



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN
ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**TUZ STRESİNE MARUZ KALAN MISIR
KÖKLERİNDE BİYOUYARICI (FOSFİT)
UYGULAMASININ OZMOTİK DÜZENLEME
VE ANTIOKSİDAN KAPASİTE ÜZERİNE
ETKİLERİ**

Songül SÜREL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

**Eylül - 2023
KONYA
Her Hakkı Saklıdır**

TEZ KABUL VE ONAYI

Songül SÜREL tarafından hazırlanan “**Tuz Stresine Maruz Kalan Mısır Köklerinde Biyouyarıcı (Fosfit) Uygulamasının Ozmotik Düzenleme ve Antioksidan Kapasite Üzerine Etkileri**” adlı tez çalışması .../.../2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Başkan

Prof. Dr. Evren YILDIZTUGAY

.....

Danışman

Prof. Dr. Ceyda ÖZFİDAN KONAKÇI

.....

Üye

Doç. Dr. Ali Tefvik UNCU

.....

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun .../.../20.. gün ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Şerife Yurdağül KUMCU
FBE Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

İmza

Songül SÜREL

Tarih:

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TUZ STRESİNE MARUZ KALAN MISIR KÖKLERİNDE BİYOUYARICI (FOSFİT) UYGULAMASININ OZMOTİK DÜZENLEME VE ANTIOKSİDAN KAPASİTE ÜZERİNE ETKİLERİ

Songül SÜREL

**Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

Danışman: Prof. Dr. Ceyda ÖZFİDAN KONAKÇI

2023, 77 Sayfa

Jüri

**Prof. Dr. Evren YILDIZTUGAY
Prof. Dr. Ceyda ÖZFİDAN KONAKÇI
Doç. Dr. Ali Tefrik UNCU**

Bu tez çalışması tuz stresi altında mısır (*Zea mays L.*) köklerinde biouyarıcı (fosfit) uygulanarak ozmotik düzenleme ve antioksidan kapasite üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla yapılmıştır. Tez çalışmamızda stres faktörü olarak tuz stresi (100 mM) seçilmiştir. Stresle eş zamanlı olarak biouyarıcı olarak sınıflandırılan fosfit (PHI, 1 ve 3 g L⁻¹) uygulanmıştır. Mısır tohumları (*DKC 6664*), hidroponik ortam ve hoagland besin çözeltisinde, iklimlendirme odasında büyütülmüş olup 21 gün sonra kök hasatı yapılmıştır. Hasat edilen mısır köklerinde su içeriği oranı (RWC), prolin miktarı, protein miktarı, ROS (H₂O₂), lipid peroksidasyonu (TBARS) ve antioksidan enzim /izozim analizleri yapılmıştır. Yapılan analizler sonucunda tuz stresine maruz kalan mısır köklerinde RWC ve protein değerlerinde azalmalar saptanmıştır. Tuz stresi köklerde süperoksit dizmutaz (SOD), katalaz (CAT) ve peroksidaz (POX) enzim aktivitelerini artırmıştır. Bu enzimlerde artışlara rağmen köklerdeki hidrojen peroksit (H₂O₂) süpürülememiştir. Devamında TBARS düzeylerinde de artışlar izlenmiştir. Dışarıdan uygulanan fosfit, tuz stresine karşı RWC, prolin ve protein miktarlarında artışlara neden olmuştur. Strese maruz kalan mısır köklerine eş zamanlı olarak fosfit eklendiğinde SOD, CAT ve POX enzim aktivitelerinde artışları sağlamıştır. Bunun sonucunda H₂O₂ etkili olarak ortadan kaldırılmış ve H₂O₂ ve TBARS miktarlarında azalmalar ölçülmüştür. Tüm bu sonuçlar değerlendirildiğinde tuz stresine karşı fosfit uygulamalarının su içeriği, ozmoregülasyon ve antioksidan savunma sistemi üzerine olumlu etkileri olduğunu söyleyebiliriz.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan, Biouyarıcı (Fosfit), Mısır (*Zea mays L.*), Tuz Stresi

ABSTRACT

MS THESIS

THE EFFECTS OF BIOSTIMULANT (PHOSPHITE) TREATMENTS ON OSMOTIC ADJUSTMENT AND ANTIOXIDANT CAPACITY IN MAIZE ROOTS EXPOSED TO SALT STRESS

Songül SÜREL

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF
NECMETTİN ERBAKAN UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE MOLECULAR BIOLOGY AND
GENETICS

Advisor: Prof. Dr. Ceyda ÖZFİDAN KONAKCI

2023, 77 Pages

Jury

Prof. Dr. Evren YILDIZTUGAY
Prof. Dr. Ceyda ÖZFİDAN KONAKCI
Doç. Dr. Ali Tefvik UNCU

This thesis study was carried out to investigate the effects on osmotic regulation and antioxidant capacity by applying biostimulant (phosphite) to maize (*Zea mays L.*) roots under salt stress. In our thesis study, salt stress (100 mM) was chosen as the stress factor. Phosphite (PHI, 1 and 3 g L⁻¹), classified as a biostimulant, was applied concurrently with stress. Maize seeds (DKC 6664) were grown in hydroponic medium and hoagland nutrient solution in a conditioning chamber and root harvested after 21 days. The water content ratio (RWC), proline amount, protein amount, ROS (H₂O₂), lipid peroxidation (TBARS) and antioxidant enzyme / isozyme analyzes were performed in harvested maize roots. As a result of the analysis, decreases in RWC and protein values were determined in maize roots exposed to salt stress. Salt stress increased superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and peroxidase (POX) enzyme activities in roots. Despite the increases in these enzymes, hydrogen peroxide (H₂O₂) in the roots could not be scavenged. Subsequently, increases in TBARS levels were also observed. Externally applied phosphite caused increases in RWC, proline and protein amounts against salt stress. When phosphite was added to the stressed maize roots simultaneously, SOD, CAT and POX enzyme activities were increased. As a result, H₂O₂ was effectively removed and reductions in the amounts of H₂O₂ and TBARS were measured. When all these results are evaluated, we can say that phosphite applications against salt stress have positive effects on water content, osmoregulation and antioxidant defense system.

Keywords: Antioxidant, Biostimulant (Phosphite), Maize (*Zea mays L.*), Salt stress

ÖNSÖZ

Öncelikle yüksek lisans eğitim süreci boyunca çalışması, disiplini ve bilgisi ile örnek aldığım, bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen, ışığıyla yolumu aydınlatan değerli danışmanım Prof. Dr. Ceyda ÖZFİDAN KONAKÇI' ya sonsuz teşekkür ederim.

Yüksek lisans tezimizin laboratuvar çalışma kısmında analizlerin kurulmasında, yürütülmesinde emeği geçen değerli hocam Prof. Dr. Evren YILDIZTUGAY'a, ayrıca bu çalışmalarda desteklerini gördüğüm Arş. Gör. Fatma Nur ALP'e, Arş. Gör. Büşra ARIKAN'a ve Çağrı GÜLENTÜRK'e teşekkürlerimi sunuyorum.

Hayatımda her zaman yanımda olan, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen babam İshak SÜREL'e, annem Havva SÜREL'e ve ablam Hayriye SÜREL'e teşekkürü bir borç bilirim.

Songül SÜREL
KONYA-2023

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	2
2.1. BİTKİLERDE STRES VE ÇEVRESEL FAKTÖRLER.....	2
2.1.1. TUZ STRESİ	4
2.1.1.1. Ozmotik Stres	7
2.1.1.2. İyonik Stres	12
2.1.1.3. Reaktif Oksijen Türleri (ROS) ve Oksidatif Stres	14
2.2. ANTİOKSİDANLAR ve DETOKSİFİKASYON.....	18
2.2.1 Enzimatik Antioksidanlar	19
2.2.2 Enzimatik Olmayan Antioksidanlar.....	22
2.3. MISIR (<i>Zea mays L.</i>) ve TUZ STRESİ	23
2.4. BİTKİSEL BİYOUYARICILAR (BİYOSTİMÜLANTLAR).....	23
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	28
3.1. Sterilizasyon aşaması	29
3.2. Çalışmada yer alan Uygulama Grupları.....	29
3.3. Bağlı Su içeriğinin (RWC) saptanması.....	32
3.4. Enzim ve İzozim aktivitelerinin saptanması için ekstraksiyon yapımı.....	32
3.4.1. Süperoksit dismutaz (SOD) izozim/enzim aktivitesinin saptanması:.....	32
3.4.2. Katalaz (CAT) izozim/enzim aktivitesinin saptanması:	33
3.4.3. Peroksidaz (POX) izozim/enzim aktivitesinin belirlenmesi:.....	33
3.5. Reaktif oksijen türlerinin (ROS) miktarının saptanması	33
3.5.1. Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) miktarının saptanması.....	33
3.6. Lipit peroksidasyonun saptanması.....	34
3.7. Prolin miktarının saptanması	34
3.8. Total protein miktarının saptanması	34
3.9. İstatistiksel Analizler	35
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....	35
4.1. Tuz stresine maruz kalan mısır köklerinde dışarıdan uygulanan fosfitin kısmi su içeriği üzerine etkisi.....	36

4.2. Tuz stresine maruz kalan mısır köklerinde dışarıdan uygulanan fosfitin antioksidan enzim aktivitesi üzerine etkisi	38
4.2.1. Tuz stresine maruz kalan mısır köklerinde dışarıdan uygulanan fosfitin total SOD enzim/izozim aktivitesi üzerine etkisi.....	38
4.2.2. Tuz stresine maruz kalan mısır köklerinde dışarıdan uygulanan fosfitin total CAT enzim/izozim aktivitesi üzerine etkisi.....	40
4.2.3. Tuz stresine maruz kalan mısır köklerinde dışarıdan uygulanan fosfitin total POX enzim/izozim aktivitesi üzerine etkisi.....	42
4.3. Reaktif oksijen türlerinin (ROS) miktarının belirlenmesi	44
4.3.1. Tuz stresine maruz kalan mısır köklerinde dışarıdan uygulanan fosfitin hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) miktarı üzerine etkisi	44
4.4. Lipit Peroksidasyonun Belirlenmesi	46
4.4.1. Tuz stresine maruz kalan mısır köklerinde dışarıdan uygulanan fosfitin TBARS (Tiobarbitürik asit reaktif maddeleri) miktarı üzerine etkisi.....	46
4.5. Tuz stresine maruz kalan mısır köklerinde dışarıdan uygulanan fosfitin prolin miktarı üzerine etkisi	47
4.6. Tuz stresine maruz kalan mısır köklerinde dışarıdan uygulanan fosfitin protein miktarı üzerine etkisi	49
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	51
5.1 Sonuçlar	51
5.2 Öneriler	54
6. KAYNAKLAR	54
ÖZGEÇMİŞ	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

SİMGELER VE KISALTMALAR

APX	Askorbat peroksidaz
CAT	Katalaz
H₂O₂	Hidrojen peroksit
HKT	Yüksek Afiniteli K ⁺ Kanalları
K⁺	Potasyum
kDa	Kilodalton
LCT	Düşük Afiniteli Katyon Kanalları
MDA	Malondialdehit
MDHAR	Monodehidroaskorbat radikalleri
mM	Milimolar
MPa	Megapaskal
Na⁺	Sodyum
NaCl	Sodyum klorür
NSCC	Seçici Olmayan Katyon Kanalları
NHX1	Na ⁺ /H ⁺ antiportu 1
PA	Poliamin
PHI	Fosfit
PI	Fosfat
POX	Peroksidaz
PSI	Fotosistem I
PSII	Fotosistem II
ROS	Reaktif Oksijen Türleri (Reactive Oxygen Species)
SOS	Tuza Aşırı Duyarlı (Salt Overly Sensitive)
SOD	Süperoksit dismutaz
TBARS	Tiyobarbuturik asit reaktif bileşikler

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1. Strese karşı oluşan cevapların bitki hücresindeki sinyalizasyonu	3
Şekil 2. 2. Bitkilerde Tuz Stresi ve Tuz toleransı	7
Şekil 2. 3. Fosfat (Pi) ve Fosfit (Phi) Anyonu 3 boyutlu moleküler yapısı	25
Şekil 3. 1. Tezimizde kullanılan uygulama gruplarının fotoğrafları	30
Şekil 3. 2. Mısır (<i>Zea mays L.</i>) uygulama gruplarının hasat öncesi gövde ve kök görüntüleri.....	31
Şekil 4. 1. 100 mM NaCl toksisitesine maruz kalan mısır köklerinde dışarıdan fosfit uygulamalarının (1 ve 3 g L ⁻¹) kısmi su içeriği (RWC) üzerine etkisi.....	36
Şekil 4. 2. 100 mM NaCl toksisitesine maruz kalan mısır köklerinde dışarıdan fosfit uygulamalarının (1 ve 3 g L ⁻¹) total SOD aktivitesi ve SOD izozimlerinin band yoğunluğu üzerine etkisi	39
Şekil 4. 3. 100 mM NaCl toksisitesine maruz kalan mısır köklerinde dışarıdan fosfit uygulamalarının (1 ve 3 g L ⁻¹) total CAT aktivitesi ve CAT izozimlerinin band yoğunluğu üzerine etkisi	41
Şekil 4. 4. 100 mM NaCl toksisitesine maruz kalan mısır köklerinde dışarıdan fosfit uygulamalarının (1 ve 3 g L ⁻¹) total POX aktivitesi ve POX izozimlerinin band yoğunluğu üzerine etkisi	43
Şekil 4. 5. 100 mM NaCl toksisitesine maruz kalan mısır köklerinde dışarıdan fosfit uygulamalarının (1 ve 3 g L ⁻¹) hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) miktarı üzerine etkisi.....	45
Şekil 4. 6. 100 mM NaCl toksisitesine maruz kalan mısır köklerinde dışarıdan fosfit uygulamalarının (1 ve 3 g L ⁻¹) TBARS miktarı üzerine etkisi	47
Şekil 4. 7. 100 mM NaCl toksisitesine maruz kalan mısır köklerinde dışarıdan fosfit uygulamalarının	48
Şekil 4. 8. 100 mM NaCl toksisitesine maruz kalan mısır köklerinde dışarıdan fosfit uygulamalarının (1 ve 3 g L ⁻¹) protein miktarı üzerine etkisi.....	49

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2. 1. Çevresel Stres faktörleri .	3
Çizelge 2. 2. Abiyotik stresler ve bitki üzerindeki olumsuz etkileri .	4
Çizelge 2. 3. Tuz stresine cevap olarak oluşan ozmolitler ve tuz toleransındaki muhtemel fonksiyonları	9
Çizelge 2. 4. Bitki organellerinde Reaktif Oksijen Türleri; oluşum mekanizması ve hücre içi lokasyonları	17
Çizelge 2. 5. Tuz stresi toleransında önemli antioksidanlar (enzimatik ve enzimatik olmayan) ve hücrel lokalizasyonları	19
Çizelge 2. 6. Biyoyarıcıların bitkilerdeki hücrel hedeflerinden tüm bitkinin fizyolojik işlevlerine, tarımsal/bahçecilik işlevlerine, ekonomik ve çevresel faydaları	26
Çizelge 2. 7. Mısır (<i>Zea mays</i>) bitkisine uygulanan biyoyarıcı çalışmalar	27
Çizelge 3. 1. Tezimizde kullanılan uygulama grupları ve açıklamaları	30



1. GİRİŞ

Bitkiler yaşamsal döngülerinde büyüme ve gelişme dönemlerini olumsuz yönde etkileyecek stres faktörleri ile karşılaşır. Abiyotik ve biyotik olarak değerlendirilen bu stres faktörleri bitkilerde fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler zararlar oluşturmada ve bitkilerin yaşam kalitesini olumsuz etkileyebilmektedir. Bitkilerde stres etkisi bir bitkinin türüne, genotipine, maruziyet süresine ve tolerans mekanizmasına göre değişebilmektedir.

Abiyotik stres faktörlerinden biri olan tuz stresi, toprak verimliliğini azaltarak tarımsal üretkenliği düşürmektedir. Toprakta artan tuz miktarı hem bitkinin hayati fonksiyonuna hem de toprak yapısına ciddi derecede zarar vermektedir. Tuzluluk; bitkide mineral alımını, büyüme ve gelişme, fotosentez verimliliğinin azalması gibi fizyolojik süreçleri olumsuz etkilemektedir (Sairam ve Srivastava, 2002).

Tuz stresi bitkilerde iki nedenle meydana gelmektedir. Kök bölgesinde artan tuz konsantrasyonu nedeniyle bitkinin suyu almakta güçlük çekmesi ve bazı iyonların miktarındaki artışa bağlı olarak toksik etkiler göstermesiyle ortaya çıkmaktadır. Aşırı tuz stresi bitkilerde gövde ve kök büyümesinde gerilemeye, verimde düşüşe neden olabilmektedir.

Tuz stresi bitkilerde reaktif oksijen türlerinin (süperoksit radikalleri, hidrojen peroksit, hidroksil radikalleri gibi) oluşum ve birikme oranını artırarak oksidatif strese neden olmaktadır (Torun ve Ayaz, 2019). Fakat bitkilerde ki antioksidan savunma sistemleri reaktif oksijen türlerini oluşumunu detoksifikasyon mekanizması ile engellemektedir. (Doğru, 2020). Bu sistemin enzim ve enzimatik olmayan bileşenleri, bitkileri oksidatif hasardan korumaya yardımcı olmaktadır. Tuz stresi altında antioksidan aktivitelerini artırabilen bitkiler, tuza toleranslı bitkiler olarak kabul edilmektedir.

Biyouyarıcılar (biyostimülantlar); bitkilerde gelişim, beslenme, verimlilik, stres koşullarına dayanıklılık gibi olaylarını etkileyen organik ya da inorganik bileşiklerden oluşabilen ve toprak yapısını etkileyebilen materyallerdir (Külahtaş ve Çokuysal, 2016).

Biyouyarıcıların sınıflandırılması humik ve fulvik asitler ve bazı azotlu bileşikler, bitki ekstraktları, inorganik ve organik polimerler, yararlı mantarlar ve yararlı bakteriler olarak yapılmaktadır. Biyouyarıcıların birincil etkileri, bitkide fizyolojik tepkileri indüklemektir. Bu tepkilerin çoğu birincil etkileri büyüme ve gelişme ile ilgilidir. Bitkilerde besin alımını, besin kullanım etkinliğini, fotosentez kapasitesini ve biyotik veya abiyotik stres toleransını artırmaktadır (Du Jardin, 2015) .

Biz bu tez çalışmamızda biyoyarıcı olarak fosfitin tuzluluk stresi altındaki mısır (*zea mays*) köklerinde ozmoregülasyon ve antioksidan sistem aktivetelerindeki muhtemel olumlu yönlerini açıklamayı hedefliyoruz.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. BİTKİLERDE STRES VE ÇEVRESEL FAKTÖRLER

Stres terimi genellikle canlı organizmada zararlı bir etki yaratabilen herhangi bir fizikokimyasal veya çevresel faktör olarak tanımlanır. Latince germek anlamına gelen "stringere" sözcüğünden gelen stres tüm canlıları etkilediği gibi bitkilerde etkilemektedir. Bitkiler yaşam süreleri boyunca büyüme ve gelişmelerini olumsuz yönde etkileyebilecek birçok çevresel stres faktörü ile karşılaşmaktadır. Bitkisel stres, bitki üzerinde negatif etkileri olan dış faktörler olarak adlandırılmaktadır. Biyolojik bir sistemde çevresel stresi değerlendirmek zordur, çünkü optimum çevre kavramı ve stres koşullarına duyarlılık ve verilen cevap oldukça değişken olabilmektedir. Bir bitkide katabolik etki oluşturan stres faktörü başka bir bitkide yaşam devamlılığı için gerekli olabilir. Bitkilerde stres etkisi bir bitkinin türüne, genotipine, maruziyet süresine ve tolerans mekanizmasına göre değişebilmektedir.

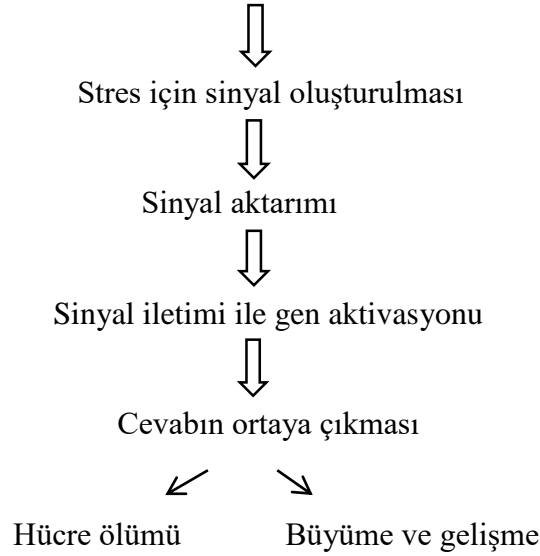
Bir bitki sisteminde, stres tarafından indüklenen iç sinyaller, büyüme ve gelişme gibi olumlu tepkilere sebep olabilirken, bitkinin yaşamını kaybedebilmesinde neden olabilmektedir. Bu nedenle, stres koşullarının zararlı semptomlarını temsil eden tepkileri ve bitki performansı üzerinde zararlı bir etkisi olmayan tepkileri ayırt etmek önemli olmaktadır (Mukherji ve Ghosh, 2018). Şekil 2.1'de strese karşı oluşan cevapların bitki hücrelerinde ki sinyalizasyonu gösterilmiştir (Çetinkaya ve Dinler, 2021).

Bitkiler büyüme ve gelişme sürecinde çevresel faktörlerin etkisi altındadır. Bir bitkinin büyüebilmesi için optimum çevre şartlarına ihtiyaç vardır. Buldukları çevrenin birtakım olumsuz etkilerine dolaylı yollardan veya direkt maruz kalabilmektedirler (Acar ve ark., 2022).

Çevresel Sinyaller (Stres etkeni)



Hücre çeperi ve hücre membranındaki reseptörler aracılığıyla stresin algılanması



Şekil 2. 1. Strese karşı oluşan cevapların bitki hücresindeki sinyalizasyonu .

Çevresel stres faktörleri biyotik ve abiyotik stres faktörleri olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (Çizelge 2.1). Biyotik stres faktörleri canlı organizma (hayvan , böcek, bakteri, mantar vb) kökenlidir. Abiyotik stres faktörleri ise fiziksel ve kimyasal nedenlere dayanmaktadır.

Çizelge 2. 1. Çevresel Stres faktörleri (Çetinkaya ve Dinler, 2021).

ÇEVRESEL STRES FAKTÖRLERİ		
Abiyotik Stres Faktörleri		Biyotik Stres Faktörleri
Fiziksel Faktörler	Kimyasal Faktörler	
Kuraklık Sıcaklık Soğuk Radyasyon Su baskını	Hava Kirliliği Bitki besin elementleri Pestisitler Toksinler Tuzlar Toprak çözeltisi pH'ı Ağır metaller	Yabani bitkiler Böcekler Hayvanlar Antropojenik etkiler Hastalıklar Mikroorganizmalar(virüs, bakteri ve mantarlar)

İklim değişikliği nedeni ile kuraklık, tuzluluk ve ağır metal stresi gibi abiyotik streslerin etkisi gün geçtikçe etkisini artmaktadır. Abiyotik stresler tarımsal bitkilerde

ürün verim ve kalitesini oldukça düşürmektedir. **Çizelge 2.2'de** abiyotik streslerin bitkiler üzerinde oluşturabileceği olumsuz etkileri gösterilmiştir.

Çizelge 2. 3. Abiyotik stresler ve bitki üzerindeki olumsuz etkileri (Ali ve ark., 2022).

