

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**





KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ENDEMİK HALOFİT *SCORZONERA HIERACIIFOLIA* BİTKİSİNİN TUZ STRESİNE
TOLERANS MEKANİZMASININ ARAŞTIRILMASI**

Cansu ALTUNTAŞ

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
"DOKTOR (BİYOLOJİ)"
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 09 / 12 /2019

Tezin Savunma Tarihi : 16 / 01 /2020

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Rabiye TERZİ

Trabzon 2020

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Biyoloji Anabilim Dalında

Cansu ALTUNTAŞ Tarafından Hazırlanan

**ENDEMİK HALOFİT *SCORZONERA HIERACIIFOLIA* BİTKİSİNİN TUZ STRESİNE
TOLERANS MEKANİZMASININ ARAŞTIRILMASI**

**başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 17 / 12 / 2019 gün ve 1832 sayılı
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda
DOKTORA TEZİ
olarak kabul edilmiştir.**

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Asim KADIOĞLU

Üye : Prof. Dr. Rabiye TERZİ

Üye : Prof. Dr. Ökkeş ATICI

Üye : Doç. Dr. Aykut SAĞLAM

Üye : Doç. Dr. Utku AVCI

**Prof. Dr. Asim KADIOĞLU
Enstitü Müdürü**

ÖNSÖZ

“Endemik Halofit *Scorzonera hieraciifolia* Bitkisinin Tuz Stresine Tolerans Mekanizmasının Araştırılması” adlı bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalında “Doktora Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Bu konunun seçilmesinde, çalışmanın planlanmasında, değerlendirilmesinde ve tezin yazım aşamasında benden desteğini hiçbir zaman esirgemeyen değerli danışmanım Prof. Dr. Rabiye TERZİ’ye, tezin geliştirilmesi konusunda yardımcı olan tez izleme jüri üyelerim sayın Prof. Dr. Asım KADIOĞLU ve sayın Doç. Dr. Aykut SAĞLAM’a teşekkür ederim. Ayrıca, KTÜ, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Bitki Fizyolojisi Araştırma Laboratuvarı’nın değerli hocaları sayın Doç. Dr. Neslihan SARUHAN GÜLER’e, Dr. Öğr. Üyesi Mehmet DEMİRALAY’a teşekkür ederim. Deneylerimde kullandığım *Scorzonera hieraciifolia* akenleri ve *Eutrema parvulum* tohumlarının temin edilmesini sağlayan sayın Prof. Dr. Serdar MAKBUL’a ve sayın Prof. Dr. İsmail TÜRKAN ve ekip arkadaşlarına, akademik hayatım boyunca her türlü desteğini gördüğüm çok değerli arkadaşlarım Öğr. Gör. Asiye SEZGİN MUSLU’ya, Esmâ CEYLAN’a, Kemal Vehbi İMAMOĞLU’na, Muammer KURNAZ’a, Öğr. Gör. Kamil ÖZTÜRK’e, Selda ÖKSÜZ’e teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde üzerimde emekleri büyük olan ve desteklerini her zaman hissettiğim sevgili aileme teşekkür ederim. Ve çok kıymetli eşim Celil ALTUNTAŞ; ömrüm boyunca gerek akademik gerekse özel hayatımda her daim yanı başımda olduğun için, pes etmemeyi, kararlılığı bana öğrettiğin ve yoluma her zaman ışık olduğun için sana kalpten teşekkür ederim. Bu çalışma 7712 BAP06 proje ile desteklenmiştir.

Cansu ALTUNTAŞ

Trabzon 2020

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Doktora Tezi olarak sunduğum “Endemik halofit *Scorzonera hieraciifolia* Bitkisinin Tuz Stresine Tolerans Mekanizmasının Araştırılması” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Rabiye Terzi'nin sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuarlarda yaptığımı/yaptırıldığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 16/01/2020

Cansu ALTUNTAŞ

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET.....	IX
SUMMARY	X
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XI
TABLolar DİZİNİ	XIII
KISALTMALAR DİZİNİ	XIV
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Stresin Tanımı	6
1.3. Tuz Stresi ve Toprak Tuzluluğu.....	6
1.4. Tuz Stresinin Bitkiler Üzerindeki Etkileri	7
1.4.1. Ozmotik Potansiyel Üzerine Etkisi	8
1.4.2. İyon İçeriği Üzerine Etkisi.....	9
1.4.3. Reaktif Oksijen Türleri Üzerine Etkisi	9
1.5. Reaktif Oksijen Türleri	10
1.5.1. Süperoksit Radikali	10
1.5.2. Singlet Oksijen.....	11
1.5.3. Hidrojen Peroksit	11
1.5.4. Hidroksil Radikali	12
1.6. Halofit Bitkiler	13
1.7. Halofitlerin Tuza Direnç Mekanizmaları	14
1.7.1. İyon Homeostasisın Düzenlenmesi ve SOS Yolu	17
1.7.2. Ozmolitlerin (Organik Çözünenler) Biyosentezi	18
1.7.3. Antioksidan Sistem	19
1.7.3.1. Enzimatik Antioksidanlar	20
1.7.3.1.1. Süperoksit Dismutaz	20
1.7.3.1.2. Katalaz	20
1.7.3.1.3. Askorbat Peroksidaz	21
1.7.3.1.4. Monodehidroaskorbat Redüktaz	21
1.7.3.1.5. Dehidroaskorbat Redüktaz.....	22

1.7.3.1.6.	Glutatyon Redüktaz	22
1.7.3.1.7.	Glutatyon Peroksidaz	22
1.7.3.2.	Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	23
1.7.3.2.1.	Askorbat (L-Askorbik Asit, C Vitamini)	23
1.7.3.2.2.	Glutatyon.....	23
1.8.	Asteraceae Familyası ve <i>Scorzonera</i> Cinsinin Özellikleri.....	24
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR	26
2.1.	Bitki Materyalleri ve Sterilizasyonu	26
2.2.	Doku Kültürünün Besin Ortamı, Koşulları ve Tuz Uygulamaları	27
2.3.	<i>Scorzonera hieraciifolia</i> 'nın Ekstrem Halofit Olma Özelliğinin Belirlenmesi ..	29
2.3.1.	Bazı Temel Stres Parametrelerinin Belirlenmesi	29
2.3.1.1.	Nispi Su İçeriğinin Ölçümü	29
2.3.1.2.	Lipid Peroksidasyonu Tayini	29
2.3.1.3.	Hidrojen Peroksit İçeriğinin Belirlenmesi	30
2.3.1.4.	Sürgün Taze ve Kuru Ağırlıklarının Belirlenmesi.....	30
2.3.1.5.	Fotosentetik Pigmentlerin Belirlenmesi.....	30
2.4.	<i>Scorzonera hieraciifolia</i> 'nın Tuza Tolerans Mekanizmasının Belirlenmesi	30
2.4.1.	Sürgün Sukkulentlik Derecesinin Ölçümü.....	30
2.4.2.	Sürgün Kalınlığının Belirlenmesi	31
2.4.3.	Bitki Alanının Belirlenmesi	31
2.4.4.	Stoma Por Açıklığının Belirlenmesi	31
2.4.5.	Prolin İçeriğinin Belirlenmesi.....	32
2.4.6.	Toplam Çözünebilir Şeker İçeriğinin Belirlenmesi	32
2.4.7.	İyon Konsantrasyonlarındaki Değişimler	32
2.4.8.	Süperoksit İçeriğinin Belirlenmesi.....	33
2.4.9.	3,3' Diaminobenzidin Boyaması ile H ₂ O ₂ İçeriğinin Belirlenmesi.....	33
2.4.10.	Enzimatik Antioksidan Aktivitelerinin Tayini.....	33
2.4.10.1.	Enzimlerin Ekstraksiyonu	33
2.4.10.2.	Süperoksit Dismutaz Aktivitesi Tayini	34
2.4.10.3.	Katalaz Aktivitesi Tayini	34
2.4.10.4.	Guaikol Peroksidaz Aktivitesi Tayini	34
2.4.10.5.	Askorbat Peroksidaz Aktivitesi Tayini	34
2.4.10.6.	Glutatyon Redüktaz Aktivitesi Tayini	35

2.4.11.	Bazı Enzimatik Olmayan Antioksidan İçeriklerinin Belirlenmesi.....	35
---------	--	----

2.4.11.1.	Askorbat İçeriğinin Belirlenmesi	35
2.4.11.2.	Glutasyon İçeriğinin Belirlenmesi	35
2.4.12.	Antioksidan Enzimlerin Protein Miktarındaki Değişimlerin Western Blot Yöntemiyle Belirlenmesi	36
2.4.12.1.	Protein Tayini.....	36
2.5.	İstatistiksel Analizler.....	37
3.	BULGULAR.....	38
3.1.	<i>Scorzonera hieraciifolia</i> 'nın Ekstrem Halofit Olma Özelliğinin Belirlenmesi ..	38
3.1.1.	Morfolojik Gözlemler	38
3.1.2.	Bazı Stres Parametrelerindeki Değişimler	40
3.1.2.1.	Nispi Su İçeriği	40
3.1.2.2.	Lipid Peroksidasyonu.....	41
3.1.2.3.	Hidrojen Peroksit İçeriği	42
3.1.2.4.	Sürgün Taze Ağırlığı ve Kuru Ağırlığı	43
3.1.2.5.	Klorofil a ve Klorofil b İçerikleri.....	44
3.1.2.6.	Toplam Klorofil ve Karotenoid İçerikleri	45
3.2.	<i>Scorzonera hieraciifolia</i> 'nın Tuza Tolerans Mekanizması.....	46
3.2.1.	Sürgün Sukkulentlik Derecesi ve Sürgün Kalınlığı	46
3.2.2.	Bitki Alanı.....	47
3.2.3.	Stoma Por Açıklığındaki Değişimler	48
3.2.4.	Prolin İçeriği	49
3.2.5.	Toplam Çözünebilir Şeker İçeriği.....	49
3.2.6.	İyon Konsantrasyonlarındaki Değişimler	50
3.2.7.	Süperoksit İçeriği	53
3.2.8.	Dokularda Hidrojen Peroksit İçeriği	54
3.2.9.	Enzimatik Antioksidan Aktivitelerindeki Değişimler.....	54
3.2.9.1.	Süperoksit Dismutaz Aktivitesi	54
3.2.9.2.	Katalaz Aktivitesi.....	55
3.2.9.3.	Guaikol Peroksidaz Aktivitesi	56
3.2.9.4.	Askorbat Peroksidaz Aktivitesi.....	56
3.2.9.5.	Glutasyon Redüktaz Aktivitesi.....	57
3.2.10.	Enzimatik Olmayan Antioksidan İçeriklerindeki Değişimler.....	58
3.2.10.1.	Askorbat İçeriği.....	58
3.2.10.2.	Glutasyon İçeriği	58
3.2.11.	Antioksidan Enzimlerin Protein Miktarındaki Değişimler	59

3.2.11.1.	Demir Süperoksit Dismutaz Protein Sentezi.....	59
3.2.11.2.	Katalaz Protein Sentezi	60
3.2.11.3.	Glutasyon Peroksidaz Protein Sentezi.....	60
3.2.11.4.	Glutasyon Redüktaz Protein Sentezi	60
4.	TARTIŞMA	62
5.	SONUÇLAR	72
6.	ÖNERİLER.....	74
7.	KAYNAKLAR	75
8.	EKLER.....	88
ÖZGEÇMİŞ		



Doktora Tezi

ÖZET

ENDEMİK HALOFİT *SCORZONERA HIERACIIFOLIA* BİTKİSİNİN TUZ STRESİNE TOLERANS MEKANİZMASININ ARAŞTIRILMASI

Cansu ALTUNTAŞ

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Rabiye TERZİ
2020, 87 Sayfa, 5 Ek Sayfa

Endemik halofit *Scorzonera hieraciifolia*'nın tuza tolerans mekanizmasını aydınlatmak için doku kültürü ortamında büyütülen fideler farklı tuz konsantrasyonlarına (0, 150, 300, 450, 600 mM NaCl) maruz bırakıldı ve bazı fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler parametrelerdeki değişimler belirlendi. Artan tuz konsantrasyonuna bağlı olarak sürgünlerde sukkulentliğin arttığı, 600 mM tuz uygulanmış sürgünlerde klorofil kaybı görülmesine rağmen bitkilerin canlılığını koruduğu saptandı. Sürgün taze ağırlığı, kuru ağırlığı, klorofil ve karotenoid içeriklerinin 450 ve 600 mM tuz uygulamasıyla önemli derecede azaldığı görüldü. Reaktif oksijen türleri, membran hasarı, prolin ve toplam çözünebilir şeker ve Na⁺, Cl⁻ ve K⁺ içeriklerinin tuz stresi uygulamalarıyla arttığı belirlendi. Katalaz (CAT) aktivitesi 450 ve 600 mM tuz uygulamalarıyla azalırken, süperoksit dismutaz (SOD), guaikol peroksidaz (GPOD), glutatyon redüktaz (GR) ve askorbat peroksidaz (APX) aktivitelerinin tüm tuz uygulamalarıyla, askorbat ve glutatyon içeriklerinin ise 300, 450 ve 600 mM tuz uygulamalarıyla arttığı gözlemlendi. Ayrıca tuz uygulamalarına paralel olarak SOD ve glutatyon peroksidaz (GPX) protein içeriklerinin arttığı tespit edildi. CAT protein içeriğinin 300 mM, GR protein içeriğinin ise 450 mM tuz uygulanmış sürgünlerde en fazla arttığı görüldü.

Elde edilen veriler ışığında, yaprakları sukkulent endemik halofit *Scorzonera hieraciifolia*'nın hücre içerisinde ozmolit ve NaCl birikimi aracılığıyla suyu etkin bir şekilde alarak sukkulentliği artırdığı, antioksidan sistemi uyardığı ve böylece çok yüksek (600 mM) tuz konsantrasyonuna tolerans gösterebilen ekstrem halofit bir bitki olduğu sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: *Scorzonera hieraciifolia*, Tuz stresi, Halofit, Sukkulent, Antioksidan Sistem

PhD. Thesis

SUMMARY

INVESTIGATION OF TOLERANCE MECHANISM TO SALT STRESS OF ENDEMIC
HALOPHYTE *SCORZONERA HIERACIIFOLIA* PLANT

Cansu ALTUNTAŞ

Karadeniz Technical University
The Graduate of Natural and Applied Sciences
Biology Graduate Program
Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Rabiye TERZİ
2020, 87 Pages, 5 Appendix

To clarify the salt tolerance mechanism of endemic halophyte *Scorzonera hieraciifolia*, the seedlings grown in tissue culture medium were exposed to different salt concentrations (0, 150, 300, 450, 600 mM NaCl) and changes in some physiological, biochemical and molecular parameters were determined. It was detected that leaf succulence increased in accordance with the increased salt concentration and the plants remained alive despite chlorophyll loss in the 600 mM NaCl applied shoots. Shoot fresh weight, dry weight, chlorophyll and carotenoid contents significantly reduced in the 450 and 600 mM salt applied shoots. Reactive oxygen species, membrane damage, proline and total soluble sugar and Na^+ , Cl^- and K^+ contents increased under salt stress conditions. It was observed that catalase (CAT) activity decreased in the shoots exposed to 450-600 mM NaCl. While the activities of superoxide dismutase (SOD), guaiacol peroxidase (GPOD), glutathione reductase (GR) and ascorbate peroxidase increased in all salt applications. Ascorbate and glutathione contents also increased in the shoots exposed to 300, 450 and 600 mM salt. In addition, protein contents of SOD and glutathione peroxidase (GPX) increased in parallel with increasing salt. The most increases of CAT and GR protein contents were observed at 300 mM and 450 mM NaCl, respectively.

In the light of the obtained data, it was concluded that leaf-succulent endemic halophyte *Scorzonera hieraciifolia* could increase the succulency by up taking the water effectively through the accumulation of osmolite and salt in the cell and it could stimulate the antioxidant system and thus it is an extreme halophyte tolerating high salt concentration (600 mM).

Keywords: *Scorzonera hieraciifolia*, Salt stress, Halophyte, Succulent, Antioxidant system

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.	Halofitlerde tuza direnç mekanizmaları.....	17
Şekil 2.	İyon dengesinin SOS sinyal iletim yolu, tuz stresi ve kalsiyum düzeyleri tarafından düzenlenmesi.	18
Şekil 3.	<i>Scorzonera hieraciifolia</i>	25
Şekil 4.	<i>Scorzonera hieraciifolia</i> akenlerinin çift katlı ıslak filtre kâğıdı arasında petri kaplarındaki görünümü.....	26
Şekil 5.	<i>Scorzonera hieraciifolia</i> akenlerinin magenta içerisinde çimlenme ve sürgün gelişimi	38
Şekil 6.	<i>Eutrema parvulum</i> tohumlarının magenta içerisinde çimlenme ve sürgün gelişimi	38
Şekil 7.	Farklı tuz konsantrasyonları içeren doku kültürü ortamında büyütülen <i>Scorzonera hieraciifolia</i> 'daki morfolojik değişimler.	39
Şekil 8.	Farklı tuz konsantrasyonları içeren doku kültürü ortamında büyütülen <i>Eutrema parvulum</i> 'daki morfolojik değişimler.....	40
Şekil 9.	<i>Scorzonera hieraciifolia</i> ve <i>Eutrema parvulum</i> 'da farklı tuz uygulamalarının nispi su içeriği (%) üzerine etkisi.	41
Şekil 10.	<i>Scorzonera hieraciifolia</i> ve <i>Eutrema parvulum</i> 'da farklı tuz uygulamalarının TBARS içeriği üzerine etkisi.....	42
Şekil 11.	<i>Scorzonera hieraciifolia</i> ve <i>Eutrema parvulum</i> 'da farklı tuz uygulamalarının H ₂ O ₂ içeriği üzerine etkisi.	43
Şekil 12.	<i>S. hieraciifolia</i> 'da farklı tuz uygulamalarının sürgün taze ağırlığı ve kuru ağırlığı üzerine etkisi.	44
Şekil 13.	<i>S. hieraciifolia</i> 'da farklı tuz uygulamalarının klorofil a ve klorofil b içerikleri üzerine etkisi.	45
Şekil 14.	<i>S. hieraciifolia</i> 'da farklı tuz uygulamalarının toplam klorofil ve toplam karotenoid içerikleri üzerine etkisi.	46
Şekil 15.	<i>S. hieraciifolia</i> 'da farklı tuz uygulamalarının sürgün sukkulentlik derecesi ve sürgün kalınlığı üzerine etkisi.....	47
Şekil 16.	<i>S. hieraciifolia</i> 'da farklı tuz uygulamalarının bitki alanı üzerine etkisi.	48
Şekil 17.	<i>S. hieraciifolia</i> 'da farklı tuz uygulamalarının stoma por açıklığı üzerine etkisi.....	48

Şekil 18. <i>S. hieraciifolia</i> 'da farklı tuz uygulamalarının prolin içeriği üzerine etkisi.....	49
Şekil 19. <i>S. hieraciifolia</i> 'da farklı tuz uygulamalarının toplam çözünebilir şeker içeriği üzerine etkisi.....	50
Şekil 20. <i>S. hieraciifolia</i> 'da farklı tuz uygulamalarının Na ⁺ içeriği üzerine etkisi.....	51
Şekil 21. <i>S. hieraciifolia</i> 'da farklı tuz uygulamalarının Cl ⁻ içeriği üzerine etkisi.....	51
Şekil 22. <i>S. hieraciifolia</i> 'da farklı tuz uygulamalarının K ⁺ içeriği üzerine etkisi.....	52
Şekil 23. <i>S. hieraciifolia</i> 'da farklı tuz uygulamalarının Mg ⁺² içeriği üzerine etkisi.	52
Şekil 24. <i>S. hieraciifolia</i> 'da farklı tuz uygulamalarının Ca ⁺² içeriği üzerine etkisi.	53
Şekil 25. <i>S. hieraciifolia</i> 'da farklı tuz uygulamalarının O ₂ ⁻ içeriği üzerine etkisi.....	53
Şekil 26. <i>S. hieraciifolia</i> 'da farklı tuz uygulamalarının dokularda H ₂ O ₂ içeriğinin belirlenmesi.....	54
Şekil 27. <i>S. hieraciifolia</i> 'da farklı tuz uygulamalarının SOD aktivitesi üzerine etkisi.	55
Şekil 28. <i>S. hieraciifolia</i> 'da farklı tuz uygulamalarının CAT aktivitesi üzerine etkisi.	55
Şekil 29. <i>S. hieraciifolia</i> 'da farklı tuz uygulamalarının GPOD aktivitesi üzerine etkisi.	56
Şekil 30. <i>S. hieraciifolia</i> 'da farklı tuz uygulamalarının APX aktivitesi üzerine etkisi.	57
Şekil 31. <i>S. hieraciifolia</i> 'da farklı tuz uygulamalarının GR aktivitesi üzerine etkisi.	57
Şekil 32. <i>S. hieraciifolia</i> 'da farklı tuz uygulamalarının ASC içeriği üzerine etkisi.....	58
Şekil 33. <i>S. hieraciifolia</i> 'da farklı tuz uygulamalarının GSH içeriği üzerine etkisi.	59
Şekil 34. <i>S. hieraciifolia</i> 'da farklı tuz uygulamalarının FeSOD protein sentezi üzerine etkisi.....	59
Şekil 35. <i>S. hieraciifolia</i> 'da farklı tuz uygulamalarının CAT protein miktarı üzerine etkisi.....	60
Şekil 36. <i>S. hieraciifolia</i> 'da farklı tuz uygulamalarının GPX protein sentezi üzerine etkisi.....	60
Şekil 37. <i>S. hieraciifolia</i> 'da farklı tuz uygulamalarının GR protein sentezi üzerine etkisi	61

TABLULAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1. Farklı tuzluluk konsantrasyonlarına bitkilerin cevapları.	7
Tablo 2. <i>Scorzonera hieraciifolia</i> akenlerinin çimlenme ve büyümeleri için geçen süre ve besin ortamının içerikleri	27
Tablo 3. <i>Eutrema parvulum</i> tohumlarının çimlenme ve büyümeleri için geçen süre ve besin ortamının içerikleri	27
Tablo 4. <i>Scorzonera hieraciifolia</i> için tuz konsantrasyonları ve besin ortamının içerikleri.....	28
Tablo 5. <i>Eutrema parvulum</i> için tuz konsantrasyonları ve besin ortamının içerikleri	28

KISALTMALAR DİZİNİ

$^1\text{O}_2$: Singlet oksijen
2-IP	: İzopentil adenin
ASC	: Askorbat
APX	: Askorbat Peroksidaz
Ca^{+2}	: Kalsiyum
CAT	: Katalaz
Cl^-	: Klor
CO_2	: Karbondioksit
DAB	: 3-3'-Diamino benzidin
DHAR	: Dehidroaskorbat
DTT	: Dithiothreitol
EC	: Elektriksel iletkenlik
ETS	: Elektron Taşıma Sistemi
GPOD	: Guaikol Peroksidaz
GPX	: Glutatyon Peroksidaz
GR	: Glutatyon Redüktaz
GSH	: Glutatyon
GST	: Glutatyon S-Transferaz
H_2O_2	: Hidrojen Peroksit
K^+	: Potasyum
KA	: Kuru Ağırlık
Kla	: Klorofil a
Klb	: Klorofil b
MDHAR	: Monodehidroaskorbat Redüktaz
Mg^+	: Magnezyum
MS	: Murashige & Skoog
N	: Azot
Na^+	: Sodyum
NAA	: Naftelen Asetik Asit
NO^{-3}	: Nitrat

NSİ : Nispi Su İçeriği
O₂ : Oksijen
O₂⁻ : Süperoksit radikali
OH⁻ : Hidroksil radikali
P : Fosfor
POX : Peroksidaz
PS I : Fotosistem I
PS II : Fotosistem II
ROT : Reaktif Oksijen Türü
SO₄⁻ : Sülfat
SOD : Süperoksit Dismutaz
TA : Taze Ağırlık
TCA : Trikloroasetik asit

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Kurak ve yarı kurak bölgelerde bitkisel üretimi sınırlandıran en önemli abiyotik stres faktörlerinden biri tuz stresidir. Tuzluluk, özellikle bu bölgelerde toprağın yıkanarak yeraltı suyuyla karışan çözünür tuzların yüksek taban suyu ile birlikte kapilarite oluşturması yolu ile toprak yüzeyine çıkması ve suyun buharlaşması ile toprak yüzeyinde birikmesi şeklinde açıklanır (Sadou vd., 2016). Toprak tuzluluğu dünyada yaklaşık 1,5 milyon ha alanı etkilemektedir ve bu da ekilebilir alanların yaklaşık %20'sini kapsamaktadır. (Miransari, 2016). Toprak tuzluluğuna yol açan bileşikler klorürler (NaCl, CaCl₂, MgCl₂), sülfatlar (Na₂SO₄, MgSO₄), nitratlar (Na₂NO₃, KNO₃), karbonatlar, bikarbonatlar (CaCO₃, Na₂CO₃, NaHCO₃) ve boratlardır. Bunların içinde sodyum klorür (NaCl) doğada en çok bulunan tuz formudur (Munns ve Termaat, 1986).

Bitkilerde tuz stresi, hücre seviyesinde iyonik ve ozmotik dengeyi etkiler ve sonuç olarak iyon toksisitesi ve ozmotik stres meydana gelir. Toprakta tuz miktarının artması sonucunda bitki hücrelerinde ozmotik basınç artar ve su potansiyeli düşer. Böylece kökler suyu alamaz ve aynı zamanda kuraklık stresi de meydana gelir. Ozmotik stresin devamında meydana gelen iyonik stres sırasında, ortamda artan sodyum (Na⁺) ve klor (Cl⁻) iyonları, potasyum (K⁺), kalsiyum (Ca²⁺) ve nitrat (NO⁻³) gibi bitki için gerekli olan iyonlar ile rekabete girer. Böylece bitkilerde besin eksikliği veya besin dengesizliği meydana gelir (Hu ve Schmidhalter, 2005). Tuzluluk bitkiler üzerinde doğrudan etkisini ozmotik stres ve iyon stresi, dolaylı etkisini (sekonder etki) ise bu stres faktörlerinin sonucunda meydana gelen çeşitli olaylarla gösterir. Tuzun neden olduğu başlıca sekonder etkiler; reaktif oksijen türlerinin (ROT) sentezi, fotoinhibisyon ve senesens olarak sayılabilir (Hong vd., 2009).

Bitkiler tuz stresinin etkilerine karşı iki farklı direnç mekanizması geliştirmişlerdir (Levitt, 1980). Bir bitkide tuzdan sakınım (kaçınma) veya tuza tolerans (kabullenme) mekanizmalarından biri iyi gelişmişse genotipik olarak bu bitki tuza dayanıklıdır. Sakınma mekanizması sahip bitkiler; tuzun kökler tarafından alınmaması, alınan tuzun köklere geri gönderilmesi, tuzun eliminasyon yoluyla uzaklaştırılması (yaşlı yaprakların dökülmesi, tuz bezleri ve tuz cepleri gibi özelleşmiş yapılar), bitki dokularının su tutma kapasitesini artırması ya da tuzun yeniden dağılımı gibi farklı stratejiler geliştirirler. Kabullenme mekanizmasına

sahip olan bitkilerin dokuları ise Na^+ ve Cl^- 'e karşı toleranslıdır. Tuza toleranslı olan bitkiler yani halofitlerin çoğu tuz biriktiricidir ve dokudaki yüksek tuz miktarına karşı kendilerini koruyabilmektedirler (Flowers vd., 1986). Bitkilerin tuzluluk toleransı, hücreler, organlar ve tüm bitki seviyesindeki adaptasyonu içeren karmaşık bir özelliktir. Bitkinin tuzluluk stresine toleransı bir dizi fizyolojik, metabolik ve moleküler mekanizmayı içerir. Halofitler tarafından benimsenen fizyolojik ve moleküler seviyedeki stratejiler; stres sinyali iletimi, transkripsiyon faktörlerinin düzenlenmesi, tuz stresinde rol oynayan genlerin aktivasyonu ve ekspresyonu, fotosentez ve transpirasyon hızındaki değişiklikler, Na^+ 'nın hücre dışı veya vakuole bölümlendirilmesi, stoma açıklığı ve stoma yoğunluğunun düzenlenmesi, fitohormonların sentezi ve birikimi, ozmotik düzenleyicilerin sentezi ve antioksidan sistemlerin uyarılmasını kapsamaktadır (Parida ve Das, 2005; Xu vd., 2016). Tuza tolerans bitkilerde iyonik ve ozmotik dengenin düzenlenmesi ile ilişkilidir (Ashraf ve Harris, 2004). Bitkide sentezlenen ozmotik düzenleyiciler su alımını ve hücre turgorunu koruyarak ozmotik ayarlama yaparlar ve böylece fizyolojik metabolizmanın zarar görmemesini sağlarlar (Han vd., 2014). Ozmotik ayarlamının yanı sıra, tuzluluk toleransının temel faktörü, hücre içi iyon homeostazının kontrolüdür (Niu vd., 1993). Bitkilerde iyon taşınımı, tuzluluk toleransını belirleyen önemli bir başlangıç noktasıdır ve kök hücrelerinin plazma zarları boyunca ve vakuolar membranlar boyunca anyon ve katyon taşınımını, ksilem ve floem yoluyla uzun süreli iyonların taşınımı ve özel hücreler tarafından tuzun atılımı ve birikimini içerir (Volkov ve Beilby, 2017). Ayrıca tuz stresi diğer abiyotik stresler gibi ROT'ların artması sonucunda oluşan oksidatif strese sebep olur. ROT kaynaklı oksidatif hasarı önlemek için bitkiler, enzimatik olmayan antioksidanların (askorbat, glutatyon vb.) yanında, süperoksit dismütaz (SOD), katalaz (CAT), askorbat peroksidaz (APX), glutatyon peroksidaz (GPX) ve glutatyon redüktaz (GR) gibi antioksidan enzimlere sahiptirler (Blokhina vd., 2003). Antioksidan sistemi etkinleştirebilen ve çeşitli tolerans stratejilerine sahip olan bitkiler tuz stresi koşullarında uzun süre hayatta kalabilirler.

Tarımı yapılan bölgelerin gelecekteki üretkenliğini devam ettirmek ve tuzluluk sorunu olan toprakların kullanılması için alternatif yollardan biri tuza toleranslı ve aynı zamanda ekonomik ürün verebilen bitki türlerinin belirlenerek bu alanlarda yetiştirilmesini sağlamaktır (Ashraf vd., 1986). Tuza toleranslı bitkilerin başarılı seçimi için ise tuza dayanıklı bitkilerin karakterize edilmesine ihtiyaç vardır. Bunun için halofitlerin genetik özelliklerinin ve tuzluluğa karşı oluşturdukları adaptasyon mekanizmalarının iyi anlaşılması gerekmektedir. Bitkilerde meydana gelen ürün kayıplarını en aza indirebilmek için diğer bir

alternatif yol da tuza toleranslı türler geliştirmektir. Bunun için de ilgili gen kaynakları korunmalı ve bitkilerde tuza tolerans mekanizmaları aydınlatılmalıdır (Lovelli vd., 2012). Bu nedenle halofitlerin tuza tolerans mekanizmaları üzerine yapılan çalışmaların sonuçları, tuza toleranslı bitkilerin yetiştirilmesi konusunda yapılan biyoteknolojik çalışmalar için oldukça önemlidir.

Halofitlerdeki tuzluluk tolerans mekanizmaları son on yılda kapsamlı olarak incelenmiştir (Shabala ve Mackay, 2011; Rozema ve Schat, 2013; Bose vd., 2014; Shabala, vd., 2014; Flowers ve Colmer, 2015; Özfıdan-Konakçı vd., 2016; Dassanayake ve Larkin, 2017; Mishra ve Tanna, 2017). Yukarıda ifade edildiği gibi, bazı halofitler (örneğin *Suaeda* ve *Arthrocnemum* cinsine ait türler) tuz stresi koşullarında hayatlarını sürdürebilmek için sukkulentlik gibi sakınma stratejisi geliştirmişlerdir. Sukkulentlik terleme oranını azaltarak suyu korumayı amaçlayan önemli bir strateji olarak kabul edilir ve hücrelerde toksik iyon konsantrasyonu üzerine seyreltici etki yaparak, tuzun etkilerini bitkilerin büyük miktarda tolere etmesini sağlar (Hajibagheri vd., 1984). Yüksek tuz koşullarında hayatını sürdürebilen bitkiler ise ekstrem halofit olarak adlandırılır. Ekstrem halofitlerin tolerans mekanizmasını aydınlatmaya yönelik literatürde bazı çalışmalar yapılmıştır. Örneğin Orsini vd., (2010) yüksek tuz derişiminde büyütülen (600 mM NaCl) *Eutrema parvulum*'un (syn. *Thellungiella parvula*) ekstrem halofit bir bitki olduğunu, Uzilday vd. (2014) ise *Eutrema parvulum*'un 300 mM tuz konsantrasyonunu tolere ettiğini, ozmotik ayarlama sağlayarak iyon homeostazını düzenlediğini ve antioksidan sistemi uyararak bitki kloroplastında aşırı tuz hasarlarını giderebildiğini rapor etmişlerdir. Başka bir çalışmada ise, ekstrem tuz koşullarına adapte olan sukkulent halofit *Salicornia europea*'nın (Amaranthaceae) vermikülit içeren ortamda 200 mM tuz koşullarında optimum büyüme gösterdiği ve 1000 mM tuz seviyesinden daha fazla tuz koşullarında hayatta kalabildiği gösterilmiştir (Flowers ve Colmer, 2008).

Bugüne kadar tuz koşullarında sukkulent halofit bitkilerle ilgili fizyolojik ve biyokimyasal bazı çalışmalar yapılmıştır. Örneğin, Naidoo ve Rughunanan (1990) gövdesi sukkulent halofit *Sarcoconia natalensis* bitkisinde farklı tuz konsantrasyonlarının (0-500 mM NaCl) bazı bitki büyüme parametreleri ve iyon içeriği üzerine etkisini araştırmıştır. Gövdesi sukkulent halofit *Suaeda fruticosa* (L.) ve *Arthrocnemum macrostachyum* bitkileri kumlu ortamda Hoagland besin solüsyonu içeren farklı tuz koşullarında büyütülmüş (200-1000 mM NaCl), tuz stresinin bitki taze ağırlığı, kuru ağırlığı ve iyon içeriği üzerine etkisi araştırılmıştır (Khan vd., 2000; Khan vd., 2005). Youssef (2009) yaptığı bir çalışmada, Suudi

Arabistan ve Mısır'da sukkulent halofit *Halecnemum strobilaceum*, *Arthrocnemum macrostachyum*, *Halopeplis perfoliata*, *Suaeda vermiculata* ve *Seidlitzia rosmarinus*'da fotosentetik pigment, bazı organik ozmolitler, iyon içerikleri ve antioksidan enzim aktivitelerinin tuza toleransındaki rollerini aydınlatmaya çalışmıştır. Zeng vd. (2018) ise yaprakları sukkulent halofit *Carpobrotus rossi* bitkisinde tuz stresi altında mezofil ve sünger parankimalarında antioksidan enzim aktivitesi, iyon ve bazı fenolik bileşiklerin içeriklerini araştırmışlardır.

Bu teze konu olan *Scorzonera hieraciifolia*'da yapılan arazi çalışmalarında *S. hieraciifolia* yapraklarında sukkulentlik gözlenmiştir. Literatürde, Türkiye'ye ait *Scorzonera* türlerinin çoğunun birçok araştırmacı tarafından taksonomik, anatomik ve biyokimyasal açısından incelendiği görülmüştür. Örneğin, Coşkunçelebi vd. (2012) yaptıkları bir çalışmada, *Scorzonera pisida* ve *Scorzonera zorkunensis*'in taksonomik durumlarını karşılaştırmışlardır. Makbul vd. (2016) ise *Scorzonera* cinsine ait çeşitli türlerin yaprak, sürgün, kök morfolojisi ve anatomisindeki farklılıkları ayrıntılı olarak incelemiştir. Erden vd. (2013) yaptıkları çalışmada, bazı *Scorzonera* (*S. suberosa*, *S. lacinata* ve *S. latifolia*) türlerinin antioksidan aktivitesi ve fitokimyasal yapısını incelemiştir. Sarı vd. (2007), *Scorzonera* cinsinde dihidrosikumarinler, lignanlar, fenolik asitler, sesquiterpen, sesquiterpen laktonlar, triterpenler ve bibenzil türevlerinin varlığını belirlemiştir.

Türkiye'de *Scorzonera* türlerinde yukarıda ifade edilen bazı biyokimyasal çalışmalar yapılmasına rağmen, *Scorzonera hieraciifolia* ile ilgili fizyolojik ve biyokimyasal çalışmalar oldukça sınırlıdır. Yapılan bir tez çalışmasında, *Scorzonera hieraciifolia*'nın da aralarında bulunduğu Tuz Gölü ve çevresinde yetişen 30 endemik halofit bitkinin, fotosentetik pigment içeriği, organik bileşikleri (glukoz, fruktoz, prolin, glisinbetain, kolin-O-sülfat, kolin ve β -alaninbetain), çözünebilir anyon (HCO_3^- , Cl^- , SO_4^{2-}) ve katyon (Na^+ , K^+ , Ca^{+2} , Mg^{+2}) miktarları incelenmiştir (Baysal-Furtana, 2010). Mevcut çalışmada arazi koşullarında sukkulentlik gözlenen endemik halofit *Scorzonera hieraciifolia*'nın ekstrem halofit olup olmadığı ve hangi mekanizmaları uyararak tuza tolerans sağladığı üzerine yapılan bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır.

Tuz stresi altında sukkulent halofitler üzerine bazı çalışmalar yapılmış ve bazı bitki büyüme parametreleri, fotosentetik pigment içerikleri (Youssef, 2009) ve iyon içeriğindeki değişimler araştırılmıştır (Khan vd., 2000; Khan vd., 2005). Zeng vd. (2018) ise sukkulent halofit *Carpobrotus rossi* bitkisinde antioksidan enzim aktivitelerindeki değişimi araştırmıştır. Bununla beraber, sukkulent halofitlerin tuza tolerans mekanizmasının

anatomik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler seviyede detaylı olarak araştırıldığı ve ekstrem halofitlerle karşılaştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ayrıca, sukkulent halofitlerin toprakta veya vermikülit içeren ortamlarda ne kadar yüksek tuz konsantrasyonunda canlılığını devam ettirebildiğinin belirlenmesi üzerine bazı çalışmalar yapılmasına rağmen (Naidoo vd., 1990; Khan vd., 2000; Khan vd., 2005; Zeng vd., 2018) doku kültüründe yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır. Örneğin, Cherian ve Reddy (2003), yaprakları sukkulent halofit *Suaeda nudiflora*'nın kallus kültüründe 0-200 mM tuz uygulayarak bitki taze ağırlığı, kuru ağırlığı, prolin ve su içeriği, Na^+ , K^+ , Ca^{+2} içerikleri, Na^+/K^+ oranı, SOD, CAT ve POX aktivitelerindeki değişimleri belirleyerek bitkinin tuza toleransını aydınlatmaya çalışmıştır. Aghaleh vd. (2009) gövdesi sukkulent halofit *Salicornia persica* ve *Salicornia europaea* bitkilerini doku kültüründe 0-600 mM olmak üzere farklı tuz konsantrasyonlarına maruz bırakarak büyüme, su durumu, protein ve prolin içeriği, membran hasarı ile fotosentetik pigmentler üzerine tuzun etkisini araştırmıştır.

