

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZ	I
ABSTRACT	II
ÇİZELGELER	III
ŞEKİLLER	IV
1. GİRİŞ	1
1.1. Oksijenin Aktivasyonu	1
1.2. Oksijen Radikallerinin Biyolojik Reaksiyonları	1
1.2.1. Hidroksil Radikali, Süperoksit Radikali ve Hidrojen Peroksit	2
1.2.1.1. Hidroksil Radikali	2
1.2.1.2. Süperoksit Radikali (O_2^-)	2
1.2.1.3. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)	3
1.3. Aktif Oksijen Üretim Bölgeleri	4
1.3.1. Kloroplastlar	4
1.3.2. Mitokondriler	5
1.3.3. Endoplazmik Retikulum	5
1.3.4. Mikrobadiler	6
1.3.5. Plazma Membranları	6
1.3.6. Hücre Duvarları	7
1.4. Aktif Oksijen Oluşumu	7
1.5. Savunma Mekanizmaları	8
1.5.1. Enzimik Yollar	8
1.5.1.1. Süperoksit Dismütaz (SOD; E.C.1.15.1.1)	8
1.5.1.2. Peroksidaz (POD; EC 1.11.1.7)	8
1.5.1.3. Katalaz (CAT; E.C.1.11.1.6)	9
1.5.1.4. Glutasyon Redüktaz (GR; E.C.1.6.4.2)	9
1.5.2. Antioksidantlar	9
1.6. Oksidatif Stres	9
1.7. Çevresel Stresler ve Antioksidant Sistemler	11
1.7.1. Kirlilik	11
1.7.1.1. Ozon.....	11

1.7.1.2.Kükürt dioksit	12
1.7.2. Herbisitler	12
1.7.3. Metaller	12
1.7.4. Fotosentezi etkileyen toksinler	12
2. MATERYAL VE YÖNTEM	14
2.1. Materyal	14
2.2. Bitkilerin Yetiştirilmesi	15
2.3. Enzim Ekstraktının Hazırlanması	15
2.4. SOD Aktivitesinin Belirlenmesi	15
2.5. Yaprak Bağlı Nem İçeriği Testi	19
2.6. Protein Analizi	19
3. BULGULAR	19
3.1. Bağlı Nem İçeriği	19
3.2. Protein İçerikleri	21
3.3. SOD Aktiviteleri	24
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	27
5. ÖZET	30
6. SUMMARY	31
7. KAYNAKLAR	32
8. TEŞEKKÜR	38
ÖZGEÇMİŞ	39

ÖZ

Bu araştırmada, tuzluluğa dayanıklı olduğu bilinen iki arpa çeşidi (Kıral –97 ve Karatay – 97) ve duyarlı veya dayanıklılığı bilinmeyen ancak doğal yayılışa sahip bir halofit olan *Hordeum marinum* L.'da Süperoksit dismutaz (SOD; EC 1.15.1.1) aktiviteleri araştırılmıştır.

Araştırmadan elde edilen sonuçlara göre; *Hordeum marinum* L.'da bulunması olası antioksidatif yolda işlevsel olduğu bilinen diğer enzimik ve enzimik olmayan antioksidantların da araştırılmasının gerekli olduğu saptanmıştır. Tuzluluğa dayanıklılıkta, bir kriter olarak SOD aktivitelerinin tek başına kullanılışlığı her üç genotip içinde uygun bulunmamıştır.

Anahtar Kelimeler: Oksidatif stres, *Hordeum marinum* L., süperoksit dismutaz, tuz stresi

ABSTRACT

In this investigation, two cultivated barleys (Kıral –97 and Karatay – 97) which are known as a salt resistant and with *Hordeum marinum* L. that is unknown as resistant or sensitive as a halophyte plant which has a natural spread, are investigated for superoxide dismutase activities. (SOD; EC 1.15.1.1)

According to the obtained results, research is required for researching other enzymic and non-enzymic antioxidants, that is probably present antioxidative ways in *Hordeum marinum* L. Resistance in salinity, SOD activities are not available for only as criteria for every three genotype.

Key words: Oxidative stress, *Hordeum marinum* L., superoxide dismutase, salt stress

ÇİZELGELER

Çizelge No:	Çizelge Adı:	Sayfa No:
Çizelge 3.1.	<i>Hordeum marinum</i> L., Kırıl -97 ve Karatay - 97'in artan tuz konsantrasyonlarına bağlı olarak bağıl nem içerikleri	20
Çizelge 3.2.	Araştırılan arpa (<i>Hordeum spp.</i> L.) çeşitlerinin protein içeriklerinde zamana bağlı olarak artan tuz konsantrasyon – larındaki protein içerikleri (mg protein / g YA)	22
Çizelge 3.3.	Araştırılan arpa (<i>Hordeum spp.</i> L.) çeşitlerinin zamana bağlı olarak, artan tuz konsantrasyonlarında toplam SOD içerikleri (Unit SOD / g YA)	25

ŞEKİLLER

Şekil No:	Şekil Adı:	Sayfa No:
Şekil 1.1	Oksijenin suya indirgenme reaksiyonları	2
Şekil 1.2	Haber –Weiss Reaksiyonu	3
Şekil 2.1	Bitki yetiştirme ortamının genel görünüşü	16
Şekil 2.2	30 günlük <i>Hordeum marinum</i> L. bitkilerinin genel görünüşü	16
Şekil 2.3	30 günlük Kıral – 97 bitkilerinin genel görünüşü	17
Şekil 2.4	Sırasıyla kontrol (0 mM NaCl), 50, 100 ve 150 mM NaCl’de yetiştirilen Kıral – 97 bitkileri (33. gün sonunda)	17
Şekil 2.5	Sırasıyla kontrol (0 mM NaCl), 50, 100 ve 150 mM NaCl’de yetiştirilen Karatay - 97 bitkileri (33. gün sonunda)	18
Şekil 2.6	Sırasıyla kontrol (0 mM NaCl), 50, 100 ve 150 mM NaCl’de yetiştirilen <i>Hordeum marinum</i> L. bitkileri (33. gün sonunda)	18
Şekil 3.1	<i>Hordeum marinum</i> L.’un, tuz stresi boyunca bağıl nem içeriği	20
Şekil 3.2	Kıral - 97’nin, tuz stresi boyunca bağıl nem içeriği	21
Şekil 3.3	Karatay – 97’nin, tuz stresi boyunca bağıl nem içeriği	21
Şekil 3.4	BSA Standart Grafiği	22
Şekil 3.5	<i>Hordeum marinum</i> L.’da NaCl uygulamalarıyla toplam protein miktarında ortaya çıkan değişimler	23
Şekil 3.6	Kıral – 97’de NaCl uygulamalarıyla toplam protein miktarında ortaya çıkan değişimler	24
Şekil 3.7.	Karatay - 97’de NaCl uygulamalarıyla toplam protein miktarında ortaya çıkan değişimler	24
Şekil 3.8	<i>Hordeum marinum</i> L.’da farklı NaCl uygulamalarıyla toplam SOD miktarında ortaya çıkan değişimler	26
Şekil 3.9.	Kıral – 97’de farklı NaCl uygulamalarıyla toplam SOD miktarında ortaya çıkan değişimler	26
Şekil 3.10.	Karatay - 97’de farklı NaCl uygulamalarıyla toplam SOD miktarında ortaya çıkan değişimler	27

1. GİRİŞ

1.1. Oksijenin Aktivasyonu:

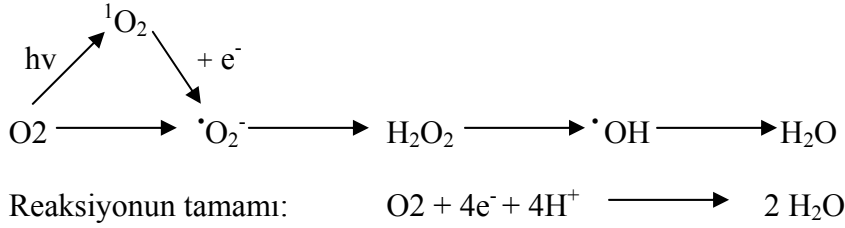
Aerobik yaşam molekülü olan oksijen şüphesiz solunum ve enerji metabolizmaları için temel bir gereksinimdir. Oksijen aynı zamanda birçok zarar verici koşulları ve hastalığı yapma etkisine de sahip olmasıyla, dünyadaki yaşamın temel paradokslarından birisini sunmaktadır. Oksijenin önemi, oksijen moleküllerinin izleri ve bunların bulunuşlarındaki büyük farklılıklar nedeniyle kültür bitkilerinde stresle artan işlevsizlik ve bozukluklardan da anlaşılmaktadır. Bunun nedeni; oksijenin sorumlu olabileceği çok sayıdaki oksijen formlarının ve ara ürünlerinin bulunuşudur.

1.2. Oksijen Radikallerinin Biyolojik Reaksiyonları:

Atmosferik oksijen ve onun durağan seviyesi diğer gaz elementleri arasında farklı yerdedir çünkü o bir radikaldir veya başka bir deyişle çiftleşmemiş iki elektronu vardır. Bu durum oksijeni paramanyetik yapar.

Oksijen aktive edilmedikçe organik moleküllerle reaksiyonlara girme olasılığı azdır. Temel seviyede moleküler oksijen (O_2 , dioksijen) zararsızdır, ancak serbest radikaller ve türevleri düzeyinde öldürücü reaktif uyarmayı ortaya çıkarmaya yeteneklidirler. O_2 'nin kullanımı aşamalı bir biçimde oldukça anlamlı bir şekilde ilerlemektedir. 4 elektronun suya indirgenmesi süresince kısmen indirgenmiş ara formlar oluşmaktadır (Şekil 1.1). İndirgenmiş dioksijenin reaktif türleri süperoksit radikal ($\cdot O_2^-$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikalini ($\cdot OH$) içermektedir. Bunlar ve O_2 'nin fizyolojik olarak enerjice zengin formu, singlet oksijen (1O_2), biyolojik olarak oldukça önemli oksijen türleridir.

Moleküler oksijenin temel seviyeden ilk singlet seviyeye hareketlendirmek için gerekli aktivasyon enerjisi yaklaşık 22 kcal/mol'dür. Yüksek bitkilerde bu enerjinin klorofil gibi bazı transfer molekülleri sayesinde ışık kuantasından sağlanmaktadır. Böyle aktive olmuş oksijen moleküllerinin hepsi tüm organizmalarda reaktif ve sitotoksiktirler. Bu tip reaktif türler, plazmalemma veya hücre içi organellerinde gerekli membran lipidlerinin peroksidasyonuna yol açacak şekilde, doymamış yağ asitleriyle reaksiyona girebilirler. Plazmalemmanın peroksidasyon zararı hücre içeriğinin dışarıya akmasını, hızla kurumasını ve hücre ölümünü yönlendirir (Edreva, 1998).



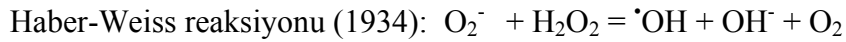
Şekil 1.1. Oksijenin suya indirgenme reaksiyonları (Acar, 1999).

1.2.1. Hidroksil Radikali, Süperoksit Radikali ve Hidrojen Peroksit

1.2.1.1. Hidroksil Radikali:

Köken ve Oluşum:

$\text{}^{\cdot}\text{OH}$, metal katalizleyen Fenton reaksiyonu ve Haber-Weiss reaksiyonu sayesinde oluşmaktadır:



Aktivitesi ve Zararlı Etkileri:

$\text{}^{\cdot}\text{OH}$ çok fazla reaktiftir, çoğu organik bileşiği oksidize eder. Yüksek reaktivitesinin gelişigüzel olmasından dolayı uygun olan ilk substratla tepkimeye girer. Bu nedenle, yüksek bir yıkıcı ve mutajenik potansiyele sahiptir. Hidroksil radikalleri kloroplast membranlarının hemen yakınında oluştuğundan kloroplastlar hidroksil radikallerine özellikle duyarlıdırlar.

Koruyucu Mekanizmalar:

$\text{}^{\cdot}\text{OH}$ 'e karşı savunmada α -tokoferol ve askorbat ile bunun etkisi sınırlı olarak bastırılmaktadır.

1.2.1.2. Süperoksit Radikali ($\text{}^{\cdot}\text{O}_2^-$):

Köken ve Oluşum:

$\text{}^{\cdot}\text{O}_2^-$, flavoprotein dehidrogenazlar tarafından enzimatik olarak oluşturulabilir. Buna ek olarak daha da önemlisi ferrodoksinlerin, hidrokinonların, tiyollerin ve indirgenmiş hemoproteinlerin oto oksidasyonları tarafından enzimatik olmayan yolla da üretilirler.

Fotosistem I'in indirgenme bölgesi üzerinde ferrodoksin ve diğer elektron taşıyıcılar oksijene bir elektron vermek için gerekli negatif elektrokimyasal potansiyele

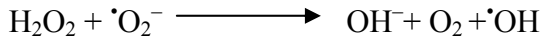
başarılı bir şekilde sahiptirler (Asada ve Takahashi, 1987). Süperoksit üretiminin çoğunluğu ferrodoksin (Furbank ve Badger, 1983) ve Mehler reaksiyonu sayesinde olmaktadır.

Aktivitesi ve Zararlı Etkileri:

$\cdot\text{O}_2^-$, lipid peroksidasyonuna, membran hasarına, hücrel toksisiteye ve DNA'da kırılmalara neden olabilmektedir (Fridovich, 1986). Süperoksit, Haber-Weiss reaksiyonunda hidrojen peroksitle reaksiyona girebilir ve buradan hidroksil radikali üretilir (Şekil 1.2). Süperoksit aynı zamanda, NADPH ve epinefrin oksidasyonunda olduğu gibi katalazın ve glutasyon redüktazın inaktivasyonuna sebep olabilir (Fridovich, 1986). Bunlarla birlikte, biyotik ve abiyotik çevresel stres faktörlerinin çoğu bitkilerde oksidatif hasarlara yol açabilir (Acar, 1999)

Koruyucu Mekanizmalar:

$\cdot\text{O}_2^-$, süperoksit dismutazla (SOD; EC 1.15.1.1) katalizlenen dismutasyon reaksiyonu yoluyla hidrojen peroksitle dönüştürülür.



