

**ÖN ALFA TOKOFEROL UYGULAMASININ
TUZ STRESİ ALTINDA SOYA (*GLYCINE MAX L.*) KÖKLERİ
ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**SEDA ŞEREFLİOĞLU
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

T.C.
SİNOP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÖN ALFA TOKOFEROL UYGULAMASININ TUZ STRESİ ALTINDA SOYA
(*GLYCINE MAX L.*) KÖKLERİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

SEDA ŞEREFLİOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr Burcu SEÇKİN DİNLER

SİNOP – 2015

T.C.
SİNOP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Bu çalışma, jürimiz tarafından 09/11/2015 tarihinde yapılan sınav ile Biyoloji Anabilim
Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Yrd.Doç.Dr Burcu SEÇKİN DİNLER



Üye : Yrd.Doç.Dr Sefer DEMİRBAS



Üye : Yrd.Doç.Dr Halil KOÇ



ONAY :

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

09/11/2015

Doç.Dr. Turgay KORKUT

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖN ALFA TOKOFEROL UYGULAMASININ TUZ STRESİ ALTINDA SOYA (*GLYCINE MAX L.*) KÖKLERİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Bu çalışmada iki haftalık soya fasülyesi (*Glycine max L.*) yapraklarına dışarıdan uygulanan alfa-tokoferolün tuz stresi altında köklerdeki etkileri, büyüme parametreleri, prolin, malondialdehid (MDA), hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit anyonu, kalsiyum (Ca^{2+}) ve fosfor (P) iyon miktarı, içsel oksin (IAA) düzeyleri ve antioksidan enzimler olan süperoksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APX), peroksidaz (POX), glutatyon reduktaz (GR), glutatyon-s-transferaz (GST) enzim ve izoenzim aktiviteleri dikkate alınarak tespit edilmiştir.

Dışarıdan uygulanan alfa-tokoferol, tuz stresinin azalttığı bağıl su içeriği (BSİ) ve bağıl büyüme oranında (BBO) iyileşmeye neden olurken; tuz stresi ile artan prolin, hidrojen peroksit, süperoksit anyon üretimi ve MDA değerlerinde azalmaya neden olmuştur. Tuz stresi uygulanan soya köklerinde SOD, APX ve GST enzim aktiviteleri azalırken, POX ise aktivitesi artmıştır. Bununlar beraber alfa-tokoferol uygulaması SOD enzim aktivitesini azaltmış, POX ve GST enzim aktivitelerini arttırmış ancak APX aktivitesini değiştirmemiştir. Ayrıca kalsiyum ve fosfor miktarı ile içsel oksin düzeyleri alfa-tokoferolün etkisi ile artış göstermiştir.

Elde edilen sonuçlar, alfa-tokoferol uygulamasının soya köklerinde tuz stresi ile oluşan oksidatif hasarı hem bazı antioksidan enzimlerin görevlerini üstlenerek hem de uyarıcı etki yaparak azalttığı ve yapraklardan gelen uyartının iyileşme sürecinde köklerde sinyal oluşturduğunu düşündürmektedir.

Anahtar kelimeler: alfa-tokoferol, tuz stresi, soya fasülyesi

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF PRE-TREATMENT OF ALPHA TOCOPHEROL IN SOYBEAN (*GLYCINE MAX* L.) ROOTS UNDER SALINITY

ABSTRACT

In this study, the effects of exogenously applied alpha- tocopherol on (*Glycine max* L.) leaves under salt stress was determined in wiew of growth parameters, proline, malondialdehyde, hydrogen peroxide, superoxide anion production, calcium and phosphorus ion contents, auxin level and activities of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, peroxidase, glutathione reductase, glutathione-s-transferase in two weeks old (*Glycine max* L.) roots.

Exogenously applied alpha-tocopherol increased relative water content and relative growth rate but reduced proline, hydrogen peroxide, superoxide anion radical and MDA content. Salt stress decreased SOD, APX, GST and increased POX activity. However, alpha-tocopherol application reduced SOD enzyme acitivity and increased POX, GST but did not change APX activity. Otherwise, calcium and phosphorus and internal auxin level were increased by alpha-tocopherol.

This findings suggested that alpha-tocopherol application alleviated the salt induced oxidative damage by simulating the some antioxidant enzyme or stimulating them and it also may have produced signal from leaves to roots.

Key words: alpha-tocopherol, salt stress, soybean

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim boyunca çalışmalarımı yönlendiren ,bilgisinden ve ışığından faydalandığım maddi ve manevi acıdan beni destekleyen saygıdeğer hocam Yrd. Doç. Burcu SEÇKİN DİNLER (Sinop Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Anabilim Dalı) ‘e

Çalışmalarında benden yardımlarını esirgemeyen Merve AKSOY ve Eda TAŞCI’ya

Hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen ve birçok fedakarlık göstererek beni bugünlere getiren annem Aysel ŞEREFLİOĞLU’na ve babam Kenan ŞEREFLİOĞLU’na teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SEMBOLLER VE KISALTMALAR	vi
ŞEKİLLER VE ÇİZELGELER	ix
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	7
3.MATERYAL ve METOD	17
3.1. Bitki materyali ve Deneme düzeneği	17
3.2. Büyüme parametreleri	19
3.2.1. Uzunluk Ölçümü	19
3.2.2. Bağlı Büyüme Oranı	20
3.2.3. Bağlı Su İçeriği	20
3.3. Lipit Peroksidasyonu (MDA)	20
3.4. Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂) Miktarı	20
3.5. Prolin Miktarı	21
3.6. İçsel Kalsiyum ve Fosfor Miktarı	21
3.7. Süperoksit Anyon Üretimi Miktarı	21
3.8. İçsel Alfa Tokoferol Miktarı	21
3.9. İndol Asetik Asit (IAA) Hormon Düzeyi	22
3.10. Antioksidan Enzim Aktiviteleri	22
3.10.1. Süperoksit Dismutaz (SOD; EC 1.15.1.1.) Enzim ve İzoenzim Aktiviteleri	22
3.10.2. Askorbat Peroksidaz (APX; EC 1.11.1.11) Enzim ve İzoenzim Aktivitesi	23
3.10.3. Glutasyon s-Transferaz (GST; EC 2.5.1.18) Enzim ve İzoenzim Aktivitesi	23
3.10.4. Peroksidaz (POX; EC 1.11.1.7) Enzim ve İzoenzim Aktivitesi	23
3.10.5. Glutasyon Reduktaz (GR; EC 1.6.4.2) Enzim Aktivitesi	24
3.11. İstatistiksel analizler	24

4. BULGULAR	25
4.1. Büyüme Parametrelerinin Sonuçları	25
4.1.1. Kök ve Gövde Uzunlukları	25
4.2. Bağlı Büyüme Oranı ve Bağlı Su İçeriği	26
4.3. Lipit Peroksidasyonu (MDA)	27
4.4. Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂) Miktarı	28
4.5. Prolin Miktarı	29
4.6. İçsel Kalsiyum (Ca ⁺⁺) ve Fosfor (P) Miktarı	30
4.7. Süperoksit Anyon Üretimi Miktarı	30
4.8. İçsel Alfa Tokoferol Miktarı	31
4.9. İndol Asetik Asit (IAA) Hormon Düzeyi	32
4.10. Antioksidan Enzim Aktiviteleri	33
4.10.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim ve İzoenzim Aktivitesi	33
4.10.2 Askorbat Peroksidaz (APX) Enzim ve İzoenzim Aktivitesi	35
4.10.3. Glutasyon s- Transferaz (GST) Enzim ve İzoenzim Aktivitesi	37
4.10.4. Peroksidaz (POX) Enzim ve İzoenzim Aktivitesi	39
4.10.5. Glutasyon Reduktaz (GR) Enzim	41
5. TARTIŞMA	42
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	48
7. KAYNAKLAR	49

SEMBOLLER VE KISALTMALAR

SEMBOLLER

%	Yüzde
α	Alfa
ϵ	Ekstinsiyon katsayısı
β	Beta
°C	Santigrat derece
CO ₂	Karbondioksit
dI	Deiyonize
dk	Dakika
ml	Mililitre
mM	Milimolar
μ M	Mikromolar
nm	Nanometre
O ₂	Oksijen
t1	İlk hasat
t2	Son hasat

KISALTMALAR

APX : Askorbat peroksidaz
AOT : Aktif oksijen türleri
BBO : Bağlı büyüme oranı
BSİ : Bağlı su içeriği
CaM : Kalmodulin
CAT : Katalaz
CDNB : 1-kloro-2,4-dinitrobenzen
DAB : 3,3'-Diaminobenzidin Tetrahidrokloroid
DAG : Diaçilgliserol
EDTA : Etilendiamintetraasetik asit
FD : Ferrodoksin
FNR : Ferodoksin NADPH reduktaz
GPX : Glutasyon peroksidaz
GR : Glutasyon reduktaz
GSH : Glutasyon
GSSG : Okside glutasyon
GST : Glutasyon s- transferaz
H₂O₂ : Hidrojen peroksit
HPLC : Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
KA : Kuru ağırlık
MDA : Malondialdehit
NADP : Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NBT : Nitro blue tetrazolium
PAGE : Poliakrilamid jel elektroforezi
PIP2: Fosfatidilinositol
IP3: İnositol trifosfat
POX : Peroksidaz
PS : Fotosistem
ROS : Reaktif oksijen türleri
SOD : Süperoksit dismutaz
TA : Turgorlu ağırlık

TBA : Tiobarbutrik asit

TCA : Trikloroasetik asit

YA : Yaş ağırlık

ŞEKİLLER ve ÇİZELGELER

ŞEKİLLER

	Sayfa No
Şekil 1.1. Bitkilerde stres sinyalinin algılanması ve iletimi	2
Şekil 1.2. Tuz stresi altında iyon homeostasisinin düzenlenmesinde SOS yolu	5
Şekil 2.1. Enzim aktivitesi	8
Şekil 2.2. Oksidatif strese karşı enzimatik savunma mekanizmaları	10
Şekil 2.3. Antioksidan tarafından serbest radikalın nötralize edilmesi	10
Şekil 2.4. E vitamin biyosentetik yolu	11
Şekil 2.5. Türkiye’de soya fasulyesinin illere göre dağılımı (2002)	13
Şekil 2.6. Türkiye’de soya fasulyesi veriminin illere göre dağılımı (2002)	14
Şekil 2.7. Soya fasulyesi üretimi yapan ülkelerin ekim alanları	13
Şekil 2.8. Soya fasulyesi üretimi yapan ülkelerin üretim miktarları (Bin Ton)	15
Şekil 2.9. Türkiye’de soya fasulyesi ekim alanları, üretim miktarları ve verim değerleri (2002-2012)	15
Şekil 2.10. Türkiye’nin soya fasulyesi ithalat miktarı ve değeri (2002-2012)	15
Şekil 3.1. Soya fasulyesi genel görünümü	17
Şekil 3.2. Soya fasulyesine ait kök genel görünümü	18
Şekil 3.3. Farklı tuz konsantrasyonlarının soya (<i>Glycine max</i> L.) kökleri üzerine etkisi	19
Şekil 3.4. Farklı alfa tokoferol konsantrasyonlarının tuz stresi altındaki soya (<i>Glycine max</i> L.) kökleri üzerine etkisi	19
Şekil 4.1. Alfa tokoferol uygulaması (2.5 mM) sonrası tuz stresine maruz bırakılan bitkilerin 3. gün hasatı sonrasında malondialdehit miktarında (nmol/g ⁻¹ YA) gözlenen değişimler	27
Şekil 4.2. Alfa tokoferol uygulaması (2.5 mM) sonrası tuz stresine maruz bırakılan bitkilerin 3. gün hasatı sonrasında hidrojen peroksit miktarında (µmol/g ⁻¹ YA) gözlenen değişimler	28
Şekil 4.3. Alfa tokoferol uygulaması (2.5 mM) sonrası tuz stresine maruz	