Bu çalışmada, halofit *Scorzonera hieraciifolia*'nın ekstrem halofit bir bitki olma özelliğini belirlemek için doku kültüründe büyütülen bitkiler ekstrem bir halofit ve model bir olan bitki *Eutrema parvulum* ile karşılaştırılmış ve *Scorzonera hieraciifolia*'nın tuza tolerans mekanizması fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler seviyede ayrıntılı olarak ortaya konulması amaçlanmıştır. Bu çalışmada doğal habitatında sukkulentlik gözlenen *Scorzonera hieraciifolia*'nın sukkulent ekstrem halofit bir bitki olabileceği hipotezi düşünülmüştür. Bu hipotezi test etmek için farklı tuz konsantrasyonlarına maruz bırakılarak doku kültüründe büyütülmüş *Scorzonera hieraciifolia* ve *Eutrema parvulum* sürgünlerinde morfolojik değişimler ile nispi su içeriği, lipid peroksidasyonu ve H_2O_2 olmak üzere bazı temel stres parametrelerinin analizleri gerçekleştirilmiştir. *Scorzonera hieraciifolia*'nın yüksek tuza tolerans gösterebildiğini belirlemek için, *S. hieraciifolia*'da yukarıdaki stres parametrelerine ek olarak sürgün taze ağırlığı, kuru ağırlığı ve fotosentetik pigment (klorofil a, b, toplam klorofil ve karotenoid) içeriğindeki değişimler de belirlenmiştir. Mevcut çalışmada ikinci bir hipotez olarak *Scorzonera hieraciifolia*'nın yüksek tuza toleransında ozmolit ve iyon dengesini (homeostaz) sağlayarak suyu etkin bir şekilde alabildiği, böylece sukkulentliği arttırdığı ve yüksek tuza tolerans sağlayabildiği düşünülmüştür. Bu hipotezi test etmek için sukkulentlik derecesi, yaprak kalınlığı, yaprak alanı, stoma por açıklığı, prolin ve toplam çözünebilir şekerler gibi ozmolitler ve Na^+ , Cl^- , K^+ , Ca^{+2} ve Mg^{+2} iyon içerikleri belirlenmiştir. Üçüncü bir hipotez olarak ise *S. hieraciifolia*'nın antioksidan sistemi uyararak yüksek tuza tolerans gösterebildiği düşünülmüştür. Bu hipotezi test etmek için süperoksit

(O₂⁻) ve hidrojen peroksit (DAB boyaması) gibi ROT'ların içeriği, SOD, CAT, GPOD, APX ve GR aktiviteleri, ASC ve GSH gibi enzimatik olmayan antioksidanların miktarlarındaki değişimler belirlenmiştir. Ayrıca SOD, CAT, GPX ve GR gibi antioksidan enzimlerin protein içerikleri western blot yöntemi ile moleküler seviyede incelenmiştir.

1.2. Stresin Tanımı

Bitkilerde “stres”, bitki büyümesini, üretkenliğini, üreme kapasitesini veya hayatta kalmasını olumsuz yönden etkileyen herhangi bir dış faktör olarak tanımlanır. Daha geniş bir ifadeyle stres, fotosentezi ve bir bitkinin enerjisini biyokütleyle dönüştürme yeteneğini sınırlayan biyotik (virüs, bakteri, fungusları, herbivorlar vb.) veya abiyotik (tuzluluk, ısı, su gibi) kısıtlamalar olarak da tanımlanabilir (Suzuki vd., 2014).

Birçok durumda, bitkilerde verimin azalmasının abiyotik streslerden kaynaklandığı düşünülür. Yüksek tuzluluk, kuraklık, soğuk ve sıcak gibi önemli abiyotik stresler, temel gıda maddesi olan ekinlerin hayatta kalma oranını, biyokütle üretimi ve verimini olumsuz yönde etkiler. Diğer yandan, Dünya tarımı artmakta olan nüfus için %70'den daha fazla gıda üretmek gibi birçok zorlukla karşı karşıyadır ve mahsullerin verimliliği gıda talebine paralel olarak artırılmalıdır (Ahmad vd., 2012).

1.3. Tuz Stresi ve Toprak Tuzluluğu

Tuz stresi, dünyadaki verimli tarım arazilerini tehlikeye sokarak, artan insan nüfusu ile birlikte besin verimini önemli ölçüde sınırlayan çevresel faktörlerden biridir (Botella vd., 2005). Tuzluluk oluşma nedenlerine göre, primer ve sekonder tuzluluk olarak ikiye ayrılır. Primer tuzluluk, ana kayaların ayrışması, tuz deposu okyanuslar ve iklimsel etmenler ile oluşmaktadır (Munns ve Tester, 2008). Sekonder tuzluluk ise, tarımsal alanlarda yoğun sulama ile çeşitli tuzlar bakımından zengin yer altı suyu seviyesinin toprak yüzeyine kadar yükselmesi, aşırı otlama, bir bölgenin doğal vejetasyonu yok edilerek tarım arazilerinin açılması ve toprakların tuzluluğa sebep olan kimyasallarla kontaminasyonu olarak sıralanabilir (Pessarakli ve Szabolcs, 1999).

Toprak tuzluluğu, sulama koşullarında tarım için büyük bir problemdir. Dünyanın sıcak ve kurak bölgelerinde düşük tarımsal potansiyel ile birlikte toprak sık sık tuzluluğa

maruz kalmaktadır. Bu alanlarda birçok ekin sulama altında büyütülür ve bu durum problemi daha da kötüleştirir. Dünya genelinde ise ekinlerin tarımsal verimliliğini ve kalitesini sınırlayan en ciddi çevresel faktörlerden biridir (Flowers vd., 2010). Bitki büyümesini tuzdan daha fazla kısıtlayan başka bir toksik madde bilinmemektedir (Xiong ve Zhu, 2002). Tarlada toprak tuzluluğu ya da sulama suyunun tuzluluğu, elektriksel iletkenlik ya da ozmotik potansiyel ile belirlenebilir. Suda tuz konsantrasyonunun artması, elektriksel iletkenliği (desi Siemens/m; Ds/m, mili Siemens/cm; mS/cm) artırarak, ozmotik potansiyeli düşürür. Bu durum bitkinin su absorpsiyonunu riske atarak bitkide fizyolojik kuraklık meydana getirir (Taiz ve Zeiger, 2008). Tuzlu topraklar, toprak ekstraktının 25 °C'de 4 dS/m'den daha fazla doygunluktaki elektrik iletkenliğine (EC) sahip olanlardır. Bu değer yaklaşık 40 mM NaCl'ye karşılık gelir ve yaklaşık 0,2 MPa'lık bir ozmotik basınç üretir (Munns ve Tester, 2008). EC değeri 4'ün üzerinde olan topraklarda büyüyen mahsullerin verimi önemli ölçüde azalır. Bu birime göre aşağıdaki tabloda farklı tuz konsantrasyonlarına karşı bitkilerin cevapları özetlenmiştir (Tablo 1).

Tablo 1. Farklı tuzluluk konsantrasyonlarına bitkilerin cevapları (Tüzüner, 1990).

Tuzluluk (EC) dS/m 25 °C	Bitkilerin Cevabı
0-2	Tuz stresi genellikle tolere edilebilir
2-4	Çok duyarlı türler etkilenebilir
4-8	Birçok bitkide gelişim sınırlanır
8-16	Sadece tuza toleranslı bitkiler yetişir
16 üzeri	Tuza çok toleranslı çok az sayıda bitki yetişir

1.4. Tuz Stresinin Bitkiler Üzerindeki Etkileri

Tuz stresinin bitkiler üzerine etkisi, bitkinin türüne, bitkiye uygulanan tuz çeşidine, tuz miktarına ve tuza maruz kalma süresine göre değişebilmektedir. Tuzluluk, birçok ürünün verimini azaltmakla kalmaz hem toprağın fizikokimyasal özelliklerini hem de alanın ekolojik dengesini etkiler. Genel olarak tuzluluk, tarımsal verimi, ekonomik getiriye düşürür ve toprak erozyonlarına neden olur (Hu ve Schmidhalter, 2002). Bitkideki tuzluluk ise, tohum çimlenmesi, bitki büyümesi, su ve besin alınımı gibi morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal etkileşimlerin kompleks bir sonucudur (Akbarimoghaddam vd., 2011).

Özellikle kurak ve yarı kurak bölgelerde tuzluluk bitki gelişimini ve metabolizmasını olumsuz yönde etkileyerek genel olarak yavaş kök ve sürgün büyümesine, verim kaybı yaşanmasına ve sıklıkla bitkinin ölümüne yol açar (Munns, 1993). Bitki büyümesinin olumsuz etkilenmesi, tuzun bitki içindeki toksik etkisinden kaynaklanmaktadır. Bitkinin aldığı tuz, transpirasyon ile yapraklara taşınır, yaşlı yapraklarda yoğunlaşır ve böylece çok yüksek Na^+ ve Cl^- konsantrasyonuna neden olur ve yapraklar canlılığını kaybeder. Zararın nedeni muhtemelen hücrelerin vakuol içindeki tuzları depolayabilmesini aşan tuz yüküdür. Tuzlar daha sonra sitoplazmada hızla birikir ve enzim aktivitesini inhibe eder.

Tuzun etkisiyle bitkilerde meydana gelen değişiklikler, iyon toksisitesi (tuz stresi), ozmotik stres, besin maddesi (N, Ca, K, P, Fe, Zn) eksikliği ve oksidatif stresi içeren bitki fizyolojisi üzerine zararlı etkilerinin sonucudur (Xiong ve Zhu, 2002; Ashraf, 2004; Munns ve Tester, 2008). Özellikle bitkilerde tuzluluk primer etkisini ozmotik ve iyon stresi oluşturarak gösterirken, sekonder etkisini ise bu stres faktörlerinin bir sonucu olarak bitkide meydana gelen yapısal bozulmalar ve toksik bileşiklerin sentezlenmesi ile gösterir. Tuzluluğun sebep olduğu başlıca sekonder etkiler DNA, protein, klorofil ve zar fonksiyonuna zarar veren ROT'ların sentezi; fotosentezin inhibisyonu, K^+ alınımının engellenmesi olarak sayılabilir (Botella vd., 2005; Hong vd., 2009). Tuzluluk aynı zamanda asıl olarak yaprak alanını, klorofil içeriğini, stoma iletkenliğini, fotosistem II verimliliğini ve fotosentezi etkiler (Netondo vd., 2004). Sonuç olarak tuzluluk fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler seviyede bitki büyümesi üzerine çeşitli etkilere neden olur (Tester ve Davenport, 2003).

1.4.1. Ozmotik Potansiyel Üzerine Etkisi

Toprak çözeltisinde aşırı miktarda bulunan çözünebilir tuzlar nedeniyle bitkiler sudan yeterince yararlanamamaktadır. Böyle bir durumda bitkinin sahip olduğu su potansiyeli azalır. Bitkide turgor potansiyelinin devamı, çözünen madde içeriğinin artması ve eş zamanlı olarak ozmotik potansiyelin azalması ile dengelenebilmektedir. Tuzluluktaki artış, bitkilerin su ve ozmotik potansiyelini daha da negatif hale getirmektedir (Mugdall vd., 2010). Kök rizosferinde çözülmüş maddelerden kaynaklanan düşük ozmotik potansiyel toprağın su potansiyelini düşürmekte ve bitkilerin genel su durumunu değiştirmektedir. Topraktaki su kaybıyla bitkide su alınımı azalmaktadır, bunun sonucunda su potansiyeli daha da düşmektedir (Bressan, 2008).

1.4.2. İyon İçeriği Üzerine Etkisi

Sodyum (Na^+), klor (Cl^-) ve sülfat (SO_4^{2-}) gibi iyonların konsantrasyonlarındaki aşırı artışa spesifik iyon toksisitesi adı verilmektedir. Toprakta aşırı çözünür tuzların varlığı bitkiler için esas olan mineral besinlerin alımı ve metabolizması ile rekabet eder. Uygun iyon oranları, bir bitkinin büyümesi ve gelişmesi ile ilgili fizyolojik cevaplara aracıdır (Wang vd., 2003). Artan tuz alımı, P, K^+ , N ve Ca^{+2} gibi temel besin maddelerinin alınımını azaltır (Zhu, 2001), yüksek Na^+ , Cl^- veya SO_4^{2-} gibi spesifik iyon toksisitelerini uyarır. Özellikle bitki büyüme ve gelişmesi için önemli bir element olan Ca^{+2} alınımı sınırlandırıldığında, Na^+ hücre zarında Ca^{+2} ile yer değiştirerek zarın apoplast kısmında $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ oranının artmasına sebep olur. Bunun sonucunda zar yapısında bozulmalar meydana gelir ve hücrenin Ca^{+2} dengesi olumsuz şekilde etkilenir (Çulha ve Çakırlar, 2011). Tuzluluğa maruz kalan *Vicia faba*'da Na^+ içeriği artarken, K^+/Na^+ oranı düşmüştür, böylece tuz koşulları altında bu durum Na^+ ve K^+ arasında negatif bir ilişki olduğunu göstermektedir (Gadallah, 1999). Ek olarak, Na^+ 'nın zararlı etkilerinin çoğu, membranların yapısal ve fonksiyonel bütünlüğü ile ilişkili olduğu görülmektedir (Kurth vd., 1986). Yüksek tuzlulukta büyütülmüş *Atriplex griffithii* bitkilerinin, Ca^{+2} içeriği yapraklarında ve sürgünlerinde azalmıştır ve K^+ içeriği, özellikle artan tuzluluk seviyeleri ile yapraklarda azaltılmıştır. Ayrıca tuz stresli buğday fidelerinde Ca^{+2} içeriği ve K^+/Na^+ oranının kontrol grubuna göre azaldığı, Na^+ içeriğinin arttığı rapor edilmiştir (Görçek ve Erdal, 2014).

1.4.3. Reaktif Oksijen Türleri Üzerine Etkisi

Bitkilerde ve tüm aerobik organizmalarda atmosferdeki O_2 seviyesi oldukça önemlidir. O_2 normal şartlarda bitki büyümesi ve gelişimi için gereklidir, ancak O_2 miktarı aşırı olduğu durumlarda bitkinin ölümü ile sonuçlanacak hücresel düzeyde hasarlar meydana gelir. Hücresel metabolizmada, ROT'lar sürekli olarak üretilir ve bitki hücreleri antioksidan ve çeşitli koruma sistemleri sayesinde ROT seviyesini normalde düşük tutmaktadırlar. Fakat biyotik ve abiyotik stres altında bitkilerde antioksidan sistemlerin etkinliği, üretilen ROT seviyesini dengeleyemezse bu durumda ROT'ların sentezi ve birikimi uyarılmış olur (Breusegem vd., 2001).

ROT'lar, esas olarak süperoksit (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikalleri (OH^\cdot) ve singlet oksijen (1O_2)'den oluşur (Foyer ve Noctor, 2005). Ozmotik etkiler sonucunda su eksikliği oluşmakta ve su eksikliği, O_2^- , H_2O_2 , OH^\cdot ve 1O_2 gibi çeşitli ROT'ların oluşumuna neden olmaktadır (Parida ve Das, 2005). Aşırı miktarda ROT üretimi hücrel redoksta dengesizlik oluşturması nedeniyle son derecede toksiktir ve oksidasyon ile lipidlere, proteinlere ve nükleik asitlere zarar verebilir (Halliwell ve Guteridge, 1985). ROT oluşumu ayrıca Na^+ ve Cl^- iyonlarının birikimi nedeniyle meydana gelen iyon toksisitesinden de kaynaklanır. Bu durum plazma membranının redoks durumunu ve bitki hücrelerinin mitokondri ve kloroplastları gibi farklı bölümlerini bozmaktadır.

ROT'lar kloroplast ve mitokondri gibi hücrel organellerde aşırı elektron taşınması neticesinde birçok yerde meydana gelebilmektedir. Fotosistem I (PSI) ve Fotosistem II (PSII) reaksiyon merkezleri, kloroplastik ROT üretiminin ana yerleridir (Asada, 2006). Bunun dışında yapraklardaki mitokondriyal ROT düzeyi kloroplast ve peroksizomlardan oldukça düşüktür. (Foyer ve Noctor, 2003).

Stres koşullarında bitkilerde redoks homeostazı, süperoksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APX), guaiakol peroksidaz (GPOD), glutatyon S-transferaz (GST), ve katalaz (CAT) gibi enzimatik bileşenler ile askorbat (ASC), glutatyon (GSH), α -tokoferol, karotenoidler, fenolikler ve flavonoidler gibi enzimatik olmayan düşük molekül ağırlıklı bileşikler olmak üzere antioksidan sistemde iki kol tarafından sağlanır (Miller vd., 2010; Gill vd., 2011). Antioksidan sistemin her iki kolunun her yerde mevcut olması hücrel yaşam için ROT detoksifikasyonunun gerekliliğinin temelini oluşturur (Gill vd., 2011).

1.5. Reaktif Oksijen Türleri

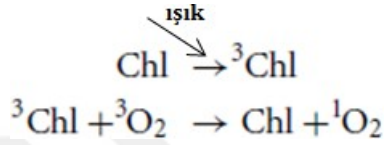
1.5.1. Süperoksit Radikali

O_2 'nin kısmi indirgenmesi ya da enerjinin O_2 'ye aktarılmasından dolayı ROT'lar sürekli olarak kloroplastlarda üretilmektedir. Süperoksit radikali (O_2^-) diğer hücrel bölümlerin yanı sıra esas olarak elektron taşıma zinciri (ETS) sırasında tilakoid zara yerleşmiş PSI'de oluşur. Normalde sitokrom c oksidaz O_2 ile etkileşime girdiğinde H_2O üretilir. Bazen O_2 farklı ETS elemanlarıyla etkileşime girerek O_2^- radikalinin oluşumuna neden olur. O_2^- radikali ROT ailesinin diğer üyelerini oluşturmak için başka reaksiyonlara da girebilir. Kısa yarı ömürle (2-4 μs) orta dereceli reaktif olan O_2^- radikali tek başına geniş

çaplı bir hasar meydana getirmez. Bunun yerine H₂O₂ ve daha reaktif ve toksik olan ¹O₂ dönüşür ve böylece membran lipid peroksidasyonuna neden olur (Halliwell, 2006).

1.5.2. Singlet Oksijen

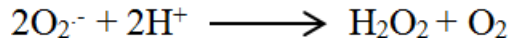
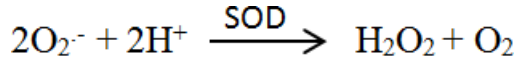
Singlet oksijen (¹O₂), O₂'ye elektron transferi ile değil anten sisteminde O₂ ile birlikte klorofilin üçlü (triplet) halinin tepkimesi tarafından oluşan bir ROT'tur.



Tuzluluk, kuraklık ve ağır metaller gibi çevresel baskılar, hücre içi karbondioksit (CO₂) konsantrasyonunun yetersiz olmasına yol açarak stoma kapanmasına neden olur. Bu durum ¹O₂ oluşumunu kolaylaştırır. ¹O₂ her iki fotosistemde hem PSI hem de PSII'de ciddi hasarlar meydana getirebilir ve böylece tüm fotosentetik sistemi tehlikeye sokabilir. Bununla birlikte proteinlere, pigmentlere, nükleik asitlere ve lipitlere zarar verebilir. Özellikle hücre ölümüne neden olan ışığın indüklediği PSII aktivitesi kaybından sorumlu ana ROT'tur. Bitkiler β-karoten, tokoferol, plastokinon yardımı ile etkili bir şekilde ¹O₂'yi temizlemeyi başarabilirler. Alternatif olarak, ¹O₂ foto-oksidatif strese karşı koruma sağlamaktan sorumlu olan genlerin düzenlenmesinde rol oynamaktadır (Krieger-Liszkay vd., 2008).

1.5.3. Hidrojen Peroksit

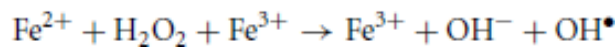
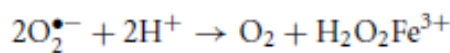
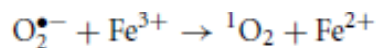
Hidrojen peroksit (H₂O₂), O₂⁻ radikalinin tek değerlikli indirgenmesi ya da proton eklenmesiyle oluşur. Düşük pH'da enzimatik olmayan bir şekilde ya da çoğunlukla SOD tarafından katalize edilen bir reaksiyonla oluşabilir. H₂O₂, bitki hücrelerinde sadece normal koşullarda değil aynı zamanda kuraklık, don, yoğun ışık, UV radyasyon, yaralanma ve patojen enfeksiyonu gibi faktörlerin neden olduğu oksidatif stres tarafından da üretilir (Sharma vd., 2012).



Bitki hücrelerinde başlıca H_2O_2 üretim yerleri; kloroplasttaki ETS, mitokondri, endoplazmik retikulum, hücre zarı ve peroksizomlardır. H_2O_2 içeriği düşük konsantrasyonlarda bitkiye yararlı olurken, yüksek konsantrasyonlarda zararlıdır. Düşük hücre içi konsantrasyonlarda, yaşlanma (Peng vd., 2005), fotorespirasyon, fotosentez (Noctor vd., 2002), stoma hareketi (Bright vd., 2006), büyüme ve gelişme (Tanou vd., 2009) gibi temel fizyolojik olaylar için bir sinyal düzenleyicisi olarak rol oynar. Aquaporinler aracılığıyla membranlardan geçebilir ve oksidatif hasara neden olabilir (Bienert vd., 2007). Hücre içi yüksek konsantrasyonda H_2O_2 hem sistein hemde metiyonin (-SCH₃) kalıntılarını okside eder ve tiyol gruplarını okside ederek Cu/Zn-SOD ve Fe-SOD enzimlerini inaktif hale getirir (Halliwell, 2006). Düşük konsantrasyonda H_2O_2 , fruktoz 1,6 bifosfataz, sedoheptuloz 1,7 bifosfataz ve fosforibulokinaz gibi farklı enzimlerin aktivitelerinde %50 oranında kayıp olmasına neden olur ve ayrıca yüksek hücrel konsantrasyonlarda programlanmış hücre ölümünden de sorumludur. Bununla birlikte O_2^- radikali gibi H_2O_2 orta derecede reaktiftir; H_2O_2 'in tamamen zararlı olması ancak daha reaktif bir türe dönüştüğünde gerçekleşir (Das ve Roychoudhury, 2014).

1.5.4. Hidroksil Radikali

Hidroksil radikali ($\text{OH}\cdot$), ROT'lar arasında bilinen en reaktif ve toksik olanıdır. Demir (Fe^{+2} , Fe^{+3}) gibi geçiş metalleri tarafından katalize edilen H_2O_2 ve O_2^- arasındaki Fenton reaksiyonu ile nötr pH'da üretilir.



Lipid peroksidasyonu, protein hasarı ve membran tahribatı gibi farklı hücrenel bileşenlere zarar verme kabiliyetine sahiptir. Bu toksik radikalin temizlenmesi için hiçbir enzimatik sistem bulunmadığından, fazla miktarda OH[•] birikimi bitkide hücre ölümüne yol açar (Pinto vd., 2003).

1.6. Halofit Bitkiler

Bitkiler, yüksek tuzlu ortamda yetiştirme kabiliyetlerine bağlı olarak glikofitler (yüksek tuzdan zarar gören bitkiler) ve halofitler (tuzcul ortamlarda yaşayabilen bitkiler) olarak iki sınıfa ayrılmıştır. Glikofitler, topraktaki yüksek tuz birikimini tolere edemeyen ve böyle alanlarda büyüemeyen bitkilerdir (Parvaiz ve Satyawati, 2008). Halofitler ise yüksek turgor potansiyeline sahip olan, yüksek tuz koşullarına adapte olmuş ve bu koşullarda yaşamını sürdürebilen bitkilerdir ve tuz stresine karşı adaptasyon mekanizması geliştirmişlerdir (Flowers vd., 1986). Bu adaptasyonlar bitkinin farklı seviyelerinde, organlarda, hücrelerde, zarlarda ve genom düzeyinde olabilir (Pitman ve Laüchli, 2002). Glikofitler, yaprakları zarar görmeden yüksek konsantrasyonlarda tuz biriktiremezler; oysa halofitler bitki dışındaki tuzların ozmotik potansiyelini dengelemek için yapraklarında sürgün kuru ağırlıklarının %50'sine kadar tuz biriktirebilirler (Flowers vd., 1986).

Halofitler tuzlu bir ortamda büyümelerini sabit bir şekilde geliştirebildikleri için tuz stresi altında (gelgit, yağış) hayatta kalma yetenekleri bakımından glikofitlerden farklıdır (Niu vd., 1993). Bir halofitin optimal büyümesi, çoğu tarım bitkisinin hızla ölebileceği tuz konsantrasyonu olan 200-400 mM NaCl arasındaki toprak tuzluluğunda gözlenir (Khan vd., 2005). Tuzlu kıyı bataklıklarından, denizden uzak tuzlu çöller, kumlar, çamurlu bataklıklara kadar çok çeşitli tuzlu alanlarda yaşamını sürdüren halofitlerin yaşadığı toprakların hemen hemen hepsi tuzlu-sodyumlu hafif alkali topraklardır. Bu topraklarda halofitlerin yaşamlarını devam ettirebilmesini sağlayan özel durumlar, tuz konsantrasyonunu seyreltebilen sukkulent yapının olması, su alımını sağlayabilen içsel yüksek iyon konsantrasyonu ve iyon alım kapasitesi, su alımını devam ettiren çözünebilir ozmolitlerin birikimi, tuzun vakuollerde bölümlendirilmesi ve tuz keseleri ile tuzun bünyeden atılması olarak sıralanabilir (Ashraf, 2004; Grigore vd., 2014).

Halofitler ortamın tuz konsantrasyonuna göre gösterdiği tolerans yönünden türler arasında farklılıklar gösterir. Bu farklılıklara göre birçok araştırmacı halofitleri farklı sınıflandırmıştır. Örneğin, Strogonov (1964)'a göre halofitler; aşırı tuz koşullarında

yaşayabilen gerçek halofitler (euhalofitler) ve orta dereceli tuz koşullarında yaşayabilen halofitler (oligohalofitler) olarak iki alt gruba ayrılır. Bununla beraber, düşük tuz veya tuz içermeyen koşullarda normal gelişim gösteren halofitler fakültatif halofit, ancak yine aynı koşullarda yetişemeyen, büyümesi için yüksek tuz koşullarına ihtiyaç duyan halofitler zorunlu (obligat) halofitler olarak adlandırmıştır. Obligat halofit olarak *Salicornia herbacea* ve *Atriplex vericaria* bilinmektedir. Breakle (1983)'a göre ise halofitler; euhalofitler, recretohalofitler, pseudohalofitler ve nonhalofitler olarak dört ana gruba ayrılmıştır. Euhalofitler, bünyesine alınan tuzu doku ve hücrelerde bölümlendiren, yaşlı bitki kısımlarında biriktiren ve ortamdaki tuz artışına oldukça dayanıklı olan bitkilerdir. Yaprakları sukkulent ve gövdesi sukkulent olmak üzere euhalofitler iki gruba ayrılmıştır. Recretohalofitler ise tuz bezleriyle dışarıya tuz salgılayanlar ve tuz keseleri ile içsel tuz salgılayanlar olmak üzere ikiye ayrılmıştır. Dokularında tuzu kısmen bölmelendiren pseudohalofitler ise, kısmen gerçek halofitler gibi davranabilen bitkilerdir. Nonhalofitler de tuzlu alanlarda uygun mevsimlerde gelişip bu şekilde tuzun alınımını sınırlayan ya da Na^+ ile Cl^- iyonlarına karşı seçici olan halofitler olarak sınıflandırılmıştır. Grigore ve Toma (2010) ise anatomik gözlemlerini ekolojik faktörlerle bütünleştirerek halofitleri; ekstrem halofit ve mezohalofit olmak üzere ikiye ayırmıştır. Ekstrem halofitler ortam şartlarına iyi adapte olmuş halofitlerdir ve sadece tuzlu ortamlarda büyüebilirler. Özellikle tuzluluk toleransı çalışmalarında sıklıkla kullanılan, Arabidopsis (Arabidopsis ile ilgili model türler (ARMS)) bitkisiyle yakın akraba olan Tuz Gölü ve çevresinde yetişen halofit *Eutrema parvulum* (syn. *Thellungiella parvula* ve *Schrenkiella parvula*, Brassicaceae) model bitkisi ekstrem halofitlere örnektir (Amtmann, 2009). Bununla birlikte, Amaranthaceae familyasının sukkulent türleri de (*Salicornia*, *Suaeda*, *Halimione* ve *Petrosimonia*) ekstrem halofitlere örnek olup, yüksek tuzluluk koşullarına en iyi şekilde adapte olmuşlardır.

1.7. Halofitlerin Tuza Direnç Mekanizmaları

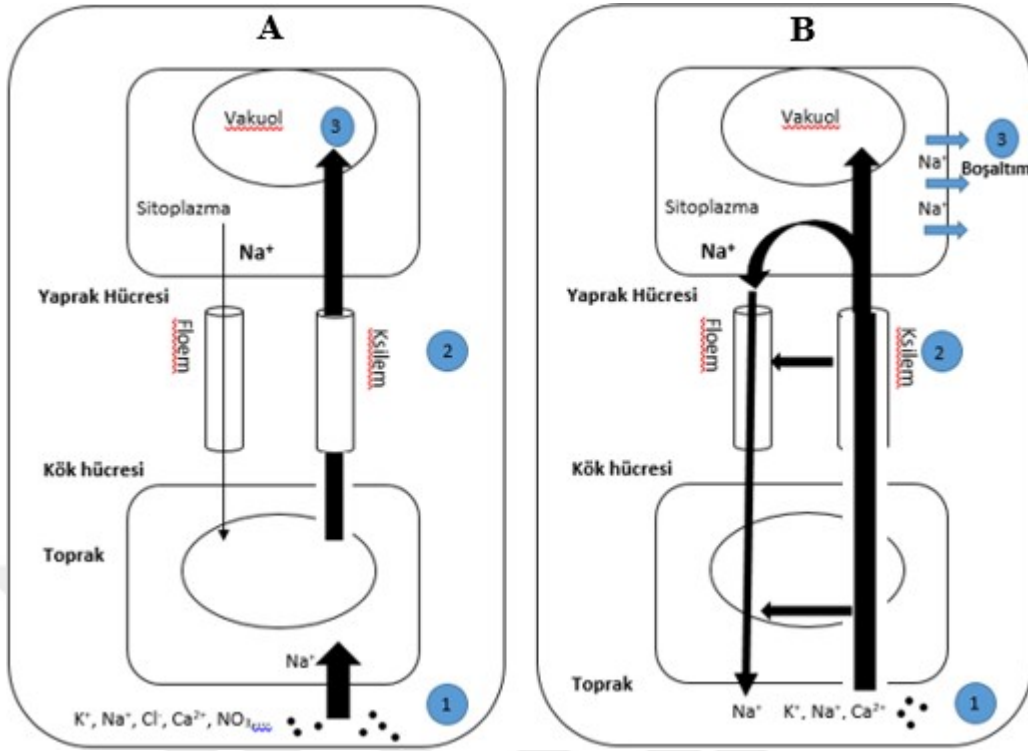
Tuzun neden olduğu etkilere karşı bitkiler sahip olduğu sakınım veya tolerans mekanizmaları ile tuz stresine karşı dayanıklılık sağladığı bilinmektedir (Levitt, 1980). Tuzlu ortamlarda halofitler dış ortamdan üç farklı şekilde etkilenirler. (1) Ozmotik kısıtlama: Tuz ortamdaki su potansiyelinin düşmesine neden olur. Böylece bitkinin su alınımını engellemiş olur. (2) Dokularda Na^+ ve Cl^- 'nin toksik birikimine bağlı olarak meydana gelen iyon stresi. (3) Na^+ 'nın, Cl^- , NO_3^- , H_2PO_4^- ve SO_4^{2-} ve diğer zorunlu katyonlar olan K^+ , Mg^{+2} ,

Ca²⁺ ile rekabet etmesinden kaynaklanan besin stresi. Bu üç stresin ortak bir paydası ROT'ların birikmesinden sorumlu olmalarıdır. Tuzlu koşullarda yaşayan halofitler, bu streslere karşı adaptasyon mekanizması geliştirmek zorunda kalmışlardır. Bu adaptasyonlar, bitkinin farklı kısımlarında, organlarda, hücrelerde, zarlarda ve moleküler seviyede bulunurlar. Halofitler, ozmotik düzenleme stratejisi (ozmotik ya da tolerans stratejisi) ve kaçınma stratejisi olarak iki ana strateji benimsemişlerdir.

Tuzdan sakınım olayı bazı fizyolojik ve yapısal adaptasyon mekanizmalar gerektirir. Halofitler için üç ana sakınım yöntemi vardır. Birincisi tuzun kökler tarafından uzaklaştırılması olayıdır. Bu durumun bir yolu rizosferde yüksek tuz varlığında, Na⁺ ve Cl⁻ iyonlarının kök tarafından belirli bir miktarda bitki bünyesine alınması sağlanarak sürgünlerdeki aşırı Na⁺ içeriğinden kaçınılmış olur. Kökte Na⁺'nın engellenmesi kaspari şeridi tarafından gerçekleştirilir. Kökten Na⁺'yı uzaklaştırmanın bir diğer yolu da Na⁺ girişinin kök hücreleri tarafından engellenmesi ve toprak çözeltisine doğru Na⁺ çıkışının artırılması yönündedir. Böylece kökten ksileme Na⁺'nın geçişi en aza indirilirken, ksilemden köke Na⁺ girişi en üst düzeyde tutulmaktadır (Tester ve Davenport, 2003). Kökler tarafından Na⁺ düzenlenmesi kökün iletim hücrelerindeki taşıyıcı proteinler aracılığıyla gerçekleşir (Botella vd., 2005) (Şekil 1). İkincisi ise, tuzun elimine (atma) edilmesiyle uzaklaştırılmasıdır. Halofitler tuzu, tuz bezleri veya tuz salgı tüyleri gibi özel yapılar sayesinde elimine etmektedir (Shabala vd., 2014; Dassanayake ve Larkin, 2017) (Şekil 1). Halofitlerin yaklaşık olarak %50'si tuz bezlerine sahiptir. Tuz salgı bezleri tuzu dışarı salgılamakta, tuz salgı tüyleri ise fazla tuzu büyük vakuollerde biriktirir ve tuz dokulardan fizyolojik olarak uzaklaştırılır (Breckle, 2002). Ceplerin çapı epidermal hücrelerden on kat daha büyük olduğundan, her epidermal cep yaklaşık bin kat daha fazla büyük hacime sahiptir ve bu nedenle yaprak hücre vakuollerine kıyasla bin kat daha fazla Na⁺ bölümlendirebilir (Shabala vd., 2014). Tuzun boşaltım mekanizması özellikle tuz salgı bezleri aracılığıyla sakınım sağlayan bitkilerde açıklanmıştır. Bu bitkilerde, sıvının bazal hücreden apikal hücreye hareketi, iki hücre arasındaki plazmodezmlarla yapılır. Derişik tuz çözeltisi, toplama hücresinde, apikal hücrenin çeperi ve kutikula arasında saklanır ve sonuç olarak tuzlu çözelti kutikuladaki küçük açıklıklarla yaprak yüzeyine doğru ilerler. Tuz bezlerinden su buharlaşarak yaprak yüzeyinde tuzlar kristal forma dönüşür, bu kristal yapılar rüzgâr veya yağmurların etkisiyle patlarlar (Lipschitz vd., 1974). Örneğin, *Zoysia* bitkisi yapraktaki tuz bezleri yoluyla iyon boşaltımını sağladığı ve tuzluluk toleransının tuz bezlerinin yoğunluğuyla ilişkili olduğu belirtilmiştir (Marcum vd., 1998). Bununla beraber, Poales

(*Aeluropus littoralis* ve *Chloris gayana*), Myrtales (*Laguncularia racemosa*), Caryophyllales (*Mesembryanthemum crystallinum* ve *Atriplex halimus*) gibi bazı familyalara ait türlerde tuz bezleri tanımlanmıştır. Tuzdan sakınım yönteminin diğer bir yolu da tuz içeriği yüksek olan yaşlı yaprakların dökülmesiyle tuzun atılması olayıdır. Bu yöntem tuzlu koşullara adapte olmuş tuz salgılama mekanizması olmayan bitkilerdeki özelliktir. Üçüncüsü bitki dokularının sukkulentlik kazanması ve tuzun floem yolu ile yeniden dağılımıdır. Vakuolde Na^+ ve Cl^- birikimi kök veya yaprak sukkulentliğini artırır. Sukkulentlik yaprak dokusunda var olan fazla tuzun seyreltilmesini sağlayan mekanizmadır ve böylece bu mekanizma ile halofitler yüksek tuz altında büyütüldüğünde ozmotik ayarlamayı destekler (Kramer, 1984). Çok sayıda halofitin karakteristik özelliği olan yapraklarda veya köklerdeki sukkulentlik, hücre boyutunda ve yaprak kalınlığında bir artış doku hacmi başına düşen yüzey alanında ve stoma sayısında bir azalma ve birim yüzey alanında yüksek bir su içeriği ile ilişkilidir (Dajic, 2006). Artan sukkulentlik, biriken tuzların seyreltilmesi ve iç suyun korunması açısından bir adaptasyon olarak yapraktaki su durumu ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Debez vd., 2004). Tuzun floem yolu ile yeniden dağılımı, bitkideki aktif ve genç dokulardan Na^+ 'nın ve Cl^- 'nin tekrar floeme aktarılarak kökten dışarı atılmasıyla yapraklardaki tuz miktarının seyreltilmesi olayıdır (Larcher, 1995) (Şekil 1).

Halofitlerin tuz toleransı esas olarak vakuolde Na^+ ve Cl^- birikimi yeteneklerine bağlıdır ve bu yüzden halofitler sitoplazmadaki Na^+ ve Cl^- içeriğini vakuole göre önemli derecede daha düşük tutarlar. Böylece bu durum, metabolik faaliyetlerin inhibisyonunu engeller (Flowers vd., 1986; Serrano ve Gaxiola, 1994). Tuz stresi ile baş edebilmek için bitkiler, kökten iyon alınımı, seçici iyonların hücreye alınımı ya da boşaltımı, toksik iyonların dağılımı, ozmolit bileşiklerin sentezi, antioksidan enzimlerin birikimi gibi tolerans mekanizmalarına sahiptirler (Parida ve Das, 2005).