Abiyotik stresler ve bitki üzerindeki olumsuz etkileri	
Tuz Stresi	Daha yüksek ozmolit konsantrasyonu, düşük ozmotik potansiyel, azalan su içeriği, fotosentezin inhibisyonu, stoma kapanması, zayıf kök gelişimi, bodur bitki büyümesi, kloroz, yaprak kıvrılması, oksidatif stres, değişen metabolizma, köklere yüksek sodyum taşınması, düşük K, Zn ve P alımı, daha az biyokütle ve tane verimi
Kuraklık stresi	Stoma iletkenliğinin azalması, yaprak içi CO ₂ miktarının azalması, osmotik basıncın artması, N asimilasyonunun azalması, solunum/transpirasyon oranının değişmesi, fotosentetik aktivitenin değişmesi, klorofil konsantrasyonunun azalması, ABA sentezinin artması, antioksidan sentezinin artması, azaltılmış ROS birikimi
Yüksek Sıcaklık Stresi	Ozmoprotektan birikimi, antioksidan sistem aktivasyonu, klorofil içeriğinde azalma, solunumda azalma, elektron taşıma kapasitelerinde ayarlama, şaperonların ve ısı şoku proteinlerinin ifadesi, stoma kapanması, yaprak yöneliminde değişiklik, yaprak dökülmesi ve yaşlanması, tilakoid zarın stabilitesinde artış, biyokütle ve verimde azalma
Düşük Sıcaklık Stresi	Antioksidan üretiminin artması, azalan hücre boyutu, artan stoma yoğunlukları, büyük ksilem damarları, bitkilerde H ₂ O tutulumunun indüklenmesi, membran strüktürünün değişmesi, biomas ve verimin düşmesi, protoplazmik akış ve elektrolit sızıntısı, meyve ve yapraklarda yüzey lezyonları, klorofil içeriğinde azalma, vasküler esmerleşme veya iç renk değişikliği
Ağır Metal Stresi	Biomas ve verimin düşmesi, hücre boyutunu ve protein biyosentezini azaltır, solunum ve su durumunu azaltır, fotosentezi ve klorofil içeriğini azaltır, elektrolit sızıntısını artırır, mineral alımını ve tohum çimlenmesini yavaşlatır, gelişmiş antioksidanlar, artan stoma yoğunlukları, DNA hasarı, kromozomal anormallikler ve anormal mitoz ve mayoz
Su basması stresi	Verimde azalma, yaprak alanı indeksinde ve klorozda azalma, su alımında azalma, klorofil içeriğinde azalma, Fotosistem II'de hasar, terlemede artış, stoma yoğunluğunda artış, besin alımında azalma, protein içeriğinde azalma, Alkol dehidrojenaz birikimi, ROS üretimi, etilen üretim, azalan giberellin ve sitokinin, artan ABA

2.1.1. TUZ STRESİ

Tuz stresi dünyada tarımsal bitkilerin büyüme ve gelişmesini etkileyen, ürün verimliliğini oldukça kısıtlayan, önemli abiyotik stres türlerinden biridir. Tuz stresi topraktaki çözünebilir tuzların artışıyla meydana gelir. Bu tuzlar genellikle, sülfatlar klorürler, karbonatlar, bikarbonatlar ve boratlardır. Ancak doğada en çok rastlanılan tuz formu sodyum klorür (NaCl)'dür (Dölarıslan ve Gül , 2012). Küresel ısınma nedeni ile iklim değışiklikleri, hava kirliliği, hatalı tarım uygulamaları gibi faktörler toprak tuzluluğunu artırmaktadır. Türkiye topraklarında (yaklaşık 1.5 milyon hektarlık kısım) tuzluluk toksitesiyle karşı karşıyadır (Doğru ve Canavar, 2020). Dünyada ise toprak tuzluluğu, sulanabilir tarım alanların %20'sini, tarım arazilerinin ise %6'sını etkilemiş durumdadır (Dölarıslan ve Gül, 2012). Tarım alanlarında gözlemlenen bu boyuttaki tuz artışının, özellikle ürün kalitesi ve verimindeki düşüşe bağlı olarak büyük ekonomik kayıplara neden olacağı öngörülmektedir (Doğru ve Canavar, 2020).

Toprak tuzluluğunun artmasına bağlı olarak tuz stresi bitkilerde; morfolojik, fizyolojik, biyokimsal ve moleküler düzeyde bozulmalara sebep olarak bitki yaşam kalitesini olumsuz etkileyebilmektedir. Bitkilerin stres karşısında oluşturduğu cevaplar bitki türüne, genotipine, maruziyet süresine ve hassasiyetine göre değişebilmektedir. Bitkiler tuza karşı gösterdikleri hassasiyete göre halofitler (deniz börölcesı, jojoba vb.) ve glikofitler (buğday, mısır, pirinç vb.) olmak üzere iki gruba ayrılır. Tuz stresine karşı hassas olan bitkilere genel olarak "glikofit " adlandırılır. Glikofit bitkiler genellikle 100-200 mM'lık tuz konsantrasyonlarında bile canlılıklarını sürdüremez. Yüksek tuzluluğa karşı dayanıklı olan bitkilere de "halofit" adlandırılır. Halofitler 300-400 mM gibi oldukça yüksek tuz konsantrasyonuna sahip olan topraklarda büyüeyebilen ve yaşam döngülerini tamamlayabilen bitki türlerini içermektedir (Doğru ve Canavar, 2020).

Tuz hassasiyeti olan bitkiler (glikofitler), tuzlu ortamlarda kontrolsüz bir iyon alımı yapmaktadırlar. Bu bitkiler, alınan yüksek miktardaki tuzu saklayacak bölmeleri olmadığından, bitkinin hasar görmesine neden olmaktadır. Oluşan bu hasar; sadece ozmotik bir stres olmayıp, daha çok iyon homeostazisinin bozulmasından kaynaklanmaktadır. Tuzluluk stresi ilk olarak kök bölgesinde meydana gelmektedir. Glikofitler, yüksek yoğunlukta tuz ile karşılaştıklarında, köklerinin gelişimi engellenmekte ve iyon toksisitesine maruz kalmaktadırlar. Diğer tuzluluk stresi ise öncelikle köklerde meydana gelmekte, fakat toksisite ve büyümedeki sınırlanma belirtileri daha çok vejetatif bölgelerde görülmektedir. Böylelikle tuzluluk stresi glikofitlerde fizyolojik ve morfolojik etkileri sonucu kendisini göstermektedir. Halofitler ise fazla miktarda Na ve Cl tuzlarını alıp yapraklarında biriktirme yoluyla tuzluluğun

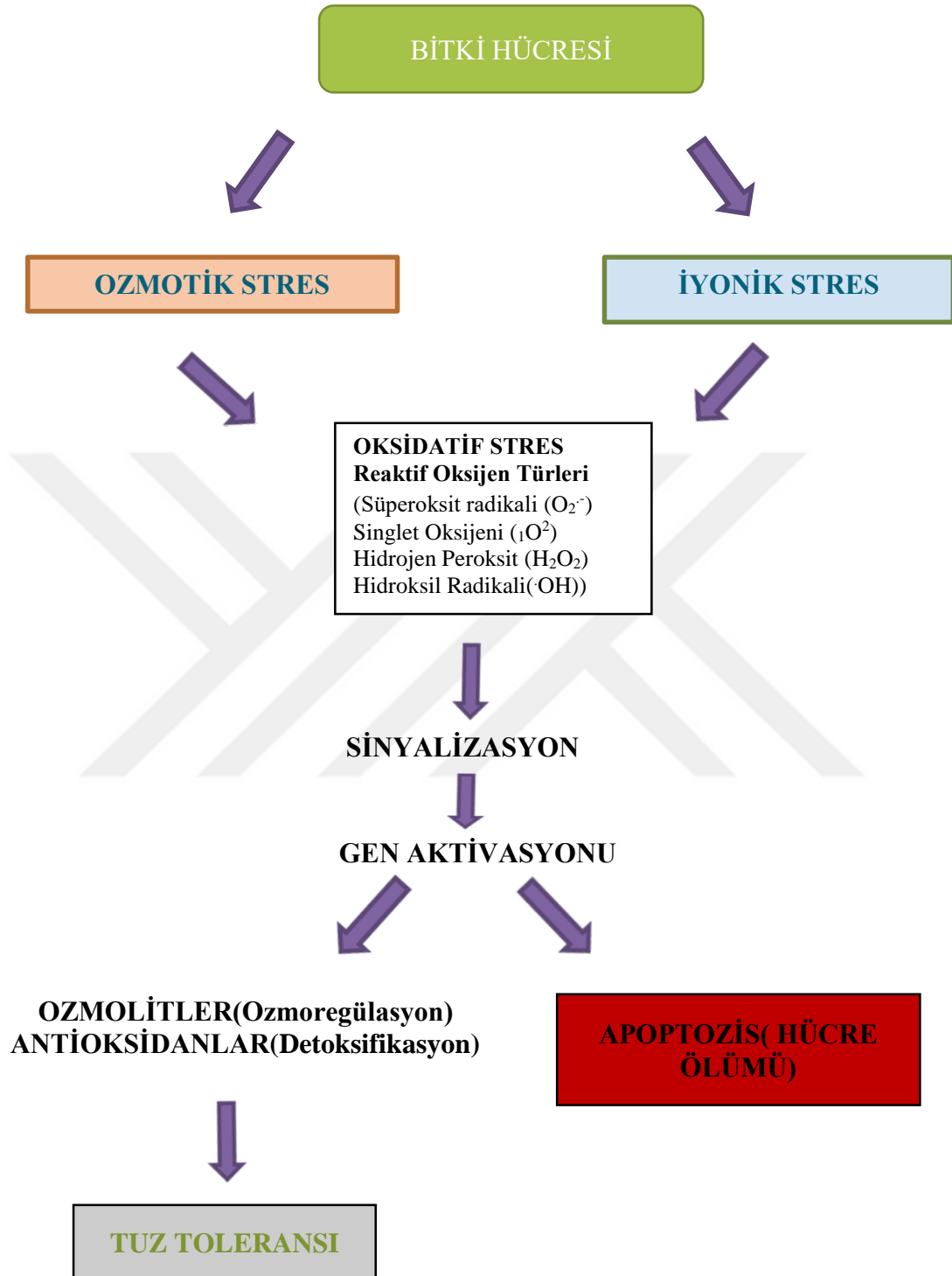
toksik etkilerinden korunmaktadırlar. Bu bitkiler, yapraklarında biriken tuzları topraktaki ozmotik potansiyeli düşürmek için kullanmaktadırlar. Bu ozmotik düzenlemenin önemli bir yanı ise biriken tuzların hücre vakuollerinde izole edilmesidir. Böylelikle, yüksek tuz konsantrasyonunun sitoplazma ve organellerde düşük oranlarda tutularak metabolizma ve enzim aktivitesine zarar vermesini engellenmektedir (Deliboran ve Savran, 2015).

Tuzlu topraklar özellikle kurak- yarı kurak lokasyonlarda yaygın olarak bulunan ve bitki gelişimine engel olacak miktarda çözünebilir tuz (NaCl) içeren topraklardır (Dölarıslan ve Gül, 2012). Tuzluluk topraktaki kullanılabilir su miktarını azaltmakta ve bitkilerin fizyolojik kuraklıkla karşılaşmasına neden olmaktadır. Fizyolojik kuraklık olarak tanımlanan terim, hücrelerin mitotik aktivitesini engelleyen, hücre bölünme durumunu azaltan, hücre sayısı ve uzamasını yavaşlatan bir durumdur. Buna bağılı olarak kök ve gövde uzunluklarında azalma, kök hacminde ve sekonder kök miktarı ve uzunluğunda azalma, yaprakların (incelme, küçülme, sayılarında azalma) vasküler doku farklılaşmasında ve gelişiminde azalma, tohum çimlenme oranında azalmalar oluşmaktadır (Abudureyimu ve Aksoy, 2019).

Bitkilerde tuz toleransını sağlayan mekanizmalar; hücre zarı bütünlüğünün korunması, Tuza Aşırı Duyarlı (Salt Overly Sensitive (SOS) yolağıının aktifleştirilmesi, ozmolitlerin sentezi, antioksidan enzimlerin aktivasyonu, sinyal iletimi ve tuz toleransı ile ilgili genlerin aktifleştirilmesi olarak bilinmektedir (Abudureyimu ve Aksoy, 2019).

Tuz stresinin bitkiler üzerinde oluşturduğu etkiler 3 temel grupta incelemek mümkündür. Bunlar; Ozmotik stres, İyonik stres ve Reaktif Oksijen Türleri (ROS) oluşumudur (Şekil 2.4) (Yang ve Guo, 2018).





Şekil 2. 2. Bitkilerde Tuz Stresi ve Tuz toleransı

2.1.1.1. Osmotik Stres

Tuz stresi, toprak ortamında sodyum klorür ve diğer çözülebilir tuz miktarındaki artışla birlikte bitkinin büyüme ve gelişimi üzerinde olumsuz etkiler oluşturabilmektedir. Toprak ortamında tuz miktarının artması ve su potansiyelinin azalması, hücrelerin ozmotik potansiyelini azaltmakta ve bitkilerin köklerden su alımını engelleyerek ozmotik strese neden olmaktadır (Yılmaz ve ark., 2011).

Ozmotik stres, toprak ve sudaki yüksek tuz konsantrasyonlarının etkisinden kaynaklanmaktadır. Topraktaki fazla çözünür tuzlar, kök yüzeyindeki su potansiyelini azaltmakta, böylece bitkinin su alımını azaltmakta (yani bitkide su mevcudiyetini azaltır), bu da bitkilerde su açığına yol açmaktadır (Yang ve Guo, 2018).

Bir bitkinin su alma kabiliyetini tehlikeye atan ozmotik stres, bitki dokularında birkaç önemli olayı tetikler. Azalan turgor basıncı sonucu, makroskopik düzeyde, hem kök, hem de sürgün hücrelerinin büyümesi durdurulmaktadır. Bu sorunla başa çıkmak için bitkilerin ozmotik dengeyi ayarlaması gerekir. Kökteki hücre turgorunun çoğu, inorganik iyonların artışıyla 40-60 dakikada geri kazanılır ve büyüme, azalmış bir oranda da olsa yeniden başlayabilmektedir. Bitki hücresinde ozmotik basıncın azalması nedeni ile Na^+ 'un hücre duvarı bileşenlerine bağlanmasından kaynaklanan hücre duvarının bileşimindeki değişikliklere neden olmaktadır. Ozmotik stres ayrıca stomaların hızlı kapanmasına neden olmakta ve bu da bitkinin CO_2 özümleme yeteneğini azaltmaktadır. Stomaların hızlı kapanması, tuzluluk stresine eşlik eden ksilem basıncındaki hızlı düşüş (örneğin, göre 100 mM NaCl'ye maruz kalan mısır köklerinde 0,05 MPa) ile açıklanabilmektedir. Ksilem basıncındaki bu düşüş, stresin başlamasından birkaç dakika sonra gerçekleşmekte ve kökler tarafından algılanan hidrolik sinyaller ses hızında hareket etmekte ve neredeyse sürgüne aktarılmakta, burada deşifre edilip ve sürgün metabolizmasını değiştirmektedirler (Zhao ve ark., 2020).

Ozmotik stres sonucu kloroplastlarda fotooksidasyona ve fotoinhibasyona neden olarak reaktif oksijen türlerinin üretimini artırmaktadır (Yılmaz ve ark., 2011).

Ozmotik stres, bitkilerde hem kısa vadeli hem de uzun vadeli ozmotik stres toleransı için önemli olan uyumlu ozmolitlerin biyosentezini ve birikimini destekleyen sinyal yollarını tetikler. Sitozolda artan uyumlu ozmolit seviyeleri su kaybını azaltır ve turgor basıncını ve hücre genişlemesini artırır (Zhao ve ark., 2020).

Ozmolitlerin önemi

Tuz stresinde; bitkilerin düşük hücre içi ozmotik potansiyelinin korunmasında ve zararlı etkilerinin önlenmesinde prolin, glisin, betain, şeker alkolleri, poliaminler ve geç embriyogenez proteinleri (LEA) gibi organik ozmolitlerin birikimi, önemli bir rol

oynamaktadır (Çizelge 2. 4). Bu nedenle ozmolit seviyelerini kontrol eden metabolik düzenlemeler ve düzenleyici yollar bitki tuz toleransı için oldukça önemlidir.

Prolin, elzem aminosasitlerden biridir. Moleküler analizler, tuz stresinin prolin sentezini indüklediğini, buna karşılık iyileşme sırasında katabolizmasının arttığını göstermiştir. Bu iyileşme fazı sırasında, prolin temel bir sinyal molekülü olarak işlevi görebilmektedir. Ayrıca prolinin hücre proliferasyonunu, hücre ölümünü ve stres kurtarma genlerinin ekspresyonunu düzenlediği düşünülmektedir. Proline benzer şekilde, glisin betain, tuzluluk altında hücre içi iyonların ozmotik potansiyelini dengelemek için bazı bitkiler tarafından sentezlenen organik bir ozmolittir (Deinlein ve ark., 2014).

Tuz stresi altında sentezlenen uyumlu ozmolitlerin tipi en azından kısmen türe ve dokuya özgüdür ve bu bileşiklerin çoğu ısı, kuraklık ve donma stresleri altında birikmektedir. Birkaç uyumlu ozmolit sınıfı tuz stresi altında birikmektedir (Çizelge 2.3). Bunlar prolin, glisin, betain, putresin; glikozilgliserol, gliserol, manitol, pinitol ve sorbitol dahil olmak üzere polioller, sükroz ve fruktoz dahil olmak üzere şekerler, trehaloz, rafinoz ve fruktanlar dahil kompleks şekerler ve K^+ gibi iyonlardır. Prolin, glisin betain, poliamin, mannitol, glikoz, fruktoz ve trehaloz gibi bazı metabolitler tuz stresi üzerine birçok bitki türünde yaygın olarak hem köklerde hem de yapraklarda birikmekte ve şekerler ise esas olarak sürgün dokusunda birikmektedir. Ozmotik ayarlama ve detoksifikasyondaki işlevlerine ek olarak, bu metabolitler ayrıca tuz tepkisini düzenlemek için enzimlere doğrudan bağlanabilmekte ve bunları etkinleştirebilmekte veya devre dışı bırakabilmektedir (Yang ve Guo, 2018a).

Koruyucu ve düzenleyici moleküllerden olan ozmolitler stres durumunda oluşturulan ROS'un temizlenmesinde, ozmotik streste, ozmotik regülatör ve ozmoprotektan olarak rol almaktadırlar. Sitoplazmada suyun alıkonmasını sağlamaktadırlar ve sodyumun apoplast ve vakuollerde tutulmasını kolaylaştırarak hücrel yapıları korumaktadırlar (Büyük ve ark., 2012).

Çizelge 2. 5. Tuz stresine cevap olarak oluşan ozmolitler ve tuz toleransındaki muhtemel fonksiyonları

Grup	Spesifik Bileşik	Fonksiyonu
İyonlar	Sodyum, klor	Ozmotik regülatör Potasyum çıkışı

Aminoasitler	Prolin	Ozmotik regülatör Ozmoprotektan ROS temizleyici protein, zar ve hücre altı yapının stabilizasyonu
Kuaterner aminler	Glisin betain	Ozmoprotektan, ozmotik regülatör Tilakoid ve plazma membran bütünlüğünün korunması ROS konsantrasyonunda ve lipid peroksidasyonunda azalma Protein stabilizasyonu
Polioller	Mannitol, Glikozilgliserol, Gliserol, Sorbitol	Ozmotik regülatör, Ozmoprotektan Protein stabilizasyonu Fotosentetik organellerin korunması
Poliaminler	Spermin, Spermidin, Putresin, Kadaverin	Ozmotik regülatör, İyon homeostazisi, Kromatinin korunması, Antioksidan enzim aktivasyonu
Şekerler	Glikoz, Fruktoz, Sükroz, Fruktanlar (Rafinoz, Trehaloz)	Ozmotik regülatör, Ozmoprotektan Karbon (enerji) kaynağı, Sinyal molekülü, Membran koruyucu, Protein stabilizasyonu

Bitkiler tarafından yüksek tuzluluk altında düşük bir hücre içi ozmotik potansiyeli sürdürmek için kullanılan temel strateji, prolin, glisin betain, şekerler, poliaminler ve LEA proteinleri dahil olmak üzere uyumlu ozmolitlerin birikimidir. Bu ozmolitler arasında prolin, tuz stresi altında ozmotik ayarlama baskın bir rol oynamaktadır. Ozmotik stres altında prolin birikimi, hem prolin biyosentez yolunun aktivasyonu, hemde prolin katabolik yolunun inaktivasyonu ile sağlanabilmektedir. Prolin, esas olarak iki ardışık enzim tarafından glutamik asidin indirgenmesi yoluyla biyosentezlenir: P5C sentaz (P5CS) ve P5C redüktaz (P5CR). P5CS, prolin biyosentezinde hız sınırlayıcı bir enzimdir ve aktivitesi esas olarak transkripsiyon

seviyesinde kontrol edilmektedir. Hem *P5CS* hem de *P5CR* genleri, prolin birikimini ve müteakip tuz stresi toleransını mümkün kılan yüksek tuzluluk altında up regüle edilmektedir. Katabolik yolda prolin, prolin dehidrojenaz (PDH) ve P5C dehidrojenaz (*P5CDH*) tarafından katalize edilen reaksiyonlar aracılığıyla glutamata dönüştürülebilmektedir. PDH'nin tuz stresi toleransındaki olumsuz rolü, düşük PDH transkript seviyelerine sahip bitkilerin daha yüksek tuz stresi toleransına sahip olması gerçeğiyle desteklenmektedir (Zhao ve ark., 2020).

Prolin, ozmotik ayarlama dışında çeşitli rollere sahiptir. ROS'un temizlenmesi ve sürdürülmesi stres altında hücre redoks durumu, glisin betain enzimlerin kuaterner yapılarını etkili bir şekilde stabilize eder ve tuzluluk altında membranların bütünlüğünü korumaktadır (Yıldız ve ark., 2014). Bitkilerde strese karşı verilen cevaplar arasında düşük moleküler ağırlıklı çözünen maddeler veya ozmolit gibi moleküllerin sentezi gelmektedir (Büyük ve ark., 2012).

Poliaminler (PA) iki ya da daha fazla amino grubu içeren bitki büyüme ve gelişmesinde önemli fonksiyona sahip, düşük molekül ağırlıklı polikasyonlardır. Bitkilerde bulunan en yaygın PA'lar; bir diamin olan putresin (Put), triamin olan Spermidin (Spd), tetraamin olan spermin (Spm) ve daha az meydana gelen diaminopropan ve kadaverindir. En küçük poliamin, yani diamin putresin, sırasıyla arginin dekarboksilaz veya ornitin dekarboksilaz enziminin aktivitesiyle arginin veya ornitinden sentezlenir (Yıldız ve ark., 2010).

PA'lar bitki hücrelerinde; serbest, bağlı veya konjuge formlarda yaygın bir şekilde bulunurlar. Serbest poliaminler, hücre içi pH'da pozitif (katyonik) yüklüdür. Bu özellikleri nedeniyle PA'lar; proteinler, fosfolipidler, RNA ve DNA gibi anyonik moleküllerle bağlı formlar oluşturabilmektedirler (Şahin ve Örgeç, 2022).

PA'lar abiyotik ve biyotik streslere karşı savunma cevabını düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Poliaminler ozmoz ve hücreden ROS atılımını sağlayarak biyotik ve abiyotik stresin katabolik etkilerini azaltmaktadır (Yılmaz ve Çiftçi, 2021). Membran ve hücre çeperini stabilize edebilme yeteneklerinin yanı sıra PA'lar asit nötralize edici ve antioksidan özelliklerinden dolayı anti-stres ve antisenesens etkilerine sahiptirler. Yapılan araştırmalarda PA seviyelerinin stres koşullarında arttığı bildirilmiştir (Yıldız ve ark., 2014).

Tuz stresi, bitkilerde ozmotik ve iyonik dengeyi bozarak, fotosentetik aktiviteyi azaltarak, çeşitli ROS'ları biriktirerek ve antioksidan enzim aktivitelerini inhibe ederek

morfolojik ve metabolik süreçleri olumsuz etkilemektedir. Tuz toleransındaki temel mekanizmalardan biri de bitki hücrelerindeki Na^+ birikimini engellemektir

Ozmolitler osmoregülasyonda görev alan ve stres tarafından oluşturulan ROS'un ortadan kaldırılmasında görev yapan proteinlerdir. Tuz stresinde ozmotik düzenleyici ve ozmokeruyucu olarak rol oynar. Sitoplazmada suyun tutulmasını sağlar ve sodyumun apoplast ve vakuollerde kalmasını kolaylaştırarak hücresel yapıları korurlar (Büyük ve ark., 2012).

2.1.1.2. İyonik Stres

Literatürde genellikle "iyonik stres" veya "iyon toksisitesi" olarak adlandırılmaktadır. Tuzlu topraklarda yetiştirilen bitkilerde, topraktaki artan ozmotik potansiyelden dolayı bitkiler suyu yeterince kullanamazlar. Bu durum, bitkinin büyümesi için gerekli olan besin ve mineralleri yeteri kadar topraktan alamamasına neden olur. İyonik stres, bitki yaşam kalitesini olumsuz etkileyen tuzluluğun sekonder etkisi olarak ortaya çıkmaktadır. Bitki hücrelerindeki yüksek tuz (NaCl) konsantrasyonları (esas olarak Na^+) iyonik stresi indükleyebilmektedir. Böylece bitki yaşamı için gerekli olan besin ve minerallerin topraktan alınımı kısıtlanmaktadır (Yang ve Guo, 2018). Bu kısıtlanma, metabolik olarak aktif hücre içi bölmelerde aşırı Na^+ ve Cl^- birikiminden dolayıdır. Na^+ içeriğinde artış ve K^+ içeriğinde azalma, iyon homeostazisini bozmaktadır (Yıldıztuğay ve ark., 2014). Hücrelerde Na^+ birikimi enzimlerin aktivitelerini inhibe edici bir etkiye sahiptir. Örneğin kloroplastta, Calvin döngüsünde yer alan kimyasal reaksiyonlar, birçok enzimi içermektedir. Bu enzimlerin çoğu K^+ tarafından kontrol edilir (Zhao ve ark., 2020). NaCl kaynaklı tuz stresi, hücrelerde Na^+ , K^+ , Cl^- ve Ca^{+2} gibi iyonların stabilitesinin bozulmasına sebep olur. Apoplastik bölgede artan Na^+ 'ların hücre içine alınımı, hücre zarında yer alan çeşitli taşıyıcı kanallar aracılığıyla gerçekleşmektedir. Na^+ ile K^+ 'un yarıçaplarının yakınlığı, K^+ taşıyıcılarının bu iyonlar arasında ayırım yapmasını zorlaştırır ve bu durumda Na^+ , K^+ ile rekabete girer. K^+ 'a karşı yüksek, Na^+ 'a karşı ise düşük afinite gösteren taşıyıcı kanallar, hücre dışında Na^+ konsantrasyonunun yüksek olması durumunda Na^+ 'nın hücre zarından sitoplazmaya geçişini sağlamaktadırlar (Çulha ve Çakırlar, 2011).