	birakılan bitkilerin 3. gün hasatı sonrasında prolin miktarında ($\mu\text{mol/g}^{-1}$ YA) gözlenen değişimler	29
Şekil 4.4.	Alfa tokoferol uygulaması (2.5 mM) sonrası tuz stresine maruz bırakılan bitkilerin 3. gün hasatı sonrasında süperoksit radikalinde (%) gözlenen değişimler	31
Şekil 4.5.	Alfa tokoferol uygulaması (2.5 mM) sonrası tuz stresine maruz bırakılan bitkilerin 3. gün hasatı sonrasında İAA miktarında (pg/mg^{-1} YA) gözlenen değişimler	32
Şekil 4.6	Alfa tokoferol uygulaması (2.5 mM) sonrası tuz stresine maruz bırakılan bitkilerin 3. gün hasatı sonrasında SOD enzim ve izoenzim aktivitesinde (ünite/mg^{-1} protein) gözlenen değişimler	33
Şekil 4.7.	Alfa tokoferol uygulaması (2.5 mM) sonrası tuz stresine maruz bırakılan bitkilerin 3. gün hasatı sonrasında SOD izoenzim aktivitesinde (ünite/mg^{-1} protein) gözlenen değişimler	34
Şekil 4.8.	Alfa tokoferol uygulaması (2.5 mM) sonrası tuz stresine maruz bırakılan bitkilerin 3. gün hasatı sonrasında APX enzim ve izoenzim aktivitesinde (ünite/mg^{-1} protein) gözlenen değişimler	35
Şekil 4.9.	Alfa tokoferol uygulaması (2.5 mM) sonrası tuz stresine maruz bırakılan bitkilerin 3. gün hasatı sonrasında APX izoenzim aktivitesinde (ünite/mg^{-1} protein) gözlenen değişimler	36
Şekil 4.10.	Alfa tokoferol uygulaması (2.5 mM) sonrası tuz stresine maruz bırakılan bitkilerin 3. gün hasatı sonrasında GST enzim ve izoenzim aktivitesinde (ünite/mg^{-1} protein) gözlenen değişimler	37
Şekil 4.11.	Alfa tokoferol uygulaması (2.5 mM) sonrası tuz stresine maruz bırakılan bitkilerin 3. gün hasatı sonrasında GST izoenzim aktivitesinde (ünite/mg^{-1} protein) gözlenen değişimler	38
Şekil 4.12.	Alfa tokoferol uygulaması (2.5 mM) sonrası tuz stresine maruz bırakılan bitkilerin 3. gün hasatı sonrasında POX enzim ve izoenzim aktivitesinde (ünite/mg^{-1} protein) gözlenen değişimler	39
Şekil 4.13.	Alfa tokoferol uygulaması (2.5 mM) sonrası tuz stresine maruz bırakılan bitkilerin 3. gün hasatı sonrasında POX izoenzim aktivitesinde (ünite/mg^{-1} protein) gözlenen değişimler	40
Şekil 4.14.	Alfa tokoferol uygulaması (2.5 mM) sonrası tuz stresine maruz	

bırakılan bitkilerin 3. gün hasatı sonrasında GR enzim aktivitesinde (ünite/mg ⁻¹ protein) gözlenen değişimler	41
--	----

ÇİZELGELER

Çizelge 4.1.	Alfa tokoferol uygulaması (2.5 mM) sonrası tuz stresine maruz bırakılan bitkilerin 3. gün hasatı sonrasında kök ve gövde uzunluklarında (cm) gözlenen değişimler	25
Çizelge 4.2.	Alfa tokoferol uygulaması (2.5 mM) sonrası tuz stresine maruz bırakılan bitkilerin 3. gün hasatı sonrasında kök ve gövdedeki yaş ve kuru ağırlığında (g) gözlenen değişimler	26
Çizelge 4.3	Alfa tokoferol uygulaması (2.5 mM) sonrası tuz stresine maruz bırakılan bitkilerin 3. gün hasatı sonrasında bağıl büyüme oranında ($\text{mg} \cdot \text{d}^{-1}$) gözlenen değişimler	27
Çizelge 4.4.	Alfa tokoferol uygulaması (2.5 mM) sonrası tuz stresine maruz bırakılan bitkilerin 3. gün hasatı sonrasında bağıl su içeriğinde(%) gözlenen değişimler	28
Çizelge 4.5.	Alfa tokoferol uygulaması (2.5 mM) sonrası tuz stresine maruz bırakılan bitkilerin 3. gün hasatı sonrasında içsel kalsiyum ve fosfor miktarında (%) gözlenen değişimler	32
Çizelge 4.6.	Alfa tokoferol uygulaması (2.5 mM) sonrası tuz stresine maruz bırakılan bitkilerin 3. gün hasatı sonrasında alfa tokoferol miktarında gözlenen değişimler	33

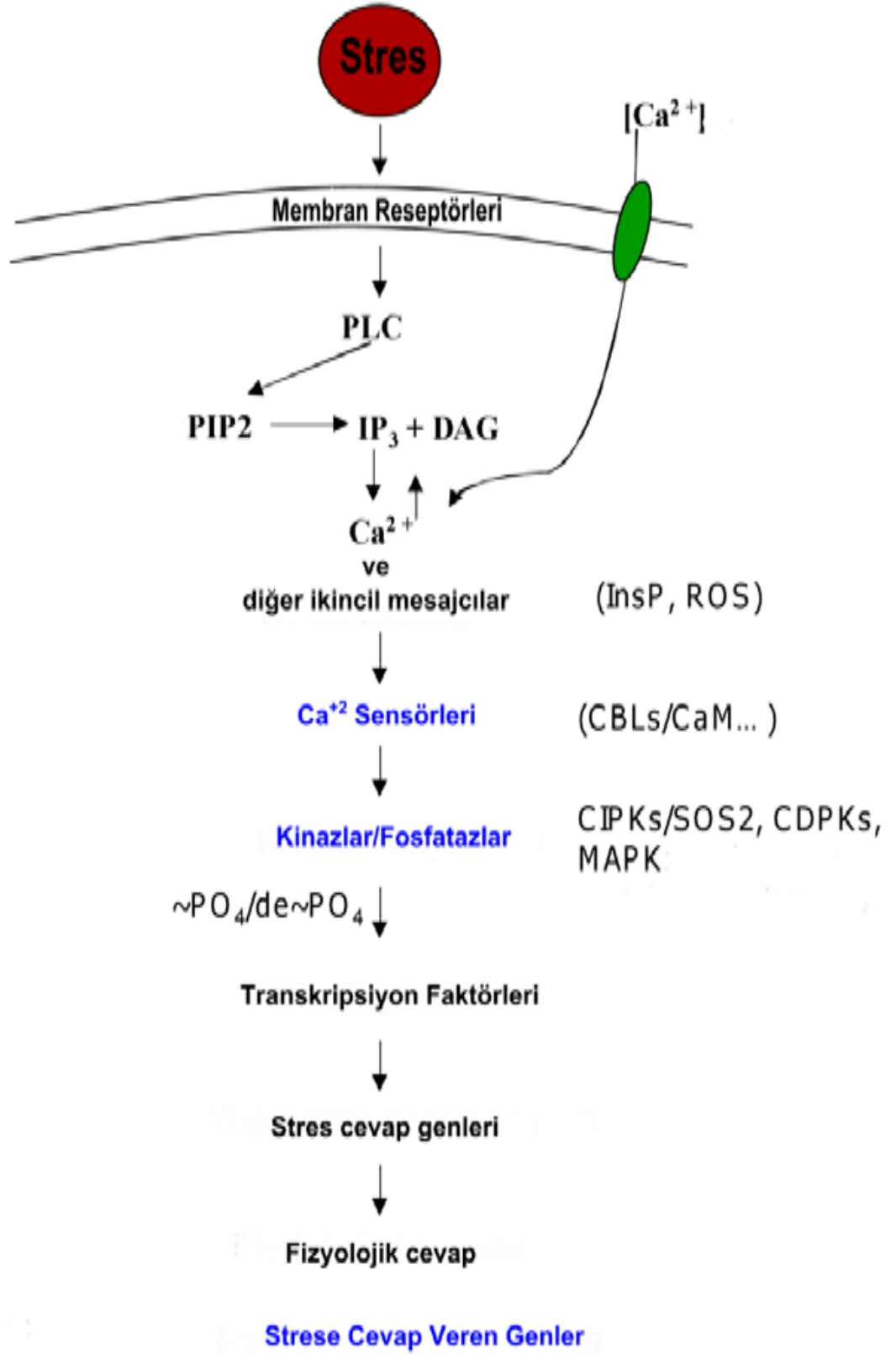
1. GİRİŞ

Bitkiler yaşamlarını sürdürdükleri alanlarda, gelişimlerini kısıtlayıcı çeşitli olumsuz koşullara maruz kalmaktadırlar. Bitkilerde büyüme, gelişme ve metabolizmayı etkileyen ya da engelleyen durumlara stres adı verilmektedir.

Bitki tür ve çeşitlerine göre çok değişik fizyolojik ve biyokimyasal tepkiler ortaya çıkabilmekte, tolerans seviyelerinde ise farklılıklar göstermektedir. Serbest oksijen radikallerinin sentezlenmesi ve bu zararlı kimyasalların hücre zarlarında tahribat yapması ile sonuçlanan tuzluluk ve kuraklık stresi koşullarında, içsel antioksidan enzimlerini yüksek düzeyde sentezleyebilen bitkiler ve çeşitleri de daha iyi dayanıklılık sergilemektedirler (Yaşar ve ark., 2008).

Stresin algılanması ve stres sinyal iletiminde bitkilerin ozmotik stresi algılama mekanizması, ozmosensörlerin henüz belirlenememesi nedeni ile netlik kazanmamıştır. Bununla birlikte farklı moleküllerin birbirleri ile ilişkileri ve kompleks sinyal iletişim ağında yer aldığı pozisyonları açıklık kazanmamasına rağmen sinyal iletiminin çeşitli bileşenleri belirlenmiştir (Bartels ve Sunkar, 2005). Bunların başında ise; fosfolipit sinyali (kalsiyum gibi ikincil mesajcılar), protein kinazlar, fosfatazların pek çok sınıfı gibi ozmotik stres sinyal ileticileri yer almaktadır.

STRES SİNYALLEMESİ



Şekil 1.1. Bitkilerde stres sinyalinin algılanması ve iletimi (Mahajan ve Tuteja, 2005)

Fosfolipit sinyali; membran fosfolipitleri inositol 1,4,5 trifosfat (IP3), diaçil gliserol (DAG), fosfotidik asit (PA) gibi çoklu sinyal moleküllerinden oluşan bir sistemdir (Zhu, 2002). Fosfolipaz C, fosfotidilinositol 4,5 bifosfatı (PIP2) hidroliz yoluyla, ikincil mesajcı olarak görev yapan IP3 ve DAG'a katalizler. IP3, Ca^{+2} 'u serbest bırakır. Sitozolik Ca^{+2} seviyesindeki değişim, Ca^{+2} sensörü olarak da bilinen kalsiyum bağlayıcı proteinler tarafından algılanır ve fosforilasyon kaskadlar, kinazlar ve fosfatazlar gibi sensör proteinler temel stres cevap genleri veya bu genlerin transkripsiyon faktör kontrolleri ile etkileşerek strese fizyolojik cevabın oluşmasını sağlarlar (Şekil 1.1).

Tuz stresi hücresel düzeyde oksidatif bir hasar olarak ortaya çıkan kurak ve yarı kurak bölgelerde verimi etkileyen önemli bir faktördür. Kök rizosferinde tuz miktarının artmasıyla birlikte ilk olarak ozmotik stres oluşmaktadır. Oluşan bu dışsal ozmotik stres, kullanılabilir su miktarının da azalmasına sebep olur ve bu olay “fizyolojik kuraklık” olarak da adlandırılır (Tuteja, 2007). Kullanılabilir su miktarının azalması, hücre genişlemesinin azalmasına ve sürgün gelişiminin yavaşlamasına neden olur. Ozmotik stresin devamında ortaya çıkan iyon stresi evresinde, ortamda artan Na^{+} ve Cl^{-} iyonlarının K^{+} , Ca^{+2} ve NO^{-3} gibi gerekli besin elementleri ile rekabete girmesiyle bitkilerde, besin eksikliği veya besin dengesizliği meydana gelir (Hu ve Schmidhalter, 2005).

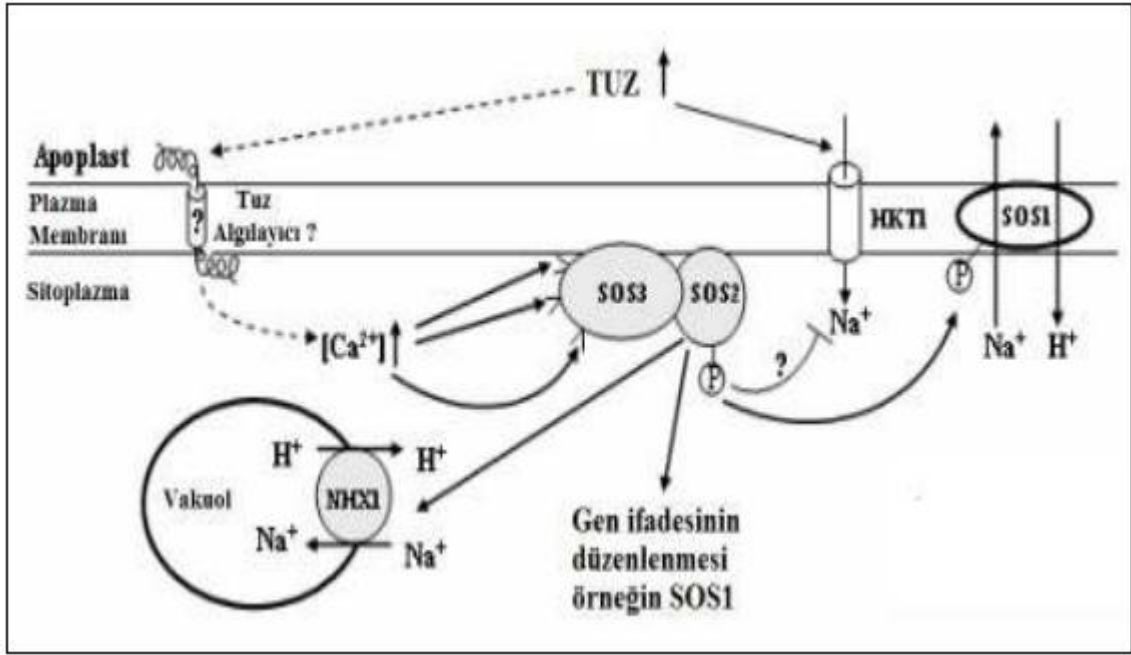
Tuzluluk, bitkiler üzerindeki doğrudan etkisini ozmotik ve iyon stresi oluşturarak gösterirken, dolaylı etkisini (sekonder etki) bu stres faktörleri sonucu bitkide meydana gelen yapısal bozulmalar ve toksik bileşiklerin sentezlenmesi ile gösterir. NaCl'nin sebep olduğu başlıca sekonder etkileri; DNA, protein, klorofil ve zar fonksiyonuna zarar veren aktif oksijen türlerinin (AOT) sentezi; fotosentezin inhibisyonu; metabolik toksisite; K^{+} alımının engellenmesi ve hücre ölümü olarak sayılabilir (Moyle ve ark., 2000).