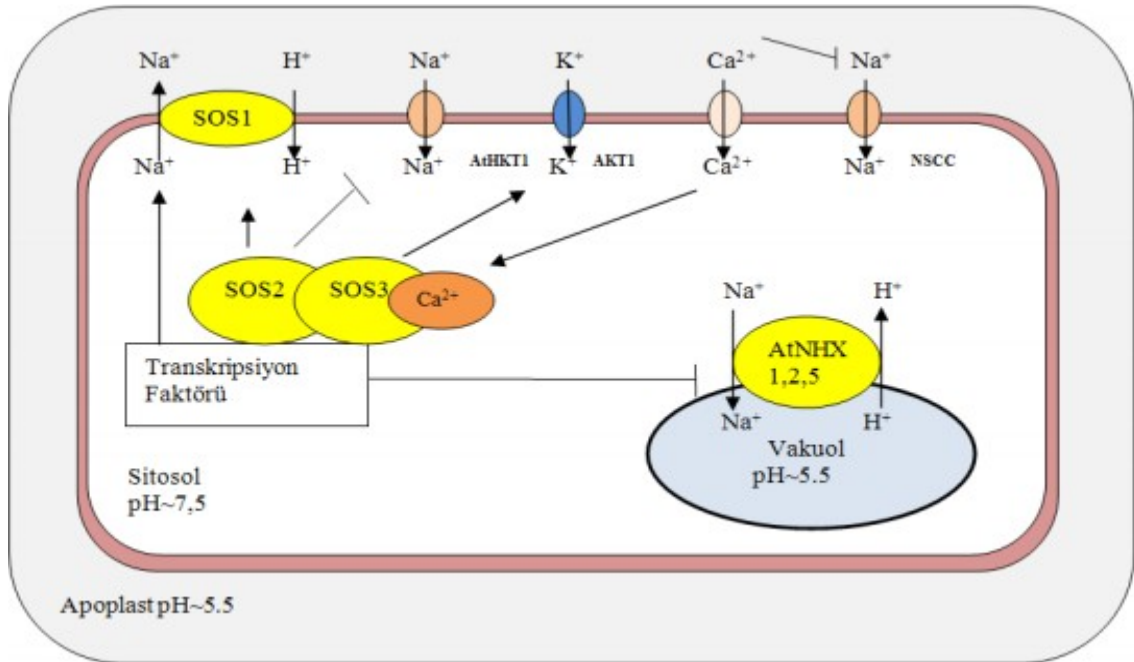
Şekil 1. Halofitlerde tuza direnç mekanizmaları. (a) Tuz toleransı (b) Tuzdan sakınım (Hamed vd., 2018)

1.7.1. İyon Homeostasisının Düzenlenmesi ve SOS Yolu

Toprakta aşırı çözünen tuzların varlığı, bitkiler için elzem olan mineral besin maddelerinin alımı ve metabolizması ile rekabet eder. Fakat, artan tuz alımını, Na^+ , Cl^- , SO_4^{2-} yüksekliği gibi spesifik iyon toksisitesini tetikler. Bu durum P, N, K^+ , Ca^{+2} , Mg^{+2} alınımını engelleyerek bitki mineral beslemesini etkiler (Serrano ve Gaxiola, 1994; Zhu, 2001). İyon homeostasisi Na^+ 'yı dokularda düşük ya da tolere edebilir oranlarda tutarak, K^+ ve Ca^{+2} gibi diğer temel besinlerin seçici olarak alınması tuz toleransının diğer bir önemli yönüdür. Hücresel düzeyde Na^+ 'nın düzenlenmesi, hücrede plazma membranına bağlı bulunan Na^+/H^+ antiportörleri (SOS yolu) ile hücreden fazla Na^+ 'nın dışarı atılması ve tonoplast Na^+/H^+ antiporterleri aracılığıyla vakuol içine alınması ile sağlanır. Ayrıca HKT-tip taşıyıcılar, seçici olmayan katyon kanalları (NSCCs), glutamat reseptörleri (GLRs), siklik nükleotid geçit kanalları (CNGCs) gibi bazı proteinler Na^+ düzenleyici sistemler olarak rapor edilmiştir (Assaha vd., 2017).

İyon homeostasisının düzenlenmesi ile ilgili Arabidopsis'de tuz toleransında görev alan *SOS1*, *SOS2*, *SOS3* olmak üzere üç lokus bilinmektedir (Qui vd., 2002). *SOS3* geni kalsiyum

bağlayıcı bir proteini, *SOS2* geni serin/treonin protein kinazını ve *SOS1* geni bir plazma membranı olan Na^+/H^+ antiporterini kodlamaktadır. *SOS* (Salt Overly Sensitive: Tuza Aşırı Duyarlı) genlerinin kontrolündeki *SOS* sinyal yolu, Na^+ ve K^+ iyon dengesini düzenlemektedir. *SOS* sinyal yolu aşırı miktarda hücre içi ve hücre dışı Na^+ birikimiyle sitoplazmik Ca^{+2} sinyalinin uyarılması sonucu başlamaktadır. *SOS3*, *SOS2* ile etkileşerek, *SOS2* aktif hale getirilir (Shi vd., 2000). *SOS2* ile *SOS3*, *SOS1*'i aktive ederek, *SOS1*'in gen ifadesini kontrol eder. *SOS1*'in aktif olmasıyla birlikte tuz stresi altında iyon dengesi sağlanarak tuza tolerans sağlanmış olur (Gong vd., 2004) (Şekil 2).



Şekil 2. İyon dengesinin *SOS* sinyal iletim yolu, tuz stresi ve kalsiyum düzeyleri tarafından düzenlenmesi. *SOS1*, *SOS2*, *SOS3*, *AtNHX1,2,5* proteinleri tuz stresiyle aktive edilir. *SOS1*: plazma zarı Na^+/H^+ antiporter; *SOS2*: serin/treonin kinaz; *SOS3*: Ca^{2+} bağlayan protein; *HKT1*: sodyum girişi taşıyıcısı; *AKT1*: K^+ girişi kanalı; *NSCC*: seçici olmayan katyon kanalı; *AtNHX1,2* veya *5*: hücre içi zar Na^+/H^+ antiporteridir.

1.7.2. Ozmolitlerin (Organik Çözünenler) Biosentezi

Stres koşullarında ozmotik dengenin sağlanması ve hücre yapısının korunması ozmolitlerin birikimiyle gerçekleşmektedir. Ozmolitlerin öncelikli görevi turgorun devamını sağlayarak dehidrasyona uğramış hücrelerdeki makromolekülleri korumaktır (Szabados vd., 2011). Ayrıca, hücrelerin ozmotik potansiyelini ayarlayabilirler ve böylece membranlar ile

makromoleküllerin yapılarını koruyabilirler (Slama vd., 2015). Bir dizi araştırmacı ozmotik potansiyeli azaltmak için tuz stresine maruz kalan bitkilerde ozmotik ayarlamaların prolin, glisin betain, çözünen şekerler, serbest amino asitler, poliaminler gibi ozmolitlerin birikmesiyle oluştuğunu bildirmiştir (Xiong ve Zhu, 2002).

Halofitlerde glisin-betain ve prolin gibi iki önemli organik çözücü birikerek, tuz stresine cevap olarak ozmotik ayarlama sağlanmaktadır (Flowers ve Colmer, 2008). Halofit hücreleri prolin katabolizmasının kontrolünde ve birikiminde glikofitlerden daha etkilidirler. Ozmoprotektan olarak rol oynayan ozmolitlerin içeriklerindeki artışla birlikte bitkilerin tuza daha fazla tolerans gösterdiği ve tuz stresine erken bir cevap oluşturduğu bulunmuştur (Fedina vd., 2002). Bitkilerde artan prolin seviyesi hücrelerdeki turgorun devamını sağlar ve prolin birikimi bitkide bir stres göstergesi olarak kabul edilir (Jagesh vd., 2010). Tuz stresi altında halofitlerin prolin içeriği glikofitlere göre farklılık göstermektedir. Örneğin, halofit *Cakile maritima*'nın yaprakları ve kökleri kontrol durumunda *A. thaliana*'ya benzer bir prolin havuzu sunarken, tuz stresinden 72 saat sonra yapraklarda *A. thaliana*'dan iki kat daha fazla, köklerde ise üç kat daha fazla prolin birikimi meydana gelebilmektedir (Ellouzi vd., 2014). Bu da halofit *C. maritima*'nın ozmotik ayarlamayı sağlamak için Na^+ 'ya ek olarak organik ozmolitler biriktirebildiğini göstermektedir. Prolin birikiminin tuz toleransı üzerindeki yararlı etkisi çeşitli halofit türlerinde araştırılmıştır (Szabados ve Savoure, 2010; Slama vd., 2015). Arabidopsis'in iki halofit yabancı akrabası olan *Thellungiella salsuginea* ve *Lepidium crassifolium*, kontrol ve tuz stresi koşullarında *A. thaliana*'dan daha fazla prolin biriktirmişlerdir (Murakeozy vd., 2003; Taji vd., 2004; Ghars vd., 2008). Tuz stresi altında halofit *Hordeum marinum* (Seçkin vd., 2010) ve halofit olmayan *Camphorotma annua* (Murakeozy vd., 2003) gibi bitkilerde prolin, glisin-betain ve poliollerin seviyesi arttığı bilinmektedir. Başka bir çalışmada, tuz stresi altında *Cichorium intybus*'un (yabani hindiba) prolin içeriğinin önemli derecede arttığı rapor edilmiştir (Sergio vd., 2012).

1.7.3. Antioksidan Sistem

Bitki hücresinde sinyal yollarındaki ROT'lar tüm organizmalar için önemlidir. Ancak hücrede aşırı ROT birikimi oksidatif stres tetikler. Bitkilerde oksidatif stres, lipid peroksidasyonu, DNA hasarı ve protein denatürasyonu gibi birçok zararlı etkiye neden olur. Glikofitler ve halofitler arasında ROT'a karşı duyarlılık farklıdır. Aslında, yüksek tuzluluk ROT oluşumuna yol açabileceğinden, halofitlerde daha yüksek bir ROT seviyesi

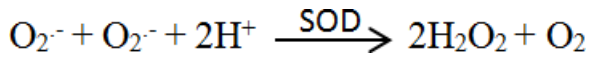
görülmektedir. Bu nedenle ROT'ların temizlenmesi bitkilerin tuza toleransında kritik öneme sahiptir ve buna göre halofitler hücrede ROT seviyesini düzenlemek için enzimatik ve enzimatik olmayan güçlü antioksidan sistemler ile donatılmıştır (Bose vd., 2014).

1.7.3.1. Enzimatik Antioksidanlar

Hücre içinde farklı bölümlerde yerleşmiş antioksidan sistemin bazı enzimleri süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), askorbat peroksidaz (APX), monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR), dehidroaskorbat redüktaz (DHAR), glutatyon redüktaz (GR) ve guaikol peroksidaz (GPOD)'dır (Das ve Roychoudhury, 2014).

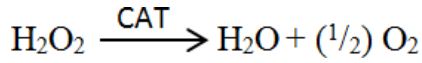
1.7.3.1.1. Süperoksit Dismutaz

Bütün aerobik organizmalarda her yerde bulunan süperoksit dismutaz (SOD) bir metaloenzim ailesine aittir. Çevresel stresler altında SOD, ROT kaynaklı oluşan hasarlara karşı ilk savunmayı yapan enzimdir. SOD, $O_2^{\cdot-}$ 'yi H_2O_2 'ye dönüştürerek, $O_2^{\cdot-}$ 'nin uzaklaştırılmasını katalize eder. Bu, Haber-Weiss reaksiyonu ile OH^{\cdot} oluşum ihtimalini ortadan kaldırır. SOD'lar bağlandıkları metal iyonlarına bağlı olarak Mn-SOD (mitokondride lokalize), Fe-SOD (kloroplastta lokalize) ve Cu/Zn-SOD (sitosolde lokalize) olmak üzere üç izoenzime ayrılır (Mittler, 2002). SOD ifadesinin abiyotik stres koşullarında yukarı yönlü düzenlendiği (up-regule edildiği) bilinmektedir (Boguszewska vd., 2010).



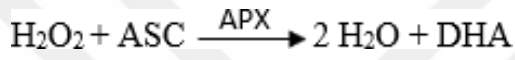
1.7.3.1.2. Katalaz

Katalaz (CAT), H_2O_2 'nin H_2O ve O_2 'ye ayrılmasını katalize etmekten sorumlu olan bir enzimdir. H_2O_2 yüksek affiniteye sahip bir enzimdir, ancak organik peroksitlere (R-O-O-R) karşı daha az özgülüğü vardır. Peroksizomlar yağ asitlerinin β -oksidasyonu, fotorespirasyon, purin katabolizması ve oksidatif stresten dolayı H_2O_2 üretiminin önemli noktalarıdır. Bununla birlikte, yapılan bir çalışma ile CAT'ın sitosol, kloroplast, mitokondri gibi bölümlerde de bulunduğunu gösterilmiştir (Mhamdi vd., 2010).



1.7.3.1.3. Askorbat Peroksidaz

Askorbat peroksidaz (APX), askorbat-glutatyon (ASC-GSH) döngüsünün ayrılmaz bileşenidir. CAT, peroksizomlardaki hidrojen peroksiti büyük ölçüde temizlerken, APX sitozol ve kloroplastta aynı görevi görmektedir. APX indirgeyici madde olarak askorbatı (ASC) kullanarak H_2O_2 'yi, H_2O ve dehidroaskorbat (DHA)'a indirger.



APX ailesi sitozolik, peroksizomal, mitokondriyal ve kloroplastik (stromal ve tilakoid) olmak üzere farklı lokalizasyon ve farklı amino asite dayalı beş farklı izoformdan oluşur (Sharma ve Dubey, 2004). H_2O_2 için APX, CAT'dan daha yüksek bir affiniteye sahip olduğundan, stres koşullarında H_2O_2 'i katalazdan daha iyi temizleyen bir enzimdir.

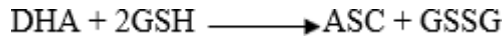
1.7.3.1.4. Monodehidroaskorbat Redüktaz

Monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR), NADPH'ı indirgeyici ajan olarak kullanarak, MDHA'nın askorbata (ASC) dönüşümünü sağlayarak, hücrel ASC havuzunun yenilenmesini düzenler. MDHAR, askorbik asiti yenilediğinden, peroksizomlarda ve mitokondrielerde APX ile birlikte bulunurlar. MDHAR, kloroplast, mitokondri, peroksizomlar, sitozol ve glioksizomlarda sınırlı birkaç izoenzime sahiptir. (Mittler, 2002).



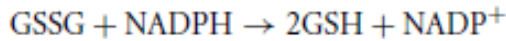
1.7.3.1.5. Dehidroaskorbat Redüktaz

Dehidroaskorbat (DHAR), elektron vericisi olarak indirgenmiş glutatyonu (GSH) kullanarak dehidroaskorbatı (DHA) ASC'ye indirger (Eltayeb vd., 2007). Bu onu, MDHAR dışında hücreSEL ASC havuzunu yeniden düzenleyen başka bir bileşik yapar. DHAR tohumlarda, köklerde ve yeşil sürgünlerde oldukça fazladır (Das ve Roychoudhury, 2014).



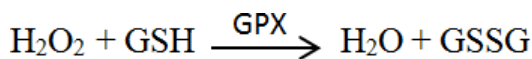
1.7.3.1.6. Glutasyon Redüktaz

Glutasyon redüktaz (GR) NADPH'ı indirgeyici olarak kullanarak, GSSG'yi GSH'a indirgeyen bir flavoprotein okside redüktazdır. İndirgenmiş glutasyon (GSH), MDHA ve DHA'dan askorbatın (ASC) yeniden oluşumu için kullanılır. ASC-GSH döngüsünün önemli bir enzimi olan GR, yüksek bir hücreSEL GSH/GSSG oranını korumak için glutasyon disülfid içerisinde bir disülfid bağ oluşumunu katalize eder. GSH, tiol gruplarının oksitlenmesini önlemek için indirgeyici rol oynayan düşük moleküler ağırlıklı bir bileşiktir (Das ve Roychoudhury, 2014).



1.7.3.1.7. Glutasyon Peroksidaz

Glutasyon peroksidaz (GPX), hem normal metabolizma sırasında hem de stres sırasında fazla H_2O_2 'yi temizleyen 40-50 kDa ağırlığındaki monomerlerden oluşan HEM grubu içeren bir enzimdir. İndol asetik asiti degrede ederek ve bu süreçte H_2O_2 'yi kullanarak biyotik strese karşı savunma sağlamasının yanı sıra lignin biyosentezinde önemli rolü vardır. GPX, guaiakol ve pyragallol gibi aromatik bileşikleri elektron verici olarak tercih eder (Asada, 1999). Ayrıca hücre içinde (sitosol, vakuol), hücre duvarında ve hücre dışında aktif olduğu için, H_2O_2 'in uzaklaştırılmasında anahtar enzim olarak kabul edilir.



1.7.3.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

1.7.3.2.1. Askorbat (L-Askorbik Asit, C Vitamini)

Yapılan araştırmalara göre askorbat (ASC) bitkilerde enzimatik olmayan antioksidanların önemli bir bileşiği olup bitki büyümesinde, hormon sinyallemede, özellikle tuza cevapta önemli bir modülasyona sahiptir (Mellidou ve Kanellis, 2017). Elektronlarını çok çeşitli enzimatik ve enzimatik olmayan reaksiyonlara verebildiği için güçlü bir antioksidan olarak kabul edilir. ASC'nin büyük bir çoğunluğu bitki hücrelerinin mitokondrisinde Smirnoff-Wheeler yolunda L-galactano-γ-lakton dehidrojenaz tarafından katalizlenen yolak tarafından katalizlenir, diğer bir kısmı ise D-galakturonik asitten üretilir. ASC havuzunun %90'ı sadece sitozolde değil, aynı zamanda büyük ölçüde apoplast içinde birikir, böylece ASC'ler bu bölgelerde bulunarak ROT saldırısına karşı ilk savunma hattı olarak görev alır (Barnes vd., 2002). Özellikle ASC, bitkilerde tuza toleransını arttırmak için ROT homeostazının hassas kontrolünde kritik rol oynar (Wang vd., 2013). ASC, H₂O₂, OH⁻, O₂⁻ ile reaksiyona girer ve membranları oksidatif hasardan koruyarak, α-tokoferol tokoferoksil radikalinden yeniden üretir (Shao vd., 2005).

1.7.3.2.2. Glutasyon

Glutasyon (GSH), sitozol, ER, mitokondri, kloroplastlar, vakuoller, peroksizomlar ve hatta apoplast gibi hemen hemen bütün hücresele bölümlerde bol miktarda bulunan düşük moleküler ağırlıklı bir tiyol tripeptiddir (γ-glutamil-sisteinil-glisin). Hücre farklılaşması, hücre büyümesi/bölünmesi, hücre ölümü, senesens, sülfat taşınmasının düzenlenmesi, metabolitlerin konjugasyonu, enzimatik aktivitenin düzenlenmesi, proteinlerin ve nükleotidlerin sentezi ve strese cevap genlerinin ekspresyonu gibi çeşitli süreçlerde rol oynar. (Mullineaux ve Rausch, 2005). GSH'nin bu çok yönlülüğü, yüksek indirgeme potansiyeline sahip olmasından kaynaklıdır. GSH, H₂O₂, ¹O₂, OH[•] ve O₂⁻ radikallerini temizler ve ilave ürünler oluşturarak (glutatillenmiş) farklı biyomolekülleri korur. Ayrıca GSH, GSSG'ye dönüşmek için askorbik asitin yeniden oluşumunda hayati bir öneme sahiptir. Bu Şekilde retilen GSSG ya sentez yoluyla ya da enzimatik olarak GR tarafından GSH'a dönüştürülür. Bu durum hücresele GSH havuzunu doldurur. GSH ayrıca, fitoşelatin sentez yoluyla fitoşelatinlerin oluşumuna (Roy Choudhury vd., 2012a) ve ağır metal

iyonlarını şelatlamaya ve böylece bitkilerde ROT oluşum kaynağını temizlemeye yardımcı olur (Roy Choudhury vd., 2012b). Bu nedenle, GSH ve GSSG arasındaki hassas denge hücrenin redoks durumunu korumak için gereklidir (Das ve Roychoudhury, 2014).

1.8. Asteraceae Familyası ve *Scorzonera* Cinsinin Özellikleri

Asteraceae familyası 1600-1700 cins ve 24.000- 30.000 arası tür ile dünyanın en zengin vasküler bitki ailesidir. Asteraceae'nin birçok doğallaşmış üyesi bilinmektedir (Moreira Muñoz ve Muñoz-Schick, 2007). 134 cins ve yaklaşık 1200 tür ile Asteraceae familyası Türkiye ve Ege'nin doğusundaki adaların florasında en geniş tür sayısını temsil eder. Bu taksonların Türkiye için %37 endemizm oranı olmak üzere 447'si endemiktir. Asteraceae familyasına ait türler farklı iki tip çiçekli kapituluma sahiptir. Birincisi tubulat çiçek olup korollası tüp şeklindedir, ikincisi ise, ligulat çiçek olup korollası dil şeklindedir. Bazı taksonlar her iki tipe ait çiçeğe sahipken, bazıları da ya sadece ligulat ya da sadece tubulat çiçeğe sahiptir. *Scorzonera* cinsine ait çiçekler yalnız ligulat yapılıdır.

Scorzonera L. (Asteraceae), 75 taksona sahip en büyük cinstir (Bremer, 1994). Türkiye'de bulunan *Scorzonera*'larla ilgili ilk çalışma Chamberlain (1975) tarafından yapılmıştır. Chamberlain'e (1975) göre Türkiye'de 39 *Scorzonera* türü bulunmaktadır. Günümüzde *Scorzonera*, geniş anlamda Türkiye'de 52 tür (59 takson) ile temsil edilmektedir ve bunun 31 tanesi endemiktir. Oysa Avrupa florasında sadece 28 tane ile temsil edilir (Chater, 1976). Bunun anlamı, Türkiye *Scorzonera* cinsinin çeşitliliğinin önemli bir merkezidir. Avrasya ve Afrika'nın kurak bölgelerinde oldukça yayılmışlardır (Nazarova, 1997). Tek veya çok yıllık otsu ya da yarı çalimsı olan *Scorzonera* türlerinin kök yapıları sert kalın olup silindir ya da yumru şeklindedir. Yapraklar bazal veya gövde de olup, basit, linear, ovat-lanseolat ya da derin loblu formda olup, saplı/sapsız şeklindedir. Çiçekleri beyaz, mor, sarı ya da menekşe rengindedir. Akenleri ise silindir, düz veya oluklu, tüylü ya da tüysüz, saplı veya sapsızdır. *Scorzonera* cinsine ait türler güzel kokulu olmaları sebebiyle dünyanın bazı ülkelerinde yemeklerde tatlandırıcı olarak (Paraschos vd., 2001), bazı türlerinin ise Avrupa, Asya ve Anadolu'da geleneksel tıpta kullanıldığı bilinmektedir (Ertuğ, 2000; Zidorn vd., 2003). Örneğin *Scorzonera humulis* L. türü sebze olarak, *Scorzonera mollis* M. halk arasında tıbbi yönden kullanılmaktadır. (Franke, 1997). Ayrıca Avrupa'da bazı ülkelerde ve özellikle Türkiye'de *Scorzonera mollis*'in kurutulmuş kökleri sebze olarak kullanılmaktadır (Ertürk ve Demirbağ, 2003). Ezer ve Arısan (2006) yaptıkları

bir çalışmada, Merzifon yöresine ait *Scorzonera eriophora* türünün ilk defa halk ilacı olarak kullanıldığını belirlemiştir. Bu türün Türkiye'ye endemik olduğu ve ayrıca insanlarda astım, mide ağrısı ve boğaz enfeksiyonlarına karşı kullanıldığı bildirilmiştir.

Scorzonera hieraciifolia Hayek (1907) halk arasında “Cıbıl tekesakalı” veya “Kır sakızı” olarak bilinen, tuzlu bataklıklarda ve bozkırlarda yaşayan, çok yıllık, sütlü halofit bir bitki türüdür. İran-Turan Bölgesinde yayılış gösteren Türkiye'ye endemiktir. Çiçeklenme dönemi Haziran-Ağustos aylarıdır. Bitkilerin boyları 5-15 cm kadardır (Şekil 3).



Şekil 3. *Scorzonera hieraciifolia*

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Bitki Materyalleri ve Sterilizasyonu

Scorzonera hieraciifolia L. akenleri, Sivas Tödürge Gölü'nden Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi'nden Prof. Dr. Serdar MAKBUL, *Eutrema parvulum* tohumları ise Ege Üniversitesi'nden Prof. Dr. İsmail TÜRKAN tarafından temin edildi. *Scorzonera hieraciifolia*'nın ekstrem halofit olma özelliğini belirlemek için 600 mM tuza dayanan ve ekstrem halofit model bitki olan *Eutrema parvulum* (syn. *Schrenkiella parvula* ve *Thellungiella parvula*) (Orsini vd., 2010) tohumları kullanıldı. Olgun *Scorzonera hieraciifolia* L. akenleri pappus tüylerinden temizlendi ve öncelikle filtre kâğıdı içeren petri kaplarında 2 gün süreyle 4 °C sıcaklıkta buzdolabında bekletilerek soğuk şokuna maruz bırakıldı (Şekil 4). 2 günün sonunda, steril kabin içerisinde aken ve tohumların sterilizasyonu yapıldı. Bunun için ilk olarak %10' luk (v/v) ticari sodyum hipoklorit çözeltisi (NaClO) içerisinde akenler 8 dk. boyunca bekletilerek yüzey sterilizasyonu yapıldı ve steril damıtılmış su ile üç aşamalı şekilde durulama işlemi yapılarak sterilizasyon işlemi tamamlandı. *E. parvulum* tohumları da aynı şekilde soğuk şokuna maruz bırakıldı ve 4 dak boyunca %10'luk NaClO çözeltisinde bekletilip, steril damıtılmış su ile durulama yapılarak sterilizasyon işlemi gerçekleştirildi.



Şekil 4. *Scorzonera hieraciifolia* akenlerinin çift katlı ıslak filtre kâğıdı arasında petri kaplarındaki görünümü

2.2. Doku Kültürünün Besin Ortamı, Koşulları ve Tuz Uygulamaları

Hem *Scorzonera hieraciifolia* hem de *Eutrema parvulum* bitkisi için bazal besin ortamları Murashige ve Skoog (1962) (MS), sukroz ve agar ile oluşturuldu. Bu bazal besiyeri ortamı, çeşitli konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicileri (kinetin, izopentil adenin (2-IP) ve naftelen asetik asit (NAA)) içermekteydi (Tablo 2 ve Tablo 3). Amaca uygun olarak MS, sukroz, agar ve bitki büyüme düzenleyicileri uygun dozlarda tartılarak, saf suda çözüldü ve ortamlarının pH'ı 5,8'e ayarlandı. Hazırlanan besiyeri ortamları 121 °C'de 1 atmosfer basınç altında otoklavlanarak steril edildi. Kullanılan pens, cam malzemeler ve bitkilerin büyütüldüğü besin ortamlarının aktarıldığı magentalar da yine otoklav yardımı ile steril edildi. Besin ortamlarının magentalara aktarılma işlemi steril kabin içerisinde gerçekleştirildi. Hazırlanmış olan besin ortamlarına, daha önceden steril hale getirilen *Scorzonera hieraciifolia* akenleri ve *Eutrema parvulum* tohumları aktarıldı. Aken ve tohumlar 24 ± 2 °C'de, ışık yoğunluğu $400-430 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ olan, 16 saat gündüz/8 saat gece fotoperiyotta, yaklaşık %60 nem içeren bitki büyütme kabini içinde çimlendirilip sırasıyla 30 ve 20 gün büyütüldü.

Tablo 2. *Scorzonera hieraciifolia* akenlerinin çimlenme ve büyümeleri için geçen süre ve besin ortamının içerikleri

Ortam	Süre (gün)	İçerikler
Çimlenme	15	MS (4,95 gr L ⁻¹) + Sukroz (%1) + Agar (%0,8) + kinetin (1 mg L ⁻¹)
Büyüme	30	MS (4,95 gr L ⁻¹) + Sukroz (%1) + Agar (%0,8) + 2-IP (2 mg L ⁻¹) + NAA (0,1 mg L ⁻¹)

Tablo 3. *Eutrema parvulum* tohumlarının çimlenme ve büyümeleri için geçen süre ve besin ortamının içerikleri

Ortam	Süre (gün)	İçerikler
Çimlenme	15	MS (4,95 gr L ⁻¹) + Sukroz (%1) + Agar (%0,8) + kinetin (1 mg L ⁻¹)
Büyüme	20	MS (4,95 gr L ⁻¹) + Sukroz (%1) + Agar (%0,8) + 2-IP (2 mg L ⁻¹) + NAA (0,1 mg L ⁻¹)

Doku kültürü ortamında büyütülen fideler 0 (kontrol), 150, 300, 450 ve 600 mM NaCl'den oluşan 5 değişik muamele grubu en az 4 fide içerecek şekilde oluşturuldu. Tuz uygulaması, tuz (NaCl) içermeyen doku kültürü ortamından (0 mM, kontrol) 150 mM tuz içeren magentaya fide aktarımı ile başlatıldı. Bir sonraki tuz konsantrasyonuna fidelerin aktarım işlemi 2 gün aralıklarla kademeli olacak şekilde gerçekleştirildi. Kademeli aktarım işlemi 450 mM tuza maruz kalmış fidelerin 600 mM tuz içeren magentaya aktarımı ile tamamlandı. Bu şekilde hem *S. hieraciifolia* hem de *E. parvulum* için kademeli tuz uygulamalarıyla hazırlanan 5 muamele grubu 7 gün boyunca aşağıdaki tablolarda ayrıntılı gösterildiği gibi tuz stresine maruz bırakıldı.

Tablo 4. *Scorzonera hieraciifolia* için tuz konsantrasyonları ve besin ortamının içerikleri

NaCl Konsantrasyonları (mM)	Besin Ortamı İçerikleri
0	MS (4,95 gr L ⁻¹) + Sukroz (%1) + Agar (%0,8) + 2-IP (2 mg L ⁻¹) + NAA (0,1 mg L ⁻¹)
150	MS (4,95 gr L ⁻¹) + Sukroz (%1) + Agar (%0,8) + 2-IP (2 mg L ⁻¹) + NAA (0,1 mg L ⁻¹) + 150 mM NaCl
300	MS (4,95 gr L ⁻¹) + Sukroz (%1) + Agar (%0,8) + 2-IP (2 mg L ⁻¹) + NAA (0,1 mg L ⁻¹) + 300 mM NaCl
450	MS (4,95 gr L ⁻¹) + Sukroz (%1) + Agar (%0,8) + 2-IP (2 mg L ⁻¹) + NAA (0,1 mg L ⁻¹) + 450 mM NaCl
600	MS (4,95 gr L ⁻¹) + Sukroz (%1) + Agar (%0,8) + 2-IP (2 mg L ⁻¹) + NAA (0,1 mg L ⁻¹) + 600 mM NaCl

Tablo 5. *Eutrema parvulum* için tuz konsantrasyonları ve besin ortamının içerikleri

NaCl Konsantrasyonları (mM)	Besin Ortamı İçerikleri
0	MS (4,95 gr L ⁻¹) + Sukroz (%1) + Agar (%0,8) + 2-IP (1 mg L ⁻¹) + NAA (0,1 mg L ⁻¹)
150	MS (4,95 gr L ⁻¹) + Sukroz (%1) + Agar (%0,8) + 2-IP (1 mg L ⁻¹) + NAA (0,1 mg L ⁻¹) + 150 mM NaCl
300	MS (4,95 gr L ⁻¹) + Sukroz (%1) + Agar (%0,8) + 2-IP (1 mg L ⁻¹) + NAA (0,1 mg L ⁻¹) + 300 mM NaCl
450	MS (4,95 gr L ⁻¹) + Sukroz (%1) + Agar (%0,8) + 2-IP (1 mg L ⁻¹) + NAA (0,1 mg L ⁻¹) + 450 mM NaCl
600	MS (4,95 gr L ⁻¹) + Sukroz (%1) + Agar (%0,8) + 2-IP (1 mg L ⁻¹) + NAA (0,1 mg L ⁻¹) + 600 mM NaCl

2.3. *Scorzonera hieraciifolia*'nın Ekstrem Halofit Olma Özelliğinin Belirlenmesi

S. hieraciifolia'nın ekstrem halofit bir bitki olma özelliğini belirlemek için; 600 mM tuza dayanabilen ve ekstrem halofit model bir bitki olan *Eutrema parvulum* (Orsini vd., 2010) bitkisi kullanıldı. Doku kültürü ortamında büyütülen *S. hieraciifolia* ve *E. parvulum* fideleri yukarıda belirtilen tuz uygulamalarına maruz bırakıldı ve morfolojik gözlemler (sürgün sayısı, sürgün boyu, klorozis varlığı) ve bazı stres parametrelerindeki (nispi su içeriği, lipid peroksidasyonu ve H₂O₂ içeriği) değişimler ölçülerek *S. hieraciifolia*'nın ekstrem halofit olma özelliği tespit edildi. Ayrıca yukarıdaki stres parametrelerine ek olarak *S. hieraciifolia*'nın yüksek tuza tolerans gösterebilen bir bitki olduğunu belirlemek için bitkide sürgün taze ağırlığı, sürgün kuru ağırlığı ve pigment içeriklerinin analizleri gerçekleştirilmiştir.

S. hieraciifolia'nın tuza tolerans mekanizmasını daha detaylı aydınlatmak için farklı tuz konsantrasyonlarına maruz bırakılarak büyütülen *S. hieraciifolia* sürgünlerinde anatomik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler değişimler belirlendi.

2.3.1. Bazı Temel Stres Parametrelerinin Belirlenmesi

2.3.1.1. Nispi Su İçeriğinin Ölçümü

S. hieraciifolia ve *E. parvulum* bitkilerinin sürgün taze ağırlıkları ölçülerek veriler kaydedildi. Daha sonra saf su içeren tüplerde örnekler 16 saat boyunca bekletilerek turgit ağırlıkları hesaplandı. Kuru ağırlık hesabı için de turgit ağırlıkları belirlenen örnekler 80 °C'de 48 saat boyunca etüvde bekletildi ve aşağıda belirtilen formüle göre tüm sayısal veriler yerine koyularak örneklerin NSİ'si hesaplandı (Castillo, 1996).

2.3.1.2. Lipid Peroksidasyonu Tayini

S. hieraciifolia ve *E. parvulum* numunelerinden 0,1 gr tartılarak, 10 mL %0,1 trikloroasetik asit (TCA) ile ekstrakte edildi. Ekstrakt 15.000 g'de 5 dk. santrifüj yapılarak, 1 mL süpernatanta, %20 TCA + %0,5 tiobarbiturik asit karışımından 4 mL ilave edildi. Karışım 95°C'de 30 dk. ısıtıldı ve soğuması için buz banyosunda bekletildi. Örneklerin absorbans değerleri 532 ve 600 nm'de okundu ve kaydedildi (Heath ve Packer, 1968).

2.3.1.3. Hidrojen Peroksit İÇeriğinin Belirlenmesi

Velikova vd. (2000) tarafından geliştirilen metot kullanılarak hidrojen peroksit (H_2O_2) içeriği belirlendi. *S. hieraciifolia* ve *E. parvulum*'dan 0,1 gr yaş örnekler tartıldı. Numunelerin ekstraksiyonu %0,1'lik TCA ile gerçekleştirildi. Ekstrakt santrifüj edilerek 1 mL süpernatanta 10 mM potasyum fosfat tamponu ve 1 M potasyum iyodür (KI) ilave edilerek, örneklerin absorban değerleri 390 nm'de ölçüldü. H_2O_2 içeriğinin hesaplanması için gerekli standart eğrisi Ek 1'de gösterildi.

2.3.1.4. Sürgün Taze ve Kuru Ağırlıklarının Belirlenmesi

Her bir deney grubundan 4'er tekrarlı olacak şekilde *S. hieraciifolia* bitkilerinin sürgün taze ağırlıkları (TA) tartıldı ve kaydedildi. Taze ağırlıkları hesaplanmış sürgünler 65 °C'de 48 saat boyunca fırında kurutularak sürgünlerin kuru ağırlıkları (KA) hesaplandı.

2.3.1.5. Fotosentetik Pigmentlerin Belirlenmesi

Fotosentetik pigmentlerin tayini Arnon'a (1949) göre yapıldı. *S. hieraciifolia* numunesinden 0,1 g tartılarak %80 aseton ile ekstraksiyon işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra santrifüj işlemi 5000 g'de 5 dk. oda sıcaklığında yapıldı. Örneklerin absorbanı 663, 645 ve 450 nm dalga boylarında okundu. Klorofil a (Kla), Klorofil b (Klb), toplam klorofil ve toplam karotenoid içeriklerinin ölçümü Lichtenthaler (1987) methoduna göre belirlenmiştir.

2.4. *Scorzonera hieraciifolia*'nın Tuza Tolerans Mekanizmasının Belirlenmesi

2.4.1. Sürgün Sukkulentlik Derecesinin Ölçümü

Sukkulentlik derecesi Qi vd., 'a (2009) göre yapıldı. *S. hieraciifolia*'nın sürgün taze ağırlıkları (TA) ve kuru ağırlıklarının (KA) hesabından sonra, sukkulentlik derecesi bu iki değerlerin birbirine oranı (TA/KA) olarak ifade edildi.

2.4.2. Sürgün Kalınlığının Belirlenmesi

S. hieraciifolia sürgünlerinin kalınlığını belirlemek için her gruba ait tüm sürgünler tek tek jilet yardımıyla sürgün boyunca boyuna kesildi. Daha sonra kesit alınan sürgünler ışık mikroskobu altında (Olympus, CX21) oküler metre yardımıyla birkaç noktadan enine ölçülerek, sayısal değerler not alındı ve bu değerlerin ortalaması alınarak sürgün kalınlığı hesaplandı.

2.4.3. Bitki Alanının Belirlenmesi

S. hieraciifolia'da her bir sürgün alanı ImageJ adlı görüntüleme programı ile belirlendi. *S. hieraciifolia*'ya uygun olan Image-Type -8 bit seçeneği seçildi ve Analyze-Set Scale seçeneğinden referans aralığı 1 cm girilerek ölçek ayarı yapıldı. Renkli görüntülerin istenen biçime getirilmesi için Image-Adjust-Threshold basamağından zemin siyah, sürgünler kırmızı olacak şekilde sürgün alanlarının sınırları belirlendi ve her bir sürgünün alan hesabı Analyze- Tools- ROI Manager basamağından gerçekleştirildi. Sürgün alan hesabı, her tuz uygulanmış gruptan 3'er tekrarlı olacak şekilde sürgünler seçilerek yapıldı.

2.4.4. Stoma Por Açıklığının Belirlenmesi

S. hieraciifolia sürgünlerinde farklı tuz konsantrasyonlarının stoma por açıklığı üzerine etkileri belirlendi. Her tuz uygulaması için, orta damara yakın olacak şekilde sürgünlerden jilet yardımıyla yüzeysel kesitler alınarak sabit preparatlar hazırlandı. Işık mikroskobu altında (Olympus, CX21) 40x büyütme ile alanına düşen stomaların por açıklığı oküler mikrometre yardımıyla ölçülüp, her bir bar aralığı 20 µm olacak şekilde, aralığa düşen stoma açıklıklarının sayısal değerleri kaydedilerek, verilerin ortalaması alındı. Stoma por açıklığı hesabı, her tuz uygulanmış gruptan 3'er tekrarlı olacak şekilde sürgünler seçilerek yapıldı.