İyonik strese yanıt olarak, köklerde çok daha hızlı bir zaman ölçeğinde çeşitli programlanmış hücre ölümü (apoptozis) olayları gözlemlenmektedir (Zhao ve ark., 2020). Bitkiler, tuzlu koşullarda hayatta kalmada; uygun sitozolik oranını

dengelemektedir (Çulha ve Çakırlar, 2011). Sitoplazmada uygun bir Na^+/K^+ oranı, hücrel hasarı ve besin eksikliğini önleyen hücre içinde Na^+ 'nın azaltılması ve K^+ 'nın artırılmasıyla sağlanabilmektedir. Sitoplazmik Na^+ azaltma mekanizmaları arasında; Na^+ alımının kısıtlanması Na^+ akışının artırılması ve vakuolde Na^+ 'nın depolanması yer alır. SOS (Salt Overly Sensitive: Tuza Aşırı Duyarlı) yolu, bitki Na^+/K^+ homeostazının düzenlenmesi için çok önemlidir. SOS yolundaki genlerin aşırı ekspresyonu, bitki tuzu toleransını artırmaktadır (Yang ve Guo, 2018).

Bitki hücrelerinde düşük sitoplazmik Na^+ konsantrasyonlarını koruyan iki ana faktör, tonoplastta lokalize Na^+/H^+ antiportu 1 (NHX1) ve plazma zarında lokalize SOS1 (NHX7 olarak da bilinir) tarafından sağlanır. NHX'lerin çoğu, vakuol içinde Na^+ 'nın ayrılması yoluyla Na^+ detoksifikasyonu için gerekliken , SOS sinyal yolunun görevi ise Na^+ 'yı hücre dışına göndermektir (Deinlein ve ark., 2014). Bu yüzden tuz stresinde SOS savunma mekanizması bitkinin tuz detoksifikasyonu açısından oldukça önemlidir. Tuz stresine bitki hücrelerinin verdiği cevaplardan biri de sitozolik Ca^{2+} tarafından uyarılan Ca^{2+} sensörü proteinlerin ekspresyonu ve aktivasyonudur. Bitkilerde tuz toleransında rol oynayan SOS1, SOS2, SOS3 olmak üzere üç lokus bulunmuştur (Abudureyimu ve Aksoy, 2019). Sitozolda serbest Ca^{2+} 'un varlığında sensör proteinler, stresten sorumlu genlerin ekspresyonunu sağlayan regülatör proteinlerin fosforilasyon /defosforilasyonunu başlatır (Çulha ve Çakırlar, 2011).

Uzun süre tuz stresine uğrayan bitkilerde oluşan iyon toksisitesi gelişen yaprakların erken yaşlanmaya uğramasına neden olur. Bu olayda fotosentetik aktivitenin azalmasına neden olmaktadır (Doğru ve Torlak, 2020). Tuz stresiyile birlikte görülen ozmotik stres, absisik asit (ABA) miktarında artışa ve sitoplazmada kalsiyum miktarında artışlara neden olur. SOS2-SOS3 kompleksi SOS1 ve tonoplasttaki Na^+/H^+ taşıyıcısı olan NHX1'in fosforilasyonunu ve *SOS1* genin transkripsiyonunu sağlamaktadır (Abudureyimu ve Aksoy, 2019). Bu gen, hücrel pH'ın ve Na^+ homeostazının sağlanmasında önemli bir role sahiptir (Çulha ve Çakırlar, 2011).

SOS sinyal iletim yolu diğer regülatör proteinlerle de etkileşime girerek Na^+ 'un homeostazını düzenlemektedir. Bu etkileşim HKT1 aktivitesini inhibe ederken sitozole Na^+ girişini kısıtlamaktadır. Ayrıca, SOS2, NHX'i aktive ederek fazla Na^+ 'un vakuolde biriktirilmesini sağlamaktadır. Böylelikle, CAX ($\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ antiportu) aktivitesi de bu etkileşim sayesinde artmakta ve tekrar sitozolik Ca^{2+} dengesi kurulmaktadır. Bunlara ek olarak, Ca^{2+} iyonlarının artışı SOS3 dışında diğer Ca^{2+} bağlı proteinler (kalneksin,

kalmomodulin (CaM)) tarafından da algılanmakta ve bu proteinlerde NHX ile ilişki kurarak NHX'in aktivasyonunu gerçekleştirmektedirler (Çulha ve Çakırlar, 2011).

Toprak çözeltisinde NaCl'den kaynaklanan hipertonic ortam oluşmaktadır. Bu ortama direkt maruz kalan köklere Na⁺'un girişi pasif taşıma olarak gerçekleşmektedir. Bu pasif giriş yolu, kolaylaştırılmış difüzyon ya da iyon kanalı şeklindeki taşıyıcılarla HKT (yüksek afiniteli K⁺ kanalları), LCT (düşük afiniteli katyon kanalları) ve NSCC (seçici olmayan katyon kanalları) ile sağlanmaktadır. Köke giriş yapan Na⁺'un bir kısmı sürgüne doğru taşınırken, bir kısmı geçilen hücrelerin vakuollerinde vakuol tipi Na⁺/H⁺ taşıyıcıları (NHX) aracılığı ile depolanmakta ve böylece sürgüne taşınan Na⁺ miktarı azalmaktadır. Na⁺, merkezi silindirden ksileme hücre zarına bağlı NHX (SOS1) taşıyıcıları ile yüklenir. Kökte, Na⁺'un ksilemden geri köke gelmesi Na⁺'a karşı seçici olmayan uniportlar (HKT ve NHX) aracılığıyla gerçekleşmektedir. Yapraklarda biriken fazla Na⁺, SOS1'ler ile ksileme geri yüklenerek veya floem döngüsüne katılarak köke geri gönderilebilir ya da NHX aracılığıyla vakuolde biriktirilerek de azaltılır (Çulha ve Çakırlar, 2011).

2.1.1.3. Reaktif Oksijen Türleri (ROS) ve Oksidatif Stres

Bitkilerde, reaktif oksijen türleri (ROS), hücresel metabolizmanın sekonder ürünü olarak oluşan ve hücre içi homeostazinin korunmasında önemli bir rol oynayan moleküllerdir. Atmosferde serbest olarak bulunan moleküler oksijen (O₂) canlı hücrelere doğrudan zarar vermeyen nispeten kararlı bir moleküldür. Bununla birlikte, oksijen molekülü ekstra enerji veya elektron aldığı anda, lipitler ve nükleik asitler dahil olmak üzere canlı hücrelerin çeşitli bileşenlerinde oksidatif hasara neden olacak reaktif oksijen türleri (ROS) üretmektedir. Bitkilerde normal büyüme koşullarında üretilen ROS'lar düşük konsantrasyonlarda tespit edilmiştir. Buna karşın, birçok çevresel stres faktörü ROS'ların üretimini teşvik etmektedir. Tuz stresi kompleks bir faktördür ve pek çok metabolik aktiviteyi etkilemektedir. Yüksek tuz konsantrasyonları hücresel elektron taşınımında bozulmalara ve süperoksit radikali (O₂^{•-}), singlet oksijen (¹O₂), hidrojen peroksit (H₂O₂) ve hidroksil radikali ([•]OH) ve gibi ROS'ların oluşumuna neden olmaktadır (Yıldız ve ark., 2010).

ROS'lar stres şartlarında kloroplastlar, mitokondriler, peroksizomlar gibi organeller ve apoplastik bölgelerde oluşan biyolojik reaksiyonlar sonucu oluşur. Özellikle, mitokondri ve kloroplast gibi enerji organellerinde elektron taşıma

sistemlerinde serbest O_2 ve elektronlar arasındaki etkileşim görülebilir (Yılmaz ve ark., 2011).

Bitki hücrelerinde oksijenin suya tam olarak indirgenmesi; gerekli enerji üretimini sağlar. Fakat oksijenin tam olarak indirgenememesi ise oldukça reaktif olan ve lipidler, DNA ve proteinler gibi birçok makromoleküle zarar verebilen ROS'ların oluşumuna neden olmaktadır (Doğru, 2020). ROS'ların hücrel yapılar da hasar oluşturması ise "oksidatif stres" olarak tanımlanmaktadır. İyonik toksisite, hiperozmotik stres ve beslenme yetersizliği sonucu homeostazinin bozulması bitkilerde oksidatif strese yol açabilmektedir (Yıldıztuğay ve ark., 2013). Mitokondri ve kloroplast gibi enerji üreten organellerde redoks tepkimeleri sırasında, bazı stres faktörleri nedeniyle elektronların asıl alıcı molekül yerine moleküler oksijene verilmesi sonucu ROS'lar oluşmaya başlamaktadırlar (Doğru, 2020). ROS'lar bitki gelişim sürecince sentezlenirler fakat detoksifikasyon mekanizması ile aralarındaki denge bozulmadığı sürece zararlı etki oluşturmazlar. Denge bozulduğunda hücre membranı, fotosentetik organeller, proteinler, enzimler ve DNA hasar görmektedir (Büyük ve ark., 2012).

a) Süperoksit radikali (O_2^-)

ROS türlerinden biri olan süperoksit radikali, hemen hemen tüm aerobik hücrelerde moleküler oksijenin (O_2) bir elektron (e^-) alarak indirgenmesi ile oluşmaktadır (Yılmaz E. ve ark., 2011). Elektron taşınımı sırasında $NADP^{+}$ 'ye verilmesi gereken elektronlar oksijene verilerek süperoksit radikalinin (O_2^-) oluşumu gerçekleşmektedir. Süperoksit radikali biyolojik makromoleküllerde kimyasal bir değişime yol açmaz fakat oksidatif stresin ana kaynağı olarak kabul edilmektedir (Toksoy ve Doğru, 2021) (Doğru, 2020).

Süperoksit dismutaz (SOD) enziminin yüksek katalitik etkisi nedeniyle hücrelerde O_2^- birikimine izin verilmez. Ancak, çeşitli patolojik durumlarda süperoksit yapımının artmasıyla süperokside özgü tepkimeler görülmeye başlamaktadır (Büyük ve ark., 2012).

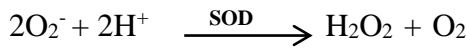
b) Singlet oksijen (1O_2):

Singlet oksijen (1O_2); oksijen molekülünün ilk stimüle edilmiş halidir. Birçok molekülü kolayca oksitleyebilmekte ve bu nedenle hücreler için toksik etki

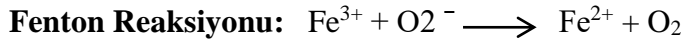
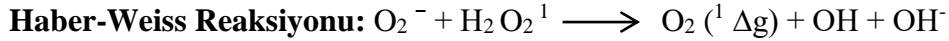
yaratabilmektedir. Stres toleransında etkili olan sinyal iletim yollarında rol oynamaktadır (Doğru ve Torlak, 2020).

c) Hidrojen peroksit (H₂O₂):

Hidrojen peroksit (H₂O₂), aerobik organizmalarda çok yüksek katalitik aktiviteye sahip bir enzim olan süperoksit dismutaz (SOD) tarafından katalize edilen süperoksit radikalinden oluşmaktadır. Süperoksit dismutaz (SOD) enziminin katalizi ile hidrojen peroksit oluşumu aşağıdaki tepkimede gösterilmiştir.



H₂O₂, süperoksit radikalının bir e⁻ alması veya O₂'nin iki e⁻ alması sonucu oluşan peroksitin iki proton (H⁺) ile birleşmesinden meydana gelmektedir. Biyolojik sistemlerdeki dismutasyon reaksiyonunda, iki O₂⁻ molekülü, iki H⁺ alarak H₂O₂ ve O₂ oluşturmaktadır. H₂O₂, serbest radikal olmadığı halde Fe²⁺ veya diğer geçiş metallerinin varlığında *Fenton reaksiyonu* sonucu, O₂⁻ varlığında *Haber- Weiss reaksiyonu* sonucunda en reaktif ve zararlı OH⁻ radikalini meydana getirmektedir. (Yılmaz ve ark., 2011).



H₂O₂ oksitleyici bir tür olarak bilinmesinin sebebi; demir, bakır gibi metal iyonlarının varlığında OH⁻ radikalinin öncülü olarak davranmasıdır. H₂O₂ özellikle proteinlerdeki hem grubunda bulunan demir ile tepkimeye girerek yüksek oksidasyon düzeyindeki aktif demir formlarını oluşturmaktadır. Bu demir formu çok güçlü oksitleyici özelliklere sahip olup, hücre zarlarında lipid peroksidasyonu gibi katabolik tepkimeleri başlatabilir. Bu nedenle biyolojik sistemlerde oluşan H₂O₂'nin derhal detoksifiye edilmesi gerekmektedir. (Büyük ve ark., 2012).

d) Hidroksil radikal (OH⁻)

Hidroksil radikali (OH^\cdot), Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonu ya da suyun yüksek radyasyona maruz kalması ile oluşmaktadır. İnaktif hale getirilmesinde hücrelerin kullanılabilecekleri bir enzim sistemi yoktur. Bu yüzden OH^\cdot hücrelerdeki en reaktif oksijen türüdür ve tüm biyolojik moleküller ile kolayca reaksiyona girebilmektedir. Fazla miktarda üretildiğinde ise toksik etkili olup, hücre ölümüne neden olabilmektedir. OH^\cdot , tiyoller ve yağ asitlerinden bir H^+ kopartarak karbon içeren organik radikaller (R^\cdot), tiyil radikalleri (RS^\cdot) veorganik peroksit radikalleri (ROO^\cdot) 'nin oluşumuna neden olmaktadır (Yılmaz ve ark., 2011).

Oksidatif Stres ve Organeller

Bitkilerde özellikle tuzluluk, kuraklık, soğuk, ağır metal toksisitesi ve UV radyasyonu gibi abiyotik stres faktörleri altında ROS'ların üretimi artmaktadır. Hücrel ROS yoğunluğunun artması sonucunda antioksidan savunma sistemleri ve ROS üretimi arasındaki denge bozulmaktadır. Bu sebeple bitkiler, oksidatif strese girebilmektedirler (Büyük İ. ve ark., 2012).

Kloroplast, mitokondri ve peroksizom gibi fotosentetik organeller, fotorespirasyon ve solunum gibi temel süreçler yoluyla ROS ve diğer redoks sinyallerinin üretim merkezidirler (Çizelge 2.4.). ROS, hücrede membran lipitleri, nükleik asitler, proteinler, klorofiller ve diğer makromoleküllerden elektron kopararak onların kararlı yapılarını bozabilmektedir (Acar ve ark., 2022). Hücre membranı üzerine serbest oksijen radikallerin etkisi, lipid peroksidasyonu ile olmaktadır. Hücre membranının tahribatına yol açan lipid peroksidasyonu, birkaç reaksiyon basamağı sonucunda malondialdehit (MDA) ürününü üretmektedir (Yılmaz ve ark., 2011). Oluşan MDA, hücre membranlarındaki iyon alışverişine etki ederek iyon geçirgenliğinin (Ca^{+2} , Na^+) artışına, enzimatik değişimlere, membran bütünlüğünün yok olmasına yol açmaktadır. Hücre içerisinde Ca^{+2} iyonlarının artışı, protein ve lipitleri parçalayabilen proteaz ve fosfolipaz enzimlerini aktive etmektedir (Sönmez E., 2019). Bununla birlikte, lipid peroksidasyonu sadece membran geçirgenliğini engellemekle kalmaz, aynı zamanda elektrolit ve enzimlerin ve reseptörlerin deaktivasyonuna ve ayrıca nükleik asitlerin ve proteinlerin oksidasyon sürecini hızlandırmasına neden olmaktadır (Hasanuzzaman ve ark., 2021).

Çizelge 2. 6. Bitki organellerinde Reaktif Oksijen Türleri; oluşum mekanizması ve hücre içi lokasyonları

Oluşum Mekanizması	Organel	Reaktif Oksijen Türü
Fotosentez ET ve PSI-II	Kloroplast	O_2^-
Hücre Solunum ET	Mitokondri	O_2^-
Glikolat Oksidaz	Peroksizom	H_2O_2
NADPH oksidaz	Plazma Membranı	O_2^-
Lipit Peroksidasyonu	Peroksizom	H_2O_2
Oksalat Oksidaz	Apoplast	H_2O_2
Ksantin Oksidaz	Peroksizom	O_2^-
Peroksidaz ,Mn ve NADH	Hücre Duvarı	H_2O_2, O_2^-
Amino oksidaz	Apoplast	H_2O_2

Kloroplastlar; ışık reaksiyonu ile klorofillerde ROS üretimi için ana bölge olarak kabul edilmektedir. O_2 ve O_2^- büyük ölçüde üretildiği organellerdir. Stres koşulları altında, stoma iletkenliği ve CO_2 asimilasyonu büyük ölçüde azalmaktadır. Böylece elektron taşıma sistemini engelleyen ROS oluşumu artmaktadır (Hasanuzzaman ve ark., 2021).

O_2^- radikali; peroksizomların iki farklı bölgesinde oluşmaktadır. Bunlardan birincisi peroksizom matriksidir. Burada ksantin oksidaz enziminin katalizlediği reaksiyon sonucunda, ksantin ve hipoksantin ürik aside dönüştürülmektedir. İkincisi ise peroksizom membranlarındaki NAD(P)H molekülüne bağımlı basit bir elektron taşınım sistemidir. Bunun dışında CO_2 solunumu esnasında peroksizomlarda $NADP^+$ oluşturulmasında, lipit katabolizmasının son ürünü olan yağ asitlerinin β -oksidasyonu sonucunda da H_2O_2 meydana gelmektedir (Sönmez, 2019).

ROS'lar stres durumunda aşırı üretildiğinde ve düzenlenemediğinde hücre hasarına neden olabilirler. Bitkiler oluşabilecek bu hasarı engellemek ve stres toleransını geliştirebilmek için antioksidan savunma sistemlerini aktive ederler.

2.2. ANTIOKSİDANLAR ve DETOKSİFİKASYON

Bitkiler, tuzluluğun meydana getirdiği osmotik ve iyonik stres sonucu oluşan oksidatif hasara karşı çeşitli biyokimyasal ve moleküler savunma mekanizmaları

geliştirmişlerdir. Bu savunma mekanizmalarından biride antioksidan sistemlerdir. Antioksidan sistemlerin temel görevi oksidatif stres sonucu oluşan ROS'ların oluşumunu azaltmak ve detoksifikasyonunu sağlamaktır. Stres koşulları altında antioksidan kapasiteyi artırabilen bitki türlerinin genellikle strese daha dayanıklı oldukları kabul edilmektedir (Doğru , 2019).

Antioksidan savunma sisteminin enzimatik olduğu kadar enzimatik olmayan bileşenleri de oksidatif stresin olumsuz etkisini azaltmaktadır (Hasanuzzaman ve ark., 2021). Tuz stresi ile meydana gelen ROS'lerden hücreyi korumak için bitkiler, süperoksit dismutaz (SOD) katalaz (CAT), peroksidaz(POX), glutatyon redüktaz (GR), gibi antioksidan enzimleri ve askorbat, glutatyon, α -tokoferol, karotenoidler gibi enzimatik olmayan bileşenleri kullanmaktadırlar (Çizelge 2.5) (Yılmaz ve ark., 2011).

2.2.1 Enzimatik Antioksidanlar

a) Süperoksit dismutaz (SOD): Bitki hücrelerinde süperoksit radikalini temizleyen SOD'lar, süperoksidin O_2 ve H_2O_2 'ye dismutasyonunu katalizlemekte ve bir hücre içinde ROS'a karşı savunmanın ilk basamağını oluşturmaktadır (Yıldız ve ark., 2014). Bitkilerde farklı SOD izoformları farklı hücre bölümlerinde yer almaktadır. Fe-SOD genelde bitkilerde belirlenememelerine karşın tespit edildikleri zaman kloroplast kısımlarında, Mn-SOD mitokondri ve peroksizomlarda, Cu/Zn-SOD kloroplast, sitoplazma ve hücrelerarası boşlukta bulunmaktadırlar. SOD'un enzimatik reaksiyonu sonucu H_2O_2 ve O_2 oluşmaktadır. Oluşan H_2O_2 'nin hücreye zarar vermemesi için hemen ortamdan uzaklaştırılması gereklidir. Çünkü H_2O_2 belirli metal iyonları ve şelatların varlığında yüksek derecede reaktif OH radikalini oluştur (Kireççi, 2018). SOD aktivitesinin biyotik ve abiyotik stres faktörleri altındaki bitki dokularında artış göstermesi, stres toleransının gelişmesi bakımından oldukça önemlidir (Doğru ve Canavar, 2020).

Çizelge 2. 7. Tuz stresi toleransında önemli antioksidanlar (enzimatik ve enzimatik olmayan) ve hücresele lokalizasyonları

Enzimler/	Fonksiyonları	Lokalizasyon
-----------	---------------	--------------

Antioksidanlar		
SOD	$O_2^{\cdot-}$ 'nin dismutasyonu ile H_2O_2 olusumunu sağlar.	sit,klo,mit,per
CAT	İndirgeyiciye gereksinim duymadan H_2O_2 'i detoksifiye eder.	mit, per, gli
POX	İndirgeyici olarak çeşitli substratları kullanarak H_2O_2 'i detoksifiye eder; hücre duvarı polimerleri ile etkileşim içindedirler.	hd, sit, mit, vak
APX	İndirgeyici olarak askorbat ile H_2O_2 detoksifikasyonu sağlar.	sit, klo, mit, per
MDHAR	İndirgeyici olarak NAD(P)H ile monodehidroaskorbat radikallerini indirger.	sit, klo, mit
DHAR	İndirgeyici olarak GSH ile dehidroaskorbat radikallerini indirger.	sit, klo, mit
GR	İndirgeyici olarak NADPH ile yükseltgenmiş glutasyonu indirger.	sit, klo, mit, per
GPX	İndirgeyici olarak GSH kullanarak lipitleri hidroperokside eder ve H_2O_2 'i detoksifiye eder.	sit, klo, mit, er
GST	Lipit hidroksiperoksitleri detoksifiye eder ve DHAR aktivitesi sergiler.	apo, cit, klo, mit, nuk
Askorbat	APX'in substratıdır, H_2O_2 'i detoksifiye eder.	apo, sit, klo, mit, per, vak
Glutasyon	Glutasyon transferazlar ve glutasyon redüktazların substratıdır. H_2O_2 , OH^{\cdot} ve diğer hidroksiperoksitleri detoksifiye eder.	apo, sit, klo, mit, per, vak
α -tokoferol	Membran lipitlerini peroksidasyondan korur, lipit peroksitlerini detoksifiye eder ve 1O_2 giderir.	membranlar
Karotenoidler	1O_2 giderir, ABA'nın haberci molekülüdür, fotosentezde etkindir	klo, kro, ami
Flavonoidler	Direk olarak H_2O_2 'i temizler.	vak

b) Katalaz (CAT): Katalazlar, H_2O_2 'yi H_2O ve O_2 'ne dönüştüren enzimlerdir. Bitki katalazları üç sınıfa ayrılabilir. 1. sınıf katalazlar fotosentetik dokularda en belirgindir ve fotorespirasyon sırasında üretilen H_2O_2 'nin giderilmesinde rol oynar. 2. sınıf katalazlar vasküler dokularda yüksek oranda üretilir ve lignifikasyonda rol oynayabilmektedir. 3. sınıf katalazlar ise, tohumlar ve genç bitkilerde oldukça fazladır ve bunların aktiviteleri glioksizomlarda glioksilat çevrimi sırasında lipit peroksidasyonu sırasında üretilen aşırı H_2O_2 'nin uzaklaştırılması ile bağlantılıdır. Katalazlar, H_2O_2 'yi

doğrudan değiştirebilen ve stres sırasında ROS detoksifikasyonu için vazgeçilmez olan başlıca temizleyici enzimlerdendir (Tiryaki, 2018). Yüksek katalaz aktivitesi, hücrelerin hidrojen peroksiti gibi reaktif oksijen türlerine karşı korunmasına yardımcı olur. Bu nedenle, bitkilerdeki katalaz aktivitesi, bitki sağlığı, büyüme ve adaptasyon açısından önemlidir.

c) Peroksidaz (POX): Peroksidazlar, oksitleyici olarak H_2O_2 veya organik peroksitleri kullanan oksidoredüktaz enzim sınıfının bir üyesidir. Organik Oksidoredüktazlar sınıfına ait peroksidazlar, moleküler ağırlıkları 30 kDa ila 150 kDa arasında değişmektedir. Peroksidazlar hücre duvarı oluşumunda, lignifikasyonda, oksin metabolizmasında, reaktif oksijen türlerinin temizlenmesinde, meyve olgunlaşmasında ve bitki savunma sisteminde önemli rol oynamaktadır (Öztekin, 2020).