Bitki yetiştirme ortamındaki fazla tuz bitkinin gelişmesini önemli ölçüde sınırlar. Tuzlar bitki büyümesine üç şekilde etki ederler;

1. Fiziksel etki: Ozmotik basıncın yükselmesi sonucu bitkinin su alımı ve dolayısıyla beslenmesi yavaşlar veya tamamıyla durur. Bitki su alımında güçlük çeker. Buna “ozmotik basınç etkisi” de denir.

2. Kimyasal etki: Bir kısım tuzlar, bitki besin maddelerinin alımını zorlaştırıp, metabolizmayı bozarak bitkinin bünyesine zarar verirler. Buna özel iyonların toksisitesi de denir.
3. Dolaylı etkiler: Tuzluluğun toprak üzerinde meydana getirdiği değişiklikler, bitkilerin gelişmesine etki eder. Örneğin su alımının sağlanması için metabolik enerjinin kullanılması ve verimde düşme meydana gelmesi gibi.

Tuz stresinde iyonik sinyal bakımından SOS (Salt Overly Sensitive) genlerini temel alan bir sinyal yolunun bulunduğu kanıtlanmıştır. SOS sinyal yolunun muhtemelen başlangıcı, Ca^{2+} sinyalini tetikleyen hücre içi ya da hücre dışı Na^+ fazlalığıdır. Bu yolda tuz stresi sonucu ortaya çıkan sitosolik Ca^{2+} sinyali, Ca^{2+} bağlayan SOS3 proteini tarafından algılanır. Ca^{2+} bağlı SOS3 proteini bir serin/treonin kinaz olan SOS2 ile etkileşerek SOS2'yi aktive eder ve SOS3-SOS2 kompleksini oluşturur. Aktifleşen SOS2 kinaz daha sonra sodyumu sitozolden pompalayacak olan Na^+ /H^+ taşıyıcısı SOS1'i fosforiller. SOS3-SOS2 kinaz kompleksi SOS1 ve diğer genlerin transkripsiyon seviyesini düzenler. Ayrıca SOS3-SOS2 kinaz kompleksi NHX1 aktive ederek sodyumun vakuolde tutulmasını sağlayabilir ve plazma membranında sodyum taşıyıcısı HKT1 aktivitesini inhibe ederek sodyumun hücre içersine girmesini sınırlandırabilir (Şekil 1.2). (Zhu, 2002; Hirt ve Shinozaki, 2004).



Şekil 1.2. Tuz stresi altında iyon homeostasisinin düzenlenmesinde SOS yolu (Hirt ve Shinozaki, 2004)

Tuz stresinin olumsuz etkilerini azaltmak amacıyla bitkilere dışarıdan antioksidan uygulamalarının yapılması oldukça önemlidir. Bitkilerde enzimatik olmayan antioksidanlar; vitamin E, vitamin C, glutatyon ve karotenoidler olurken; enzimatik antioksidanlar ise superoksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APX), glutatyon redüktaz (GR), katalaz (CAT), peroksidaz (POX)'dur.

Tokoferoller direk olarak AOT'ları etkisizleştirir; özellikle singlet oksijeni tokoferolün geri dönüşümsüz oksidasyonu ile etkisizleştirirler. Alfa tokoferol, lipid faz zincir kıran bir antioksidan olarak zincirleme şekilde ilerleyen lipid peroksidasyonu gibi serbest radikal üreten basamaklara etki ederek reaksiyonları adeta kırar (Baskin SI ve ark.,1997). Ayrıca membranların akıcılığını ve geçirgenliğini düzenleyerek stabilizasyon da sağlar. Özellikle tokoferollerin membranlardaki yağ asitleri ve lizofosfolitlerle kompleks oluşturması membranları zararlı etkilere karşı korumaktadır.

Alfa tokoferol doğada yaygın olarak bulunan E vitamini ailesinin ana bileşenidir. Özellikle kloroplastların tilakoid membranlarında yoğun olarak bulunur. Moleküler yapılarında üç metil grubu içermeleriyle en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olan alfa tokoferoldür. Bu antioksidan fotosentez kaynaklı reaktif oksijen türlerini (O_2^- , H_2O_2 , OH^-) devre dışı bırakır ve tilakoid zarlarında lipid peroksidasyonun yayılmasını önler (Munne-Bosch ve ark., 2005).

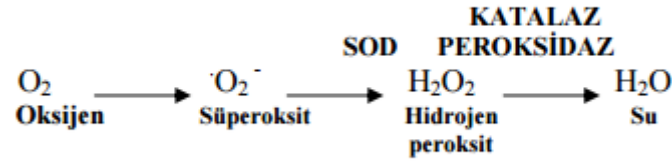
Çalışmada soya bitkisi (*Glycine max* L.) yapraklarına ön deneme sonucunda belirlenen konsantrasyonda dışarıdan uygulanan alfa tokoferolün (2.5 mM) tuz stresi altında kökte meydana getirdiği etkileri fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler düzeyde aydınlatmaktadır.

Alfa tokoferol ile ilgili yapılan çalışmalar incelendiğinde, bitkilerde yapraklara dışarıdan yapılan uygulamaların etkileri araştırılmış olmasına karşın kökteki etkilerin incelendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle çalışmanın sonuçları dışarıdan alfa tokoferol uygulamasının köklerde yaptığı etkileri ilk defa incelemesi açısından önem kazanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

Tuzluluk, bitkinin morfolojisi ve anatomisini kapsayan tüm metabolik faaliyetlerini etkileyen bir faktördür (Levitt, 1980). Toprak çözeltisindeki tuz konsantrasyonu arttığında ve su potansiyeli azaldığında, bitki hücrelerinin ozmotik potansiyeli düşer ve bitki hücrelerinin bölünmesi ya da uzaması birden yavaşlar. Bu stres koşulları altında genellikle stomalar kapanır ve sonuç olarak fotosentez azalır. Stres koşullarının devam etmesi halinde bitki büyümesi tamamen durabilir (Ashraf, 1994). Tuzluluğa en fazla duyarlılık gösteren organların yapraklar olduğunu bildiren Munns ve Termaat (1986)'ın açıklamalarından sonraki yıllarda yapılan başka çalışmalar sonucunda mısırdaki (Cromer ve ark., 1988) ve domatestede (Snapp ve Shennan, 1992) kök büyümesi ve gelişmesinin de tuzluluktan benzer biçimde etkilendiği ortaya konmuştur. Tuz stresi bitkinin ölümüne neden olabildiği gibi tolerans durumuna bağlı olarak büyümeyi engellemekte, kloroz, nekrotik lekelerin oluşumuna yol açabilmekte, verim ve kalitenin azalmasına neden olmaktadır (Hasegawa ve ark., 1986). Pandya ve ark. (2005) tuzun toksik etkisinin ilk önce yaşlı yapraklarda görülmeye başladığını, bu yaprakların uçlarından başlayıp yaprak ayasına ve sapına doğru ilerleyen kloroz şeklinde kendini gösterdiğini, daha sonra bu kısımların nekroze olduğunu belirtmektedirler. Tuzlu koşullarda büyüyen bitkilerin büyüme hızı düşük olup bodur bir yapı sergilemektedir. Yaprakları ise çoğunlukla küçük ve rengi de koyu yeşildir. Tuz stresinde hücre büyümesi ve bölünmesindeki yavaşlamanın, sitokin miktarının azalması sonucu ortaya çıktığı ileri sürülmektedir. Hormon dengesinde ortaya çıkan değişikliklerin tohum çimlenmesi üzerinde de etkide bulunduğu, azalan sitokin sentezlenmesinin sonucu olarak çimlenme oranında azalma olduğu iddia edilmektedir (Mangal ve Lal, 1990). Tuzlu koşullarda çimlenmenin engellenmesi ve çimlenme yüzdesinin düşmesi, beklenen bir tepkidir (Demir ve ark., 1992).

Bitkiler ve tüm aerobik canlılar için atmosferik oksijen (O_2) düzeyi oldukça önemlidir. O_2 normal koşullar altında bitki büyümesi ve gelişmesi için gerekli iken, konsantrasyonu gereğinden fazla arttığı zaman, ölüm ile sonuçlanabilecek hücresel hasarlar oluşmasına neden olabilir. Bunun nedeni, moleküler oksijenin hücrede sürekli indirgenerek çeşitli aktif oksijen türlerini oluşturmasıdır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Antioksidan enzim aktivitesi

AOT'lar *singlet oksijen (O_2), süperoksit molekülü (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve elektron transferinin gerçekleştirdiği indirgenme reaksiyonlarının ara ürünleridir (Apel ve Hirt, 2004). Stres koşulları altında artan AOT'lar; zarda lipid peroksidasyonuna, protein oksidasyonuna, enzim inhibisyonuna, klorofil parçalanmasına, DNA ile RNA'da hasarlara ve hücre ölümüne neden olurlar (Mittler, 2002). Ayrıca AOT'lar; bitki gelişiminde önemli rol oynayan hormonal sinyal üretiminde, hücre duvarı polimer yapısının değişiminde, bitkinin çevreyi algılamasıyla ilişkili mekanizmalarda, gen ekspresyonlarında, metabolik ve fizyolojik düzenlemelerde kritik fonksiyonlara sahip olması nedeniyle "oksidatif sinyal molekülü" olarak da görev alırlar (Swanson ve Gilroy, 2010).

SOD; AOT'lara karşı koruyucu sistemin ilk adımını oluşturmaktadır ve iki molekül O_2^- ile reaksiyona girerek birer molekül H_2O_2 ve O_2 sentezlenmesini sağlar (Asada, 1999). O_2^- , H_2O_2 gibi zarlardan difüze olabilmeye özelliğine sahip olmadığından, bu molekülün sentezlendiği hücresel bölümlerde ortadan kaldırılması için SOD enzimi bulunur (Alscher ve ark., 2002). Metaloenzimler grubunda yer alan SOD, mangan SOD (Mn SOD), bakır-çinko SOD (CuZn SOD) ve demir SOD (Fe SOD) olmak üzere içerdiği metal gruplarına göre üç farklı izoenzim çeşidine sahiptir. Bu izoenzimlerden Fe SOD kloroplastlarda, Mn SOD mitokondri ile peroksizomda ve CuZn SOD ise kloroplast, peroksizom, sitozol ve hücreler arası boşlukta bulunur (Alscher ve ark., 2002). Stres koşulları altında SOD aktivitesinin artması ve bu düzeyin korunması gen ifadesinin ve SOD transkripsiyonunun artmasına bağlıdır (Ivan ve ark., 1999).

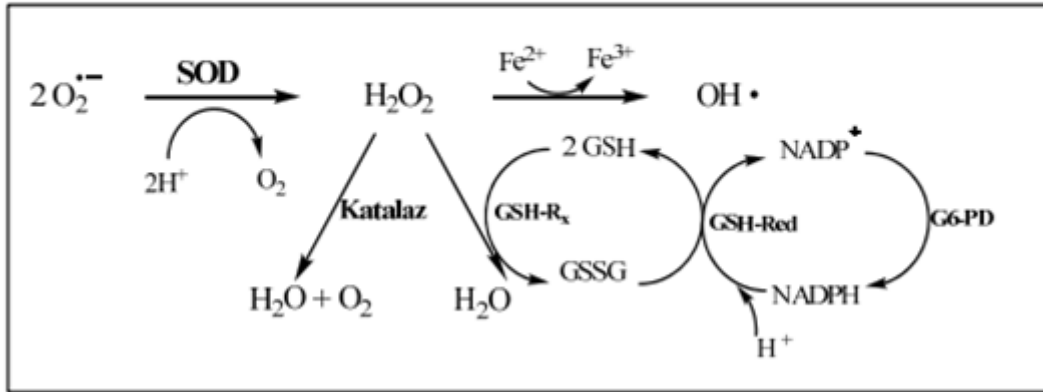
Yüksek katalitik aktiviteye fakat düşük substrat afinitesine sahip CAT kloroplastta bulunmadığı için buradaki tiol-düzenleyici enzimlerin korunmasında görev alamaz. Bu enzimin yerine ortamdaki H_2O_2 'leri detoksifiye eden ve H_2O_2 'e karşı daha yüksek ilgi gösteren POX'lar bulunur (Noctor ve Foyer, 1998). POX, fenolik bileşikler

ve/veya antioksidanlar gibi yardımcı substratlarla H_2O_2 'i suya dönüştürür (Meloni ve ark., 2003).