2.4.5. Prolin İçeriğinin Belirlenmesi

İçsel prolin seviyesindeki değişimi belirlemek için *S. hieraciifolia* sürgünlerinden 100 mg numune tartıldıktan sonra %3'lük sülfosalisilik asitle homojenize edilerek, filtreden geçirildi. Karışımın (2 mL) üzerine 1 mL asetik asit ve 1 mL ninhidrin ilave edildi. Örnekler 100 °C'de 1 saat su banyosunda tutularak, reaksiyonu sonlandırmak için buzda soğutuldu ve 3 mL toluen eklenerek, vortekslendi. Örneklerin prolin içerikleri 520 nm'de ölçülerek kaydedildi (Bates vd., 1973). Prolin hesaplanmasında kullanılan standart eğri grafiği Ek 2'de sunuldu.

2.4.6. Toplam Çözünabilir Şeker İçeriğinin Belirlenmesi

S. hieraciifolia'nın kuru örnekleri (0.1 g), havanda 5 mL %70'lik etanol ile ezilerek homojen hale getirildi ve karışım tüplere aktarılarak 80 °C'de 3 dk. boyunca kaynatıldı. Daha sonra örnekler 10.000 g'de 5 dk. santrifüj edildi. Ölçüm için 100 µL süpernatant üzerine 900 µL saf su eklenerek seyreltilme işlemi yapıldı ve 1 mL %5 fenol ve 5 mL %96 sülfürik asit ilave edilerek karışım vorteks yardımıyla homojen hale getirildi. Karışım tüplere alındı ve oda sıcaklığında bekletilerek soğutuldu. Örneklerin toplam çözünabilir şeker içerikleri 490 nm'de okundu. Standart glukoz konsantrasyonu 20 µg mL⁻¹ olacak şekilde hazırlandıktan sonra absorbanı ölçüldü (Dubois, 1956).

2.4.7. İyon Konsantrasyonlarındaki Değişimler

S. hieraciifolia bitki ekstraktları (1g) kullanılarak, Dionex ICS-5000 sistemi ile anyon-kasyon analizleri yapıldı (Haddad ve Jackson, 1990). Klorür anyon iyon içeriği analizi Dionex Ion Pac AS 9 HC (4x250 mm) ayırım kolonu ve 10 mM sodyum karbonat akışkan faz (akış hızı: 1 mL/dk.) ile gerçekleştirildi. Kasyon iyon (sodyum, potasyum, magnezyum, kalsiyum) içeriklerinin analizi ise, Dionex Ion Pac CS 12 A (3x150 mm) kolonu ve 20 mM metasülfonikasit yürütücü fazı (akış hızı: 0,5 mL/dk.) ile gerçekleştirildi. Kasyon baskılayıcı kolon olarak Dionex CERS 500 (2 mm) ve anyon baskılayıcı kolon olarak Dionex AERS 500 (4 mm) kullanıldı. Numuneler oto örnekleyici ile 20 µL hacimlerde kolona verildi.

Sistemde Thermo Scientific iletkenlik dedektörü kullanıldı ve Chromeleon yazılım sistemi ile hesaplamalar yapıldı.

2.4.8. Süperoksit İçeriğinin Belirlenmesi

Süperoksit içeriği XTT {(2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino) carbonyl] -2H-tetrazolium hydroxide} kullanılarak Schopfer vd., 'a (2001) göre belirlendi. *S. hieraciifolia* sürgünlerinden 0,5 g alınarak küçük parçalara ayrıldı ve 3,5 unite mL⁻¹ süperoksit dismutaz (SOD) içeren ve içermeyen 5 ml 500 µM XTT içeren, 10 mM Na-sitrat tamponunda (pH 7,0) karanlıkta vakum infiltrasyonu yapıldı. Numuneler 2 saat bu tamponda bekletildi. Daha sonra sürgünlerdeki XTT indirgenmesindeki artış 470 nm'de spektrofotometrede okundu.

2.4.9. 3,3' Diaminobenzidin Boyaması ile H₂O₂ İçeriğinin Belirlenmesi

Sürgün dokusunda H₂O₂ birikiminin belirlenmesi için 3,3' Diaminobenzidin (DAB) boyama protokolü Daudi vd. (2012)'nin methoduna göre modifiye edildi. *S. hieraciifolia* sürgünleri 0.05% v/v Tween 20 ve 10 mM sodyum fosfat tamponunda (pH 7.0) hazırlanan DAB'a maruz bırakıldı. Sonrasında sürgünler test tüplerine yerleştirilerek standart laboratuvar sallayıcısında 80–100 rpm'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında, sürgünler su banyosunda 90–95 °C de 15±5 dk. ağartma solüsyonunda (etanol: asetik aist: gliserol, 3:1:1) kaynatıldı. Sürgünler taze ağartma solüsyonunda 30 dk. bekletildi ve renk değişimleri gözlemlendi.

2.4.10. Enzimatik Antioksidan Aktivitelerinin Tayini

2.4.10.1. Enzimlerin Ekstraksiyonu

S. hieraciifolia sürgünlerinden 0,1 g tartıldı ve sıvı azot içerisinde un haline getirildi. Daha sonra 2 mL ekstraksiyon tamponu (50mM K₂HPO₄, 1 mM EDTA pH 7,0, %1 PVPP) içerisinde ekstrakte edildi. Ekstrakt 4 °C'de 20000 g'de 20 dk. santrifüj edildi ve enzim aktivitelerinde kullanılmak üzere süpernatantlar alındı.

2.4.10.2. Süperoksit Dismutaz Aktivitesi Tayini

Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi, Beauchamp ve Fridovich'e (1971) göre, 1 mL reaksiyon karışımına (50 µL ekstrakt, 13 mM metiyonin, 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7,8), 0,1 mM EDTA, 75 µM nitro blue tetrazolyum) 2 µM riboflavin eklendi, sonra 10 dk. boyunca 375 µmol m⁻² s⁻¹ şiddetinde beyaz ışıktaki bekletildi ve 560 nm'de absorbans değerleri kaydedildi.

2.4.10.3. Katalaz Aktivitesi Tayini

Katalaz (CAT) aktivitesi, Aebi'nin (1983) methoduna göre ölçüldü. Enzim aktivitesi, 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7,0), 30 mM H₂O₂ ve 20 µL enzim ekstraktı içeren 1 mL'lik reaksiyon karışımının 240 nm'de 5 dk. aralıklarla ölçüldü.

2.4.10.4. Guaikol Peroksidaz Aktivitesi Tayini

Guaikol peroksidaz (GPOD) Urbanek vd., 'nin (1991) yöntemi baz alınarak belirlendi. 2 mL'lik reaksiyon karışımı (100 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7,0), 5 mM guaiakol, 15 mM H₂O₂, 0,1 mM EDTA ve 50 µL enzim ekstrakt) 470 nm'de 1 dk. süreyle ölçülerek enzim aktivitesi belirlendi.

2.4.10.5. Askorbat Peroksidaz Aktivitesi Tayini

Askorbat peroksidaz (APX) aktivitesi, 290 nm'deki absorbansa bağlı azalışa göre belirlendi (Nakano ve Asada, 1981). 1 mL'lik reaksiyon karışımının (20µL enzim ekstraktı, 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7,0), 250 µM askorbat (ASC) ve 5 mM H₂O₂) ölçülmesiyle enzim aktivitesi belirlendi ve epsilon katsayısı 2,8 mM⁻¹cm⁻¹ olacak şekilde 290 nm'de ASC için hesaplandı.

2.4.10.6. Glutasyon Redüktaz Aktivitesi Tayini

Glutasyon redüktaz (GR) aktivitesi Foyer ve Halliwell'e (1976) göre, 200 µL 0,5 mM EDTA içerisinde hazırlanmış 50 mM Tris-HCl (pH 7,8), 250 µl GSSG ve 500 µL NADPH ihtiva eden karışıma 50 µL enzim ekstraktı eklenerek NADPH'in oksidasyonu 340 nm'de 5 dk. boyunca azalışa göre hesaplandı.

2.4.11. Bazı Enzimatik Olmayan Antioksidan İçeriklerinin Belirlenmesi

2.4.11.1. Askorbat İçeriğinin Belirlenmesi

Askorbat konsantrasyonu Liso vd.'nin (1984) methoduna göre belirlendi. *S. hieraciifolia* sürgünlerinden 0,25 g numune tartılarak, 5 mL, %5 (w/v) *m*-fosforik asit ile homojenizasyon gerçekleştirildi. Ekstrakt 10,000 g'de 4 dk. santrifüj edilerek, 70 µL'lik örnek 0,1 M sitrat-0,2 M fosfat tamponu (pH 6,2) içeren 3 mL reaksiyon ortamına ilave edildi. Başlangıç absorbansı 265 nm'de okundu, askorbat konsantrasyonu, reaksiyon ortamına iki ünite askorbat oksidaz ilavesinin 5 dk. ardından meydana gelen azalmanın okunması ile belirlendi. Askorbat oksidasyonu tamamlandıktan sonra, askorbat oksidaz, 10 mM sodyum azit ile inhibe edildi. Ardından ortama 2,5 mM dithiothreitol (DTT) ilave edildi. DTT ile meydana gelen indirgenmenin ardından (3 dk.) absorbans 265 nm de yeniden okundu. DHAR ve ASC içermeyen radikaller başlangıç ve son absorbanslar arasındaki farktan belirlendi (Takahama ve Oniki, 1994). Askorbat içeriğinin hesaplanmasında kullanılan standart eğri grafiği Ek 3'te belirtildi.

2.4.11.2. Glutasyon İçeriğinin Belirlenmesi

S. hieraciifolia sürgün örnekleri (0,5 g) tartılarak, 5 mL, 1 mM EDTA içeren %5'lik metafosforik asit içerisinde ekstrakte edildi. Ekstrakt 4 °C'de 10.000 g'de 10 dk. santrifüj edildi. Süpernatant glutasyon içeriğinin belirlenmesi için kullanıldı. Glutasyon içeriği "Total Glutasyon Assay Kit" (Northwest Life Sci. Spec) ile Teitze'ye (1969) göre belirlendi. Glutasyon 250 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄ (pH 7,5), 200 µM NADPH, 600 µM DTNB, 25 µL ekstrakt ve 0,3 U GR içeren reaksiyon karışımının kullanılmasıyla ölçüldü. 412 nm'de

absorbanstaki değişim 3 dk. boyunca gözlemlendi. Glutatyon içeriği 0-5 μ M konsantrasyonlarda GSH standart grafiği üzerinden hesaplandı (Ek 4).

2.4.12. Antioksidan Enzimlerin Protein Miktarındaki Değişimlerin Western Blot Yöntemiyle Belirlenmesi

SOD, CAT, GPX ve GR için protein ekstraksiyonu 4X PEB (protein ekstraksiyon tamponu, AS08 300 Agrisera Inc.) kullanılarak gerçekleştirildi. Numuneler eşit hacimde örnek tamponunda (2X Laemmli örnek tamponu 1610737 Bio-Rad) çözdürölüp 95°C’de 5 dk. ısıtıldı. Örneklerin toplam proteinleri her bir örnekten 30 μ g olacak şekilde Bradford’a (1976) göre hesaplandı ve %12 sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi SDS-PAGE (TGX Stain-Free Precast Protein Gels, 4568095 Bio-Rad) ile ayrılması oda sıcaklığında elektroforez işlemi (Mini- PROTEAN Tetra Cell system, 165800 Bio-Rad) ile gerçekleştirildi. Proteinlerin moleküler ağırlıklarının belirlenmesi için renkli protein marker (Precision Plus Protein Western C Blotting Standards, 1610376 Bio-Rad) kullanıldı. Jel elektroforezinde ayrılan proteinler 10 dk. süreyle 2.5 A’da Trans-Blot Turbo Transfer Sistem (1704155 Bio-Rad) cihazı kullanılarak PVDF membrana (Trans-Blot Turbo Mini PVDF Transfer Packs, 1704156 Bio-Rad) aktarıldı. Transfer sonrasında membran, TBS içerisinde %2,5 yağsız kuru süt tozu ile 4°C derecede blotlandı. Enzimlerin tespitinde SOD için FeSOD Chloroplastic Fe-dependent superoxide dismutase (A S06 125), GPX için glutathione peroxidase 1 (A S04 055), CAT için Catalase (peroxisomal marker) (A S09 501) ve GR için glutathione reductase (ab84963) primer antikorları kullanıldı ve bir gece boyunca 4°C’de inkübe edildi. Bir gece sonunda, membranlar goat anti-rabbit IgG-HRP secondary antibodies (AS09 602 Agrisera) konjuge horseradish peroksidaz ile 4 saat sallayıcıda inkübasyona bırakıldı. SOD CAT, GPX ve GR immünokimyasal tespiti, peroksidaza bağlanmış ECL kemilüminesans kiti (Clarity Western Enhanced Chemiluminescence, 1705061 Bio-Rad) ile gerçekleştirildi. Taranan bantların yoğunluğu Image Lab Software (1709690, Bio-Rad) programı ile gösterildi.

2.4.12.1. Protein Tayini

Bradford (1976) yöntemine göre bovin serum albumin standartları hazırlandı ve Coomassie Brilliant Blue G250 kullanılarak protein içerikleri 595 nm’de ölçüldü. Protein

miktarları mg cinsinden hesaplanarak hem enzim aktivitelerinin ölçümünde hem de western blot analizlerinde kullanıldı. Protein içeriklerinin hesaplanmasında kullanılan standart eğri grafiği Ek 5'deki gibi sunulmuştur.

2.5. İstatistiksel Analizler

Her bir parametre en az 4 tekrar olacak şekilde yapıldı. Elde edilen veriler, bilgisayar ortamında Windows tabanlı Statistic Package for Social Sciences (SPSS) programında one-way ANOVA varyans analiz testleri (Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi) ile değerlendirildi. $P < 0,05$ olan değerler istatistiksel bakımdan anlamlı kabul edildi. Bütün şekillerdeki hata çubukları ortalama \pm standart sapma (S.S.)'yı göstermektedir ve çizelgelerdeki değerler ortalama \pm S.S. şeklinde verildi.

3. BULGULAR

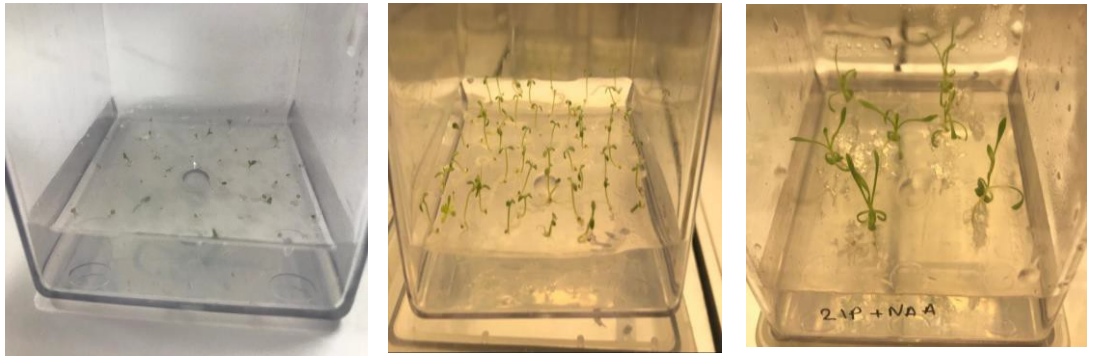
3.1. *Scorzonera hieraciifolia*'nın Ekstrem Halofit Olma Özelliğinin Belirlenmesi

3.1.1. Morfolojik Gözlemler

Scorzonera hieraciifolia akenleri ve *Eutrema parvulum* tohumları kontrollü koşullarda bitki büyütme kabininde çimlendirilip sırasıyla 30 ve 20 gün büyütüldü. (Şekil 5, 6). *S. hieraciifolia* ve *E. parvulum* bitkileri doku kültüründe 7 gün boyunca 0, 150, 300, 450 ve 600 mM olacak şekilde farklı tuz konsantrasyonlarına maruz bırakıldı ve morfolojik değişimler gözlemlendi (Şekil 7, 8).



Şekil 5. *Scorzonera hieraciifolia* akenlerinin magenta içerisinde çimlenme ve sürgün gelişimi

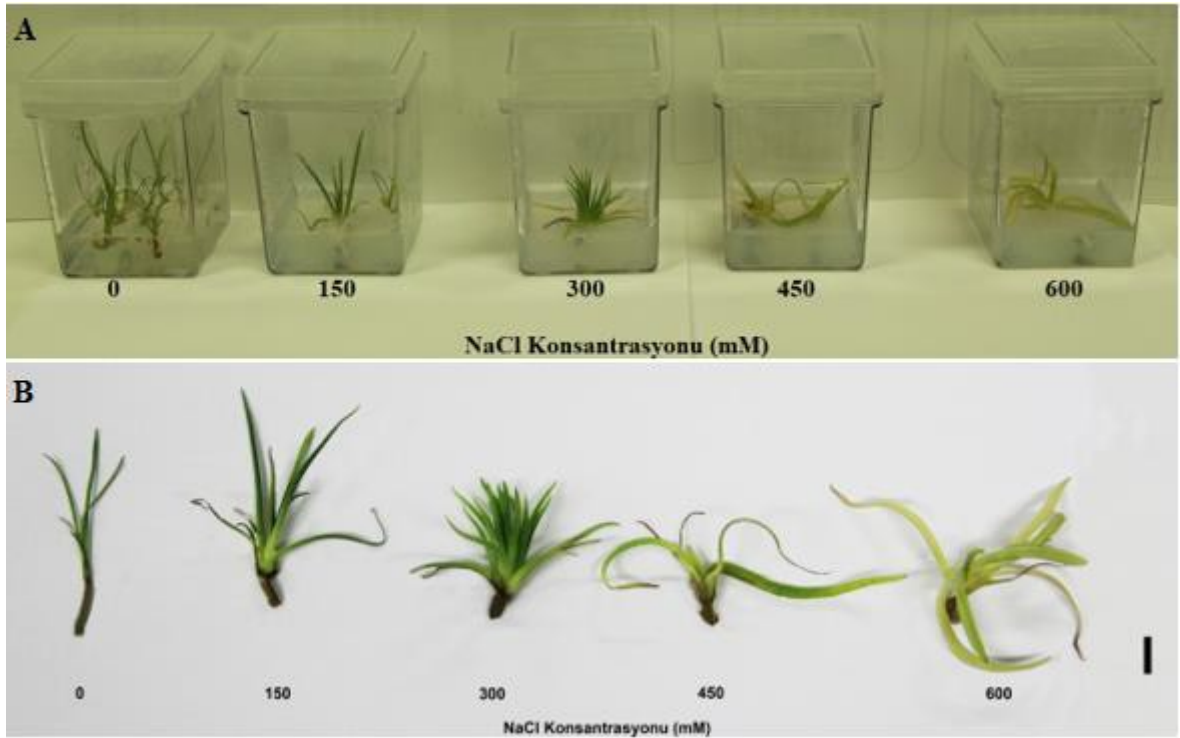


Şekil 6. *Eutrema parvulum* tohumlarının magenta içerisinde çimlenme ve sürgün gelişimi

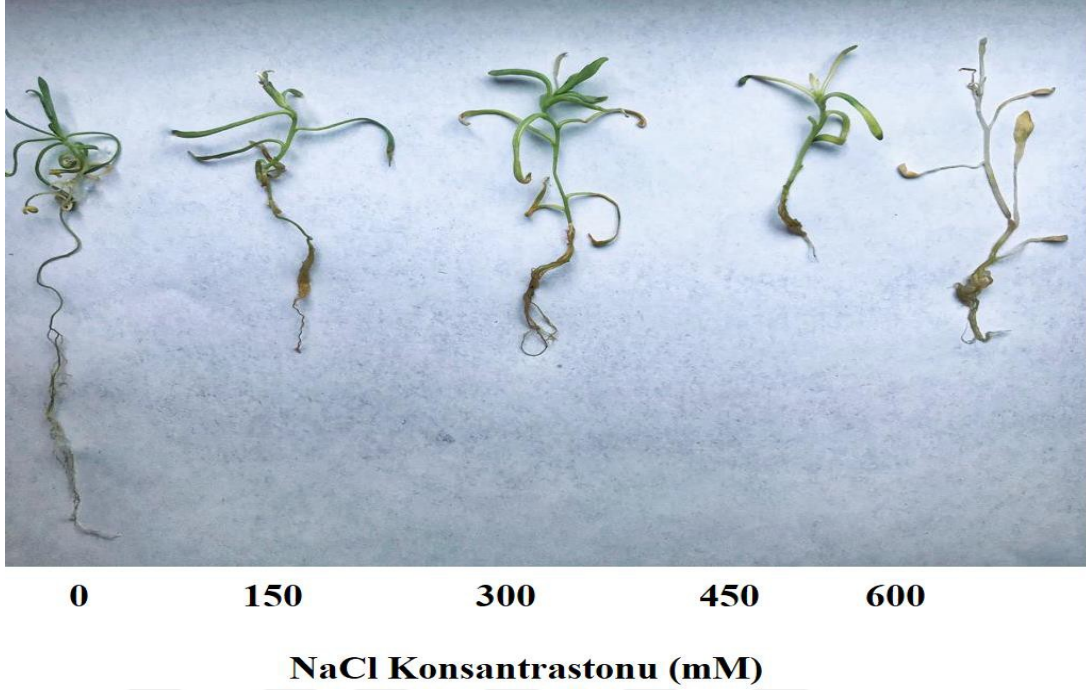
Scorzonera hieraciifolia sürgünlerinde kontrole göre tuz konsantrasyonu arttıkça sukkulentliğin arttığı görüldü. 300 mM tuz konsantrasyonunda sürgün boyunun kısaldığı ve

sürgün sayısının arttığı belirlendi. 600 mM tuz uygulamasıyla sürgünlerde klorofil kaybı (klorozis) görülmesine rağmen, bitkilerin yine de hayatta kaldığı tespit edildi (Şekil 7).

Eutrema parvulum'da ise kontrol grubuna göre 300 mM tuz uygulamasının yaprak yüzeyini arttırdığı ve bitkide optimum büyümenin bu konsantrasyonda meydana geldiği gözlemlendi. Bununla birlikte, 450 mM tuz uygulamasıyla klorozis başlamasına rağmen bitkinin canlılığını koruduğu tespit edildi. Ancak 600 mM tuz uygulamasıyla bitkinin yaşamını sürdüremediği belirlendi (Şekil 8).



Şekil 7. Farklı tuz konsantrasyonları içeren doku kültürü ortamında büyütülen *Scorzonera hieraciifolia*'daki morfolojik değişimler. (A) magenta içerisindeki görüntüsü (B) dış ortamdaki görüntüsü. Bar: 1 cm



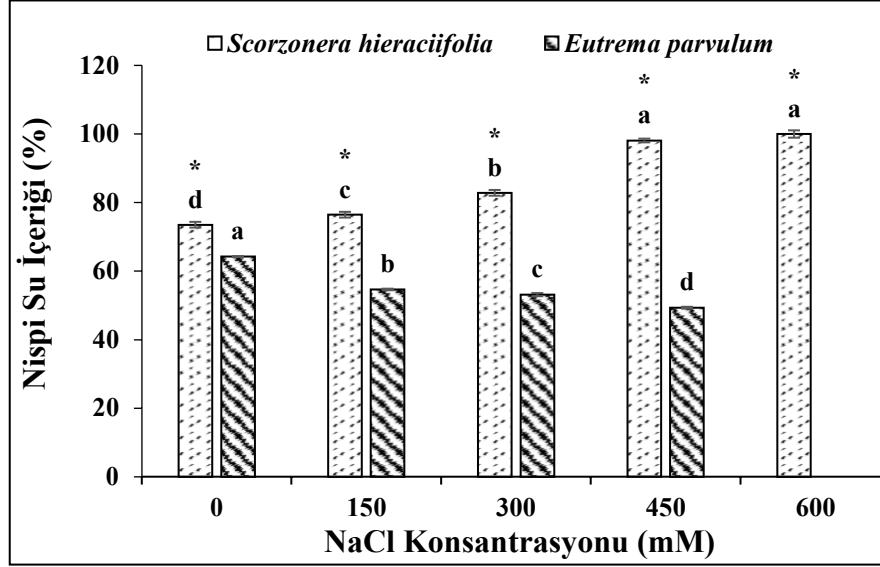
Şekil 8. Farklı tuz konsantrasyonları içeren doku kültürü ortamında büyütülen *Eutrema parvulum*'daki morfolojik değişimler. Bar: 1 cm

3.1.2. Bazı Stres Parametrelerindeki Değişimler

3.1.2.1. Nispi Su İçeriği

Scorzonera hieraciifolia'daki NSİ'nin 150-600 mM tuz uygulanmış sürgünlerde kontrole göre arttığı belirlendi. En yüksek NSİ değeri 450 ve 600 mM tuz uygulanmış sürgünlerde kaydedildi (Şekil 9).

Eutrema parvulum'daki NSİ'nin ise 150-600 mM tuz uygulanmış sürgünlerde azaldığı tespit edildi. En düşük NSİ 450 mM tuz uygulanmış sürgünlerde belirlendi (Şekil 9).

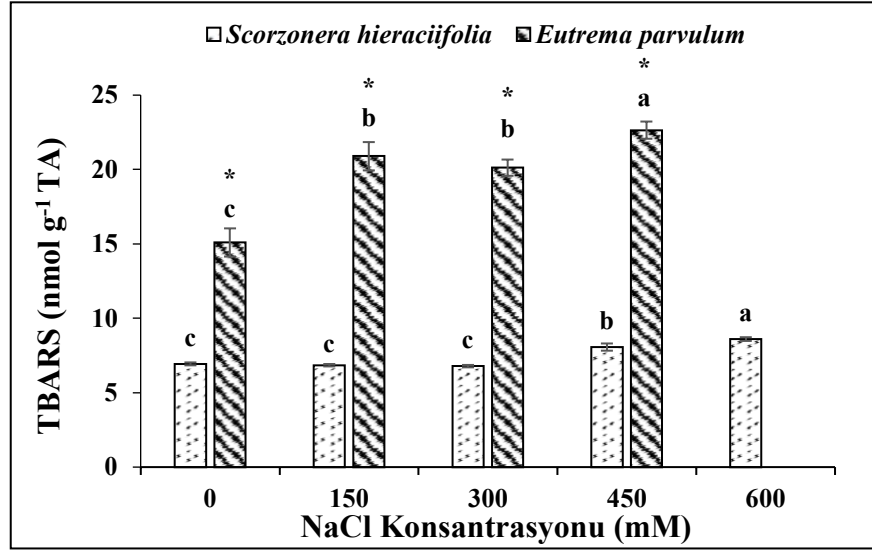


Şekil 9. *Scorzonera hieraciifolia* ve *Eutrema parvulum*'da farklı tuz uygulamalarının nispi su içeriği (%) üzerine etkisi. Barlar ortalamalara ait standart sapmayı göstermektedir (n=3). Sütunlar üzerindeki farklı harfler uygulamalar arasındaki önemli farkları ($P \leq 0.05$) göstermektedir. (*) Bitkiler arasında istatistikî açıdan önemli farklılıkları göstermektedir.

3.1.2.2. Lipid Peroksidasyonu

S. hieraciifolia'daki TBARS içeriğinin 150 ve 300 mM tuz uygulanmış sürgünlerde kontrole göre değişmediği tespit edildi. İlginç şekilde, 450 ve 600 mM tuz uygulanmış bitkilerde TBARS içeriğinin arttığı belirlendi. En yüksek TBARS içeriği 600 mM tuz uygulanmış sürgünlerde görüldü (Şekil 10).

E. parvulum'daki TBARS içeriğinin ise 150, 300 ve 450 mM tuz uygulanmış sürgünlerde kontrole göre arttığı tespit edildi. En yüksek TBARS içeriği 450 mM tuz uygulamasıyla kaydedildi (Şekil 10).

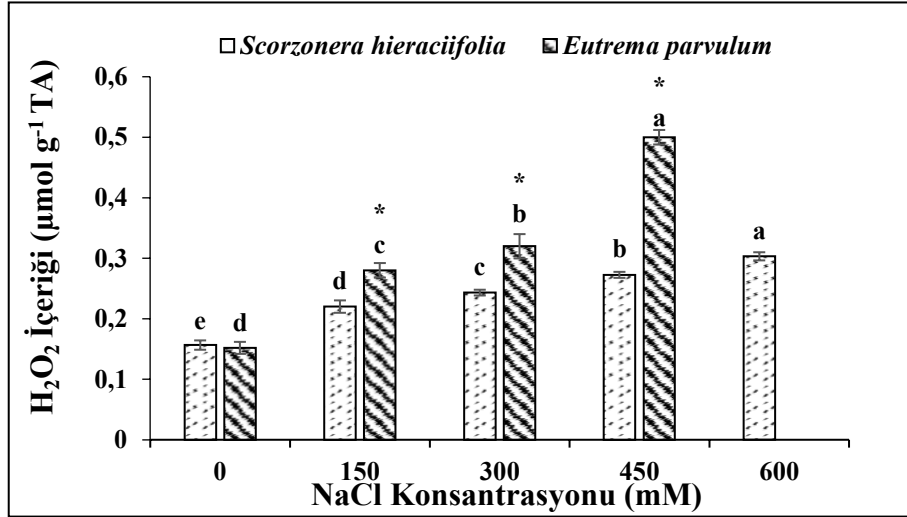


Şekil 10. *Scorzonera hieraciifolia* ve *Eutrema parvulum*'da farklı tuz uygulamalarının TBARS içeriği üzerine etkisi. Barlar ortalamalara ait standart sapmayı göstermektedir (n=3). Sütunlar üzerindeki farklı harfler uygulamalar arasındaki önemli farkları ($P \leq 0.05$) göstermektedir. TA: Taze ağırlık. (*) Bitkiler arasında istatistiki açıdan önemli farklılıkları göstermektedir.

3.1.2.3. Hidrojen Peroksit İçeriği

S. hieraciifolia'daki H_2O_2 içeriğinin 150-600 mM tuz uygulanmış bitkilerde kontrol grubuna göre arttığı tespit edildi. En yüksek H_2O_2 içeriği 600 mM tuz uygulanmış bitkilerin sürgünlerinde belirlendi (Şekil 11).

Benzer şekilde *E. parvulum*'daki H_2O_2 içeriğinin 150-600 mM tuz uygulanmış sürgünlerde arttığı kaydedildi. En yüksek H_2O_2 seviyesi 450 mM tuz uygulanmış sürgünlerde belirlendi (Şekil 11).

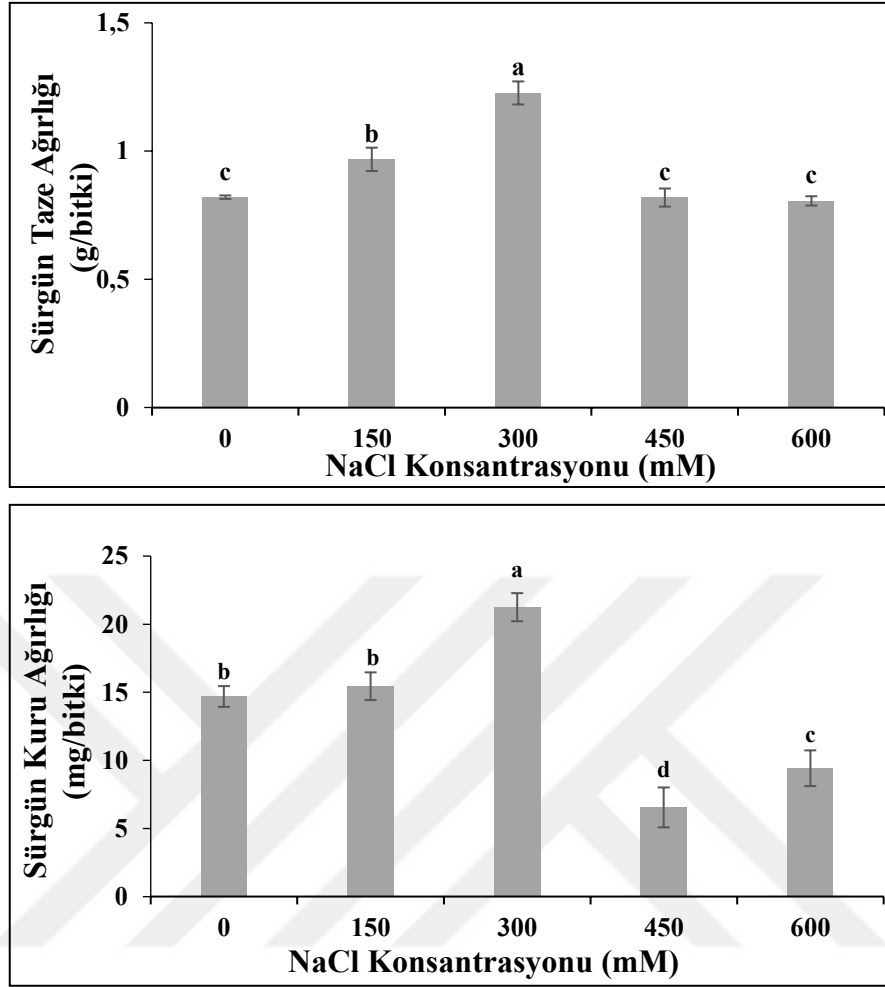


Şekil 11. *Scorzonera hieraciifolia* ve *Eutrema parvulum*'da farklı tuz uygulamalarının H₂O₂ içeriği üzerine etkisi. Barlar ortalamalara ait standart sapmayı göstermektedir (n=3). Sütunlar üzerindeki farklı harfler uygulamalar arasındaki önemli farkları (P≤0.05) göstermektedir. TA: Taze Ağırlık. (*) Bitkiler arasında istatistiki açıdan önemli farklılıkları göstermektedir.

3.1.2.4. Sürgün Taze Ağırlığı ve Kuru Ağırlığı

S. hieraciifolia'nın sürgün taze ağırlığının 150 ve 300 mM tuz uygulanmış bitkilerde kontrole göre önemli derecede arttığı belirlendi. Bununla beraber, 450 ve 600 mM tuz uygulanmış bitkilerin sürgün taze ağırlığının kontrol grubuna göre değişmediği tespit edildi (Şekil 12).

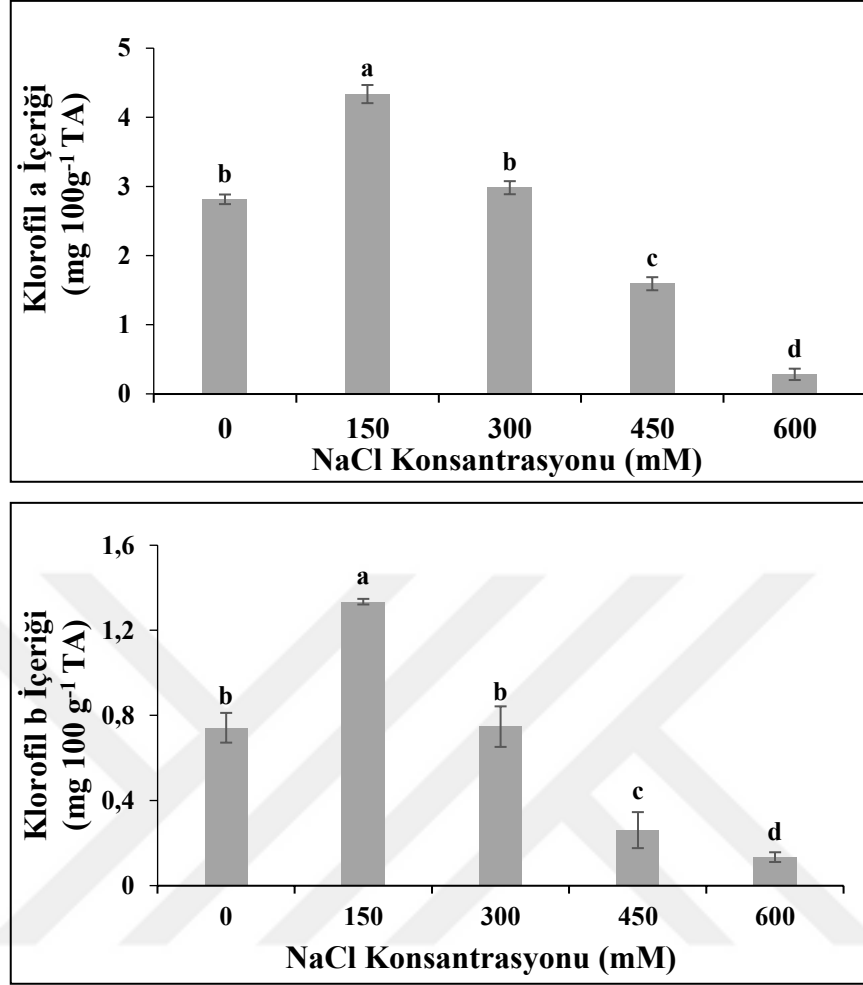
S. hieraciifolia'nın kuru ağırlığının 150 mM tuz uygulanmış sürgünlerde kontrole göre değişmediği kaydedildi. İlginç bir şekilde, 300 mM tuz uygulanmış sürgünlerde kuru ağırlığın önemli derecede arttığı görüldü. Bununla beraber, 450 ve 600 mM tuz uygulanmış bitkilerde sürgün kuru ağırlığının azaldığı belirlendi. (Şekil 12).



Şekil 12. *S. hieraciifolia*'da farklı tuz uygulamalarının sürgün taze ağırlığı ve kuru ağırlığı üzerine etkisi. Barlar ortalamalara ait standart sapmayı göstermektedir (n=3). Sütunlar üzerindeki farklı harfler uygulamalar arasındaki önemli farkları ($P \leq 0.05$) göstermektedir.