SOD enzim aktivitesi sonucu ortaya çıkan H_2O_2 'in kloroplastlardan süpürülmesinde rol oynayan önemli enzimlerden birisidir. Peroksidazlar, *hem* yapısına sahip askorbat peroksidaz (APX) ve guaiol tip peroksidazları (GPX) içeren glikoproteinlerdir. POX, lignin ve etilen biyosentezi, IAA'nın bozulması, proteinlerin toplanması gibi birçok fizyolojik reaksiyonda görev almaktadır (Arıkan ve ark., 2017).

d) Askorbat Peroksidaz (APX): APX gelişmiş bitkiler de dahil olmak üzere birçok canlı grubunda ROS'ların detoksifikasyonuna karşı en etkili antioksidan enzimlerden birisidir. APX bitki hücrelerinde su-su döngüsü ve askorbat- glutatyon döngüsünde yer alan enzimlerden biridir. H_2O_2 'nin parçalanmasından sorumludur. APX enziminin kloroplastlardaki tilakoid membranlara bağlı olan (tAPX), glioksizom mebranlarına bağlı olan (gmAPX), kloroplast stromasında (sAPX) ve sitoplazmada (cAPX) çözülmüş olarak bulunan farklı izozimleri vardır. APX' un H_2O_2 'ye afinitesi oldukça yüksektir. Bitki hücrelerinde H_2O_2 'nin parçalanmasında rol oynayan diğer enzimlerden olan katalazın (CAT) ve guaiakol peroksidazın (GPOX) afinitesi ise daha düşüktür. Bu sebeple bitkilerde H_2O_2 'nin detoksifikasyonu konusunda en etkili enzim olarak rol almaktadır (Doğru, 2019).

e) Glutatyon Redüktaz (GR): Glutatyon Redüktaz (GR), SOD ve APX gibi askorbat-glutatyon döngüsünde rol oynayan bir enzimdir. ROS'lara karşı savunmada; indirgenmiş glutatyon havuzunu besleyerek oldukça etkin bir rolü vardır. GSH aynı zamanda glutatyon transferaz enziminin substratı olarak da önemlidir. GR aktivitesinde

ve GSH miktarında meydana gelen değişimler bitki türlerinin çeşitli stres faktörlerine karşı tolerans geliştirmesinde oldukça önemlidir (Doğru, 2019).

2.2.2 Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

a) Askorbat (Askorbik asit -Vitamin C): Doğada en çok bulunan ve oksidatif streste en etkili antioksidandır. Stres altındaki bitkilerdeki askorbik asidin temel rolü H_2O_2 ' in zararlı etkilerini ve diğer toksik oksijen türevlerinin etkilerini azaltmaktır. Mitokondride sentezlenmektedir ve diğer hücrelere kolaylaştırılmış difüzyon yolu ile taşınmaktadır (Arıkan ve ark., 2017). Askorbik asidin fotosentetik pigmentleri ve fotosentetik organelleri oksidatif stresin olumsuz etkilerinden koruduğu ve stabilizasyonunu sağladığı da bilinmektedir (Doğru ve Torlak, 2020).

b) Glutatyon: Glutatyon; glutamin, sistein ve glisin amino asitlerinden oluşan bir tripeptittir. Glutatyon transferazlar ve glutatyon redüktazların substratıdır. Bitki hücrelerinde sitokrom, kloroplast, mitokondri, peroksizom, apoplast ve vakuollerde bulunur. Oksidatif streste oluşan radikallerin azaltılmasında oldukça önemli rolleri vardır. Özellikle askorbat-glutatyon döngüsünde indirgenmiş askorbik asitin oluşumunu sağlamaktadır. (Doğru, 2019).

c) Karotenoidler: Bitkilerde yaygın olarak bulunan renk pigmentleridir. Karotenoidler özellikle singlet oksijenin ve peroksil radikallerini detoksifikasyonunda etkili olan antioksidanlardır (Arıkan ve ark., 2017).

d) α -Tokoferoller (Vitamin E): Tokoferoller (α , β , γ , δ) antioksidan aktiviteye sahiptir. Bunlardan α -tokoferol doğada en bol bulunan ve yüksek biyolojik aktiviteye sahiptir. Tokoferoller ROS'ların özellikle singlet oksijen ve OH^\cdot radikalini etkisiz hale getiren detoksifiye etme özelliğine sahip antioksidatif bir fonksiyon taşımaktadırlar. Tokoferoller lipid peroksidasyonunu engellemekte ve diğer oksidatif reaksiyonlar sırasında meydana gelen radikallerin etkisini önlemektedir. Bunların yanısıra hücre sel sinyal olarak da görev yapmaktadır (Koç ve Üstün, 2008).

2.3. MISIR (*Zea mays L.*) ve TUZ STRESİ

Mısır Poaceae (*Gramineae*) familyasından, tek yıllık, monokotil bir bitkidir. Çiçekleri monoik yapıda olup, erkek (tepe püskülü) ve dişi çiçekler (koçan) aynı bitki üzerinde fakat farklı yerlerde bulunmaktadır. Mısır, $2n=20$ kromozomlu olup diploid bir bitkidir.

Mısır dünyada ekim alanı bakımından buğday ve çeltikten sonra 3. sırada yer almaktadır. Ülkemizde üretim miktarı bakımından buğday ve arpadan sonra üçüncü sırada yer almaktadır. Mısır karbonhidrat, protein, yağ, lif, çeşitli mineral ve vitamin içeriği ile temel gıda ve yem bitkilerinden biridir. Gıda tüketimi dışında; tekstil, enerji, ilaç, kozmetik gibi endüstriyel kullanımları da bulunmaktadır. Çok yönlü tüketim alanı nedeni ile ekonomik değeri olan bir tarım bitkisidir (Mutlu, 2019).

Mısır, dünyanın farklı bölgelerinde yetiştirilebilen adaptasyon gücü yüksek bir bitkidir. Mısır üretimi için ideal sıcaklık $24-32\text{ C}^{\circ}$ 'ler arasındadır. Aşırı asit ve aşırı alkali topraklar mısır yetiştiriciliği için uygun değildir. En uygun pH derecesi 6-7 dir.

Toprak tuzluluğu pH değerini artırarak bazik ortam sağlamaktadır. (Karaoğlu ve Yalçın, 2018). Mısır C4 bitkisidir. Bu sebeple diğer tahıllardan (C3 bitkileri) farklı olarak, fotosentez verimliliği daha yüksektir.

Mısır bitkisinde tuz stresinin ilk olumsuz etkilerinden birisi de solunum, fotosentez gibi metabolik olayların yavaşlamasıyla birlikte büyüme ve gelişmenin azalmasıdır. Kök büyümesi olumsuz etkilenir.

Tuz stresi bitkiiler üzerinde osmotik ve iyon stresi oluşturmaktadır. Ayrıca, bitki yapısında oluşan yapısal bozulmalar ve toksik maddelerin sentezlenmesi ile etki edebilmektedir. Örneğin, NaCl'nin başlıca sekonder etkileri; bazı protein yapılarına zarar vermek, klorofil zar yapısını bozmak, fotosentez inhibisyonu ve metabolik toksisite; K^{+} alımının engellenmesi ve hücre ölümü olarak bildirilmiştir (Cengiz ve ark., 2022).

2.4. BİTKİSEL BİYOUYARICILAR (BİYOSTİMÜLANTLAR)

Bitki biyoyarıcısı, besin verimini, abiyotik stres toleransını ya da ürün kalite özelliklerini geliştirmek için bitkilere uygulanan, besin içeriği ne olursa olsun herhangi bir madde veya mikroorganizmadır. Aynı zamanda, olumsuz büyüme koşullarında bitki stres toleransını ve üretkenliğini destekleyebilen aktif bileşiklerin çoğu, mahsul kalitesini etkileyebilen metabolitler veya ara maddelerdir. Biyoyarıcılar; dormansiye

baskılayabilir, meyve boyutunu artırabilir, kök sistemi ve vejetatif dokuların gelişimini geliştirebilir, fotosentetik aktiviteleri artırabilir, bitki canlılığını artırabilir, çiçeklenmeyi düzenleyebilir. İçerdiği fizyolojik olarak aktif bileşikler arasındaki olası etkileşimler göz önüne alındığında, bitkiler üzerindeki etkiler doza, tedavi süresine, büyüme koşullarına ve bitki türlerine bağlı olabilir. Biyoyarıyıcılar genellikle doğrudan toprağa ya da vejetatif organellere uygulanabilir. Yapılan çalışmalarda bitkilerde stres karşısında antioksidan kapasiteyi artırdığı bildirilmiştir. (Teklić ve ark., 2021). Bitki biyostimülantları, mahsul verimini ve kalitesini modüle eden, fizyolojik ve moleküler süreçleri tetikleyen doğal bileşiklerdir (Povero ve ark., 2018).

Bitkilerde besin alımını, besin kullanım etkinliğini, fotosentez kapasitesini ve biyotik veya abiyotik stres toleransını artırabilmektir (du Jardin, 2015). Farklı işlevleri arasında, biyostimülantlar, özellikle hormonlardaki ve diğer sinyal moleküllerindeki içerikleri nedeniyle, bitki büyümesini ve azot metabolizmasını etkiler. Biyoyarıyıcı uygulanan bitkilerde genellikle kök kıl uzunluğunda ve yoğunluğunda önemli bir artış gözlenir, bu da bu maddelerin, emici yüzey alanında bir artış yoluyla bitkilerde besin alımını destekleyen bir "besin alma tepkisi" indüklediğini düşündürmektedir. Ayrıca, biyoyarıyıcılar, birincil ve ikincil bitki metabolizmasında işlev gören enzimlerin aktivitesini ve gen ekspresyonunu olumlu yönde etkilemektedir. Birincil etkileri, bitkide fizyolojik tepkileri indüklemektir. Bu tepkilerin çoğu büyüme ve gelişme ile ilgilidir (Nardi ve ark., 2016).

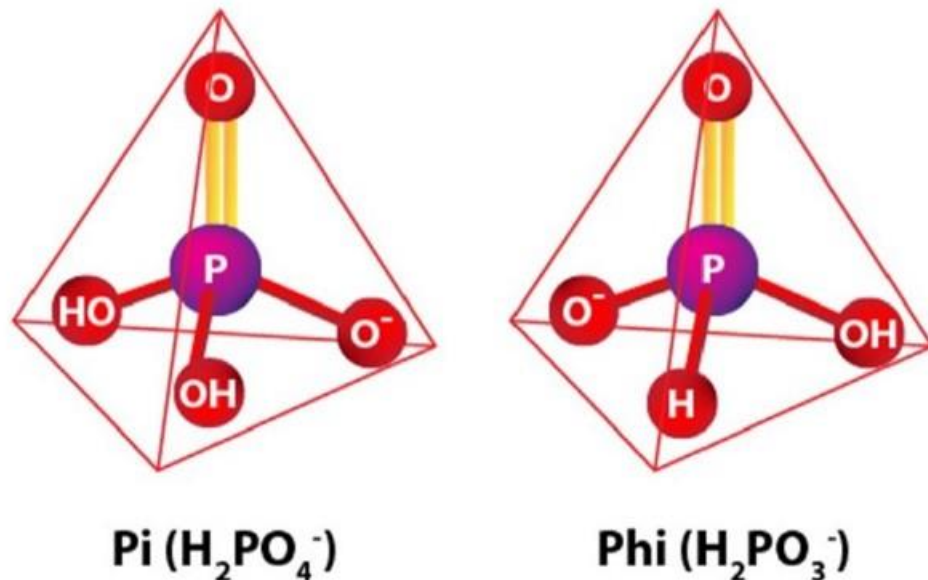
Biyoyarıyıcıların etki gösterdiği önemli bir metabolizma da poliamin metabolizmasıdır. Poliaminler, Na^+ birikimini azaltmakta, tuzluluktan etkilenen bitkilerin antioksidan aktivitelerini ve fotosentetik kapasitesini arttırmaktadırlar (Yılmaz ve Çiftçi, 2021). Poliaminlerin stres altındaki bitkilerde olumlu etkisi, ozmolitlerin sentezi için gen ifadesinin düzenlenmesine, zar bütünlüğünün korunmasına, farklı organellerde Na^+ ve Cl^- iyon birikiminin kontrol edilmesine dahil olduklarını gösterir (Prabhat Kumar Srivastava ve ark., 2021).

Poliaminlerin içeriğindeki değişimler tuz stresi koşullarında hem prolin birikimini teşvik edebilmekte hem de kontrol edebilmektedir. Transgenik bitkilerde artan prolin içeriği veya poliamin biyosentezi abiyotik streslere karşı tolerans ile ilişkilendirilmiştir (Yıldız ve ark., 2010). Araştırmalar poliaminlerin antioksidan enzimleri aktive ederek ve antioksidanları arttırarak serbest radikal oluşumunu, membran peroksidasyonunu ve biyomoleküllerin denatürasyonunu engellediği ve tuzlu koşullarda fide büyümesinin sağlandığını ortaya koymuştur (Yıldız ve ark., 2014).

Bitki gelişimini, bitkilerin beslenmesini, ürün kalitesini ve verimini olumlu yönde etkileyen; bitkilerin strese dayanıklılığını arttıran biyoyararlılar sınıflandırmaları tamamen kesinleşmemekle birlikte, kimi araştırmacılar tarafından önemli kategorileri belirlemiştir (Çizelge 2. 8.). Bu kategoriler; humik ve fulvik asitler, amino asitler ve diğer azotlu bileşikler, deniz yosunu ve bitki ekstraktları, kitin ve kitosan benzeri polimerler, inorganik bileşikler, yararlı mantarlar ve yararlı bakteriler şeklindedir (Külahtaş ve Çokuysal, 2016).

Bitkiler temel besin maddelerinin oluşması için fosfora ihtiyaç duyarlar. ATP oluşumu ve DNA yapısında yer alırlar. Fosfor, bitki büyüme ve gelişmesinde önemli rollere sahiptir. Bitkinin hastalık ve zararlılara karşı direncini artırır. Ayrıca topraktan potasyumun alımına yardımcı olur ve bitki köklerinin suyu almasını düzenleyerek suyun etkili bir şekilde kullanılmasını sağlar (Bolat ve Kara, 2017).

Fosfat (Pi) anyonunun bir analogu olan fosfit (Phi), potansiyel bir biyoyararlı, ve çevreye dost bir bileşen olarak ortaya çıkmaktadır. Fosfat molekülünden bir oksijen eksik olan fosfit, bitkiler tarafından direkt kullanılamaz, ancak toprak bakterileri tarafından yavaşça fosfata oksitlenebilir ve daha sonra fosfor besin maddesi olarak kökler tarafından emilebilir (Huang ve ark., 2018). Fosfor, bitkilerin büyümesi, gelişmesi, kök oluşumu, çiçeklenme ve tohum oluşumu gibi birçok temel biyolojik süreç için gereklidir.



Şekil 2. 3. Fosfat (Pi) ve Fosfit (Phi) Anyonu 3 boyutlu moleküler yapısı

Yaptığımız literatür taramasında fosfit genel olarak antibakteriyel ve fungusit olarak kullanılmıştır. Mısır (*Zea Mays L.*) bitkisi üzerinde biyoyarıcı olarak hümik asit ve fulvik asit uygulamaları yapılmıştır (**Şekil 2.3**). Biz bu tez çalışmamızda tuz stresi altında mısır bitkisinde fosfitin tuz toleransı ve antioksidan kapasite üzerindeki etkileri araştırmayı hedefledik.



Çizelge 2. 9. Biyoyarıcıların bitkilerdeki hücrel hedeflerinden tüm bitkinin fizyolojik işlevlerine, tarımsal/bahçecilik işlevlerine, ekonomik ve çevresel faydaları (du Jardin,2015).

	Hümik asit	Yosun ekstraktları	Protein hidrolazatı	Glisin betain	Bitki Büyümesini Teşvik Eden <i>Rhizobacteria</i>
Hüresel mekanizma (hüresel bileşenler ve proseslerle etkileşim)	Plazma zarı proton pompalayan ATPazları etkinleştirir, mısır köklerinde hücre duvarı gevşemesini ve hücre uzamasını teşvik eder (<i>Zea mays</i>) (Jindo ve ark.,2012)	<i>Ascophyllum nodosum</i> ekstraktları, yağlı tohumlarda (<i>Brassica napus</i>) kabuklu yemişlerin (örn. Cu, Fe, Zn) mikro taşıyıcılarını kodlayan genlerin ekspresyonunu uyarır (Billard ve ark., 2014)	Tuz stresi altında yoncadan (<i>Medicago sativa</i>) elde edilen enzimatik hidrolizat, fenilalanin amonyak-liyaz (FAL) enzimini, gen ekspresyonunu ve flavonoidlerin üretimini uyarır (Ertani ve ark., 2013).	Kinoida tuzun neden olduğu ışık hasarına karşı (Shabala ve ark., 2012) Fotosistem II (PSII'yi, muhtemelen reaktif oksijen süpürücülerinin aktivasyonu yoluyla korur (Chen & Murata, 2011).	<i>Azospirillum brasilense</i> , kış buğdayında (<i>Triticum aestivum</i>) oksinleri serbest bırakır ve kök morfogenezinde yer alan oksin sinyal yollarını aktive eder (Dobbelaere ve ark., 1999).
Fizyolojik fonksiyon	Köklerin doğrusal büyümesi ve biyokütlesinde artış	Artan doku konsantrasyonları ve kök sürgünleri için mikro besinlerin taşınması	UV ve oksidatif hasara karşı flavonoidlerle koruma (Huang ve ark., 2010)	Tuz stresi altında yaprak fotosentetik aktivitesinin korunması	Artan lateral kök saçakları ve kök yoğunluğu
Tarım / bahçecilik fonksiyonu	Kök yayılma kapasitesinde ve ürün verimliliğinde artış	Bitki dokularında düzelmiş mineral bileşenler	Abiyotik (örn. tuz) strese karşı artan tolerans ve mahsul artışı	Abiyotik streslere (örn. yüksek tuzluluk) karşı artan tolerans ve mahsul artışı	Artan kök arama kapasitesi, gelişmiş besin kullanım verimliliği
Ekonomik ve çevresel faydalar	Daha yüksek mahsul verimi gübre tasarrufu ve çevreye daha az zarar	Bitki dokularının "biyofortifikasyonu" ile (S, Fe, Zn, Mg, Cu'dan artan içerik) geliştirilmiş besin değeri,	Stres koşulları altında daha yüksek mahsul verimi (örn. yüksek tuzluluk)	Stres koşulları altında daha yüksek mahsul verimi (örn. yüksek tuzluluk)	Daha yüksek mahsul verimi, gübre tasarrufu ve çevreye daha az zarar

Çizelge 2. 10. Mısır (*Zea mays*) bitkisine uygulanan biyoyararlı çalışmalar

Biyouyarıcı	Referans	Çalışma koşulları	Büyüme ve besin alımı üzerindeki etkileri	Bitki fizyolojisine etkisi
Hümik Asitler	Jindo ve ark., 2012	Minimal sıvı ortamda laboratuvar testleri	Köklerde artan sayıda mitotik bölge ; kök büyümesinin teşviki	Köklerde artan sayıda mitotik bölge ve proton pompası aktivitesi
Hümik Maddeler	Schiavon ve ark., 2010	Hidroponikte büyüme odası testi	Değerlendirilmemiş	Fenilpropanoid yolunun güçlendirilmesi, fenilalanin ve tirozinde azalma, fenolik bileşiklerde ve bazı amino asitlerde artış
Hümik Asitler	Canellas ve ark. 2002	Minimal sıvı ortamda laboratuvar testleri	Artan kök uzaması, sekonder köklerin çoğalması ve kök yüzey alanı artışı	Plazma zarının stimüle edilmiş H ⁺ -ATPaz aktivitesi ve lateral kök gelişiminin mitotik bölgeleri
Fulvik Asit	Anjum ve ark., 2011	Kuraklık ve kuraklık olmayan koşullarda net evde pot denemeleri	Kuraklık stresi altında artan yaprak alanı, bitki kuru ağırlığı, klorofil içeriği, verim artışı; kuraklık olmayan koşullarda artan verim	Artan CO ₂ asimilasyon oranı ve prolin içeriği
Fulvik Ve Hümik Asitler	Eyheraguibel ve ark. 2008	Hidroponik kültürde büyüyen 10 günlük fidelere koçanı doldurma aşamasına kadar uygulama	Fidelerin artan kök uzunluğu; 2 ayda artan toplam bitki biyokütlesi; bitki başına artan sayıda yaprak ve çiçek , gelişmiş bitki gelişimi; artan lateral kök gelişimi; artan besin alımı	
Hümik Asitler	Canellas ve ark. 2009	Minimal sıvı ortamda laboratuvar testleri	Uyarılmış kök büyümesi ve kök uzunluğu	Kök plazma zarı veziküllerinde aktifleştirilmiş proton pompası aktivasyonu
Hümik Asitler	Aslı ve Neumann ,2010	Hidroponik kültürde ve çoklu uygulamalarla toprakta büyüme odası çalışması	Yüksek konsantrasyonlarda hümik asit ile sürgünün inhibisyonu, ancak kök büyümesinin değil; azaltılmış terleme	Azaltılmış hidrolik iletkenlik, kök ortamından sürgüne su taşınmasını azalttı

3. MATERYAL VE YÖNTEM

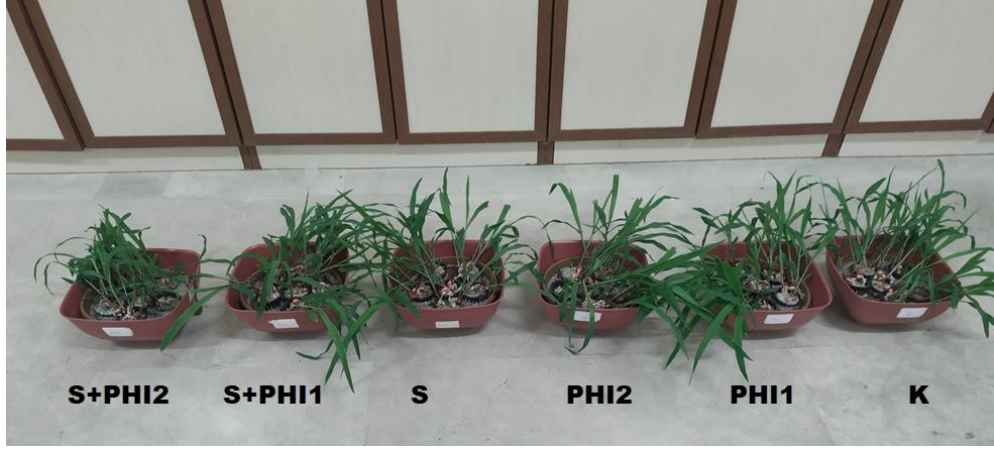
3.1. Sterilizasyon aşaması

Tez çalışmamızda araştırma materyali olarak mısır (*Zea mays* cv. *DKC6664*) kullanım alanının genişliği ve ekonomik öneminden dolayı seçilmiştir. Sterilizasyon aşaması için mısır tohumlarına belli oranda seyreltilmiş (%4) sodyum hipoklorit beş dakika süresince uygulanmıştır. Sonrasında sodyum hipokloridin uzaklaştırılması için deiyonize su ile yıkama işlemi yapılmış ve bu yıkama birkaç kere tekrar edilmiştir. Bu aşama tohumların fide haline geçinceye kadarki büyüme dönemine sağlıklı şekilde ulaşmaları amacıyla yapılmıştır.

3.2. Çalışmada yer alan Uygulama Grupları

Yüksek lisans tezimizde stres faktörü olarak tuzluluk stresi seçilmiştir. Bu konuda daha önceki yapılan çalışmalar incelendiğinde mısır bitkisine 100 mM NaCl uygulanmasına karar verilmiştir. Tezimizde strese karşı olası koruyucu mekanizmalarını inceleyeceğimiz biyouyarıcı olarak fosfit mısır bitkilerine hem kontrol koşullarında hem de tuz stresi koşullarında dışarıdan uygulanarak yapılmıştır. Fosfitin uygulama dozları etki mekanizmasında önemli olduğundan daha önceki çalışmalar incelenmiş ve 1 ve 3 gr L⁻¹ olmasına karar verilmiştir.

