

T.C.
KİLİS 7 ARALIK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TUZ STRESİNE KARŞI BAZI ZEYTİN ÇEŞİTLERİNİN SAVUNMA
STRATEJİLERİ**

Sekvan DEMİR

DANIŞMAN: Yrd. Doç. Dr. Hakan ÇETİNKAYA

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

OCAK 2013

KİLİS

TEZ ONAYI

Yrd. Doç. Dr. Hakan ÇETİNKAYA danışmanlığında, Sekvan DEMİR tarafından hazırlanan “Tuz Stresine Karşı Bazı Zeytin Çeşitlerinin Savunma Stratejileri” adlı tez çalışması 24 Ocak 2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği ile Kilis 7 Aralık Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

| Jüri Üyeleri | Unvanı, Adı Soyadı (Kurumu) | İmza |
|--------------|-----------------------------|------|
|--------------|-----------------------------|------|

| | | |
|---------------|--|--|
| Başkan | Doç.Dr. Nazım ŞEKEROĞLU (Kilis 7 Aralık Üniversitesi, Fen Bilimleri Enst. Biyoloji ABD) | |
|---------------|--|--|

| | | |
|------------|--|--|
| Üye | Yrd. Doç. Dr. Hakan ÇETİNKAYA (Kilis 7 Aralık Üniversitesi, Fen Bilimleri Enst. Biyoloji ABD) | |
|------------|--|--|

| | | |
|------------|---|--|
| Üye | Yrd. Doç. Dr. Bekir Bülent ARPACI (Kilis 7 Aralık Üniversitesi, Bahçe Bitkileri ABD) | |
|------------|---|--|

Bu tezin kabulü, Fen bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun/...../2013 tarih ve/..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Tez No:

Doç. Dr. Şükrü ÇAKMAKTEPE
Enstitü Müdürü V.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TUZ STRESİNE KARŞI BAZI ZEYTİN ÇEŞİTLERİNİN SAVUNMA STRATEJİLERİ

Sekvan DEMİR

Kilis 7 Aralık Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Hakan ÇETİNKAYA

YIL: 2013

Sayfa: 38

Bu çalışmada sodyum klorürün (NaCl) farklı dozlarının (0, 75 ve 150 mM) *Olea europea* L'nin Gemlik, Kilis Yağlık ve Nizip Yağlık çeşitlerinde oluşturduğu fizyolojik ve biyokimyasal etkiler araştırılmıştır. Toplam klorofil miktarı, 75 mM NaCl dozunda en yüksek, 150 mM dozunda en düşük düzeyde belirlenmiştir. Çeşitler bakımından ise en düşük toplam klorofil miktarı Gemlik çeşidinde, en yüksek Kilis Yağlık çeşidinde elde edilmiştir. Farklı tuz konsantrasyonları çeşitlerin toplam fenol ve protein içeriklerini etkilememiştir. Toplam flavonoid içerikleri ise 150 mM NaCl dozunda 50,13 mg/g QE ile en yüksek, 47,72 mg/g QE ile 75 mM dozda en düşük bulunmuştur. Toplam flavonoid içeriği çeşitler arasında da Gemlik çeşidinde en yüksek, Kilis Yağlık çeşidinde en düşük düzeyde tespit edilmiştir.

Sonuç olarak tuzlu koşullar altında klorofil miktarının azaldığı ve çeşitlerin bu konuda farklı tepkiler verdiği ayrıca tuzlu koşulların yapraklardaki toplam fenol ve protein miktarına etkisinin az olmasına karşın toplam flavonoid miktarına etkisi önemli bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: klorofil, *Olea europaea* L, protein, toplam fenolik maddeler, toplam flavonoid, tuzluluk

ABSTRACT

MSc. Thesis

DEFENCE STRATEGY OF SOME OLIVE CULTIVARS AGAINST SALT STRESS

Sekvan DEMİR

Kilis 7 Aralık University

The Institute for Studies in Sciences and Engineering

Department of Biology

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Hakan ÇETİNKAYA

Year: 2013

Page: 38

In this study, the effects of different sodium chloride (NaCl) salinity levels (0, 75, and 150 mM) on physiological and biochemical parameters of *Olea europaea* L. cultivars (Gemlik, Kilis Yağlık, and Nizip Yağlık) were investigated. The highest total chlorophyll content was obtained under 75 mM salinity level while the lowest one was determined under 150 mM salinity. With respect to the cultivars, the highest chlorophyll content was found in Kilis Yağlık cv. whereas the lowest value was obtained in Gemlik. Different salinity concentration did not influence the total phenolic content and protein content of cultivars. However; flavonoid content was determined to be highest under 150 mM with 50,13 mg/g QE but the lowest value was 42, 72 mg/g QE under 75 mM salinity level. Regarding with cultivars, total flavonoid content was ascertained for Gemlik cv. while it was lowest for Kilis Yağlık cv. Accordingly, it can be deduced that salinity decreased the chlorophyll content and cultivars showed different reactions against salinity and its doses. In addition, it influenced total phenolic and protein content in small quantities except that flavonoids were differently synthesized against salinity levels.

Keywords: Chlorophyll, *Olea europaea* L., protein, total phenolic matter, total flavonoid, salinity

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının konusunun belirlenmesinde, deneysel ve teorik aşamalarında ve yazımı esnasında yardım, öneri ve desteğini gördüğüm danışman hocam Sayın Yrd. Doç.Dr. Hakan ÇETİNKAYA'ya,

Bana her konuda yardımcı olan Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölüm Başkanı Sayın Doç. Dr. Nazım ŞEKEROĞLU'na ve Biyoloji Bölümü Öğretim Üyelerine,

Deneysel ve teorik aşamalarında ve tez yazımı esnasında yardım, öneri ve desteğini gördüğüm Sayın Arş. Gör. Muhittin KULAK' a,

Labaratuvar çalışmaları olarak bu tezin tamamlanmasında desteği bulunan İspanya'daki Cordoba Üniveritesi öğretim üyesi Sayın Prof.Dr. Jesus V.Novo Jorin ve çalışma arkadaşlarına en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Sekvan DEMİR

KİLİS 2013

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|-----|
| ÖZET..... | ii |
| ABSTRACT..... | iii |
| TEŞEKKÜR | iv |
| İÇİNDEKİLER | v |
| SİMGELER ve KISALTMALAR | vii |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | ix |
| ÇİZELGELER DİZİNİ | x |
| RESİMLER DİZİNİ..... | xi |
| 1.GİRİŞ | 1 |
| 2.MATERYAL VE YÖNTEM..... | 9 |
| 2.1. Materyal | 9 |
| 2.1.1.Kilis Yağlık Çeşidi..... | 9 |
| 2.1.2.Nizip Yağlık Çeşidi..... | 9 |
| 2.1.3.Gemlik Çeşidi..... | 10 |
| 2.1.4.Kilis İli Coğrafik Konumu..... | 10 |
| 2.1.5.Genel İklim Durumu. | 11 |
| 2.1.6.Meteoroljik Veriler | 12 |
| 2.2.Yöntem..... | 13 |
| 2.2.1. Arazi Çalışmaları ve Tuz Uygulamaları..... | 13 |
| 2.2.2. Fizyolojik Parametrelerin Belirlenmesi..... | 13 |
| 2.2.2.1. Fotosentetik Pigmentlerin Belirlenmesi..... | 13 |
| 2.2.3. Bitki Ekstrelerinin Hazırlanması ve Analizi..... | 14 |
| 2.2.3.1. Toplam Fenol İçeriğinin Belirlenmesi..... | 14 |
| 2.2.3.2. Toplam Flavonoid İçeriğinin Belirlenmesi..... | 15 |

| | |
|--|-----------|
| 2.2.3.3. Protein Miktarının Belirlenmesi..... | 16 |
| 2.2.4. İstatistiksel Değerlendirme..... | 19 |
| 3. BULGULAR VE TARTIŞMA..... | 20 |
| 3.1. Fotosentetik pigmentlerin belirlenmesi..... | 20 |
| 3.2. Fenolik Bileşiklerin ve Proteinin Belirlenmesi..... | 24 |
| 4.SONUÇLAR..... | 31 |
| 5.KAYNAKLAR | 33 |
| 6.ÖZGEÇMİŞ..... | 38 |

SİMGELER VE KISALTMALAR

1.Simgeler

| | |
|--------------------|--------------------------|
| μl | : Mikro Litre |
| $^{\circ}\text{C}$ | :Santigratderece |
| g | : Gram |
| kg | : Kilogram |
| mg | : Miligram |
| ml | : Mililitre |
| mm | : Milimetre |
| mM | : Mili Molar |
| mg/ml | : Miligram/mililitre |
| NaCl | : Sodyum Klorür |
| R^2 | :Determinasyon Katsayısı |
| μl | : Mikrolitre |
| % | : Yüzde |

2.Kısaltmalar

| | |
|-----|-----------------------|
| Abs | :Absorbans. |
| DTT | : Dithiothreitol |
| GAE | :Gallik Asit Eşdeğeri |
| nm | : Nanometre |

| | |
|------------|---|
| QE | :Kuersetin Eşdeğeri |
| rpm | : Rotation Per Minute (Dakika başına dönme sayısı) |
| SDS | : Sodium Dodecyl Sulfate |
| SDS-PAGE | : Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis |
| TCA-Aseton | : Trichloroasetic Asit-Aseton |
| TEMED | : Tetramethylenediamine |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | |
|--|----|
| Şekil 2.1. Kilis İli Lokasyon Haritası..... | 11 |
| Şekil 2.2. Gallik Asit Standart Kalibrasyon Eğrisi..... | 14 |
| Şekil 2.3. Kuersetin Standart Kalibrasyon Eğrisi..... | 15 |
| Şekil 3.1.1. Farklı NaCl Dozlarında Zeytin Çeşitlerinin Klorofil a Miktarları (mg/L).. | 23 |
| Şekil 3.1.2. Farklı NaCl Dozlarında Zeytin Çeşitlerinin Klorofil b Miktarları (mg/L)... | 23 |
| Şekil 3.1.3. Farklı NaCl Dozlarında Zeytin Çeşitlerinin Toplam Klorofil Miktarı (mg/L)..... | 24 |
| Şekil 3.2.1. Farklı NaCl Dozlarında Zeytin Çeşitlerinin Yaprak Flavanoid Miktarları (mg/g QE)..... | 28 |
| Şekil 3.2.2. Farklı NaCl Dozlarında Zeytin Çeşitlerinin Yaprak Toplam Fenol Miktarları (mg/g GAE)..... | 29 |
| Şekil 3.2.3. Farklı NaCl Dozlarında Zeytin Çeşitlerinin Yaprak Protein Miktarları (µg/ml)..... | 29 |

ÇİZELGELER DİZİNİ

| | |
|---|----|
| Çizelge 2.1. Kilis İline Ait 2011 Yılı Aylık Ortalama Meteorolojik Parametreler..... | 12 |
| Çizelge 3.1.1. Farklı Tuzluluk Koşulları Altında Yetiştirilen Zeytin Çeşitlerinin Yaprak Klorofil-a İçeriğine İlişkin Varyans Analizi..... | 21 |
| Çizelge 3.1.2. Farklı Tuzluluk Koşulları Altında Yetiştirilen Zeytin Çeşitlerinin Yaprak Klorofil-b İçeriğine İlişkin Varyans Analizi..... | 21 |
| Çizelge 3.1.3. Farklı Tuzluluk Koşulları Altında Yetiştirilen Zeytin Çeşitlerinin Yaprak Toplam Klorofil İçeriğine İlişkin Varyans Analizi..... | 21 |
| Çizelge 3.1.4. Farklı NaCl Dozlarında Zeytin Çeşitlerinin Klorofil a, Klorofil b ve Toplam Klorofil Miktarı..... | 22 |
| Çizelge 3.1.5. Farklı NaCl Dozlarında Klorofil a, Klorofil b ve Toplam Klorofil Miktarı..... | 22 |
| Çizelge 3.1.6. Farklı Zeytin Çeşitlerinin Klorofil a, Klorofil b ve Toplam Klorofil Miktarı..... | 22 |
| Çizelge 3.2.1. Farklı Tuzluluk Koşulları Altında Yetiştirilen Zeytin Çeşitlerinin Yaprak Toplam Fenol İçeriğine İlişkin Varyans Analizi..... | 25 |
| Çizelge 3.2.2. Farklı Tuzluluk Koşulları Altında Yetiştirilen Zeytin Çeşitlerinin Yaprak Toplam Flavonoid İçeriğine İlişkin Varyans Analizi..... | 26 |
| Çizelge 3.2.3. Farklı NaCl Dozlarında Zeytin Çeşitlerinin Toplam Fenol, Toplam Flavanoid ve Protein Miktarı..... | 27 |
| Çizelge 3.2.4. Farklı NaCl Dozlarında Toplam Fenol, Toplam Flavanoid ve Protein Miktarı..... | 27 |
| Çizelge 3.2.5. Farklı Zeytin Çeşitlerinde Toplam Fenol, Toplam Flavanoid ve Protein Miktarı..... | 28 |

RESİMLER DİZİNİ

| | |
|--|----|
| Resim 2.1. Zeytin Yapraklarının Sıvı Nitrojen İçinde Toz haline Getirilişi..... | 16 |
| Resim 2.2. Örneklerin Vortekslenmesi..... | 17 |
| Resim 2.3. Örneklerin 10'ar Saniye Sonikasyonun Yapılması..... | 18 |
| Resim 2.4. Örneklerin Santrifüjlenmesi..... | 19 |
| Resim 2.5. Örneklerin Küvetler İçinde Fotometre Cihazında Protein Miktarının Ölçülmesi..... | 20 |

1. GİRİŞ

Hem doğal hem de tarımsal koşullar altında bitkiler, sıklıkla çevresel stres etmenlere maruz kalır. Hava sıcaklığı gibi bazı çevresel faktörler kısa süreli stres oluştururken; topraktaki su içeriği gibi diğer etkilerin oluşturduğu stresler günlerce sürebilir (Taiz ve Zeiger, 2008). Dolayısıyla bitkiler yaşamları süresince eş yada farklı zamanlarda birçok biyotik ve abiyotik stres faktörü ile karşılaşabilmektedir. Bitkisel üretimde stres; bir veya birden fazla etkenin bitkiyi çevresel olarak etkileyerek, büyümede yavaşlama ve verim düşüklüğüne neden olması şeklinde tanımlanabilir. Bitkide strese neden olan etmenler, hastalık oluşturanlar ve zararlılar gibi canlı kökenli olabileceği gibi; tuzluluk, kuraklık, düşük ve yüksek sıcaklıklar, radyasyon ve besin elementlerinin eksiklikleri veya fazlalıkları gibi cansız kökenli de olabilmektedir (Yaşar, 2003; Kalefetoğlu ve Ekmekçi, 2005).

