toxicity in *Jerusalem artichoke* by Up-Regulation of Antioxidant Enzymes. Soil Science Society of China, 18(6), 766–774.
- Yee, Y., Tam, N.F.Y., Wong, Y.S., Lu, C.Y., 2002. Growth and physiological responses of two mangrove species (*Bruguira gymnorrhiza* and *Kandelia candel*) to waterlogging. Environ. Exp. Bot., 1-13.
- Yılmaz, S., ve Ozan, T. S., 2003. Meme kanserli hastalarda lipid peroksidasyonu ve bazı enzim aktiviteleri arasındaki iliksi. Türk Biyokimya Dergisi, 28(4),252-256.
- Yingli, Y., Shijian, X., Lizhe, A., Nianlai, C., 2007. NADPH oxidase-dependent hydrogen peroxide production, induced by salinity stress, may be involved in the regulation of total calcium in roots of wheat. Journal of Plant Physiology, 164, 1429-1435.
- Zhu, J. K., 2001. Over expression of a delta-pyrroline-5-carboxylate synthetase gene and analysis of tolerance to water and salt stress in transgenic rice. Trends Plant Sci, (6), 66–72.

## ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında Erzurum'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Erzurum'da tamamladı. 1996 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2000 yılında mezun oldu. Aynı yıl Milli Eğitim Bakanlığı kadrosu ile öğretmenliğe atandı. Çeşitli okullarda öğretmenlik ve idarecilik yaptı. 2007 yılında başladığı Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimine devam etmektedir. 2009 yılında araştırma görevlisi olarak atandığı Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi'nde halen araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır. Evli ve iki çocuk babasıdır.