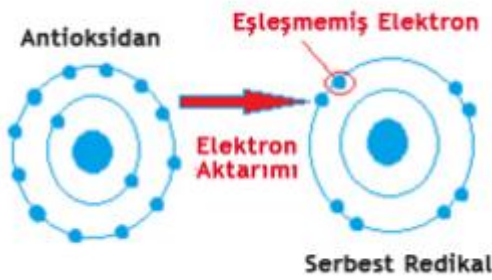
APX, H_2O_2 detoksifikasyonunda yer alan diğer bir enzim olup bu enzimin izoenzim grupları, kloroplast stroması ile tilakoid zarı, mitokondri, sitozol ve peroksizom olmak üzere dört farklı yerde bulunur. APX, H_2O_2 'i suya dönüştürürken, askorbatı (AsA) spesifik elektron vericisi olarak kullanır ve bu reaksiyona AsA'nın tek değerlikli oksidant formu olan monodehidroaskorbat (MDA, MDAsA olarak da kullanılmaktadır) oluşumu eşlik eder. MDA direkt olarak NADPH-bağlı MDA redüktaz (MDAR) enziminin aktivitesiyle AsA'ya indirgenebilir (Mittler ve ark., 2004). Ayrıca MDA bir enzimatik reaksiyon olmaksızın kendiliğinden dihidroksiaskorbata (DHA) da indirgenebilir (Sairam ve Tyagi, 2004). DHA'dan AsA sentezlenmesine DHAR enzimi aracılık eder ve bu reaksiyonda itici güç olarak GSH (redükte glutatyon)'ın GSSH (okside glutatyon)'a oksidasyonu kullanılır.

Glutatyon redüktaz (GR), NAD(P)H'ı indirgeyici ajan olarak kullanıp GSH'nin GSSH'dan tekrar sentezlenmesini sağlar (Şekil 2.2.) APX'in H_2O_2 'i detoksifiye etmek için ihtiyaç duyduğu ve AsA ile GSH'nin yeniden sentezlendiği bu döngü askorbat-glutatyon döngüsü veya Halliwell-Asada döngüsü olarak adlandırılır (Secenji ve ark., 2008). Ayrıca, H_2O_2 gibi glutatyon ve AsA da zarlardan kolayca diffüze olabilir ve farklı bölümler arasında taşınabilirler.

Glutatyon-s-transferazlar (GST), her biri iki alt birimden oluşmuş bir enzim ailesidir. Katalitik ve katalitik olmayan çok sayıda fonksiyona sahiptirler. Antioksidan savunma mekanizması açısından önemleri, ksenobiyotiklerin (yabancı maddeler) biyotransformasyonu ve detoksifikasyonunda rol almaları ve başta araşidonik asit ve linoleat hidroperoksitleri olmak üzere lipid peroksitlere karşı selenyumdan bağımsız GSH-Px aktivitesi göstermeleridir (Akkuş, 1995).

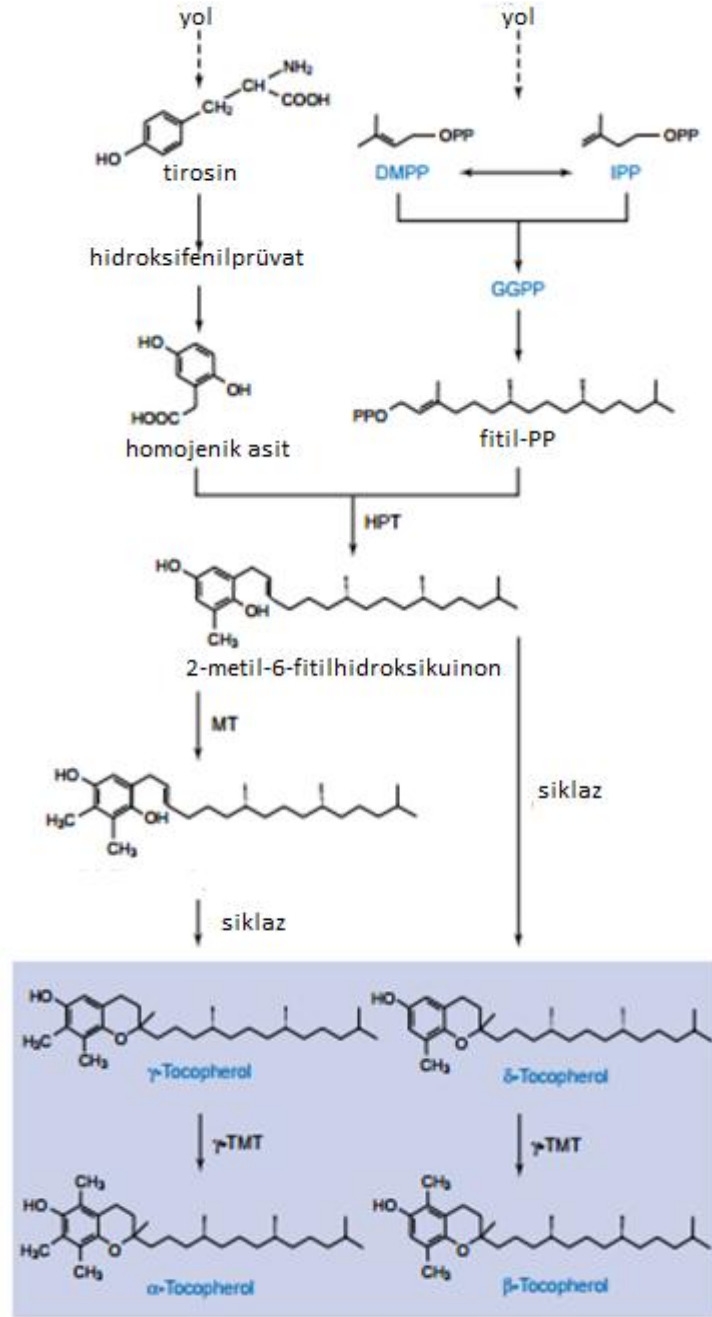


Şekil 2.2. Oksidatif strese karşı enzimatik savunma mekanizmaları



Şekil 2.3. Antioksidan tarafından serbest radikalın nötralize edilmesi

Alfa tokoferol, E vitamini ile eş anlamlı hale gelmiştir. E vitamini yağda çözünen vitaminlerdendir. Bu yüzden hücre zarında bol miktarda bulunur. E vitamininin etkilerini gösteren 8 tokoferol ve tokotrienol vardır. Alfa tokoferol yapısındaki içerdiği 3 metil grubuyla diğer tokoferoller içinde en etkili olanıdır. α -tokoferol ve daha çok kullanılan α -tokoferil asetat; hafif sarı, kokusuz, yağimsı berrak ve oldukça yapışkan maddelerdir. Doğada bulunan dekstro şekli fizyolojik olarak en etkili izomeridir. Suni rasemik α -tokoferol (DL- α -tokoferol) ve esteri, tekabül eden dekstro izomerinin %70-75 etkisine sahiptir. β ve γ tokoferoller, α izomerinin yarısı kadar, δ izomeriyse ancak % 1'i kadar etkilidir (Wikipedia).



Şekil 2.4. E vitamin biyosentetik yolu (Hofius ve ark.)

Bitkilerde doğal olarak oluşan 4 tokoferol türevi koyu bölümde vurgulanmıştır (Şekil 2.4.). Tokoferol biyosentezi mevalonat olmayan yoldan türeyen fitil pirofosfat ve şikimat yoldan türeyen homojenizatin yoğunlaşması aracılığıyla gerçekleşir. Bunun sonucunda 2-metil-6-fitilplastokinon oluşur. Oluşan bu madde bütün tokoferollerin öncül maddesidir. Daha sonraki halka siklizasyon ve metilasyon reaksiyonları, 4 ana tokoferol türevinin oluşumu ile sonuçlanmaktadır (Şekil 2.4.). γ ve δ tokoferolün ortak bir siklaz aracılığıyla gerçekleşmesi muhtemeldir. Benzer şekilde α ve β tokoferolde

elde edilen son metilasyon reaksiyonu sırasıyla aynı metiltransferaz ile katalize edilmesi beklenmektedir.

In vivo ve in vitro çalışmalar α -tokoferol ile glutatyon peroksidazın serbest radikallere karşı birbirini tamamlayıcı etkisi olduğunu göstermiştir. GSH-Px oluşmuş peroksitleri ortadan kaldırırken, α -tokoferol peroksitlerin oluşumunu engeller (Seven ve Candan, 1996; Akkuş, 1995).

- Tokoferoller billuri şekilde elde edilemez.
- Oksijensiz ortamda 200 °C'ye kadar dayanır.
- Organik asitlerden 100 °C'ye kadar etkilenmez.
- Oksidasyonla biyolojik etkisini hızla kaybeder.
- Işık ve bilhassa ultraviyole (morötesi) ışıklara karşı dayanıksızdır.

Vitamin E (alfa-tokoferol) sellüler ve organel zarlar arasına girer ve serbest radikalleri daha az reaktif bileşiklere çevirerek zarları lipid peroksidasyona karşı korur. Alfa-tokoferol zar fosfolipidleri yapısında bulunan araşidonik aside bağlanarak etkisini gösterir (Burton ve ark., 1985; Kavutcu ve ark., 1996; Engle ve ark., 1998; Koveshnikov ve Pikaliuk, 1993; Maiorano ve ark., 1999; Grobas ve ark., 2002).

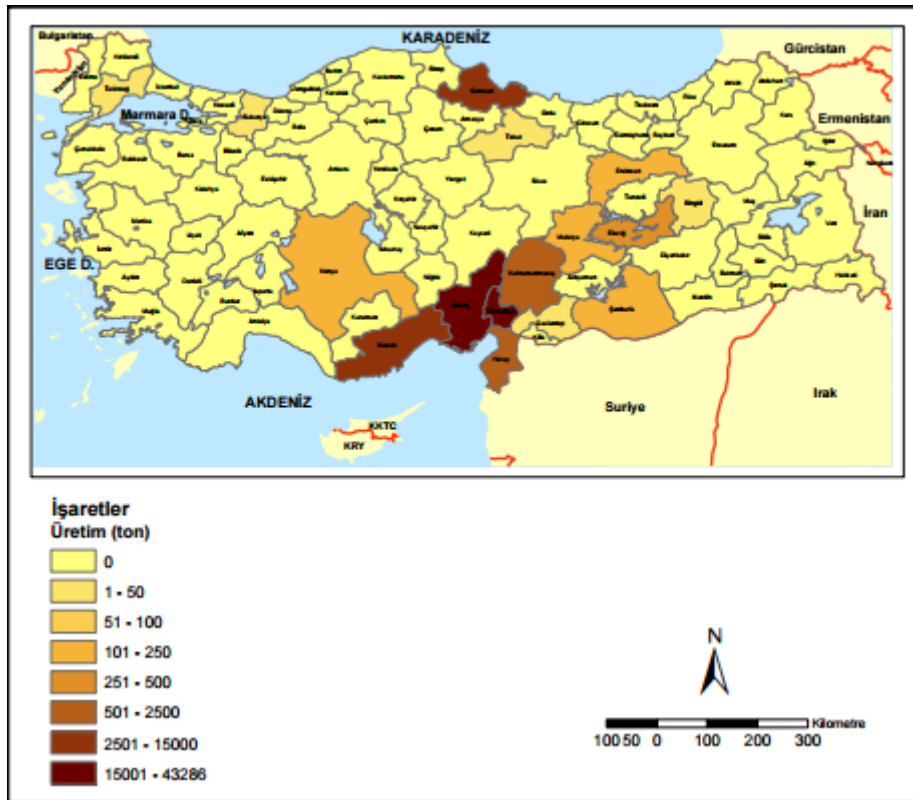
Soya fasulyesi binlerce yıldır Asya ülkelerinin en değerli besin kaynağı olmuştur. Besin değeri, mineraller ve vitaminler açısından oldukça zengin bir bitki olan soyanın gerek insan sağlığına bilimsel olarak kanıtlanmış yararları gerekse 400'den fazla endüstriyel ürün yapımında kullanılması soyayı tarımsal ürünler arasında önemli bir yere getirmektedir.