Stres etmenlerinin en önemlilerinden birisi de tuzluluktur. Karasal yüksek yapılı bitkiler doğal koşullar altında, deniz suyunun ve tatlı suyun birbirine karıştığı yada gelgitlerle yer değiştirdiği deniz kıyıları ve deltalarda, yüksek tuz konsantrasyonları ile karşılaşır. Daha iç kısımlarda ise jeolojik deniz birikimlerinde çıkan doğal tuz sızıntıları çevreye yayılarak o alanları tarım için uygunsuzlaştırır. Ancak sulama suyundaki tuzların birikimi tarımda daha yaygın bir sorundur (Taiz ve Zeiger, 2008). Doğal olarak ya da insan kaynaklı oluşabilecek tuzluluk, tarımsal üretim alanlarında, toprağın verimliliğini olumsuz yönde etkileyerek bitki büyümesi, verimi ve kalitesini sınırlandıran en önemli sorunların başında gelmektedir (Khan ve Irwin, 1996; Taban ve ark.,1999; Debez ve ark., 2004; Ozturk ve ark., 2004; Zehtab-Salmasi 2008). Tuzluluk; özellikle kurak ve yarı kurak iklim bölgelerinde, yıkanarak yeraltı suyuna karışan çözünebilir tuzların yüksek taban suyuyla birlikte kapillarite yoluyla toprak yüzeyine çıkması ve buharlaşma sonucu suyun topraktan ayrılarak tuzun toprak yüzeyinde ve yüzeye yakın bölümünde birikmesi olayıdır (Ergene, 1982; Kwiatowsky, 1998; Kara, 2002). Tuzluluk bitkilerde toksisiteye ve mineral beslenme bozukluklarına yol açarak bitkinin fizyolojik ve biyokimyasal metabolizmasını tahrip etmektedir. Yağış oranının az ve buharlaşmanın fazla olduğu, kurak ve yarı kurakekolojilerde tuzluluk doğal olarak ortaya çıkmaktadır. Yanlış yöntemlerle sulamaya açılan bu bölgelerde taban suyundaki

tuzların üst katmanlara taşınması ile de topraklarda tuzluluk artmaktadır (Shannon, 1984).

Oleaceae familyasına ait ülkemizde 7 cins altında 10 kadar tür yayılış göstermektedir. *Olea europaea* L. (zeytin ağacı), vatanı Akdeniz havzası olan bu bölgede büyük ölçüde kültürü yapılan 3-16 m boylanan, kışın yaprak dökmeyen bir ağaçtır. Yapraklar basit, lanseolattır. Çiçekleri beyazımsı sarı renkli ve küçüktür. Yaprakların koltuğunda bulunur. Meyve yağ taşır ve yenir. Yaprakları kan şekerini, yaprak gövde ve dal kabukları ise tansiyonu düşürücüdür (Tanker ve ark., 1998).

Çalışma konusu olan zeytin yaprakları *Folium Olivarium* olarak bilinir. Yapraklar tanen, uçucu yağ, organik asitler ve rezin taşır. Yapraklar ve gövde kabuğu, infüzyon halinde (% 5) iştah açıcı, idrar verici, kabız, ateş düşürücü etkilere sahiptir. Şeker hastalığına karşı da kullanılmaktadır. Haricen cerahatli yaraların temizlenmesi ve pansumanında kullanılır (Baytop, 1999).

Bitkiler, yapısında fenol grubu (aromatik halkasında işlevsel birhidroksil grup içeren kimyasallar) taşıyan çok çeşitli sekonder metabolitler üretirler. Bu kimyasallar fenolik bileşikler olarak sınıflandırılırlar. Yaklaşık 10.000 çeşit bileşiğin yer aldığı bitkisel fenolikler kimyasal olarak heterojen bir gruptur. Kimyasal çeşitliliklerine uyacak şekilde fenolikler, bitkilerde çok farklı roller üstlenirler. Bu bileşiklerin çoğu herbivor ve patojenlere karşı savunma bileşikleridir. Diğerlerinin mekanik destek veren, polen ve meyve (tohum) dağılımını sağlayan canlıları çeken ve aynı ortamda yetişen rakip bitkilerin büyümesini azaltan işlevleri bulunur (Taiz ve Zeiger, 2008).

Flavonoidler bitkilerin sekonder metabolitlerin önemli bir sınıfıdır. Günümüze kadar bitkilerden izole edilen 4000'den fazla flavonoid özellikli bileşik bilinmektedir. Flavonoidlerin, antioksidatif (Bors ve ark., 1990; Tsujimoto ve ark., 1993; Yuting ve ark., 1990; Zhou ve ark. 1991; Cattel ve ark., 1992), antikarsinojenik (Huang ve ark., 1981; Verma ve ark., 1988; Mukhtar ve ark., 1988) gibi bilinen biyolojik aktivitelerinin yanında bitki fizyolojisinde önemli rol oynadıkları bilinmektedir. Flavonoidler, bitkisel fenoliklerin en büyük sınıflarından birisidir. Bir flavanoidin temel karbon iskeletinde

toplam 15 karbon bulunur. Bunlardan 12'si altışarlı diziler halinde iki aromatik halkada yer alır. Geri kalan 3 karbonlu köprü bu halkaları birleştirir (Taiz ve Zeiger, 2008).

Bitkilerde renkli pigmentler iki ana grupta toplanırlar; karotenoidler ve flavonoidler. *Karotenoidler*, sarı, turuncu ve kırmızı rengi veren terpen yapıda bileşiklerdir ve aynı zamanda fotosentezde yardımcı pigmentler olarak iş görürler. Flavonoidlerise fenolik bileşiklerdir ve çok çeşitli renk verici kimyasalları içerir. Antosiyaninler gibi pek çok renk oluşumundan sorumlu olan flavonoidler olduğu gibi, ultraviyole ışığının zararına karşı koruyucu işlev gören flavonoidler de mevcuttur (Taiz ve Zeiger, 2008).

Tuzluluk problemi yaşanan alanlarda, tuza dayanıklı bitki yada ağaçların seçimi, bu alanların üretime kazandırılması büyük önem taşımaktadır. Buralarda yetişebilecek bitkilerin seçiminde ekonomik faydaların gözetilmesi temel hedeflerden olmalıdır. Bu hedefler doğrultusunda, mevcut çalışmada kullanımı milattan önceki çağlara dayanan, tıbbi ve ekonomik anlamda öneme sahip olan *Olea europea L.*'nin Kilis ve çevresinde tarımı yapılan çeşitlerinin (Gemlik, Kilis Yağlık ve Nizip Yağlık) fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerine sodyum klorürünün (NaCl) farklı tuz düzeylerinin (0, 75 ve 150 mM) karşılaştırılması etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bitki doku ya da hücrelerinde meydana gelen değişimlere bağlı olarak, bitkinin sahip olduğu biyolojik aktivite potansiyelinde de değişimlerin olup olmadığı tespit edilmeye çalışılmıştır. Bu kapsamda, farklı tuzluluk koşullarının üç farklı zeytin çeşidinin fotosentetik pigmentler, toplam protein, toplam fenolik madde ve toplam flavonoid içeriğinde meydana getirdiği değişimlerin karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi çalışmanın temel amacını oluşturmaktadır.

Rao ve Rao (1981), 200 mM NaCl içeren ortamda yetiştirilen ısıpınak bitkisi yapraklarında birim alanda belirlenen klorofil miktarının kontrol bitkilerinde belirlenen klorofil miktarının % 73 düzeyinde olduğu saptanmıştır. Toplam klorofil miktarı içerisinde tuz stresinde klorofil a'nın daha fazla etkilendiği ve parçalandığı saptanmıştır. Tuzlu koşullarda bitkilerde klorofil miktarının azalması klorofili parçalayan Klorofilaz enzim aktivitesinin artmasına bağlı olarak açıklanmıştır.

Nelson ve Paris (1984) bildirdiğine göre kavun tohumlarına NaCl uygulaması yapılmış ve çimlenme döneminde iyi performans gösteren genotiplerin, fide aşamasında aynı performansı gösteremediği belirlenmiştir. Çimlenme aşamasında negatif olarak etkilenen genotipler ise fide aşamasında tuz stresine karşı daha iyi tolerans göstermiştir.

Neuman ve ark. (1988), fasulye fidelerinin düşük düzeylerde (50-100 mM) tuzluluğa maruz bırakıldığında, üç günlük süre içerisinde ışıklı koşullarda primer yapraklarda hücre genişlemesinin azaldığını ve bunu hücre büyüme parametrelerinden hücre duvarı büyümesi ve turgor basıncı ile ilişkilendirmektedir. Tuzluluk 72 saat sonra hücre büyümesinde herhangi bir olumsuz etki meydana getirmemiş, kontrol bitkilerinde oransal olarak küçük artışlar görülmüştür. Diğer yandan 50 mM NaCl 24 saat içinde toplam yaprak turgorunu önemli ölçüde azaltmış, yaprak osmotik potansiyelinde adaptif azalmaya paralel olarak ksilem basıncı, yapraktaki apoplastik madde potansiyelini düşürmüştür ve bu düşüş de sonuçta yaprağın su potansiyelini düşürmüştür. Bu bulgularla, fasulye fidelerinde orta tuzluluk seviyelerinde başlangıçta yaprak büyüme oranının, hücre duvarı büyümesindeki azalmadan çok turgordaki düşüşten kaynaklandığı ve uzun dönem tuzluluk koşullarında (10 gün) turgordaki azalmaya ters olarak hücre duvarı büyümesinin sağlandığını ifade etmişlerdir.

Yadav ve ark. (1989), farklı tuzluluk seviyelerinde nohutun çimlenme, gelişme ve mineral kompozisyonunu araştırdıkları saksı çalışmalarında, artan tuzluluk düzeylerinin (1.4, 2.5, 4.3, 6.2, 8.5 dS/m²) çimlenmeyi geciktirdiğini çimlenme yüzdesini düşürdüğünü, kuru madde üretimini azalttığını, Ca, Mg ve Na miktarını arttırdığını ve K ile B miktarını azalttığını bildirmişlerdir.

Güneş ve ark. (1995), tuz stresinin bitkinin çeşitli parametrelerini etkileyerek fotosentez verim ve aktivitesini olumsuz etkilediğini ve aynı zamanda yaprakların iç hücrelerinde CO₂ basıncı düşerken, stomaların geçirgenliklerinde olduğu gibi klorofil kapsamında da azalma olduğunu bildirmişlerdir.

Angelopoulos (1996), şiddetli stres yaşayan bitkilerin fotoinhibisyon sürecine bağlı olarak mezofil hücrelerinde yüksek CO₂ seviyesinin olduğunu ve şiddetli su stresinin

bitkiler fotosentez aktivitesini olumsuz etkilemenin yanında yaprak üstü yüzeyinin floresans özelliğini değiştirdiğini bildirmişlerdir.

Botia ve ark. (2001), *Olea europaea* L. meyvelerinde bazı fenolik bileşiklerin biyosentez modülasyonun ve onların zeytin yağının kalitesine etkisi araştırdıkları çalışmada, İspanyanın değişik bölgelerinde yetiştirilen zeytin bitkisinin meyvelerinin fenolik bileşikleri mass-spektrometre ile ölçülmüştür. Farklı analizlerle farklı miktarlarda tirozol, kazein, lutein ve oleuropin gözlemlendi. Sonuçta meyvelerin %0.3'lik brotomax ile 50 gün sonunda bütün analiz çeşitlerinde meyve hacmi, yağ içerikleri, fenol içerikleri miktarı ve antioksidan aktivitesi üzerinde yararlı etkileri gözlemlenmiştir.

Karanlık (2001) ve Yaşar (2003)'a göre tuz stresi altındaki bitkilerde stomalar kapatılmakta, yaprak alanları da küçülerek transpirasyon azaltılmaya çalışılmaktadır. Böylece bitki, su kaybını en aza indirmek ve topraktan su ile birlikte yüksek miktardaki tuzu almayı engellemeye gayret etmektedir. Yaprak alanındaki azalmanın yanında birim alandaki CO₂ fiksasyonu da azalmaktadır. Bütün bunlara, yükselen respirasyon eşlik eder. Yaşamak için yoğun enerji sarf eden bitki, daha az fotosentez yaparak harcadıklarını yerine koyamadığı için gelişme ve büyüme geriler. Tuz stresi altında net CO₂ fiksasyonunun azalması; su noksanlığı, stomaların kapanışı, apoplastta tuzun birikmesi ve mezofil hücrelerinin turgoru kaybetmesi veya tuz iyonlarının doğrudan toksisitesi sebebidir.

Zhu (2001), tuzluluğun stomaların kapanması dolayısıyla transpirasyonun ve kloroplastlara net CO₂ diffüzyonunun azalmasına yol açarak fotosentezin olumsuz şekilde etkilendiğini rapor etmiştir. Bu durumun da beraberinde oksidatif zararlanmayı getirdiğini belirtmiştir. Garcia (2002), genç ve olgun zeytin dokularında stres altında farklı protein üretimi gözlemlenmiştir.

Parida ve ark. (2002), *Bruguiera parviflora* yapraklarında NaCl uygulamasına bağlı olarak toplam klorofil, toplam protein ve diğer metabolik bileşiklerde meydana gelen değişimlerin incelendiği çalışmada, NaCl tuzunun 0, 100, 200 ve 400 mM'lık dozları

kullanılmıştır. En yüksek toplam klorofil miktarı 100 mM NaCl tuz uygulamasında elde edilirken artan tuz düzeyi ile birlikte miktarlarda önemli düşüşler meydana gelmiştir. Yüksek NaCl konsantrasyonunda (200 ve 400 mM) toplam klorofil miktarında azalmanın nedeninin bazı kloroplastların tahribi veya pigment-protein kompleksinin lipid protein oranlarının değişimi olabilmemin yanında klorofilaz aktivitesinin artmasının da bu düşüşe sebep olabileceğini bildirmişlerdir. Toplam protein miktarı da artan NaCl dozlarına bağlı olarak aşamalı bir şekilde düştüğünü ve bu azalmanın NaCl'nin protein sentezi ve proteolizis üzerindeki olumsuz etkisinden kaynaklanmış olabileceğini bildirmişlerdir.

Silva ve ark. (2005), *Olea europaea* zeytin bitkisinin yaprakları, meyveleri ve köklerinin ekstraktları HPLC ile Mass Spektrometre (MS) aracılığıyla analiz edildi. Bu yöntemler, bazı genel fenolik bileşiklerin tanımlanmasında önemlilik arz etmektedir. Toplam fenol Folin Denis ayırıcı ile tespit edildi. Çalışma sonucunda toplam fenol bileşikleri en fazla zeytin bitkisinin küspelerinde 13,9- 30,5 (g/L) bulunurken, en az toplam fenol bitkinin köklerinde 5,9-14,9 (g/L) olarak tespit edilmiştir.