Şekil 1.2. Haber –Weiss Reaksiyonu (Acar, 1999)

1.2.1.3. Hidrojen Peroksit (H_2O_2):

Köken ve Oluşum:

H_2O_2 , peroksizomlarda glikolatın oksidasyonu boyunca üretilebilir. Daha da önemlisi, süperoksitten süperoksit dismutaz tarafından üretilebilir.

Aktivitesi ve Zararlı Etkileri:

H_2O_2 , aktif oksijen türlerinin en durağan olanıdır. Kuvvetli nükleofilik oksidanttır ancak gerçekte reaktif değildir. S-H bağlarının oksidasyonu sayesinde Calvin döngüsü enzimleri ve diğer enzimlerin inhibisyonundan sorumludur (Kaiser, 1979). Hidrojen peroksit ayrıca Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları yoluyla yıkıcı hidroksil radikale dönüşebilir.

Koruyucu Mekanizmalar:

H_2O_2 , peroksizomlarda katalazla ve kloroplastlarda askorbat peroksidazla (AsPOD) ortamdan temizlenir.

1.3. Aktif Oksijen Üretim Bölgeleri:

Farklı mekanizmalar tarafından üretilen, iki farklı formda aktif oksijen vardır. Oksijenin $\cdot\text{O}_2^-$ 'e, H_2O_2 'e ve $\cdot\text{OH}$ 'ne indirgenmesi, çoğu biyolojik sistemlerde oksijen aktivasyon mekanizmasının temelidir. Bununla beraber, fotosentetik bitkilerde, fotosistemler tarafından singlet oksijen oluşturulması önemlidir. Aktif oksijen, sık sık kompleks kimyasal reaksiyonlara imkan veren metabolizmanın bir bileşiği olarak oluşur. Fakat diğer aktif oksijen türevleri, kimyasal olarak veya çevresel stresin sebep olduğu metabolizmadaki karışıklığın bir sonucu olarak elektron taşıma sistemlerinde ya da enzimlerin fonksiyon kaybı sonucunda oluşur.

1.3.1. Kloroplastlar

Elstner'in 1991'de tanımladığı gibi, kloroplast içinde aktif oksijen üretilen en az 4 bölge vardır.

(1) PSI, kloroplastlarda oksijen aktivasyonunun önemli bir mekanizması olan Mehler reaksiyonuyla oksijeni indirgeyebilir. PSI'nin indirgeme bölgesinin, NADP'nin sınırlı olduğu şartlar altında oksijenin monovalent indirgenmesine önemli ölçüde katkıda bulunduğu düşünülmüştür. Örneğin, eğer Calvin çemberi NADPH'ı, PSI'in sağladığı elektronlar kadar hızlı bir şekilde okside edemezse, bu durum gerçekleşir.

(2) Fotoaktive olmuş klorofil 1, normal olarak, uyarma enerjisini PS reaksiyon merkezlerine transfer eder, fakat Elektron Taşıma Sistemlerinde kullanıldığından yakalanan ışık enerjisinin önlendiği koşullar altında bu enerji oksijeni uyararak, oksijenin triplet formdan singlet forma dönüşmesine neden olur. Bu şartlara örnek olarak; kuraklık nedeniyle stoma kapanması, transport sistemlerinin zararına zarar, belli besinlerin eksikliği veya kirlilik etmenleri ve herbisitler gibi ksenobiyotik kimyasalların varlığı verilebilir.

(3) PS II'nin oksidize olan yüzeyi PS II reaksiyon merkezine sudan 4 tekil elektronun transferini kolaylaştırmakta ve oksijeni triplet veya temel durağan seviyeye dönüştürmektedir. Bu bölgeden moleküler oksijene elektronların geçişimi veya kısmen indirgenmiş oksijen ürünlerinin salıverilmesi, aktive olmuş oksijen üretimine nisbeten küçük bir katkı yapmakla birlikte, belli alkoller PSII tarafından indirgenebilir.

(4) Fotorespirasyon, kloroplastlarda iyi bilinen oksijenasyon yoludur. Rubisco, fosfoglikolat ve fosfogliserat oluşumunda RuBP' nin 2. karbonuna oksijen eklenmesini katalizler. Bu, kloroplastlarda aktif oksijen oluşturmadığı halde, peroksizomlarda glikolat metabolizmasını devamında aktif oksijen oluşturur.

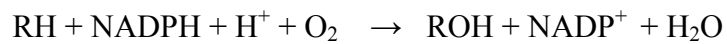
1.3.2. Mitokondriler

Oksijenin büyük bölümü mitokondriyal elektron taşıma sistemindeki sitokrom oksidaz tarafından tüketilir ve oksijene ardışık olarak 4 elektron transfer edilir, sonuçta su meydana gelir. Bitki mitokondrisinde alternatif oksidazda, ilave bir oksijen indirgeme bölgesi vardır, siyanüre direnci sayesinde sitokrom oksidazdan ayrılır. Bununla beraber, bu bölgelerden hiçbiri süperoksitin önemli miktarlarını üretmez. (Rich ve Bonner,1978) Aynı zamanda, NADH varlığında mitokondride üretilen H_2O_2 ve $\bullet O_2^-$ izole edilmiştir. (Loschen ve ark.,1973;1974) Antimisin A, ubikinon oksijen indirgenmesini arttırdıktan sonra elektron akışını durdurur. Ubikinon A'daki zincirin sitokrom b bölgesi oksijenin indirgenmesini tercih eden ubikinon indirgenmesi de olasılıkla diğer koşullarla artmaktadır (Rich ve Bonner,1978). Çeşitli Fe-S Proteinleri ve NADH dehidrogenazın da süperoksit ve hidrojen peroksit üretilen muhtemel bölgelere dahil olduğu düşünülmektedir. (Turrens ve ark.,1982).

1.3.3. Endoplazmik Retikulum

Granülsüz endoplazmik retikulumda; oksidasyon, hidrosilasyon, dealkilasyon, deaminasyon, dehalojenizasyon ve desaturasyonları içeren çeşitli oksidatif prosesler meydana gelmektedir. İşlevi karmaşıklaşmış oksijenazlar; bir elektron verici olarak NAD(P)H kullanarak bir organik substrata bir oksijen atomu ekleyen, bir **heme** kısmı içerir.

Sitokrom P_{450} tarafından katalizlenen genel reaksiyon şöyledir:



Bitkilerde en iyi karakterize edilmiş sitokrom P_{450} , flavonoid ve lignin biyosentezlerinde işlevsel olan sinnamat-4-hidroksilaz'dır. Fakat işlevi karmaşıklaşmış diğer oksijenazlar, gibberellin ve sterol biyosentezleri içeren diğer biyokimyasal yollarda işlevseldirler. Bu sistemler tarafından oksijenin aktivasyonu, böyle kompleks metabolitlerin sentezinde, oksijen ekleme reaksiyonlarına gerekli bir şarttır. Süperoksit, sitokrom P_{450} içeren, mikrozomal NAD(P)H'a bağlı elektron taşınımıyla üretilir (Winston ve Cederbaum, 1983).

Substratın (RH) univalent indirgenmesi ve $P_{450} - RHOO$ kompleksi oluşturmak için triplet oksijenin ilavesinden sonra kompleks $P_{450} - RH$ 'a ayrışabilir ve süperoksit oluşur.

Sitokrom P₄₅₀ ilk olarak organik substrat RH ile reaksiyona girer. Kompleks, eşleşmemiş bir elektrona sahip her bir triplet oksijenle kendiliğinden reaksiyona girebilen bir ara radikal oluşturmak için, bir flavoprotein tarafından indirgenir. Bu oksijenlenmiş kompleks sitokrom b tarafından indirgenebilir veya bazen bu kompleks süperoksit oluşturarak ayrışabilir.

1.3.4. Mikrobadiler

Peroksizomlar ve glioksizomlar tek zarlı organellerdir. Bunlar yağ asitlerinin β-oksidasyonu ve glikolik asit döngüsünde görevli olan glikolat oksidaz, katalaz ve çeşitli peroksidazlar gibi enzimleri içerirler. Glikolat oksidaz glikolattan oksijene iki elektron taşınmasında H₂O₂ üretir. (Lindquist ve ark.,1991). Ksantin oksidaz, urat oksidaz ve NADH oksidaz, kendi substratlarının oksidasyonunun bir sonucu olarak süperoksit oluşturur. *In vitro* da ksantin oksidaz reaksiyonu, ksantinin ürik aside dönmesi sırasında bir mol süperoksit üreterek, süperoksit kaynağı olarak sık sık kullanılmıştır (Fridovich,1970).

1.3.5. Plazma Membranları

Bir süperoksit oluşturan NAD(P)H oksidaz aktivitesi plazmalemmada zenginleştirilmiş fraksiyonlarda açıkça gösterilmiştir (Vianello ve Macri,1991). Bu flavoproteinler belli kinonlar veya azotlu bileşiklerin redoks döngüsü vasıtasıyla süperoksit üretebilir. Kökte, NAD(P)H oksidaz Fe⁺³ 'ü Fe⁺² 'ye dönüştürerek taşınabilen bir forma indirger. Bu kök enziminin fonksiyon kaybı, süperoksit üretir (Çakmak ve Marschner,1988). Oksinle aktive olmuş bir NADH oksidaz ile hücre duvarı asidifikasyonu ve oksinle uyarılmış hücre uzaması arasında ilişki kurulmuştur (Morré ve ark.,1988).

Bitkilerdeki NAD(P)H oksidaz ile hayvanlardakinin benzer bir fonksiyonu vardır. Lökositler dış zar üzerinde, yabancı bir ajana yanıtta aktive olan, potansiyel patojen saldırılarında oksidatif reaksiyonları uyaran süperoksit üreten NADH oksidaz ihtiva ederler (Hohn ve Lehere,1975). Bitkilerde, fungal elisitörler bazı patojenik funguslara yüksek duyarlılık yanıtıyla bağlantılı benzer bir süperoksit oluşumuna neden olurlar (Doke ve Ohashi,1988;Doke ve ark.,1991). Yaralanma, sıcaklık şoku ve ksenobiyotikler geçici olarak bu süperoksit oluşturma reaksiyonunu aktive etmektedir. Sonuç olarak süperoksit oluşturan reaksiyonların, bitki hücrelerinde biyolojik,fiziksel veya kimyasal strese savunma yanıtlarına bir sinyal olarak hizmet edebileceği önerilmiştir.

1.3.6. Hücre Duvarları

Tamamen açık olmamasına rağmen, hücre duvarları metabolizmanın ve aynı zamanda oksijen aktivasyonunun aktif bölgeleridir. Bu reaksiyonların bazıları, yukarıda tanımlandığı gibi patojenlere karşı savunma reaksiyonlarına dahil edilebilir. Diğerleri ksenobiyotik kimyasalların bölmelere ayrılması ve parçalanmasına dahil olabilir. Bununla beraber, yaygın reaksiyonların çoğu, biyosentetiktir. Örneğin, ligninin fenilpropanoid öncülleri, H₂O₂ ile ilgili reaksiyonlar sayesinde çapraz bağlanır, alt üniteler lignine rastgele bağlanır (Gross,1980). NADH, bir hücre duvarı malat dehidrogenazı tarafından meydana getirilir ve daha sonra H₂O₂ oluşturmak için, olasılıkla plazmalemma üzerindeki NADH oksidaz tarafından kullanılır (Gross ve ark.,1977) (Vianello ve Macri,1991). Diamin oksidazlar, kendiliğinden oksidize olacak bir kinonu indirgemek için diaminler veya poliaminler (putresin, spermidin, kadaverin,vb.) kullanarak da hücre duvarında aktif oksijen üretimine dahil olurlar. (Vianello ve Macri,1991; Elstner,1991)

1.4. Aktif Oksijen Oluşumu

Zararlı oksijen türevleri bir dizi yolla oluşabilirler, ancak fotooksidatif strese bağlı olarak aktif oksijen üretimi, fotosentetik elektron taşıma sistemine fazla enerji girişi yoluyla gerçekleşmektedir. Kloroplastların ışık sistemi fazla ışık enerjisi yakaladığında, buradan enerjinin akışında dört yol vardır. Bu, termal dağıtma ve floresens sayesinde serbest bırakılabilir. Engellenmemiş maksimum çalışma olursa bu enerji elektron taşıma zinciri tarafından absorbe edilir. Sonuçta, aktif oksijen türlerinin oluşumu fazla enerjiyi azaltabilecektir (Salin, 1988). Singlet oksijen, elektron taşıma zincirindeki taşıyıcılardan elektron alımı ile süperoksit oluşurken klorofilden fazla enerjinin absorpsiyonuyla oluşturulur. Hidrojen peroksit, süperoksit dismütaz tarafından antioksidant sistemin ilk basamağında oluşmaktadır ve hidroksil radikali Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonlarındaki hidrojen peroksitten oluşmaktadır.

Foto-oksidatif zarara bakıldığında, aktif oksijen türlerinin çok çeşitli zarar verici etkilere sahip oldukları görülmektedir. Hidroksil radikali ve singlet oksijen oldukça reaktiftirler ve çoğu organik bileşiği oksidize edebilirler. Hidrojen peroksitin zararlı etkileri belli enzimler ve süperoksitle birlikte engellenir ve buradan hidroksil radikali oluşabilir. Toplam sonuç, kloroplastların parçalanması ve biyosentezlerinin engellenmesidir. Bu etkiler çevresel stresler tarafından oluşturulabilmektedir.

Fotosentezdeki rollerine bakıldığında, hareketlendirilmiş bir elektronun enerjisi oksijene verildiğinde oluşan aktif oksijen türlerinin, enerji seviyesini düşürmede ve elektron taşıma sistemini fotoinhibisyonla sonuçlanacak yüksek bir indirgemeden korumada rol oynadığı görülmektedir (Foyer ve ark., 1994). Bu nedenle, eğer oksijen ara ürünleri antioksidant sistemini etkin şekilde veriyorsa fazla enerjinin dağıtılmasının önemli bir bileşeni olarak görülebilir.

1.5. Savunma Mekanizmaları (Edreva, 1998; Acar; 2001)

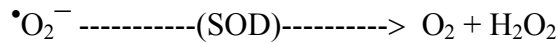
Aktif oksijen türlerinin regülasyonu genel olarak metabolitlerin iki grubu ile gerçekleştirilmektedir. Bunlar; antioksidantlar ve koruyucu enzimlerdir.