Soya fasulyesi (*Glycine max* L.) 5000 yıl önce Doğu Asya ovalarında keşfedilmiş, Asya halkının beslenme alışkanlığında devrim yaratmıştır. Çin halkının beş kutsal (çeltik, soya, buğday, arpa ve darı) ekininden biri olarak kabul edilmiş ve Çinlilerin sağlık kaynağı olmuştur. Vücudumuza ve zihnimize olan faydası saymakla bitmeyen soya, Doğu Asya ülkelerinin en önemli tarımsal ürünlerinden biridir. Bugün dünya üzerinde üretimi yapılan en önemli bitkisel ürünlerden biri olmasına karşın soya 100 yıl öncesine kadar Uzakdoğu dışında pek fazla bilinmiyordu.

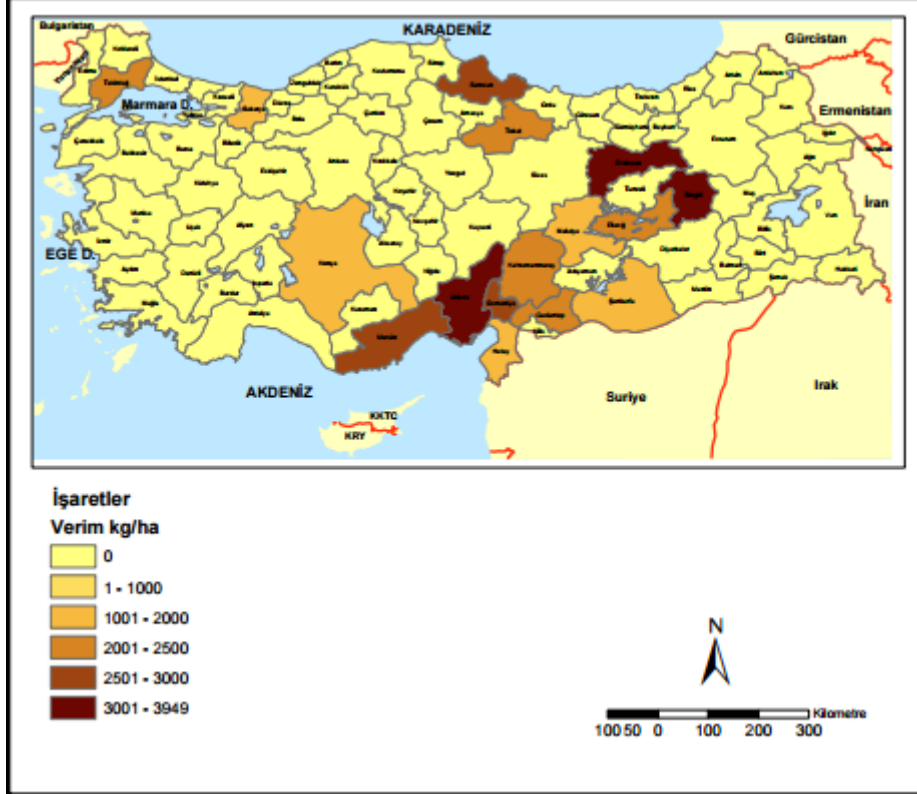
“Mucize bitki” olarak bilinen soya hem insan ve hayvan beslenmesinde, hem de sanayide son derece önemlidir. Soya baklagiller familyasından, dikine boylanabilen,

yetiştirme şartlarına bağlı olarak uzunluğu 1-1.5 m arasında değişebilen, çok dallı, az çok sarılgıcı otsu, kazık köklü yazlık bir baklagil 5 bitkisidir. Yapısındaki yağ oranı yüksekliği sebebiyle soya tarımsal ürünlerin sınıflandırılması sırasında yağlı tohumlu bitkiler içerisinde gösterilmektedir (Wikipedia).

Soya fasulyesi, besin değeri ile içerdığı mineral ve vitaminler açısından oldukça zengindir. İçeriğinde yüksek miktardaki protein yanında soya fasulyesi lif, kalsiyum ve magnezyum bolca bulunmaktadır. Tohumlarında % 18-24 yağ, % 35-45 protein, % 30 karbonhidrat ve % 5 oranında da mineral, çok sayıda vitamin ve değerli aminoasitler içeren ve toprağa organik madde ile azot sağlayan bir bitki olan soya fasulyesi ülkemizde hem ana ürün hem de ikinci ürün olarak kullanılmaktadır. Akdeniz, Güneydoğu Anadolu ve Doğu Anadolu'nun bazı kısımlarında soya fasulyesi daha fazla üretilmektedir (Şekil 2.4.). Bu bölgelerde verim kalitesi daha yüksektir (Şekil 2.5.)(Anaç ve ark., 2003)



Şekil 2.5. Türkiye’de soya fasulyesinin illere göre dağılımı (2002)



Şekil 2.6. Türkiye’de soya fasulyesi veriminin illere göre dağılımı (2002)

Dünyada toplam soya fasulyesi ekim alanı yaklaşık 105 mha olup Şekil 2.5.’te görüldüğü üzere bu ekim alanlarının büyük bölümü 7 ülkede bulunmaktadır. Soya üretimi yapan ülkelerin başında Brezilya ve ABD gelmektedir (Şekil 2.7.).Türkiye’de soya üretim miktarı son yıllarda artış göstermiştir (Şekil 2.8.)

Ülkeler	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
ABD	29.339	29.330	29.930	28.835	30.190	25.959	30.223	30.907	31.003	29.799	30.799
Brezilya	16.365	18.525	21.539	22.949	22.047	20.565	21.246	21.750	23.327	23.969	24.975
Arjantin	11.405	12.420	14.305	14.032	15.130	15.981	16.387	16.771	18.131	18.765	17.577
Hindistan	6.106	6.555	7.571	7.708	8.334	8.880	9.511	9.735	9.554	9.950	10.800
Çin	8.722	9.313	9.582	9.594	9.304	8.754	9.128	9.190	8.516	7.650	6.750
Paraguay	1.445	1.474	1.870	1.970	2.200	240	2.464	2.570	2.671	2.805	3.000
Kanada	1.024	1.049	1.174	1.165	1.201	1.171	1.195	1.383	1.477	1.542	1.668
Dünya	78.957	836.358	91.598	92.561	95.308	90.153	96.451	99.324	102.614	103.599	104.997

Şekil 2.6. Soya fasulyesi üretimi yapan ülkelerin ekim alanları

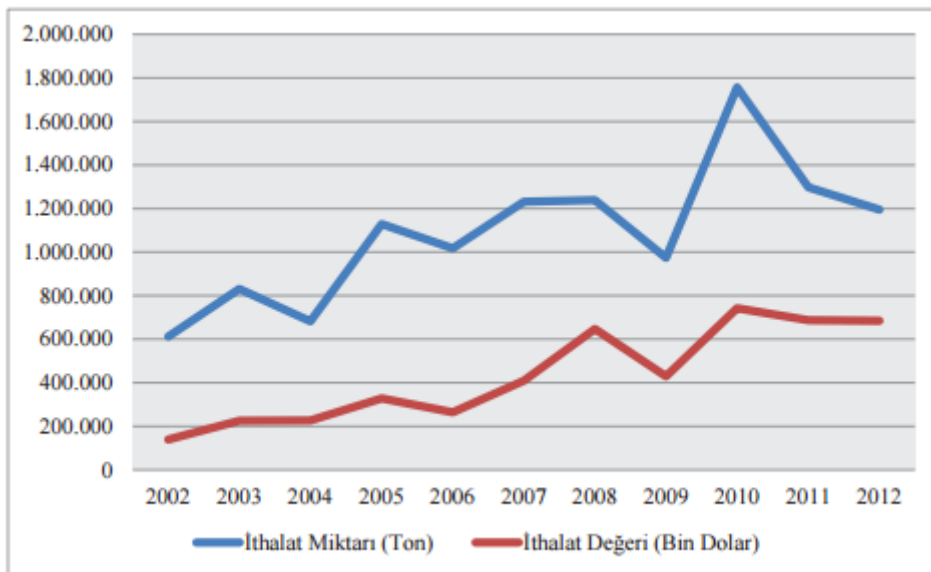
Ülkeler	2009/10	2010/11	2011/12	2012/13	2013/14 Ocak	2013/14 Şubat
Brezilya	69,000	75,300	66,500	82,000	89,000	90,000
ABD	91,417	90,605	84,192	82,561	89,507	89,507
Arjantin	54,500	49,000	40,100	49,300	54,500	54,000
Çin	14,98	15,080	14,485	13,050	12,200	12,200
Hindistan	9,700	9,800	11,000	11,500	11,800	11,800
Paraguay	6,462	7,128	4,043	9,367	9,000	9,300
Kanada	3,581	4,445	4,298	5,086	5,200	5,200
Diğer	10,763	12,546	14,539	15,406	15,621	15,686
Toplam	260,403	263,904	239,157	268,270	286,828	287,693

Şekil 2.7. Soya fasulyesi üretimi yapan ülkelerin üretim miktarları (Bin Ton)

Yıllar	Ekim Alanı (Ha)	Üretim Miktarı (Ton)	Verim Değeri (Kg/Da)
2002	25.500	75.000	294
2003	27.000	85.000	315
2004	14.000	50.000	357
2005	8.600	29.000	337
2006	11.918	47.300	397
2007	8.675	30.666	354
2008	9.444	34.461	365
2009	10.512	38.442	366
2010	23.472	86.540	367
2011	26.421	106.722	387
2012	31.599	115.000	364

Şekil 2.8. Türkiye’de soya fasulyesi ekim alanları, üretim miktarları ve verim değerleri (2002-2012)

Türkiye ‘deki soya fasulyesi ithalat miktarı ve değeri Şekil 2.9’da verilmiştir.



Şekil 2.9. Türkiye’nin soya fasulyesi ithalat miktarı ve değeri (2002-2012)

Türkiye'nin tükettiği miktarda soya fasulyesini üretme potansiyeli olmasına rağmen pazarlama, depolama, kurutma ve işlemede gerekli altyapının sağlanamaması ile yerli soya fasulyesi üretimi artan iç piyasa talebini karşılayamamaktadır. Yağlı tohumlarda yeterlilik sağlanamamakta, yem sektörü ihtiyacını karşılayamamaktadır.

3. MATERYAL ve METOD

3.1. Bitki Materyali ve Deneme Düzeneği

Denemede soya (*Glycine max* L.) tohumları plastik saksılara toprak ortamında her saksıya 5 adet olmak üzere ekilmiştir. Daha sonra $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 5 gün boyunca karanlık ortamda çimlenmeye bırakılmıştır. Çimlenen tohumlar 16 saat aydınlık/8 saat karanlık fotoperiyotta yetiştirilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Soya fasulyesi genel görünümü

Bitkiler uygulama aşamasına kadar Hoagland besin çözeltisi ile sulanmıştır. İki haftalık soya fasulyesi (*Glycine max* L.) yapraklarına yapılan ön denemeler sonucunda uygun konsantrasyonlar tespit edilmiştir.

0. gün hasatı: Ön deneme sonuçları dikkate alınarak 1 gün ara ile 3 kez (2.5 mM) ön alfa tokoferol uygulaması sonrası 0. gün hasatı yapılmıştır.

3. gün hasatı: Alfa tokoferol uygulaması (2.5 mM) sonrası tuz stresine maruz bırakılan bitkiler 3. gün sonunda hasat edilmiştir.

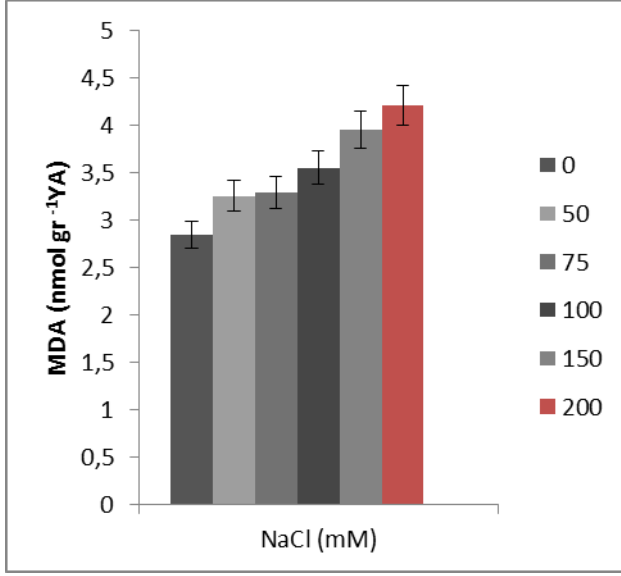
Kök genel görünümü Şekil 3.2’de verilmiştir.