Mısır tohumları önce petri kaplarında çimlendirilmiş ve hidroponik ortama alınmıştır. Bu ortamda 21 gün süresince kontrollü koşullarda yetiştirilmiştir. Üç haftalık mısır fidelerine stres ve biyouyarıcı uygulamaları yapılmıştır. Bahsedildiği gibi mısır fideleri tuz stresi uygulamasına eş zamanlı olarak fosfit uygulamasına maruz bırakılmıştır. Uygulama süresi olarak bahsedilen makaleler de göz önüne alındığında 2 gün (48 saat) seçilmiştir. Uygulama süresi sonunda hasat edilen mısır kök örneklerinde fizyolojik ve biyokimyasal analizler yapılmıştır. Analiz süresine kadar bekletilen örnekler -80°C ortamında tutulmuştur. Tezimizde yer alan uygulama gruplarının fotoğrafları Şekil 3.1 ve grupların açıklamaları Çizelge 3.1’de gösterilmiştir.

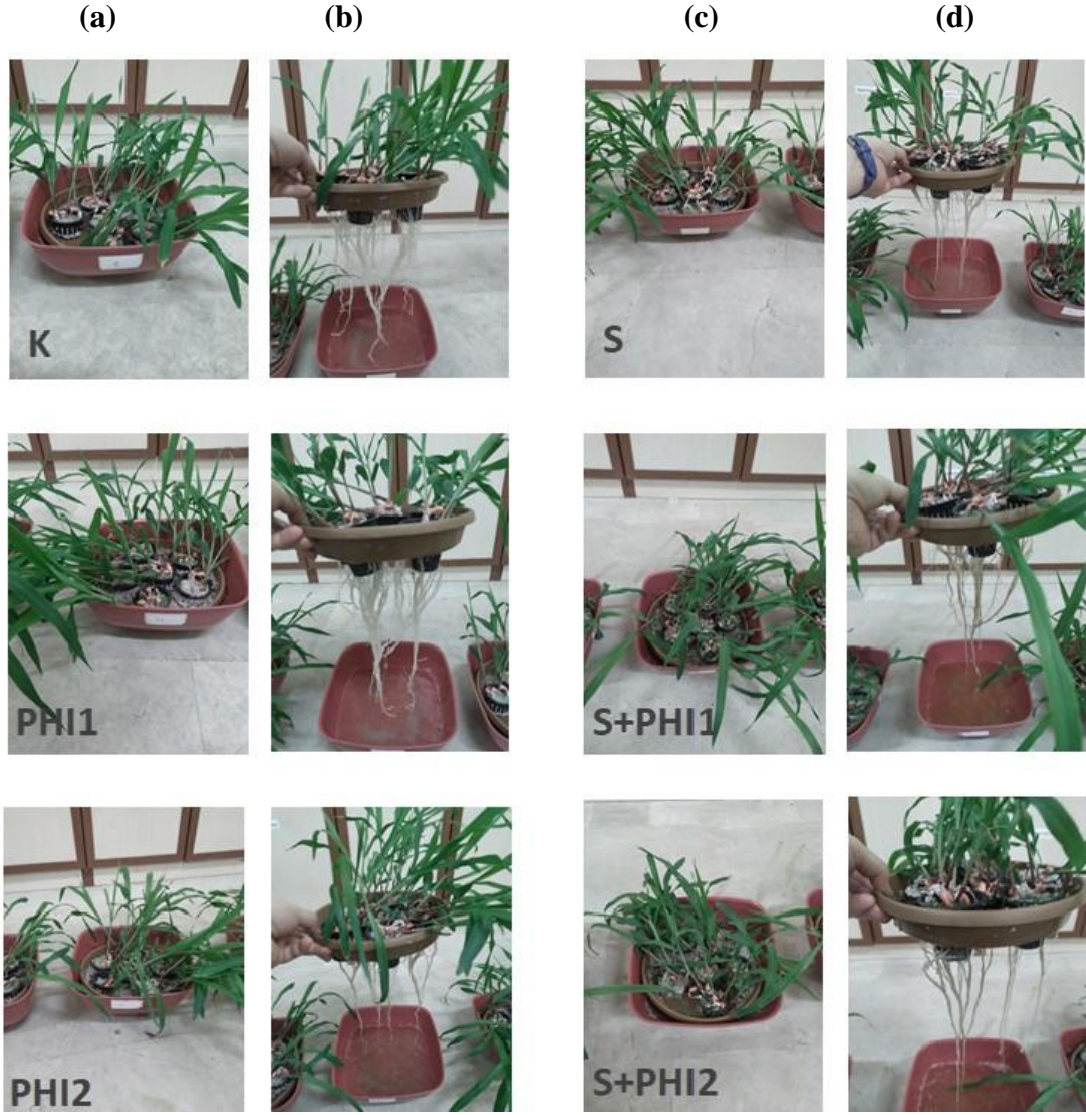


Şekil 3. 1. Tezimizde kullanılan uygulama gruplarının fotoğrafları

Çizelge 3. 1. Çalışmamızda kullanılan uygulama grupları ve açıklamaları

Grup	Grup açıklaması
K	Kontrol grubu, herhangi bir uygulama yapılmamış grup
PHI1	Kontrol koşulları altında sadece 1 g L ⁻¹ fosfit uygulaması yapılan grup
PHI2	Kontrol koşulları altında sadece 3 g L ⁻¹ fosfit uygulaması yapılan grup
S	Kontrol koşulları altında sadece 100 mM NaCl stresi uygulaması yapılan grup
S+PHI1	100 mM NaCl stresi ve 1 g L ⁻¹ fosfit uygulamaları yapılan grup
S+PHI2	100 mM NaCl stresi ve 3 g L ⁻¹ fosfit uygulamaları yapılan grup

Stres ve biyouyarıcı uygulamalarının mısır bitkilerinde başlıca etki alanlarının kökler olduğu görülmektedir. Bu amaçla belirlediğimiz analizleri kök örnekleri üzerinde tamamladık. Hasat öncesinde uygulama gruplarının mısır fide ve köklerine ait fotoğraflar aşağıda sunulmuştur (Çizelge 3.1).



Şekil 3. 2. Mısır (*Zea mays L.*) uygulama gruplarının hasat öncesi gövde ve kök görüntüleri ((a) Kontrol grubu gövde (b) Kontrol grubu Kök (c) Stres grubu gövde (d) Stres grubu kök (Bakınız Çizelge 3.2).

Tezimizin amacı olan tuzluluk stresi altında mısır köklerinde dışarıdan fosfit uygulamasının olası koruyuculuk rollerini saptayabilmek için fizyolojik ve biyokimyasal analizler yapılmıştır.

Fizyolojik analizler içerisinde;

- Bağlı su içeriği (RWC)

Biyokimyasal parametreler içerisinde,

- Antioksidan enzim/izozim aktivite tayinleri (SOD, CAT, POX)
- ROS miktarı (H_2O_2 miktarı)
- Lipid peroksidasyonu (TBARS miktarı)

- Prolin analizi
- Protein miktarı

3.3. Bağlı Su içeriğinin (RWC) saptanması

Uygulama süresi olarak 2 gün seçilmiştir. Uygulama sonrasında örneklemeler yapılmıştır. Kök örneklerinin yaş ağırlıkları belirlenmiş ve değer YA olarak kaydedilmiştir. Örneklemeler arasındaki değişim oranlarını belirleyebilmek için tekrarlı çalışılmış her bir gruptan 5 tekrar örnek kaydedilmiştir. Formülde kullanılmak üzere yaş ağırlıklarının yanı sıra turgorlu ağırlıkları da ölçülmüştür. Bu amaçla 50 ml deiyonize su içerisinde yaklaşık 20 dakika bekletilmiş ve ağırlıkları tartılarak değer TA olarak kaydedilmiştir. Bu tartım sonrasında örnekler 70°C etüvde 3 gün süresince tutulmuş ve tartılmıştır. Değer KA olarak kaydedilmiştir. Smart ve Bingham (1974) kısmi su içeriği (RWC) hesaplamasında aşağıda da gösterilen formülü kullanmıştır ve birimini de % olarak hesaplanmıştır.

$$RWC (\%) = [(YA - KA) / (TA - KA)] \times 100$$

3.4. Enzim ve İzozim aktivitelerinin saptanması için ekstraksiyon yapımı

Örnekleme sonrasında kökler tartılarak derin dondurucuda kısa süre bekletilmiş daha sonra antioksidan enzim/izozim aktivite tayin analizlerinde kullanılmıştır. Kök örneklerinde analiz yapabilmek için (0.5 gr) soğutulmuş havan içerisinde konulan kök örneklerinin üzerine 50 mM Na-fosfat tamponu (pH 7.8), 1 mM EDTA ve polivinylpolyprolidone (PVPP) içeren homojenizasyon tamponu eklenmiştir. Solüsyon içerisindeki kök örnekleri parça kalmayacak şekilde ezilmiştir. Soğutmalı santrifüj ile 30 dakika süresince 14000 g'de santrifüj edilmiştir. Ependorfun üst kısmında kalan süpernatant temiz bir ependorf içerisinde alınmış ve enzim analizlerinde kullanılmak üzere ayrılmıştır.

3.4.1. Süperoksit dismutaz (SOD) izozim/enzim aktivitesinin saptanması:

SOD izozim analizleri densiyometrik olarak yapılmış ve Laemmli (1970) tarafından verilen metotla tamamlanmıştır. SOD izozim tayininde kök örnekleri, 9 mM Tris HCl (pH 6.8) ve %13.6 gliserol ile homojenizasyon yapılmış ve 14.000 g'de 5 dakika

süresince santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatantların protein miktarı belirlenmiştir. Protein miktarının belirlenmesi, bovin serum albüminin standart olarak kullanılmasıyla Bradford (1976) tarafından verilen metot temel alınarak yapılmıştır. Protein miktarına bağlı olarak her bir gruptan eşit miktarda protein (30 µg) yüklemesi yapılarak SOD izozim tayini belirlenmiştir. İzozimlerin bant yoğunlukları Bio-1D yazılım programı kullanılarak densiyometrik olarak yapılmıştır. Ayrıca total SOD aktivite tayini, daha önce verilen ekstrakt üzerinden tamamlanmıştır. Bu tayin için Beauchamp ve Fridovich (1971) ile gösterilen yöntem izlenmiştir.

3.4.2. Katalaz (CAT) izozim/enzim aktivitesinin saptanması:

Woodbury ve ark. (1971) ile tanımlanan metota göre CAT izozimlerin analizleri yapılmıştır. Her bir gruptan 30 µg protein olacak şekilde yükleme yapılmıştır. Total CAT enzim aktivitesi için Bergmeyer (1970) tarafından tanımlanan yöntem kullanılmış ve 50 mM Na-fosfat tamponu (pH 7.0), %0.3 H₂O₂, EDTA ve enzim örneği kuvarz küvetlere eklenmiştir. Örneklerin aktivite analizleri, 240 nm dalga boyundaki H₂O₂'nin üç dakika süresince tüketilmesi temel alınarak tamamlanmıştır.

3.4.3. Peroksidaz (POX) izozim/enzim aktivitesinin belirlenmesi:

Peroksidaz (POX) izozim bant yoğunlarının belirlenmesi amacıyla elektroforetik olarak Seevers ve ark. (1971) tarafından verilen metot kullanılmıştır. Total POX aktivitesinde Herzog ve Fahimi (1973) tarafından tanımlanan metottan yararlanılmıştır. 3'-3'-diaminobenzidin tetrahidroklorit (DAB), H₂O₂ varlığında okside olmaktadır ve bunun 465 nm'de absorbans artışı temel alınarak total POX aktivite hesaplanmıştır.

3.5. Reaktif oksijen türlerinin (ROS) miktarının saptanması

3.5.1. Hidrojen peroksit (H₂O₂) miktarının saptanması

Hidrojen peroksit (H₂O₂) miktarının belirlenmesi amacıyla Liu ve ark. (2010) tarafından verilen yöntem kullanılmıştır. Bu yöntem 0.5 gr kök örnekleri sıvı azotta

parçalanmış ve aseton ile homojenize edilmiştir. Süzüntü, 3.000 g'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant ayrılmış ve titantum tetraklorid içeren solüsyon ilave edilmiştir. Amonyum hidroksit eklenerek 16.000 g'de santrifüj edilmiştir. Pellet kısmı aseton ile yıkanarak elde edilen pellet H_2SO_4 solüsyonuyla çözülmüştür. Oluşan solüsyonun 410 nm'de absorbansı izlenmiştir. Bilinen H_2O_2 miktarına bağlı standart eğri temel alınarak H_2O_2 miktarı hesaplanmıştır.

3.6. Lipit peroksidasyonun saptanması

Malondialdehit (TBARS miktarı) birikimi lipid peroksidasyonun bir göstergesidir. Stres koşulunda köklerin hasar düzeyini veya fosfit uygulamalarının bu hasar üzerine olumlu rollerini belirleyebilmek için TBARS miktarı tayin edilmiştir. Bu nedenle Rao ve Sresty (2000) tarafından gösterilen yöntemle göre 0.1 gr kök örnekleri tiokloroasetik asit (TCA) ile homojenize edilmiştir. Homojenizasyon sonrasında karışım 10.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında, süpernatant ayrılmış ve 2-Tiobarbitürük asit (TBA) ve trikloroasetik asit (TCA) karışımı eklenmiştir. Karışım tüplere alınmış ve sıcak su banyosunda yarım saat tutulmuştur. Miktar tayini için 532 nm ve 600 nm iki farklı aralıktaki absorbans değişimleri değerlendirilmiştir.

3.7. Prolin miktarının saptanması

Örnekleme yapılan köklerdeki prolin miktarının izlenmesi Bates ve ark. (1973) tarafından yöntem temel alınmıştır. Her bir gruptan 0.1 gr kök örnekleri alınmış ve sülfosalisilik asit eklenerek homojenize edilmiştir. Elde edilen karışım filtre kağıdından süzülüp asit ninhidrin ve glasiyal asetik asit eklenmiştir. Oluşan solüsyon sıcak su banyosunda bir saat bekletilmiş ve sonrasında buz banyosuna alınmıştır. Soğutmadan sonra karışıma toluen eklenmiş ve üst kısım alınarak 520 nm'de absorbansı kaydedilmiştir.

3.8. Total protein miktarının saptanması

Elektroforetik olarak yapılan izozim belirlenmesi ve enzim aktivitelerinin saptanması amacıyla protein miktarı izlenmiştir. Bu nedenle Bradford (1976) ile gösterilen protein tayin yöntemi kullanılmıştır. Bovin serum albumin (BSA) içeren ve

belirlenen miktar aralığında standartlara göre örneklerin protein miktarı hesaplanmıştır. Hazırlanan örnekler ve kör, spektrofotometrik olarak 595 nm’de absorbansı ölçülmüştür.

3.9. İstatistiksel Analizler

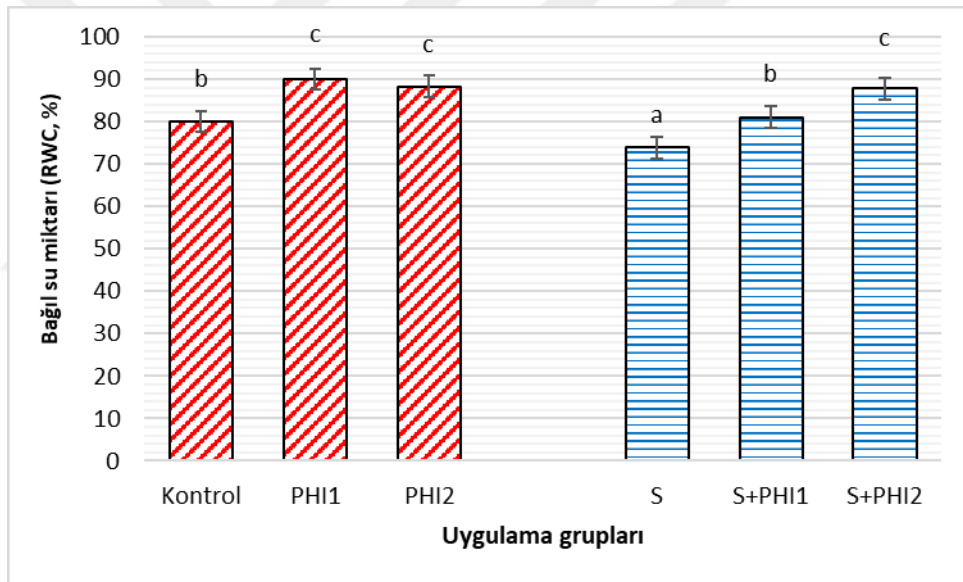
Fizyolojik ve biyokimyasal parametrelerdeki elde edilen verilen her bir gruptan beş tekrar yapılarak değerlendirilmiştir. Bulgular one-way ANOVA analiziyle (tek yönlü varyans analizi) yorumlanmıştır. Uygulama grupları arasındaki karşılaştırma TUKEY post-test (SPSS yazılımı, versiyon 28.0) ile yapıldı. Karşılaştırma sonunda değer $P < 0.05$ bulunuyorsa gruplar arasındaki değişimde istatistiksel olarak farklı olarak yorumu yapılmıştır. Çalışmamızdaki grafik olarak verilen tüm sonuçlarımızdaki hata çubukları standart hata temel alınarak yapılmıştır.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

Tez çalışmamızda bir biyoyararıcı türevi olan farklı miktarlarda uygulanan fosfitin tuz stresine maruz kalan mısır köklerindeki biyolojik süreçlere olan, olası koruma rolleri araştırılmaya çalışılmış ve bu amaçla bu olası koruma su içeriğinde, antioksidan savunma sisteminde ve lipid peroksidasyonu üzerinde oluşan değişimlerle gösterilmeye çalışılmıştır. Bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlar ve değerlendirmesi aşağıda verilmiştir.

4.1. Tuz stresine maruz kalan mısır köklerinde dışarıdan uygulanan fosfitin kısmi su içeriği üzerine etkisi

Tuz stresine maruz bırakılan mısır köklerinde farklı konsantrasyonlarda uygulanan fosfitin su ilişkileri üzerine etkisini belirleyebilmek için uygulama gruplarında kısmi su içeriği (RWC) (Şekil 4.1) analiz edilmiştir.



Şekil 4. 1. 100 mM NaCl toksisitesine maruz kalan mısır köklerinde dışarıdan fosfit uygulamalarının (1 ve 3 g L⁻¹) kısmi su içeriği (RWC) üzerine etkisi

Tuz stresi uygulaması beklendiği gibi mısır köklerinin su içeriğinde (RWC) azalmaya neden olmuştur. Diğer yandan kontrol koşulları altında uygulanan fosfitin RWC değerlerinde artışa neden olduğu grafikte görülmektedir. RWC’de gözlenen bu artış uygulanan tüm fosfit uygulamalarında izlenmiştir. Tuz stresinin oluşturduğu mısır köklerinin RWC’sindeki bu azalma dışarıdan uygulanan fosfit uygulaması ile

önlenmiştir. Yüksek fosfit uygulaması tuz stresine karşı köklerdeki su içeriğini korumada daha uygun olmuştur.

Tuzluluk stresi ekilebilir tarım arazilerinin büyük bir kısmı için olumsuz bir stres faktörüdür (Van Zelm ve ark., 2020). Bitki büyüme ortamlarına eklenen tuz konsantrasyonları bitkide iki önemli hasara neden olmaktadır. Bunlardan biri ozmotik stres diğeri ise iyon toksisitesidir (Sandhu ve ark., 2017). Mısır köklerinde tuz uygulamasına bağlı olarak Na ve Cl iyonlarının bitki için gerekli besleyici elementlerin alınmasıyla ilişkili taşıyıcıların ve su kanallarının yapısını bozduğu bildirilmiştir. Bu durumda da tuz stresine maruz kalan bitkilerde su içeriğinde azalmalar saptanmıştır (El Moukhtari vd., 2021). RWC değerlerinde stres altında gözlediğimiz azalmalar, mısır köklerinde absorplanan su miktarı ile transpirasyon sonucu kaybedilen su miktarı arasındaki dengesizliği de göstermektedir.

Biyouyarıcılar tuz stresinin olumsuz etkilerini ortadan kaldırmak için kullanılabilir. Biyouyarıcının kaynağı, ürünler ve bunların bitki türleri üzerindeki etkileri arasında karşılaştırma yapmak için bize daha fazla araç sağlayabilir. Biyouyarıcı uygulamalarından elde edilen sonuçlar, kullanılan doz, uygulama modu, uygulama zamanlaması ve bunların bir ila birkaç biyomolekül ve/veya mikroorganizma bileşimi gibi bir dizi faktöre bağlı olarak değişir. Biyouyarıcıların kuraklık toleransını ve su kullanım etkinliğin artırma durumu, bahçe bitkileri ve meyve ağaçlarının tarımsal açıdan önemli olduğu ancak su mevcudiyetinin kentleşme ve iklim değişikliği nedeniyle daha az güvenilir hale geldiği kuraklığa eğilimli bölgeler için büyük bir potansiyele sahiptir. Bitki biyouyarıcılarının çoğu, besin maddelerinin alımını kolaylaştırmak için rizosfere eklenebilir ve bunların birçoğunun su eksikliği, toprak tuzlanması ve optimal olmayan büyüme sıcaklıklarına maruz kalma gibi çevresel strese karşı da koruyucu etkileri vardır (du Jardin, 2015). Biyouyarıcılar kendi başlarına besin değildir; bunun yerine besinlerin alımını kolaylaştırırlar veya büyümenin desteklenmesine veya stres direncine faydalı bir şekilde katkıda bulunurlar. Deniz biyoaktif maddelerinin (mikroalglerden izopropanol özleri, bir çeşit biyouyarıcı) üzüm bitkilerine (*Vitis vinifera* L.) yapraktan uygulanması, kuraklık stresi altında yaprak su potansiyelini ve stoma iletkenliğini arttırdı (Mancuso ve ark., 2006). Son araştırmalar, organik ve biyo-gübre olarak uygulanan biyouyarıcının, kimyasal gübre uygulamasına kıyasla kuraklık stresine maruz kalan bitkilerde besin kullanım etkinliğini artırabileceğini göstermiştir (El Moukhtari ve ark., 2021). Benzer şekilde çalışmamızda fosfit uygulaması tuz stresi altında mısır köklerinin su miktarında artışlar sağlamıştır. Bu olumlu etkinin nedeni olarak hem su alımının stres altında

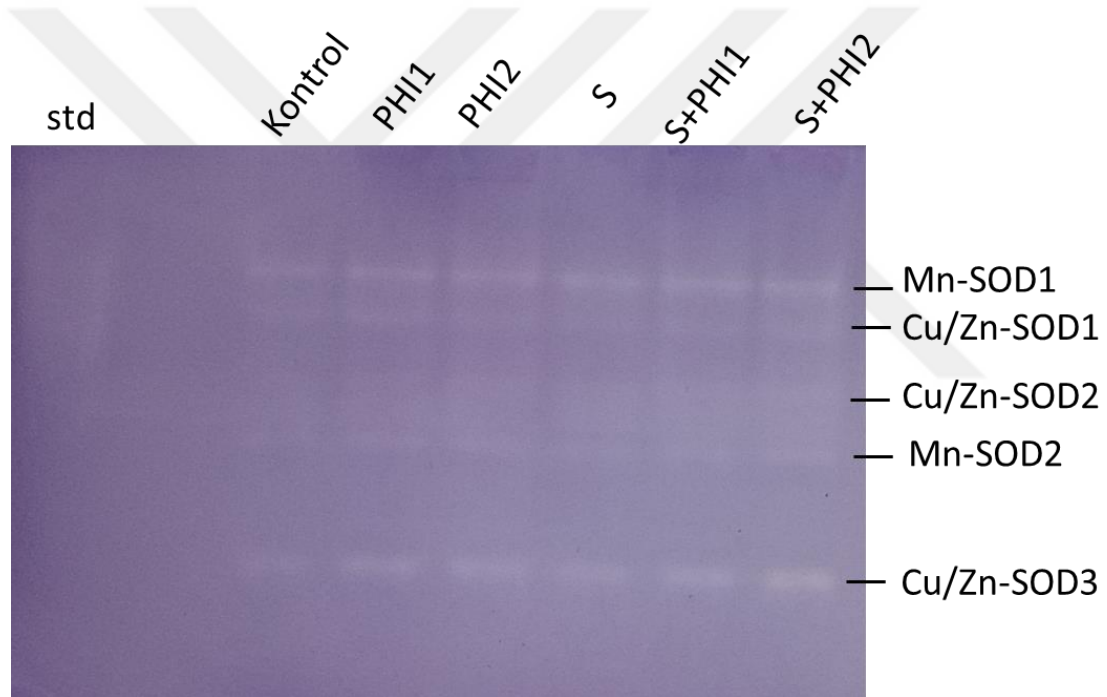
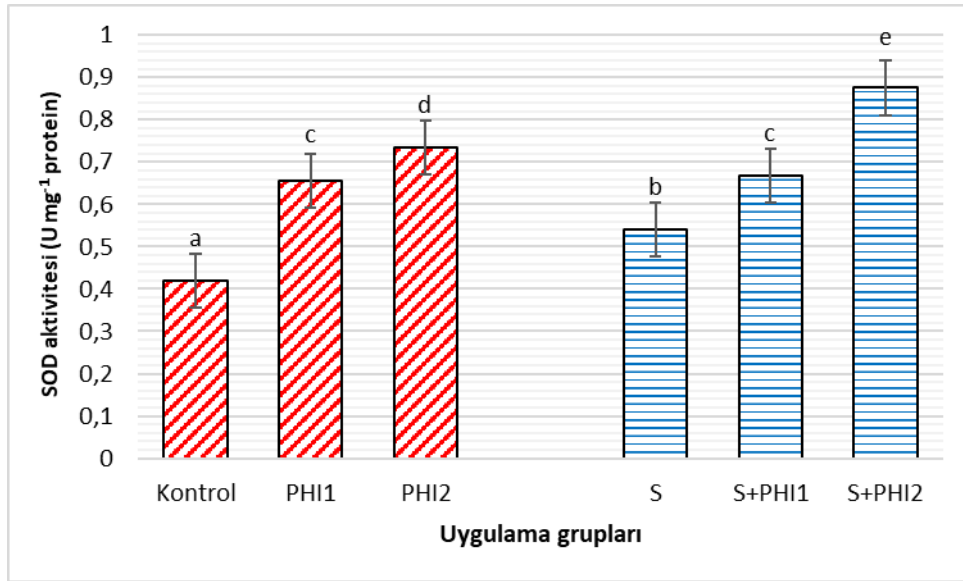
yeniden düzenlenmesi hem de transpirasyonun kontrolü ve stoma hareketlerinin dengelenmesi sonucunda su içeriğindeki artışlar olarak söylenebilir. K^+ ozmoregülasyonda rol alan bir element olup, tezimizde tuz stresi altındaki mısır bitkilerine uygulanan fosfit içsel K oranını da artırarak RWC değerlerinin artışı sağlanmış olabilir.