1.5.1. Enzimik Yollar

Aktif oksijenin düzenlenmesine dahil olan enzimler koruyucu enzimler olarak adlandırılmaktadır. Bitki hücresinde temel koruyucu enzimler süperoksit dismutaz, peroksidaz, katalaz, askorbat peroksidaz'dır.

1.5.1.1. Süperoksit Dismütaz (SOD; E.C.1.15.1.1)

SOD, bir proteindir. Prostetik gruplar olarak transit metalleri içerir, bunlar çeşitli değerlikli metallerdir. Metal iyonlarına göre 3 çeşit SOD görülmektedir. Cu/Zn SOD, Mn/SOD ve Fe SOD. Cu/Zn SOD siyanüre duyarlıdır, SOD bir serbest radikal olan süperoksit anyonunun dismutasyonu olarak adlandırılan reaksiyonu katalizler:



Bu reaksiyon sayesinde SOD, hücrenin serbest radikal havuzunun düzenlenmesine dahil olmaktadır. Fe SOD'lar kloroplastlarda, Mn SOD'lar mitokondrielerde ve peroksisomlarda, Cu-Zn SOD'lar ise kloroplast, sitosol ve olasılıkla ekstraselüler yüzeylerde lokalize olmuşlardır. Reaksiyonun aktif oksijen ürünü olan H₂O₂, PO ve CAT tarafından metabolize edilir.

1.5.1.2. Peroksidaz (PO; E.C.1.11.1.7)

Bir heme (Fe-porfirin) grubu içeren glikoproteindir. PO'nun ilk hareketi bir elektron yakalayıcı olarak H₂O₂ kullanarak substratı oksidize etmesidir:

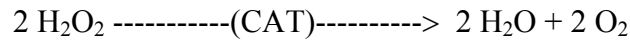


PO'nun heme kısmındaki Fe iyonu katalitik hareket için yanıt vericidir. Bu reaksiyon;

- a) hücre duvarında lignin ve suberin biyosentezleriyle sonuçlanan serbest fenollerin oksidatif polimerizasyonunu sağlar.
- b) hücre duvarı bileşenlerine, fenollerin oksidatif polimerizasyonla bağlanmasını sağlar. Örneğin; hücre duvarına çapraz bağlanma ve sağlamlıkla sonuçlanan fenoller (ferulik asit) ve hücre duvarındaki tirozin atıkların (uzantılar) hücre duvarı polisakkarit zincirlerine bağlanması.

1.5.1.3.Katalaz (CAT; E.C.1.11.1.6)

CAT, heme (Fe-porfirin) grubu içeren şu reaksiyonu katalizleyen enzimdir:



Bunun sonucunda CAT aynı zamanda, H_2O_2 seviyesinin kontrolünü sağlar.

1.5.1.4. Glutasyon Redüktaz (GR; E.C.1.6.4.2)

GR, oksidize glutasyonun redüksiyonunu katalizler:



İndirgenmiş glutasyonun seviyesi bu yolla korunur ve hücrenin antioksidant seviyesi düzenlenir.

Stres koşullarında PO, CAT, SOD ve GR'nin koruyucu rolü transgenik bitkiler kullanılarak bu enzimlerin üst seviyede veya alt seviyedeki ifadeleri gen mühendisliği yöntemleri tarafından kanıtlanmıştır.

1.5.2. Antioksidantlar

Antioksidantlar aktif oksijenin birikimini düşük redoks potansiyelle denetleyen molekülleri kapsamaktadır. Bunlar; fenoller, flavonoidler, tokoferoller, karotenoidler, poliaminler vb.'dir. Bundan başka; bazı fenollerin (hidroksisinnamik asitler ve flavonoidler) aktif oksijene yanıtta serbest radikallerin etkili çöpçüleri olarak hareket ettikleri rapor edilmiştir. Mevcut güçlü hücre antioksidantları askorbik asit (Vitamin C) ve tiyollerdir (SH grubu içeren bileşikler).

1.6. Oksidatif Stres:

Bitki membranlarındaki reaktif oksijen türleri (ROT) veya lipid peroksidasyon reaksiyonları, seçici bir şekilde doymamış yağ asitlerini bozabilir ve aldehitleri, hidrokarbonları ve çapraz bağlanmış ürünleri biriktirebilir. Bitki membranları üzerine

çevresel stresin etkileri incelendiğinde, birçok çalışma malondialdehit (MDA) gibi lipid peroksidasyon ürünlerini ölçerek, serbest oksijen radikallerinin böyle stres yanıtlarına dahil olduğu sonucuna varmıştır. Bu reaksiyonların substratlarında, membran yağ asitleri incelenmiştir. Seçici olmayan doymamış yağ asitleri çok sık olarak gözlemlenmiştir. Stres etkinliklerinde serbest oksijen radikallerinin gerekli olmadığı rapor edilmiştir. Bu zıtlık, tohum yaşlanması gibi proseslerde serbest oksijen radikallerinin birçok kural dışı ilişkisinin nedenidir (Wilson ve Mc Donald,1986).

Proteinler üzerine oksidatif saldırı, bölgeye özel amino asit modifikasyonları, peptid zincirlerinin parçalanması, çapraz bağlanmış reaksiyon ürünlerinin bir araya toplanması, elektriksel yüklerin değişmesi ve proteolizise duyarlılığın artması ile sonuçlanmaktadır. Bir peptidteki amino asitler, onların saldırıya duyarlılığını ve aktive olmuş oksijenin farklı formları ile onların potansiyel reaktivitesine neden olur. Primer, sekonder ve tersiyer protein yapıları belli amino asitlerin göreceli duyarlılıklarını değiştirmektedir.

Bir protein oksidize olduğu zaman bir çok aminoasit, spesifik geri dönüşsüz modifikasyonlara uğrar. Örneğin, triptofan bitirozin ürünlerini oluşturmada çapraz bağlanarak oluşturur (Davies, 1987). Histidin, lizin, prolin, arginin ve serin, oksidasyonda karbonil grupları oluşturur (Stadtman, 1986). Proteinlerin oksidatif bozunumu, redoks döngüsünün yeteneğindeki bir durum olarak demir gibi metal kofaktörlerin varlığında artabilir. Böyle durumlarda metal proteinin bağlanma bölgesi üzerinde divalent bir katyona bağlanır. Metal daha sonra bir hidroksil radikali oluşturan Fenton reaksiyonunda hidrojen peroksit ile reaksiyona girer. Buradaki hidroksil radikali proteinin katyon bağlanma bölgesinde veya yakınında bir amino asit kalıntısını hızla oksitleyebilmektedir (Stadtman, 1986).

İyonize radyasyon gibi serbest oksijen radikalleri oluşturan ajanlar ve aktif oksijen, DNA'da delesyonlara, mutasyonlara ve diğer letal genetik etkiler şeklinde ortaya çıkan bir çok lezyona neden olmaktadır. DNA'ya hasarın karakterizasyonu, baz degradasyonu, tek zincir kıvrılması ve proteinlere çapraz bağlanmaya neden olan oksidasyona duyarlı şeker ve baz kısımlarının her ikisinde de gösterilmiştir (Imlay ve Linn, 1986).

DNA'nın proteinlere çapraz bağlanması, hidroksil radikalının DNA veya ilişkili proteinler üzerine saldırmasının diğer bir sonucudur (Oleinick ve ark.,1986). İyonize radyasyonla muamele veya diğer hidroksil radikali oluşturan ajanlar timin-sistein gibi,

DNA ve protein arasında kovalent sızıntılara sebep olur. Bu çapraz bağlar bulunduğu zaman, çeşitli ekstraksiyon metodlarıyla DNA'dan protein ayrılması gerçekleşmez. DNA-protein çapraz bağlarının önem sırası, tek zincir kırıklarından daha az olmasına rağmen, onlar kendiliğinden onarılamaz ve replikasyon yada transkripsiyon tamirden önce meydana gelirse letal olabilir. DNA, bir hücrenin serbest radikal saldırısına tolerans yeteneği bakımından açıkça zayıf bir halkadır. Diğer makromoleküllere kıyasla DNA'da hasar daha az tolere edilebilir.

1.7 Çevresel Stresler ve Antioksidant Sistemler:

Toksik oksijen türlerinin oluşumu bitkiler çevresel stres altında olduklarında artar (Elstner ve ark., 1988; Foyer ve Harbinson; 1994). Çevresel faktörler tarafından arttırılabilen fotooksidatif stresler bunlarda üç tipi ayırd etmemizi sağlar. Bu faktörler doğrudan (1. tip) ve dolaylı (2. tip) olabilmektedir. Serbest radikal üretimi veya antioksidant savunma mekanizmalarını engelleyebilme doğrudan yollar olurken, aktif oksijen seviyelerinde bir artış meydana gelmesi ise dolaylı bir yoldur. Üçüncü tip ise çevresel stresler biyosentetik yollarda karışıklıklara neden olurlar, bu durum kloroplastların fazla enerjiyi harcama yeteneğini etkiler ve böylece aktif oksijen oluşumuna neden olur (Salin, 1988). Çevresel streslerin bazı örnekleri şunlardır:

1.7.1. Kirlilik:

1.7.1.1.Ozon:

Azot oksitlerin yıkımından kökenlenen kirlenmenin büyük bir kısmını Ozon oluşturmaktadır. Güçlü bir oksitleme potansiyeline sahip olduğundan yüksek bir fototoksisiteye sahiptir ve bu özelliği nedeniyle serbest radikal zincir reaksiyonuna sebep olur (Mehlhorn ve ark.,1990). Ozon ayrıca PSII D1 proteinini yıkıma uğrattır (Lutz ve ark., 1992) ve Rubisco'nun aktivitesini ve miktarını azaltır (Landry ve Pell, 1993). Rubisco ve PSII D1 proteini üzerine ozonun bu etkileri elektron taşınımı sayesinde fazla enerjinin dağıtımını engellemeyle ve buna ek olarak aktif oksijen türlerinin oluşumuyla sonuçlanmaktadır.

1.7.1.2. Kükürt dioksit:

Kükürt dioksit kloroplastların asidifikasyonuna sebep olur. Bu kirletici, oksijen radikali üretimine enerji akışı olmasıyla, SH içeren ve ışıkta aktive olan kloroplast enzimlerini inaktive eder (Shimizaki ve Suguhara, 1980; Tanaka ve ark., 1982; Covello

ve ark., 1989). Eğer ışık varlığında sülfıt sülfata dönerse süperoksit oluşturulur (Asada, 1980).

1.7.2. Herbisitler

Paraquat gibi bipyridium herbisitler ışık varlığında doğrudan oksijen radikallerini oluştururlar, özellikle PSI'de süperoksit oluştururlar.

Diuron ve Norflurazon ise sırasıyla elektron taşınımını ve karotenoid biyosentezini engellerler. Normal şartlardaki singlet oksijen miktarından ileri gelen etkileri bastırma olası iken böyle herbisitlerin bulunuşu singlet oksijenin büyük miktarlarda üretimine dolaylı olarak sebep olur ve singlet oksijen seviyelerinin artması ile sonuçlanır (Salin,1988).

1.7.3. Metaller:

Bakır ve kadmiyum gibi metal iyonlar oksidatif strese neden olabilir. Bakır iyonları CAT seviyelerinde azalmaya neden olmaktadır (Streb ve ark., 1993) ve bunun sonucunda hidrojen peroksit artar. Metaller ayrıca çok fazla yıkıcı etkiye sahip hidroksil radikalini oluşturan fenton reaksiyonunu katalizler (Eltner ve ark., 1988).

1.7.4. Fotosentezi etkileyen toksinler:

Bu toksinler bitkileri ışığa daha duyarlı yaparlar ve böylece bitkilerde fotooksidatif stresi harekete geçirirler. Buna örnek olarak bir fungal toksin olan cercosporinin etkisi gösterilebilir. Cercosporin; lipid peroksidasyona ve membran yapısının değişmesine neden olan singlet oksijen üretimini arttırır ve en sonunda iyon sızıntısı ortaya çıkar (Daub, 1982; Daub ve Briggs, 1983).

Genel olarak çevresel stresler antioksidant yolunun aktivitesindeki bir artış ile desteklenir. Fotooksidatif stres SOD, GR, AsPOD (Askorbat peroksidaz) aktivitelerini azaltır veya arttırır, Glutasyon, Askorbat ve α -tokoferol seviyelerinde sadece artışa neden olur. Stres hormonu olan etilen SOD ve AsPOD aktivitelerini arttırır (Mehlhorn, 1990). Stres yanıtlarının yoğunluğu; koruma için stresle artan hücresel değişimlerin genel bir yol olabileceğine işaret etmektedir. Antioksidant yolların aktivitesindeki artışın sadece enzim miktarındaki artışlarla ilişkili olmadığı, aynı zamanda enzimlerin duyarlılığında ki artışlarla da ilişkili olduğu bulunmuştur. Stres koşulları farklı substratlara duyarlı farklı izoformların üretimine neden olur (Matters ve Scandalios 1986; Scandalios 1993; Durumm-Herrel ve ark.,1989;Edwards ve ark.,1994). SOD 6 , CAT 3, AsPOD 3 ve GR ise 6 izozime sahiptir. Farklı duyarlılıklara sahip farklı

izoformların seviyelerinin uyumlarının düzenlenmesi antioksidant savunma sisteminin hareketleri için çok önemli bir strateji olabilir.

ROT, aerobik organizmaları buraya kadar bahsedilen oksidatif zarara karşı fizyolojik mücadeleye zorlamaktadır. Tüm bu olayların meydana getirdiği karışıklık ve beraberindeki zararlı etkileri “**Oksidatif Stres**” olarak tanımlanmaktadır (Scandalios, 1993; Bowler ve ark., 1992). Fotosentez süresince oksijen üreten ve solunumda bunu kullanan, daima değişken çevrelerde sabit bir yaşam şekline sahip bitkiler için oksidatif stresin etkileri daha büyük olmaktadır (Acar, 1999). Oksidatif stres, bitkilerde özellikle kloroplastlarda ortaya çıkmaktadır (Bowler ve ark., 1992).