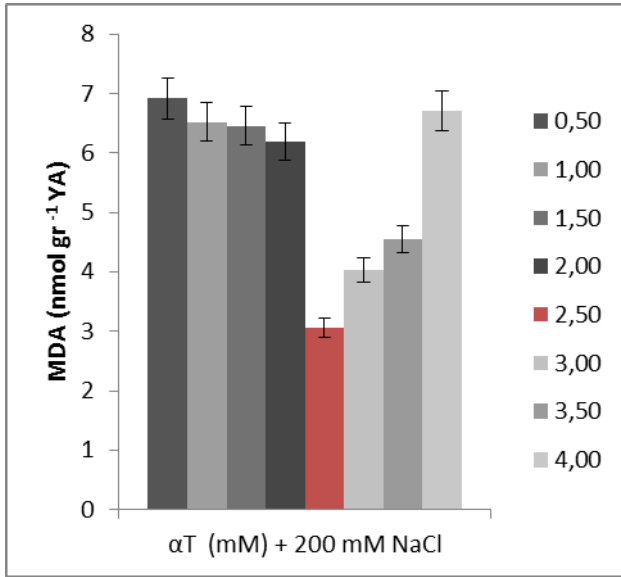
Şekil 3.2. Soya fasülyesine ait kök genel görünümü

Deneme düzeneği

1. 0. gün Kontrol
2. 0. gün Tokoferol
3. 3. gün Kontrol
4. 3. gün Tokoferol
5. NaCl
6. Alfa Tokoferol + NaCl



Şekil 3.3. Farklı tuz konsantrasyonlarının soya (*Glycine max* L.) kökleri üzerine etkisi



Şekil 3.4. Farklı alfa tokoferol konsantrasyonlarının tuz stresi altındaki soya (*Glycine max* L.) kökleri üzerine etkisi

3.2. Büyüme parametreleri

3.2.1. Uzunluk Ölçümü

Alfa tokoferol uygulaması sonrası tuz uygulamasının 3. gününde her gruptan bitki örnekleri alınarak kök ve gövde uzunlukları ölçülmüştür.

3.2.2. Bağlı Büyüme Oranı

Alfa tokoferol uygulaması sonrası tuz uygulamasının 3. gününde başlangıç ve son kuru ağırlık değerleri (70°C de 72 saat kurutulmuş) ölçülerek bağlı büyüme oranları hesaplanmıştır (Venus ve Causton, 1979).

$BBO = (Kuru\ ağırlık\ 2 - Kuru\ ağırlık\ 1) / (t_2 - t_1)$ t₂: son hasat zamanı, t₁: ilk hasat zamanı

3.2.3. Bağlı Su İçeriği

Tuz uygulamasının 3. gününde tüm gruplar için 6'lı örnek alınmış ve yaş ağırlıkları ölçülmüştür (Smart ve Bingham, 1974). 6 saat boyunca dI-H₂O içinde petrilerde bekletilerek turgorlu hale gelmeleri sağlanmıştır. Daha sonra turgorlu halleri ölçülmüştür. 70°C de 72 saat bekletilerek kurutulduktan sonra kuru ağırlıkları saptanmıştır.

Bağlı su içerikleri % olarak $(YA - KA) / (TA - KA) * 100$ bağıntısına göre hesaplanmıştır.

3.3. Lipit Peroksidasyonu (MDA)

Lipit peroksidasyonunun son ürünü olan malondialdehit (MDA) miktarı Madhavo ve Stresty (2000) yöntemine göre belirlenmiştir. Her gruptan 0.5 g kök örnekleri TCA (Trikloroasetik asit) ile homojenize edilmiştir. Santrifüjden sonra süpernatanta TBA (Tiobarbitürik asit) ve TCA içeren reaksiyon karışımı pipetlenmiştir. Tüm deney tüpleri 95°C'de 30 dakika ısıtılmıştır. Karışım 10.000 X 15 dakika santrifüjlenmiştir. Oluşan süpernatantın 532 ve 600 nm'deki absorbans değerleri okutulmuştur. MDA konsantrasyonu, ekstinksiyon katsayısı ($\epsilon = 155\ mM^{-1}cm^{-1}$) kullanılarak hesaplanmıştır.

3.4. Hidrojen Peroksit (H₂O₂) Miktarı

H₂O₂ düzeyi, Velikova ve ark. (2000) yöntemine göre belirlenmiştir. Her gruptan 0.1 g kök örneği 5 ml TCA (trikloroasetik asit) ile homojenize edilmiştir. 12.000 rpm'de 15 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Süpernatant 0.5ml, tampon (potasyum fosfat 10 mM, pH: 7) çözeltisi 0.5 ml ve 1 ml, 1M KI tampon maddesi ile karıştırılmıştır. UV-VIS spektrofotometrede 390 nm'de absorbans değerleri ölçülmüştür.

3.5. Prolin Miktarı

Alfa tokoferol ve tuz stresi uygulanmış soya bitkisi köklerinde ki serbest prolin miktarı Bates ve ark.'nın (1973) saptadığı yöntemle göre belirlenmiştir. Taze bitki materyalinin 0.5 g'ı tartılmış ve % 3(w/v)'lük 5 ml sülfosalisilik asit kullanılarak homojenize edilmiştir. Homojenatlar filtre kağıdından süzölmüştür. Elde edilen süpernatant 1 ml ninhidrin ve 1 ml glasiyel asetik asit ilave edilerek karıştırılmıştır. Bu karışım 100°C'de 1 saat su banyosunda bekletilmiştir. Bu süre sonunda tüpler alınarak buz içersine sokulmuş ve reaksiyon sonlandırılmıştır. Reaksiyon karışımı 4 ml tolüen ile ekstrakte edilmiş ve 15-20 saniye tüp karıştırıcıda (vorteks) çalkalanmıştır. Tolüen içeren renkli sıvı oda sıcaklığında bekletilmiş ve karışımın tolüen içeren üst fazı 520 nm dalga boyunda spektrofotometrede okuma yapılmıştır. Bitki dokularındaki prolin miktarları kalibrasyon eğrisi kullanılarak hesaplanmıştır.

3.6. İçsel Kalsiyum ve Fosfor Miktarı

Bitki köklerinde içsel kalsiyum ve fosfor miktarı Hanlon (1998) (AAS), Johnson ve Isaac, (1998) (ICP-OES) yöntemine göre Johnson ve Ulrich (1959) nitrik ve perklorik asit kullanılarak belirlenmiştir. Pellet 0.1 N perklorik asit ile sulandırılıp atomik absorpsiyon spektrofotometresinde tespit edilmiştir.

ICP okuma (ppm)*SF(100)

3.7. Süperoksit Anyon Üretimi Miktarı

Süperoksit anyon üretimi miktarı Rosa (1979) yöntemine göre yapılmıştır. 0.05 M sodyum karbonat tamponu (pH: 10.5) 1.2 ml, 3 mM'lık ksantinden 0.1 ml, 3 mM EDTA'dan 0.1 ml %0.15'lik bovin serum albümininden 0.1 ml, 0.75 mM'lık nitroblue tetrazoliumdan 0.1 ml ve örnekten 0.1 ml konulup 25°C 'de 10 dakika bekletilmiştir. Reaksiyon 6 mM ksantin eklenerek başlatılmış 20 dakikadan sonra 6 mM CuCl'den 0.1 ml eklenerek durdurulmuştur. Sonuçlar 560 nm'de okunmuştur.

3.8. İçsel Tokoferol Miktarı

Örneklerde yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi ile alfa tokoferol miktarı tayin edilmiştir. Analizler Hewlett Packard 1100 (HP 1100) serisi HPLC sisteminde gerçekleştirilmiştir.

3.9. İndol Asetik Asit (IAA) Hormon Düzeyi

IAA hormon seviyesine Flores ve ark. (2011) yöntemine uygun olarak UHPLC-MS/MS cihazı ile yapılmıştır. Bileşiklerin stok standart çözeltileri (200 ile 300 mg/L arasında değişen konsantrasyonlarda) ayrı ayrı tartılarak hazırlanmıştır. Bitki materyali Sigma'dan alınan metanol (HPLC-için) içerisinde çözündürülmüştür.

3.10. Antioksidan Enzim Aktiviteleri

3.10.1. Süperoksit Dismutaz (SOD; EC 1.15.1.1.) Enzim ve İzoenzim Aktiviteleri

SOD aktivitesi, Beauchamp ve Fridowich (1971)'e göre, SOD'un fotokimyasal olarak nitro blue tetrazolium'un (NBT) indirgenmesini inhibe etme yeteneğinin ölçülmesiyle tayin edilmiştir. 3 ml reaksiyon karışımı; 50 mM fosfat tamponu (pH:7,8), 33 mM NBT, 10 mM L-metionin, 0,66 mM EDTA. Na₂, 0,0033 mM ribofilavin içermektedir.

Süpernatant seyreltikten sonra karışım 10 dk 300 mmol m²s⁻¹ ışık şiddeti altında bekletilmiş ve daha sonra reaksiyon karışımının 560 nm'de verdiği absorbans değerleri okunmuştur. SOD için 1 enzim birimi; ışıkla indirgenmenin %50 engellenmesine neden olan protein miktarı (mg) olarak tanımlandığından, yaprak örneklerindeki SOD aktiviteleri buna göre belirlenmiştir.

SOD izoenzim aktivitesi; Laemli (1970)'e göre eşit miktarda protein içeriği, sodyum dodesil sülfat dışında denatüre edici olmayan poliakrilamit jel elektroforez (PAGE)'e yüklenmiştir. SOD izozimlerinin ayrımı için; %4.5 staking ve %12.5 seperating solüsyonları kullanılmış ve sabit akımda (60 mA), 0-4°C'de jeller yürütülmüştür. SOD aktivitesinde jeller Beauchamp ve Fridowich (1971)'e göre riboflavin ve NBT ile fotokimyasal boyama yapılarak tespit edilmiştir. Boyanmış olan jeller; Software (4.6.00.0; UVP Bioluminescence systems, UK) programına göre görüntülenmiştir. SOD aktivitelerinin densitometrik analizleri için; kontrol grupları %100 olarak alınmış ve elde edilen değerler % olarak gösterilmiştir. Elde edilen veri; birbirinden bağımsız 3 jelin ortalaması alınarak elde edilmiştir.

3.10.2. Askorbat Peroksidaz (APX; EC 1.11.1.11) Enzim ve İzoenzim Aktivitesi

APX aktivitesinin tayini Nakano ve Asada (1981)'ya göre yapılmıştır. Askorbat okside oldukça spektrofotometreden 290 nm'deki absorbansta oluşan azalma okunmuş ve hesaplamalar askorbatın ekstinksiyon katsayısı kullanılarak ($2.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) yapılmıştır. Reaksiyon karışımı 50 mM sodyum fosfat tamponu (pH: 7), 0.5 mM askorbat, 0.1 mM EDTA Na₂ ve 1.2 mM H₂O₂'den oluşmuştur. Askorbatın oksidasyonu, enzim ekstraktının ek ilave edilmesiyle başlatılmış ve absorbanstaki düşüş 180 sn boyunca izlenmiştir. 1 birim APX aktivitesi dakikada okside olan 1 mmol ml⁻¹ askorbat ifade edilmiştir.

Askorbat peroksidaz izoenzim aktivitesi; Mittler ve Zilinkas (1993)'ın yöntemine göre belirlenmiştir. Örnekler yüklenmeden önce jeller 2 mM askorbat içeren tamponda 4°C'de 30 dakika yürütülmüştür. Daha sonra 35 µl protein içeren örnekler jellere yüklenerek sabit akım altında (60 mA) yürütülmüştür. Yürütme işleminden sonra jeller 2 mM askorbat içeren 50 mM potasyum fosfat tamponunda (pH: 7) 20 dakika inkübe edilmiş ve sonra 4 mM askorbat ve 2 mM hidrojen peroksit içeren 50 mM potasyum fosfat tamponunda (pH: 7.8) 20 dakika bekletilmiştir. Ardından jeller tamponla 1 dakika yıkanmış ve 28 mM TEMED ve 2.5 mM NBT içeren 50 mM potasyum fosfat tamponuna alınmış ve ışıқта 10-20 dakika bekletilmiştir.

3.10.3. Glutasyon S-Transferaz (GST; EC 2.5.1.18) Enzim ve İzoenzim Aktivitesi

Glutasyon S-transferaz aktivitesi (Habig ve ark. (1974) yöntemine göre belirlenmiştir. Glutasyon S-transferaz, 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) ile glutasyonun -SH grubu arasındaki tepkimeyi katalizler. Enzim aktivitesi 340 nm'de GSH ve CDNB kullanılarak dakikada oluşan S-2,4-dinitrofenilglutasyonun 1 mikro molünü katalizleyen enzim miktarının ölçülmesiyle belirlenir. GST aktivitesi, CDNB ekstinksiyon katsayısı ($\epsilon = 9.6 \text{ mmol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) kullanılarak hesaplanır.

Glutasyon S- transferaz izoenzim aktivitesi; GST izoenzimi %10 native PAGE'de eşit oranda protein yükleyerek Laemmli (1990) yöntemine göre yapılmıştır.