4.2. Tuz stresine maruz kalan mısır köklerinde dışarıdan uygulanan fosfitin antioksidan enzim aktivitesi üzerine etkisi

4.2.1. Tuz stresine maruz kalan mısır köklerinde dışarıdan uygulanan fosfitin total SOD enzim/izozim aktivitesi üzerine etkisi

Tuz stresine maruz bırakılan mısır köklerinde farklı konsantrasyonlarda uygulanan fosfitin total antioksidan enzim sistemi üzerine etkisini araştırmak için uygulama gruplarında total süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi analiz edilmiştir (Şekil 4.2) .

Uygulama gruplarında yapılan densiyometrik analizlere göre SOD enzimine ait total enzim aktivitesi ve izozim profillemesi şekil 4.2’de verilmiştir. Buna göre, deneme süresince SOD izoziminin 5 bandı izlenmiştir. Bunlardan iki tanesi Mn-SOD, üç tanesi de Cu/Zn-SOD izozimlerine aittir. Çalışmamızda uygulamalara bağlı olarak Fe-SOD izozimi gözlenmemiştir. Mısır köklerine dışarıdan uygulanan tuz stresi total SOD aktivitesini artırmıştır. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında total aktiviteye paralel olarak Mn-SOD1-2 ve Cu/Zn-SOD1-2-3 izozimlerin yoğunluğunda artışlar izlenmiştir. Dışarıdan uygulanan fosfit, kontrol koşulları altında total SOD aktivitesini artırmıştır. Aynı zamanda stresin SOD aktivitesi üzerinde oluşturduğu artışların üzerinde, sadece stres grubuna göre fosfit uygulamalarıyla SOD aktivitesi daha da artmıştır. Bu artışların en yüksek düzeyi S+PHI2 grubunda izlenmiştir. Bu gruptaki (S+PHI2) SOD artışları başlıca Mn-SOD2 ve Cu/ZnSOD3 izozimlerinin bant yoğunluklarına bağlıdır.



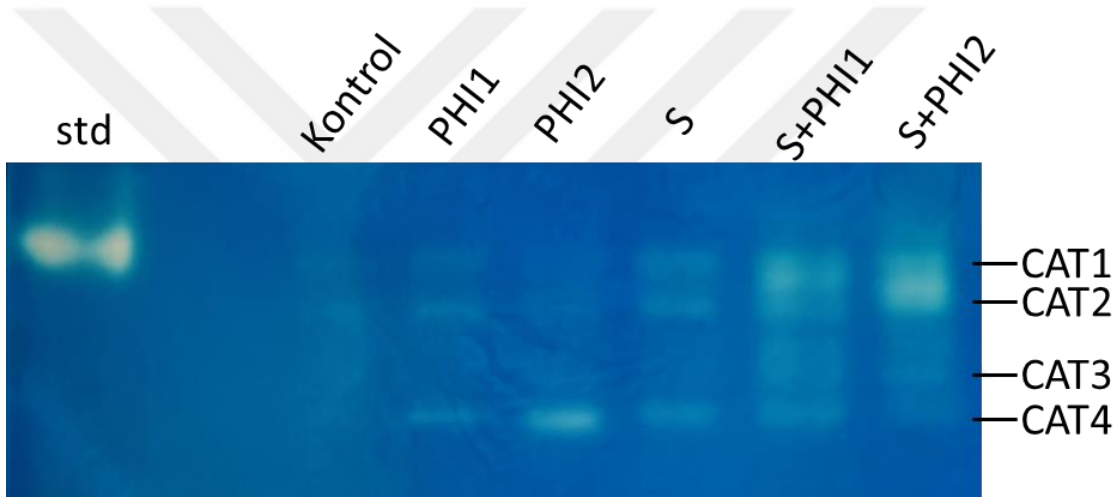
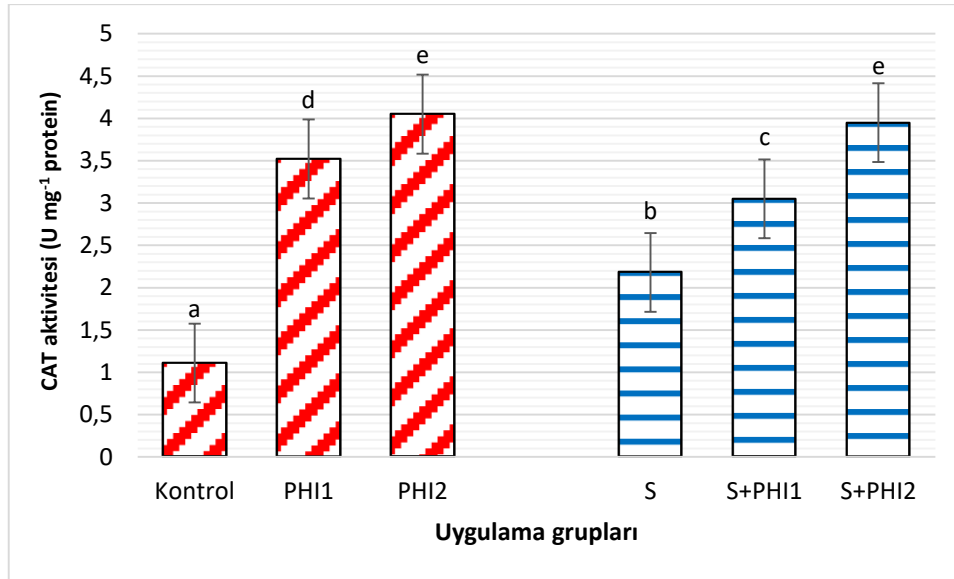
Şekil 4. 2. 100 mM NaCl toksisitesine maruz kalan mısır köklerinde dışarıdan fosfit uygulamalarının (1 ve 3 g L⁻¹) total SOD aktivitesi ve SOD izozimlerinin band yoğunluğu üzerine etkisi

Bitkilerde tuz stresi neden olduğu iyonik strese bağlı olarak enzim aktivitesinde bozulmalara neden olmaktadır. Na⁺ iyonları, enzim aktivitesi için gerekli olan bazı elementlerin yerine geçerek enzim aktivitesini azaltabilmektedir (Roychoudhury ve ark., 2011). Tuz stresi fotosentez ve solunum gibi temel biyolojik süreçleri elimine ettiği için radikal birikimine ya da reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumuna neden olmaktadır.

Radikal birikiminin temel nedenleri arasında oksijenin yüksek enerjili elektronlar tarafından indirgenmesi ya da membranda ya da sitoplazmada lokalize olan NADPH oksidaz gibi bazı enzim aktiviteleri sayılabilmektedir (Gill ve Tuteja, 2010). ROS'un hücreler ya da yaşamsal moleküller üzerindeki yıkıcı etkilerini ortadan kaldırabilmek için enzimatik ya da enzimatik olmayan bileşenler kullanılır. SOD enzim bu adımdaki ilk enzimdir. SOD enzimi süperoksit anyon radikalini, H_2O_2 'ye dönüştürerek toksisitesini azaltmaktadır (Sarafraz-Ardakani ve ark., 2014). Çalışmamızda tuz stresi altında mısır köklerindeki SOD aktivitesi artmış ve süperoksit anyon radikalini katalizlenmesi sağlanmıştır. Daha önce ElSayed ve ark., (2021) tarafından yapılan bir çalışmada *Phaseolus vulgaris* bitkilerine uygulanan tuz (NaCl) stresine bağlı olarak SOD izozimlerinin (Cu/Zn-SOD) ekspresyonlarında artışlar izlenmiştir. Stres ile gözlenen SOD aktivitesindeki artış, dışarıdan uygulanan fosfit uygulamasıyla da sürdürülmüştür. Bazen tarımsal biyoyarıcılar olarak adlandırılan bitki biyoyarıcıları, bir bitkinin etrafındaki çevreye eklenebilen ve bitki büyümesi ve beslenmesi üzerinde, ayrıca abiyotik ve biyotik stres toleransı üzerinde olumlu etkileri olan maddelerin çeşitli bir sınıflandırmasıdır (Feldman ve ark., 2020). Bir biyoyarıcı olan silimarinin tuz stresine karşı dışarıdan uygulamalarında SOD aktivitesini uyararak tolerans sağladığı gösterilmiştir (Alharby ve ark., 2021). Bu durumda çalışmamıza paralel olarak bulunan bu sonuç, biyoyarıcıların radikallerin süpürülmesinde etkili olabileceğini göstermektedir. Çalışmamızda artan SOD aktivitesiyle fosfit uygulaması stres ile oluşan süperoksit anyon radikalini ortadan kaldırarak onun H_2O_2 'e dönüşmesini katalize etmiş olabilir. Süperoksit anyon radikalini özellikle membranlar üzerine olumsuz etkileri düşünüldüğünde fosfit uygulamasının zar bütünlüğünün de korunmasında etkili olabileceği sonucuna ulaşabiliriz.

4.2.2. Tuz stresine maruz kalan mısır köklerinde dışarıdan uygulanan fosfitin total CAT enzim/izozim aktivitesi üzerine etkisi

Tuz stresine maruz bırakılan mısır köklerinde farklı konsantrasyonlarda uygulanan fosfitin total antioksidan enzim sistemi üzerine etkisini araştırmak için uygulama gruplarında total katalaz (CAT) aktivitesi analiz edilmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4. 3 . 100 mM NaCl toksisitesine maruz kalan mısır köklerinde dışarıdan fosfit uygulamalarının (1 ve 3 g L⁻¹) total CAT aktivitesi ve CAT izozimlerinin band yoğunluğu üzerine etkisi

Deneme süresince mısır köklerinde uygulama gruplarında 4 tane CAT bandı (CAT1-4) izlenmiştir. Native-page analizlerinde CAT izoformları bakımından elde edilen değişimler total CAT aktivitesiyle benzerlik göstermektedir. Spektrofotometre analizlerinde total CAT aktivitesinde tuz stresine bağlı olarak bir artış gözlenmiştir. Bu değişim ayrıca stres altında mısır köklerindeki CAT1-2-4 izozim bantlarının artan yoğunluklarıyla da ilişkilidir. Diğer yandan, tuz stresine maruz kalan mısır bitkilerine fosfit eklenmesi, köklerdeki CAT aktivitesini artırmıştır. Bu artış oranı, S+PHI2 uygulama grubunda en yüksek düzeyde olup özellikle CAT1-2 izozim densiteleri ile uyumluluk göstermektedir. Fosfit hem kontrol hem stres koşulları altında total CAT

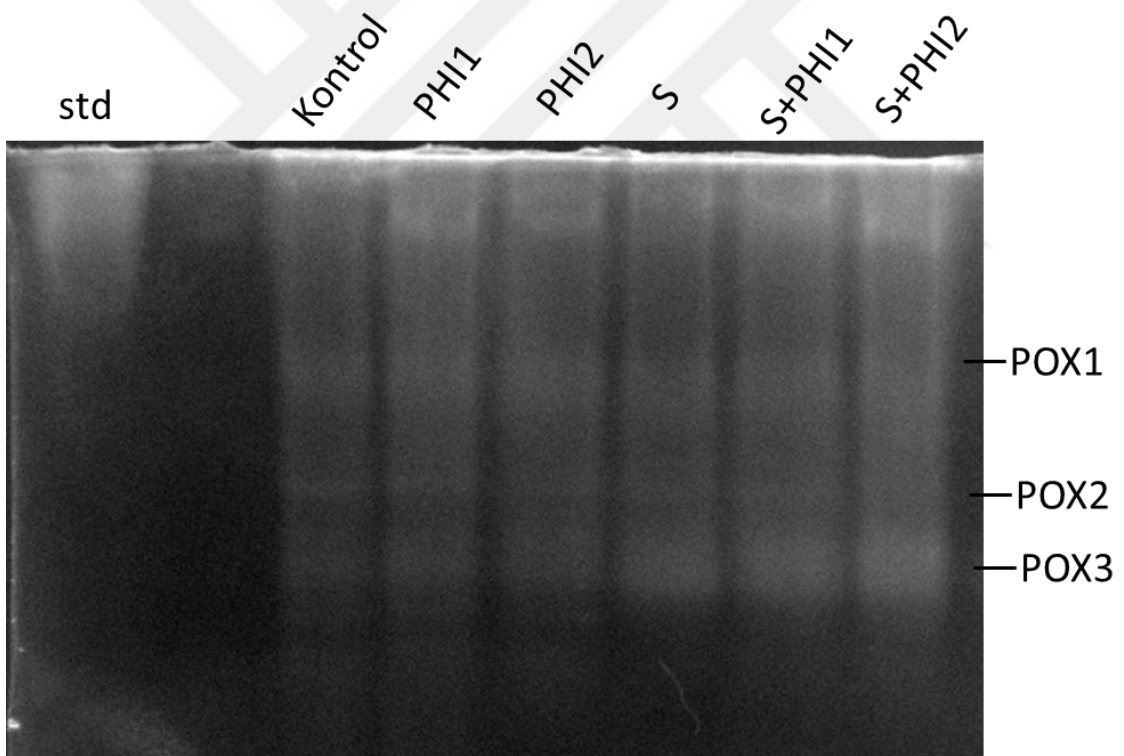
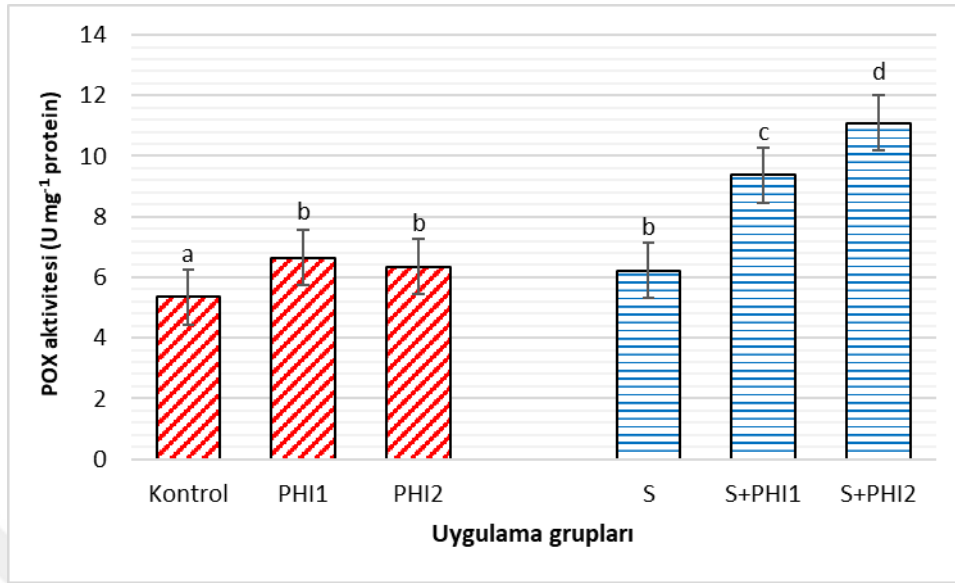
aktivitesini uyarmaktadır. Total CAT aktivitesindeki artışın oranı, en yüksek fosfit miktar uygulamasında maksimum (1.4 kat artışla) düzeydedir.

SOD enzim aktivitesiyle birlikte oluşan H_2O_2 'nin toksik düzeyleri, CAT enzim aktivitesiyle suya dönüştürülerek ortadan kaldırılmaya çalışılmaktadır. Tez çalışmamızda tuz stresi uygulamalarıyla oluşan H_2O_2 birikimleri CAT aktivitesi ile süpürülmeye çalışılmıştır. Daha önce yapılan çalışmalarda stres altındaki pirinç bitkilerindeki CAT artışlarının tuz stresine toleransta bir belirteç olduğu rapor edilmiştir (Mishra ve ark., 2013). Sonuçlarımıza benzer olarak, kuraklık ve tuzluluk stresleri altında bitkilerde CAT genlerinin ekspresyon seviyeleri artmıştır (Puyang ve ark., 2015). SOD aktivitesinde olduğu gibi dışarıdan uygulanan fosfitin hem stres hem de kontrol koşulları altında antioksidan enzim aktivitesini (CAT) olumlu yönde düzenlemiştir. Banakar ve ark. (2022), tarafından biyoyarıcı olarak kırmızı yosun ekstraktlarının çeltik bitkilerine uygulanmasıyla birlikte mantar stresine karşı CAT aktivitesinin arttığı rapor edilmiştir. SOD aktivitesinin oluşturduğu H_2O_2 miktarının CAT aktivitesinin artışıyla birlikte ortadan kaldırıldığını söyleyebiliriz. Dışarıdan uygulanan fosfit ile H_2O_2 miktarının azaltılmasında, artan CAT enzim aktivitesinin katkı sunduğu düşünülebilir.

4.2.3. Tuz stresine maruz kalan mısır köklerinde dışarıdan uygulanan fosfitin total POX enzim/izozim aktivitesi üzerine etkisi

Tuz stresine maruz bırakılan mısır köklerinde farklı konsantrasyonlarda uygulanan fosfitin total antioksidan enzim sistemi üzerine etkisini araştırmak için uygulama gruplarında total peroksidaz (POX) aktivitesi analiz edilmiştir (Şekil 4.4).

Deneme süresince uygulanan gruplarda 3 POX izoformu izlenmiştir. Tuz stresine maruz kalan mısır köklerinde total POX aktivitesi artmıştır. Bu POX artışından özellikle POX izoformunun yoğunluğu sorumludur. Bununla birlikte sadece stres grubuyla karşılaştırıldığında, fosfit uygulaması stres uygulanan mısır köklerinde POX aktivitesini uyarmıştır. En yüksek POX aktivitesi S+PHI2 grubunda %78 oranında artışla izlenmiştir. Bu grupta (S+PHI2), POX1 ve POX3 izozimlerinin bant yoğunlukları bu artışa paralellik göstermektedir. Benzer olarak stresin uygulanmadığı koşullarda mısır köklerine dışarıdan eklenen fosfit artan POX aktivitesine neden olmuştur. Bu değişimde tüm POX izozimlerinin etkisi bulunmaktadır.



Şekil 4. 4. 100 mM NaCl toksisitesine maruz kalan mısır köklerinde dışarıdan fosfit uygulamalarının (1 ve 3 g L⁻¹) total POX aktivitesi ve POX izozimlerinin band yoğunluğu üzerine etkisi

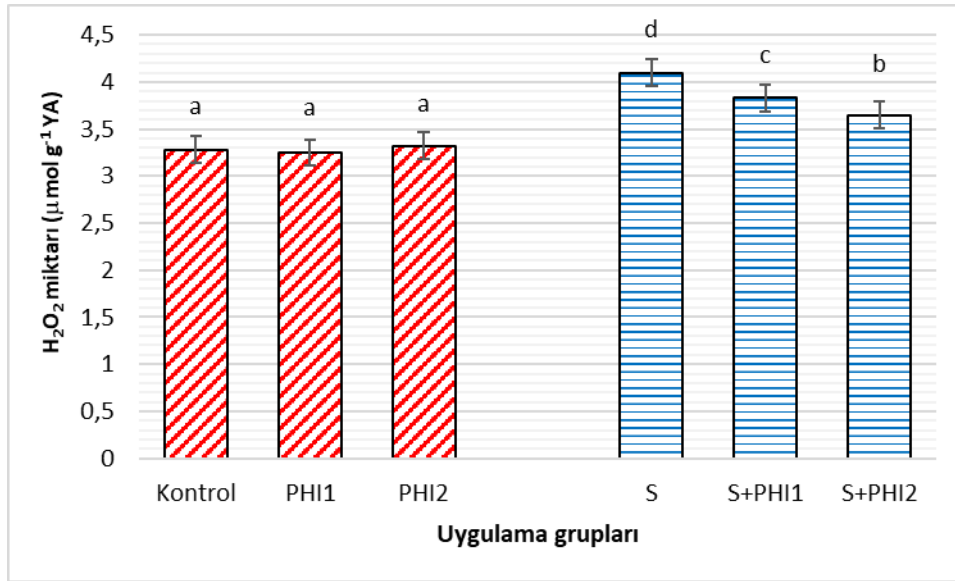
Katalaz gibi POX enzim aktivitesiyle birlikte H_2O_2 'nin toksik etkileri ortadan kaldırılabılır (Ahammed ve ark., 2013). Daha önce yapılan bir çalışmada *Cicer arietinum* bitkisine uygulanan tuz uygulaması POX aktivitesini artırmıştır. Diğer yandan daha önce de belirttiğimiz gibi poliamin uygulaması stres altındaki bitkilerde antioksidan sistemi uyarıcı yönde etki etmektedir. Tuz stresi altında yetiştirilen *Cucumis sativus* bitkilerine uygulanan spermin eklenmesi, kloroplastlarda POX aktivitesini artırmıştır (Shu ve ark., 2013). Bu çalışmada, strese bağlı olarak oluşan ROS türlerinin toksik etkilerini nötralize etmek için antioksidan metabolitlerinin ekspresyon düzeyinde sentezinin biyoyarıcı maddeler tarafından uyarılması rapor edilmiştir. Stres altındaki bitkilere dışarıdan fosfit uygulamasının, artan POX ve diğer antioksidan enzim aktivitesine bağlı olarak süperoksit anyon radikalının azalmasında ve membranlardaki peroksidasyon durumlarının indirgenmesinde etkili olduğunu düşünebiliriz. Daha sonra da ifade edeceğimiz gibi bu sonuçlar azalan TBARS miktarı (lipid peroksidasyon düzeyini gösteren analiz) ile uyumludur.

4.3. Reaktif oksijen türlerinin (ROS) miktarının belirlenmesi

4.3.1. Tuz stresine maruz kalan mısır köklerinde dışarıdan uygulanan fosfitin hidrojen peroksit (H_2O_2) miktarı üzerine etkisi

Tuz stresine maruz bırakılan mısır köklerinde farklı konsantrasyonlarda uygulanan fosfitin ROS birikimi üzerine etkisini araştırmak için uygulama gruplarında hidrojen peroksit (H_2O_2) miktarı analiz edilmiştir (Şekil 4.5).

Beklendiği üzere tuz stresi mısır köklerinde ROS birikimini tetikleyerek H_2O_2 miktarı %25 oranında artırmıştır. Sadece stres grubuyla kıyaslandığında, dışarıdan fosfit uygulaması, stresin uyardığı yüksek H_2O_2 düzeylerini azalmıştır. H_2O_2 düzeylerindeki azalmanın oranı S+PHI2 grubunda daha belirgindir. Ayrıca stres uygulamadan kontrol koşullarında dışarıdan uygulanan fosfit H_2O_2 miktarında herhangi bir değişime neden olmamıştır.