ROT, stresli ve stressiz hücrelerin her ikisinde de oluşmaktadır. Bitkiler, ROT'lerine karşı çok iyi gelişmiş bir savunma sistemine sahiptirler. Bu sistem ROT'ların sınırlandırılması ve oluşumunu içine aldığı kadar bunların ortadan kaldırılmasını da başlatmaktadır. Bununla birlikte, stres koşullarında ROT oluşumunda artış ortaya çıktığında savunma sistemi bunları ortadan kaldırabilir. Bitkiler ROT'taki bir artışa, savunma sistemindeki enzimatik veya non-enzimatik antioksidant yolları artırma ile bunları ortadan kaldırma şeklinde yanıt vermektedirler. Ancak böyle yolların mekanizmalarındaki belli başlı yollar çok iyi anlaşılammıştır. (Alscher ve ark., 2002).

Bir hücre içinde, SOD'lar ROT'a karşı savunmanın ilk hattını oluşturmaktadırlar. O_2^- , bir elektron taşıma zincirinin bulunduğu herhangi bir yerde üretilmektedir ve bundan dolayı O_2 aktivasyonu, içinde mitokondriler, kloroplastlar, mikrozoimler, glioksizimler, peroksizimler, apoplast ve sitosolün bulunduğu hücrenin farklı bölümlerinde görülebilmektedir (Alscher ve ark., 2002).

Bugün dünyadaki ekili arazilerin yaklaşık % 20'si ve sulanan tüm arazilerin yaklaşık % 50'si tuzluluktan etkilenmektedir. Yüksek tuz konsantrasyonları bitkilerde iyon dengesizliğine ve hiperozmotik strese neden olmaktadır. Bu ilk etkilerin devamında, ikincil stres olarak sıklıkla oksidatif zarar olur (Zhu, 2001).

Kültür domatesi *Lycopersicon esculentum* Mill cv. M82 (Lem) ve bunun yabani tipi olan nispeten tuza toleranslı *L. pennellii* (Cor.) D'Arcy (Lpa) 100 mM'lık tuz stresine maruz bırakıldıklarında; Lem'e zıt olarak Lpa'da SOD ve CAT aktivitelerinin artış gösterdikleri rapor edilmiştir (Shalata ve ark., 2001).

Yüksek tuz stresi, su potansiyelindeki ve iyon dağılımındaki homeostaziye engel olur. İyon ve su dengesindeki şiddetli değişiklikler moleküler zarara, büyümenin durmasına ve hatta ölüme neden olabilmektedir. Tuz toleransının başarılması için ilk

olarak zarar önlenmeli veya hafifletilmeli, ikinci olarak homeostatik şartlar yeni stresli şartlarda tekrar düzenlenmeli, üçüncü olarak her ne kadar azalmış hızda olsa da büyüme devam ettirilmelidir. Tuzluluk riski taşıyan bölgelerde tahılların büyümesi için artan tuz toleransına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu ise tuz toleransının yeni genetik kaynaklarına gereksinim göstermektedir (Zhu, 2001; Munns ve ark., 2002).

Özellikle bitkilerin oksidatif strese daha fazla maruz kaldıkları bir gerçektir. Bu durum onların hareketsiz olmalarından ve üretici özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Üretici özelliklerini sağlayan fotosentez yollarında klorofilin durumu çok önem taşımaktadır. Tüm organizmalar arasında sadece bitkiler en fazla hücresel O₂ konsantrasyonuna sahiptirler. Yaprak hücreleri 250 µM O₂ konsantrasyonuna sahipken bu oran memeli mitokondrilerinde 0,1 µM'dır (Scandalios, 1993). Hareketsiz olmaları ise bitkilerin çevresel değişimlere tepkide biyokimyasal yollar üzerinde değişikliğe gitmelerinde özellikle rol oynayan faktör olarak düşünülmelidir. Bunun içindir ki, oksidatif stres kapsamına dahil olabilen tuz, kuraklık, iyon noksanlığı vb. çevresel stresler bitkilerin aerobik yolları üzerine etki gösterebilmektedir. Bitkilerde bu streslere yanıtta enzimik ve enzimik olmayan yanıtların olması, onların böyle streslere toleranslı veya duyarlı davranmalarına neden olmaktadır. Bununla birlikte onların toleranslı veya duyarlı oluşları da bizlere onların diğer genetik ve fizyolojik olaylarında rehberlik etmektedir. Bir gen kaynağı olarak özellikle doğal genotipler, aerobik yaşamın bu paradoksuna dirençli genotiplerin geliştirilmesinde kullanılan ana materyallerdir.

Araştırmada tuz stresine duyarlılığı veya dayanıklılığı bilinmeyen ve halofit bir tür olan *Hordeum marinum* L. çalışılmıştır. Bugüne değin, *Hordeum marinum* L.'un SOD içeriği çalışılmamıştır. Bu kapsamda, tuzlulukla mücadele edebilen yeni bir gen kaynağı olma olasılığı, SOD aktivitesi temelinde belirlenmiştir.

2. MATERYAL VE YÖNTEM:

2.1. Materyal:

Tuzluluğa dayanıklılıkları bilinen iki arpa türü (Kıral – 97, Karatay - 97) Bahri Dağdaş MİKHAM' dan elde edilmiştir. *Hordeum marinum* L. ise, Ağustos 2003'te doğal yayılış gösterdiği Selçuk (İzmir)'dan toplanmıştır.

2.2. Bitkilerin Yetiştirilmesi:

Tohumlar % 5'lik sodyum hipoklorit ile 20 dk. yüzey sterilizasyonunun ardından perlit içeren 180 x 160 mm.'lik plastik saksılara ekilmişler ve kısmen kontrollü koşullardaki (16 / 8 saat ışık / karanlık, 24 ± 8 °C sıcaklık, % 70 ± 10 nem) yetiştirilmişlerdir.

Bitkiler 21. güne kadar, Hoagland besin çözeltisi (% 100) (Arnon ve Hoagland, 1940'a göre, Steward 1963) kullanılarak üç günde bir defa sulanmışlardır. 21. günden itibaren bitkilerin kontrol grupları ayrılarak, diğerlerine 12 gün boyunca yine üç günde bir olmak üzere sırasıyla 50 mM, 100 mM ve 150 mM NaCl konsantrasyonları uygulanmıştır (Şekil 2.1., 2.2., 2.3, 2.4, 2.5, 2.6).

2.3. Enzim Ekstraktının Hazırlanması:

0,5 – 1,0 gr arasında değişen taze yaprak materyali 0,1 M EDTA Na₂ içeren 3 ml sodyum fosfat tamponunda (pH; 7,8) homojenize edilmişlerdir. Homojenatlar, 4 °C'de, 13.000 rpm'de 20 dk. santrifüjlenmiş ve buradan elde edilen süpernatantlar enzim ve protein analizleri için kullanılmışlardır.

2.4. SOD Aktivitesinin Belirlenmesi:

SOD aktivitesinin belirlenmesinde; 50 mM sodyum fosfat tamponu, 33 µm Nitroblue tetrazolium, 10 mM L – metiyonin, 0,66 mM EDTA Na₂ ve 0,0033 mM Riboflavin, farklı hacimlerdeki supernatantlarla 10 x 100 mm.'lik cam tüplerde hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımları oda sıcaklığında $300 \mu\text{mol sec}^{-1}$ ışık yoğunluğunda 10 dk. ışıklandırılmıştır. Ölçümler 560 nm'de Shimadzu UV 1600 marka spektrofotometrede gerçekleştirilmiştir.

Kontrol tüpündeki (0 µm supernatant) indirgenmesi % 100 kabul edilerek, diğer tüplerdeki indirgenmeler oransal hesaplama ile saptanmıştır. Ortaya çıkan değer, % 100'den çıkarılarak sonuç farklı hacimlerden elde edilen diğer sonuçlarla elde edilmiş eğriden hesaplanır. 1 birim SOD aktivitesi, 560 nm'de NBT'nin % 50 indirgenmesine eşit olacak şekilde aşağıdaki formüle uygulanarak belirlenmiştir (Giannopolities ve Ries, 1977, Beauchamp ve Fridovich, 1971).

$$\% \text{ Inhibisyon} = (\text{ABS } 2 - \text{ABS } 1) / (\text{ABS } 1 \times 100)$$

ABS 2: Enzim içermeyen reaksiyonun absorbansı (kör)

ABS 1: Enzim içeren reaksiyonun (50, 100,150,200 µl supernatant) absorbansı



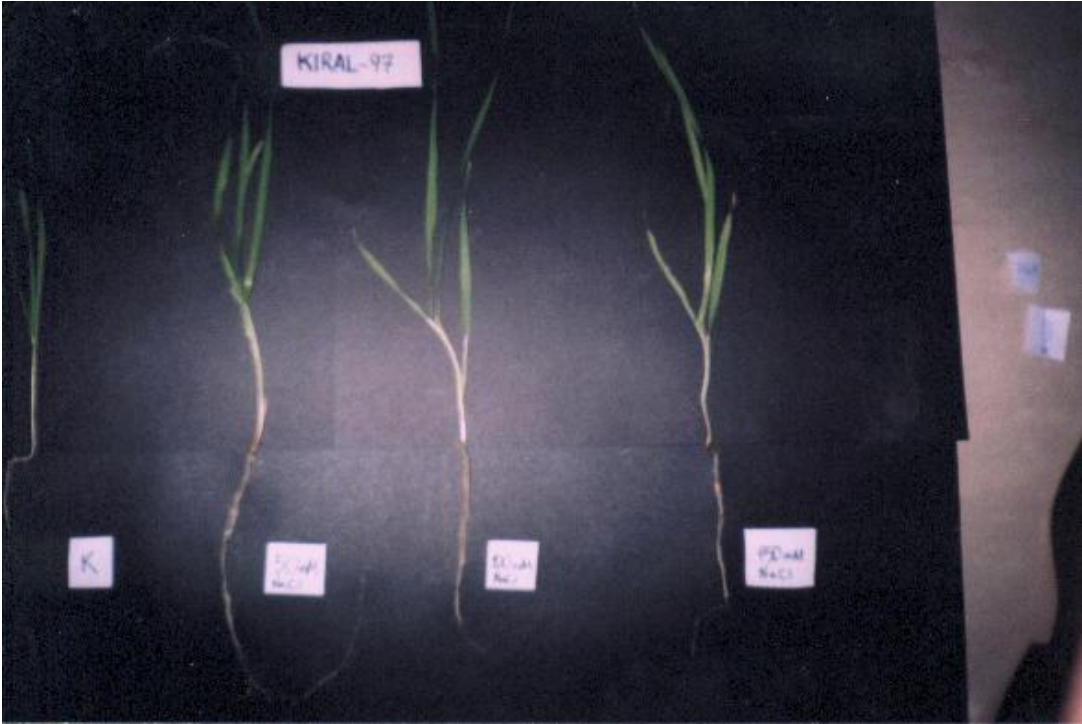
Şekil 2.1. Yetiştirme ortamının genel görünüşü



Şekil 2.2. 30 günlük *Hordeum marinum* L. bitkilerinin genel görünüşü



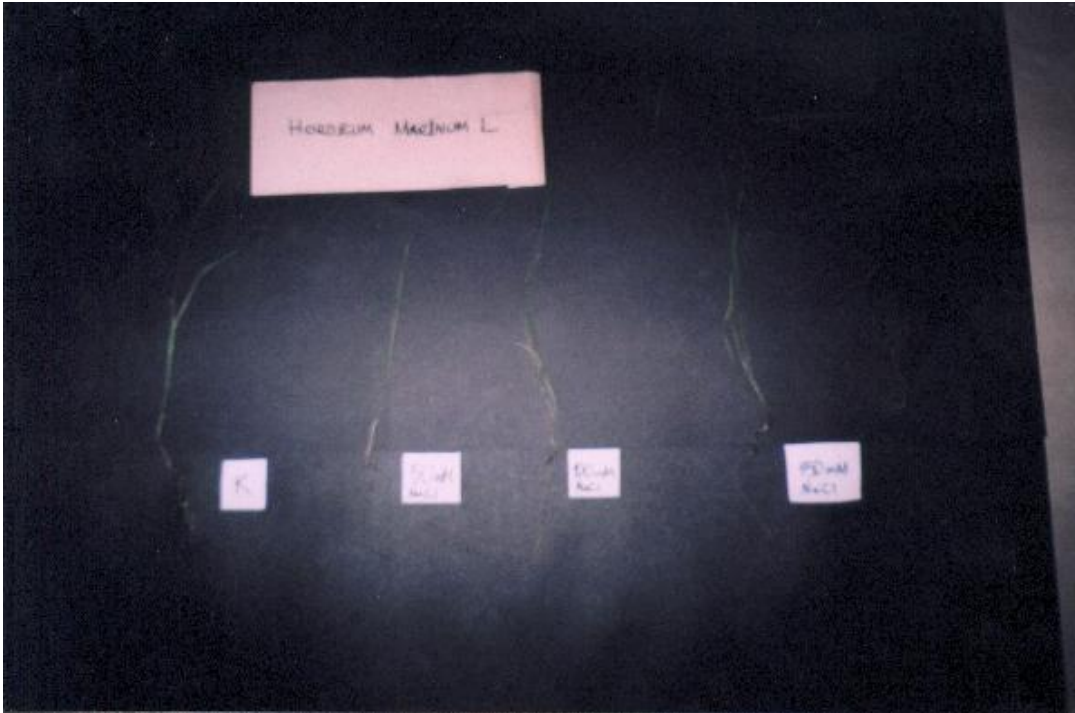
Şekil 2.3. 30 günlük Kıral – 97 bitkilerinin genel görünüşü



Şekil 2.4. Sırasıyla kontrol (0 mM NaCl), 50, 100 ve 150 mM NaCl’de yetiştirilen Kıral – 97 bitkileri (33. gün sonunda)



Şekil 2.5. Sırasıyla kontrol (0 mM NaCl), 50, 100 ve 150 mM NaCl'de yetiştirilen Karatay - 97 bitkileri (33. gün sonunda)



Şekil 2.6. Sırasıyla kontrol (0 mM NaCl), 50, 100 ve 150 mM NaCl'de yetiştirilen *Hordeum maritimum* L. bitkileri (33. gün sonunda)

2.5. Yaprak Bağlı Nem İçeriği Testi:

Test için yaprakların orta kısmındaki 1/3'lik bölümü kesilerek yaş ağırlıkları (YA) tartılmış, daha sonra filtre kağıtları arasına yerleştirilerek 4 saat boyunca saf suda şişmeye bırakılmışlardır. Süre sonunda turgida ağırlıkları (TA) ölçülmüştür. Örnekler bundan sonra 70 °C'deki etüvde 24 saat kurumaya bırakılmış ve kuru ağırlıkları (KA) belirlenmiştir. Ölçüm sonuçları aşağıdaki formüle uygulanarak yaprak bağlı nem içerikleri (% BNI) hesaplanmıştır (Smart ve Bingham, 1974).

$$\% BNI = ((YA - KA) / (TA - KA) \times 100)$$

2.6. Protein Analizi:

Protein içerikleri Bradford (1974)'a göre çalışılmıştır. Standart olarak Bovine Serum Albumin (BSA) kullanılmış, BSA standardı 0,01 – 0,1 µg/ml aralığında hazırlanmıştır. Protein analiz belirteci için 100 mg Coomassie Brilliant Blue 50 ml % 95'lik etil alkolde çözdürülmüştür. Bu karışımın üzerine 100 ml % 85'lik orto – fosforik asit ilave edilerek karışım saf su ile 600 ml'ye tamamlanmış ve süzölmüştür. Süzöntüye 100 ml % 87'lik gliserol ilave edilerek karışım 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Bu karışım enzim analizi için hazırlanan süpernatantlardaki protein ölçümlerinde kullanılmıştır. 100 µl süpernatant 5 ml belirteçle karıştırılarak ortaya çıkan renk belirteç körüne karşı 595 nm'de okunmuştur.