3.10.4. Peroksidaz (POX; EC 1.11.1.7) Enzim ve İzoenzim Aktivitesi

POX aktivitesi Herzog ve Fahimi (1973)'ye göre belirlenmiştir. Aktivite 465 nm'de 3,3-diaminobenzidin tetrahidrokloroid (DAB)'in oksidasyonu ile absorbansta meydana gelen artış izlenerek hesaplanmıştır. Polystiren küvetteki reaksiyon karışımı, DAB solüsyonu, %0.6'lık H_2O_2 , dI- H_2O ve enzim ekstraktından oluşmaktadır. Reaksiyon H_2O_2 'nin ilave edilmesiyle başlatılmış ve 180 sn boyunca absorbans artışı izlenmiştir. Spesifik enzim aktivitesi dakikada tüketilen $\mu\text{mol ml}^{-1} H_2O_2$ olarak ifade edilmiştir.

POX izoenzim aktivitesi Seevers ve ark. (1971)'na göre yapılmıştır. 75 μg protein içeren örnekler % 10'luk denatüre olmayan akrilamid jelde (PAGE) sabit akım altında (120 mA) yürütülmüştür. Elektroforezden sonra oluşan bantları görebilmek için jeller karanlıkta 30 dakika boyunca, benzidin ve hidrojen peroksit içeren 200 mM Na-asetat tamponunda (pH: 5.0) inkübe edilmiştir.

3.10.5. Glutasyon Redüktaz (GR; EC 1.6.4.2) Enzim Aktivitesi

Glutasyon redüktaz aktivitesi, 340 nm'deki absorbanstaki düşüş göz önüne alınarak hesaplanmıştır (Foyer ve Halliwell., 1976). NADPH varlığında, okside glutasyon miktarındaki azalma, kuvartz küvette, köre karşı okunarak 180 saniye boyunca takip edilmiştir. Hesaplamalar glutasyon redüktaz enziminin ekstinksiyon katsayısı kullanılarak ($6.2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) yapılmıştır. Spesifik enzim aktivitesi, dakikada indirgenen 1 mmol ml^{-1} GSSG miktarı olarak ifade edilmiştir.

İstatistik Analizler

Elde edilen veriler Tek-Yönlü Varyans Analizi (One-way ANOVA) ile analiz edilmiş ve ortalamalar arasındaki farklılıklar Lowest Standard Deviations (LSD) test, ile karşılaştırılmıştır. $P < 0.05$ olan değerler istatistiksel bakımdan anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Büyüme Parametrelerinin Sonuçları

4.1.1. Kök ve Gövde Uzunlukları

Alfa tokoferol uygulaması (2.5 mM) sonrası tuz stresine maruz bırakılan bitkiler 3. gün sonunda hasat edilmiş kök ve gövde uzunluklarındaki değişimler Çizelge 4.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Alfa tokoferol uygulaması (2.5 mM) sonrası tuz stresine maruz bırakılan bitkilerin 3. gün hasatı sonrasında kök ve gövde uzunluklarında (cm) gözlenen değişimler

		UZUNLUK
Gövde	Kontrol	29.5±1.3 ^a
	Alfa Tokoferol	30±1.03 ^a
	NaCl	27±1.05 ^b
	Alfa Tokoferol+NaCl	29.5±1.04 ^a
Kök	Kontrol	12±1.10 ^a
	Alfa Tokoferol	18±0.8 ^b
	NaCl	6±1.0 ^c
	Alfa Tokoferol+NaCl	9±1.0 ^d

Alfa tokoferol uygulaması, kontrol grubuna göre kök uzunluğunda %50 lik bir artış gösterirken, gövde uzunluğunda herhangi bir değişiklik göstermemiştir.

Tuz uygulaması kontrol grubuna göre gövde uzunluğunda %8’lik bir azalma gösterirken, gövde uzunluğunda bir değişiklik göstermemiştir.

Alfa tokoferol+NaCl uygulaması, NaCl gruplarına göre gövde uzunluğunda %9'luk bir artış gösterirken, kök uzunluğunda %50'lik bir artışa neden olmuştur.

4.2. Bağıl Büyüme Oranı ve Bağıl Su İçeriği

Bağıl büyüme oranı Çizelge 4.3'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. Alfa tokoferol uygulaması (2.5 mM) sonrası tuz stresine maruz bırakılan bitkilerin 3. gün hasatı sonrasında bağıl büyüme oranında ($\text{mg}^{-1}\text{d}^{-1}$) gözlenen değişimler

BBO	
Kontrol	0.035 $\pm$ 0.008 ^a
Alfa Tokoferol	0.049 $\pm$ 0.004 ^b
NaCl	0.030 $\pm$ 0.001 ^c
Alfa Tokoferol+NaCl	0.046 $\pm$ 0.001 ^d

Alfa tokoferol uygulamasının, kontrol grubuna göre bağıl büyüme oranını %40 oranında arttırdığı gözlenmiştir.

NaCl uygulamasının, kontrol grubuna göre bağıl büyüme oranını %14 oranında azalttığı gözlenmiştir.

Alfa tokoferol+NaCl uygulamasının, NaCl grubuna göre bağıl büyüme oranını %53 oranında arttırdığı gözlenmiştir

Bağıl su içeriği Çizelge 4.4'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. Alfa tokoferol uygulaması (2.5 mM) sonrası tuz stresine maruz bırakılan bitkilerin 3. gün hasatı sonrasında bağıl su içeriğinde (%) gözlenen değişimler

	BSİ
Kontrol	39 ±0.05 ^a
Alfa Tokoferol	34 ±0.03 ^b
NaCl	28 ±0.05 ^c
Alfa Tokoferol+NaCl	38 ±0.03 ^d

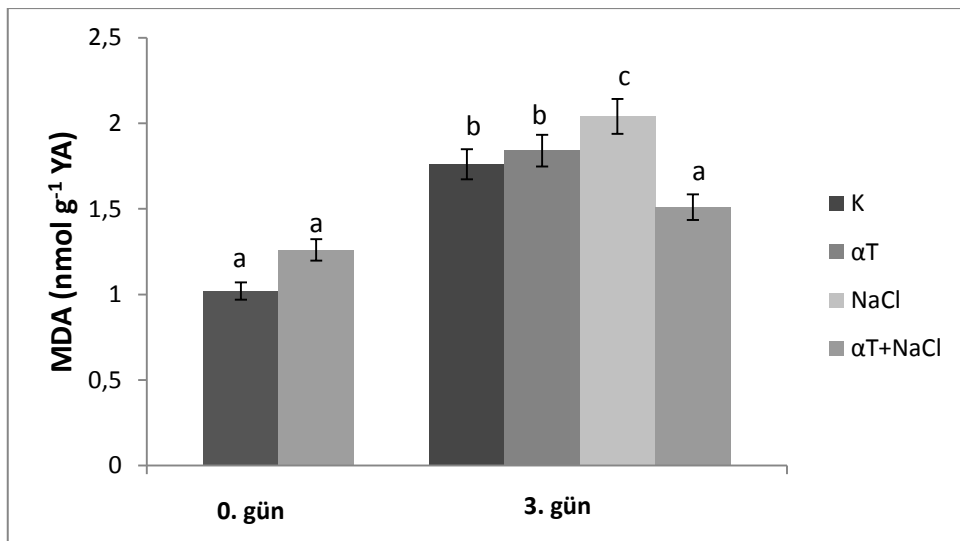
Alfa tokoferol uygulamasının, kontrol grubuna göre bağıl su içeriğini %13 azalttığı gözlenmiştir.

NaCl uygulamasının, kontrol grubuna göre bağıl su içeriğini %28 azalttığı gözlenmiştir.

Alfa tokoferol+NaCl uygulamasının, NaCl grubuna göre bağıl su içeriğini %36 artırdığı gözlenmiştir.

4.3. Lipit Peroksidasyonu (MDA)

Lipit peroksidasyonunda meydana gelen değişimler Şekil 4.1’de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Alfa tokoferol uygulaması (2.5 mM) sonrası tuz stresine maruz bırakılan bitkilerin 3. gün hasatı sonrasında malondialdehit miktarında (nmol/g^{-1} YA) gözlenen değişimler

0. gün alfa tokoferol uygulaması, kontrol grubuna göre MDA miktarını değiştirmemiştir.

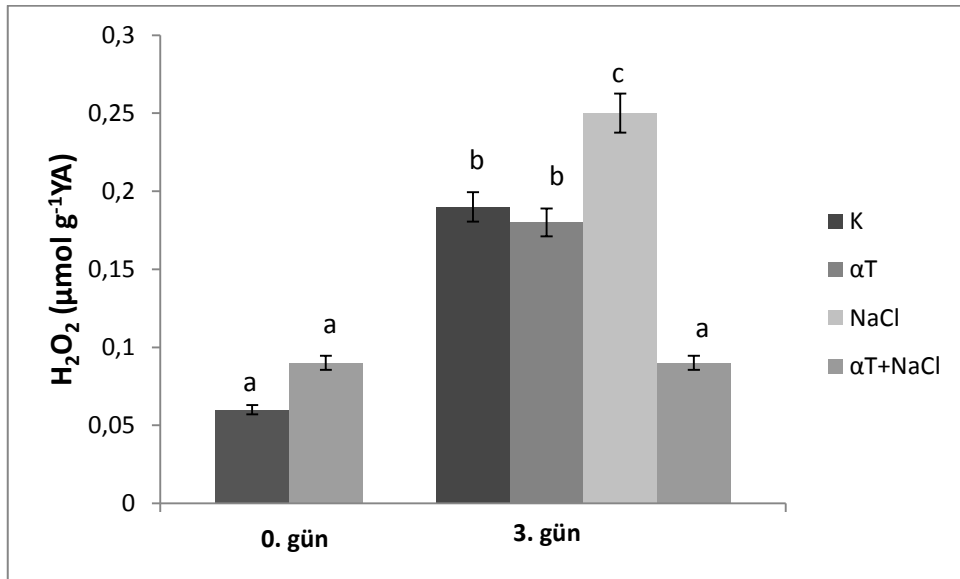
3. gün alfa tokoferol uygulaması, kontrol grubuna göre MDA miktarını değiştirmemiştir.

NaCl uygulamasının kontrol grubuna göre MDA miktarını %16 oranında artırdığı gözlenmiştir.

Alfa tokoferol+NaCl uygulamasının NaCl grubuna göre MDA miktarını %26 oranında azalttığı tespit edilmiştir.

4.4. Hidrojen Peroksit (H_2O_2) Miktarı

Hidrojen peroksit miktarında meydana gelen değişimler Şekil 4.2’de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. Alfa tokoferol uygulaması (2.5 mM) sonrası tuz stresine maruz bırakılan bitkilerin 3. gün hasatı sonrasında hidrojen peroksit miktarında ($\mu\text{mol/g}^{-1}$ YA) gözlenen değişimler

0. gün alfa tokoferol uygulaması, kontrol grubuna göre H_2O_2 miktarında bir değişiklik göstermemiştir.

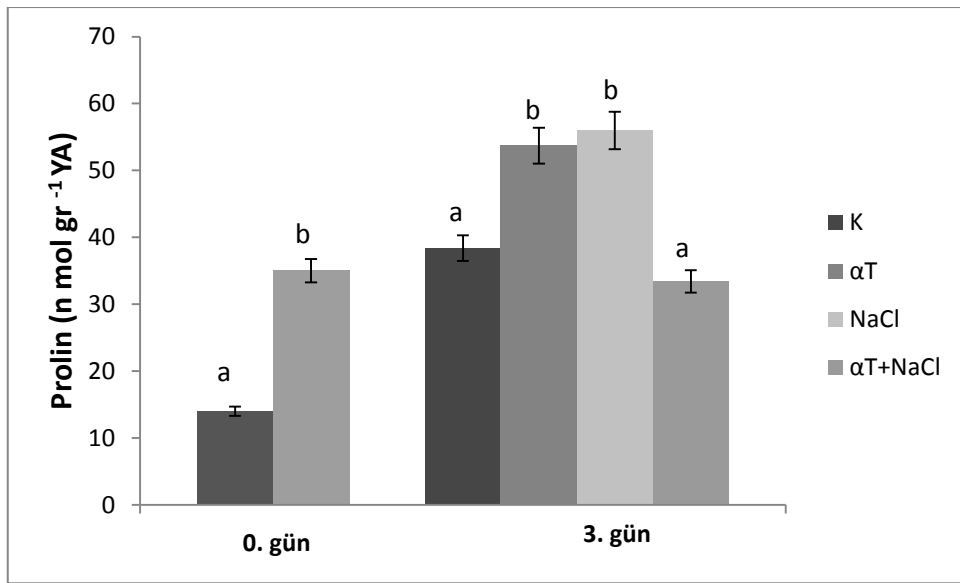
3. gün alfa tokoferol uygulaması, kontrol grubuna göre H₂O₂ miktarında bir değişiklik göstermemiştir.

NaCl uygulaması kontrol grubuna göre H₂O₂ miktarını %19 arttırmıştır.

Alfa tokoferol+NaCl uygulamasının NaCl grubuna göre H₂O₂ miktarını %41 oranında azalttığı tespit edilmiştir.

4.5. Prolin Miktarı

Prolin miktarında meydana gelen değişimler Şekil 4.3'te gösterilmiştir.