3.1.2.5. Klorofil a ve Klorofil b İçerikleri

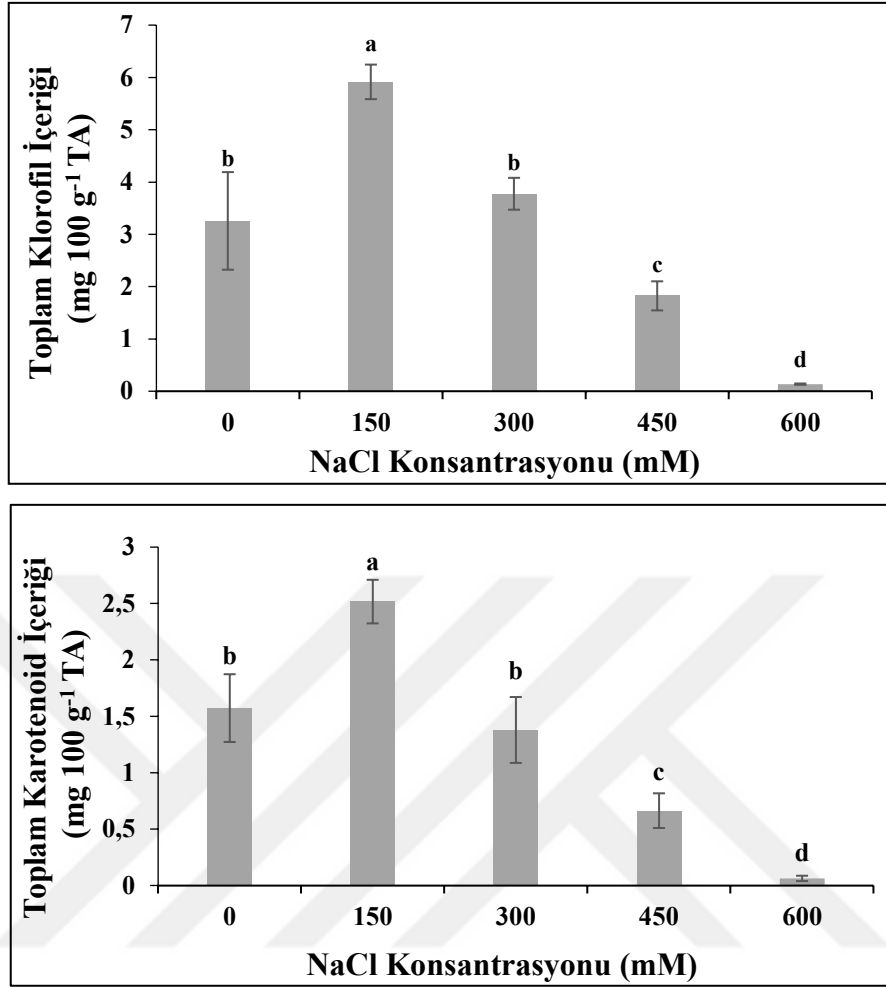
S. hieraciifolia'nın sürgünlerinde yapılan denemeler sonucunda, klorofil a ve b içeriklerinin kontrol grubuna göre 150 mM tuz uygulanmış sürgünlerde istatistik olarak anlamlı bir biçimde arttığı kaydedildi. İlginç bir şekilde 300 mM tuz uygulanmış sürgünlerin klorofil a ve b içeriklerinde kontrole göre bir değişiklik görülmedi. Bununla beraber, 450 ve 600 mM tuz uygulanmış sürgünlerde klorofil a ve b içeriklerinin kontrole göre önemli derecede azaldığı tespit edildi. En düşük klorofil a ve b içeriği 600 mM tuz uygulanmış sürgünlerde belirlendi (Şekil 13).



Şekil 13. *S. hieraciifolia*'da farklı tuz uygulamalarının klorofil a ve klorofil b içerikleri üzerine etkisi. Barlar ortalamalara ait standart sapmayı göstermektedir (n=3). Sütunlar üzerindeki farklı harfler uygulamalar arasındaki önemli farkları ($P \leq 0.05$) göstermektedir. TA: Taze Ağırlık

3.1.2.6. Toplam Klorofil ve Karotenoid İçerikleri

Toplam klorofil ve karotenoid içeriklerinin kontrole göre 150 mM tuz uygulanmış sürgünlerde önemli derecede arttığı kaydedildi. Bununla beraber, 300 mM tuz uygulanmış sürgünlerde kontrol grubuna göre toplam klorofil ve karotenoid içeriklerinin değişmediği tespit edildi. İlginç şekilde 450 ve 600 mM tuz uygulanmış sürgünlerde toplam klorofil ve karotenoid içeriğinin önemli derecede azaldığı görüldü (Şekil 14).



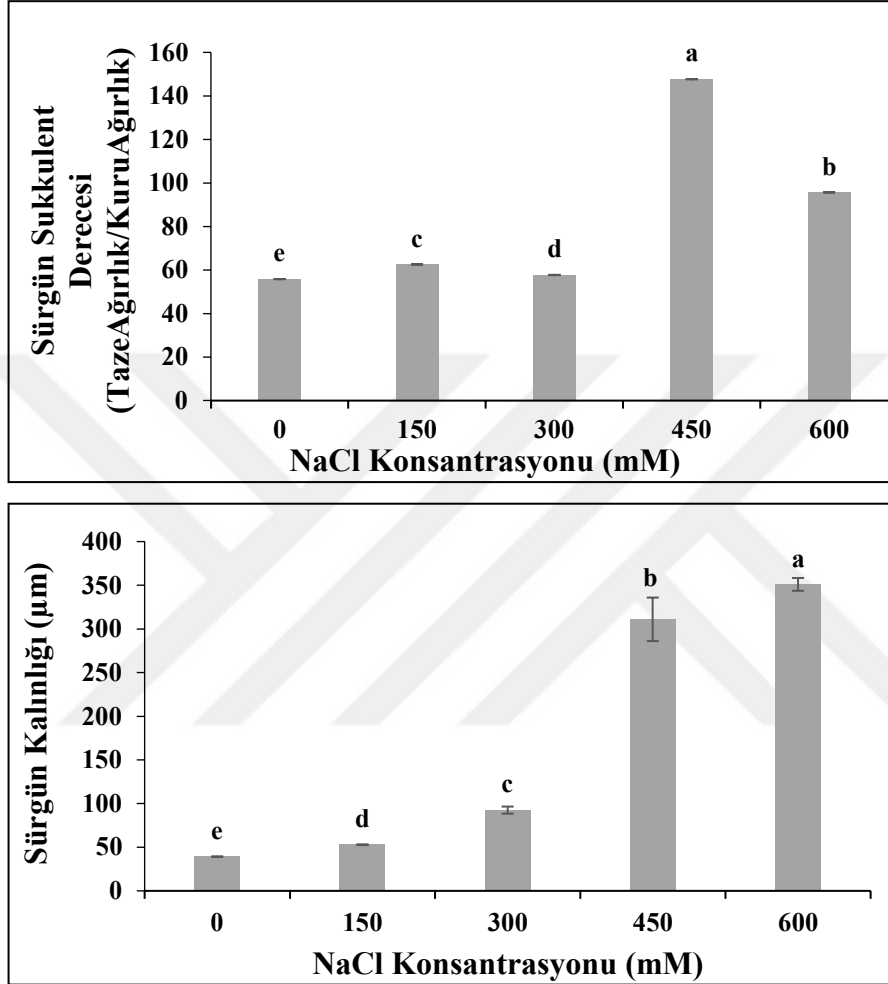
Şekil 14. *S. hieraciifolia*'da farklı tuz uygulamalarının toplam klorofil ve toplam karotenoid içerikleri üzerine etkisi. Barlar ortalamalara ait standart sapmayı göstermektedir (n=3). Sütunlar üzerindeki farklı harfler uygulamalar arasındaki önemli farkları ($P \leq 0.05$) göstermektedir. TA: Taze Ağırlık

3.2. *Scorzonera hieraciifolia*'nın Tuza Tolerans Mekanizması

3.2.1. Sürgün Sukkulentlik Derecesi ve Sürgün Kalınlığı

Scorzonera hieraciifolia'nın sürgün sukkulentlik derecesinin 150-600 mM tuz uygulanmış fidelerde kontrol grubuna göre arttığı görüldü. En yüksek sukkulentlik derecesi 450 mM tuz uygulanmış bitkilerde belirlendi (Şekil 15).

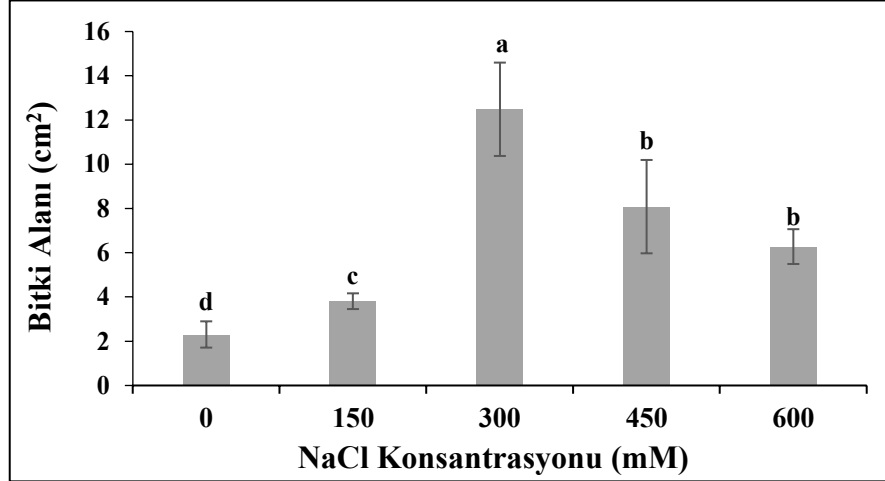
Scorzonera hieraciifolia'nın sürgün kalınlığının ise artan tuza bağlı olarak kontrole göre arttığı tespit edildi. En fazla sürgün kalınlığı 600 mM tuz uygulanmış sürgünlerde gözlemlendi (Şekil 15).



Şekil 15. *S. hieraciifolia*'da farklı tuz uygulamalarının sürgün sukkulentlik derecesi ve sürgün kalınlığı üzerine etkisi. Barlar ortalamalara ait standart sapmayı göstermektedir (n=3). Sütunlar üzerindeki farklı harfler uygulamalar arasındaki önemli farkları ($P \leq 0.05$) göstermektedir.

3.2.2. Bitki Alanı

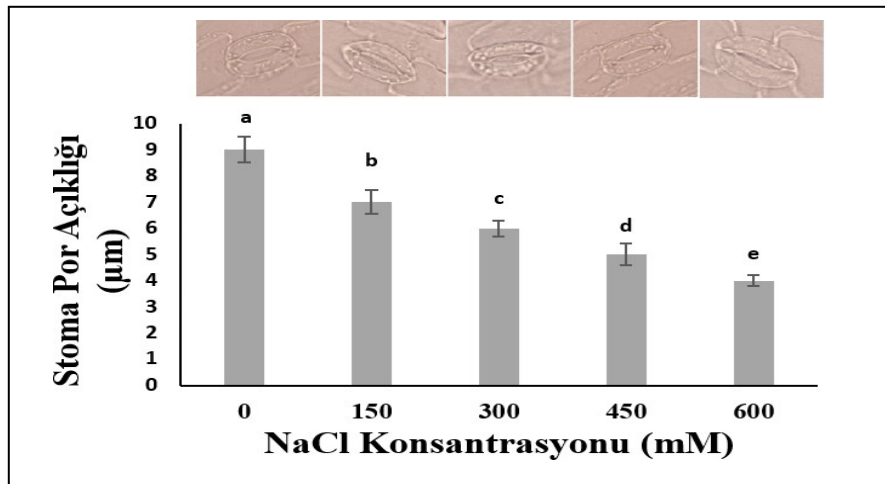
Analizler sonucunda bitki alanının kontrole göre 150-600 mM tuz uygulanmış bitkilerde arttığı tespit edildi. En yüksek bitki alanı 300 mM tuz uygulanmış bitkilerde belirlendi (Şekil 16).



Şekil 16. *S. hieraciifolia*'da farklı tuz uygulamalarının bitki alanı üzerine etkisi. Barlar ortalamalara ait standart sapmayı göstermektedir (n=3). Sütunlar üzerindeki farklı harfler uygulamalar arasındaki önemli farkları ($P \leq 0.05$) göstermektedir.

3.2.3. Stoma Por Açıklığındaki Değişimler

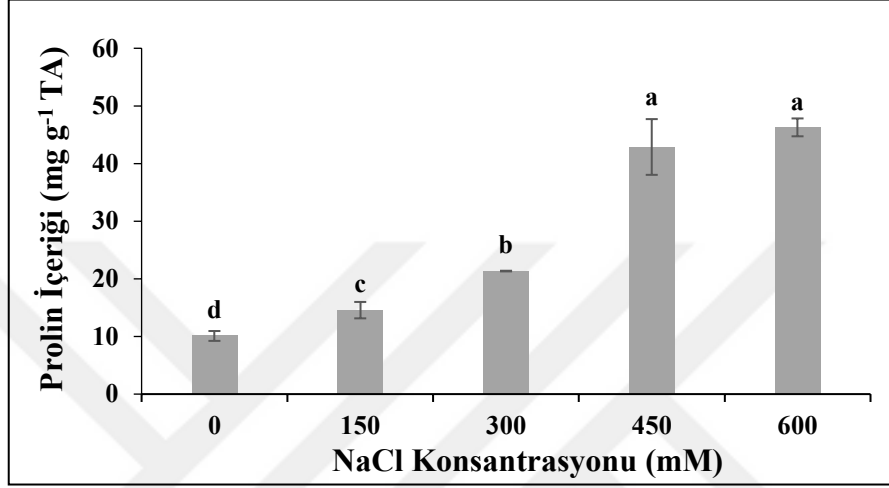
Sürgünlerde yapılan analizler sonucunda, stoma por açıklığının kontrole göre 150-600 mM tuz uygulanmış bitkilerde azaldığı kaydedildi. En yüksek azalış 600 mM tuz uygulanmış bitkilerde tespit edildi (Şekil 17).



Şekil 17. *S. hieraciifolia*'da farklı tuz uygulamalarının stoma por açıklığı üzerine etkisi. Barlar ortalamalara ait standart sapmayı göstermektedir (n=3). Sütunlar üzerindeki farklı harfler uygulamalar arasındaki önemli farkları ($P \leq 0.05$) göstermektedir.

3.2.4. Prolin İçeriği

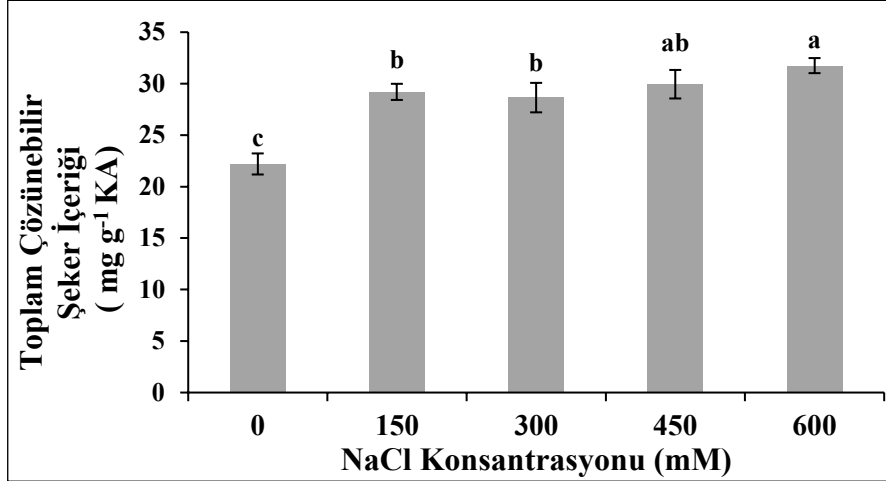
Analizler sonucunda, *S. hieraciifolia*'daki prolin içeriğinin 150-600 mM tuz uygulanmış bitkilerde kontrole göre arttığı tespit edildi. En yüksek prolin içeriği 450 ve 600 mM tuz uygulanmış sürgünlerde kaydedildi (şekil 18).



şekil 18. *S. hieraciifolia*'da farklı tuz uygulamalarının prolin içeriği üzerine etkisi. Barlar ortalamalara ait standart sapmayı göstermektedir (n=3). Sütunlar zerindeki farklı harfler uygulamalar arasındaki önemli farkları ($P \leq 0.05$) göstermektedir. TA: Taze ağırlık

3.2.5. Toplam znebilir şeker İçeriği

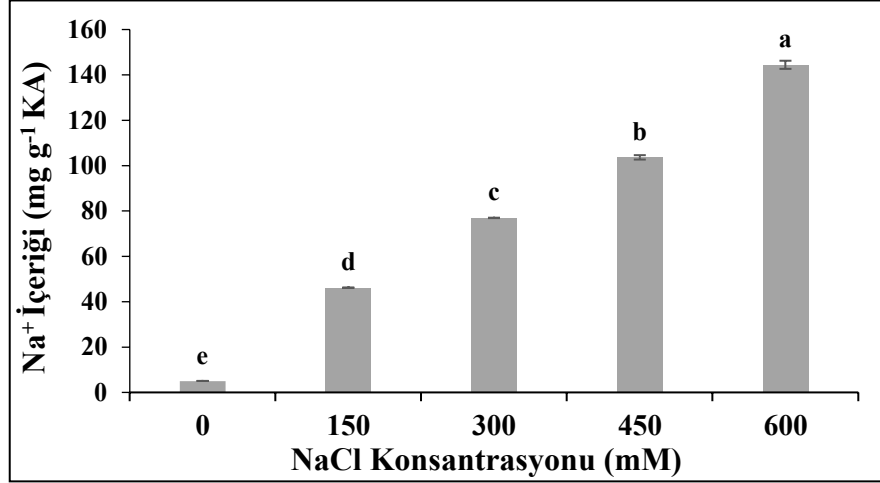
Toplam znebilir şeker içeriğinin 150-600 mM tuz uygulanmış sürgünlerde kontrole göre arttığı tespit edildi. En yüksek toplam çözünebilir şeker içeriği 600 mM tuz uygulanmış sürgünlerde kaydedildi (şekil 19).



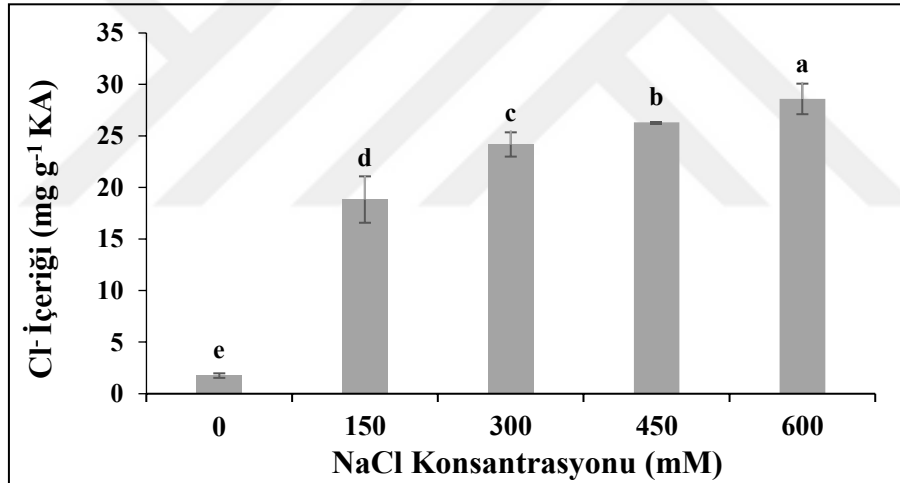
Şekil 19. *S. hieraciifolia*'da farklı tuz uygulamalarının toplam çözünebilir şeker içeriği üzerine etkisi. Barlar ortalamalara ait standart sapmayı göstermektedir (n=3). Sütunlar üzerindeki farklı harfler uygulamalar arasındaki önemli farkları ($P \leq 0.05$) göstermektedir. KA: Kuru Ağırlık

3.2.6. İyon Konsantrasyonlarındaki Değişimler

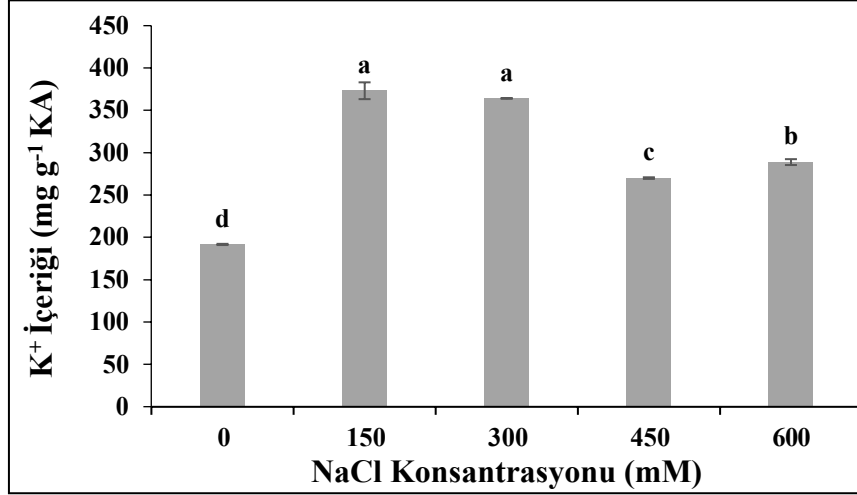
Scorzonera hieraciifolia'daki sürgünlerin Na^+ içeriğinin artan tuz konsantrasyonuna bağlı olarak kontrole göre arttığı tespit edildi. En yüksek Na^+ içeriği 600 mM tuz uygulanmış bitkilerde tespit edildi. (Şekil 20). Benzer şekilde sürgünlerdeki Cl^- içeriğinin tuz konsantrasyonuna bağlı olarak arttığı kaydedildi. En yüksek Cl^- içeriği de 600 mM tuz uygulanmış fidelerde belirlendi (Şekil 21). K^+ içeriğinin ise kontrole göre 150-600 mM tuz uygulanmış bitkilerde arttığı görüldü. En yüksek K^+ içeriği 150 ve 300 mM tuz uygulanmış bitkilerde tespit edildi (Şekil 22). Benzer şekilde Mg^{+2} ve Ca^{+2} iyon içeriklerinin kontrole göre 150-600 mM tuz uygulanmış bitkilerde arttığı tespit edildi (Şekil 23,24).



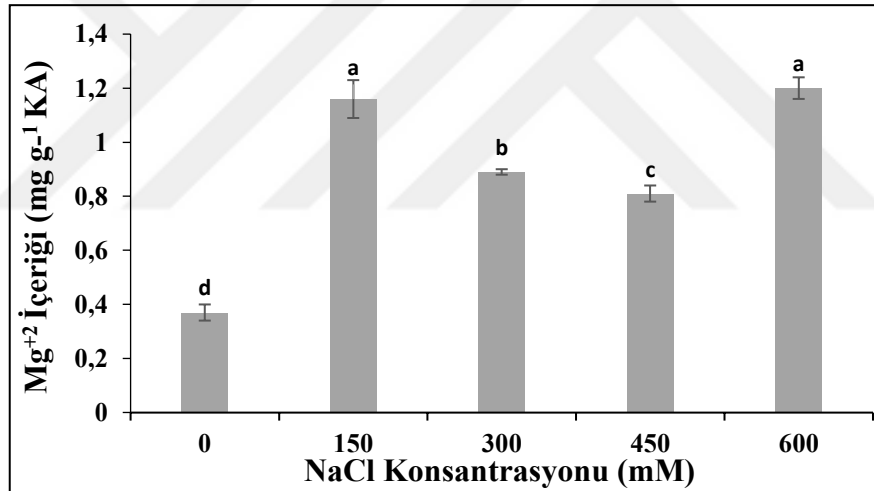
Şekil 20. *S. hieraciifolia*'da farklı tuz uygulamalarının Na⁺ içeriği üzerine etkisi. Barlar ortalamalara ait standart sapmayı göstermektedir (n=3). Sütunlar üzerindeki farklı harfler uygulamalar arasındaki önemli farkları (P≤0.05) göstermektedir. KA: Kuru Ağırlık



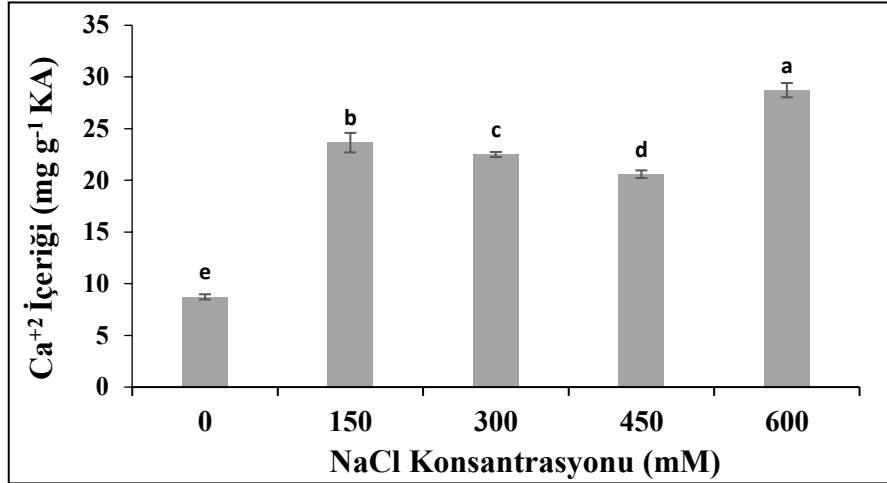
Şekil 21. *S. hieraciifolia*'da farklı tuz uygulamalarının Cl⁻ içeriği üzerine etkisi. Barlar ortalamalara ait standart sapmayı göstermektedir (n=3). Sütunlar üzerindeki farklı harfler uygulamalar arasındaki önemli farkları (P≤0.05) göstermektedir. KA: Kuru Ağırlık



Şekil 22. *S. hieraciifolia*'da farklı tuz uygulamalarının K⁺ içeriği üzerine etkisi. Barlar ortalamalara ait standart sapmayı göstermektedir (n=3). Sütunlar üzerindeki farklı harfler uygulamalar arasındaki önemli farkları (P≤0.05) göstermektedir. KA: Kuru Ağırlık



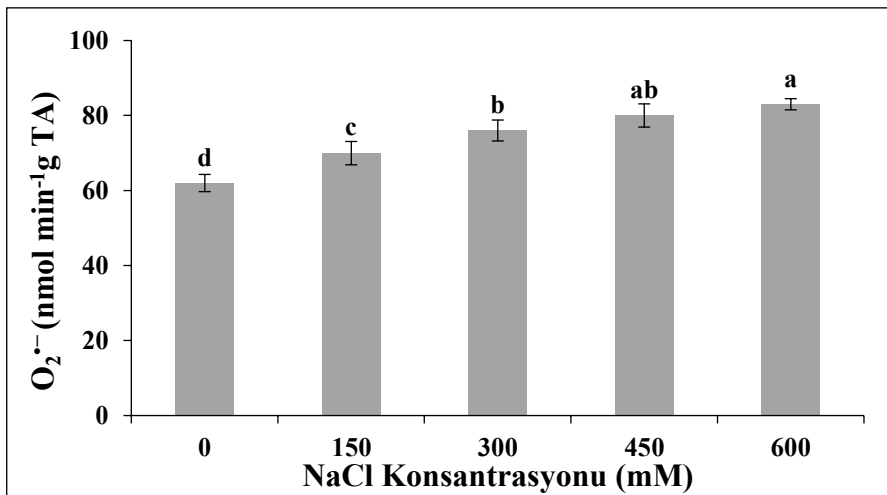
Şekil 23. *S. hieraciifolia*'da farklı tuz uygulamalarının Mg⁺² içeriği üzerine etkisi. Barlar ortalamalara ait standart sapmayı göstermektedir (n=3). Sütunlar üzerindeki farklı harfler uygulamalar arasındaki önemli farkları (P≤0.05) göstermektedir. KA: Kuru Ağırlık



Şekil 24. *S. hieraciifolia*'da farklı tuz uygulamalarının Ca^{+2} içeriği üzerine etkisi. Barlar ortalamalara ait standart sapmayı göstermektedir (n=3). Sütunlar üzerindeki farklı harfler uygulamalar arasındaki önemli farkları ($P \leq 0.05$) göstermektedir. KA: Kuru Ağırlık

3.2.7. Süperoksit İçeriği

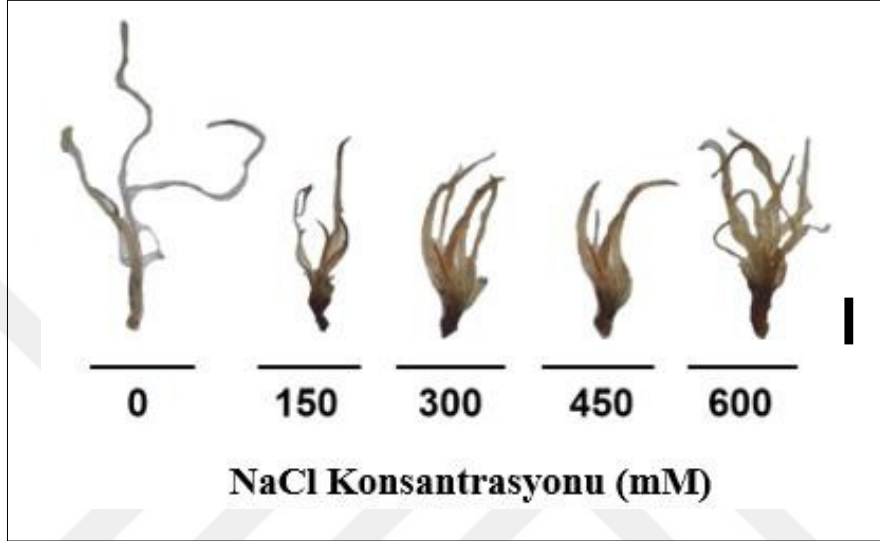
S. hieraciifolia'daki O_2^- içeriğinin kontrol grubuna göre 150-600 mM tuz uygulanmış sürgünlerde arttığı tespit edildi. En yüksek O_2^- içeriği 600 mM tuz uygulanmış bitkilerde görüldü (Şekil 25).



Şekil 25. *S. hieraciifolia*'da farklı tuz uygulamalarının O_2^- içeriği üzerine etkisi. Barlar ortalamalara ait standart sapmayı göstermektedir (n=3). Sütunlar üzerindeki farklı harfler uygulamalar arasındaki önemli farkları ($P \leq 0.05$) göstermektedir. TA: Taze Ağırlık

3.2.8. Dokularda Hidrojen Peroksit İçeriği

DAB boyaması yöntemi ile sürgün dokularında H_2O_2 içeriğindeki değişim açık-koyu kahverengin oluşumuyla değerlendirildi. Kontrole göre 150, 300, 450 ve 600 mM tuz uygulanmış sürgünlerde H_2O_2 içeriğinin önemli derecede arttığı tespit edildi (Şekil 26).

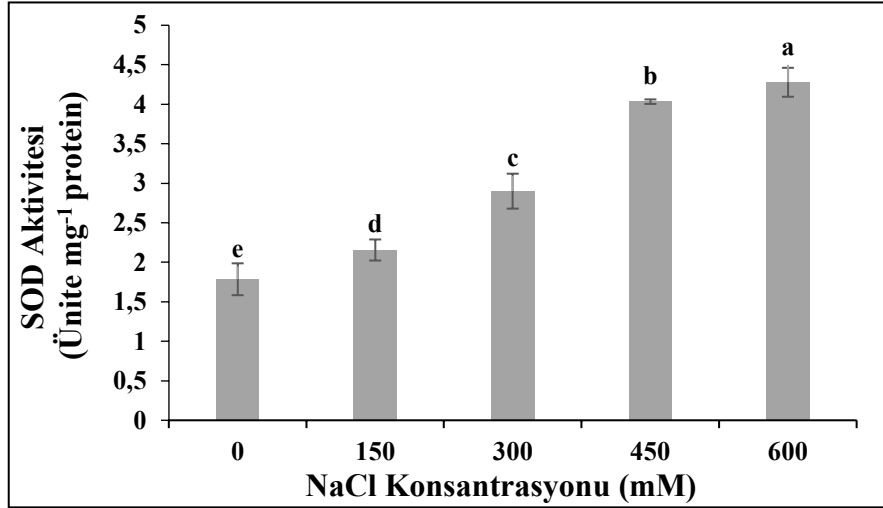


Şekil 26. *S. hieraciifolia*'da farklı tuz uygulamalarının dokularda H_2O_2 içeriğinin belirlenmesi. Bar: 1 cm

3.2.9. Enzimatik Antioksidan Aktivitelerindeki Değişimler

3.2.9.1. Süperoksit Dismutaz Aktivitesi

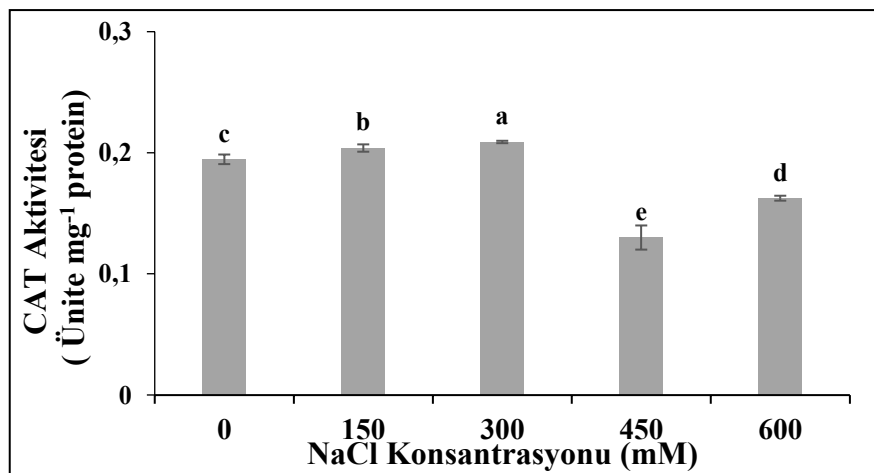
S. hieraciifolia'da yapılan analizler sonucunda, kontrole göre 150, 300, 450 ve 600 mM tuz uygulanmış sürgünlerde SOD aktivitesinin önemli derecede arttığı belirlendi. En yüksek SOD aktivitesindeki artış 600 mM tuz uygulanmış sürgünlerde kaydedildi (Şekil 27).



Şekil 27. *S. hieraciifolia*'da farklı tuz uygulamalarının SOD aktivitesi üzerine etkisi. Barlar ortalamalara ait standart sapmayı göstermektedir (n=3). Sütunlar üzerindeki farklı harfler uygulamalar arasındaki önemli farkları ($P \leq 0.05$) göstermektedir.

3.2.9.2. Katalaz Aktivitesi

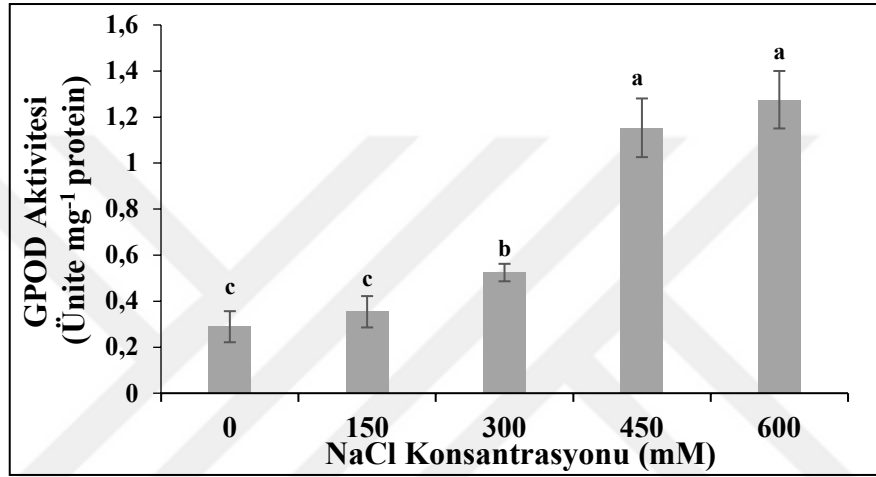
Sürgünlerde yapılan analizler sonucunda CAT aktivitesinin 150 ve 300 mM tuz uygulanmış sürgünlerde kontrole göre önemli derecede arttığı belirlendi. Bununla beraber 450 ve 600 mM tuz uygulanmış sürgünlerde CAT aktivitesinin azaldığı tespit edildi. En düşük CAT aktivitesi 450 mM tuz uygulanmış sürgünlerde görüldü (Şekil 28).



Şekil 28. *S. hieraciifolia*'da farklı tuz uygulamalarının CAT aktivitesi üzerine etkisi. Barlar ortalamalara ait standart sapmayı göstermektedir (n=3). Sütunlar üzerindeki farklı harfler uygulamalar arasındaki önemli farkları ($P \leq 0.05$) göstermektedir.

3.2.9.3. Guaikol Peroksidaz Aktivitesi

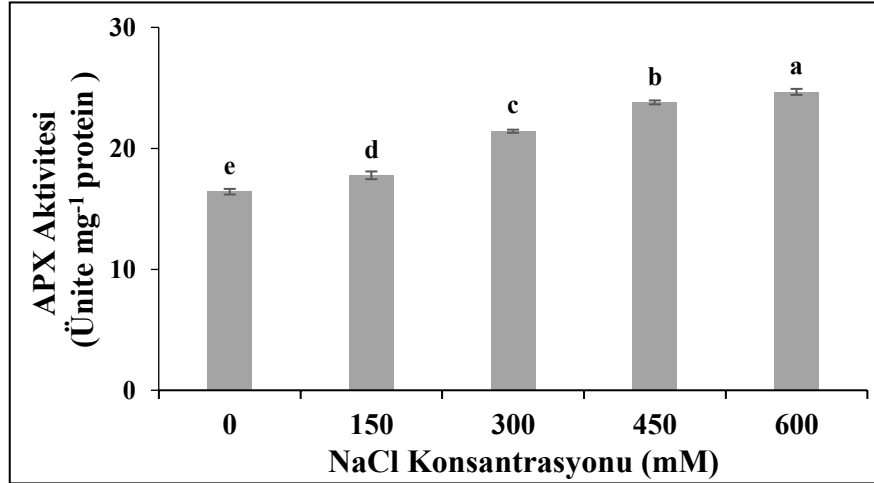
Bitkinin sürgünlerinde yapılan analizler sonucunda GPOD aktivitesinin 150 mM tuz uygulanmış bitkilerde kontrole oranla istatistiki ($P \leq 0.05$) bakımdan önemli bir değişiklik göstermediği tespit edildi. Bununla beraber 300, 450 ve 600 mM tuz uygulanmış sürgünlerde GPOD aktivitesinin arttığı kaydedildi. En yüksek GPOD aktivitesi 450 mM ve 600 mM tuz uygulanmış sürgünlerde görüldü (Şekil 29).



Şekil 29. *S. hieracifolia*'da farklı tuz uygulamalarının GPOD aktivitesi üzerine etkisi. Barlar ortalamalara ait standart sapmayı göstermektedir (n=3). Sütunlar üzerindeki farklı harfler uygulamalar arasındaki önemli farkları ($P \leq 0.05$) göstermektedir.