3. BULGULAR:

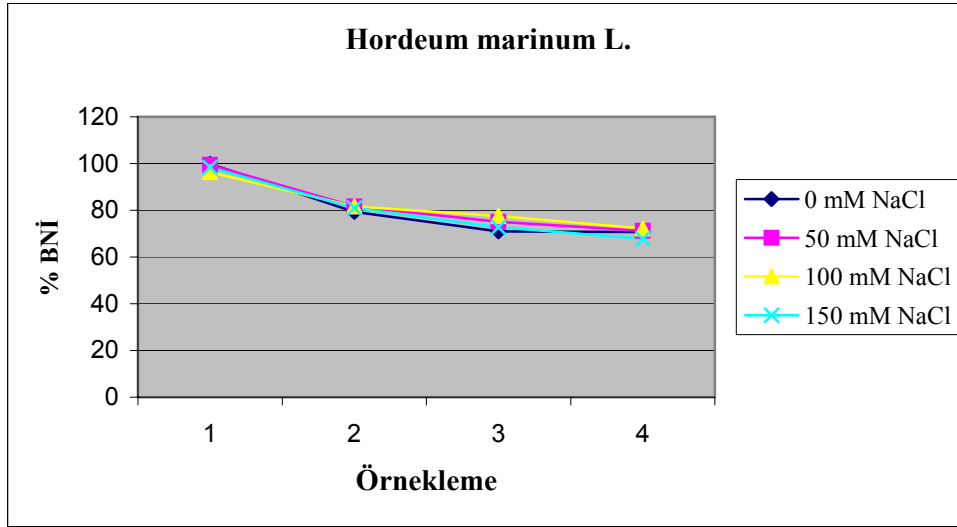
3.1. Bağlı Nem İçeriği :

Bağlı nem içeriği sonuçları Çizelge 3.1.'de verilmiştir. Buna göre; yaprak bağlı nem içeriği diğer genotiplere kıyasla *H. marinum*'da genel olarak düşük bulunmuştur. Karatay - 97 tüm genotipler içerisinde en iyi su kapasitesine sahip olarak bulunmuştur. Kırıl – 97 ise diğer iki genotip arasında yer alan bir bağlı nem içeriği sergilemektedir (Şekil 3.1, 3.2 ve 3.3.'de gösterilmiştir).

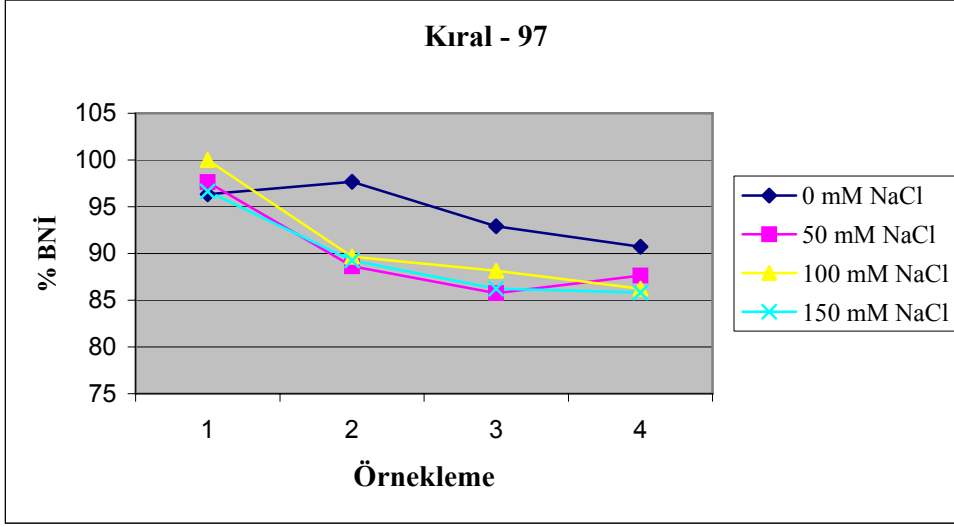
Artan NaCl konsantrasyonu *H. marinum*'un su içeriğini en çok % 32,13 en az ise % 24,09 düzeyinde etkilemiştir. Bu durum diğer genotiplerden Kırıl – 97 için sırasıyla; % 11,46 ve % 2,82, Karatay - 97 için ise yine sırasıyla; % 14,62 ve % 8.4 olmuştur.

Çizelge 3.1. *Hordeum marinum* L., Kıral -97 ve Karatay - 97'in artan tuz konsantrasyonlarına bağlı olarak bağıl nem içerikleri.

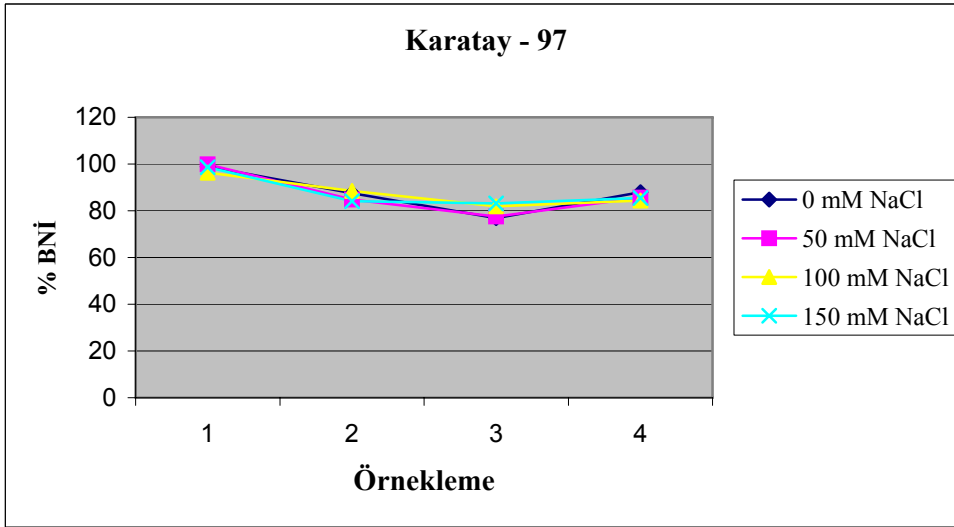
Çeşit	Konsantrasyon (mM NaCl)	% BNI			
		1. Örnekleme	2. Örnekleme	3. Örnekleme	4. Örnekleme
H. manium L.	0	99,87 ± 2,85	79,29 ± 2,03	70,91 ± 3,50	70,70 ± 10,63
	50	99,52 ± 4,12	81,59 ± 0,22	75,02 ± 10,35	71,18 ± 13,77
	100	96,35 ± 2,33	81,61 ± 4,86	77,50 ± 4,26	72,26 ± 4,27
	150	98,42 ± 1,20	80,96 ± 6,32	72,78 ± 2,31	67,74 ± 8,56
Kıral -97	0	96,35 ± 4,12	97,68 ± 3,25	92,92 ± 1,23	90,71 ± 3,21
	50	97,65 ± 0,25	88,63 ± 2,35	85,75 ± 1,85	87,65 ± 0,68
	100	99,99 ± 0,02	89,65 ± 3,84	88,15 ± 5,36	86,22 ± 3,36
	150	96,64 ± 3,21	89,26 ± 3,36	86,23 ± 1,47	85,81 ± 2,63
Karatay - 97	0	98,95 ± 1,85	87,60 ± 2,36	76,88 ± 3,45	87,94 ± 1,27
	50	99,81 ± 2,89	84,73 ± 0,75	77,54 ± 2,56	85,65 ± 0,94
	100	96,34 ± 5,21	88,49 ± 2,22	81,96 ± 0,25	84,33 ± 0,21
	150	98,57 ± 3,47	84,15 ± 0,12	83,12 ± 5,32	85,53 ± 2,21



Şekil 3.1. *Hordeum marinum* L.'un, tuz stresi boyunca bağıl nem içeriği.



Şekil 3.2. Kıral - 97'nin, tuz stresi boyunca bağıl nem içeriği.

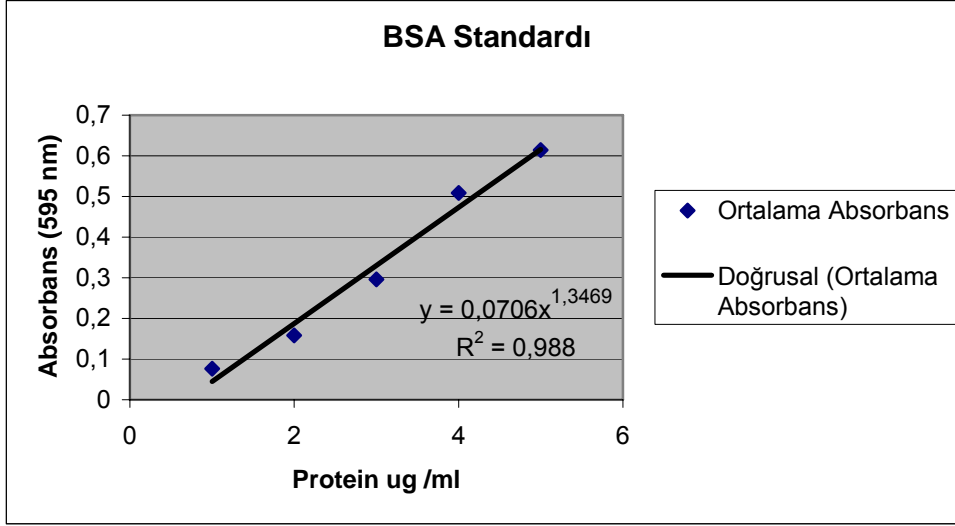


Şekil 3.3. Karatay - 97'nin, tuz stresi boyunca bağıl nem içeriği.

3.2. Protein İçerikleri:

Tüm çeşitlerin total protein sonuçları kontrol bitkiler ve tuz stresi uygulanmış olan bitkilerin yapraklarından, total SOD analizi için hazırlanan supernatantlar kullanılarak saptanmıştır. Sonuçlar 0,01 – 0,1 µg/ml aralığında 5 farklı noktada (0,01, 0,02, 0,04,

0,08 ve 0,1 µg/ml) hazırlanan BSA standardına göre (Şekil 3.4) hesaplanmış ve yaş ağırlıkta mg protein olarak verilmiştir (Çizelge 3.2).



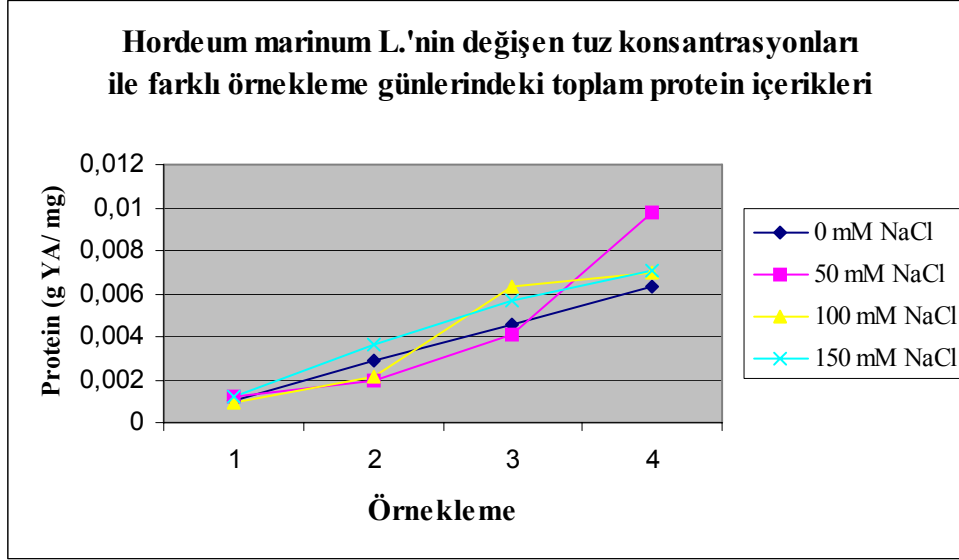
Şekil 3.4. BSA Standart Grafiği

Çizelge 3.2. Araştırılan arpa (*Hordeum spp. L.*) çeşitlerinin protein içeriklerinde zaman bağlı olarak artan tuz konsantrasyonlarındaki protein içerikleri (mg protein / g YA).