Ben-Ahmed ve ark. (2009), *Chemlali* çeşidi üzerinde tuzlu suyun meyve gelişimi, kalitesi ve zeytinyağının fenolik bileşiklerine etkileri araştırılmıştır. Bitkiler normal ve tuzlu suyla sulanmıştır. Bu çalışma sonucunda tuzluluk artınca meyve ağırlığı, zeytin, zeytinyağı içerikleri düşmüştür. Aksine fenolik bileşikler ve toplam fenol konsantrasyonu arttığını belirlemişlerdir.

Bourgou ve ark. (2010), *Nigella sativa*'da tuzluluğa bağlı olarak fenolik bileşiklere ve bitkinin biyolojik aktivitesine etkileri araştırılmıştır. *Nigella sativa* bitkisinin tohumları doğal olarak hastalıklara ilaç olarak kullanılan aromatik ve tıbbi bitki sınıfına girer. Bu çalışmanın amacı tuzluluğun bu türün antioksidan ve fenolik bileşiklerine etkisi çalışılmıştır. Bu çalışmada 60 mM NaCl dozu tohumların fenolik bileşiklerini ve flavonoid içeriklerini önemli derecede azaltarak etkilemiştir. Tuzluluk bazı bileşiklerin özellikle kuersetin, apigenin and trans-sinamik asit biyosentezini artırdığı gözlemlenmiştir.

Demiral ve ark. (2009), *Olea europaea* L.'nin Gemlik çeşidi artan dozlarda NaCl stresine maruz bırakılarak, bitkinin bu strese karşı oluşturduğu biyokimyasal tepkiler belirlenmeye çalışılmıştır. Bir yıllık zeytin bitkisi tohumları saksıda yüksek tuzluluğa maruz bırakılmış. Bu çalışmada bitki yapraklarının kuru madde yüzdesi, Na ve Cl konsantrasyonu, DPPH süpürme aktivitesi, toplam fenolik bileşikler ve prolin içerikleri belirlenmiştir. Sonuçlardan zeytin bitkisinin tuz stresine karşı geliştirdiği savunma mekanizmasını bir düzen ve birbirini tamamlayacak şekilde takip ettiğini göstermişlerdir. Sonuçta DPPH süpürme aktivitesi, zeytin bitkisinde tuz stresinin olumsuz etkisini azaltan antioksidanların etki düzeylerinin belirlenmesinde güvenilir bir değer olabileceğini ortaya koymuştur.

Shaheen ve ark. (2011), *Olea europea* L.'nin beş çeşidini sera şartlarında tuzluluğun vejetatif ve yaprak kısımlarındaki kimyasal içerikleri üzerindeki etkisi araştırdıkları çalışmada, bir yıllık zeytin bitkisi kum saksılarında tuzlu suyla sulanmıştır. Bu amaçla, NaCl tuzu 0, 50, 100, 150 ve 200 mM/L dozlarında kullanılmıştır. Bu çalışma sonucunda artan tuz dozlarında bitkinin hayatta kalma yüzdesi, yapraksayısı, yaprak alanı, yaprağın N, P, K, Ca içeriği ve klorofil düşmeyle beraber; yapraklarda Na, Cl ve prolin miktarları artmıştır.

Rezazadeh ve ark. (2012), tuzluluğun *Cynara scolymus* L. yapraklarının toplam fenol ve flavonoid içeriğine etkisinin araştırıldığı çalışmada, NaCl tuzunun 50, 100, 150, 200 ve 250 mM dozları kullanılmıştır. En yüksek toplam fenolik bileşik miktarı 150 mM NaCl dozunda saptanırken, en düşük düzeyi de 250 mM NaCl tuz uygulamasında olduğunu belirtmişlerdir. Toplam flavonoid için de aynı durum söz konusu olup, doğal ortamlarda yapılan deneyler saksılarda yapılanlara göre daha iyi düzeyde toplam fenol ve flavonoid elde edilmiştir.

Salah ve ark. (2012), bu çalışmada sekiz çeşit zeytin yapraklarının toplam fenol ve flavonoid içerikleri ölçülmüştür. Farklı çeşitler yüksek miktarda polifenol ve flavonoid içermektedir. Bütün zeytin çeşitlerinin yaprak ekstratlarında oleuropein en çok bulunan bileşik olmuştur. Yüksek miktarda oleuropein içeriğinin olması ve önemli derecede antioksidant aktivitesinin bulunması bu zeytin yaprak ekstratlarının ileride sanayi ve

ilaç uygulamalarında kullanılabilecek potansiyel malzemeler olabileceğini bildirmişlerdir.

Petridis ve ark. (2012), *Olea europaea* L. dört Yunanistan zeytin çeşidinde su kıtlığına bağlı olarak bitki yapraklarının fenolik bileşikleri, gaz değişimi, oksidatif zarar ve antioksidan aktivitesine etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda; su stresi zeytin bitkisinin fizyolojik ve biyokimyasal parametrelerini etkilemiş olup, bu etki bitkinin genotipi, sulama derecesi ve deneyin süresine bağlı olarak etkilenmiştir. Su stresi şiddetine karşı antioksidan kapasitesinin aşılabileceğinin yanında, malondialdehid seviyesi ve sonraki oksidatif zarar iki ay su kıtlığından sonra artmıştır.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

Güneydoğu Anadolu Bölgesinde yoğun olarak yetiştirilen bir yaşındaki Gemlik, Kilis Yağlık ve Nizip Yağlık zeytin çeşitlerinin fidanları çalışmanın ana materyalini oluşturmaktadır.

2.1.1.Kilis Yağlık Çeşidi

Kilis, Gaziantep, Şanlıurfa, Kahramanmaraş ve Mardin illerinde yoğun olarak yetiştirilmektedir. Bölgesinin en önemli yağlık çeşididir. Meyveleri çok küçük, çekirdekleri meyveye oranla iridir. Bu çeşidin en önemli sorunu boncuklu meyve oluşumudur. Meyveleri % 31,8 oranında yağ içerir. Yüksek oranda yağ içeren bu çeşit yağlık olarak değerlendirilir. Kilis yağlık çeşidi soğukve sıcağa mukavemeti, verimliliği ve bölgeye uyum sağlamış çeşit özelliği ile bölgede büyük bir öneme sahiptir. Orijini Kilis ili olan Kilis yağlık çeşidi, bölgede yumru ile çoğaltılmaktadır. Periyodisite gösterir. Yuvarlak şekilli ve boncuklu olarak tabir edilen normale göre irili ufaklı meyve yapısına sahiptir. Çekirdekleri ufakça, daneye göre oranı % 18,7'dir (Ulusaraç ve Karaca, 1985). Özellikle Gaziantep ve Kilis civarında yaygın olarak yetiştirilmekte olup ilin mevcut ağaç varlığının % 60'ını, Güneydoğu Anadolu bölgesinin toplam ağaç sayısının % 52'sini, Türkiye genelindeki ağaç varlığının ise % 2,8'ini oluşturmaktadır. Meyveleri yüksek oranda (% 27-35) yağ içeren bu çeşit yağlık olarak değerlendirilmektedir (Canözer, 1991).

2.1.2.Nizip Yağlık Çeşidi

Güneydoğu Anadolu bölgesindeki ağaç varlığının % 38'ini teşkil eden Nizip yağlıkçeşidinin orijini Gaziantep'in Nizip ilçesidir. Gaziantep'in Nizip, Kahramanmaraş'ın Merkez ve Mardin'in Cizre ilçelerinde yoğun olarak yetiştiriciliği yapılır. Meyveleri % 27,4 oranında yağ içerir. Kilis Yağlıkta olduğu gibi yüksek yağ içerdiğinden yağlık olarak değerlendirilir. Güneydoğu Anadolu bölgesinde yumru ile

çoğaltılmış bir çeşittir. Türkiye genelindeki ağaç varlığının yaklaşık % 2'sini oluşturmaktadır (Canözer, 1991). Nizip yağlık çeşidi; % 25-33 yağ içeriğinden dolayı genellikle yağlık olarak değerlendirilmesinin yanında, iri meyveleri seçilerek yeşil ve siyah sofralık olarak da değerlendirilmektedir. Soğuğa ve sığağa mukavemeti yüksektir. Periyodisite gösteren bir çeşittir. Yuvarlağa yakın silindirik meyveleri bulunmaktadır. Çekirdeğinin meyveye oranı % 16,3 olarak tespit edilmiştir (Ulusaraç ve Karaca, 1985).

2.1.3. Gemlik Çeşidi

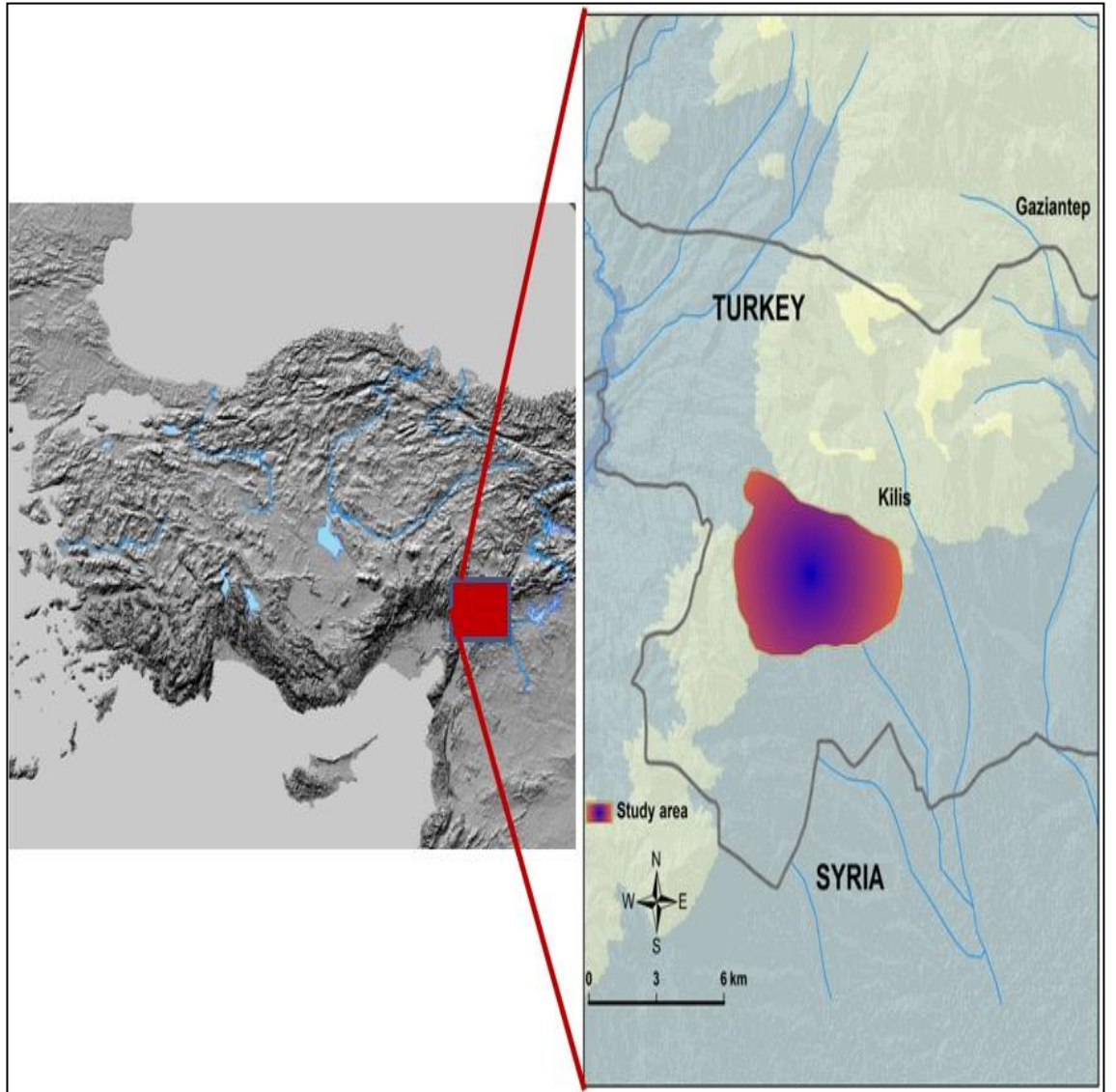
Sinonim adları trilye, kaplık, kıvrık ve kara olan Gemlik çeşidinin orijini Bursa'nın Gemlik ilçesidir. Coğrafi dağılımı; Bursa, Tekirdağ, Kocaeli, Bilecik, Kastamonu, Sinop, Samsun, Trabzon, Balıkesir, İzmir, Manisa, Aydın, İçel, Adana, Antalya ve Adıyaman ilidir. Morfolojik özellikleri bakımından ağaç kuvveti orta kuvvette, habitusu orta büyüklükte, düzgün ve yuvarlaktır. Yaprak şekli kısa-geniş eliptiktir. Meyve; büyüklüğü orta, şekli yuvarlağa yakın silindiriktir. Fizyolojik özellikleri; gelişme kuvveti orta kuvvette ve verimlidir. Periyodisite durumu iyi bakım şartlarında düzenli ürün verir. Döllenme durumu kısmen kendine verimlidir. Ayvalık, Çakır, Erkence çeşitleri Gemlik için tozlayıcı olarak önerilebilir. (DAZB, 2003)

2.1.4. Kilis İlinin Coğrafi Konumu

Kilis ili, Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde, Hatay-Maraş oluğu ile Fırat ırmağı arasında uzanan Gaziantep Platosu'nun güneybatı kısmında, Türkiye-Suriye sınırı boylarında 36° Kuzey enlemi ve 32° Doğu boylamı değerleri arasındadır. Ortalama yükseltisi 750 m'dir. Yüzölçümü 1521 km² olup %16'lık kısmını orman ve fundalık ağaçlar oluşturur (Kesici, 1994) (Şekil 2.1). Bölgenin önemli tarım ürünleri zeytin, antepfıstığı ve üzümdür. Ayrıca yöresel olarak sebze yetiştiriciliği de yapılmaktadır. Kilis ve çevresinde zeytin yetiştiriciliği birinci sıradadır. Zeytin çeşitlerinden en fazla yetiştirilenler ise eski bahçelerde Kilis Yağlık ve Nizip Yağlık, yeni plantasyonlarda Gemlik ve Ayvalık çeşitleridir.