3.2.9.4. Askorbat Peroksidaz Aktivitesi

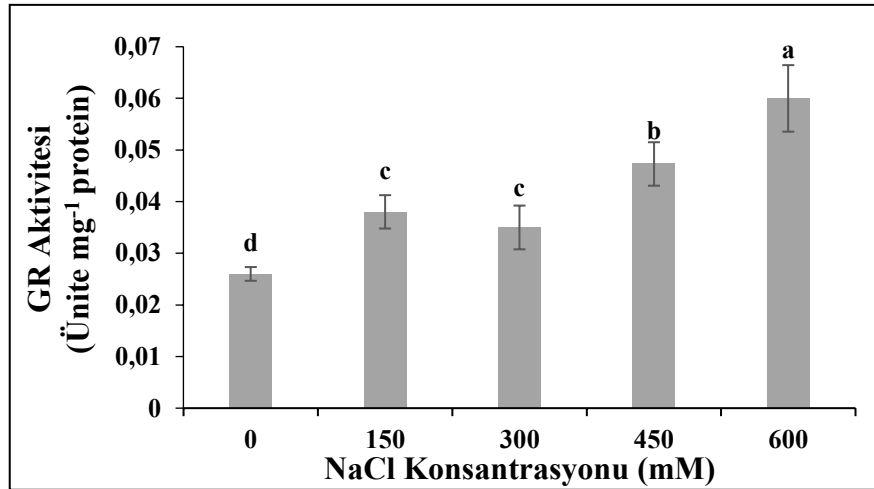
Tuz stresine maruz bırakılan bitkilerin sürgünlerinde yapılan analizler sonucunda, APX aktivitesinin 150-600 mM tuz uygulanmış sürgünlerde kontrole göre önemli derecede arttığı tespit edildi. En yüksek APX aktivitesi 600 mM tuz uygulanmış sürgünlerde belirlendi (Şekil 30).



Şekil 30. *S. hieraciifolia*'da farklı tuz uygulamalarının APX aktivitesi üzerine etkisi. Barlar ortalamalara ait standart sapmayı göstermektedir (n=3). Sütunlar üzerindeki farklı harfler uygulamalar arasındaki önemli farkları ($P \leq 0.05$) göstermektedir.

3.2.9.5. Glutasyon Redüktaz Aktivitesi

Bitkilerin sürgünlerinde yapılan analizler sonucunda, 150-600 mM tuz uygulanmış sürgünlerde GR aktivitesinin kontrol grubuna göre arttığı tespit edildi. En önemli GR artışı 600 mM tuz uygulanmış sürgünlerde belirlendi (Şekil 31).

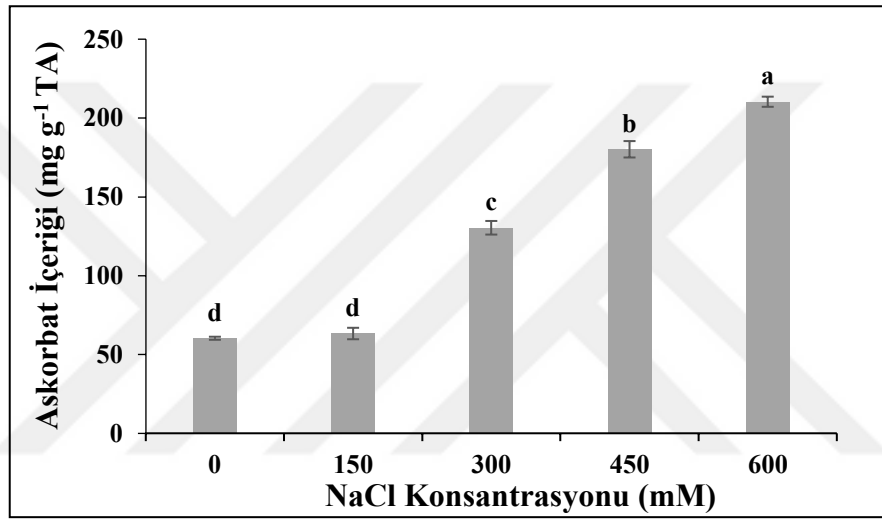


Şekil 31. *S. hieraciifolia*'da farklı tuz uygulamalarının GR aktivitesi üzerine etkisi. Barlar ortalamalara ait standart sapmayı göstermektedir (n=3). Sütunlar üzerindeki farklı harfler uygulamalar arasındaki önemli farkları ($P \leq 0.05$) göstermektedir.

3.2.10. Enzimatik Olmayan Antioksidan İçeriklerindeki Değişimler

3.2.10.1. Askorbat İçeriği

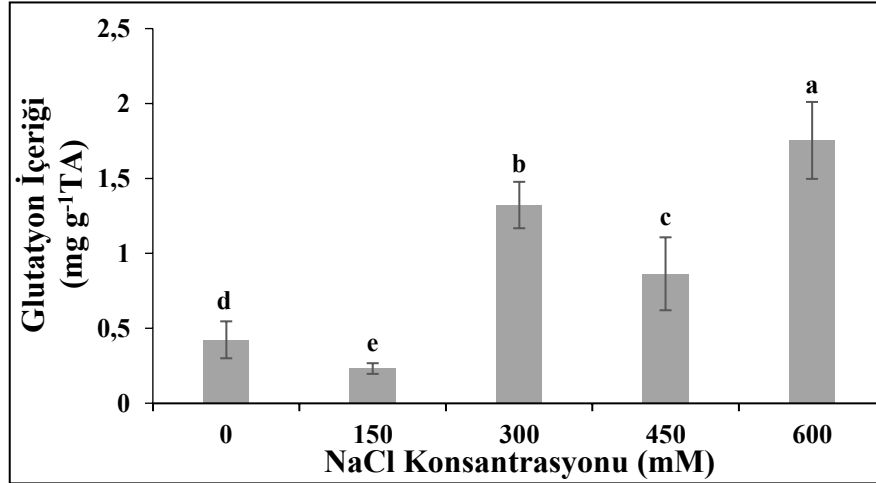
ASC içeriğinin kontrol grubuna göre 150 mM tuz uygulanmış sürgünlerde istatistiki bakımdan değişmediği belirlendi. Bununla beraber, 300, 450 ve 600 mM tuz uygulanmış sürgünlerde ASC içeriğinin kontrole göre önemli derecede arttığı tespit edildi. En yüksek ASC artışı 600 mM tuz uygulanmış sürgünlerde kaydedildi (Şekil 32).



Şekil 32. *S. hieraciifolia*'da farklı tuz uygulamalarının ASC içeriği üzerine etkisi. Barlar ortalamalara ait standart sapmayı göstermektedir (n=3). Sütunlar üzerindeki farklı harfler uygulamalar arasındaki önemli farkları ($P \leq 0.05$) göstermektedir. TA: Taze Ağırlık

3.2.10.2. Glutatyon İçeriği

Sürgünlerde yapılan analizler sonucunda, kontrol ile kıyaslandığında GSH içeriğinin 150 mM tuz uygulanmış sürgünlerde azaldığı belirlendi. Bununla beraber 300, 450 ve 600 mM tuz uygulanmış bitkilerde GSH içeriğinin kontrole göre önemli derecede arttığı kaydedildi. En yüksek GSH içeriği 600 mM tuz uygulanmış sürgünlerde tespit edildi (Şekil 33).

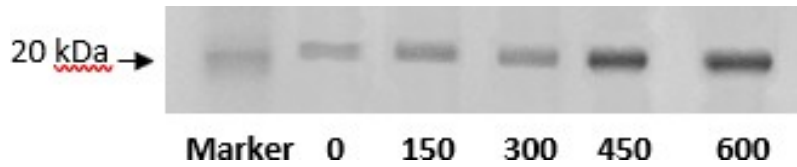


Şekil 33. *S. hieraciifolia*'da farklı tuz uygulamalarının GSH içeriği üzerine etkisi. Barlar ortalamalara ait standart sapmayı göstermektedir (n=3). Sütunlar üzerindeki farklı harfler uygulamalar arasındaki önemli farkları ($P \leq 0.05$) göstermektedir. TA: Taze Ağırlık

3.2.11. Antioksidan Enzimlerin Protein Miktarındaki Değişimler

3.2.11.1. Demir Süperoksit Dismutaz Protein Sentezi

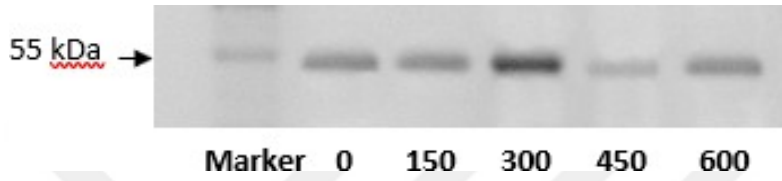
Demir Süperoksit Dismutaz (FeSOD) protein içerikleri ile ilgili yapılan western blot sonuçlarına göre, *S. hieraciifolia* sürgünlerinde FeSOD içeriğinin kontrol grubuna göre 150-600 mM tuz uygulanmış sürgünlerde arttığı kaydedildi. En yüksek FeSOD içeriği 450 ve 600 mM tuz uygulanmış sürgünlerde görüldü (Şekil 34).



Şekil 34. *S. hieraciifolia*'da farklı tuz uygulamalarının FeSOD protein sentezi üzerine etkisi.

3.2.11.2. Katalaz Protein Sentezi

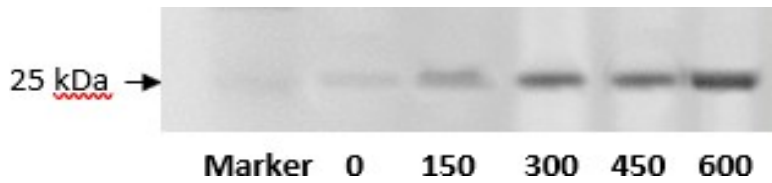
Bitkinin sürgünlerinde yapılan analizler sonucunda, CAT protein miktarının 150 ve 600 mM tuz uygulanmış sürgünlerde kontrole göre değişmediği görüldü. 300 mM tuz uygulanmış sürgünlerde CAT miktarının kontrole göre önemli derecede arttığı kaydedildi. Bununla beraber ilginç şekilde, 450 mM tuz uygulanmış sürgünlerde CAT miktarının azaldığı tespit edildi (Şekil 35).



Şekil 35. *S. hieraciifolia*'da farklı tuz uygulamalarının CAT protein miktarı üzerine etkisi.

3.2.11.3. Glutasyon Peroksidaz Protein Sentezi

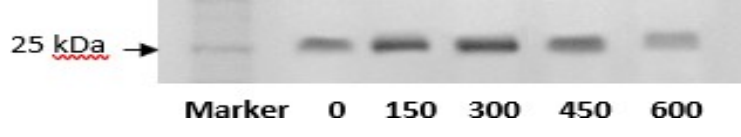
Sürgünlerde yapılan analizler sonucunda, glutasyon peroksidaz (GPX) miktarının 150-600 mM tuz uygulanmış bitkilerin sürgünlerinde kontrole göre arttığı görüldü. En yüksek GPX miktarı 600 mM tuz uygulanmış bitkilerde kaydedildi (Şekil 36).



Şekil 36. *S. hieraciifolia*'da farklı tuz uygulamalarının GPX protein sentezi üzerine etkisi.

3.2.11.4. Glutasyon Redüktaz Protein Sentezi

S. hieraciifolia'daki GR miktarının kontrole göre 150, 300 ve 450 mM tuz uygulanmış sürgünlerde arttığı tespit edildi. Bununla beraber, 600 mM tuz uygulanmış sürgünlerde kontrole göre önemli bir fark tespit edilmedi (Şekil 37).



Şekil 37. *S. hieraciifolia*'da farklı tuz uygulamalarının GR protein sentezi üzerine etkisi

4. TARTIŞMA

Bu çalışma ile endemik halofit *Scorzonera hieraciifolia*, 7 gün boyunca doku kültüründe beş farklı tuz konsantrasyonuna (0, 150, 300, 450 ve 600 mM) maruz bırakılarak bitkinin ekstrem halofit özelliği belirlenmiş ve tuza toleransının anatomik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler mekanizması ayrıntılı olarak incelenmiştir.

Çalışmanın ilk aşamasında, doğal habitatında sukkulentlik gözlenen *Scorzonera hieraciifolia*'nın sukkulent ekstrem halofit bir bitki olabileceği hipotezini test etmek için doku kültürü ortamında farklı tuz konsantrasyonlarında büyütülen sürgünlerdeki morfolojik ve bazı temel stres parametrelerindeki değişimler belirlenmiş ve elde edilen veriler ekstrem halofit *Eutrema parvulum* (Orsini vd., 2010; Uzilday vd., 2014) ile karşılaştırılmıştır. *S. hieraciifolia*'nın yüksek derişimdeki tuza tolerans gösterebilen bir bitki olduğunu belirlemek için ayrıca bitkide sürgün taze ağırlığı, sürgün kuru ağırlığı ve pigment içerikleri belirlenmiştir. *Scorzonera hieraciifolia* sürgünlerinde kontrol grubuna göre (0 mM NaCl), artan tuz konsantrasyonuna bağlı olarak sukkulentliğin arttığı ve bitki büyümesi için optimum tuz konsantrasyonunun 300 mM olduğu gözlenmiştir. *Eutrema parvulum*'da ise 300 mM tuz uygulamasının yaprak yüzeyini artırdığı ve benzer şekilde optimum büyüme için tuz konsantrasyonunun 300 mM olduğu, her iki bitkide 450 mM tuz uygulaması ile bitkilerin hayatta kalmaya devam ettiği belirlenmiştir. *S. hieraciifolia*'nın 600 mM tuz uygulamasını, klorosis görülmesine rağmen canlı kaldığı ancak *E. parvulum*'un bu konsantrasyonda canlılığını kaybettiği görülmüştür. Böylece morfolojik gözlemler, *S. hieraciifolia*'nın sukkulent halofit olduğunu ve muhtemelen bu özelliği sayesinde *E. parvulum*'a göre doku kültürü ortamında daha yüksek tuz konsantrasyonunu tolere edebileceğini göstermektedir. Diğer taraftan, tüm sukkulent halofitlerin ekstrem halofit olmadığı bilinmektedir. Yapılan doku kültürü çalışmalarında, yaprağı sukkulent halofit *Suaeda nudiflora*'nın 340 mM tuz koşullarında büyümesinin inhibe olduğu (Cherian ve Reddy, 2003), gövdesi sukkulent halofit *Salvadora persica*'nın 600 mM tuz koşullarında hayatta kalabildiği ve ekstrem halofit olduğu bildirilmiştir (Aghalel vd., 2009).

Çalışmada *S. hieraciifolia*'nın ekstrem halofit olma özelliği hipotezini test etmek için morfolojik gözlemler dışında temel stres parametrelerinden nispi su içeriği, membran hasarı ve H₂O₂ içeriğindeki değişimler belirlenmiştir. NSİ bitkilerde su durumunun önemli bir göstergesi olup, yaprağın % NSİ'si, yaprak dokusuna su temini ve terleme oranı arasındaki

dengeyi yansıtır (Lugojan ve Ciulca, 2011). Çalışmamızda, *S. hieraciifolia*'da NSİ'nin kontrol grubuna göre tuz konsantrasyonu arttıkça arttığı, *E. parvulum*'da ise azaldığı belirlenmiştir. Bu iki bitki arasındaki NSİ farklılığı, *S. hieraciifolia*'nın sukkulent yapısı sayesinde dışarıdan su almaya devam ettiğini ve böylece aşırı tuzu hücre içerisinde seyrelettiğini düşündürmektedir.

Diğer bir stres parametresi olarak membran hasarı bulgularına göre *S. hieraciifolia*'da kontrolle kıyaslandığında TBARS içeriğinin yalnızca yüksek tuz (450 ve 600 mM) uygulamalarıyla arttığı, aksine *E. parvulum*'da hem yüksek (450 ve 600 mM) hem de düşük tuz koşullarında (150 ve 300 mM) TBARS içeriğinin yüksek olduğu tespit edilmiştir. Sukkulent halofitlerde TBARS içeriği ile ilgili yapılan analizler sonucunda bulgularımızla paralel olarak, düşük tuz konsantrasyonlarının bitkide membran hasarı oluşturmadığı, ancak aşırı tuzun membran hasarını artırdığı rapor edilmiştir (Aghalel vd., 2009).

Hidrojen peroksit (H_2O_2) içeriğindeki değişimler üzerine yapılan çalışmalarda her iki bitkide H_2O_2 içeriğinin tüm tuz uygulamalarıyla birlikte kontrole göre arttığı, ancak *S. hieraciifolia*'daki artışın *E. parvulum*'dan %30 daha az olduğu tespit edilmiştir. Topraktaki yüksek tuz konsantrasyonları, bitkilerde iyon dengesizliğine ve hiperozmotik strese neden olur (Munns ve Tester, 2008). Bu primer etkilerin sonucunda, süperoksit (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali (OH^\cdot) ve singlet oksijen (1O_2) gibi ROT'ların oluşumuna neden olan sekonder etki olarak oksidatif stres meydana gelir (Ahmad vd., 2012). Bu bilgiler doğrultusunda, tuz stresi koşullarında *S. hieraciifolia*'da *E. parvulum*'dan daha az oksidatif stres hasarının meydana geldiği ifade edilebilir. Literatürde bazı tuz koşullarında H_2O_2 içeriğinin değişmediği bazılarında ise arttığı kaydedilmiştir. Örneğin, sukkulent ekstrem halofit *Salicornia brachiata*'nın H_2O_2 içeriğinin kontrole göre 200 mM tuz uygulamasıyla değişmediği, yüksek tuz uygulamalarıyla (400 ve 600 mM) arttığı belirlenmiştir (Parida ve Jha, 2010). Benzer şekilde Uzilday vd., (2014), kontrole göre ekstrem halofit *Eutrema parvulum*'un H_2O_2 içeriğinin 50 ve 200 mM tuz uygulamalarıyla değişmediğini, ancak 300 mM tuz uygulamasıyla önemli derecede arttığını rapor etmişlerdir.

S. hieraciifolia'nın yüksek tuza tolerans gösterebilen bir bitki olduğunu belirlemek için tuz stresinden etkilenen ve bitkinin strese karşı toleransını belirlemede ölçülen parametre olarak sürgün taze ağırlığı, sürgün kuru ağırlığı ve fotosentetik pigmentlerin içeriğindeki değişimlerde belirlenmiştir. Kontrole göre *S. hieraciifolia*'nın sürgün taze ağırlığının 150 ve 300 mM tuz uygulamalarıyla arttığı, 450 ve 600 mM tuz uygulamalarıyla değişmediği tespit edilmiştir. Bu bulgular sukkulent halofitlerle ilgili literatürdeki diğer çalışmalarla

uygunluk içerisinde. Örneğin, yaprakları sukkulent halofit *Suaeda fruticosa* ve gövdesi sukkulent *Arthrocnemum macrostachyum*'nin sürgün taze ağırlıklarının düşük tuz (200 ve 400 mM) uygulamalarıyla arttığı, yüksek tuz (800 ve 1000 mM) uygulamalarıyla ise azaldığı rapor edilmiştir (Khan vd., 2000; Khan vd., 2005). Bununla beraber Hajiboland vd. (2018) toprak koşullarında ekstrem halofit *Eutrema parvulum*'da yaptığı bir çalışmada, kontrole göre sürgün taze ağırlığının tuz uygulamalarıyla (0-400 mM NaCl) arttığını belirlemişlerdir. Elde edilen veriler ışığında, yüksek tuz koşullarında sürgün taze ağırlığındaki azalışın ozmoregulasyonu sağlayan ozmolitlerin birikiminden kaynaklanabileceği ve bitkideki enerji kaybını en aza indirmek için bir kazanç olabileceği fikrini öne sürmektedir.

Mevcut çalışmada *Scorzonera hieraciifolia*'nın sürgün kuru ağırlığının ise kontrole göre 150 mM tuz uygulamasıyla değişmediği, 300 mM tuz uygulamasıyla arttığı, 450 ve 600 mM tuz uygulamalarıyla azaldığı belirlenmiştir. Sukkulent halofitlerle yapılan başka çalışmalarda da düşük tuz uygulamalarıyla sürgün kuru ağırlığının arttığı, yüksek tuz uygulamalarıyla ise azaldığı rapor edilmiştir (Aghalel vd., 2009; Parida vd., 2016). Bununla birlikte halofitlerle ilgili yapılan çalışmalarda düşük tuz koşullarında bile bitki kuru ağırlığının azaldığı belirtilmiştir. Örneğin, halofit *Centaurea tuzgolensis*'de 300 mM tuz uygulamasıyla sürgün kuru ağırlığının azaldığı tespit edilmiştir (Yıldıztuğay vd., 2011). Benzer şekilde, ekstrem halofit *Eutrema parvulum*'un sürgün kuru ağırlığının 200 ve 300 mM tuz uygulamalarıyla azaldığı rapor edilmiştir (Uzilday vd., 2014). Bu bilgilerden yola çıkılarak, halofit bitkilerde düşük tuz koşullarında bile bitki kuru ağırlığının azaldığı, sukkulent halofitlerin kuru ağırlığının ise sadece yüksek tuz koşullarından etkilendiği düşünülebilir.

Klorofil ve karotenoid gibi fotosentetik pigmentler bitkilerde enerji metabolizmasının yaşamsal bileşenleridir (Parida ve Jha, 2013). Mevcut çalışmada *Scorzonera hieraciifolia*'nın klorofil a, klorofil b, toplam klorofil ve karotenoid içeriklerinin kontrol grubuna göre 150 mM tuz uygulamasıyla arttığı, 300 mM tuz uygulamasıyla değişmediği, ancak yüksek tuz uygulamalarıyla (450 ve 600 mM) önemli derecede azaldığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar literatürdeki tuz stresi altında sukkulent halofitler ile ekstrem halofitlerin fotosentetik pigment içerikleri üzerine benzer çalışmalarla uygunluk içerisinde. Örneğin, doku kültürü koşullarında ekstrem sukkulent halofit *Salicornia persica* ve *Salicornia europaea* bitkilerinde klorofil a ve b içerikleri artan tuz konsantrasyonuna bağlı olarak kontrole göre önemli derecede azaldığı, en fazla azalışın 600 mM tuz uygulamasıyla olduğu belirtilmiştir. (Aghalel vd., 2009). Benzer şekilde Vera-Estrella vd. (2005), ekstrem halofit

Theilingiella halophila'nın toplam klorofil içeriğinin 200 ve 400 mM tuz uygulamalarıyla önemli derecede azaldığını rapor etmişlerdir. Bu bilgiler ışığında, yüksek tuz koşullarında (450 ve 600 mM) fotosentetik pigmentlerdeki bu azalışın membran hasarından kaynaklı olabileceği gibi fotoinhibisyon ya da ROT'ların oluşumu ile de ilişkili olabileceği ifade edilebilir. Nitekim, tuz stresi altında fotosentez aktivitesindeki azalmanın klorofil içeriğinin ve CO₂ emiliminin azalmasında kaynaklı olduğu ileri sürülmüştür (Sudhir ve Murthy, 2004). Böylece, *E. parvulum* ile karşılaştırılarak *S. hieraciifolia*'daki morfolojik gözlemlerden ve bazı stres parametrelerinin ölçülmesinden elde edilen bulgular, *S. hieraciifolia*'nın yaprakları sukkulent ekstrem halofit olduğu hipotezini doğrulamıştır. Çalışmada ikinci bir hipotez olarak *Scorzonera hieraciifolia*'nın sukkulentlik ile sağlanan aşırı tuza toleransında ozmolit ve iyon dengesini (homeostaz) sağlayarak suyu etkin bir şekilde alabildiği, böylece sukkulentliği arttırdığı ve yüksek tuza tolerans sağlayabildiği düşünülmüştür. Bu hipotezi test etmek için sukkulentlik derecesi, sürgün kalınlığı, bitki alanı, stoma por açıklığı, prolin, toplam çözünür şeker içeriği gibi ozmolitler ve Na⁺, Cl⁻, K⁺, Ca⁺² ve Mg⁺² iyon içerikleri belirlenmiştir.

Glikofitlere kıyasla halofit bitkiler, yüksek tuz koşullarına tolerans göstermelerini sağlayan benzersiz anatomik yapılarla sahiptirler (Shabala, 2013). Bu nedenle çalışmada *Scorzonera hieraciifolia*'nın tuz stresine toleransı ile ilişkili olabileceği düşünülen anatomik yapılardan, sukkulentlik derecesi ve sürgün kalınlığı analizleri yapılmıştır. Sukkulentlik derecesi, yaprağın birim alanı başına su depolama kapasitesini gösterir ve sukkulent yapıya sahip olan bitkiler kalın yaprakları ile karakterize edilirler (Mimura vd., 2003). *Scorzonera hieraciifolia*'da kontrole göre tüm tuz uygulamalarıyla hem sukkulentlik derecesinin hem de sürgün kalınlığının arttığı belirlenmiştir. Benzer şekilde başka çalışmalarda tuz stresi koşullarında sukkulentliğin ve yaprak kalınlığının arttığı rapor edilmiştir. Örneğin, sukkulent halofit *Suaeda salsa* ile *Salvadora persica*'nın sukkulentlik derecesinin (Qi vd., 2009; Rangani vd., 2016) ve halofit *Cakile maritima*'nın yaprak kalınlığının (Debez vd., 2006) tuz uygulamalarıyla arttığı rapor edilmiştir. Çalışmamızda bitkide aşırı Na⁺ ve Cl⁻ iyonlarının birikiminden kaynaklı iyon homeostazisinin düzenlenmesiyle alınan suyun vakuol hacmini artırmasından dolayı sukkulentlik derecesinin ve sürgün kalınlığının arttığı söylenebilir. Nitekim, Ogburn ve Edwards (2010) araştırmacıları benzer şekilde halofitlerdeki sukkulentliğin esas olarak genişlemiş vakuollerde iyon birikimi nedeniyle meydana geldiğini ileri sürmüşlerdir.

Scorzonera hieraciifolia'nın tuza toleranstaki rolünü belirlemek için araştırılan diğer önemli bir parametre de stoma por açıklığıdır. Çalışmamızda kontrole göre tuz konsantrasyonu arttıkça stomaların kısmen kapandığı tespit edilmiştir. Nitekim tuz koşullarında bitkilerin stomalarını kapatması yaprak suyu içeriğinin korunmasıyla ilişkili olduğu ileri sürülmüştür (Parida vd., 2004). Sonuçlarımızla benzerlik gösteren *Aster tripolium*'da yapılan bir çalışmada, hücre vakuolünde aşırı tuz birikimi meydana geldiği zaman, apoplastta bekçi hücrelerinin etrafında Na^+ iyon konsantrasyonunun artmaya başladığı ve bu durumun bitkide kısmen stoma kapanmasına, transpirasyonun azalmasına ve suyun etkili bir şekilde kullanılmasına neden olduğu rapor edilmiştir. Böylece yapraklara giden aşırı tuz akışının azaldığı ve bitki büyümesinin devam edebildiği belirtilmiştir (Joshi vd., 2015). Bu bilgiler ışığında, *S. hieraciifolia*'nın artan Na^+ ve Cl^- içeriklerine karşı stomalarını kısmen kapatarak, suyu etkin bir şekilde alabildiği ve böylece yüksek tuz koşullarında (600 mM) yaşamını devam ettirebildiği düşünülmektedir.

Halofit bitkilerde ozmotik ayarlama, tuza toleransta en önemli fizyolojik mekanizmalardan biri olarak kabul edilir (Kotagiri ve Kolluru, 2017). Bu nedenle mevcut çalışmada tuza tolerans mekanizmasında ozmolitlerin rolünü araştırmak için, prolin ve toplam çözünebilir şeker içerikleri belirlenmiştir. Kontrol grubuna göre *Scorzonera hieraciifolia*'nın prolin ve toplam çözünebilir şeker içeriğinin tüm tuz uygulamalarıyla önemli derecede arttığı tespit edilmiştir. Prolin ve toplam çözünebilir şeker içerikleri ile ilgili benzer çalışmalar da literatürde mevcuttur. Örneğin, sukkulent halofit *Plantago crassifolia* ve *Inula crithmoides*'in prolin içeriğinin tüm tuz uygulamalarıyla (150, 300, 450 ve 600 mM) arttığı rapor edilmiştir (Pardo Domenech vd., 2016). Wang vd. (2013), *Eutrema halophilum*'un toplam çözünebilir şeker içeriğinin tuz konsantrasyonu (200, 400, 600 mM) arttıkça orantılı olarak arttığını belirlemişlerdir. Veriler ışığında, vakuolde iyonların bölümlendirilmesinden dolayı bozulan ozmoregulasyonun yeniden sağlanması için *S. hieraciifolia*'nın prolin ve toplam çözünebilir şeker içeriklerinde bir artışın meydana geldiği düşünülmektedir.

Çalışmada *Scorzonera hieraciifolia*'nın yüksek tuza toleransında iyonların rolünü belirlemek için ayrıca Na^+ , Cl^- , K^+ , Mg^{+2} ve Ca^{+2} içerikleri belirlenmiştir. Çalışmada tuz koşulları altında sukkulent halofit *Scorzonera hieraciifolia*'nın Na^+ , Cl^- , K^+ , Mg^{+2} ve Ca^{+2} içeriklerinin arttığı belirlenmiştir. Tuza toleransta yaprakları ve gövdesi sukkulent halofitlerin vakuolünde biriken inorganik anyon ve kationlar, ozmotik potansiyeli bir dereceye kadar düşürerek tuzlu topraklardan suyun alınımını sağlamaktadırlar (Short ve

Colmer 1999). Bununla beraber, bazı sukkulent halofitlerin Na^+ 'yı kullanarak hücrel osmotik potansiyeli düzenlemesinin yanı sıra sitozolde aşırı Na^+ toksikliğini azaltmak için vakuolde Na^+ iyonunu bölümlendirdiği ve böylece hücrel iyon homeostazisinin ve turgorun korunduğu belirtilmiştir (Flowers vd., 2015). Ancak vakuol içinde etkili bölümlendirme, sitozolün osmotik potansiyelinde eş zamanlı bir artış ve sitozolik K^+ dengesinin de sürdürülmesi ile başarılır. Nitekim hem hücrel hem de bütün bitki seviyesinde tuza tolerans yüksek Na^+ içeriğine karşı K^+ homeostazisinin sürdürülmesiyle ilgili olduğu bilinmektedir (Hariadi vd., 2011). Bulgularımıza benzer olarak halofit *Salvadora persica*'nın tuz koşullarında (250, 500 ve 750 mM NaCl) artan Na^+ ve Cl^- içeriğine rağmen bitkinin K^+ dengesini koruduğu belirlenmiştir (Parida vd., 2016). Verilerimize göre, yüksek tuz koşullarında *S. hieraciifolia*'da artan Na^+ ve Cl^- 'ye göre K^+ 'nın homeostazisinin sürdürüldüğü görülmektedir. Nitekim, Ca^{+2} ve Mg^{+2} gibi iki değerlikli kationlar mezofil hücrelerinin plazma zarında K^+ taşıyıcılarının aktivitesini ayrıca düzenlediği bilinmektedir (Shabala vd., 2005; Pérez vd., 2008).

Çalışmada üçüncü bir hipotez olarak *S. hieraciifolia*'nın antioksidan sistemi uyararak yüksek tuza tolerans gösterebildiği düşünülmüştür. Bu hipotezi test etmek için süperoksit (O_2^-) ve hidrojen peroksit (DAB boyaması) gibi ROT'ların içeriğine, SOD, CAT, GPOD, APX ve GR aktivitelere, ASC ve GSH gibi enzimatik olmayan antioksidanların miktarlarındaki değişimler incelenmiştir. *Scorzonera hieraciifolia*'da kontrole göre O_2^- ve H_2O_2 seviyelerinin tüm tuz uygulamalarıyla arttığı belirlenmiştir. Başka çalışmalarla da tuz stresi koşullarında tuza toleranslı/halofit bitkilerde O_2^- ve H_2O_2 içeriğinin arttığı rapor edilmiştir. Örneğin, kontrole göre tuza toleranslı transgenik *Brassica napus* (150, 300 ve 450 mM) ve halofit *Eutrema halophilum*'un (25, 50, 100 mM) O_2^- içerikleri tüm tuz uygulamalarıyla arttığı belirlenmiştir (Sun vd., 2015; Shiri vd., 2015). Ayrıca Ellouzi vd. (2011), kontrole göre halofit *Cakile maritima*'nın H_2O_2 içeriğinin 400 mM tuz uygulamasıyla arttığını rapor etmişlerdir.

Tuz stresi koşullarında bitkilerde redoks homeostazisinin sağlanmasında antioksidan mekanizma etkilidir (Das ve Rocyhoudhury, 2014). SOD, bitki hücrelerinde süperoksit radikallerini (O_2^-) temizleyen ilk enzimdir ve ROT toksisitesine karşı hücreleri korumada önemli bir rol oynar (Scandalios, 1993). Çalışmada kontrol grubuna göre, *S. hieraciifolia*'nın SOD aktivitesinin artan tuz konsantrasyonuna bağlı olarak arttığı belirlenmiştir. Tuz stresi altında artan ROT'lara karşı ekstrem halofitlerde SOD aktivitesinin arttığı ile ilgili literatürde benzer çalışmalar mevcuttur. Örneğin, Uzilday vd. (2014) ekstrem halofit *E.*

parvulum'da SOD aktivitesinin kontrol grubuna göre tuz uygulamalarıyla (50, 200 ve 300 mM NaCl) önemli derecede arttığını rapor etmişlerdir. Başka bir çalışmada, ekstrem halofit *Atriplex portulacoides*'in SOD aktivitesinin artan tuz konsantrasyonuna bağlı olarak (200, 400, 800 ve 1000 mM NaCl) arttığı belirlenmiştir (Benzarti vd., 2012). Nitekim çevresel streslere karşı artan SOD aktivitesi bitkinin artan toleransı ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Sharma vd., 2012). Bununla birlikte, tuz stresi altında sukkulent halofitlerde de SOD aktivitesinin arttığı ya da azaldığı ile ilgili çalışmalar literatürde mevcuttur. Örneğin, tuz koşullarında (100, 150 ve 200 mM NaCl) sukkulent halofit *Suaeda nudiflora*'nın SOD aktivitesinin azaldığı (Cherian ve Reddy, 2003), aksine *Crithmum maritimum*'da SOD aktivitesinin 200 mM tuz uygulamasıyla arttığı tespit edilmiştir (Amor vd., 2005). Görüldüğü gibi SOD aktivitesi ile ilgili literatürde net bir durum mevcut değildir. Nitekim, tuz stresi altında SOD aktivitesi tuzluluk seviyesinin yanı sıra bitki türüne, yaşına, analiz edilen bitki kısmına göre değişiklik gösterebilir (Chaparzadeh vd., 2004).

Çalışmamızda araştırılan diğer bir antioksidan enzim CAT aktivitesidir. Kontrole göre *Scorzonera hieraciifolia*'nın CAT aktivitesinin 150 ve 300 mM tuz uygulamalarıyla arttığı, 450 ve 600 mM tuz uygulamalarıyla azaldığı belirlenmiştir. Bu bulgular literatürdeki başka çalışmalarla uygunluk içerisindedir. Örneğin, kontrole göre sukkulent ekstrem halofit *Salicornia brachiata*'nın CAT aktivitesinin 200 mM tuz uygulamasıyla değişmediği, 400 ve 600 mM tuz uygulamalarıyla ise azaldığı rapor edilmiştir (Parida ve Jha, 2010). Veriler ışığında, yüksek tuz konsantrasyonlarında (450 ve 600 mM) azalan CAT aktivitesinin H₂O₂'nin temizlenmesinde etkili bir antioksidan olmadığı ve CAT'ın görevini başka bir antioksidan enzimin (askorbat peroksidaz vb.) üstlendiği düşünülmektedir. Nitekim bitkide azalan antioksidan enzim aktivitelerinde strese karşı diğer koruyucu mekanizmaların harekete geçtiği ileri sürülmüştür (Kronfuss vd., 1996). Ayrıca CAT enziminin H₂O₂ için nispeten zayıf affinitesi olduğu da bilinmektedir (Shang ve Feierabend, 1999).

Çalışmamızda araştırılan antioksidan enzimlerden biri de GPOD enzimidir. Analizler sonucunda, *Scorzonera hieraciifolia*'nın GPOD aktivitesinin kontrole göre 150 mM tuz uygulamasıyla değişmediği, 300, 450 ve 600 mM tuz uygulamalarıyla önemli derecede arttığı belirlenmiştir. Literatürde yapılan başka çalışmalarda da tuz stresi koşullarında GPX aktivitesinin arttığı belirtilmiştir. Örneğin, sukkulent ekstrem halofit *Salicornia brachiata*'nın GPX aktivitesinin tuz uygulamalarıyla (200, 400 ve 600 mM) arttığı rapor edilmiştir (Parida ve Jha, 2010). Bulgularımız ışığında, 300, 450 ve 600 mM tuz uygulamalarıyla artan GPOD aktivitesinin *S. hieraciifolia*'da tuza toleransında etkili

olmasının yanı sıra bitki sürgün boyunun kısılmasında da bir rolü olabileceğini akla getirmektedir. Nitekim, GPX enziminin büyümeyi teşvik eden IAA fitohormonunu inhibe ettiği (Salin, 1987) ve aynı zamanda hücre duvarı sertleşmesinden kaynaklanan bitki büyümesini azaltabileceği yapılan çalışmalarla rapor edilmiştir (Dionisio-Sese ve Tobita, 1998; Cavalcanti vd., 2004). Çalışmada hem morfolojik değişimlere hem de sürgün taze ağırlığı ile ilgili mevcut verilere bakıldığında, özellikle sürgün boyunun 300 mM tuz uygulamasından sonra azalması bu ifadeyi desteklemektedir.

Çalışmamızda diğer bir antioksidan enzim olan APX aktivitesinin kontrole göre tüm tuz uygulamalarıyla arttığı belirlenmiştir. Sonuçlarımızla paralel olacak şekilde literatürde bazı çalışmalar mevcuttur. Örneğin, sukulent ekstrem halofit *Salicornia brachiata*'nın APX aktivitesinin tuz uygulamalarıyla (200-600 mM) önemli derecede arttığı rapor edilmiştir (Parida ve Jha, 2010). Başka bir çalışmada, sukulent halofit *Salicornia* türlerinin (*S. persica* ve *S. europaea*) APX aktivitesinin tüm tuz uygulamalarıyla (100, 200, 400, 500 ve 600 mM) arttığı belirlenmiştir (Aghalel vd., 2009). H₂O₂, CAT tarafından gliksizom ve peroksizomlarda ve APX tarafından kloroplastlarda olmak üzere iki yolla detoksifiye edilir (Shigeoka vd., 2002; Seçkin vd., 2010). Bu bilgi doğrultusunda, çalışmamızda tuz koşullarında azalan CAT aktivitesinin yerine H₂O₂ temizlemesini APX enziminin üstlenmiş olduğunu söyleyebiliriz. Nitekim, APX enzimi askorbat-glutasyon yolu ile hücrelerde fazla H₂O₂ birikimini önler (Asada, 2006) ve APX aktivitesindeki bu artışın önceden var olan APX'in aktivasyonundan ya da bitkiler tuza maruz kaldığında APX'in sentezinden kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür (Parida ve Das, 2005).

GR aktivitesi üzerine yapılan çalışmalarda *Scorzonera hieraciifolia*'da kontrole göre GR aktivitesinin yüksek tuz uygulamalarıyla arttığı belirlendi. APX gibi GR de askorbat ve glutasyonun redoks durumunu korumak için gereken bir enzimdir (Asada, 2006). GR, glutasyon ve askorbatı içeren bir redoks döngüsü boyunca içsel H₂O₂ içeriğinin kontrolünde önemli bir rol oynamaktadır (Foyer ve Noctor, 2009). Önceki çalışmalar ile GR'nin tuzluluk dahil abiyotik stres kaynaklı oksidatif hasara karşı farklı bitki türlerinin korunmasında koruyucu bir rolü olduğu rapor edilmiştir (Demiral ve Türkan, 2005; Rao ve Reddy, 2008). Bulgularımıza paralel olacak şekilde Parida ve Jha (2010) tarafından yapılan çalışmada tuz koşullarında sukulent ekstrem halofit *Salicornia brachiata*'nın GR aktivitesinin önemli derecede arttığını rapor etmişlerdir. Sonuçlarımız *S. hieraciifolia*'da, tuz stresine karşı GR'nin antioksidan savunma sisteminde önemli bir rolü olabileceğini göstermektedir.