Çeşit	Konsantrasyon (mM NaCl)	1. Örneklem	2. Örneklem	3. Örneklem	4. Örneklem
H. marimum L.	0	0,0010 ± 0,0002	0,0029 ± 0,0005	0,0046 ± 0,0003	0,0063 ± 0,0009
	50	0,0012 ± 0,0006	0,0020 ± 0,0001	0,0041 ± 0,0008	0,0098 ± 0,0015
	100	0,0009 ± 0,0002	0,0021 ± 0,0003	0,0063 ± 0,0006	0,0070 ± 0,0021
	150	0,0012 ± 0,0003	0,0036 ± 0,0006	0,0057 ± 0,0011	0,0071 ± 0,0011
Kıral - 97	0	0,0021 ± 0,0001	0,0042 ± 0,0013	0,0113 ± 0,0024	0,0121 ± 0,0003
	50	0,0024 ± 0,0012	0,0072 ± 0,0017	0,0152 ± 0,0016	0,0104 ± 0,0026
	100	0,0017 ± 0,0006	0,0091 ± 0,0021	0,0175 ± 0,0009	0,0169 ± 0,0017
	150	0,0023 ± 0,0003	0,0101 ± 0,0006	0,0116 ± 0,0014	0,0103 ± 0,0008
Karataş - 97	0	0,0021 ± 0,0008	0,0051 ± 0,0003	0,0128 ± 0,0021	0,0157 ± 0,0016
	50	0,0024 ± 0,0007	0,0076 ± 0,0014	0,0179 ± 0,0017	0,0231 ± 0,0027
	100	0,0017 ± 0,0003	0,0106 ± 0,0019	0,0183 ± 0,0028	0,0214 ± 0,0034
	150	0,0023 ± 0,0004	0,0099 ± 0,0015	0,0216 ± 0,0016	0,0186 ± 0,0026

Hordeum marimum L.'da, kontrol bitkilerin toplam protein içeriği ilk örneklemede (24.gün) 0,0010, ikinci örneklemede (27. gün) 0,0029, üçüncü örneklemede (30. gün) 0,0046 ve dördüncü örneklemede (33.gün) ise 0,0063 mg olarak belirlenmiştir. 50 mM NaCl konsantrasyonuna maruz bırakılan *Hordeum marimum L.*

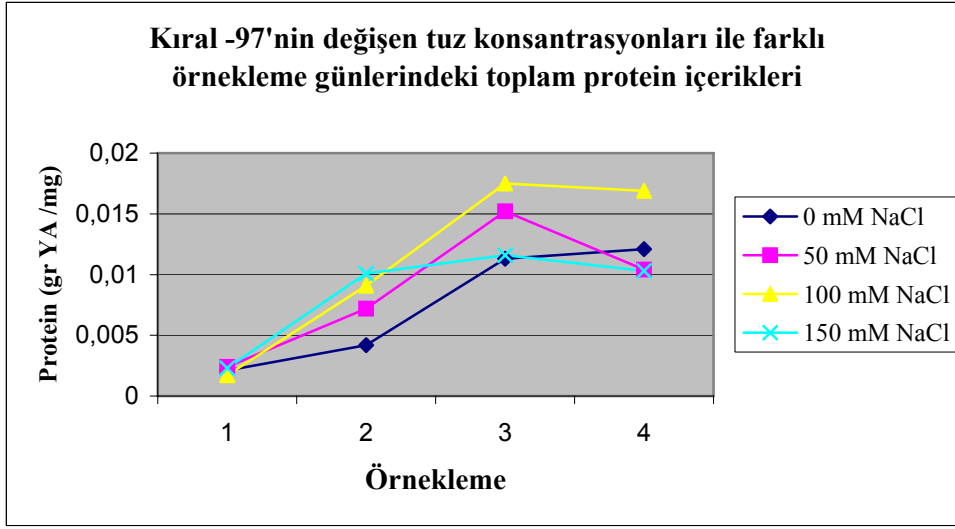
bitkilerinde bu değerler sırasıyla 0,0012, 0,0020, 0,0048, 0,0098 mg, 100 mM NaCl konsantrasyonuna maruz bırakılanlarda sırasıyla 0,0009, 0,0021, 0,0063, 0,0070 mg, 150 mM NaCl konsantrasyonuna maruz kalanlarda ise yine sırasıyla 0,0012, 0,0036, 0,0057, 0,0071 mg olarak saptanmıştır (Şekil 3.5).



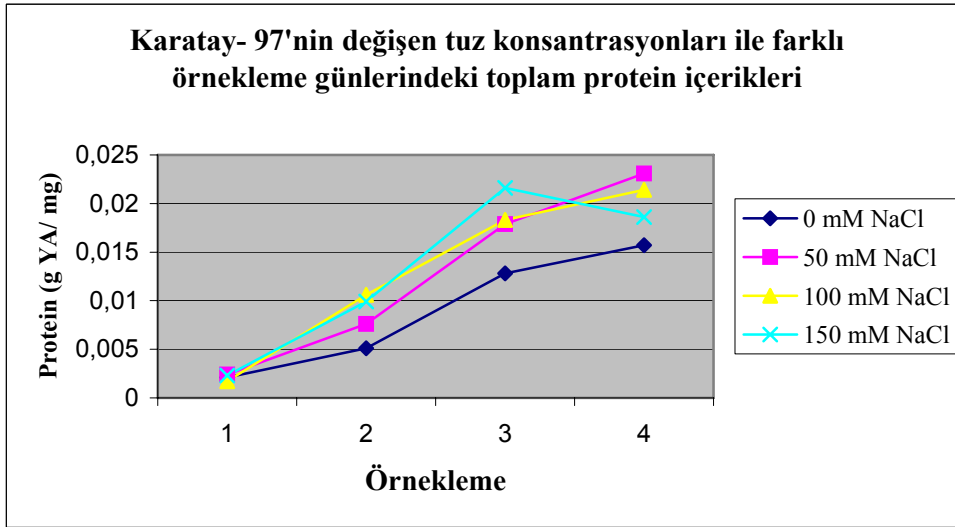
Şekil 3.5. *Hordeum marinum* L.'da NaCl uygulamalarıyla toplam protein miktarında ortaya çıkan değişimler

Kıral – 97’de saptanan toplam protein içerikleri ise kontrol bitkilerde ilk örneklemede (24.gün) 0,0021, ikinci örneklemede (27. gün) 0,0042, üçüncü örneklemede (30. gün) 0,0113 ve dördüncü örneklemede (33.gün) ise 0,0121 mg olarak belirlenmiştir. 50 mM NaCl konsantrasyonuna maruz bırakılan Kıral –97 bitkilerinde bu değerler sırasıyla 0,0024, 0,0072, 0,0152, 0,0104 mg, 100 mM NaCl konsantrasyonuna maruz bırakılanlarda sırasıyla 0,0017, 0,0091, 0,0175, 0,0169 mg, 150 mM NaCl konsantrasyonuna maruz kalanlarda ise yine sırasıyla 0,0023, 0,0101, 0,0116, 0,0103 mg olarak bulunmuştur (Şekil 3.6)

Karatay - 97’de, kontrol bitkilerin toplam protein içeriği ilk örneklemede (24.gün) 0,0021, ikinci örneklemede (27. gün) 0,0051, üçüncü örneklemede (30. gün) 0,0128 ve dördüncü örneklemede (33.gün) ise 0,0157 mg olarak belirlenmiştir. 50 mM NaCl konsantrasyonuna maruz bırakılan Karatay - 97 bitkilerinde bu değerler sırasıyla 0,0024, 0,0076, 0,0179, 0,0231 mg, 100 mM NaCl konsantrasyonuna maruz bırakılanlarda sırasıyla 0,0017, 0,0106, 0,0183, 0,0214 mg, 150 mM NaCl konsantrasyonuna maruz kalanlarda ise yine sırasıyla 0,0023, 0,0099, 0,0216, 0,0186 mg olarak belirlenmiştir (Şekil 3.7)



Şekil 3.6. Kıral – 97’de NaCl uygulamalarıyla toplam protein miktarında ortaya çıkan değişimler



Şekil 3.7. Karatay - 97’de NaCl uygulamalarıyla toplam protein miktarında ortaya çıkan değişimler

3.3. SOD Aktiviteleri:

Kontrolde ve farklı tuz konsantrasyonlarında araştırılan arpa genotiplerinde ortaya çıkan toplam SOD aktiviteleri Çizelge 3.3’te verilmiştir.

Hordeum marinum L.’da, kontrol bitkilerin toplam SOD içeriği ilk örneklemede (24.gün) 495,2, ikinci örneklemede (27. gün) 524,3, üçüncü örneklemede (30. gün) 504,6 ve dördüncü örneklemede (33.gün) ise 516,7 Unit/ g YA olarak belirlenmiştir. 50 mM NaCl konsantrasyonuna maruz bırakılan *Hordeum marinum* L. bitkilerinde bu değerler sırasıyla 488,6, 514,1, 497,6, 504,8 Unit/ g YA, 100 mM NaCl konsantrasyonuna maruz bırakılanlarda sırasıyla 508,4, 539,6, 524,3, 519,2 Unit/ g YA,

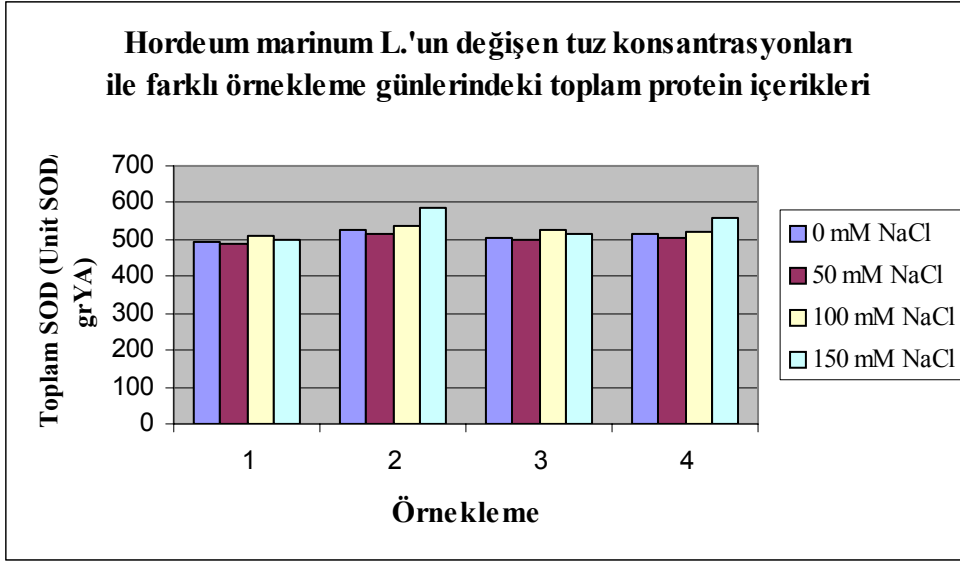
150 mM NaCl konsantrasyonuna maruz kalanlarda ise yine sırasıyla 501,7, 588,3, 516,9, 561,4 Unit/ g YA olarak saptanmıştır (Şekil 3.8).

Çizelge 3.3. Araştırılan arpa (*Hordeum spp. L.*) çeşitlerinin zamana bağlı olarak, artan tuz konsantrasyonlarında toplam SOD içerikleri (Unit SOD / g YA).

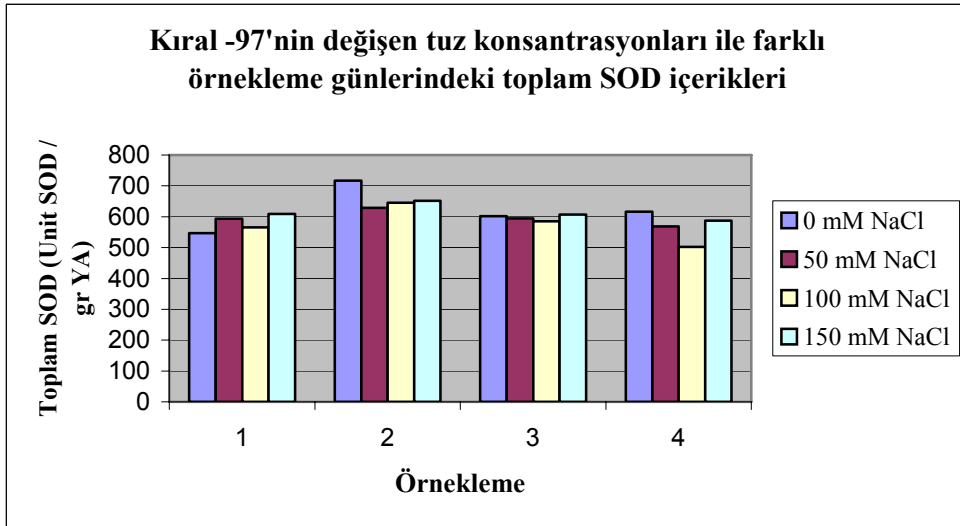
Çeşit	Konsantrasyon (mM NaCl)	1. Örneklem	2. Örneklem	3. Örneklem	4. Örneklem
H. manium L.	0	495, 2 ± 56,4	524,3 ± 84,5	504,6 ± 39,8	516,7 ± 33,7
	50	488,6 ± 88,3	514,1 ± 65,7	497,6 ± 101,4	504,8 ± 64,6
	100	508,4 ± 52,7	539,6 ± 28,6	524,3 ± 74,6	519,2 ± 28,9
	150	501,7 ± 67,1	588,3 ± 49,3	516,9 ± 54,8	561,4 ± 41,5
Kıral -97	0	547,2 ± 42,6	716,5 ± 113,8	601,4 ± 91,8	616,5 ± 122,7
	50	593,6 ± 95,3	628, 3 ± 65,4	594, 9 ± 107,8	568,7 ± 25,4
	100	565,1 ± 47,5	645, 8 ± 112,9	585,6 ± 66,7	502,3 ± 39,6
	150	609,5 ± 154,3	651,2 ± 56,1	606,7 ± 58,4	587,6 ± 74,1
Karatay - 97	0	621,7 ± 104,5	701,6 ± 29,4	715,8 ± 12,7	713,4 ± 55,9
	50	635,4 ± 121,5	599,3 ± 104,2	603,8 ± 63,7	607,5 ± 151,8
	100	611,8 ± 78,6	601,7 ± 96,4	594,6 ± 58,6	601,8 ± 69,7
	150	629, 6 ± 51,2	562,8 ± 42, 6	581,9 ± 20,6	618,6 ± 45,8

Kıral – 97’de saptanan toplam SOD içerikleri ise kontrol bitkilerde ilk örneklemede (24.gün) 547,2, ikinci örneklemede (27. gün) 716,5, üçüncü örneklemede (30. gün) 601,4 ve dördüncü örneklemede (33.gün) ise 616,5 Unit/ g YA olarak belirlenmiştir. 50 mM NaCl konsantrasyonuna maruz bırakılan Kıral –97 bitkilerinde bu değerler sırasıyla 593,6, 628,3, 594,9, 568,7 mg, 100 mM NaCl konsantrasyonuna maruz bırakılanlarda sırasıyla 565,1, 645,8, 585,6, 502,3 Unit/ g YA, 150 mM NaCl konsantrasyonuna maruz kalanlarda ise yine sırasıyla 609,5, 651,2, 606,7, 587,6 mg olarak bulunmuştur (Şekil 3.9).