2.1.5.Kilis İlinin Genel İklim Durumu

Kilis ili Akdeniz Bölgesi'nin güneydoğu sınırında kalan bir il olduğu için iklimi Akdeniz iklimi ve karasal iklim arasında bir geçiş gösterir. Bölge birbirinden farklı özellikler gösteren hava kütlelerinin etkisinde kalır. 1975-2010 yılları arası gerçekleşen değerler ortalaması; Aylık ortalama yağış miktarı 41 mm'dir. Yağışlar genellikle yağmur biçiminde Aralık, Ocak, Şubat ve Mart aylarında yoğunlaşır. İlde ortalama sıcaklık 17,1 °C' dir. Kış mevsiminin en soğuk günleri Ocak ayında; yaz mevsiminin en sıcak günleri ise Temmuz ve Ağustos aylarındadır.



Şekil 2.1. Kilis ili lokasyon haritası

2.1.6. Meteorolojik Veriler

Mart 2011–Şubat 2012 tarihleri arasında ait meteorolojik veriler Çevre ve Şehircilik Bakanlığı, Ulusal Hava Kalitesi İzleme İstasyonu ve Kilis Meteoroloji Müdürlüğü'nden temin edilmiştir. Sıcaklık, yağış, bağıl nem, rüzgâr hızı ve yönleri ile hava basıncı değerleri aylık olarak çizelge 2.1.de özetlenmiştir.

Çizelge 2.1. Kilis iline ait 2011 yılı Aylık Ortalama Meteorolojik parametreler

| Tarih | PM10 | SO2 | Hava Sıcaklığı | Rüzgâr Yönü | Rüzgâr Hızı | Bağıl Nem | Hava Basıncı | Yağış |
|-----------------|-------------------------|-------------------------|-----------------------|--------------------|--------------------|------------------|---------------------|-------------------------|
| | µg/m³ | µg/m³ | °C | Derece | m/s | % | mbar | Kg/m² |
| Ocak | 66,77 | 8,65 | 8,15 | 192,45 | 2,03 | 64,10 | 941,35 | 52,80 |
| Şubat | 67,26 | 8,50 | 8,73 | 169,11 | 2,16 | 64,01 | 937,39 | 62,90 |
| Mart | 51,54 | 13,66 | 12,88 | 149,45 | 2,22 | 51,31 | 941,31 | 30,10 |
| Nisan | 69,21 | 2,20 | 16,26 | 144,20 | 2,63 | 58,04 | 935,33 | 59,00 |
| Mayıs | 59,87 | 1,23 | 21,25 | 129,71 | 2,62 | 53,58 | 937,03 | 15,00 |
| Haziran | 53,03 | 9,83 | 26,79 | 99,47 | 3,33 | 50,17 | 933,30 | 5,40 |
| Temmuz | 72,71 | 5,81 | 30,42 | 102,23 | 3,38 | 48,45 | 935,23 | 0,00 |
| Ağustos | 60,32 | 11,35 | 30,60 | 102,61 | 3,33 | 49,45 | 936,81 | 2,90 |
| Eylül | 73,35 | 4,29 | 28,11 | 128,12 | 2,62 | 46,99 | 940,18 | 21,10 |
| Ekim | 78,67 | 2,39 | 20,28 | 143,39 | 2,16 | 45,99 | 945,48 | 20,10 |
| Kasım | 67,59 | 14,93 | 10,44 | 177,03 | 1,91 | 54,42 | 947,33 | 106,60 |
| Aralık | 113,74 | 15,85 | 8,54 | 184,52 | 1,73 | 59,20 | 950,13 | 82,60 |
| Ortalama | 69,51 | 8,22 | 18,54 | 143,52 | 2,51 | 53,81 | 940,07 | 38,21 |

2.2. Yöntem

Çalışma, 2012 yılı Ocak-Nisan ayları arasında gerçekleştirilmiş olup zeytin fidanları, 4 aylık süre boyunca uzun dönem tuz stresine maruz bırakılmışlardır. Arazi çalışmaları ve tuz uygulamalarından sonra çeşitlerin fizyolojik gelişimleri incelenmiştir.

2.2.1. Arazi Çalışmaları ve Tuz Uygulamaları

Arazi çalışmaları, Kilis 7 Aralık Üniversitesi Tarımsal Uygulama ve Araştırma Merkezi serasında yürütülmüştür. Özel olarak hazırlanan harç toprağı (toprak, kum ve yanmış hayvan gübresi) ile doldurulan saksılara birer adet zeytin fidanı dikilip saksılar seraya yerleştirilmiştir. Deneme faktörü olarak, sodyum klorürün kontrol ile birlikte 2 değişik konsantrasyonu (0, 75 ve 150 mM) ve üç farklı zeytin çeşidi (Gemlik, Kilis Yağlık ve Nizip Yağlık) kullanılmıştır. Denemeler istatistiksel analizlerin sağlıklı olarak yapılabilmesi açısından üç tekrarlamalı olarak yürütülmüştür.

2.2.2 Fizyolojik Parametrelerin Belirlenmesi

Uygulamalar sonrasında fizyolojik parametrelerin belirlenmesi amacıyla çeşitlerin yapraklarındaki klorofil miktarları, fenolik maddeler ve protein içerikleri belirlenen yöntemlere göre analiz edilmiştir.

2.2.2.1. Fotosentetik pigmentlerin belirlenmesi

Klorofil a, klorofil b ve klorofil a/b oranı Arnon (1949)'e göre belirlenmiştir. Bu amaçla; yaprak dokuları (10 mg) sıvı nitrojende öğütülmüş ve içinde 1 ml %80'lik aseton olan ependorf tüplerine hemen aktarılmıştır. Örnekler 15 dakika 12.000 rpm'de santrifüj edildikten sonra, üst fazı kullanılmak üzere alınmıştır. Absorbansı 663 nm ile 645 nm 'de ölçülmüştür. Toplam klorofil ve klorofil a ve b pigmentlerinin

konsantrasyonları aşağıdaki eşitliklere göre ölçülmüştür. Ölçümde kontrol olarak 600 µl % 80'lik aseton kullanılmıştır. Örnekler 600 µl klorofil kurvesinde ölçülmüştür.

$$\text{Toplam Klorofil (mg/L)} = 8.02_{A663} + 20.2_{A645}$$

$$\text{Klorofil a (mg/L)} = 12.7_{A663} - 2.69_{A645}$$

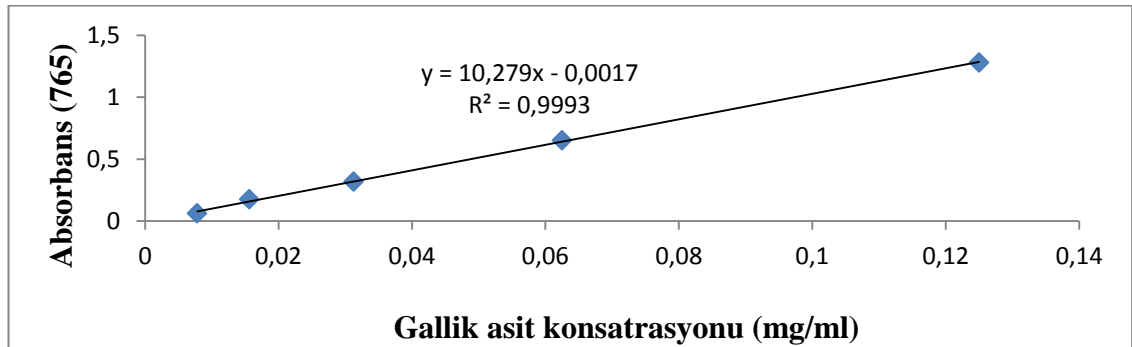
$$\text{Klorofil b (mg/L)} = 22.9_{A645} - 4.68_{A663}$$

2.2.3. Bitki Ekstrelerinin Hazırlanması ve Analizi

Stres koşullarına maruz bırakılan zeytin çeşitlerinden alınan yaprak örnekleri ilk olarak oda koşullarında kurutulduktan sonra blender cihazı ile öğütülmüştür. Toz haline getirilen zeytin yapraklarından 5 g tartılıp ağzı kapalı beherde yirmi katı saf metanol ile (100 ml) sallama ünitesinde (shaker) 24 saat süre ile karıştırılmıştır. Daha sonra elde edilen ham çözelti süzgeç kâğıdından süzölmüştür. Elde edilen süzöntü 250 ml'lik balonlara aktarılmış ve bütün çözücüsü uzaklaşmıca kadar Rotary evaporatörde vakumu yapılmıştır..

2.2.3.1. Toplam Fenol İçeriğinin Belirlenmesi

Toplam polifenol analizi spektrofotometrik Folin-Ciocalteu yöntemine göre (Singleton ve ark., 1999) yapılmıştır. Bu analiz için standart gallik asit çözeltisinin 0,007813-0,125 mg/ml aralığındaki 5 farklı konsantrasyonu ile bir kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir ($R^2=0.9993$). Sonuçlar elde edilen eğrinin regresyon eşitliğinden yararlanılarak hesaplanmış ve mg gallik asit eşdeğeri (GAE) olarak ifade edilmiştir (Şekil 2.2).



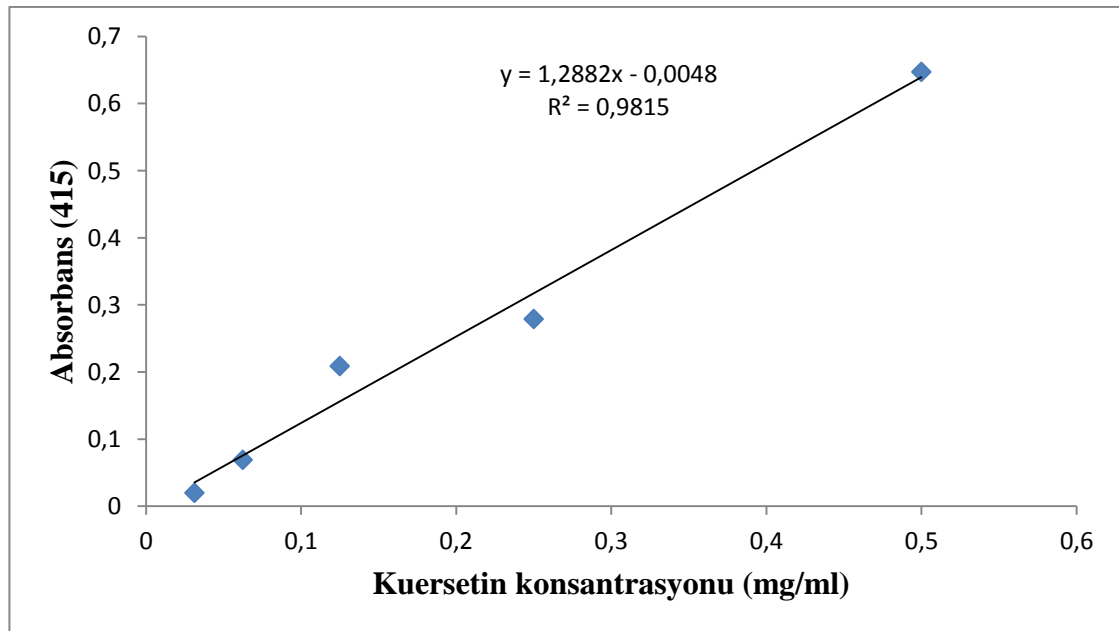
Şekil 2.2. Gallik asit standart kalibrasyon eğrisi

Bu yöntemde 1 mg/ml'ye metanol ile seyreltilmiş 0,5 ml yaprak ekstraktı 2,5 ml Folin-Ciocalteu reaktifi (% 10'luk) ile karıştırılmıştır. Bu karışım üzerine 2,5 ml % 7,5'lik doygun sodyum karbonat çözeltisi ilave edilerek iyice karıştırılmıştır. Elde edilen karışım inkübatörde 45°C'de 45 dakika beklenildikten sonra oluşan mavi rengin absorbansı spektrofotometrede 765 nm'de okunmuştur.

2.2.3.2. Toplam Flavonoid İçeriğinin Belirlenmesi

Toplam flavanoid analizi spektrofotometrik olarak belirlenmiştir (Kumaran ve Karunakaran, 2006). Bu analiz için standart Kuersetin (quercetin) çözeltisinin 0,03125-0,5 mg/ml aralığındaki 5 farklı konsantrasyonu ile bir kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir ($R^2 = 0,9815$). Sonuçlar elde edilen eğrinin regresyon eşitliğinden yararlanılarak hesaplanmış ve mg kuersetin eşdeğeri (QE) olarak ifade edilmiştir (Şekil 2.3).

Bu yöntemde 10 mg/ml'ye metanol ile seyreltilmiş 100 µl bitki ekstraktı %20' lik 100 µl alüminyum klorür ile karıştırıldıktan sonra bu karışıma 1 damla asetik asit eklenmiştir. Toplam hacim 5 ml olacak şekilde metanol ile tamamlanıp oda koşullarında 40 dakika beklenildikten sonra absorbans spektrofotometrede 415 nm'de okunmuştur.