Şekil 4. 5. 100 mM NaCl toksisitesine maruz kalan mısır köklerinde dışarıdan fosfit uygulamalarının (1 ve 3 g L⁻¹) hidrojen peroksit (H₂O₂) miktarı üzerine etkisi

Normal koşullar altında belli miktarda ROS birikimi saptanmıştır. Tuz stresi ise bitkilerde enzimatik ya da enzimatik olmayan yolla yüksek düzeylerde ROS birikimine neden olmaktadır. Stresle birlikte solunum ya da fotosentez süreçlerinin zara bağlı reaksiyonlarında bozulmalar görülebilmektedir. Enerji düzeyleri yüksek kalan elektronların oksijeni indirgemesi sonucunda ROS oluşabilmektedir. Ayrıca peroksizomlarda gerçekleşen reaksiyonlar esnasında ya da NADPH oksidaz ve amin oksidaz gibi bazı enzimatik reaksiyonlarda ROS oluşumu rapor edilmiştir. ROS türlerinden olan H₂O₂ tam olarak bir radikal yapısında değerlendirilmemektedir. H₂O₂'nin miktarı açısından iki yönlü rolü bulunmaktadır. Düşük dozlarında sinyalleme rolü bulunmakta ve strese cevap mekanizmalarının aktive edilmesinde diğer sinyalleme molekülleri ile etkileşime geçebilmektedir. Ancak yüksek H₂O₂ dozlarında ise hücrel moleküllerin yapı ve fonksiyonunda hasar oluşmaktadır. Çalışmamızda tuz stresi altında mısır köklerinde artan SOD aktivitesine bağlı olarak H₂O₂ düzeyleri artmıştır. Buna karşılık H₂O₂'yi süpüren enzimler CAT ve POX aktivitesi artmış ancak enzim aktiviteleri H₂O₂'yi ortadan kaldırılmasında etkin olamamıştır. Bu durumda mısır köklerinde yüksek H₂O₂ düzeyleri izlenmiştir. Tuz stresiyle eş zamanlı olarak dışarıdan eklenen fosfit, her iki konsantrasyonda da CAT ve POX aktivitelerindeki ciddi artışlarla H₂O₂ miktarını azaltmıştır. Biyoyarıcıların serbest radikalleri temizlemek için antioksidan enzim moleküllerine bağlanarak, stres kaynaklı NADPH oksidazların ve NADPH'ye bağlı süperoksit anyon radikali oluşumunun aktivasyonuna karşı koyabilir (Patel ve ark., 2018).

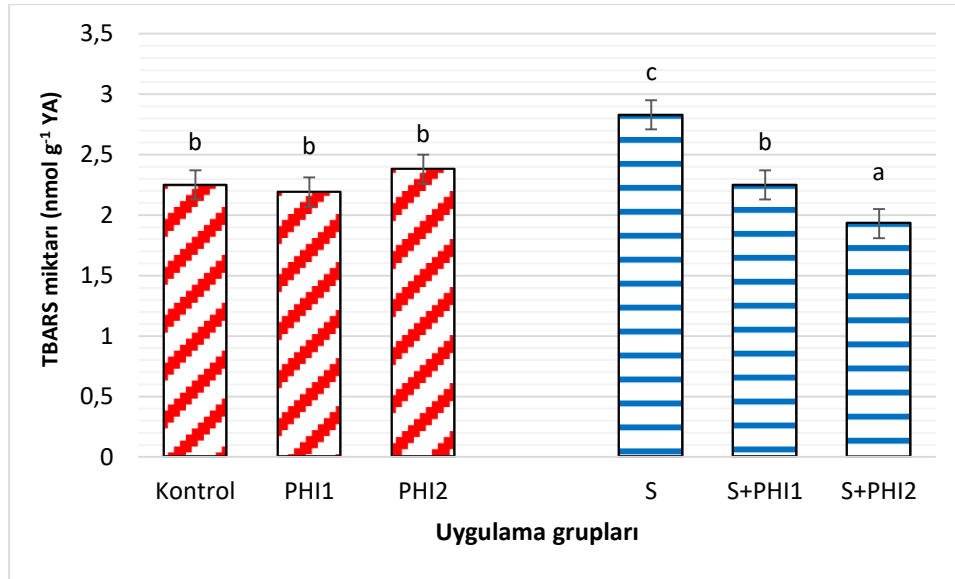
Daha önce yapılan çalışmalarda dışarıdan uygulanan deniz yosunu ekstraktlarının (biouyarıcı olarak) kuraklık stresi altında yetişen fasulye bitkilerin fotosentetik parametrelerinde ve prolin miktarında iyileşmeler sağladığı gösterilmiştir (Carvalho ve ark., 2018). Biouyarıcıların (melatonin gibi) klorofil yapısındaki ve fotosentetik aygıtlardaki bozulmaları ortadan kaldırarak strese karşı hasarı korumada rol oynadığı ifade edilmiştir (Arnao ve Hernández-Ruiz, 2020). Tezimizde tuz stresine karşı fotosentetik aparatlardaki dışarıdan fosfit uygulamasına bağlı iyileşme ve gelişmeler azalan ROS oluşumuna neden olmuş olabilir.

4.4. Lipit Peroksidasyonun Belirlenmesi

4.4.1. Tuz stresine maruz kalan mısır köklerinde dışarıdan uygulanan fosfitin TBARS (Tiobarbitürik asit reaktif maddeleri) miktarı üzerine etkisi

Tuz stresine maruz bırakılan mısır köklerinde farklı konsantrasyonlarda uygulanan fosfitin lipid peroksidasyonu üzerine etkisini araştırmak için uygulama gruplarında TBARS miktarı analiz edilmiştir (Şekil 4.6).

Tuz stresi altında yetiştirilen mısır köklerinde lipid peroksidasyon düzeyini gösteren TBARS analizleri incelendiğinde, TBARS miktarında stres altında 1.3 katlık bir artışın olduğu saptanmıştır. H_2O_2 miktarındaki değişime benzer olarak, stresin uyardığı TBARS miktarındaki artış, dışarıdan fosfit uygulaması ile önlenmiştir. TBARS'daki en düşük seviyeleri sadece stres grubuyla karşılaştırıldığında stres ile birlikte uygulanan en yüksek konsantrasyonda fosfit grubunda (S+PHI2) %32 oranında azalmayla gözlenmiştir. Kontrol koşulları altında uygulanan fosfit, TBARS miktarı üzerine herhangi bir etki oluşturmamıştır.



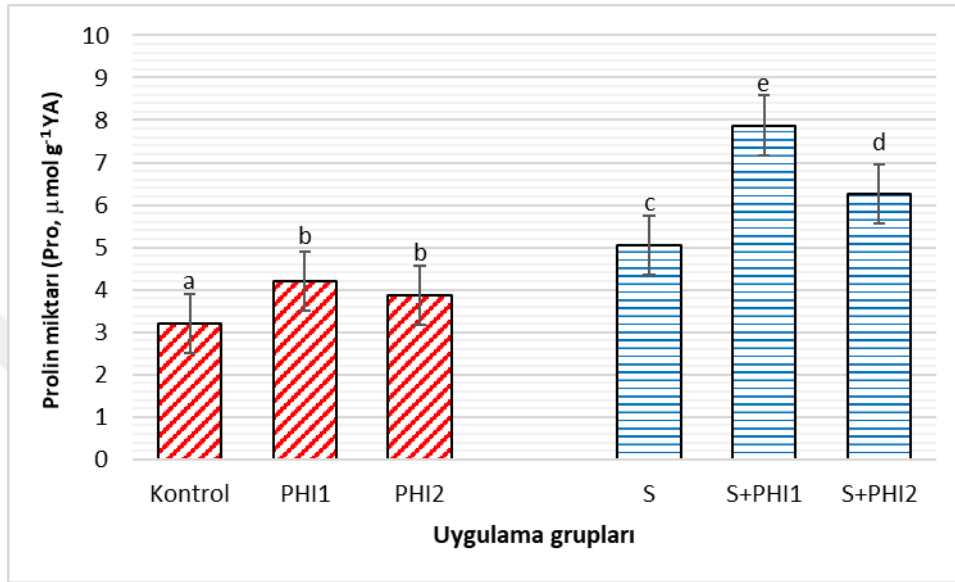
Şekil 4. 6. 100 mM NaCl toksisitesine maruz kalan mısır köklerinde dışarıdan fosfit uygulamalarının (1 ve 3 g L⁻¹) TBARS miktarı üzerine etkisi

Tuz stresi membranlarda lipid peroksidasyonuna neden olmakta ve hücre membranının bütünlüğünü bozmaktadır (Che-Othman ve ark., 2017). Bu durum sadece hücre zarlarında değil aynı zamanda kloroplast, mitokondri ve ER gibi organel zarlarında da görülmektedir. Bu sonuç, mısır köklerindeki TBARS düzeylerindeki artışla uyumludur. Ancak fosfit uygulaması stresin oluşturduğu bu hasarları ortadan kaldırmıştır ve membranlardaki iyon sızıntısını ve malondialdehit birikimini azaltmıştır. Fernandes (2021) tarafından su eksikliği altında fasulye fidelerine uygulanan biouyarıcıların zar bütünlüğünü ve peroksidasyon durumlarını kontrol ederek besleyicilerin iyileştirilmesinde etkili olduğu bildirilmiştir. Çalışmamızda, fosfit ve tuz stresinin eş zamanlı olarak uygulandığı mısır köklerindeki TBARS düzeylerindeki azalma, fosfit aracılı antioksidan sisteminin uyarılmasıyla ve ROS'ların etkin olarak ortadan kaldırılmasıyla ilişkili olabilir.

4.5. Tuz stresine maruz kalan mısır köklerinde dışarıdan uygulanan fosfitin prolin miktarı üzerine etkisi

Tuz stresine maruz bırakılan mısır köklerinde farklı konsantrasyonlarda uygulanan fosfitin osmoregülasyon üzerine etkisini araştırmak için uygulama gruplarında prolin miktarı analiz edilmiştir (Şekil 4.7).

Tuz stresi mısır köklerinin prolin miktarını artırmıştır. Strese bağlı olarak oluşan prolin miktarındaki bu değişim stresle birlikte fosfit uygulamasıyla da sürdürülmüştür. Tuz stresine maruz kalan mısır köklerine uygulanan düşük konsantrasyondaki fosfit (3 g L^{-1}) en yüksek prolin miktarının oluşmasına (1.6 kat artışla) neden olmuştur. Aynı şekilde kontrol koşulları altında uygulanan fosfit konsantrasyonları prolin miktarını artırmıştır.



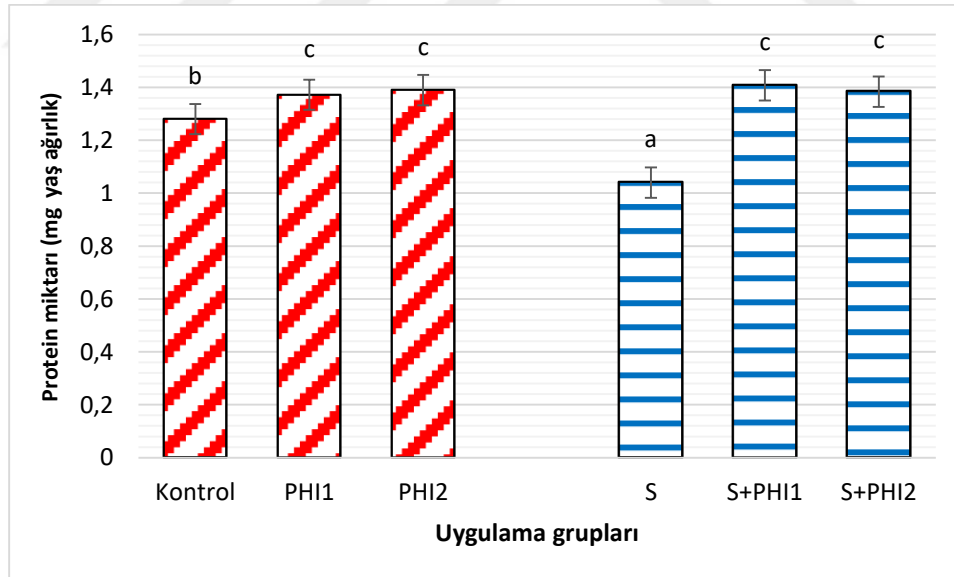
Şekil 4. 7. 100 mM NaCl toksisitesine maruz kalan mısır köklerinde dışarıdan fosfit uygulamalarının (1 ve 3 g L^{-1}) prolin miktarı üzerine etkisi

Bitki hücrelerinde prolinin yüksek birikimleri hücresel dengenin, su alınımının, ozmotik düzenlemenin ve redoks durumunun korunmasında ve oksidatif hasarın ortadan kaldırılmasında etkilidir (Ghosh ve ark., 2022). Stres altındaki bitkilerde sentezlenen prolin ile hücre turgor durumu korunarak stres altında bitkilerin büyüme ve gelişmelerinin devamlılığı sağlanmaya çalışılmaktadır. Prolinin stres altındaki çoklu rolleri içinde moleküler şaperon olarak protein bütünlüğünün ve enzimlerin aktivitesinin korunmasında sayılmaktadır (Lugan ve ark., 2010). Prolinin bu koruma fonksiyonunu yaparken fitohormonlar, kalsiyum ve mitojenle aktive edilmiş protein kinazlar gibi farklı stres sinyalleme bileşenleriyle de etkileşim göstermektedir (Feng ve ark., 2016). Prolin miktarındaki artış, strese karşı tolerans olarak ifade edilmekte ve çalışmamızda da bu durum tuz stresine maruz kalan köklerde izlenmiştir. Prolin miktarında gözlediğimiz artışlarla mısır bitkilerinde su içeriğinde (RWC) artışlar sağlanmaya çalışılmış ancak stresin şiddetinden dolayı bu tam olarak başarılamamıştır. Biyoyararıcıların içsel poliamin

miktarını düzenleyerek osmoregülasyonda rol aldığı ve prolin miktarını da bu yolla artırdığı saptanmıştır (Simon-Sarkadi ve ark., 2006). Çalışmamızda da izlenen sonuçlara paralel olarak, tuz stresi altında yetişen buğday fidelerine organik biyoyarıcıların uygulaması prolin miktarını artırmıştır (Rady ve ark., 2018). Bu çalışmada dışarıdan uygulanan *Moringa oleifera* ekstraktlarının yüksek RWC içeriğinin korunmasında osmoregülasyondan sorumlu içsel prolin miktarının artışının da etkili olduğundan bahsedilmiştir. Tezimizde elde ettiğimiz S+PHI grubundaki prolin artışları, TBARS miktarındaki azalmalarla da bağlantılı olabilir, çünkü prolinin bir membran koruyucu rolü de bulunmaktadır.

4.6. Tuz stresine maruz kalan mısır köklerinde dışarıdan uygulanan fosfitin protein miktarı üzerine etkisi

Tuz stresine maruz bırakılan mısır köklerinde farklı konsantrasyonlarda uygulanan fosfitin protein miktarı üzerine etkisi incelenmiş ve deneme sonucunda elde edilen veriler Şekil 4.8’de verilmiştir.



Şekil 4. 8. 100 mM NaCl toksisitesine maruz kalan mısır köklerinde dışarıdan fosfit uygulamalarının (1 ve 3 g L⁻¹) protein miktarı üzerine etkisi

Beklentilerimize paralel olarak tuz stresi, mısır köklerinde protein miktarında azalmalara neden olmuştur. Tuz stresinin proteinler üzerine bu olumsuz etkisi dışarıdan fosfit uygulamasıyla ortadan kaldırılmış ve her iki fosfit konsantrasyonu da protein miktarında artış sağlamıştır. Stres uygulanmadığı kontrol koşullarında mısır köklerine eklenen fosfit uygulaması protein miktarında artışlara neden olmuştur.

Tuz stresi altındaki bitkilerde çözünebilir protein miktarının azaldığına dair raporlar daha önce yayınlanmıştır (Santos ve ark., 2001). Bu azalmanın nedeni olarak protein sentezi için gerekli olan potasyum alımının tuzluluk stresi altında bozulması yatmaktadır. Ayrıca protein sentezi üzerine Na ve Cl iyonlarının oluşturduğu olumsuz etki ve bu iyonların diğer yararlı ve kofaktör olarak görevli elementlerin yerini almasına bağlı olarak meydana gelen enzimatik reaksiyonlardaki bozulmalar da gösterilebilir. Ancak fosfit uygulandığı takdirde stresin protein miktarı üzerine bu olumsuz durum ortadan kaldırılmaktadır. Özellikle kontrol koşullarında ya da stresli koşullar altında fosfit uygulanan gruplardaki protein miktarındaki artışları poliaminlerin azot döngüsü üzerine olan etkilerine bağlayabiliriz. Ayrıca Rady ve ark. (2018) tarafından tuz stresi altında yetişen buğday bitkilerinde organik biyoyarıcılarının çözünebilir şeker ve protein üzerine pozitif etkilerini bildirilmiştir. Ottaino ve ark. (2021) stres altındaki marul fidelerinde dışarıdan uygulanan bitki temelli biyoyarıcının (triacontanol) azot metabolizmasında yer alan enzimlerin aktivitelerini düzenlediği gösterilmiştir. Baltazar ve ark. (2021) tarafından yayınlanan raporda biyoyarıcılarının protein sentez basamaklarında düzenleyici olarak rol aldığı ifade edilmiştir. Hem azot metabolizması hem de protein sentezindeki olumlu etkilerine bağlı olarak dışarıdan uyguladığımız fosfitin protein miktarını artırdığını söyleyebiliriz.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1 Sonuçlar

Tuzluluk stresi bitki büyümesini ve gelişimini etkileyen önemli bir çevresel strestir. Bitkiler yüksek tuzlu ortamlara uyum sağlamak için uygun mekanizmalar geliştirmek zorundadır. Tuz stresi, hücre içi ozmotik basıncı artırır ve sodyumun toksik seviyelere birikmesine neden olabilir. Bu nedenle, tuz stresi sinyallerine yanıt olarak bitkiler, iyon homeostazını düzenlemek, ozmotik stres yolunu aktive etmek, bitki hormonu sinyallemesine aracılık etmek ve hücre iskeleti dinamiklerini ve hücre çeperi kompozisyonunu düzenlemek dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalar yoluyla uyum sağlar. Bitkilerde tuz stresine bağlı olarak besin alımında azalma görülmekte ve bu durum azalan kök hidrolik iletkenliğine, kök uzunluğuna, kök yüzey alanına ve absisik asit kaynaklı stoma kapanmasına neden olmaktadır. Bu anlamda çalışmamızın sonuçları su ilişkileri anlamında değerlendirildiğinde, bu ifadeler tuz stresinin mısır köklerinde azalan RWC (su içeriği) değerleri ve kısmi büyüme oranı (raporlanmayan sonuçlarımız) ile desteklenmektedir. Strese bağlı büyümedeki azalmalar, düşük protein içeriğimizle de uyusmaktadır. İyon taşıyıcıların, proton pompalarının ve prolin, glisin betain vb. gibi ozmotik bileşenlerin aktif katılımıyla vakuole bölmelendirilmesi topraktaki fazla Na ve Cl'ye karşı tolerans mekanizmalarına katkıda bulunur. Prolin, tuzluluk dahil olmak üzere çeşitli abiyotik stresler altında biriken en yaygın endojen ozmolittir. Prolinin şiddetli stres altındaki fidelerde daha yüksek su içeriğini koruma yeteneği, hem doğrudan içsel prolin içeriğini artırarak ozmotik düzenlemeye katkısına bağlanabilir. Prolinin bu koruyuculuk rolü düşünüldüğünde, çalışmamızda, tuz stresi mısır köklerinin prolin miktarını artırmış ancak bu değişim stres grubunda RWC değerlerini indükleyebilmek için yeterli olmamıştır.

Moleküler oksijen, yüksek konsantrasyon da bitki hücrelerine zararlı olan reaktif oksijen türleri (ROS) üretmek için yüksek enerji seviyesinden elektronlar alır. Şiddetli stres koşulları altında, ROS üretim hızı, hücresel savunma sisteminin temizleme potansiyelini aşarak oksidatif strese neden olur. Oksidatif stres, hücresel bileşenlere zarar vererek işlev bozukluklarına ve nihayetinde hücre ölümüne neden olur. ROS, DNA dahil her hücresel makromolekül üzerinde bitki metabolizması için toksik olan hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit anyon radikali ve hidroksil radikali gibi bileşenleri içerir. Reaktif türlerin toksisitesini azaltmak için antioksidan sistem görev yapar. Bu savunma

mekanizmasında ilk adım süperoksit anyon radikalini katalize eden süperoksit dismutaz (SOD) enzimidir. Çalışmamızda tuz stresi altındaki mısır köklerinde artan SOD aktivitesiyle süperoksit anyon radikali ortadan kaldırılmış buna karşılık H_2O_2 düzeyleri artış göstermiştir. Total SOD enziminin densiyometrik analizi değerlendirildiğinde ise strese uyarılan Mn-SOD ve Cu/Zn-SOD isoformları tuz stresinin mısır köklerinin özellikle mitokondrilerinde hasar oluşturduğu söylenebilir. Stres ile oluşan H_2O_2 'nin yüksek düzeyleri antioksidan sistem içinde yer alan CAT, POX ve AsA-GSH döngüsünde bulunan APX ya da GR gibi diğer enzimlerce ortadan kaldırılır (Ramezani ve ark., 2017). Mısır köklerine tuz stresi maruziyetinden sonra total CAT ve POX aktiviteleri artış göstermiş, ancak yüksek H_2O_2 düzeyleri stres grubunda izlenmiştir. Bu durumda stresin indüklediği antioksidan sistemin yeterli düzeyde uyarılmadığı anlaşılmaktadır. Antioksidan enzim aktivitesinin başarısına bağlı olarak hücrelerde lipid peroksidasyon önlenir. Tuz stresi altında yetişen mısır köklerinde lipid peroksidasyonun belirteci olan TBARS miktarında ciddi düzeyde artış izlenmiştir.

Fosfat (Pi) anyonunun bir analogu olan fosfit (PHI), potansiyel bir biyoyarıcı, ve çevreye dost bir bileşen olarak ortaya çıkmaktadır. Fosfor asidinin tuzları olan fosfit, bitkiler tarafından kullanılamaz, ancak toprak bakterileri tarafından yavaşça fosfata oksitlenebilir ve daha sonra fosfor besin maddesi olarak kökler tarafından emilebilir (Huang ve ark., 2018). Moleküler, fizyolojik ve biyokimyasal yaklaşımlardaki ileri araştırmalar, PHI'nin çeşitli bitki türlerinin büyümesini, gelişmesini ve kalitesini artırmadaki kilit rol onaylamıştır. PHI'nin doğrudan etki tarzının aksine, PHI'nin düşük konsantrasyonları, indüklenmiş direnç olarak bitki savunma tepkilerini artırmak için dolaylı eylemle ilişkilidir. PHI kaynaklı direnç çalışmaları, PHI'nin bitkilerde birden fazla şekilde çalıştığını göstermektedir. PHI'nin dolaylı etkileşimleri, patojenleri baskılamak için doğrudan etkilerinden daha faydalıdır (Daniel ve Guest, 2006). PHI'nin etkileri üzerine yapılan araştırmalar, genel olarak, yüksek ekzojen PHI konsantrasyonunun bitkinin normal büyüme ve gelişmesinde bir düşüşle ilişkilendirilebileceğini göstermiştir (Trejo-Téllez ve Gómez-Merino, 2018). Çilekte PHI uygulaması, kontrole kıyasla meyvelerin büyümesini, kökünü ve kalitesini iyileştirmektedir (Estrada-Ortiz ve ark., 2012). Bu sonuçlara paralel olarak stres uygulanan mısır köklerine PHI eklenmesi mısır köklerinin hem su içeriğinde hem de kısmı büyüme oranlarında (raporlanmayan sonuç) bir iyileşmeye neden olmuştur.