Çalışmamızda tuz stresi koşullarında enzimatik olmayan antioksidanlardan ASC içeriğindeki değişim araştırılmıştır. Kontrol grubuna göre *Scorzonera hieraciifolia*'nın ASC içeriğinin 150 mM tuz uygulamasıyla değişmediği, 300, 450 ve 600 mM tuz uygulamalarıyla önemli derecede arttığı belirlenmiştir. Yapılan bir çalışmada, tuz stresi altında askorbat eksik *Arabidopsis* mutantının oksidatif bileşiklere karşı yüksek duyarlılık gösterdiği belirtilmiştir (Abogadallah, 2010). Vaidyanathan vd., (2003), tuz koşullarında iki önemli çeltik (*Oryza sativa* L.) kültüvarı olan Pusa Basmati (tuza-hassas) ve Pokkali'nin (tuza toleranslı) ASC içeriklerini karşılaştırmışlardır. Kontrole göre Pokkali'nin ASC içeriğinin tuz uygulamalarıyla (100, 150, 200, 250, 300 mM) önemli derecede arttığını, Pusa Basmati'de ise ASC içeriğinin 100 ve 150 mM tuz uygulamalarıyla artarken, 200, 250 ve 300 mM tuz uygulamalarıyla önemli derecede azaldığını rapor etmişlerdir. Nitekim, bitkilerdeki ASC seviyesindeki artışın antioksidan sistemin etkili bir şekilde sürdürülmesi için gerekli olduğu, biyotik ve abiyotik streslerin sonucunda meydana gelen oksidatif stres hasarından bitkileri koruduğu ileri sürülmüştür (Shigeoka vd., 2002).

Mevcut çalışmada araştırılan bir diğer enzimatik olmayan antioksidan da GSH'tır. Kontrole göre *Scorzonera hieraciifolia*'nın GSH içeriğinin 150 mM tuz uygulamasıyla önemli derecede azaldığı, 300, 450 ve 600 mM tuz uygulamalarıyla arttığı tespit edilmiştir. Sonuçlarımızla paralellik içinde olan bir çalışmada halofit *Cakile maritima*'nın GSH içeriğinin 400 mM tuz uygulamasıyla arttığı belirtilmiştir (Amor vd., 2006). Bulgularımıza göre, GSH redox durumunu koruyarak tuz stresi toleransında koruyucu bir rol oynadığı (Shalata vd., 2001) ve stres koşullarına adapte olan bitkilerde GSH seviyesinin daha yüksek olduğu rapor edilmiştir (May ve Leaver, 1993). Bu nedenle *S. hieraciifolia*'da kontrole göre tuz stresine karşı GSH içeriğindeki artışın bitkinin tuza toleransında rol oynadığını göstermektedir.

Mevcut çalışmada, *S. hieraciifolia*'nın yüksek tuza tolerans mekanizmasını moleküler yönden de aydınlatmak için SOD, CAT, GPX ve GR enzimlerinin protein profilleri western blot yöntemi ile belirlenmiştir. Kontrol grubuna göre, tüm tuz uygulanmış grupların FeSOD ve GPX protein içeriklerinin arttığı, en yüksek FeSOD içeriği 450 ve 600 mM tuz uygulamalarıyla, GPX içeriğinin ise 600 mM tuz uygulanmasıyla olduğu tespit edilmiştir. Aksine, kontrole göre CAT içeriğinin 150 ve 600 mM tuz uygulamasıyla değişmediği, 300 mM tuz uygulamasıyla arttığı, 450 mM tuz uygulamasıyla azaldığı belirlenmiştir. Bununla birlikte, GR içeriğinin kontrole göre 150, 300, 450 mM tuz uygulamalarıyla arttığı, 600 mM tuz uygulamasıyla değişmediği tespit edilmiştir. Elde edilen veriler ışığında, yüksek tuz

koşullarında antioksidanların protein içeriklerindeki değişimler, antioksidan enzim aktiviteleriyle bir paralellik içinde olduğunu göstermektedir. Tuz koşullarında tuz stresinin etkilerinden sakınmak için *S. hieraciifolia*'nın antioksidan savunma sistemini etkili bir şekilde uyardığı düşünülmektedir. Böylece tuz koşullarında *S. hieraciifolia*'da sukkulentlik mekanizması anatomik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler yönlerden detaylı bir şekilde aydınlatılmaya çalışılmıştır. *Scorzonera hieraciifolia*'nın sukkulentlik mekanizmasında iyon birikimi, ozmotik ayarlama, ozmolit üretimi (prolin, toplam çözünebilir şeker), turgor basınç potansiyelinin sürdürülmesi ve antioksidan savunma sistemi ile bitki büyümesi arasında hassas bir dengenin kurulduğu söylenebilir.

Elde edilen veriler ışığında, bu çalışma ile yaprakları sukkulent endemik halofit *Scorzonera hieraciifolia*'nın ozmolitleri hücre içerisinde ve NaCl'yi ise vakuolde depolaması sayesinde suyu etkin bir şekilde alarak sukkulentliği artırdığı, ayrıca antioksidan sistemi uyararak 600 mM yüksek tuz konsantrasyonuna tolerans gösterebilen ekstrem halofit bir bitki olduğu sonucuna varıldı.

5. SONUÇLAR

1. *S. hieraciifolia*'da artan tuz konsantrasyonuna bağlı olarak sukkulentliğin arttığı gözlemlendi ve bitki büyümesinde optimum tuz konsantrasyonunun 300 mM olarak tespit edildi. Bitkinin 450 mM tuz uygulamasıyla hayatta kaldığı, 600 mM tuz koşullarında klorozis meydana gelmesine rağmen yaşamına devam ettiği tespit edildi.
2. *Eutrema parvulum*'da da optimum büyümenin 300 mM tuz uygulamasıyla olduğu, 450 mM tuz uygulamasıyla klorozis görüldüğü ancak 600 mM tuz konsantrasyonunda bitkinin canlılığını kaybettiği tespit edildi.
3. *E. parvulum*'da artan tuz konsantrasyon bağlı olarak NSİ'nin azaldığı aksine *Scorzonera hieraciifolia*'da tuza bağlı olarak arttığı belirlendi.
4. *E. parvulum*'da TBARS içeriği tüm tuz uygulamalarıyla artarken, *S. hieraciifolia*'da yalnızca yüksek tuz uygulamalarıyla arttığı tespit edildi.
5. *S. hieraciifolia* ve *E. parvulum*'un H₂O₂ içeriğinin tüm tuz uygulamalarıyla birlikte arttığı tespit edildi. En yüksek H₂O₂ içeriği *S. hieraciifolia*'da 600 mM, *E. parvulum*'da ise 450 mM tuz uygulamalarıyla olduğu belirlendi.
6. *S. hieraciifolia*'nın hem sukkulentlik derecesi hemde sürgün kalınlığı kontrole göre artan tuz konsantrasyonuna bağlı olarak arttığı kaydedildi.
7. *S. hieraciifolia*'nın sürgün alanı, kontrole göre tüm tuz uygulamalarıyla birlikte arttığı görüldü. En yüksek sürgün alanı 300 mM tuz uygulanmış sürgünlerde tespit edildi.
8. *S. hieraciifolia*'da stoma por açıklığı artan tuz konsantrasyonuna bağlı olarak kısmen azaldığı belirlendi.
9. *S. hieraciifolia*'da sürgün taze ağırlığının kontrole göre 150 ve 300 mM tuz uygulamalarıyla arttığı, 450 ve 600 mM tuz uygulamalarıyla değişmediği tespit edildi.
10. *S. hieraciifolia*'nın sürgün kuru ağırlığının kontrol grubuna göre 150 mM tuz uygulamasıyla değişmediği, 300 mM tuz uygulamasıyla arttığı, yüksek tuz uygulamalarıyla (450 ve 600 mM) azaldığı belirlendi.
11. *S. hieraciifolia*'nın fotosentetik pigment içeriklerinin 150 mM tuz uygulamasıyla arttığı, 300, 450 ve 600 mM tuz uygulamalarıyla birlikte azaldığı kaydedildi.
12. *S. hieraciifolia*'nın O₂⁻ içeriğinin kontrole göre tüm tuz uygulanmış sürgünlerde arttığı belirlendi.
13. *S. hieraciifolia*'da dokularda H₂O₂ içeriğinin tüm tuz uygulamalarıyla arttığı görüldü.

14. *S. hieraciifolia*'nın prolin ve toplam çözünebilir şeker içeriğinin kontrole göre tüm tuz uygulamalarıyla birlikte arttığı belirlendi.
15. *S. hieraciifolia*'nın Na⁺, Cl⁻, K⁺, Mg⁺² ve Ca⁺² içeriklerinin tüm tuz uygulamalarıyla arttığı kaydedildi.
16. *S. hieraciifolia*'nın SOD, APX ve GR aktivitelerinin tüm tuz uygulamalarıyla arttığı belirlendi.
17. *S. hieraciifolia*'nın CAT enzim aktivitesinin kontrole göre 150 ve 300 mM tuz uygulamalarıyla arttığı, 450 ve 600 mM tuz uygulamalarıyla azaldığı kaydedildi.
18. *S. hieraciifolia*'nın GPOD enzim aktivitesinin kontrole göre 300, 450 ve 600 mM tuz uygulamalarıyla arttığı görüldü.
19. *S. hieraciifolia*'nın ASC içeriğinin kontrole göre 150 mM tuz uygulamasıyla değişmediği, 300, 450 ve 600 mM tuz uygulamalarıyla arttığı kaydedildi.
20. *S. hieraciifolia*'nın GSH içeriğinin kontrole göre 150 mM tuz uygulamasıyla azaldığı, 300, 450 ve 600 mM tuz uygulamalarıyla arttığı tespit edildi.
21. FeSOD ve GPX miktarlarının artan tuz konsantrasyonuna bağlı olarak arttığı belirlendi.
22. CAT miktarının 300 mM tuz uygulamasıyla arttığı, 450 mM tuz uygulamasıyla azaldığı, 150 ve 600 mM tuz uygulamasıyla kontrole değiştirmedeği görüldü.
23. GR miktarının ise, 150, 300 ve 450 mM tuz uygulamalarıyla arttığı, 600 mM tuz uygulamasında ise kontrole değişmediği belirlendi.
24. Yaprakları sukkulent endemik halofit *Scorzonera hieraciifolia*'nın ozmolitleri NaCl'yi hücre içerisinde biriktirdiği bu sayede suyu etkin bir şekilde alarak sukkulentliği artırdığı, antioksidan sistemi uyardığı ve yüksek tuz tolerans gösterebilen ekstrem halofit bir bitki olduğu sonucuna varıldı.

6. ÖNERİLER

Halofitlerin tuz stresini tolere edebilmek için sahip oldukları sakınım mekanizmalarından biri sukkulent yapıya sahip olmasıdır. Bu mekanizmaya sahip olan halofit bitkiler yüksek tuz koşullarına tolerans gösterebilirler ve bu koşullarda uzun süre canlılıklarını devam ettirebilirler. Bu tez çalışmasıyla *Scorzonera hieraciifolia*'nın tuza toleransında sukkulent yapının oldukça önemli olduğu belirlendi. Bitki bu yapı sayesinde su içeriğini koruyarak, 600 mM gibi ekstrem tuz koşullarında hayatta kalabildiği kanısına varılmıştır.

Bitkideki sukkulentlik ile sağlanan tuza tolerans mekanizmasının araştırıldığı mevcut çalışmamızda, tuz koşullarında antioksidan sistemde rol alan bazı enzimlerdeki değişimler belirlenmiştir. Bu mekanizmanın daha ayrıntılı incelenebilmesi için antioksidan sistemde rol oynayan Asada-Halliwell yolunun diğer enzimleri olan monodehidroaskorbat redüktaz ve dehidroaskorbat redüktaz aktivitelerinin belirlenmesi önerilmektedir.

Bununla birlikte, sukkulent halofitlerin kök ve yaprak bölgelerindeki hücre zarında ve vakuollerinde konumlandırılmış taşıyıcı proteinlerin (Na^+ taşıyıcısı (HKT1), vakuolar Na^+/H^+ antiport (NHX), seçici olmayan katyon kanalları (NSCC) vb.) tuz stresi koşullarındaki rolünü ayrıntılı olarak ortaya koymak için *Scorzonera hieraciifolia*'da hem dejenarat primer tasarlanarak qRT-PCR yöntemi ile genlerin ifade seviyelerine bakılmasına, hem de western blot yöntemi ile protein profilleri çalışılmasına gereksinim duyulmaktadır. Ayrıca bu çalışmada yüksek tuz koşullarında *S. hieraciifolia*'da kuru ağırlığının azaldığı belirlenmiştir. Bu azalışın fotosentez etkinliğinin azalmasından kaynaklanabileceği düşünüldüğü için, rubisco aktivitesi ve klorofil floresans parametrelerindeki değişimlerin araştırılması önerilmektedir.

Bu bitkinin genomu bilinmediğinden, tuz stresi altında *Scorzonera hieraciifolia*'da mikroarray yöntemini kullanarak tuz stresi ile ilişkili olabilecek genler belirlenebilir ve ilgili genlerin tanımlanmasından sonra, kültür bitkilerine bu genlerin aktarılması diğer araştırılması gereken önemli konulardan biridir.

7. KAYNAKLAR

- Abogadallah, G.M., 2010. Antioxidative Defense under Salt Stress, Plant Signaling & Behavior, 5, 369-374.
- Aebi, H.E., Catalase, 1983. Methods of Enzymatic Analysis, In: Bergmeyer, H.U. (Ed.), 273-286, Weinheim: Verlag Chemie.
- Aghaleh, M., Niknam, V., Ebrahimzadeh, H. ve Razavi, K., 2009. Salt Stress Effects on Growth, Pigments, Proteins and Lipid Peroxidation in *Salicornia persica* and *S. europaea*, Biologia Plantarum, 53, 243-248.
- Ahmad, P., Hakeem, K.R., Kumar, A., Ashraf, M. ve Akram, N.A., 2012. Salt Induced Changes in Photosynthetic Activity and Oxidative Defense System of Three Cultivars of Mustard (*Brassica juncea* L.), The African Journal of Biotechnology, 11, 2694-2703.
- Akbarimoghaddam, H., Galavi, M., Ghanbari, A. ve Panjehkeh, N., 2011. Salinity Effects on Seed Germination and Seedling Growth of Bread Wheat Cultivars, Trakia Journal of Sciences, 9, 43-50.
- Amor, N.B., Hamed, K.B., Debez, A., Grignon, C. ve Abdelly, C., 2005. Physiological and Antioxidant Responses of the Perennial Halophyte *Crithmum maritimum* to Salinity, Plant Science, 168, 889-899.
- Amor, N.B., Jiménez, A., Megdiche, W., Lundqvist, M., Sevilla, F. ve Abdelly, C., 2006. Response of Antioxidant Systems to NaCl Stress in The Halophyte *Cakile maritima*, Physiologia Plantarum, 126, 446-457.
- Amtmann, A., 2009. Learning From Evolution: *Theellungiella* Generates New Knowledge on Essential and Critical Components of Abiotic Stress Tolerance in Plants, Molecular Plant, 2, 3-12.
- Arnon, D., 1949. Copper Enzymes in Isolated Chloroplasts, Polyphenol Oxidase in *Beta vulgaris*, Plant Physiology, 24, 1-15.
- Asada, K., 1999. The Water-Water Cycle in Chloroplasts: Scavenging of Active Oxygens and Dissipation of Excess Photons, Annual Review of Plant Biology, 50, 601-639.
- Asada, K., 2006. Production and Scavenging of Reactive Oxygen Species in Chloroplasts and Their Functions, Plant Physiology, 141, 391-396.
- Ashraf, M., Mcneilly, T. ve Bradshaw, A.D., 1986. Response and Ion Uptake of Selected Salt Tolerant and Unselected Lines of Three Legume Species, New Phytologist, 104, 463-472.
- Ashraf, M., 2004. Some Important Physiological Selection Criteria for Salt Tolerance in Plants, Flora, 199, 361-376.
- Ashraf, M. ve Harris, P.J.C., 2004. Potential Biochemical Indicators of Salinity Tolerance in Plants, Plant Science, 166, 3-16.
- Assaha, D.V., Ueda, A., Saneoka, H., Al-Yahyai, R. ve Yaish, M.W., 2017. The Role of Na⁺ and K⁺ Transporters in Salt Stress Adaptation in Glycophytes, Frontiers in Physiology, 8, 509.

- Barnes, J., Zheng, Y. ve Lyons, T., 2002. Plant Resistance to Ozone: The Role of Ascorbate. In: Air Pollution and Plant Biotechnology, In: Omasa, K., Saji, H., Youssefian, S., Kondo, N. (Eds.) 235-252, Springer, Tokyo.
- Bates, L.S., Waldren, R.P. ve Teare, I.D., 1973. Rapid Determination of Free Proline for Water Stress Studies, Plant and Soil, 39, 205-207.
- Baysal-Furtana, G., 2010. Tuz Gölü Çevresindeki Bazı Endemik Halofit Bitkilerin Ekofizyolojisi, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Beauchamp, C. ve Fridovich, I., 1971. Superoxide Dismutase: Improved Assays and an Assay Applicable to Acrylamide Gels, Analytical Biochemistry, 44, 276-287.
- Benzarti, M., Rejeb, K.B., Debez, A., Messedi, D. ve Abdelly, C., 2012. Photosynthetic Activity and Leaf Antioxidative Responses of *Atriplex portulacoides* Subjected to Extreme Salinity, Acta Physiologiae Plantarum, 34, 1679-1688.
- Bienert, G.P., Møller, A.L., Kristiansen, K.A., Schulz, A., Møller, I.M., Schjoerring, J.K. ve Jahn, T.P., 2007. Specific Aquaporins Facilitate the Diffusion of Hydrogen Peroxide Across Membranes, Journal of Biological Chemistry, 282, 1183-1192.
- Blokhina, O., Virolainen, E. ve Fagerstedt, K.V., 2003. Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: A Review, Annals of Botany, 91, 179-194.
- Boguszewska, D., Grudkowska, M. ve Zagdańska, B., 2010. Drought Responsive Antioxidant Enzymes in Potato (*Solanum tuberosum* L.), Potato Research, 53, 373-382.
- Bose, J., Rodrigo Moreno, A. ve Shabala, S., 2014. ROS Homeostasis in Halophytes in the Context of Salinity Stress Tolerance, Journal of Experimental Botany, 65, 1241-1257.
- Botella, M.A., Rosado, A., Bressan, R.A. ve Hasegawa, P.M., 2005. Plant Adaptive Responses to Salinity Stress, Plant Abiotic Stress, In: Jenks, M.A. ve Hasegawa, P.M. (Eds.), 37-70, Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK.
- Bradford, M.M., 1976. Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, Analytical Biochemistry, 72, 248-254.
- Breckle, S.W., 2002. Salinity: Environment Plants Molecules, Salinity, Halophytes and Salt Affected Natural Ecosystems, 53-77, Springer, Dordrecht.
- Breckle, S.W., 1983. Studies on Halophytes from Iran and Afghanistan II* Ecology of Halophytes Along Salt Gradients, Royal Society of Edinburg, Proceedings Sec. B: Biological 89 B, 203-215.
- Bremer, K., 1994. Asteraceae: Cladistics and Classification. Timbers Press, Portland, 1994.
- Bressan, R.A., 2008. Stres Fizyolojisi, Editörler: Taiz, L., Zeiger, E., 591-620, Palme Yayıncılık, Ankara.
- Breusegem, F.V., Vranová, E., Dat, J.F. ve Inz, D., 2001. The Role of Active Oxygen Species in Plant Signal Transduction, Plant Science, 161, 405-414.
- Bright, J., Desikan, R., Hancock, J.T., Weir, I.S. ve Neill, S.J., 2006. ABA-Induced NO Generation and Stomatal Closure in *Arabidopsis* are Dependent on H₂O₂ Synthesis, The Plant Journal, 45, 113-122.

- Castillo, F.J., 1996. Antioxidative Protection in the Inducible CAM Plant *Sedum album* L. Following the Imposition of Severe Water Stress and Recovery, Oecologia, 107, 469-477.
- Cavalcanti, F.R., Oliveira, J.T.A., Martins Miranda, A.S., Vie'gas, R.A. ve Silveira, J.A.G., 2004. Superoxide Dismutase, Catalase and Peroxidase Activities Do Not Confer Protection Against Oxidative Damage in Salt-Stressed Cowpea Leaves, New Phytologist, 163, 563-571.
- Chamberlain, D.F., 1975. *Scorzonera* L., Flora of Turkey and the East Aegean Islands, In: Davis, P.H. (ed.), volume 5, 632-657, Edinburgh: Edinburgh University Press.
- Chaparzadeh, N., D'Amico, M.L., Khavari-Nejad, R.A., Izzo, R. ve Navari-Izzo, F., 2004. Antioxidative Responses of *Calendula officinalis* under Salinity Conditions, Plant Physiology and Biochemistry, 42, 695-701.
- Chater, A.O., 1976. Flora Europaea, In: Tutin, T.G., Heywood, V.H., Burges, N.A., Moore, D.M., Valentine, D.H., Walters, S.M., Webb, D.A. (Eds.), 4, 317-322, Cambridge University Press.
- Cherian, S. ve Reddy M.P., 2003. Evaluation of NaCl Tolerance in The Callus Cultures of *Suaeda nudiflora* Moq., Biologia Plantarum, 46, 193.
- Coşkunçelebi, K., Makbul, S., Gültepe, M., Onat, D., Güzel, M.E. ve Okur, S., 2012. A New *Scorzonera* (Asteraceae) Species from South Anatolia, Turkey, and Its Taxonomic Position Based on Molecular Data, Turkish Journal of Botany, 36, 299-310.
- Çulha, Ş. ve Çakırlar, H., 2011. Tuzluluğun Bitkiler Üzerine Etkileri ve Tuz Tolerans Mekanizmaları, Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi, 11, 11-34.
- Dajic, Z., 2006. Salt Stress, Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants, Dordrecht, The Netherlands, 41-99.
- Das, K. ve Roychoudhury, A., 2014. Reactive Oxygen Species (ROS) and Response of Antioxidants as ROS Scavengers during Environmental Stress in Plants, Frontiers in Environmental Science, 2, 53.
- Dassanayake, M. ve Larkin, J.C., 2017. Making Plants Break a Sweat: The Structure, Function, and Evolution of Plant Salt Glands, Frontiers in Plant Science, 8, 406.
- Daudi, A., Cheng, Z., O'Brien, J.A., Mammarella, N., Khan, S., Ausubel, F.M. ve Bolwell, G.P., 2012. The Apoplastic Oxidative Burst Peroxidase in Arabidopsis is a Major Component of Pattern Triggered Immunity, Plant Cell, 24, 275-287.
- Debez, A., Ben Hamed, K., Grignon, C. ve Abdelly, C., 2004. Salinity Effects on Germination, Growth, and Seed Production of The Halophyte *Cakile maritima*, Plant Soil, 262, 179-189.
- Debez, A., Saadaoui, D., Ramani, B., Ouerghi, Z., Koyro, H.W., Huchzermeyer, B. ve Abdelly, C., 2006. Leaf H⁺-ATPase Activity and Photosynthetic Capacity of *Cakile maritima* under Increasing Salinity, Environmental and Experimental Botany, 57, 285-295.
- Demiral, T. ve Türkan, I., 2005. Comparative Lipid Peroxidation, Antioxidant Defense Systems and Proline Content in Roots of Two Rice Cultivars Differing in Salt Tolerance, Environmental and Experimental Botany, 53, 247-257.

- Dionisio Sese, M.L. ve Tobita, S., 1998. Antioxidant Responses of Rice Seedlings to Salinity Stress, Plant Science, 135, 1-9.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. ve Smith, F., 1956. Calorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances, Analytical Chemistry, 28, 350-56.
- Ellouzi, H., Ben Hamed, K., Cela, J., Munné Bosch, S. ve Abdely, C., 2011. Early Effects of Salt Stress on The Physiological and Oxidative Status of *Cakile maritima* (Halophyte) and *Arabidopsis thaliana* (Glycophyte), Physiologia Plantarum, 142, 128-143.
- Ellouzi, H., Hamed, K.B., Hernández, I., Cela, J., Müller, M., Magné, C., Abdely, C. ve Munné Bosch, S., 2014. A Comparative Study of The Early Osmotic, Ionic, Redox and Hormonal Signaling Response in Leaves and Roots of Two Halophytes and a Glycophyte to Salinity, Planta, 240, 1299-1317.
- Eltayeb, A.E., Kawano, N., Badawi, G.H., Kaminaka, H., Sanekata, T., Shibahara, T., Inanaga, S. ve Tanaka, K. 2007. Overexpression of Monodehydroascorbate Reductase in Transgenic Tobacco Confers Enhanced Tolerance to Ozone, Salt and Polyethylene Glycol Stresses, Planta, 225, 1255-1264.
- Erden, Y., Kırbağ, S. ve Yılmaz, Ö., 2013. Phytochemical Composition and Antioxidant Activity of Some *Scorzonera* Species, Proceedings of The National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences, 83, 271-276.
- Ertuğ, F., 2000. An Ethnobotanical Study Central Anatolia (Turkey), Economic Botany, 54, 155-182.
- Ertürk, Ö. ve Demirbağ, Z., 2003. *Scorzonera mollis* Bieb (Compositae) Bitkisinin Antimikrobiyal Aktivitesi, Ekoloji Çevre Dergisi, 12, 27-31.
- Ezer, N. ve Arısan, Ö.M., 2006. Folk Medicines in Merzifon (Amasya, Turkey), Turkish Journal of Botany, 30, 223-230.
- Fedina, I.S., Georgieva, K. ve Grigorova, I., 2002. Light Dark Changes in Proline Content of Barley Leaves under Salt Stress, Biologia Plantarum, 45, 59-63.
- Flowers, T.J., Hajibagheri, M.A. ve Clipson, N.J.W., 1986. Halophytes, The Quarterly Review of Biology, 61, 313-337.
- Flowers, T.J. ve Colmer, T.D. 2008. Salinity Tolerance in Halophytes, New Phytologist, 179, 945-963.
- Flowers, T.J., Galal, H.K. ve Bromham, L., 2010. Evolution of Halophytes: Multiple Origins of Salt Tolerance in Land Plants, Functional Plant Biology, 37, 604-612.
- Flowers, T.J. ve Colmer, T.D., 2015. Plant Salt Tolerance: Adaptations in Halophytes, Annals of Botany, 115, 327-331.
- Flowers, T.J., Munns, R. ve Colmer, T.D., 2015. Sodium Chloride Toxicity and the Cellular Basis of Salt Tolerance in Halophytes, Annals of Botany, 115, 419-431.
- Foyer, C. ve Halliwell, B., 1976. The Presence of Glutathione and Glutathione Reductase in Chloroplasts: A Proposed Role in Ascorbic Acid Metabolism, Planta, 133, 21-25.
- Foyer, C.H. ve Noctor, G., 2003. Redox Sensing and Signalling Associated with Reactive Oxygen in Chloroplasts, Peroxisomes and Mitochondria, Physiologia Plantarum, 119, 355-364.

- Foyer, C.H. ve Noctor, G., 2005. Redox Homeostasis and Antioxidant Signaling: A Metabolic Interface Between Stress Perception and Physiological Responses, The Plant Cell, 17, 1866-1875.
- Foyer, C.H. ve Noctor, G., 2009. Redox Regulation in Photosynthetic Organisms: Signaling, Acclimation and Practical Implications, Antioxidants and Redox Signalling, 11, 861-905.
- Franke, W., 1997. *Nutzpflanzenkunde*, sixth ed. Thieme, Stuttgart.
- Gadallah, M.A.A., 1999. Effects of Proline and Glycinebetaine on *Vicia faba* Responses to Salt Stress, Biologia Plantarum, 42, 249-257.
- Ghars, M.A., Parre, E., Debez, A., Bordenave, M., Richard, L., Leport, L., Bouchereau, A., Savouré, A. ve Abdelly, C., 2008. Comparative Salt Tolerance Analysis Between *Arabidopsis thaliana* and *Thellungiella halophila*, with Special Emphasis on K⁺/Na⁺ Selectivity and Proline Accumulation, Journal of Plant Physiology, 165, 588-599.
- Gill, S.S., Khan, N.A., Anjum, N.A. ve Tuteja, N., 2011. Amelioration of Cadmium Stress in Crop Plants by Nutrients Management: Morphological, Physiological and Biochemical Aspects, Plant Stress, 5, 1-23.
- Gong, D., Guo, Y., Schumaker, K.S. ve Zhu, J.K., 2004. The SOS3 Family of Calcium Sensors and SOS2 Family of Protein Kinases in Arabidopsis, Plant Physiology, 134, 919-926.
- Görçek, Z. ve Erdal, S., 2014. Lipoic Acid Mitigates Oxidative Stress and Recovers Metabolic Distortions in Salt Stressed Wheat Seedlings by Modulating Ion Homeostasis, the Osmo-Regulator Level and Antioxidant System, Journal of the Science of Food and Agriculture, 95, 2811-2817.
- Grigore, M.N. ve Toma, C., 2010. A Proposal for a New Halophytes Classification, Based on Integrative Anatomy Observations, Muz. Olteniei, Craiova, Stud. și Com., Șt. Nat., 26, 45-50.
- Grigore, M.N., 2014. Ivanescu, L. ve Toma, C., *Halophytes: An Integrative Anatomical Study*, 1, New York: Springer.
- Haddad, P.R. ve Jackson P.E., 1990. *Ion Chromatography: Principles and Applications*, Elsevier Science Publishers B.V., 775.
- Hajibagheri, M.A., Hall, J.L. ve Flowers, T.J., 1984. Stereological Analysis of Leaf Cells of the Halophyte *Suaeda maritima* (L.) Dum., Journal of Experimental Botany, 35, 1547-1557.
- Hajiboland, R., Bahrami-Rad, S., Akhiani, H., ve Poschenrieder, C., 2018. Salt Tolerance Mechanisms in Three Irano-Turanian Brassicaceae Halophytes Relatives of *Arabidopsis thaliana*, Journal of Plant Research, 131, 1029-1046.
- Halliwell, B. ve Gutteridge, J.M.C., *Free Radicals in Biology and Medicine*, Vol 5, London: Oxford University Press, 1985.
- Halliwell, B., 2006. Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology is a Fundamental Theme of Aerobic Life, Plant Physiology, 141, 312-322.

- Hamed, K.B., Dabbous, A., El Shaer, H. ve Abdely, C. Salinity Responses and Adaptive Mechanisms in Halophytes and Their Exploitation for Producing Salinity Tolerant Crops. In *Salinity Responses and Tolerance in Plants*, 2, 1-19, Springer, Cham., 2018.
- Han, Q.Q., Lü, X.P., Bai, J.P., Qiao, Y., Paré, P.W., Wang, S. M., Zhang, J.L., Wu, Y.N., Pang, X.P., Xu, W.B. ve Wang, Z. L., 2014. Beneficial Soil Bacterium *Bacillus subtilis* (GB03) Augments Salt Tolerance of White Clover, *Frontiers in Plant Science*, 5, 525.
- Hariadi, Y., Marandon, K., Tian, Y., Jacobsen, S.E. ve Shabala, S., 2011. Ionic and Osmotic Relations in Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) Plants Grown at Various Salinity Levels, *Journal of Experimental Botany*, 62, 185-193.
- Heath, R.L. ve Packer, L., 1968. Photoperoxidation in Isolated Chloroplast. I. Kinetics and Stoichiometry of Fatty Acid Peroxidation, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125, 189-198.
- Hong, C.Y., Chao, Y.Y., Yang, M.Y., Cho, S.C. ve Kao, C.H., 2009. Na⁺ but Not Clor Osmotic Stress is Involved in NaCl Induced Expression of Glutathione Reductase in Roots of Rice Seedlings, *Journal of Plant Physiology*, 166, 1598-1606.
- Hu, Y. ve Schmidhalter, U., 2002. Plant Toxicology, Limitation of Salt Stress to Plant Growth, In: Hock, B., Elstner, C.F. (Eds.), 91–224, Marcel Dekker Inc., New York.
- Hu, Y. ve Schmidhalter, U., 2005. Drought and Salinity: A Comparison of Their Effects on Mineral Nutrition of Plants, *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 168, 541-549.
- Jagesh, K., Tiwari, A.D., Munshi, R.K., Raghu, N., Pandey Ajay, A.J.S. ve Bhat, A.K.S., 2010. Effect of Salt Stress on Cucumber: Na⁺-K⁺ Ratio, Osmolyte Concentration, Phenols and Chlorophyll Content, *Acta Physiologiae Plantarum*, 32, 103-114.
- Joshi, R., Mangu, V.R., Bedre, R., Sanchez, L., Pilcher, W., Zandkarimi, H. ve Baisakh, N., 2015. Salt Adaptation Mechanisms of Halophytes: Improvement of Salt Tolerance in Crop Plants. In *Elucidation of Abiotic Stress Signaling in Plants*, 243-279, Springer, New York.
- Khan, M.A., Ungar, I.A. ve Showalter, A.M., 2000. The Effect of Salinity on the Growth, Water Status, and Ion Content of a Leaf Succulent Perennial Halophyte, *Suaeda fruticosa* (L.) Forssk. *Journal of Arid Environments*, 45, 73-84.
- Khan, M.A., Ungar, I.A. ve Showalter, A.M., 2005. Salt Stimulation and Tolerance in an Intertidal Stem-Succulent Halophyte, *Journal of Plant Nutrition*, 28, 1365-1374.
- Kotagiri, D. ve Kolluru, V.C., 2017. Effect of Salinity Stress on the Morphology and Physiology of Five Different Coleus Species, *Biomedical and Pharmacology Journal*, 10, 1639-1649.
- Kramer, D., 1984. Cytological Aspects of Salt Tolerance in Higher Plants. Salinity Tolerance in Plants: Strategies for Crop Improvement. In: Staples, R.C., Toenniessen, G.H. (Eds.), 3-15, Wiley, New York.
- Krieger Liskay, A., Fufezan, C. ve Trebst, A., 2008. Singlet Oxygen Production in Photosystem II and Related Protection Mechanism, *Photosynthesis Research*, 98, 551-564.
- Kronfuss, G., Wieser, G., Havranek, W.M. ve Polle, A., 1996. Effects of Ozone and Mild Drought Stress on Total and Apoplastic Guaiacol Peroxidase and Lipid Peroxidation in

- Current Year Needles of Young Norway Spruce (*Picea abies* L., Karst.), Journal of Plant Physiology, 148, 203-206.
- Kurth, E., Cramer, G.R., Lauchli, A. ve Epstein, E., 1986. Effects of NaCl and CaCl₂ on Cell Enlargement and Cell Production in Cotton Roots, Plant Physiology, 82, 1102-1106.
- Larcher, W., Physiological Plant Ecology, Vol 1, 506, Published by Springer, New York, 1995.
- Levitt, J., Responses of Plants to Environmental Stress, Vol 1, Academic Press, New York, 1980.
- Lichtenthaler, H.K., 1987. Impacts of Global Change on Tree Physiology and Forest Ecosystems, Mohren, G.M.J., Kramer, K., Sabate, S., (Eds.), 148, 350-382, Academic Press.
- Lipschitz, N., Shomer Ilan, A., Eshel, A. ve Waisel, Y., 1974. Salt Glands on Leaves of *Rhodes grass* (*Chlorisgayana* Kth), Annals of Botany, 38, 459-462.
- Liso, R., Calabrese, G., Bitonti, M.B. ve Arrigoni, O., 1984. Relationship Between Ascorbic Acid and Cell Division, Experimental Cell Research, 150, 314-320.
- Lovelli, S., Perniola, M., Di Tommaso, T., Bochicchio, R. ve Amato, M., 2012. Specific Root Length and Diameter of Hydroponically Grown Tomato Plants under Salinity, Journal of Agronomy, 11, 101-106.
- Lugojan, C. ve Ciulca, S., 2011. Evaluation of Relative Water Content in Winter Wheat, Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology, 15, 173-177.
- Makbul, S., Coşkunçelebi, K., Okur, S. ve Gültepe, M., 2016. Contribution to the Taxonomy of Turkish *Scorzonera* (Asteraceae) Taxa Based on Vegetative Anatomy, Nordic Journal of Botany, 34, 670-684.
- Marcum, K.B., Anderson, S.J. ve Engelke, M.C., 1998. Salt Gland Ion Secretion: A Salinity Tolerance Mechanism Among Five Zoysiagrass Species, Crop Science, 38, 806-810.
- May, M.J. ve Leaver, C.J., 1993. Oxidative Stimulation of Glutathione Synthesis in *Arabidopsis thaliana* Suspension Cultures, Plant Physiology, 103, 621-627.
- Mellidou, I. ve Kanellis, A.K., 2017. Genetic Control of Ascorbic Acid Biosynthesis and Recycling in Horticultural Crops, Frontiers in Chemistry, 5, 50.
- Mhamdi, A., Queval, G., Chaouch, S., Vanderauwera, S., Van Breusegem, F. ve Noctor, G., 2010. Catalase Function in Plants: A Focus on Arabidopsis Mutants as Stress-Mimic Models, Journal of Experimental Botany, 61, 4197-4220.
- Miller, G., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S. ve Mittler, R., 2010. Reactive Oxygen Species Homeostasis and Signalling during Drought and Salinity Stresses, Plant Cell & Environment, 33, 453-467.
- Mimura, T., Kura Hotta, M., Tsujimura, T., Ohnishi, M., Miura, M., Okazaki, Y., Mimura, M., Maeshima, M. ve Washitani Nemoto, S., 2003. Rapid Increase of Vacuolar Volume in Response to Salt Stress, Planta, 216, 397-402.
- Miransari, M., 2016. Abiotic and Biotic Stresses in Soybean Production, 1, 344, Elsevier, Academic Press, USA.