Şekil 2.3. Kuersetin standart kalibrasyon eğrisi

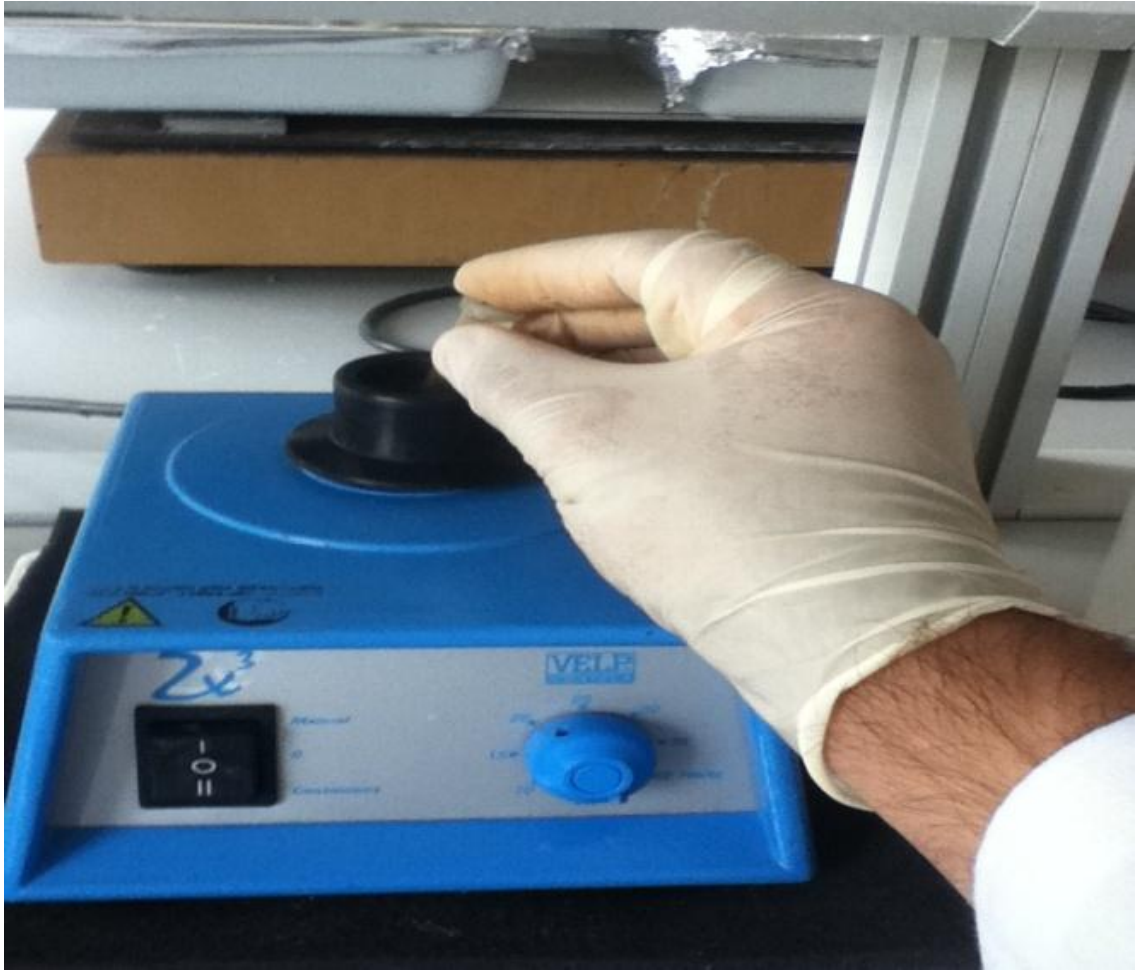
2.2.3.3. Protein Miktarının Belirlenmesi

Protein miktarı Bradford methoduyla (Bradford, 1976) belirlenmiştir. Farklı dozlarda uygulanan tuz konsantrasyonlarındaki zeytin çeşitlerinden alınan yaprak örnekleri ayrı ayrı sıvı nitrojende toz haline gelinceye kadar öğütülmüştür (Resim 2.1). Öğütülen her örnek 2 mL'lik ependorf tüplerine alınıp, üzerine 1 mL %10'luk TCA-Aseton eklenerek vortekslenmiştir (Resim 2.2). Örneklere daha sonra +4 °C de 10'ar saniyelik 3'er defa sonikasyon yapılmıştır (Resim 2.3). Ependorf tüpleri TCA-Aseton'la tamamen doldurulmuştur. Vorteksleme ve +4 °C 'de 12.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlemeden sonra üst faz dökülmüştür. Örneklere 2 mL % 80'lik metanolde amonyum asetat eklenmiş ve tekrar vortekslenip, santrifüjlenmiştir (Resim 2.4) . Üst faz döküldükten sonra korunan pellet üzerine 2 mL'lik % 80'lik aseton eklenip iyice vortekslenmiştir.+4°C'de 12.000 rpm'de 5 dakika santrifüjleme işleminden sonra üst faz dökülmüştür. Pelletler oda koşullarında kurumaya bırakılmıştır.



Resim 2.1.Zeytin Yapraklarının Sıvı Nitrojen İçinde Toz Haline Getirilişi

600 µL SDS tamponu %5'lik DTT (30 µL) ile 600 µL Fenol iyice karıştırılarak karışım hazırlanmıştır. Bu karışım kurumaya bırakılan örneklere eklenip, buzdolabında 5 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Sonra +4 °C'de 12.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Daha sonra üst faz olan fenolik faz pipetle alınıp yeni tüplere aktarılmıştır. Üstlerine 1 mL çökeltme tamponu eklenip gece boyunca -20 °C'de derin dondurucuda bekletilmiştir. Bekletilen örnekler sonraki gün alınıp +4 °C de 12.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilip, üst faz dökülüp geri kalan pellet korunmuştur. Örnekler üzerine % 100 Metanol eklenip, vorteksleme ve santrifüj işlemleri tekrarlanmıştır. Daha sonra % 80 Aseton eklenerek vortekslenip santrifüj edilmiştir. Sonra oda koşullarında kurumaya bırakılmıştır. Örnekler Protein Çözünme Tamponu eklenip (0,015 gram DTT eklendi) çalkalayıcı vortekste +4 °C de 2 saat bekletilmiştir. Örnekler daha sonra fotometre cihazında okutulmuştur (Resim 2.5).



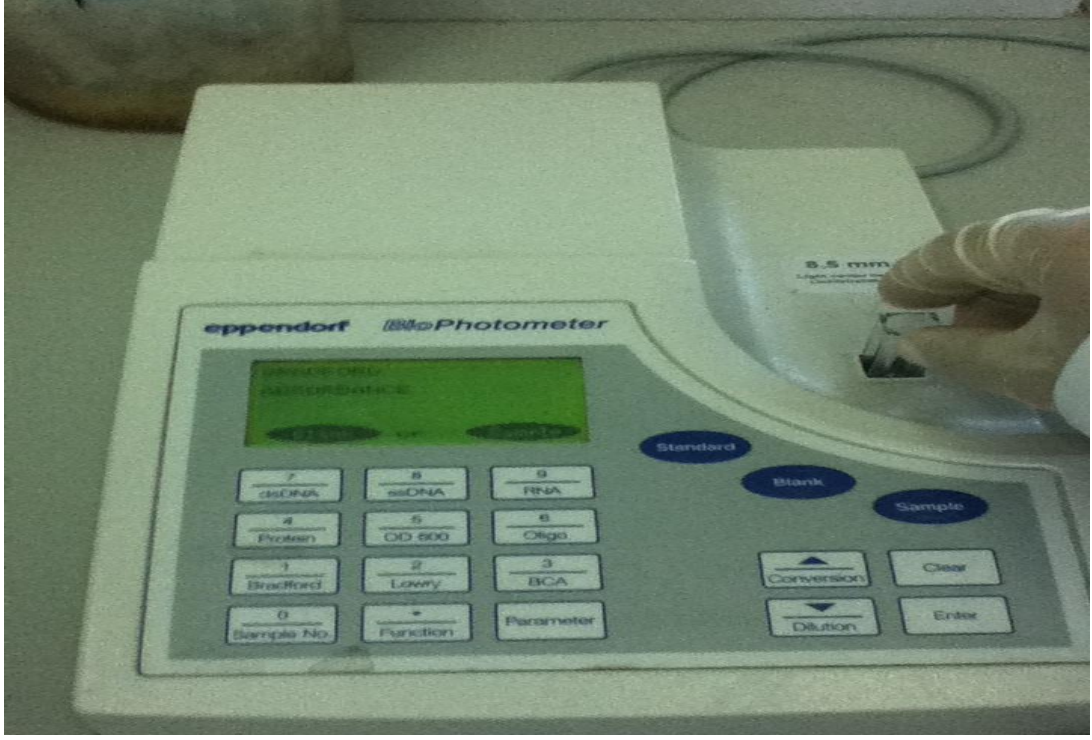
Resim 2.2. Örneklerin Vortekslenmesi



Resim 2.3.Örneklerin 10'ar Saniye Sonikasyonun Yapılması



Resim 2.4. Örneklerin Santrifüjlenmesi



Resim 2.5. Örneklerin Küvetler İçinde Fotometre Cihazında Protein Miktarının Ölçülmesi

2.2.4. İstatistiksel Değerlendirme

Araştırma sonucunda elde edilen veriler Tesadüf bloklarında Bölünmüş Parseller Deneme Desenine göre varyans analizine tabi tutulmuştur. Önemli görülen uygulamaların karşılaştırması için varyans analizinden yararlanılmıştır. Tüm istatistikî hesaplamalar bilgisayarda MSTAT-C paket programı kullanılarak yapılmıştır.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada, kullanımı milattan önceki çağlara dayanan, tıbbi ve ekonomik anlamda öneme sahip olan *Olea europea* L.'nin Kilis ve çevresinde kültürü yapılan çeşitlerinin (Gemlik, Kilis Yağlık ve Nizip Yağlık) fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerine sodyum klorürünün (NaCl) farklı düzeylerinin (0, 75 ve 150 mM) karşılaştırılmalı etkisi incelenmiştir. Bitki doku ya da hücrelerinde meydana gelen değişimlere bağlı olarak, bitkinin sahip olduğu biyolojik aktivite potansiyelinde de değişimlerin olup olmadığı tespit edilmiştir. Bu amaçla; çalkalama (shaker) yöntemi kullanılarak elde edilen zeytin yaprağı ekstralarının, uygulanan tuz düzeylerine bağlı olarak antimikrobiyal ve antioksidant potansiyelleri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Giderek artan çoraklık ve kuraklık koşullarında önemli biyoaktif sekonder metabolit üretimi yapabilen ve daha fazla tolerans aralığında yetişebilen zeytin çeşitlerinin belirlenmesi ve tarımsal alanda üretimi ve yetiştirilmesinin teşvik edilmesi çalışmanın temel amacını oluşturmaktadır.

3.1.Fotosentetik pigmentlerin belirlenmesi

Tuzlu koşulların zeytin çeşitlerinin klorofil (a), klorofil (b) ve toplam klorofil üzerine etkisine ilişkin varyans analiz sonuçları çizelge 3.1.1, 3.1.2, ve 3.1.3'de verilmiştir. Bitkilerde klorofil miktarlarının belirlenmesi fotosentez kapasitesinin belirlenmesinde önemli bir göstergedir (Güzel, 2006). Farklı tuz düzeylerinin fotosentetik pigmentlere etkisine ilişkin elde edilen bulgular Çizelge 3.1.4, 3.1.5, 3.1.6'da ve Şekil 3.1.1, 3.1.2 ve 3.1.3'de gösterilmiştir.

Test edilen her üç zeytin çeşidinde de uygulanan tuz düzeyleri ile yaprak pigment miktarlarında önemli değişimler belirlenmiştir ($P \leq 0.01$). Her ne kadar sentezlenen klorofil (a), klorofil (b) ve toplam klorofil miktarları bakımından sayısal ve istatistiksel olarak önemli farklar belirlense de, tüm zeytin çeşitlerinde en yüksek fotosentetik klorofil miktarlarına 75 mM ve en düşük miktarlar ise 150 mM'lik tuz uygulamasında saptanmıştır. Ancak, Khashab (1997), Atia (2002), Melgar ve ark.(2008), Shaheen ve ark. (2011) farklı zeytin çeşitlerinde artan tuz dozları ile klorofil (a), (b) ve toplam klorofil miktarında azalma olduğunu belirtmişlerdir

Çizelge 3.1.1. Farklı Tuzluluk Koşulları Altında Yetiştirilen Zeytin Çeşitlerinin Yaprak Klorofil-a İçeriğine İlişkin Varyans Analizi

| VK | SD | KT | KO | F değeri |
|------------|----|--------|-------|-------------|
| Tekerrür | 2 | 5,766 | 2,883 | 829,2212 |
| Çeşit | 2 | 14,094 | 7,047 | 2026,7996 |
| Hata | 4 | 0,014 | 0,003 | |
| Doz | 2 | 4,0,39 | 2,02 | 1,42126E+14 |
| ÇeşitX Doz | 4 | 2,343 | 0,586 | 4,12237E+13 |
| Hata | 12 | 0,001 | 0,001 | |
| Toplam | 26 | 26,257 | | |

Varyasyon katsayısı: % 0,00; VK: Varyasyon Kaynakları; SD: Serbestlik Derecesi; KT: Kareler Toplamı; KO: Kareler Ortalaması

Çizelge 3.1.2. Farklı Tuzluluk Koşulları Altında Yetiştirilen Zeytin Çeşitlerinin Yaprak Klorofil-b İçeriğine İlişkin Varyans Analizi

| VK | SD | KT | KO | F değeri |
|------------|----|-------|-------|-----------|
| Tekerrür | 2 | 5,699 | 2,849 | 603,6393 |
| Çeşit | 2 | 1,844 | 0,922 | 195,2737 |
| Hata | 4 | 0,019 | 0,005 | |
| Doz | 2 | 0,628 | 0,314 | 2355,8623 |
| ÇeşitX Doz | 4 | 0,342 | 0,086 | 641,8912 |
| Hata | 12 | 0,002 | 0,001 | |
| Toplam | 26 | 8,533 | | |

Varyasyon katsayısı: % 0,62; VK: Varyasyon Kaynakları; SD: Serbestlik Derecesi; KT: Kareler Toplamı; KO: Kareler Ortalaması

Çizelge 3.1.3. Farklı Tuzluluk Koşulları Altında Yetiştirilen Zeytin Çeşitlerinin Yaprak Toplam Klorofil İçeriğine İlişkin Varyans Analizi

| VK | SD | KT | KO | F değeri |
|------------|----|--------|--------|----------|
| Tekerrür | 2 | 3,799 | 1,899 | 151,6164 |
| Çeşit | 2 | 21,119 | 10,559 | 86,8184 |
| Hata | 4 | 0,487 | 0,122 | |
| Doz | 2 | 11,353 | 5,676 | 38,3160 |
| ÇeşitX Doz | 4 | 4,588 | 1,147 | 7,7427 |
| Hata | 12 | 1,778 | 0,148 | |
| Toplam | 26 | 43,123 | | |

Varyasyon katsayısı: % 6,73; VK: Varyasyon Kaynakları; SD: Serbestlik Derecesi; KT: Kareler Toplamı; KO: Kareler Ortalaması

Çizelge 3.1.4 Farklı NaCl Dozlarında Zeytin Çeşitlerinin klorofil (a), klorofil (b) ve Toplam Klorofil Miktarı

| Zeytin Çeşitleri | NaCl (mM) | Klorofil a | Klorofil b | Toplam Klorofil |
|------------------|-----------|------------|------------|-----------------|
| Gemlik | 0 | 3,060 H | 1,547 F | 4,626 CD |
| | 75 | 3,520 F | 1,682 E | 5,201 C |
| | 150 | 2,708 I | 1,455 G | 4,163 D |
| Kilis Yağlık | 0 | 4,753 D | 2,148 C | 6,899 AB |
| | 75 | 4,967 B | 2,288 A | 7,254 AB |
| | 150 | 4,837 C | 2,161 BC | 6,329 B |
| Nizip Yağlık | 0 | 4,102 E | 1,796 D | 4,897 CD |
| | 75 | 5,133 A | 2,227 AB | 7,358 A |
| | 150 | 3,253 G | 1,474 FC | 4,726 CD |

EGF(%1) : Çeşit X Doz İnteraksiyonu: Klorofila : 0,0788 Klorofil b : 0,0788 Toplam Klorofil : 0,959 Aynı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark kendi grubu için önemli değildir.

Klorofil biyosentezinden sorumlu öncü enzimlerin (chlorophyllase ve 5-aminolaevulinic acid) orta şiddetteki tuz uygulamalarında miktarında artış olduğu ve artan tuz düzeyi ile birlikte bu öncü enzimlerin inhibe edildiği ve sonuç olarak klorofil pigmentlerinin degradasyona uğradığı bildirilmiştir (Santos, 2004).