PHI ile dışarıdan uygulama yapılmış (uygun dozlarda) bitkilerde biyotik streslere karşı yüksek düzeyde bir direnç, bitki hücrelerinde antioksidan ve savunma

enzimlerinin uyarılmasından kaynaklandığı gösterilmiştir (Oyarburo ve ark., 2015). PHI uygulaması, hızlı bir antioksidan oluşumu ve hücre ölümünü programlayan ROS üretimine karşı yüksek bir azalma hassasiyeti yaratarak salatalık bitkisinin küf stresine karşı direncini artırmıştır (Ramezani ve ark., 2017). SOD, APX ve CAT aktiviteleri, *Pseudoperonospora infestans* ve *Pseudoperonospora cubensis* stresi altındaki patates ve salatalık fidelerinde PHI uygulamasıyla önemli ölçüde geliştirilmiştir (Mohammadi ve ark., 2021). Benzer şekilde stresin artırdığı SOD, CAT ve POX aktiviteleri, stresle eş zamanlı olarak dışarıdan PHI eklenmesiyle bu enzim aktivitelerini daha da indüklenmesi sağlanmıştır. Ek olarak, antioksidan içeriğin artırılması, yüksek NADP⁺ düzeylerini koruyarak ve toksik radikallerin bileşimini inhibe ederek fotosistemlerdeki elektron taşıma zincirinin gelişimine katkı sağlamış olabilir. Feldman ve ark. (2020) patojen stresi altındaki bitkilerde PHI uygulamasından sonra özellikle sinyal iletimi ve savunma tepkilerinde yer alan 172 genin ifade edildiği gösterilmiştir. Çalışmada da PHI uygulamasıyla antioksidan aktivitelerin artmasında enzimlerin sentezinden sorumlu gen ekspresyonlarının da arttırıldığı söylenebilir. Bulgular, sıcaklık stresine karşı daha iyi bitki performansı için, PHI dışarıdan uygulamasının yalnızca oksidatif stres ve DNA hasarını azaltmada gerekli olmadığını, aynı zamanda olumsuz termal koşullara maruz kalma durumunda osmolitlerin ve savunma metabolitlerinin biyolojik sentezini iyileştirdiğini göstermiştir (Xi ve ark., 2020). Bu ifade doğrultusunda, çalışmamızda PHI+stres gruplarında prolin üzerine elde ettiğimiz sonuçlar, stresin oluşturduğu membranlardaki hasarın fosfit uygulamasıyla iyileştirebildiğini göstermektedir. Bu iyileşme, fosfit uygulamasıyla mitokondrinin kristallerinde gerçekleşen hücresel solunum reaksiyonlarının pozitif yönde düzenlenebildiğini de gösterebilir. Tuz stresine karşı mısır köklerinde dışarıdan uygulanan fosfitin su ilişkileri ve antioksidan sistem üzerine olumlu etkileşimleri sayesinde hücrelerdeki lipid peroksidasyon düzeylerinin azaltılması (azalan TBARS miktarı) sağlanabilmiştir.

5.2 Öneriler

Tuz stresinin tarımsal alandaki olumsuz etkilerinin giderilmesinin önemi yadsınamaz. Tuzluluk toksisitesiyle karşı karşıya kalan bölgelerde yetişen bitkilerin, özellikle de mısır gibi ekonomik değeri olan ve üretim düzeyi yüksek olan bitkilerde, tuz stresine karşı tolerans mekanizmalarının geliştirilmesi ve böylece verim ve kalitesinin iyileştirilmesi önemlidir. Tuz stresiyile başa çıkmada kullanılan stratejilerin ekosistemle ve bitkilerle dost olması ve yaşama ortamlarında birikmemesi değerli bir özelliktir. Birçok çalışmada fosfitin tarımdaki faydası, bir bitki gübresi olmaktan ziyade hastalıkları önleme üzerindeki etkisi ile ilgili olarak incelenmiştir. Biyoyarıcı olarak sınıflandırılan fosfit uygulamalarının zirai anlamda geniş düzeyde kullanımı avantajlı görünmektedir. Fosfit toprağa uygulandığında, fosfitin fosfota oksidasyonuna aracılık eden mikroorganizmalarla temas eder. Böylece, bu dolaylı yöntemle fosfit, mikrobiyal oksidatif reaksiyonlardan sonra bitki için bir fosfor besin maddesi olarak kullanılabilir hale gelebilir.

Fosfitin mahsul verimini ve kalitesini iyileştirmesinin yanı sıra bitkilerde çevresel stres tepkilerini uyardığı da gösterilmiştir. Fosfitin stres koşullarına maruz kalan bitkilerdeki savunma mekanizmalarının etkinleştirmeye ilgili biyolojik süreçleri incelemeye değerlidir. Fosfitin alımı, taşınması ve subsellüler lokalizasyonu alanında önemli ilerlemeler kaydedilmiş olmasına rağmen, fosfitin bitki metabolizması üzerindeki etkilerinin ardındaki temel süreçlerin daha derinlemesine anlaşılması hala eksiktir. Tezimizdeki sonuçların değerlendirmesiyle yeni bir biyoyarıcı olarak fosfitin etkisine ilişkin araştırmalardaki mevcut gelişmelere yeni bilgilerin sağlanması beklenmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Abudureyimu, B., ve Aksoy, E. (2019). SOS Yolağından Sorumlu Arabidopsis Mutantlarının Tuz Stresi Altındaki Hassasiyetlerinin Karşılaştırılması. *Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 7(11), 1982.
- Acar, O., Öztürk, E., Seçkin-Dinler, B., Gül, V., Demirbaş, S., Sefaoğlu, F., Turfan, N., Kaya, C., Çetinkaya, H., ve Koç, F. N. (2022). *Bitkilerde Abiyotik ve Biyotik Stres Yönetimi* (B. Seçkin-Dinler & V. Gül (ed.); Sayı December). Iksad Publications.
- Ahammed, G. J., Choudhary, S. P., Chen, S., Xia, X., Shi, K., Zhou, Y., & Yu, J. (2013). Role of brassinosteroids in alleviation of phenanthrene-cadmium co-contamination-induced photosynthetic inhibition and oxidative stress in tomato. *Journal of Experimental Botany*, 64(1), 199–213.
- Alharby, H. F., Al-Zahrani, H. S., Hakeem, K. R., Alsamadany, H., Desoky, E. S. M., ve Rady, M. M. (2021). Silymarin-enriched biostimulant foliar application minimizes the toxicity of cadmium in maize by suppressing oxidative stress and elevating antioxidant gene expression. *Biomolecules*, 11(3), 1–28.
- Ali, S., Moon, Y. S., Hamayun, M., Khan, M. A., Bibi, K., ve Lee, I. J. (2022). Pragmatic role of microbial plant biostimulants in abiotic stress relief in crop plants. *Journal of Plant Interactions*, 17(1), 705–718.
- Arıkan, Ş., Muzaffer, İ., ve Pırlak, L. (2017). Antioksidan Sistemler. *1st International Turkish World Engineering and Science Congress in Antalya*, 7–10.
- Arnao, M. B., ve Hernández-Ruiz, J. (2020). Is phyto melatonin a new plant hormone? *Agronomy*, 10(1).
- Baltazar, M., Correia, S., Guinan, K. J., Sujeeth, N., Bragança, R., ve Gonçalves, B. (2021). Recent advances in the molecular effects of biostimulants in plants: An overview. İçinde *Biomolecules* (C. 11, Sayı 8). MDPI AG.
- Banakar, S. N., PrasannaKumar, M. K., Mahesh, H. B., Parivallal, P. B., Puneeth, M. E.,

- Gautam, C., Pramesh, D., Shiva Kumara, T. N., Girish, T. R., Nori, S., ve Narayan, S. S. (2022). Red-seaweed biostimulants differentially alleviate the impact of fungicidal stress in rice (*Oryza sativa* L.). *Scientific Reports*, 12(1).
- Bates, L. S., Waldren, R. P., ve Teare, I. D. (1973). *Rapid determination of free proline for water-stress studies* (C. 39, Sayı 1).
- Beauchamp, C., ve Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 44(1), 276–287.
- Bolat, İ., ve Kara, Ö. (2017). Bitki Besin Elementleri Kaynakları, İşlevleri, Eksik ve Fazlalıkları. *Bartın Orman FakÜltesi Dergisi*, 19(1), 218–228.
- 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(1–2), 248–254.
- Büyük, İ., Soydam-Aydın, S., ve Aras, S. (2012). Bitkilerin stres koşullarına verdiği moleküler cevaplar. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 69(2), 97–110.
- Carvalho, M. E. A., De Camargo E Castro, P. R., Gaziola, S. A., ve Azevedo, R. A. (2018). Is seaweed extract an elicitor compound? Changing proline content in drought-stressed bean plants. *Comunicata Scientiae*, 9(2), 292–297.
- Cengiz, R., Öztürk, A., Beyhan, A., Ali, U., Morca, F., Akci, E., ve Diler, H. (2022). *MISIR; Islah Teknikleri ve Yetiştiriciliği* (R. Cengiz (ed.); C. 1). Iksad Publications.
- Çetinkaya, H., ve Seçkin-Dinler, B. (2021). Bitkilerde Hücre Duvarı Mekanizmasında Strese Bağlı Meydana Gelen Savunma Cevapları. *Sinop Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 6(2), 174–188.
- Che-Othman, M. H., Millar, A. H., ve Taylor, N. L. (2017). Connecting salt stress signalling pathways with salinity-induced changes in mitochondrial metabolic processes in C3 plants. İçinde *Plant Cell and Environment* (C. 40, Sayı 12, ss. 2875–

2905). Blackwell Publishing Ltd.

- Çulha, Ş., ve Çakırlar, H. (2011). Tuzluluğun Bitkiler Üzerine Etkileri ve Tuz Tolerans Mekanizmaları. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 11(021002), 11–34.
- Daniel, R., ve Guest, D. (2006). Defence responses induced by potassium phosphonate in *Phytophthora palmivora*-challenged *Arabidopsis thaliana*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 67(3–5), 194–201.
- Deinlein, U., Stephan, A. B., Horie, T., Luo, W., Xu, G., ve Schroeder, J. I. (2014). Plant salt-tolerance mechanisms. *Trends in Plant Science*, 19(6), 371–379.
- Deliboran, A., ve Savran, Ş. (2015). Toprak tuzluluğu ve tuzluluğa bitkilerin dayanım mekanizmaları. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 8(1), 57–61.
- Doğru, A. (2019). Bitkilerde Antioksidan Sistemler ve Tuz Stresine Verdikleri Yanıtlar. *International Journal of Eastern Anatolia Science Engineering and Design*, 1(2), 164–185.
- Doğru, A. (2020). Bitkilerde Aktif Oksijen Türleri ve Oksidatif Stres. *International Journal of Life Sciences and Biotechnology*.
- Doğru, A. (2020). Tuz stresi altındaki buğday genotiplerinde foliar bor uygulamalarının neden olduğu fizyolojik ve biyokimyasal değişimler. *Journal of Boron*, 5(2), 100–107.
- Doğru, A., ve Canavar, S. (2020). Bitkilerde Tuz Toleransının Fizyolojik ve Biyokimyasal Bileşenleri. *Academic Platform Journal of Engineering and Science*, 155–174.
- Doğru, A., ve Torlak, E. (2020). Tuz Stresi Altındaki Mısır Bitkilerinde Eksojen Askorbik Asit Uygulamasının Etkileri. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 30, 919–927.

- Dölarıslan M, ve Gül E. (2012). Toprak bitki ilişkileri açısından tuzluluk. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi* , 2, 56–59.
- du Jardin, P. (2015). Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae*, 196, 3–14.
- El Moukhtari, A., Carol, P., Mouradi, M., Savoure, A., ve Farissi, M. (2021). Silicon improves physiological, biochemical, and morphological adaptations of alfalfa (*Medicago sativa* L.) during salinity stress. *Symbiosis*, 85(3), 305–324.
- ElSayed, A. I., Rafudeen, M. S., Gomaa, A. M., ve Hasanuzzaman, M. (2021). Exogenous melatonin enhances the reactive oxygen species metabolism, antioxidant defense-related gene expression, and photosynthetic capacity of *Phaseolus vulgaris* L. to confer salt stress tolerance. *Physiologia Plantarum*, 173(4), 1369–1381.
- Estrada-Ortiz, E., Trejo-Téllez, L. I., Gómez-Merino, F. C., Núñez-Escobar, R., ve Sandoval-Villa, M. (2012). Phosphite On Growth and Fruit Quality In Strawberry. *Acta Horticulturae*, 947, 277–282.
- Farhangi-Abriz, S., Faegi-Analou, R., ve Nikpour-Rashidabad, N. (2017). Polyamines, affected the nitrogen partitioning, protein accumulation and amino acid composition of mung bean under water stress. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 20(4), 279–285.
- Feldman, M. L., Guzzo, M. C., Machinandiarena, M. F., Rey-Burusco, M. F., Beligni, M. V., Di Rienzo, J., Castellote, M. A., Daleo, G. R., ve Andreu, A. B. (2020). New insights into the molecular basis of induced resistance triggered by potassium phosphite in potato. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 109.
- Feng, W., Lindner, H., Robbins, N. E., ve Dinneny, J. R. (2016). Growing out of stress: The role of cell- and organ-scale growth control in plant water-stress responses. İçinde *Plant Cell* (C. 28, Sayı 8, ss. 1769–1782). American Society of Plant Biologists.

- Ghosh, U. K., Islam, M. N., Siddiqui, M. N., Cao, X., ve Khan, M. A. R. (2022). Proline, a multifaceted signalling molecule in plant responses to abiotic stress: understanding the physiological mechanisms. İçinde *Plant Biology* (C. 24, Sayı 2, ss. 227–239). John Wiley and Sons Inc.
- Gill, S. S., ve Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. İçinde *Plant Physiology and Biochemistry* (C. 48, Sayı 12, ss. 909–930).
- Hasanuzzaman, M., Raihan, M. R. H., Masud, A. A. C., Rahman, K., Nowroz, F., Rahman, M., Nahar, K., ve Fujita, M. (2021). Regulation of reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under salinity. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(17).
- Herzog, V., ve Fahimi, H. D. (1973). A new sensitive colorimetric assay for peroxidase using 3,3'-diaminobenzidine as hydrogen donor. *Analytical Biochemistry*, 55(2), 554–562.
- Huang, Z., Carter, N., Lu, H., Zhang, Z., ve Wang-Pruski, G. (2018). Translocation of phosphite encourages the protection against *Phytophthora infestans* in potato: The efficiency and efficacy. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 152, 122–130.
- Karaoğlu, M., ve Yalçın, A. murat. (2018). Toprak Tuzluluğu ve Iğdır Ovası Örneği. *Journal of Agriculture*, 1(1), 27–41.
- Kireççi, O. A. (2018). Bitkilerde Enzimatik ve Enzimatik Olmayan Antioksidanlar. *BEÜ Fen Bilimleri Dergisi*, 7(2), 473–483.
- Koç, E., ve Üstün, A. S. (2008). Patojenlere Karşı Bitkilerde Savunma ve Antioksidanlar. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 24(2), 82–100.
- Köseoğlu-Toksoy, S., ve Dogru, A. (2021). Farklı NaCl Konsantrasyonlarının Bazı Ekmeklik Buğday (*Triticum aestivum* L.) Genotiplerinin Çimlenme Dönemindeki Etkileri. *Environmental Toxicology and Ecology Journal*, 1(1), 33–42.

- Külahtaş B, ve Çokuysal B. (2016). Biyostimulantların Sınıflandırılması ve Türkiye'deki Durumu. *Çukurova Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 31(3), 185–200.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685.
- Liu, Z. J., Guo, Y. K., ve Bai, J. G. (2010). Exogenous hydrogen peroxide changes antioxidant enzyme activity and protects ultrastructure in leaves of two cucumber ecotypes under osmotic stress. *Journal of Plant Growth Regulation*, 29(2), 171–183.
- Lugan, R., Niogret, M. F., Leport, L., Guégan, J. P., Larher, F. R., Savouré, A., Kopka, J., ve Bouchereau, A. (2010). Metabolome and water homeostasis analysis of *Thellungiella salsuginea* suggests that dehydration tolerance is a key response to osmotic stress in this halophyte. *Plant Journal*, 64(2), 215–229.
- Mancuso, S., Azzarello, E., Mugnai, S., ve Briand, X. (2006). Marine Bioactive Substances (IPA Extract) Improve Foliar Ion Uptake and Water Stress Tolerance in Potted «*Vitis vinifera*» Plants. *Adv. Hort. Sci (C. 20, Sayı 2)*.
- Mishra, P., Bhoomika, K., ve Dubey, R. S. (2013). Differential responses of antioxidative defense system to prolonged salinity stress in salt-tolerant and salt-sensitive Indica rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Protoplasma*, 250(1), 3–19.
- Mohammadi, M. A., Cheng, Y., Aslam, M., Jakada, B. H., Wai, M. H., Ye, K., He, X., Luo, T., Ye, L., Dong, C., Hu, B., Priyadarshani, S. V. G. N., Wang-Pruski, G., ve Qin, Y. (2021). ROS and Oxidative Response Systems in Plants Under Biotic and Abiotic Stresses: Revisiting the Crucial Role of Phosphite Triggered Plants Defense Response. *Frontiers in Microbiology (C. 12)*. Frontiers Media S.A.
- Mutlu, H. (2019). Willow Tree Extracts As Novel Plant-Based Biostimulants, Yüksek Lisans Tezi. *Gebze Teknik Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü*, Kocaeli, 13-16.
- Oyarburo, N. S., Machinandiarena, M. F., Feldman, M. L., Daleo, G. R., Andreu, A. B., ve Olivieri, F. P. (2015). Potassium phosphite increases tolerance to UV-B in potato.

Plant Physiology and Biochemistry, 88, 1–8.

- Öztekin, A. (2020). Separation of Guaiacol Peroxidase from Onion Roots with Affinity Chromatography. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 10(2), 1163–1170.
- Parvin, S., Lee, O. R., Sathiyaraj, G., Khorolragchaa, A., Kim, Y. J., ve Yang, D. C. (2014). Spermidine alleviates the growth of saline-stressed ginseng seedlings through antioxidative defense system. *Gene*, 537(1), 70–78.
- Povero, G., Roupael, Y., & Colla, G. (2018). Synergistic Biostimulatory Action: Designing the Next Generation of Plant Biostimulants for Sustainable Agriculture. *Frontiers in Plant Science*, 9, (1655).
- Srivastava, P.K., (2021). Salt Stress Responses in Plants: Perception, Signaling, Omics and Tolerance Mechanisms (C. 1). Nova, 18-21
- Puyang, X., An, M., Han, L., ve Zhang, X. (2015). Protective effect of spermidine on salt stress induced oxidative damage in two Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.) cultivars. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 117, 96–106.
- Rady, M. M., ve Hemida, K. A. (2015). Modulation of cadmium toxicity and enhancing cadmium-tolerance in wheat seedlings by exogenous application of polyamines. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 119, 178–185.
- Ramezani, M., Rahmani, F., ve Dehestani, A. (2017). Study of physio-biochemical responses elicited by potassium phosphite in downy mildew-infected cucumber plants. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 50(11–12), 540–554.
- Roychoudhury, A., Basu, S., ve Sengupta, D. N. (2011). Amelioration of salinity stress by exogenously applied spermidine or spermine in three varieties of indica rice differing in their level of salt tolerance. *Journal of Plant Physiology*, 168(4), 317–328.

- Şahin, G., ve Öргеç, M. (2022). Effects of Polyamines on Plant Growth and Development with a Current Perspective. *Türkiye Tarımsal Araştırmalar Dergisi*, 9(2), 255–264.
- Sairam, R. K., ve Srivastava, G. C. (2002). Changes in antioxidant activity in sub-cellular fractions of tolerant and susceptible wheat genotypes in response to long term salt stress. *Plant Science*, 162(6), 897–904.
- Sandhu, D., Cornacchione, M. V., Ferreira, J. F. S., ve Suarez, D. L. (2017). Variable salinity responses of 12 alfalfa genotypes and comparative expression analyses of salt-response genes. *Scientific Reports*, 7(February), 1–18.
- Sarafraz-Ardakani, M.-R., Khavari-Nejad, R.-A., Moradi, F., ve Najafi, F. (2014). Abscisic Acid and Cytokinin-Induced Osmotic and Antioxidant Regulation in Two Drought-Tolerant and Drought-Sensitive Cultivars of Wheat During Grain Filling Under Water Deficit in Field Conditions. *Not Sci Biol*, 6(3), 354–362.
- Seevers, P. M., Daly, J. M., ve Catedral, F. F. (1971). The Role of Peroxidase Isozymes in Resistance to Wheat Stem Rust Disease. *Plant Physiology*, 48(3), 353–360.
- Shu, S., Yuan, L. Y., Guo, S. R., Sun, J., ve Yuan, Y. H. (2013). Effects of exogenous spermine on chlorophyll fluorescence, antioxidant system and ultrastructure of chloroplasts in *Cucumis sativus* L. under salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 63, 209–216.
- Simon-Sarkadi, L., Kocsy, G., Várhegyi, Á., Galiba, G., ve De Ronde, J. A. (2006). Stress-induced changes in the free amino acid composition in transgenic soybean plants having increased proline content. *Biologia Plantarum* (C. 50, Sayı 4).
- Sönmez, E. (2019). Tuz Stresi Altındaki Mısır (*Zea mays* L.) Bitkisinde Potasyum Uygulamalarının Fizyolojik ve Biyokimyasal Etkisinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, *Sakarya Fen Bilimleri Enstitüsü*, Sakarya 1- 133.
- Teklić, T., Parađiković, N., Špoljarević, M., Zeljković, S., Lončarić, Z., ve Lisjak, M. (2021). Linking abiotic stress, plant metabolites, biostimulants and functional food.

- Annals of Applied Biology*, 178(2), 169–191.
- Tiryaki, İ. (2018). Bazı Tarla Bitkilerinin Tuz Stresine Gösterdikleri Adaptasyon Mekanizmaları. *KSÜ Tarım ve Doğa Dergisi*, 21(5), 800–808.
- Torun, H., ve Ayaz, F. A. (2019). Tuz Stresi Koşullarında Salisilik Asidin Zamana Bağlı Uygulanmasının Arpa (*Hordeum Vulgare* L.) Köklerinin Antioksidan Savunma Sistemi Üzerine Etkileri. *Eskişehir Technical University Journal of Science and Technology C-Life Sciences and Biotechnology*, 8(1), 69–84.
- Trejo-Téllez, L. I., ve Gómez-Merino, F. C. (2018). Phosphite as an Inductor of Adaptive Responses to Stress and Stimulator of Better Plant Performance. *Springer Singapore*.
- Van Zelm, E., Zhang, Y., ve Testerink, C. (2020). Salt Tolerance Mechanisms of Plants. *Annual Review of Plant Biology*. 71:403–33
- Vieira-Santos, C. L., Campos, A., Azevedo, H., ve Caldeira, G. (2001). In situ and in vitro senescence induced by KCl stress: nutritional imbalance, lipid peroxidation and antioxidant metabolism. *Journal of Experimental Botany*, 52(355), 351–360.
- Woodbury, W., Spencer, A., ve Stahmann, M. (1971). An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isozymes. *Analitica Biochemistry*, 44, 301–305.
- Xi, Y., Han, X., Zhang, Z., Joshi, J., Borza, T., Mohammad Aqa, M., Zhang, B., Yuan, H., ve Wang-Pruski, G. (2020). Exogenous phosphite application alleviates the adverse effects of heat stress and improves thermotolerance of potato (*Solanum tuberosum* L.) seedlings. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 190 (110048).
- Yang, Y., ve Guo, Y. (2018a). Elucidating the molecular mechanisms mediating plant salt-stress responses. *New Phytologist* (C. 217, Sayı 2, 523–539).
- Yang, Y., ve Guo, Y. (2018b). Unraveling salt stress signaling in plants. İçinde *Journal of Integrative Plant Biology* (C. 60, Sayı 9, 796–804).

- Yıldız, M., Terzi, H., ve Akçalı, N. (2014). Bitki Tuz Stresi Toleransında Salisilik Asit ve Poliaminler. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 14(2), 16.
- Yildiz, M., Terzi, H., Cenkci, S., ve Suna Arıkan, E. (2010). Bitkilerde Tuzluluğa Toleransın Fizyolojik ve Biyokimyasal Markörleri. *Anadolu Üniversitesi Bilim Ve Teknoloji Dergisi-C*, 1(1), 1–33.
- Yildiz M, Terzi H, ve Akçalı N. (2014). Tuz Stresi Altındaki Bitkilerin Metabolik Yollarındaki Proteom Değişimleri. *BEÜ Fen Bilimleri Dergisi BEU Journal of Science*, 3(1), 81–93.
- Yildiztugay, E., Özfıdan-Konakci, C., ve Kucukoduk, M. (2013). *Sphaerophysa kotschyana*, an endemic species from Central Anatolia: Antioxidant system responses under salt stress. *Journal of Plant Research*, 126(5), 729–742.
- Yildiztugay, E., Özfıdan Konakçı, C., Küçüködük, M., ve Duran, Y. (2014). Modulation of osmotic adjustment and enzymatic antioxidant profiling in *Apera intermedia* exposed to salt stress. *Turkish Journal of Botany*, 38(1), 99–111.
- Yılmaz, A., ve Çiftçi, V. (2021). Pütresin'in Tuz Stresi Altında Yetişen Yer Fıstığı (*Arachis hypogaea* L.)'na Etkisi. *European Journal of Science and Technology*.
- Yılmaz E, Tuna A.L, ve Bürün B. (2011). Bitkilerin Tuz Stresi Etkilerine Karşı Geliştirdikleri Tolerans Stratejileri. *C.B.Ü. Fen Bilimleri Dergisi*, 7(1), 47–66.
- Zhang, Y., Hu, X.-H., Shi, Y., Zou, Z.-R., Yan, F., Zhao, Y.-Y., Zhang, H., ve Zhao, J.-Z. (2013). Beneficial Role of Exogenous Spermidine on Nitrogen Metabolism in Tomato Seedlings Exposed to Saline-alkaline Stress. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 138(1), 38–49.
- Zhao, C., Zhang, H., Song, C., Zhu, J. K., & Shabala, S. (2020). Mechanisms of Plant Responses and Adaptation to Soil Salinity. *The Innovation* Cell Press (C. 1, Sayı 1).