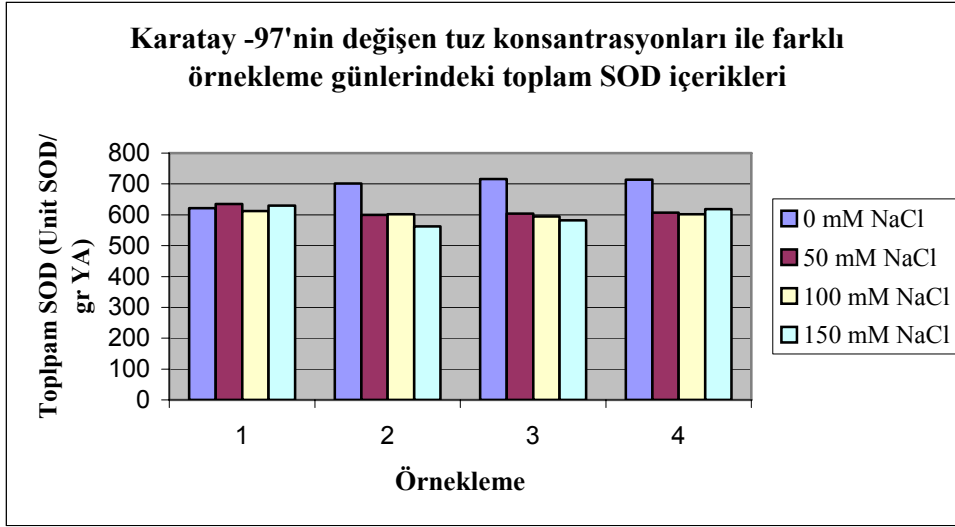
Karatay - 97’de, kontrol bitkilerin toplam SOD içeriği ilk örneklemede (24.gün) 621,7, ikinci örneklemede (27. gün) 701,6, üçüncü örneklemede (30. gün) 715,8 ve dördüncü örneklemede (33.gün) ise 713,4 Unit/ g YA olarak belirlenmiştir. 50 mM NaCl konsantrasyonuna maruz bırakılan Karatay - 97 bitkilerinde bu değerler sırasıyla 635,4, 599,3, 603,8, 607,5 Unit/ g YA, 100 mM NaCl konsantrasyonuna maruz bırakılanlarda sırasıyla 611,8, 601,7, 594,6, 6014,8 Unit/ g YA, 150 mM NaCl konsantrasyonuna maruz kalanlarda ise yine sırasıyla 629,6, 562,8, 581,9, 618,6 Unit/ g YA olarak saptanmıştır (Şekil 3.10).



Şekil 3.8. *Hordeum marinum L.*'de farklı NaCl uygulamalarıyla toplam SOD miktarında ortaya çıkan değişimler



Şekil 3.9. Kıral – 97'de farklı NaCl uygulamalarıyla toplam SOD miktarında ortaya çıkan değişimler



Şekil 3.10. Karatay - 97'de farklı NaCl uygulamalarıyla toplam SOD miktarında ortaya çıkan değişimler

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA:

Bağıl nem içeriği sonuçlarına bakıldığında, diğer iki genotipe kıyasla Karatay - 97 kùltürü en iyi su kapasitesine sahip görünmektedir. Bununla birlikte *Hordeum marinum* L.'un son örnekleme gününde diğer iki genotipe kıyasla genelde en düşük nem içeriğine sahip olduğu saptanmıştır.

Protein içeriklerine bakıldığında ise; *H. marinum* L.'un deneme sonunda kontrolde 6 katlık bir artışa sahipken bu durum 50 mM NaCl'de protein içeriği yaklaşık 9 kat, 100 ve 150 mM NaCl'de ise yaklaşık 7 kat artmıştır. Kırıl – 97 için bu durum, kontrolde 6 kat, 50 mM NaCl'de 5 kat, 100 mM NaCl'de 10 kat, 150 mM NaCl'de ise 5 kat artış göstermiştir. Karatay – 97'de ise deneme sonunda kontrolde 7 kat, 50 ve 100 mM NaCl'de 12 kat, 150 mM NaCl'de ise 8 kat artış belirlenmiştir

Toplam SOD aktivitelerinde ise, *H. marinum* L.'da deneme sonunda kontrolde ve NaCl uygulamalarında anlamlı bir artış saptanmamıştır. Bu durum Kırıl –97 ve Karatay – 97 için de benzer şekildedir.

Çevresel stresler en büyük etkilerini, bitkilerin ölümünden çok onların büyüme ve biyomas birikimleri üzerine göstermektedirler. Tuzluluğa maruz kalmış *Halimione portulacoides* yapraklarındaki katalaz ve peroksidaz aktivitelerini araştıran Kalir ve ark. (1984), 0 – 2,0 M arasında değişen NaCl konsantrasyonları sonucunda artan peroksidaz aktivitesine karşılık, azalan katalaz aktivitelerini saptamışlardır.

Sreenivasulu ve ark. (2000), farklı tuz konsantrasyonlarına tuza toleranslı (cv. *Prasad*) ve tuza duyarlı (cv. *Lepakshi*) *Setaria italica* (Akdarı) bitkisinin antioksidant kapasitesini incelemişlerdir. Buna göre; toplam SOD ve askorbat peroksidaz (AsPOD) aktivitesi tuz stresine maruz kalan tuza duyarlı kültürde belirgin şekilde azalırken, tuz stresi koşullarındaki tuza toleranslı kültürde ise arttığı bulunmuştur.

Ayrıca tuza duyarlı bezelye bitkisi (*Pisum sativum* L.) yapraklarında, mitokondride Mn SOD ve Cu/Zn SOD seviyelerinde anlamlı artışlar bulunmuştur (Hernandez ve ark., 1993).

Artmayan SOD aktiviteleri, Kalir ve ark. (1984)'nin POD aktivitelerinde karşılaştıkları sonuçlar ile benzerdir. Her üç genotipin toplam protein içeriklerindeki artışlara rağmen SOD aktivitelerinde bu artışa paralel artışların bulunmayışı, tuz stresiyle yaratılan oksidatif strese karşı yanıtta SOD'dan başka enzimik veya non-enzimik yolların kullanıldığını düşündürmektedir. Bununla birlikte, Sreenivasulu ve ark. (2000)'nin tuza duyarlı kültürlerde karşılaştıkları azalan toplam SOD sonuçları ile paralellik göstermektedir. Ancak, tuza dayanıklı kültürler olarak bilinen Kırıl -97 ve Karatay - 97'de SOD aktivitesindeki istatistiksel olarak anlamlı artışların bulunmayışı tuza toleransın SOD ile doğrudan ilgili olmadığına işaret etmektedir. Tuza duyarlılığın, *Pisum sativum* L.'un yaprak mitokondrilerinde neden olduğu artışın, araştırılan arpa genotiplerinde, toplam proteindeki artışa rağmen belirlenememiş olması diğer antioksidant savunma yollarını akla getirmektedir.

Tuz ve su streslerine bitki yanıtları çoğunlukla geneldir. Tuzluluk bitkinin su alma yeteneğini azaltır, bu ise hızla büyümede azalmaya neden olur. Kök büyümesinde içsel indirgenme köklerden üretilen hormonal sinyallerden dolayıdır. Büyüme üzerine doğrudan tuza-özel bir etki söz konusudur. Bitkiye giren tuz aslında transpirasyon yapan yaşlı yapraklarda toksik seviyeleri yükselterek, gelişmemiş yaşlılığa sebep olur ve büyümeyle beslenemeyen bitkide, bitkinin fotosentetik yaprak alanını azaltır. Tuza toleranslı bitkiler tuza duyarlı olanlardan farklı olarak düşük oranda da olsa yapraklara Na^+ ve Cl^- taşınımına sahiptir. Aynı zamanda tuza toleranslı bitkiler bu iyonları vakuollerde bölümlendirilmekte ve böylece sitoplazma veya hücre duvarında bu iyonların birikimi önlemekte ve sonuçta tuz toksisitesinden sakınma başarılmaktadırlar. Bu prosesler, ozmotik stres toleransından farklı olarak tuz toleransını sağlamaktadırlar. Belli genler de tuzun membranlardan taşınımını kontrol etmektedir (Munns, 2002).

Araştırma sonuçlarımıza göre, buraya kadar elde edilen bilgiler, tuza karşı dayanıklılığı bilinen Kırıl –97 ve Karatay –97 ile bir halofit olan ve tuza doğal olarak toleransı bulunan *Hordeum marinum* L.'un, tolerans veya dayanıklılık mekanizmalarında SOD'dan başka enzimik veya enzimik olmayan diğer antioksidant savunmaların çalıştığını düşündürmektedir. Bu bağlamda, toplam protein içeriğinde saptanan artışların bu nedenle olduğu da düşünülebilir. Tüm bu nedenlerden dolayı, SOD tek başına tuz stresi ile ilişkili antioksidant savunmada kesin bir kriter olarak kullanışlı değildir. Bu amaçla, aynı genotipler üzerine tuz stresi etkisiyle GR, AP ve diğer antioksidatif enzimlerin aktivitelerinin çalışılması yerinde olacak ve anlamlı sonuçlara ulaşılmasını sağlayacaktır.

5. ÖZET

***Hordeum marinum* L'DA TUZ STRESİNE BAĞLI OLARAK SÜPEROKSİT DİSMÜTAZ (EC 1.15.1.1) AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ**

Bu araştırmada, tuzluluğa dayanıklı olduğu bilinen iki arpa çeşidi (Kıral –97 ve Karatay – 97) ve duyarlı veya dayanıklılığı bilinmeyen ancak doğal yayılışa sahip bir halofit olan *Hordeum marinum* L.'da Süperoksit dismutaz (SOD; EC 1.15.1.1) aktiviteleri araştırılmıştır.

Tuz stresinin oluşturulmasında sırasıyla, 50, 100, 150 mM NaCl ve 0 mM NaCl (kontrol) konsantrasyonları uygulanmıştır. Ayrıca, tuz stresine bağlı olarak bağıl nem içeriği de tespit edilmiştir.

Tüm denemeler sonunda, zamana bağlı olarak toplam protein içerikleri her üç genotipte artarken, artan tuz konsantrasyonları buna paralel bulunmamıştır. Toplam SOD aktivitelerinin her üç genotipte de anlamlı bir artışa sahip olmadığı saptanmıştır.

Değişmeyen SOD aktiviteleri, Kalir ve ark. (1984)'nin POD aktivitelerinde elde ettikleri sonuçlar ile benzerdir. Her üç genotipin toplam protein içeriklerindeki artışlara rağmen toplam SOD aktivitelerindeki artış buna paralel değildir. Bu ise tuz stresiyyle yaratılan oksidatif strese karşı yanıtta Bununla birlikte, sonuçlarımıza paralel olarak Sreenivasulu ve ark. (2000)'nin tuza duyarlı *Setaria italica* kültürlerinde azalan toplam SOD aktiviteleri elde etmişlerdir.

Araştırmadan elde edilen sonuçlara göre; *Hordeum marinum* L.'da bulunması olası antioksidatif yolda işlevsel olduğu bilinen diğer enzimik ve enzimik olmayan antioksidantların da araştırılması gereklidir. Tuzluluğa dayanıklılıkta, her üç genotip için de SOD aktiviteleri tek başına bir kriter olarak kullanışlı değildir.

6. SUMMARY

THE DETERMINATION OF SUPEROXIDE DISMUTASE (EC 1.15.1.1) ACTIVITY DEPEND ON SALT STRESS IN *Hordeum marinum* L

In this investigation, two cultivated barleys (Kıral –97 and Karatay – 97) which are known as a salt resistant and with *Hordeum marinum* L. that is unknown as resistant or sensitive as a halophyte plant which has a natural spread, are investigated for superoxide dismutase activities (SOD; EC 1.15.1.1) .

Forming salt stress, respectively 50, 100, 150 mM NaCl concentrations and 0 mM NaCl (as a control) were used to form salt stress.

At the end of the all experiments, total protein amount wasn't founded parallel with increasing salt concentrations while the total protein amount, which depend on time course in every three genotype increased. A significant increasing wasn't found at total SOD activities in every three genotype.

Unchangable SOD activities are similar to the results of POD activities that were obtained by Kalir *et al.* (1984). Although the increasing of total SOD activities were not parallel with the increasing of total protein content in every three genotype. This was also thought as a response against oxidative stress, which was obtained by the salinity stress, using enzyme or non-enzyme pathways. Nevertheless, our results were parallel with Sreenivasulu *et al.* (2000) who obtained the same decreasing total SOD activities in salt sensitive *Setaria italica* cultivars

According to the obtained results, research is required for researching other enzymic and non-enzymic antioxidants, that is probably present antioxidative ways in *Hordeum marinum* L.. Resistance in salinity, SOD activities are not available for only as a criteria for every three genotype.