Çizelge 3.1.5 Farklı NaCl Dozlarında Klorofil a, klorofil b ve Toplam Klorofil Miktarı

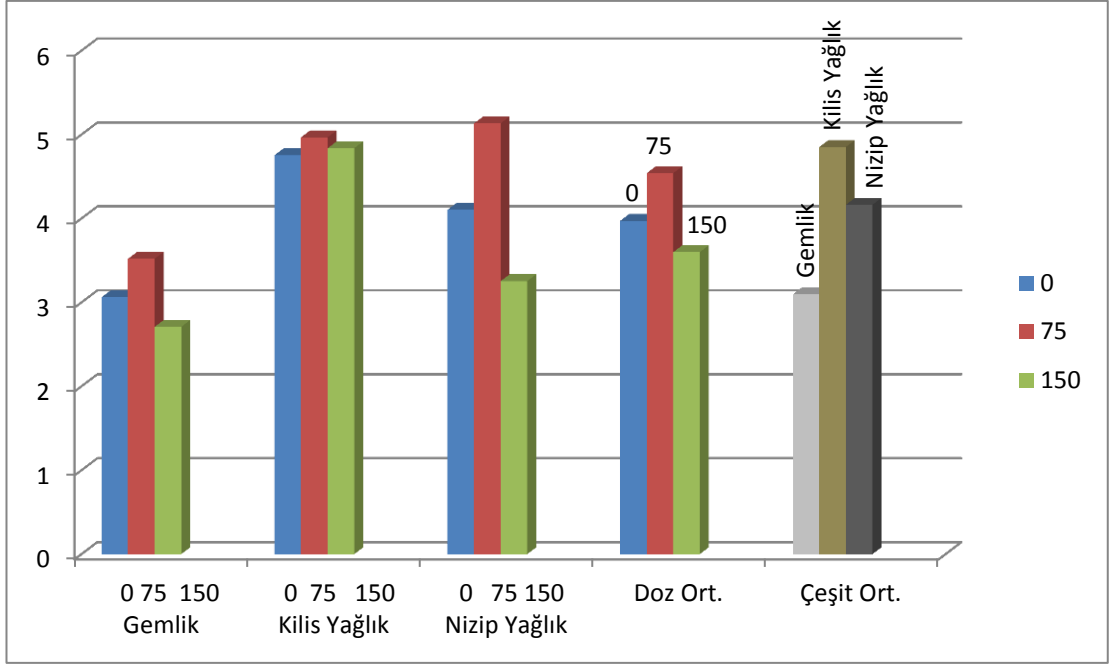
| DOZ NaCl (mM) | Klorofil a | Klorofil b | Toplam Klorofil |
|---------------|------------|------------|-----------------|
| 0 | 3,972 B | 1,830 B | 5,474 B |
| 75 | 4,540 A | 2,066 A | 6,604 A |
| 150 | 3,599 C | 1,697 C | 5,073 B |
| EGF (%1) | 0,0455 | 0,0455 | 0,5539 |

Aynı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark kendi grubu için önemli değildir.

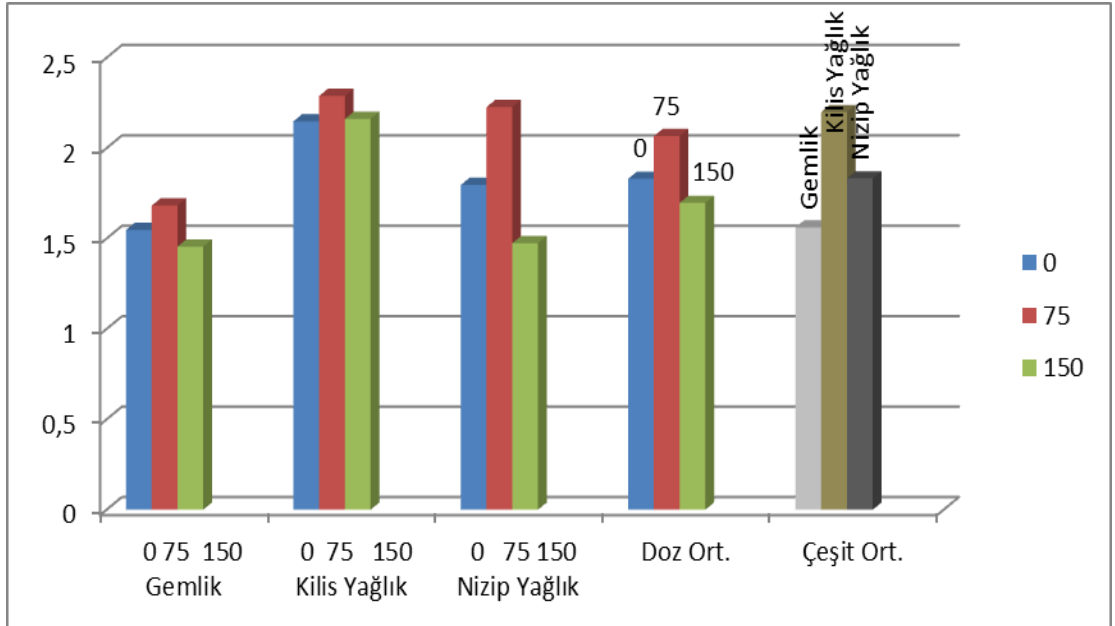
Çizelge 3.1.6 Farklı Zeytin Çeşitlerinin Klorofil a, Klorofil b ve Toplam Klorofil Miktarı

| ÇEŞİT | Klorofil a | Klorofil b | Toplam Klorofil |
|--------------|------------|------------|-----------------|
| Gemlik | 3,096 C | 1,561 C | 4,663 C |
| Kilis Yağlık | 4,852 A | 2,199 A | 6,827 A |
| Nizip Yağlık | 4,163 B | 1,832 B | 5,660 B |
| EGF (% 1) | 0,1189 | 0,1535 | 0,7581 |

Aynı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark kendi grubu için önemli değildir.



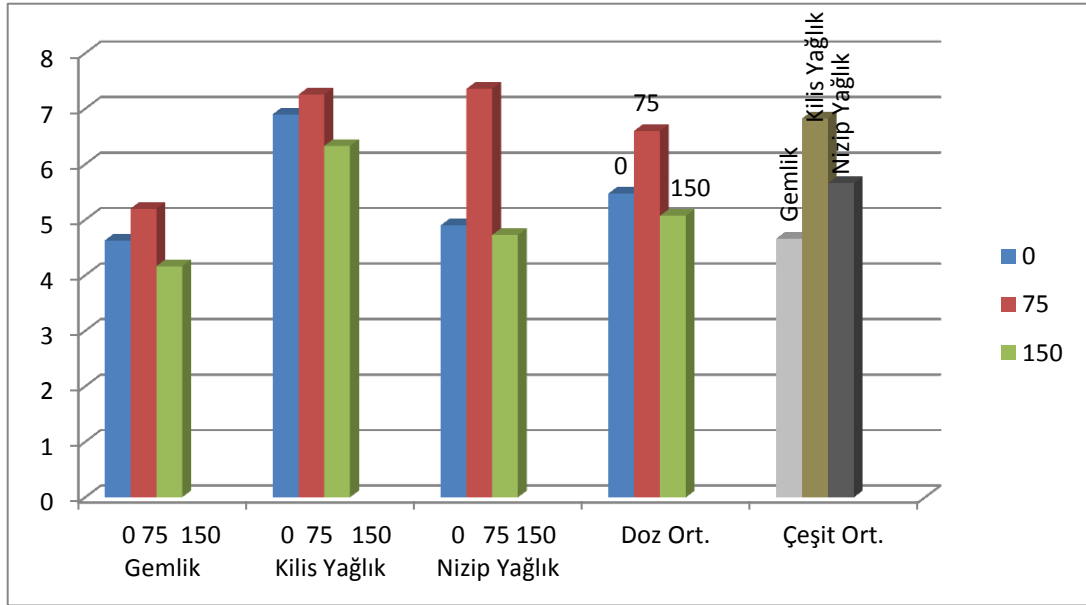
Şekil 3.1.1. Farklı NaCl Dozlarında Zeytin Çeşitlerinin Klorofil a Miktarları(mg/L)



Şekil 3.1.2. Farklı NaCl Dozlarında Zeytin Çeşitlerinin Klorofil b Miktarları(mg/L)

Aynı zamanda oluşan reaktif oksijen türleri de klorofil degradasyona neden olmaktadır. Halofit karakterli olan bitkilerin klorofil içeriklerini daha fazla koruduğu bildirilmiştir (Sevengor ve ark., 2011).

Yüksek düzeydeki tuz konsantrasyonu hücre içi iyon dengesizliği ile iyon toksisitesine ve osmotik strese neden olmaktadır. Sonuç olarak DNA, protein ve lipid biyosentezine olumsuz etki oluşturan reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşmasına neden olur (Yaşar ve ark., 2006).



Şekil 3.1.3. Farklı NaCl Dozlarında Zeytin Çeşitlerinin Toplam Klorofil Miktarları (mg/L)

3.2.Fenolik Bileşiklerin ve Proteinin Belirlenmesi

Tuzlu koşulların zeytin çeşitleri yapraklarının fenolik madde içeriğine etkisine ilişkin varyans analiz sonuçları çizelge 3.2.1 ve 3.2.2’de verilmiştir. Farklı tuz düzeylerinin fenolik madde ve protein içeriğine etkisine ilişkin elde edilen bulgular Çizelge 3.2.3, 3.2.4, 3.2.5’de ve Şekil 3.2.1, 3.2.2 ve 3.2.3’de gösterilmiştir.

Fenolik bileşikler zeytin kalitesinin belirlenmesinde önemli bir göstergeler olup oleuropein gibi bazı özel fenoller renk, tat ve lezzet gibi bazı kalite özelliklerini etkilemektedir (Turan, 2005). Zeytin yapraklarındaki fenolik bileşikler, oleuropein, genetik faktör, hasat zamanı, renk ve yaşı gibi pek çok faktörden önemli oranda etkilendiği bildirilmiştir (Ranalli ve ark., 2006; Saygın, 2009). Yapılan çalışmada NaCl farklı doz uygulamalarının, Gemlik, Nizip ve Kilis Yağlık zeytin çeşitlerinin fenolik madde ve

protein düzeyine etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmaz iken, toplam flavonoid düzeyine etkisi farklı olmuştur

Yaprakların toplam fenol içeriği yönünden çeşitlerin ve dozların etkisi istatistiksel olarak önemli olmamasına karşın, en yüksek toplam fenol değeri 150 mM tuz dozunda ve Nizip Yağlık çeşidinde bulunmuştur. Fenoller biyotik ve abiyotik stres faktörlerine cevapta rol oynayan bileşiklerdir (Ruiz ve Romero, 2001; Doğan, 2005). Birçok araştırmacı, fenolik bileşik sentez ve birikiminin biyotik ve abiyotik faktörlere bağlı olarak uyarılabileceğini bildirmişlerdir (Dixon ve Paiva, 1995; Naczki ve Shahidi, 2004). Ancak farklı tür ve genotipler üzerinde yapılan çalışmalarda da artan stres faktörleri ile toplam fenolik madde içeriğinde azalmalar olabileceği de saptanmıştır.

Çizelge 3.2.1. Farklı Tuzluluk Koşulları Altında Yetiştirilen Zeytin Çeşitlerinin Yaprak Toplam Fenol İçeriğine İlişkin Varyans Analizi

| VK | SD | KT | KO | F değeri |
|------------|----|----------|---------|----------|
| Tekerrür | 2 | 30,745 | 15,372 | 0,1906 |
| Çeşit | 2 | 22,419 | 11,210 | 0,1390 |
| Hata | 4 | 322,537 | 80,634 | |
| Doz | 2 | 223,410 | 111,705 | 2,9912 |
| ÇeşitX Doz | 4 | 200,956 | 50,239 | 1,3453 |
| Hata | 12 | 448,135 | 37,345 | |
| Toplam | 26 | 1248,202 | | |

Varyasyon katsayısı: % 2,74; VK: Varyasyon Kaynakları; SD: Serbestlik Derecesi; KT: Kareler Toplamı; KO: Kareler Ortalaması

Ancak, NaCl tuz çeşidi ile oluşturulmuş stres koşullarında toplam fenolik madde miktarının, farklı zeytin çeşitlerinde koruyucu bir rolü olmadığı tespit edilmiştir. Yürütülecek daha özel bir çalışma, stres koşullarına karşı dirençliliği artıran fenolik bileşiklerin tespit edilmesi konunun aydınlatılmasına katkıda bulunacaktır. Nitekim, tuzlu koşullar altında yetiştirilen, *Nigella sativa*L.'nin toplam fenol ve flavanoid içerikleri önemli ölçüde azalırken, tuzluluk, quercetin, apigenin and trans-cinnamic acid gibi bazı önemli fenolik bileşiklerin biyosentezini arttığı tespit edilmiştir (Bourgou ve ark., 2009).

Tuzlu stres koşullarının *Cynara scolymus* L.'nin toplam fenol ve flavanoid içeriğinde önemli artış göstermesinin yanında kafeik asit ve klorojenik asid gibi fenoliklerin birikimide olumlu etkilenmiştir (Rezazadeh ve ark., 2012).

Çizelge 3.2.2. Farklı Tuzluluk Koşulları Altında Yetiştirilen Zeytin Çeşitlerinin Yaprak Toplam Flavonoid İçeriğine İlişkin Varyans Analizi

| VK | SD | KT | KO | F değeri |
|------------|----|----------|---------|----------|
| Tekerrür | 2 | 2,562 | 1,281 | 1,3636 |
| Çeşit | 2 | 812,869 | 406,434 | 432,5631 |
| Hata | 4 | 3,758 | 0,940 | |
| Doz | 2 | 255,501 | 127,750 | 157,7053 |
| ÇeşitX Doz | 4 | 320,260 | 80,065 | 98,8386 |
| Hata | 12 | 9,721 | 0,810 | |
| Toplam | 26 | 1404,671 | | |

Varyasyon katsayısı: % 1,96; VK: Varyasyon Kaynakları; SD: Serbestlik Derecesi; KT: Kareler Toplamı; KO: Kareler Ortalaması

Kuraklık (Grace, 2005) ve yüksek radyasyon (Bidel ve ark., 2007) ile oluşturulmuş stres ortamlarında da bazı önemli fenoliklerin biriktiği bildirilmiştir. Ksouri ve ark. (2007), Cakile maritima (cv. Tabarka) yapraklarında toplam fenolik madde içeriğinin artan tuz dozları ile azaldığını belirtmiştir. Öte yandan, fenolik madde birikimi ve tuzluluğa tolerans arasında pozitif bir korelasyonunun olduğunu belirten çalışmalar da bulunmamaktadır. Farklı dut genotipleri üzerinde yapılan çalışmada artan tuz düzeyi ile fenolik madde birikiminin artışı bildirilmiştir (Agastian ve ark., 2000).