- Mishra, A. ve Tanna, B. 2017. Halophytes: Potential Resources for Salt Stress Tolerance Genes and Promoters, Frontiers in Plant Science, 8, 829.
- Mittler, R., 2002. Oxidative Stress, Antioxidants and Stress Tolerance, Trends in Plant Science, 7, 405-410.
- Moreira Muñoz, A. ve Muñoz Schick, M., 2007. Classification, Diversity, and Distribution of Chilean Asteraceae: Implications for Biogeography and Conservation, Diversity and Distributions, 13, 818-828.
- Mugdhal, V., Madaan, N. ve Mudgal, A., 2010. Biochemical Mechanisms of Salt Tolerance in Plants: A Review, International Journal of Botany, 6, 136-143.
- Mullineaux, P.M. ve Rausch, T., 2005. Glutathione, Photosynthesis and The Redox Regulation of Stress Responsive Gene Expression, Photosynthesis Research, 86, 459-474.
- Munns, R. ve Termaat, A., 1986. Whole Plant Responses to Salinity, Australian Journal of Plant Physiology, 13, 143-160.
- Munns, R., 1993. Physiological Processes Limiting Plant Growth in Saline Soils: Some Dogmas and Hypotheses, Plant Cell & Environment, 16, 15-24.
- Munns, R. ve Tester, M., 2008. Mechanisms of Salinity Tolerance, Annual Review of Plant Biology, 59, 651-681.
- Murakeözy, É.P., Nagy, Z., Duhazé, C., Bouchereau, A. ve Tuba, Z., 2003. Seasonal Changes in the Levels of Compatible Osmolytes in Three Halophytic Species of Inland Saline Vegetation in Hungary, Journal of Plant Physiology, 160, 395-401.
- Murashige, T. ve Skoog F., 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures, Physiologia Plantarum, 15, 473-497.
- Naidoo, G. ve Rughunanan, R., 1990. Salt Tolerance in the Succulent, Coastal Halophyte, *Sarcocornia natalensis*, Journal of Experimental Botany, 41, 497-502.
- Nakano, Y. ve Asada, Y., 1981. Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate Specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts, Plant Cell Physiology, 22, 867-880.
- Nazarova, E.A., 1997. Karyosystematic Investigation of the Genus *Scorzonera* L. sl (Lactuceae, Asteraceae), Caryologia, 50, 239-261.
- Netondo, G.W., Onyango, J.C. ve Beck, E., 2004. Sorghum and Salinity: II. Gas Exchange and Chlorophyll Fluorescence of Sorghum Under Salt Stress, Crop Science, 44, 806-811.
- Niu, X., Narasimhan, M.L., Salzman, R.A., Bressan, R.A. ve Hasegawa, P.M., 1993. NaCl Regulation of Plasma Membrane H⁺-ATPase Gene Expression in a Glycophyte and a Halophyte, Plant Physiology, 103, 713-718.
- Noctor, G., Veljovic-Jovanovic, S., Driscoll, S., Novitskaya, L. ve Foyer, C.H., 2002. Drought and Oxidative Load in the Leaves of C3 Plants: A Predominant Role for Photorespiration?, Annals of Botany, 89, 841-850.
- Ogburn, R.M. ve Edwards, E.J., 2010. Advances in Botanical Research, In: Kader, J.C. ve Delseny, M. (Eds.), Volume 55, 179-225, Elsevier Ltd., Academic Press, 2010.

- Orsini, F., D'Urzo, M.P., Inan, G., Serra, S., Oh, D.H., Mickelbart, M.V., Consiglio, F., Li, X., Jeong, J.C., Yun, D.J. ve Bohnert, H.J., 2010. A Comparative Study of Salt Tolerance Parameters in 11 Wild Relatives of *Arabidopsis thaliana*, Journal of Experimental Botany, 61, 3787-3798.
- Özfidan Konakçı, C., Uzilday, B., Özgür, R., Yıldıztuğay, E., Sekmen, A. H. ve Türkan, I., 2016. Halophytes as a Source of Salt Tolerance Genes and Mechanisms: a Case Study for The Salt Lake Area, Turkey, Functional Plant Biology, 43, 575-589.
- Paraschos, S., Magiatis, P., Kalpoutzakis, E., Harvala, C. ve Skaltsounis, A.L., 2001. Three New Dihydroisocoumarins from The Greek Endemic Species *Scorzonera cretica*, Journal of Natural Products, 64, 1585-1587.
- Pardo Domènech, L.L., Tifrea, A., Grigore, M.N., Boscaiu, M. ve Vicente, O., 2016. Proline and Glycine Betaine Accumulation in Two Succulent Halophytes under Natural and Experimental Conditions, Plant Biosystems, 150, 904-915.
- Parida, A.K., Das, A.B. ve Mitra, B., 2004. Effects of Salt on Growth, Ion Accumulation, Photosynthesis and Leaf Anatomy of The Mangrove, *Bruguiera parviflora*, Trees, 18, 167-174.
- Parida, A.K. ve Das, A.B., 2005. Salt Tolerance and Salinity Effects on Plants: A Review, Ecotoxicology and Environmental Safety, 60, 324-349.
- Parida, A.K. ve Jha, B., 2010. Antioxidative Defense Potential to Salinity in the Euhalophyte *Salicornia brachiata*, Journal of Plant Growth Regulation, 29, 137-148.
- Parida, A.K. ve Jha, B., 2013. Physiological and Biochemical Responses Reveal the Drought Tolerance Efficacy of the Halophyte *Salicornia brachiata*, Journal of Plant Growth Regulation, 32, 342-352.
- Parida, A.K., Veerabathini, S.K., Kumari, A. ve Agarwal, P.K., 2016. Physiological, Anatomical and Metabolic Implications of Salt Tolerance in the Halophyte *Salvadora persica* under Hydroponic Culture Conditions, Frontiers in Plant Science, 7, 351.
- Parvaiz, A. ve Satyawati, S., 2008. Salt Stress and Phytochemical Responses of Plants a Review, Plant Soil and Environment, 54, 89.
- Peng, C.L., Ou, Z.Y., Liu, N. ve Lin, G.Z., 2005. Response to High Temperature in Flag Leaves of Super High Yielding Rice Pei'ai 64S/E32 and Liangyoupeijiu, Rice Science, 12, 179-186.
- Pérez, V., Wherrett, T., Shabala, S., Muñiz, J., Dobrovinskaya, O. ve Pottosin, I., 2008. Homeostatic Control of Slow Vacuolar Channels by Luminal Cations and Evaluation of the Channel-Mediated Tonoplast Ca^{2+} Fluxes in Situ, Journal of Experimental Botany, 59, 3845-3855.
- Pessaraki, M. ve Szabolcs, I., 1999. Sustainable Food Security in the Era of Local and Global Environmental Change, In: Behnassi, M. ve Pollmann, O. (Eds.), Springer, Nordrhein-Westfalen Germany.
- Pinto, E., Sigaud Kutner, T.C., Leitao, M.A., Okamoto, O.K., Morse, D. ve Colepicolo, P., 2003. Heavy Metal Induced Oxidative Stress in Algae, Journal of Phycology, 39, 1008-1018.

- Pitman, M.G. ve Läuchli, A., 2002. Global Impact of Salinity and Agricultural Ecosystems. In *Salinity: Environment Plants Molecules*, In: Kumar, V., Wani, S.H., Suprasanna, P., Phan Tran, L.S. (Eds.), 3-20, Springer, Dordrecht.
- Qi, C.H., Chen, M., Song, J. ve Wang, B.S., 2009. Increase in Aquaporin Activity is Involved in Leaf Succulence of the Euhalophyte *Suaeda salsa*, under Salinity, Plant Science, 200-205.
- Qui, Q.S., Guo, Y., Dietrich, M.A., Schumaker, K.S. ve Zhu, J.K., 2002. Regulation of SOS1, a Plasma Membrane Na-H Exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by SOS2 and SOS3, Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America, 8436-8441.
- Rangani, J., Parida, A.K., Panda, A. ve Kumari, A., 2016. Coordinated Changes in Antioxidative Enzymes Protect The Photosynthetic Machinery from Salinity Induced Oxidative Damage and Confer Salt Tolerance in an Extreme Halophyte *Salvadora persica* L., Frontiers in Plant Science, 7, 50.
- Rao, A.C. ve Reddy, A.R., 2008. Glutathione Reductase: A Putative Redox Regulatory System in Plant Cells. In *Sulfur Assimilation and Abiotic Stress in Plants*, In: Hasanuzzaman, M., Narasimha, M., Prasad, V., Nahar, K. (Eds.), 111-147, Springer, Berlin, Heidelberg.
- Roy Choudhury, A., Pradhan, S., Chaudhuri, B. Ve Das, K., 2012a. 11 Phytoremediation of Toxic Metals and the Involvement of Brassica Species.
- Roy Choudhury, A., Das, K., Ghosh, S., Mukherjee, R.N. ve Banerjee, R., 2012b. Transgenic Plants: Benefits and Controversies, Journal of Botanical Society Bengal, 29-35.
- Rozema, J. ve Schat, H., 2013. Salt Tolerance of Halophytes, Research Questions Reviewed in the Perspective of Saline Agriculture, Environmental and Experimental Botany, 83-95.
- Sadou, O., Aycan, M., Taher, M., Kayan, M. ve Yıldız, M., 2016. Tuz Stresinin Ayçiçeğinin (*Helianthus annuus* L.) Fide Gelişimi Üzerine Etkisi, International Journal of Agricultural and Natural Sciences, 9, 13-17.
- Salin, M.L., 1987. Toxic Oxygen Species and Protective Systems of the Chloroplast, Physiologia Plantarum, 72, 681-689.
- Sarı, A., Zidorn, C., Ellmerer, E.P., Özgökçe, F., Ongania, K.H. ve Stuppner, H., 2007. Phenolic Compounds from *Scorzonera tomentosa* L., Helvetica Chimica Acta, 311-317.
- Scandalios, J.G., 1993. Oxygen Stress and Superoxide Dismutases, Plant Physiology, 101, 7-12.
- Schopfer, P., Plachy, C. ve Frahry, G., 2001. Release of Reactive Oxygen Intermediates (Superoxide Radicals, Hydrogen Peroxide, and Hydroxyl Radicals) and Peroxidase in Germinating Radish Seeds Controlled by Light, Gibberellin, and Abscisic Acid, Plant Physiology, 125, 1591-1602.
- Seçkin, B., Türkan, I., Sekmen, A.H. ve Özfidan, C., 2010. The Role of Antioxidant Defense Systems at Differential Salt Tolerance of *Hordeum marinum* Huds. (sea barley grass) and *Hordeum vulgare* L. (cultivated barley), Environmental and Experimental Botany, 69, 76-85.
- Sergio, L., De Paola, A., Cantore, V., Pieralice, M., Cascarano, N.A., Bianco, V.V. ve Di Venere, D., 2012. Effect of Salt Stress on Growth Parameters, Enzymatic Antioxidant

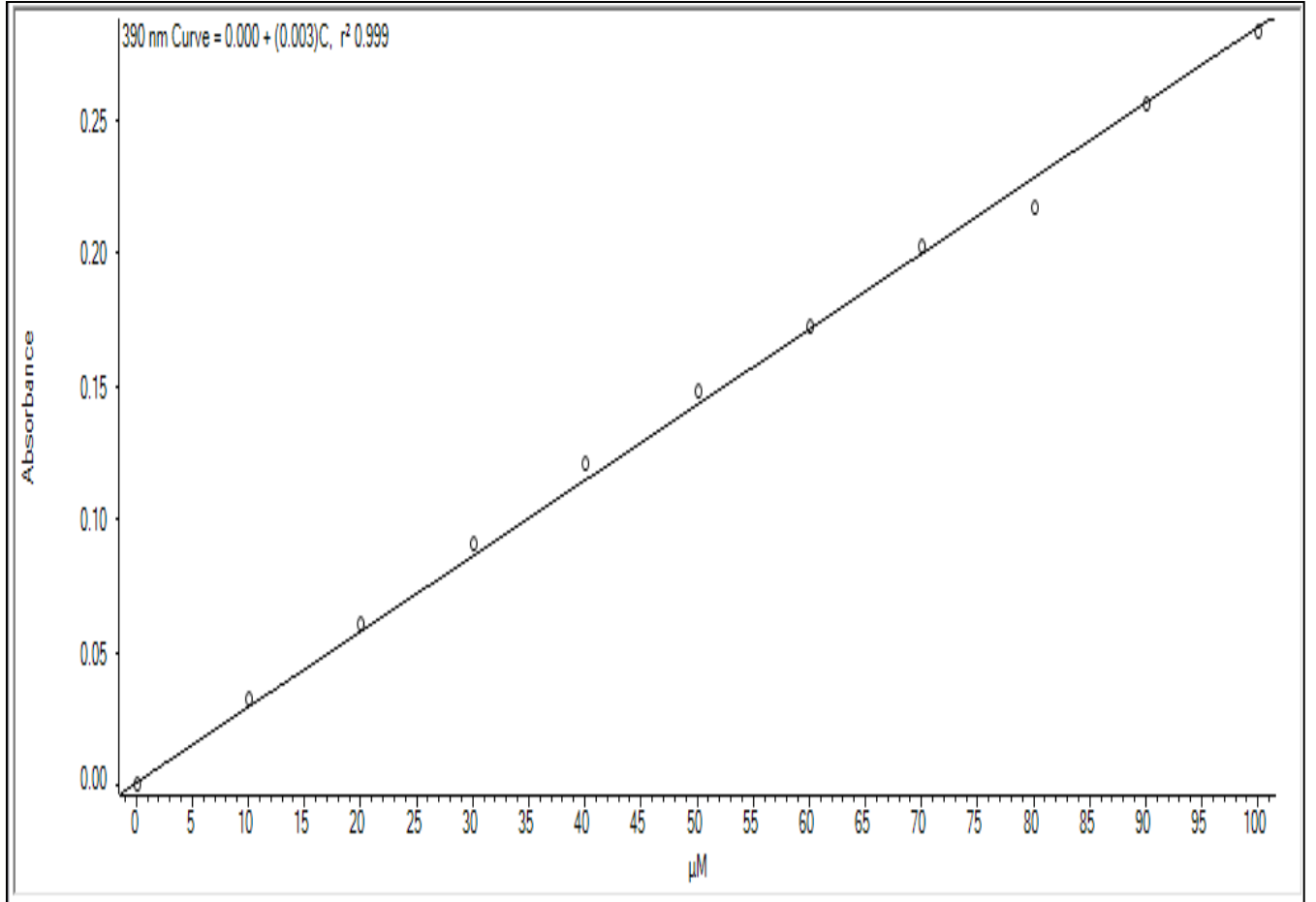
- System, and Lipid Peroxidation in Wild Chicory (*Cichorium intybus* L.), Acta Physiologiae Plantarum, 2349-2358.
- Serrano, R. ve Gaxiola, R., 1994. Microbial Models and Salt Stress Tolerance in Plants, Critical Reviews in Plant Sciences, 121-138.
- Shabala, S., Shabala, L., Volkenburgh, E.V. ve Newman, I., 2005. Effect of Divalent Cations on the Flux of Sand Leaf Photochemistry in Salinized Barley Leaves, Journal of Experimental Botany, 1369-1378.
- Shabala, S. ve Mackay, A., 2011. Ion Transport in Halophytes. In Advances in Botanical Research, In: Ahmad, P. ve Wani, M.R. (Eds.), 2, 151-199, Academic Press, Springer New York Heidelberg Dordrecht, London.
- Shabala, S., 2013. Learning From Halophytes: Physiological Basis and Strategies to Improve Abiotic Stress Tolerance in Crops, Annals of Botany, 112, 1209-1221.
- Shabala, S., Bose, J. ve Hedrich, R., 2014. Salt Bladders: Do They matter?, Trends in Plant Science, 19, 687-691.
- Shalata, A., Mittova, V., Volokita, M., Guy, M. ve Tal, M., 2001. Response of the Cultivated Tomato and Its Wild Salt-Tolerant Relative *Lycopersicon pennellii* to Salt-Dependent Oxidative Stress: The Root Antioxidative System, Physiologia Plantarum, 487-494.
- Shang, W. ve Feierabend, J., 1999. Dependence of Catalase Photoinactivation in Rye Leaves on Light Intensity and Quality and Characterization of a Chloroplast-Mediated Inactivation in Red Light, Photosynthesis Research, 201-213.
- Shao, H.B., Liang, Z.S., Shao, M.A. ve Sun, Q., 2005. Dynamic Changes of Anti-Oxidative Enzymes of 10 Wheat Genotypes at Soil Water Deficits. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 187-195.
- Sharma, P. ve Dubey, R.S., 2004. Ascorbate Peroxidase from Rice Seedlings: Properties of Enzyme Isoforms, Effects of Stresses and Protective Roles of Osmolytes, Plant Science, 541-550.
- Sharma, P., Jha, A.B., Dubey, R.S. ve Pessarakli, M., 2012. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions, Journal of Botany, 26.
- Shi, H., Ishitani, M., Kim, C. ve Zhu, J.K., 2000. The *Arabidopsis thaliana* Salt Tolerance Gene *SOS1* Encodes a Putative Na⁺/H⁺ Antiporter, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 97, 6896-6901.
- Shigeoka, S., Ishikawa, T., Tamoi, M., Miyagawa, Y., Takeda, T., Yabuta, Y. ve Yoshimura, K., 2002. Regulation and Function of Ascorbate Peroxidase Isoenzymes, Journal of Experimental Botany, 53, 1305-1319.
- Shiri, M., Rabhi, M., Abdelly, C. ve Amrani, A.E., 2015. The Halophytic Model Plant *Thellungiella salsuginea* Exhibited Increased Tolerance to Phenanthrene Induced Stress in Comparison with The Glycophytic One *Arabidopsis thaliana*, Ecological Engineering, 74, 125-134.
- Slama, I., Abdelly, C., Bouchereau, A., Flowers, T. ve Savoure, A., 2015. Diversity, Distribution and Roles of Osmoprotective Compounds Accumulated in Halophytes under Abiotic Stress, Annals of Botany, 115, 433-447.

- Strogonov, B.P., 1964. Physiological Basis of Salt Tolerance of Plants as Affected by Various Types of Salinity, In: Poljakoff, A.P., Mayber, P. (Eds.), 98-128.
- Sudhir, P., ve Murthy, S.D.S., 2004. Effects of Salt Stress on Basic Processes of Photosynthesis, Photosynthetica, 481-486.
- Sun, X., Feng, X., Li, C., Zhang, Z.P. ve Wang, L.J., 2015. Study on Salt Tolerance with YHem1 Transgenic Canola (*Brassica napus*), Physiologia Plantarum, 154, 223-242.
- Suzuki, N., Rivero, R.M., Shulaev, V., Blumwald, E. ve Mittler, R., 2014. Abiotic and Biotic Stress Combinations, New Phytologist, 203, 32-43.
- Szabados, L. ve Savouré, A., 2010. Proline: a Multifunctional Amino Acid, Trends in Plant Science, 15, 89-97.
- Szabados, L., Kovacs, H., Zilberstein, A. ve Bouchereau, A., 2011. Plants in Extreme Environments: Importance of Protective Compounds in Stress Tolerance, Advances in Botanical Research, 57,105–150.
- Taiz, L. ve Zeiger, E. 2008. Bitki Fizyolojisi (Plant Physiology) üçüncü baskıdan çeviri, Palme yayıncılık, ISBN: 978-9944-341-61-5, original ISBN: 0-87893-823-0.
- Taji, T., Seki, M., Satou, M., Sakurai, T., Kobayashi, M., Ishiyama, K., Narusaka, Y., Narusaka, M., Zhu, J.K. ve Shinozaki, K., 2004. Comparative Genomics in Salt Tolerance Between *Arabidopsis* and *Arabidopsis* Related Halophyte Salt Cress Using *Arabidopsis* Microarray, Plant Physiology, 1697-1709.
- Takahama, U. ve Oniki, T., 1994. The Association of Ascorbate and Ascorbate Oxidase in The Apoplast with IAA-Enhanced Elongation of Epicotyls from *Vigna angularis*, Plant and Cell Physiology, 257-266.
- Tanou, G., Molassiotis, A. ve Diamantidis, G., 2009. Induction of Reactive Oxygen Species and Necrotic Death Like Destruction in Strawberry Leaves y Salinity, Environmental and Experimental Botany, 270-281.
- Teitze, F., 1969. Enzymic Method for Quantitative Determination of Nanogram Amounts of Total and Oxidized Glutathione: Applications to Mammalian Blood and Other Tissues, Analytical Biochemistry, 502-522.
- Tester, M. ve Davenport, R., 2003. Na⁺ Tolerance and Na⁺ Transport in Higher Plants, Annals of Botany, 503-527.
- Trevisan, M., 2001. Correlates of Markers of Oxidative Status in the General Population, American Journal of Epidemiology, 348-356.
- Tüzüner, A., Toprak ve Su Analiz El Kitabı, Tarım Orman ve Köy İşleri Bakanlığı, Köy Hizmetleri Genel Müdürlüğü, Ankara, 1990.
- Urbanek, H., Kuzniak Gebarowska, E. ve Herka, K., 1991. Elicitation of Defense Responses in Bean Leaves by *Botrytis cinerea* Polygalacturanase, Acta Physiologia Plantarum, 43-50.
- Uzilday, B., Özgür, R., Sekmen, A. H., Yıldıztugay, E. ve Türkan, I., 2014. Changes in the Alternative Electron Sinks and Antioxidant Defence in Chloroplasts of the Extreme Halophyte *Eutrema parvulum* (*Thellungiella parvula*) under Salinity, Annals of Botany, 115, 449-463.

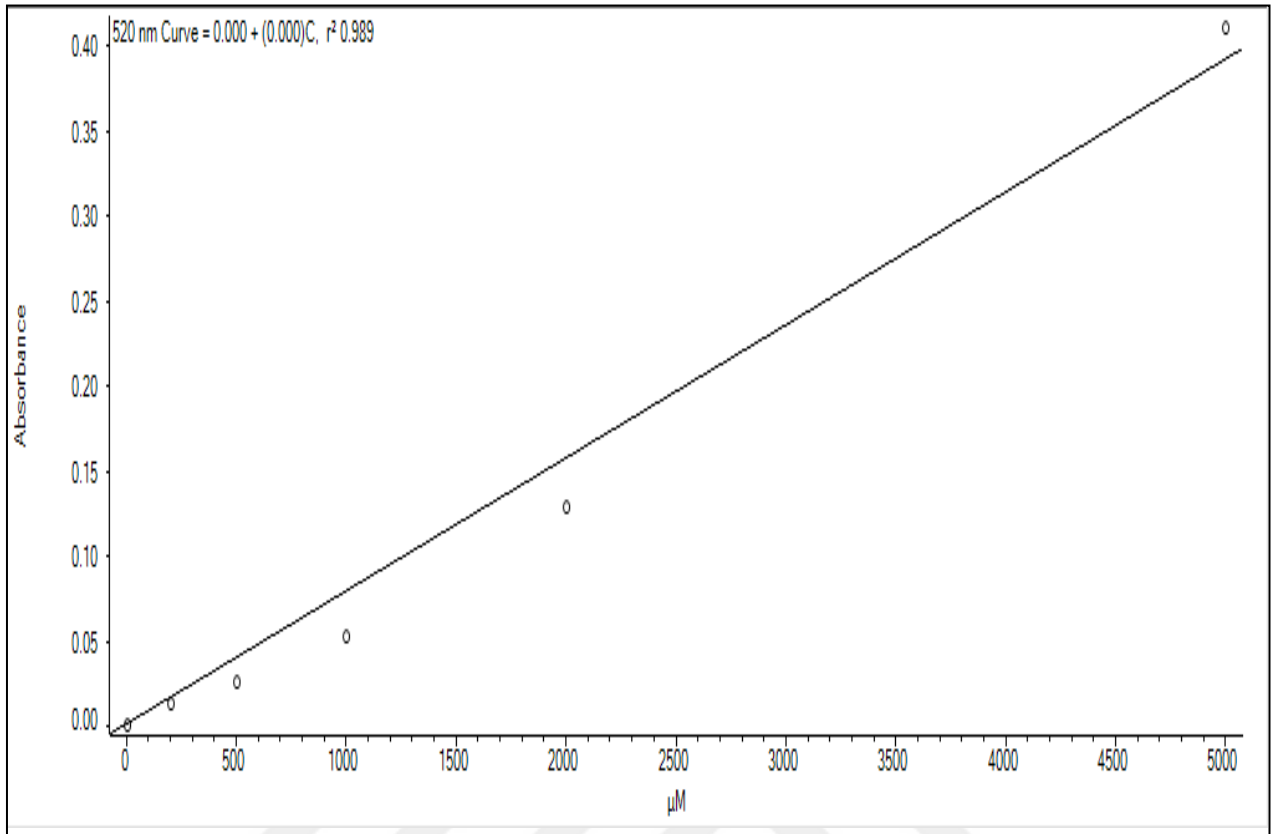
- Vaidyanathan, H., Sivakumar, P., Chakrabarty, R. ve Thomas, G., 2003. Scavenging of Reactive Oxygen Species in NaCl-Stressed Rice (*Oryza sativa* L.) Differential Response in Salt-Tolerant and Sensitive Varieties, Plant Science, 1411-1418.
- Velikova, V., Yordanov, I. ve Edreva, A., 2000. Oxidative Stress and Some Antioxidant Systems in Acid Rain Treated Bean Plants Protective Role Of Exogenous Polyamines, Plant Science, 59-66.
- Vera Estrella, R., Barkla, B. J., García-Ramírez, L. ve Pantoja, O., 2005. Salt Stress in *Thellungiella halophila* Activates Na⁺ Transport Mechanisms Required for Salinity Tolerance, Plant Physiology, 1507-1517.
- Volkov, V. ve Beilby, M.J., 2017. Salinity Tolerance in Plants: Mechanisms and Regulation of Ion Transport, Frontiers in Plant Science, 8, 1795.
- Wang, W., Vinocur, B. ve Altman, A., 2003. Plant Responses to Drought, Salinity and Extreme Temperatures: Towards Genetic Engineering for Stress Tolerance, Planta, 218, 1-14.
- Wang, X., Chang, L., Wang, B., Wang, D., Li, P., Wang, L., Yi, X., Huang, Q., Peng, M. ve Guo, A., 2013. Comparative Proteomics of *Thellungiella halophila* Leaves from Plants Subjected to Salinity Reveals the Importance of Chloroplastic Starch and Soluble Sugars in Halophyte Salt Tolerance, Molecular & Cellular Proteomics, 2174-2195.
- Xiong, L. ve Zhu, J.K., 2002. Salt Tolerance. In: The Arabidopsis Book. American Society of Plant Biologists, In: Somerville, C., Meyerowitz, E., Rockville, M.D. (Eds.).
- Xu, C., Tang X., Shao, H. ve Wang, H., 2016. Salinity Tolerance Mechanism of Economic Halophytes From Physiological to Molecular Hierarchy for Improving Food Quality, Current Genomics, 207-214.
- Yıldıztuğay, E., Sekmen, A.H., Türkan, I. ve Kuçukoduk, M., 2011. Elucidation of Physiological and Biochemical Mechanisms of an Endemic Halophyte *Centaurea tuzgoluenis* under Salt Stress, Plant Physiology and Biochemistry, 816-824.
- Youssef, A.M., 2009. Salt Tolerance Mechanisms in Some Halophytes From Saudi Arabia and Egypt, Research Journal of Agriculture and Biological Sciences, 191-206.
- Zeng, F., Shabala, S., Maksimović, J.D., Maksimović, V., Bonales-Alatorre, E., Shabala, L., Yu, M., Zhang, G. ve Živanović, B.D., 2018. Revealing Mechanisms of Salinity Tissue Tolerance in Succulent Halophytes: A Case Study for *Carpobrotus rossi*, Plant, Cell & Environment, 2654-2667.
- Zhu, J.K., 2001. Plant Salt Tolerance, Trends in Plant Science, 66-71.
- Zidorn, C., Ellmerer, E.P., Sturm, S. ve Stupper, H., 2003. Trylobibenzyls E and F from *Scorzonera humilis* and Distribution of Caffeic Acid Derivatives, Lignans and Trylobibenzyls in European Taxa of the Subtribe Scorzonerinae (Lactuceae, Asteraceae), Phytochemistry, 61-67.

8. EKLER

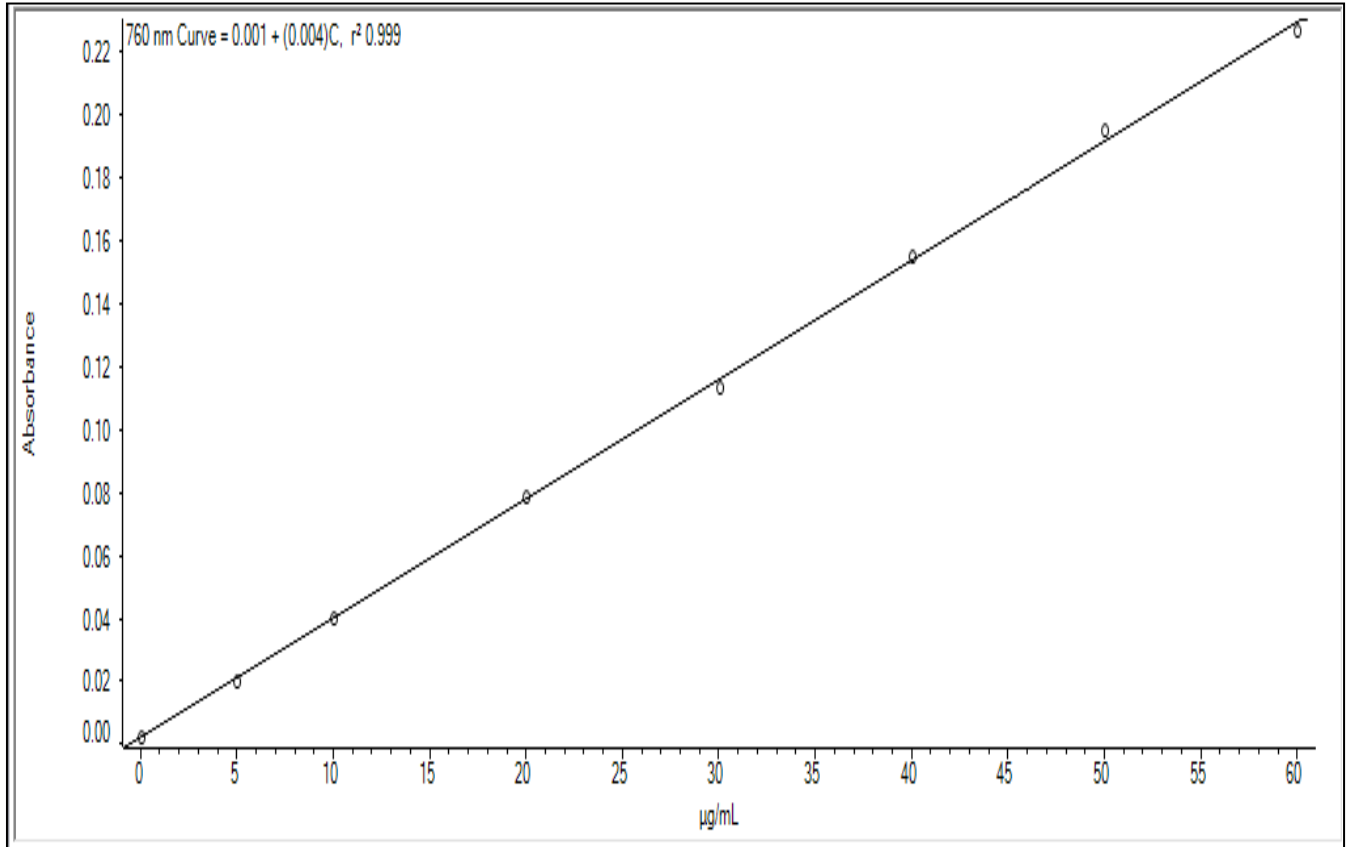
Ek 1. Hidrojen Peroksit Standart Eğri Grafiği



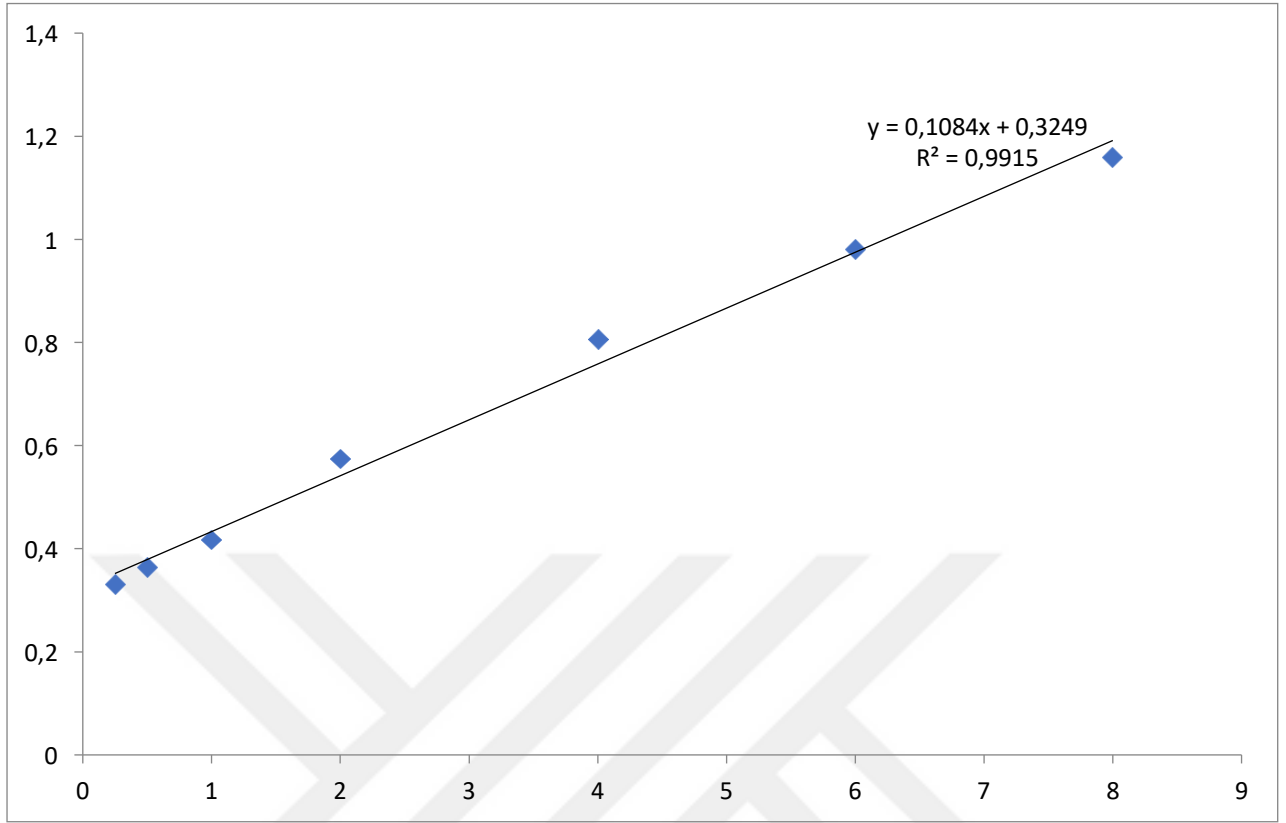
Ek 2. Prolin Standart Eğri Grafiği



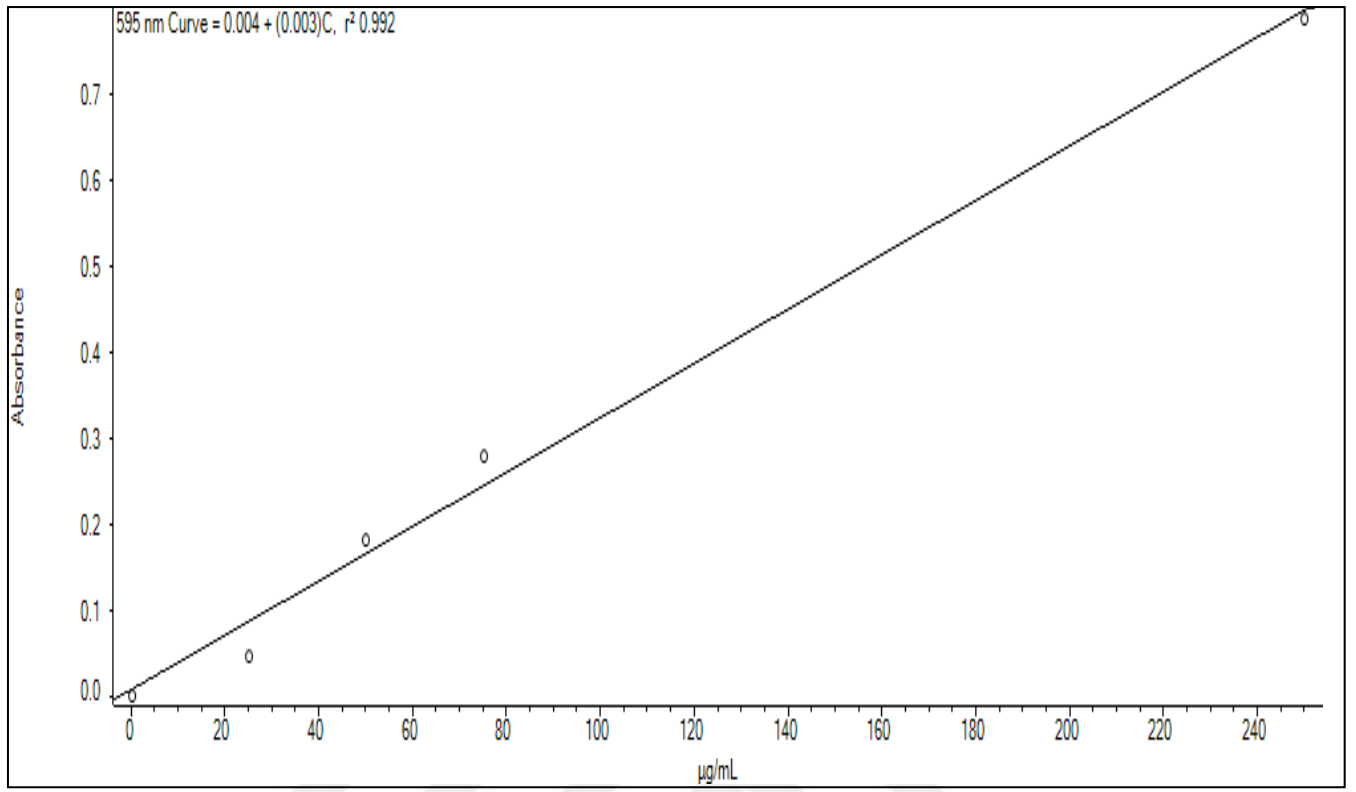
Ek 3. Askorbat Standart Eğri Grafiği



Ek 4. Glutasyon Standart Eğri Grafiği



Ek 5. Protein Standart Eğri Grafiği



ÖZGEÇMİŞ

Tez çalışmasını hazırlayan ve sunan Cansu ALTUNTAŞ 8 Ocak 1991’de Trabzon’da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Trabzon’da tamamladı. 2008 yılında KTÜ Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nü kazandı. Biyoloji bölümünü 2012 yılında tamamladıktan sonra aynı yıl KTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı. 2015 yılında yüksek lisans programını tamamladıktan sonra yine aynı yıl içerisinde Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Doktora Eğitimine başladı. Lisansüstü eğitim süresince TÜBİTAK 111T511, 114Z148 (COST), 114Z336 kodlu ulusal ve uluslararası projelerde bursiyer olarak, FHD-2016-5655, FHD-2016-5455, FBA-2016-5562, FDK-2018-7712 kodlu BAPprojelerinde ise araştırmacı olarak görev aldı. Evli ve bir çocuk beklemektedir.