7. KAYNAKLAR

- Acar, O., 1999**, Kurağa dayanıklı bazı arpa (*Hordeum ssp.*) çeşitlerinde süperoksit dismutaz (SOD) aktivitelerinin araştırılması, Doktora Tezi, E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 87 s.
- Acar, O., Türkan, İ., Özdemir, F., 2001**, Superoxide dimutase and peroxidase activities in drought sensitive and resistant barley (*Hordeum vulgare L.*) varieties, *Acta Physiol. Plant.*, 23: 3, 351-356.
- Alsher, R.G., Erturk, N., Heath, L.S., 2002**, Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants, *J of Exp. Botany*, Vol. 53, No.372, Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants Special Iss., pp. 1331-1341.
- Asada, K., 1980**, Formation and scavenging of superoxide in chloroplasts, in relation to injury by sulfur dioxide in studies on the effects of air pollutants on plants and mechanisms of phytotoxicity. - *Res. Rep. Natl. Inst. Environ. Stud.* 11: 165-179
- Asada, K., Takahashi, M., 1987**, Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis.- In *Photoinhibition: Topics in Photosynthesis*. Vol. 9. (D.J. Kyle, C.B. Osmond and C.J. Arntzen, eds), pp. 227-287. Elsevier, Amsterdam. ISBN 0-444-80890-6.
- Beauchamp, C., Fridovich, I., 1971**, Superoxide dismutase: Improved Assays and applicable to Acrylamide Gels, *Analytical Biochemistry*, 44:276 – 287.
- Bowler, C., Van Montagu, M. ve Inze, D., 1992**, Superoxide dismutase and stress tolerance, *Annu. Rev.Plant Physiol., Plant Mol. Biol.*, 43:83 – 116.
- Bradford, M. M., 1976**, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein – dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72: 248 – 254.
- Çakmak, I., Marschner, H., 1988**, Enhanced superoxide radical production in roots of zinc-deficient plants. *J. Expt. Bot.* 39:1449-1460.

- Covello, P.S., Chang, A., Dumbroff, E.B., Thompson, J.E. 1989**, Inhibition of photosystem II precedes thylakoid membrane lipid peroxidation in bisulfite treated leaves of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol.* 90:1492-1497.
- Daub, M.E., 1982**, Peroxidation of tobacco membrane lipids by the photosensitizing toxin, cercosporin. *Plant Physiol.* 69: 1361-1364.
- Daub, M.E., Briggs, S.P., 1983**, Changes in tobacco cell membrane composition and structure caused by the fungal toxin cercosporin. *Plant Physiol.* 71: 763-766.
- Davies, K.J.A., 1987**, Protein damage and degradation by oxygen radicals. I General aspects. *J. Biol. Chem.* 162:9895-9901.
- Doke, N., Ohashi, Y., 1988**, Involvement of an O₂-generating system in the induction of necrotic lesions on tobacco leaves infected with tobacco mosaic virus. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* 32:163-175.
- Doke, N., Miura, Y., Chai, H-B, Kawakita, K., 1991**, Involvement of Active Oxygen in induction of plant defense response against infection and injury. In: *Active Oxygen/Oxidative Stress* Pell E.J., Steffen K.L. (eds), *Stress and Plant Metabolism*, American Soc. Plant Physiol. Rockville, M.D. pp. 84-96.
- Drumm-Herrel, H., Gerhauber, U., Mohr, H. 1989**, Differential regulation by phytochrome of the appearance of plastidic and cytoplasmic isoforms of glutathione reductase in mustard (*Synapis alba* L.) cotyledons. *Planta* 178: 103-109.
- Edwards, E.A., Enard, C., Creissen, G.P., Mullineaux, P.M. 1994**, Synthesis and properties of glutathione reductase in stressed peas. *Planta* 192: 137-143.
- Elstner, E.F., Wagner, G.A., Schultz, W., 1988**, Activated oxygen in green plants in relation to stress situations. *Curr. Topics Plant Biochem. Physiol.* 7: 159-187.
- Elstner, E.F., 1991**, Mechanisms of oxygen activation in different compartments of plant cells In: *Active oxygen/oxidative stress and plant metabolism*. Pell E.J. and Steffen K.L. (eds) American Soc. Plant Physiol. Rockville, M.D. pp. 13-25.

- Foyer, C.H., Harbinson, J. 1994**, Oxygen metabolism and the regulation of photosynthetic electron transport. - In Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants (C.H. Foyer & P.M. Mullineaux, eds), pp. 1-42. CRC Press, Boca Raton, FL ISBN 0-8493-5443-9.
- Edreva, A., 1998**, Molecular Bases of Stress in Plants, Bitkilerde Stres Fizyolojisinin Moleküler Temelleri, EBILTEM, 22-26 Haziran, Bornova, İzmir, s. 1-33.
- Foyer, C.H., Lelandais, M., Kunert, K.J., 1994**, Photooxidative stress in plants, *Physiol. Plant.* 92: 696-717.
- Fridovich, I., 1970**, Quantitative aspects of the production of superoxide anion radical by milk xanthine oxidase. *J. Biol Chem* 245:4053-4057.
- Fridovich, I., 1986**, Superoxide Dismutases, *Adv. Enzymology*, 58: 62-97.
- Furbank, R.T., Badger, M.R., 1983**, Oxygen exchange associated with electron transport and photophosphorylation in spinach thylakoids.- *Biochim. Biophys. Acta.* 723: 400-409.
- Giannopolitis , N., Ries, S.K., 1977**, Superoxide dismutase: I. Occurrence in higher plants, *plant Physiol.*, 59:309 – 314.
- Gross, G.G., Janse, C., Elstner, E.F., 1977**, Involvement of malate, monophenols and superoxide radical in hydrogen peroxide formation by isolated cell walls from horseradish. (*Armoracia lapathifolia* Gilib.) *Planta* 136:271-276.
- Gross, G.G., 1980**, The biochemistry of lignification. *Adv. Bot. Res.* 8:25-63.
- Hohn, D.C., Lehere, R.L. 1975**, NADPH oxidase deficiency in X-linked chronic granulomatous disease. *J. Clin Invest.* 53:707-713.
- Hernandez, J.A., Corpas, F.J., Gomez, M., del Rio, L.A., Sevilla, F., 1993**, Salt-induced oxidative stress mediated by activated oxygen species in pea leaf mitochondria, *Physiologia Plantarum*, 89: 103-110.

- Kaiser, W.M., 1979**, Reversible inhibition of the Calvin cycle and activation of oxidative pentose phosphate cycle in isolated chloroplasts by hydrogen peroxide. *Planta* 145:377-382.
- Kalir, A., Omri, G., Poljakoff-Mayber, A., 1984**, Peroxidase and catalase activity in leaves of *Halimione portulacoides* exposed to salinity, *Physiol. Plant.*, 62: 238-244.
- Landry, L.G., Pell, E.J., 1993**, Modification of Rubisco and altered proteolytic activity in O₃-stressed hybrid poplar (*Populus maximowizii* + *trichocarpa*). *Plant Physiol.* 101:1355-1362.
- Loschen, G., Azzi, A., Floheß, L., 1973**, Mitochondrial H₂O₂ formation: Relationship with energy conversion. *FEBS Lett* 33:84-88.
- Loschen, G., Azzi, A., Richter, C., Floheß, L. 1974**, Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide. *FEBS Lett* 42:68-72.
- Lindqvist, Y., Branden, C.L., Mathews, F.S., Lederer, F., 1991**, Spinach glycolate oxidase and yeast flavocytochrome b₂ are structurally homologous and evolutionarily related enzymes with distinctly different function and flavin mononucleotide binding. *J. Biol. Chem.* 266:3198-3207.
- Lutz, C., Steiger, A., Godde, D., 1992**, Influence of air pollutants and nutrient deficiency on D1 protein content and photosynthesis in young spruce trees. *Physiol. Plant.* 85: 611-617.
- Matters, G.L., Scandalios, J.G., 1986**, Effect of the free radical generating herbicide paraquat on the expression of superoxide dismutase (SOD) genes in maize. *Biochem. Biophys. Acta* 882: 29-38
- Melhorn, H., O'Shea, J.M., Wellburn, A.R., 1990**, Electron spin resonance evidence for the formation of free radicals in plants exposed to ozone. *Physiol. Plant.* 79: 377-383.

- Morré, D.J., Brightman, A.O., Wu, L.Y., Barr, R. Leak, B., Crane, F.L., 1988,** Role of plasma membrane redox activities in elongation growth in plants. *Physiol. Plant* 73: 187-193.
- Munns, R., Husain, S, Rivelli, A.N., James, R.A., Condon, A.G., Lindsay, M.P., Lagudah, E.S., Scachtman, D.P., Hare, R.A., 2002,** Avenues for increasing salt tolerance of crops and the role of physiologically based selection traits, *Plants and Soil*, 247: 93 – 105.
- Munns, R., 2002,** Comparative physiology of salt and water stress, *Plant Cell Environment*, 25: 239 – 250.
- Oleinick, N.L., Chiu, S., Ramakrishnan N., Xue, L., 1986,** The formation, identification, and significance of DNA-protein cross-links in mammalian cells. *Brit. J. Cancer* 55: Suppl. 8:135-140.
- Rich, P.R., Bonner, W.D. Jr., 1978,** The sites of superoxide anion generation in higher plant mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 188:206-213.
- Salin, M.L., 1988,** Toxic oxygen species and protective systems of the chloroplast. - *Physiol. Plant.* 72: 681-689.
- Shimazaki, K., Sugahara, K. 1980,** Inhibition site of the electron transport system in lettuce chloroplasts by fumigation of leaves with SO₂, *Plant Cell Physiol.* 21: 125-135.
- Scandalios, J.G., 1993,** Oxygen Stress and Superoxide Dismutases, *Plant Physiol.* 101:7-12.
- Shalata, A., Mittova, V., Volokita, M., Guy, M. Ve Tal, M., 2001,** Response of the cultivated tomato and its wild salt – tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to salt dependent oxidative stress: The root antioxidative system, *Physiologia Plantarum*, 112: 487 – 494.

- Smart, R.E., Bingham, G.E., 1974,** Rapid estimates of relative water content, *Plant Physiol.*, 53: 258 – 260.
- Stadtman, E.R., 1986,** Oxidation of proteins by mixed-function oxidation systems: implication in protein turnover, aging and neutrophil function. *Trends Biochem. Sci.* 11:11-12.
- Streb, P., Michael-Knauf, A., Feierabrand, 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.
- 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.
- Steward, F.C., 1963,** *Plant Physiology*, Academic Press, New York and London, 797 p.
- Tanaka, K., Kondo, N., Sugahara, K., 1982,** Accumulation of hydrogen peroxide in chloroplasts of SO₂ fumigated spinach leaves. *Plant Cell Physiol.* 23: 999-1007.
- Turrens, J.F., Freeman, B.A., Crapo, J.D., 1982,** Hyperoxia increases H₂O₂ release by lung mitochondria and microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 217:411-421.
- Vianello, A., Macri, F., 1991,** Generation of superoxide anion and hydrogen peroxide at surface of plant cells. *J. Bioenerg. Biomemb.* 23:409-423.
- Wilson, D.O. and McDonald, M.B. Jr., 1986,** The lipid peroxidation model of seed aging. *Seed Sci. Tech.* 14:269-300.
- Winston, G.W., Cederbaum, A.I., 1983,** Oxyradical production by purified components of the liver microsomal mixed-function oxidase system I: Oxidation of hydroxyl radical scavenging agents. *J. Biol Chem* 258:1508-1513.
- Zhu, Jian-Kang, 2001,** Plant Salt Tolerance, *Trends in Plant Science*, 6:2,66 – 71.

8. TEŞEKKÜR

Öncelikle, bu araştırma konusunu bana öneren ve araştırmamın her aşamasında ilgi ve yardımlarını benden esirgemeyen değerli hocam Yard. Doç. Dr. Okan ACAR'a teşekkür ederim. Ayrıca bu süreçte bana her türlü imkanı sunan ve daima destek olan aileme de gönülden teşekkür ederim. Aynı zamanda tüm çalışmalarım boyunca beni destekleyen ve ilgi ve yardımlarını esirgemeyen Özel Çanakkale Koleji'ne çok teşekkür ederim.

Araştırmamız, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından BAP 2002/12 nolu proje ile desteklenmiştir. Bu nedenle adı geçen kuruluşa teşekkür etmeyi bir borç bilirim.

Araştırmalarım süresince, her aşamada bilgisini benimle paylaşan değerli hocalarım Doç. Dr. Ahmet GÖNÜZ'e, Yard. Doç. Dr. Cüneyt AKI'ya ve özellikle analiz aşamasında ciddi destek ve yardımlarını benden esirgemeyen yüksek lisans öğrencisi, sevgili Filiz BAYKAL'a çok teşekkür ederim.

ÖZGEÇMİŞ:

Adı Soyadı : Ahu BİNİCİ

Doğum Yeri ve Yılı : Çanakkale – 1975

Adres :Boğazkent Mevkii, Piri Reis Sitesi, C Blok D:18 Kepez /
Çanakkale

Eğitim Durumu:

1983 –1988 : Gazi İlköğretimokulu

1988 –1990 : Merkez Ortaokulu

1990 – 1992: Çanakkale Lisesi

1992 – 1997: ODTÜ Eğitim Fakültesi Biyoloji Bölümü

Staj ve Kurslar:

Stajyer : 1996 Özel Arı Kolejinde Biyoloji Öğretmeni

Kursiyer : Ağustos 2001, Proteom Yaz Okulu, Çanakkale(Ç.O.M.Ü., Berlin Teknik
Üniversitesi, Ege Üniversitesi işbirliğiyle)

Mesleki Deneyim:

1997 – 2004 : Biyoloji ve Fen Bilgisi Öğretmeni, Özel Çanakkale Koleji, Çanakkale.

YÜKSEKÖĞRETİM KURULU DÖKÜMANTASYON MERKEZİ
TEZ VERİ FORMU

Tez No:

Konu:

Üniv.kodu:

Not: Bu bölüm merkezimiz tarafından doldurulacaktır.

Tezin yazarının

Soyadı : Binici

Adı: Ahu

Tezin Türkçe adı:

Tezin Yabancı adı:

Tezin yapıldığı

Üniversite : Çanakkale 18 Mart

Enstitüsü : Fen Bilimleri

Yılı : 2001 –2004

Diğer Kuruluşlar :

Tezin Türü : 1- Yüksek Lisans X
2- Doktora
3-Tıpta Uzmanlık
4- Sanatta Yeterlilik

Dili : Türkçe
Sayfa Sayısı :

Tez Danışmanlarının

Ünvanı : YRD.DOÇ.

Adı : Okan

Soyadı : Acar

Ünvanı :

Adı :

Soyadı :

Türkçe anahtar kelimeler:

İngilizce anahtar kelimeler:

1-Oksidatif stres
2- Hordeum marinum L.
3- Süperoksit dismutaz
4-Tuz stresi
5-

1-Oxidative stress
2-Hordeum marinum L.
3- Superoxide dismutase
4- Salt stress
5-

Tarih :

İmza :