Gemlik çeşidinde artan tuz düzeyi ile birlikte toplam flavanoid madde içeriğinde azalmalar görülmüştür. Toplam flavanoid yönünden dozların ve çeşitlerin etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. En yüksek flavanoid değeri 50,13 mg/g QE ile 150 mM tuz dozunda, 51,74 mg/g QE ile Gemlik çeşidinden elde edilmiştir. Çeşitlerde artan tuz konsantrasyonu ile toplam flavanoid miktarında önemli artış belirlenmiştir. Uygulanan dozlar arasında istatistiksel olarak önemli farklılıklar saptanmıştır ($p < 0,01$). Nizip Yağlık çeşidinde ise en yüksek miktar 150 mM'lik tuz uygulamasında elde edilmiştir. Tüm çeşitler arasında istatistiksel olarak önemli farklılıklar belirlenmiştir.

Çizelge 3.2.3 Farklı NaCl Dozlarında Zeytin Çeşitlerinin Yapraklarındaki Toplam Fenol, Toplam Flavanoid(mg/g QE) ve Protein Miktarı

| Zeytin Çeşitleri | NaCl (mM) | Toplam Fenol | Toplam Flavanoid | Protein Miktarı |
|---------------------|-----------|--------------|------------------|-----------------|
| Gemlik | 0 | 219,41 | 53,30 B | 0,031 |
| | 75 | 220,39 | 51,48 BC | 0,059 |
| | 150 | 226,39 | 50,42 C | 0,031 |
| Kilis Yağlık | 0 | 224,63 | 35,80 G | 0,024 |
| | 75 | 216,46 | 37,30 FG | 0,062 |
| | 150 | 230,64 | 42,77 E | 0,024 |
| Nizip Yağlık | 0 | 226,71 | 46,51 D | 0,016 |
| | 75 | 222,21 | 39,39 F | 0,027 |
| | 150 | 223,11 | 57,18 A | 0,024 |

EGF(%1) ÇeşitXDoz İnteraksiyonu : T. Fenol: 15,24(Ö.D.) T. Flavanoid : 2,245 Protein : 0,0788 (Ö.D.) Aynı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark kendi grubu için önemli değildir.

Çizelge 3.2.4 Farklı NaCl Dozlarında Toplam Fenol, Toplam Flavanoid ve Protein Miktarı

| DOZ NaCl (mM) | Toplam Fenol | Toplam Flavanoid | Protein Miktarı |
|-----------------|--------------|------------------|-----------------|
| 0 | 223,65 | 45,22 B | 0,024 |
| 75 | 219,69 | 42,72 C | 0,049 |
| 150 | 226,71 | 50,13 A | 0,026 |
| EGF (%1) | Ö.D. | 1,296 | Ö.D. |

Aynı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark kendi grubu için önemli değildir.

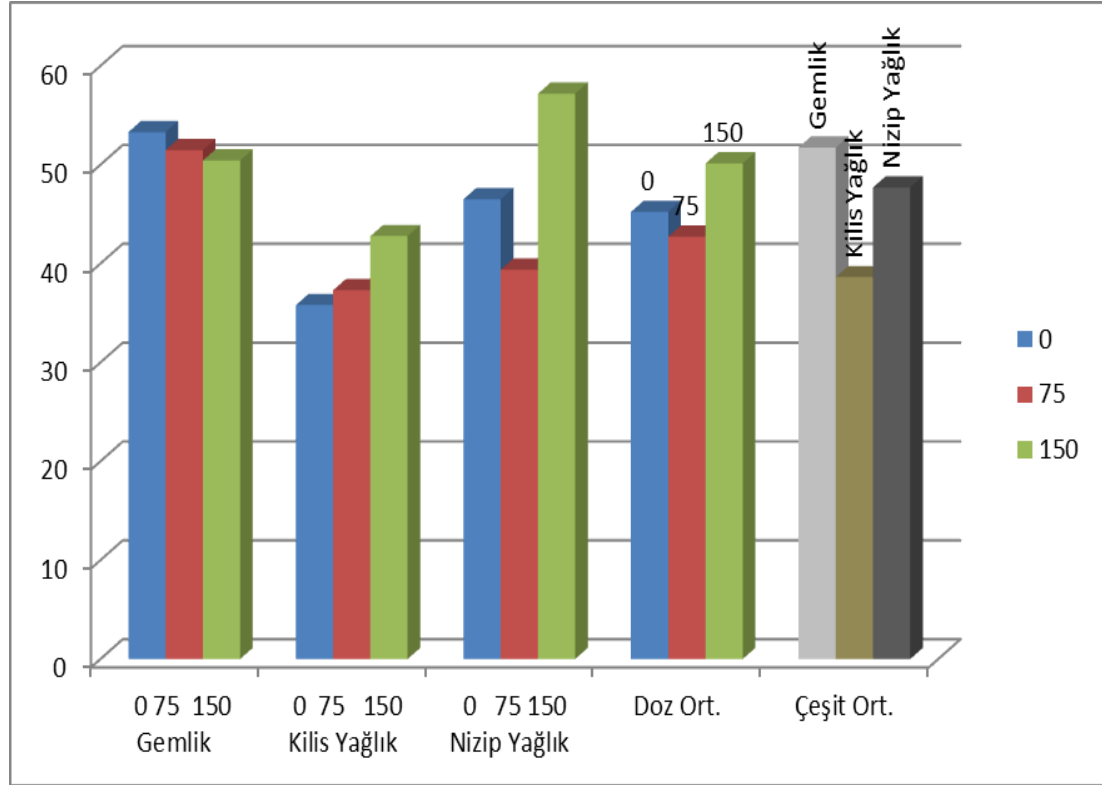
Stres koşullarının, flavanoid madde biyosentezi ya da strese karşı rollerinin aydınlatılmasına yönelik yapılan çalışmalar bulunmamaktadır. (Ali ve Abbas, 2003; Rezazadeh ve ark., 2012). Tuzlu koşullar altında flavonoid madde miktarının arttığı ve lipid peroksidasyonunun azaldığı ve bu iki parametre negatif bir korelasyonun olduğu da bildirilmiştir (Chutipaijit, 2009). Flavonoidlerin, bitkinin fizyolojik performansını etkileyerek strese karşı tolerans kabiliyetini artırdığı bildirilmiştir (Chutipaijit, 2009).

Tuzlu koşulların protein miktarı üzerinde ve çeşitler arasında etkisi önemli bulunmamıştır ve varyans analiz tablosu çizelge 3.2.6’da verilmiştir. Bunun yanında en yüksek protein miktarı 75 mM tuz dozunda bulunurken, çeşitlerde en az Nizip Yağlık çeşidinden elde edilmiştir. Artan tuz dozları, asidik ve alkalın proteazların aktivitesini artışıının, toplam protein miktarını azaltabileceği bildirilmiştir. (Parida ve ark., 2004)..

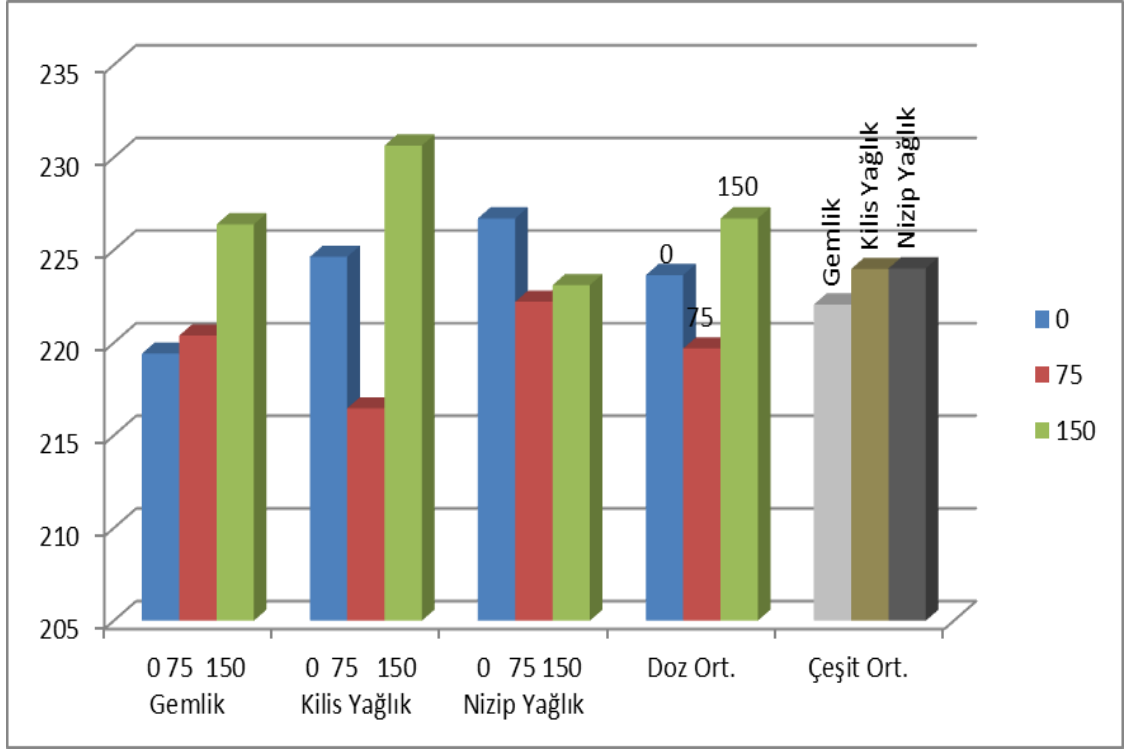
Çizelge 3.2.5 Farklı Zeytin Çeşitlerinde Toplam Fenol, Toplam Flavanoid ve Protein Miktar

| ÇEŞİT | Toplam Fenol | Toplam Flavanoid | Protein Miktarı |
|--------------|--------------|------------------|-----------------|
| Gemlik | 222,06 | 51,74 A | 0,040 |
| Kilis Yağlık | 223,98 | 38,62 C | 0,037 |
| Nizip Yağlık | 224,01 | 47,70 B | 0,023 |
| EGF (%1) | Ö.D. | 2,104 | Ö.D. |

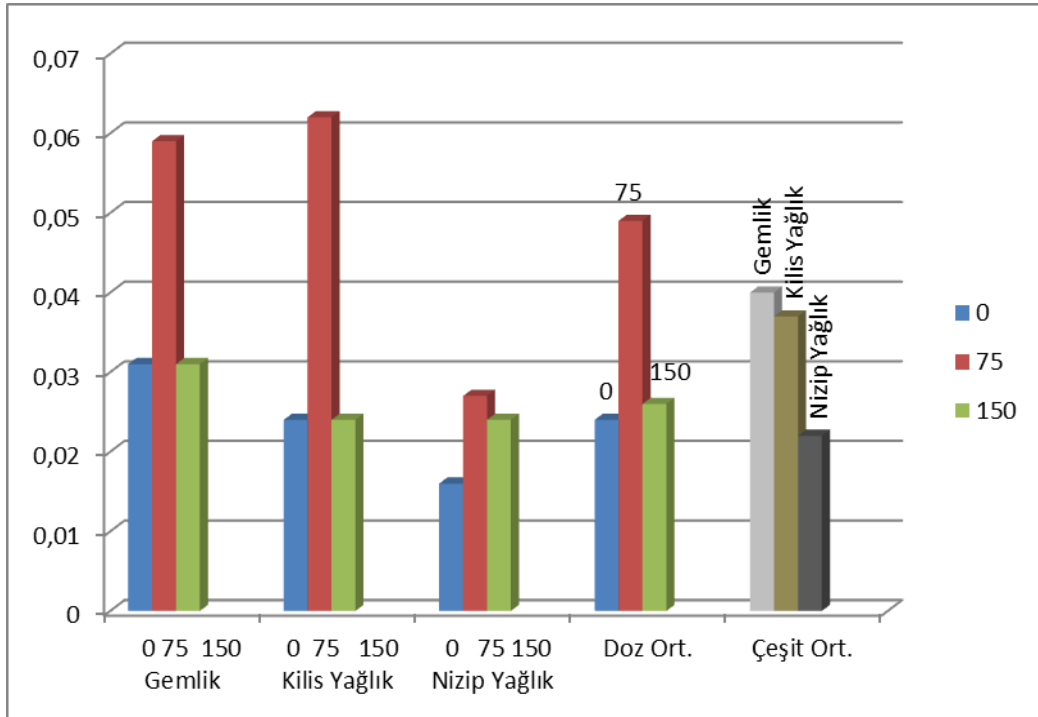
Aynı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark kendi grubu için önemli değildir.



Şekil 3.2.1. Farklı NaCl Dozlarında Zeytin Çeşitlerinin Yaprak Flavanoid Miktarları (mg/g QE)



Şekil 3.2.2. Farklı NaCl Dozlarında Zeytin Çeşitlerinin Yaprak Toplam Fenol Miktarları (mg/g GAE)



Şekil 3.2.3. Farklı NaCl Dozlarında Zeytin Çeşitlerinin Yaprak Protein Miktarları (µg/ml)

Tuz dozlarının artması toplam protein miktarı üzerinde azalmalara neden olsa da serbest amino asit miktarını etkileyebileceği bildirilmiştir (Parida et al., 2002). Bu amaçla, tuzlu koşullara karşı ozmotik düzenleme yapılmıştır. Asidik ve alkalın proteaz aktivitesindeki artış serbest amino asit miktarını artırıp stres koşullarına direnç sağlamaktadır (Parida et al., 2002; Parida ve ark., 2004).

4.SONUÇLAR

Bu çalışmada sodyum klorürün (NaCl) farklı dozlarının (0, 75 ve 150 mM) *Olea europea* L'nin Gemlik, Kilis Yağlık ve Nizip Yağlık çeşitlerin yapraklarında fizyolojik ve biyokimyasal olarak oluşturduğu etkiler araştırılmıştır. Toplam klorofil miktarı, 75 mM NaCl dozunda en yüksek, 150 mM dozunda en düşük düzeyde belirlenmiştir. Çeşitler bakımından ise en düşük toplam klorofil miktarı Gemlik çeşidinde, en yüksek Kilis Yağlık çeşidinde elde edilmiştir. Çeşitlerin farklı konsantrasyonlardaki tuz dozlarına karşı toplam fenol ve protein içerikleri bakımından fark önemli bulunmamıştır. Toplam flavonoid içerikleri ise 150 mM NaCl dozunda 50,13 mg/g QE ile en yüksek, 47,72 mg/g QE ile 75 mM dozda en az bulunmuştur. Toplam flavonoid miktarı çeşitler arasında da Gemlik çeşidinde en yüksek, Kilis Yağlık çeşidinde en düşük düzeyde tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, tuzlu koşullar altında zeytin yapraklarında klorofil miktarının azaldığı ve çeşitlerin bu konuda farklı tepkiler verdiği, ayrıca tuzlu koşulların yapraklardaki toplam fenol ve protein miktarına etkisinin az olmasına karşın toplam flavonoid miktarı bakımından çeşitlerde ve farklı NaCl dozların arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur.

Araştırmada elde edilen bulgulara göre, tuz koşullarının farklı dozlarda bitkileri etkilediği görülmüştür. Ayrıca, çeşitlerinde bu dozlara karşı tepkisi farklı olmuştur. Tuzlu koşullara karşı bitkilerin bir savunma mekanizması geliştirerek polifenoller bakımından farklı miktarlarda sentezlendiği gözlemlenmiştir. Buna karşılık klorofil bakımından da etkilenecek stres koşullarında fotosentez veriminin düştüğü tahmin edilmektedir.

Yapılacak çalışmalarda, önemli fenolik asit yada flavonoidlerin tespit edilmesi zeytin çeşitlerinin sahip olduğu besinsel, tıbbi ve ekonomik değerinin tespit edilmesi konusunda daha fazla fikir sahibi olunacağı düşünülmektedir. Ayrıca elde edilen bulgular bitki stres fizyolojisinin anlaşılmasına ve bitkilerin stres koşullarına karşı oluşturduğu savunma stratejileri hakkında bilgi vermektedir.

Dolayısıyla, ÷lkemiz topraklarının tuzluluk durumu göz önüne alınarak bu gibi alanlarda dayanıklı bitki türlerini ve çeşitlerini yetiştirmek, yanlış tarımsal uygulamalar sonucu tuzluluğun artmasını önlemek açısından bazı tedbirlerin alınmasını sağlamak ekonomik yetiştiricilik için uygun olacaktır.

5.KAYNAKLAR

- Agastian, P., Kingsley, S.J. ve Vivekananda, M., 2000. Effect of salinity on photosynthesis and biochemical characteristics in mulberry genotypes. *Photosynthetica* 38, 287-290.
- Ali, R.M., Abbas, H.M., 2003. Response of salt stressed barley seedlings to phenylurea. *Plant Soil Environment* 4, 158–162.
- Angelopoulos, K., Dichio, B. Xiloyannis, C., 1996. Inhibition of photosynthesis in olive trees (*Olea europaea* L.) during water stress and rewatering. *Journal of Experimental Botany* 47, 1093-1100.
- Arnon, DI., 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts, polyphenoxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology* 24, 1-15.
- Baytop, T., 1999. Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi (Geçmişte ve Bugün), Nobel Tıp Kitapevleri Ltd. Şti., 2. Baskı. 480 s., İstanbul.
- Ben-Ahmed C, Ben-Rouina B, Sensoy S, Boukhriss M., 2009. Saline water irrigation effects on fruit development, quality and phenolic composition of virgin olive oils, Cv. Chemlali. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(7), 2803–2811.
- Bidel L.P.R., Meyer S., Goulas, Y., Cadot, Y., Cerovic, Z.G., 2007. Responses of epidermal phenolic compounds to light acclimation: in vivo qualitative and quantitative assessment using chlorophyll fluorescence excitation spectra in leaves of three woody species. *Journal of Photochemical and Photobiology B. Biology* 88,163–179.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochemistry* , 72; 248-254.
- Bors, W., Heller, W., Michel, C. Saran, M., 1990. Flavonoids as antioxidants: Determination of radical scavenging efficiencies. *Methods in Enzymology* 186, 343-354.
- Botia, J. M., Ortuno, A., Benavente-Garcia, O., Baidez, A.G., Frias,J., Marcos, D. Del Rio J.A., 2001. Modulation of the biosynthesis of some phenolic compounds in *Olea europaea* L. fruits: Their influence on olive oil quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 355–358.
- Bourgou S, Kchouk ME, Bellila A, Marzouk B., 2010. Effect of salinity on phenolic composition and biological activity of *Nigella sativa*. *Acta Horticulturae* 853, 57-60.
- Canözer, Ö., 1991. Standart Zeytin Çeşitleri Kataloğu. Tarım ve Köy isleri Bakanlığı, Mesleki Yayınlar, No:334-16. Ankara, 107 s.

- Chutipaijit, S., S. Cha-um K. Sompornpailin. 2009. Differential accumulations of proline and flavonoids in Indica rice varieties against salinity. *Pakistan Journal of Botany* 41, 2497-2506.
- Cottele, N., Bernier, J.L., Catteau, J.P., Pommery, P., Wallet, J. C. Gaydou, E.M., 1996. Antioxidant properties of hydroxy-flavones. *Free Radical Biology and Medicine* 20, 35-43.
- DAZB (Dogu Akdeniz Zeytin Birliđi) 2003. Gemlik Zeytin esidine ait esas zellikler. www.dazb.org.tr/upload/gemlik_zeytin_cesidine_ait_esas_ozellikler.pdf.
- Debez, A., Hamed, K., Grignon, B., Abdelly, C., 2004. Salinity effects on germination, growth, and seed production of the halophyte *Cakile maritima*. *Plant and Soil*, 262,179-189.
- Demiral, M.A., Uygun, D.A., Uygun, M., Kasırga, E., Kragzler, A.A., 2009. Biochemical response of *Olea europaea* cv. Gemlik to short-term salt stress. *Turkish Journal of Biology* 35, 433-442.
- Dixon, R.A., Paiva, N., 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7, 1085–1097.
- Doğan, M., 2005. *Ceratophyllum demersum* L.'de Kadmiyum Klorür, Sodyum Klorür ve Bunların Kombinasyonlarının Fizyolojik ve Morfolojik Etkileri. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Ergene, A., 1982. Toprak Bilgisi. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No:267, Ders Kitapları Serisi No:42, Erzurum.
- García J.L., Sarmiento R. and Troncoso A. 2002. Some biochemical differences between juvenile and young olive plant material. *Acta Horticulturae* 586:537-540.
- Grace, S.C., 2005. Phenolics as Antioxidants. In: *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants*, Smirnoff, N. (Ed.). Blackwell Scientific Publishers, Oxford, U.K., pp: 141-168.
- Güneş, A., İnal, A. ve Alpaslan, M., 1996. Effect of salinity on stomal resistance, proline and mineral composition of pepper. *Journal of Plant Nutrition* 19(2), 389-396.
- Huang, M.T., Chang, R.L., Fortner, J.G. Conney, A.H., 1981. Studies on the mechanism of activation of microsomal benzo[a]pyrene hydroxylation by flavonoids. *The Journal of Biological Chemistry* 256 (13), 6829–6836.
- Kalefetoğlu, T., ve Ekmeki, Y., 2005. The effects of drought on plants and tolerance mechanisms (Review). *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 18(4), 723-740.
- Kara, T., 2002. Irrigation Scheduling to Present Soil Salinization from a Shallow Water Table, *Acta Horticulture*, Number 573, 139-151.

Karanlık, S., 2001. Değişik Buğday Genotiplerinde Tuz Stresine Dayanıklılık ve Dayanıklılığın Fizyolojik Nedenlerinin Araştırılması. Ç.Ü. Fen Bil. Enstitüsü (Doktora Tezi, basılmamış), Adana.

Khan, M.A., Irwin, A.U., 1996. Influence of the salinity and temperature on the germination of *Haloxylon recurvum* Bunge Ex.Boiss. *Annals of Botany*, 78, 547-551.

Ksouri, R., Megdiche, W., Debez, A., Falleh, H., Grignon, C., Abdelly, C., 2007. Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritima*. *Plant Physiology and Biochemistry* 45, 244-249.

Kumaran, A. Karunakaran, R.J., 2006. Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of *Coleus aromaticus*. *Food Chemistry* 97, 109 – 114.

Kwiatowsky, J., 1998. Salinity Classification, Mapping and Management in Alberta. <http://www.agric.gov.ab.ca/sustain/soil/salinity/>

Mukhtar, H., Das, M., Khan, W.A., Wang, Z.Y., Bik, D.P., Bickers, D.R., 1988. Exceptional activity of tannic acid among naturally occurring plant phenols in protecting against 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-, benzo(a)pyrene-, 3 methylcholanthrene-, and N-methyl-N-nitrosourea-induced skin tumorigenesis in mice. *Cancer Research* 48 (9), 2361-5.

Naczka, M. Shahidi, F., 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A* 1054 (1-2), 95-111.

Nelson, H., Paris, H.S., 1984. Effects of salinity on germination, seedling growth and yield of melons irrigation. *Science* 5, 265-273.

Neumann, P.M. Volkenburgh, E.V., Cleland, R.E., 1988. Salinity stress inhibits bean leaf expansion by reducing turgor, not wall extensibility. *Plant Physiology* 88(1), 233-237.

Ozturk, A., Unlukara, A., İpek, A., Gurbuz, B., 2004. Effect of salt stress and water deficit on plant growth and essential oil content of lemon balm (*Melisa officinalis* L.). *Pakistan Journal of Botany*, 36 (4), 787-792 .

Parida, A.; Das, A.B.; Das, P.; 2002. NaCl stress causes changes in photosynthetic pigments. Proteins and other metabolic components in the leaves of a true mangrove, *Bruguiera Parviflora*, in hydroponic cultivars. *Journal of Plant Biology* 45, 28-36.

Parida, A.K., Das, A.B., Mitra, B., Mohanty, P., 2004c. Salt-stress induced alterations in protein profile and protease activity in the mangrove *Bruguiera parviflora*. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung* 59c, 408–414.

Petridis, A., Therios, J., Samouris, G., Koundouras, S., Giannakoula, A., 2012. Effect of water deficit on leaf phenolic composition, gas exchange, oxidative damage and antioxidant activity of four Greek olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *Plant Physiology and Biochemistry* 60, 1-11.

- Ranalli, A., Contento, S., Lucera, L., Di Febo, M., Marchegiani, D., Di Fonzo, V., 2006. Factors affecting the contents of iridoid oleuropein in olive leaves (*Olea europaea* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (2), 434–440.
- Rao, G. G. ve Rao, G. R., 1981. Pigment composition and chlorophyllase activity in Pigeon pea (*Cajanus indicus* Spreng.) and gingelly (*Sesamum indicum* L.) under NaCl salinity. *Indian Journal of Experimental Biology* 19, 768-770.
- Rezazadeh, A., Ghasemnezhad, A., Barani, M., Telmadarrehei, T. 2012. Effect of salinity on phenolic composition and antioxidant activity of artichoke (*Cynara scolymus* L.) leaves. *Journal of Medicinal Plants Research* 6, 245-252.
- Ruiz, J.M., Romero, L., 2001. Bioactivity of the phenolic compounds in higher plants. In: Rahman A. (ed.), *Studies in Natural Products Chemistry*. Vol. 25(F). Elsevier Science, pp. 651-681.
- Salah, M.B., Abdelmelek, H., Abderraba, M., 2012. Study of phenolic composition and biological activities assessment of olive leaves from different varieties grown in Tunisia. *Medicinal Chemistry* 2, 107-111.
- Shaheen, M.A., Hegazi, A.A., ve Hmnam, I.S.A., 2011. Effect of salinity treatments on vegetative characteristics and leaves chemical content of transplant of five olive cultivars. *Journal of Horticultural Science and Ornamental Plants* 3(2), 143-151.
- Silva S, Gomes L, Leitao F, Coelho AV, Vilas Boas L., 2006. Phenolic compounds and antioxidant activity of *Olea europaea* L. fruits and leaves. *International Food Science and Technology* 12, 385-396.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós R.M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* 299, 152–178.
- Taban, S., Gunes, A., Alpaslan, M., Ozcan, H., 1999. Sensitivity of various maize (*Zea mays* L. cvs.) varieties to salinity. *DOGA, Tr. Journal of Agriculture and Forestry* 23, Supplement 3, 625-633.
- Taiz, L., Zeiger, E., 2008. *Bitki Fizyolojisi*. Palme Yayıncılık, Ankara (Çeviri Editörü: Prof. Dr. İsmail TÜRKAN).
- Tanker, N., Koyuncu, M., Coşkun, M., 1998. *Farmasötik Botanik*. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, Ders Kitapları No: 78.
- Tsujimoto, Y., Hashizume, H., Yamazaki, M., 1993. Superoxide radical scavenging activity of phenolic compounds. *International Journal of Biochemistry* 25 (4), 491-4.4
- Turan, E., 2005. Sarı Ulak Tarsus Zeytin ve Siyah Çaydan Elde Edilen Fenolik Ekstraktların Antioksidan Etkilerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

- Ulusaraç, A., Karaca, R., 1985. Güneydoğu Anadolu Bölgesi Zeytin Çeşitleri Üzerine Pomolojik Araştırmalar. Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü. Sonuç Raporu, Gaziantep, 30 s.
- Verma, A.K., Johnson, J.A., Gould, M.N., Tanner, M.A., 1988. Inhibition of 7,12 dimethylbenz(a)anthracene- and N-nitrosomethylurea-induced rat mammary cancer by dietary flavonol quercetin. *Cancer Research* 48 (20), 5754-58.
- Yadav, H.D., Yadav, O.P., Dhankar, O.P., Oswal, M.C., 1989. Effect of chloride salinity and boron on germination. Growth and mineral composition of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Annals of Arid Zone* 28(1-2), 63-67.
- Yasar, F., 2003. Tuz Stresi Altındaki Patlıcan Genotiplerinde Bazı Antioksidant Enzim Aktivitelerinin in vitro ve in vivo Olarak İncelenmesi (Doktora tezi, basılmamış). Y.Y.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Van.
- Yuting, C., Rongliang, Z., Zhongjian, J., Yong, J. 1990. Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine* 9, 19.
- Zehtab-Salmasi, S., 2008. Effect of salinity and temperature on the germination of dill (*Anethum graveolens* L.). *Plant Science Research*, 1(1), 27-29.
- Zhou, Y.C., Zheng, R.L., 1991. Phenolic compounds and an analogue as superoxide anion scavengers and antioxidants. *Biochemical Pharmacology* 42, 1177–1179.
- Zhu, J.K., 2001. Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science* 6, 66-71.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Sekvan DEMİR

Doğum Yeri: Şırnak

Doğum Tarihi: 24.07.1984

E-Posta: sekvandemir@hotmail.com

Yabancı Dil: İngilizce

Eğitim Durumu

Orta Öğretim: Şırnak Anadolu Lisesi

Lisans: Gazi Üniversitesi, 2010, Ankara

Yüksek Lisans: Kilis 7 Aralık Üniversitesi, Kilis