Şekil 4.3. Alfa tokoferol uygulaması (2.5 mM) sonrası tuz stresine maruz bırakılan bitkilerin 3. gün hasatı sonrasında prolin miktarında ($\mu\text{mol/g}^{-1}$ YA) gözlenen değişimler

0. gün alfa tokoferol uygulamasının kontrol grubuna göre prolin miktarını 2 kat arttırdığı gözlenmiştir.

3. gün alfa tokoferol uygulamasının kontrol grubuna göre prolin miktarını %40 arttırdığı gözlenmiştir.

NaCl uygulamasının kontrol grubuna göre prolin miktarını %31 arttırdığı gözlenmiştir.

Alfa tokoferol+NaCl uygulamasının NaCl grubuna göre prolin miktarını %40 oranında azalttığı tespit edilmiştir.

4.6. İçsel Kalsiyum (Ca) ve Fosfor (P) Miktarı

İçsel kalsiyum ve fosfor miktarında meydana gelen değişimler Çizelge 4.5'te gösterilmiştir.

Gruplar	K	α T	NaCl	α T+NaCl
Ca				
0. gün	1.04±0.02 ^a	0.97±0.03 ^a		
3. gün	0.86±0.02 ^a	0.78±0.04 ^b	0.64±0.011 ^c	0.67±0.04 ^d
P				
0. gün	0.44±0.02 ^a	0.45±0.01 ^a		
3. gün	0.52±0.02 ^a	0.56±0.005 ^a	0.61±0.005 ^b	0.65±0.02 ^c

Çizelge 4.5. Alfa tokoferol uygulaması (2.5 mM) sonrası tuz stresine maruz bırakılan bitkilerin 3. gün hasatı sonrasında içsel kalsiyum ve fosfor miktarında (%) gözlenen değişimler

0. gün alfa tokferol uygulaması kontrol grubuna göre içsel kalsiyum miktarı oranında %7'lik azalma gösterirken fosfor miktarında %3'lük artış göstermiştir.

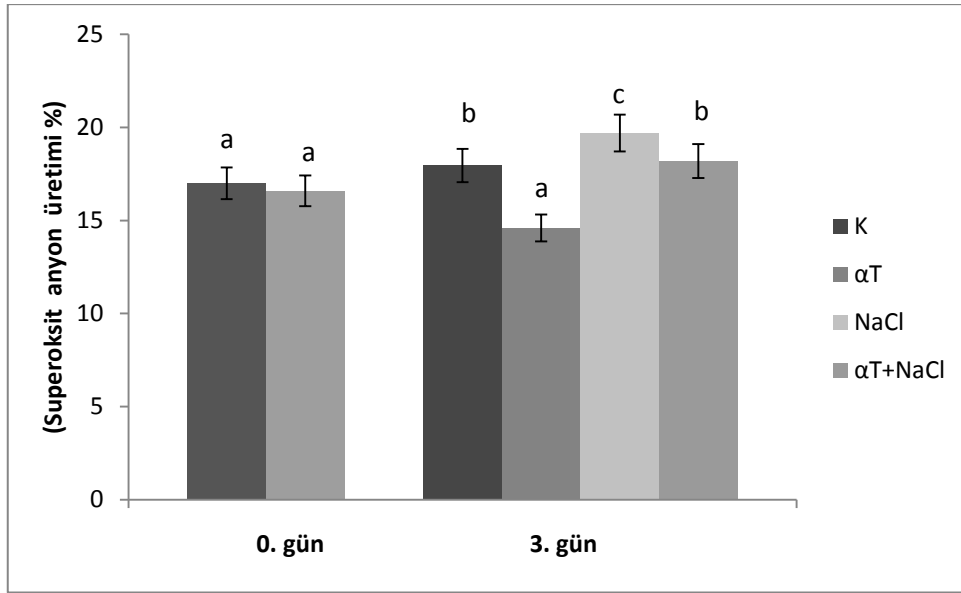
3. gün alfa tokoferol uygulaması kontrol grubuna göre içsel kalsiyum miktarı oranında %9'luk bir azalma gösterirken fosfor oranında %8'lik bir artış göstermiştir.

NaCl uygulaması kontrol grubuna göre içsel kalsiyum miktarı oranında %26'lık bir azalma gösterirken fosfor miktarında %17'lik bir artış göstermiştir.

Alfa tokoferol+NaCl uygulaması NaCl grubuna göre içsel kalsiyum miktarı oranında %5'lik bir artış gösterirken fosfor oranında %7'lik bir artış göstermiştir.

4.7. Süperoksit Anyon Üretimi Miktarı

Süperoksit anyon üretimi miktarında meydana gelen değişimler 4.4'te gösterilmiştir.



Şekil 4.4. Alfa tokoferol uygulaması (2.5 mM) sonrası tuz stresine maruz bırakılan bitkilerin 3. gün hasatı sonrasında süperoksit radikalinde (%) gözlenen değişimler

0. gün alfa tokoferol uygulamasının, kontrol grubuna göre süperoksit anyon üretimi miktarını değiştirmedığı gözlenmiştir.

3. gün alfa tokoferol uygulamasının, kontrol grubuna göre süperoksit anyon üretim miktarını %19 azalttığı gözlenmiştir.

NaCl uygulamasının kontrol grubuna göre süperoksit anyon üretimi miktarını %10 artırdığı gözlenmiştir.

Alfa tokoferol+NaCl uygulamasının NaCl grubuna göre süperoksit anyon üretimi miktarını % 10 oranında azalttığı tespit edilmiştir.

4.8. İçsel Alfa Tokoferol Miktarı

Gruplar	K	αT	NaCl	αT+NaCl
αT (mg/per 100g)				
0. gün	0.13±0.05 ^a	0.25±0.07 ^b		
3. gün	0.12±0.08 ^a	0.37±0.05 ^b	0.14±0.01 ^a	0.23±0.05 ^c

Çizelge 4.6. Alfa tokoferol uygulaması (2.5 mM) sonrası tuz stresine maruz bırakılan bitkilerin 3. gün hasatı sonrasında alfa tokoferol miktarında gözlenen değişimler

0. gün alfa tokoferol uygulamasının, kontrol grubuna göre içsel alfa tokoferol miktarını %92 oranında arttırdığı gözlenmiştir.

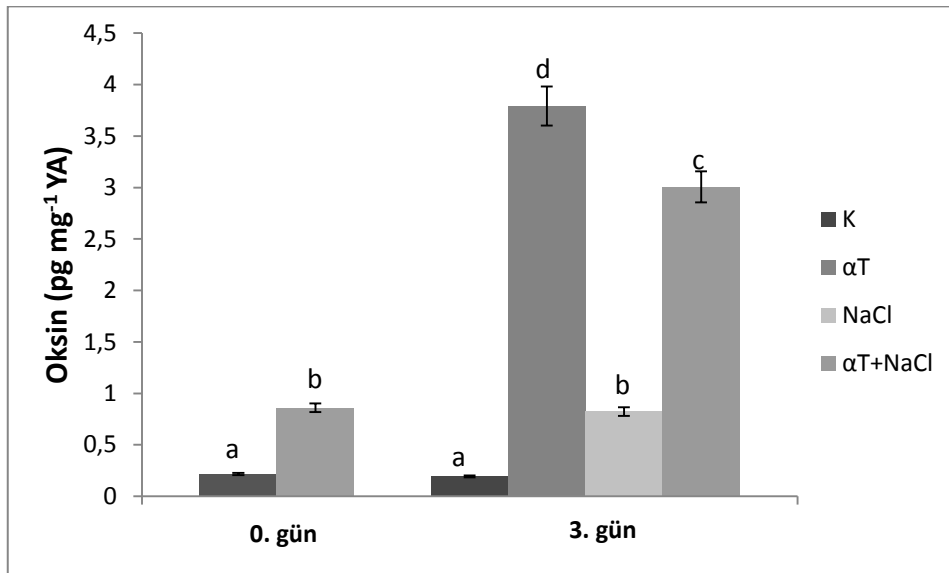
3. gün alfa tokoferol uygulamasının, kontrol grubuna göre içsel alfa tokoferol miktarını 3 kat arttırdığı gözlenmiştir.

NaCl uygulamasının kontrol grubuna göre içsel alfa tokoferol miktarını %16 oranında arttırdığı gözlenmiştir.

Alfa tokoferol+NaCl uygulamasının NaCl grubuna göre içsel alfa tokoferol miktarını %64 oranında arttırdığı tespit edilmiştir.

4.9. İndol Asetik Asit (IAA) Hormon Düzeyi (Oksin)

IAA hormon düzeyinde meydana gelen değişimler Şekil 4.5'te gösterilmiştir



Şekil 4.5. Alfa tokoferol uygulaması (2.5 mM) sonrası tuz stresine maruz bırakılan bitkilerin 3. gün hasatı sonrasında IAA miktarında (pg/mg^{-1} YA) gözlenen değişimler

0. gün alfa tokoferol uygulamasının, kontrol grubuna göre oksin hormon düzeyini 4 kat arttırdığı gözlenmiştir.

3. gün alfa tokoferol uygulamasının, kontrol grubuna göre oksin hormon düzeyini yaklaşık 5 kat artırdığı gözlenmiştir.

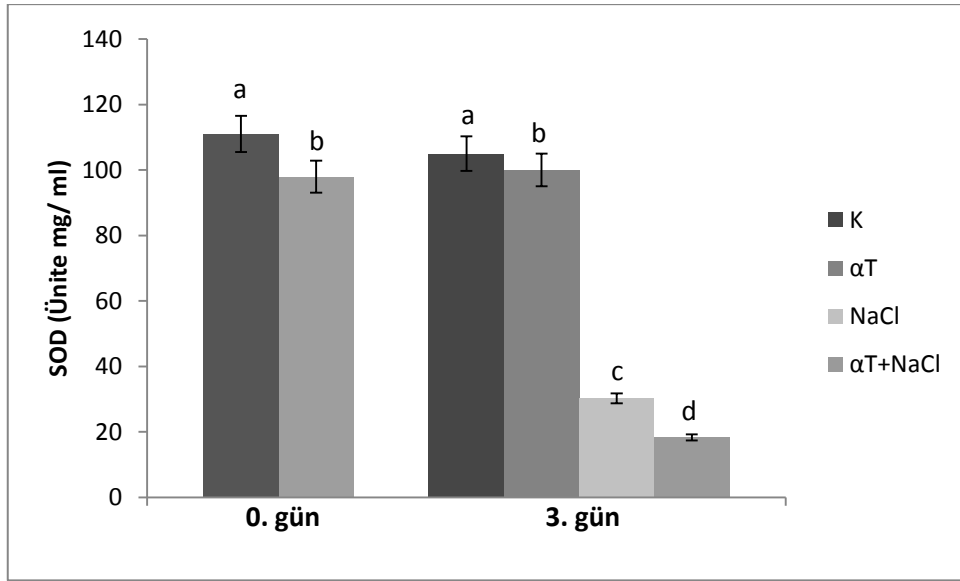
NaCl uygulamasının kontrol grubuna göre oksin hormon düzeyini 4 kat artırdığı gözlenmiştir.

Alfa tokoferol+NaCl uygulamasının NaCl grubuna göre oksin hormon düzeyini yaklaşık 4 kat artırdığı tespit edilmiştir.

4.10. Antioksidan Enzim Aktiviteleri

4.10.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim ve İzoenzim Aktivitesi

Süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesi ile ilgili veriler Şekil 4.6'da gösterilmiştir.



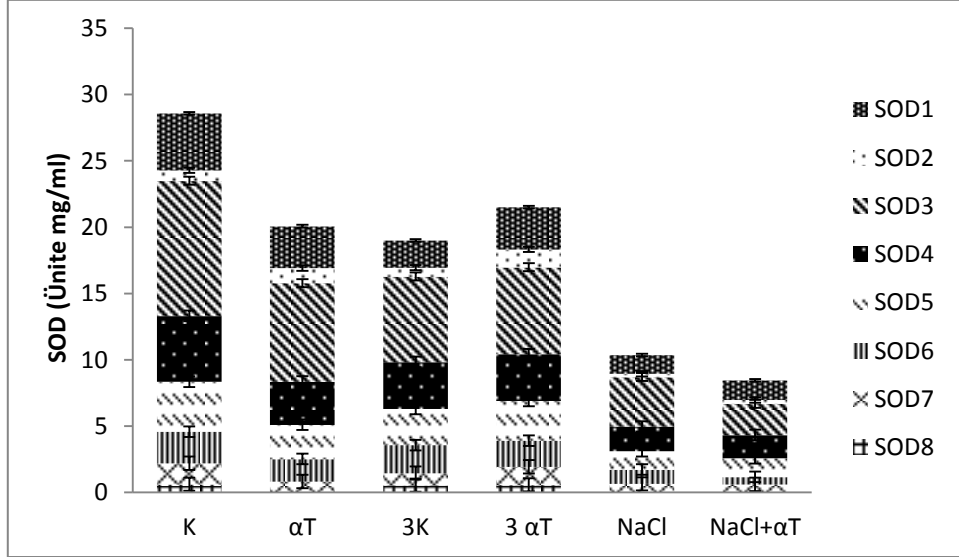
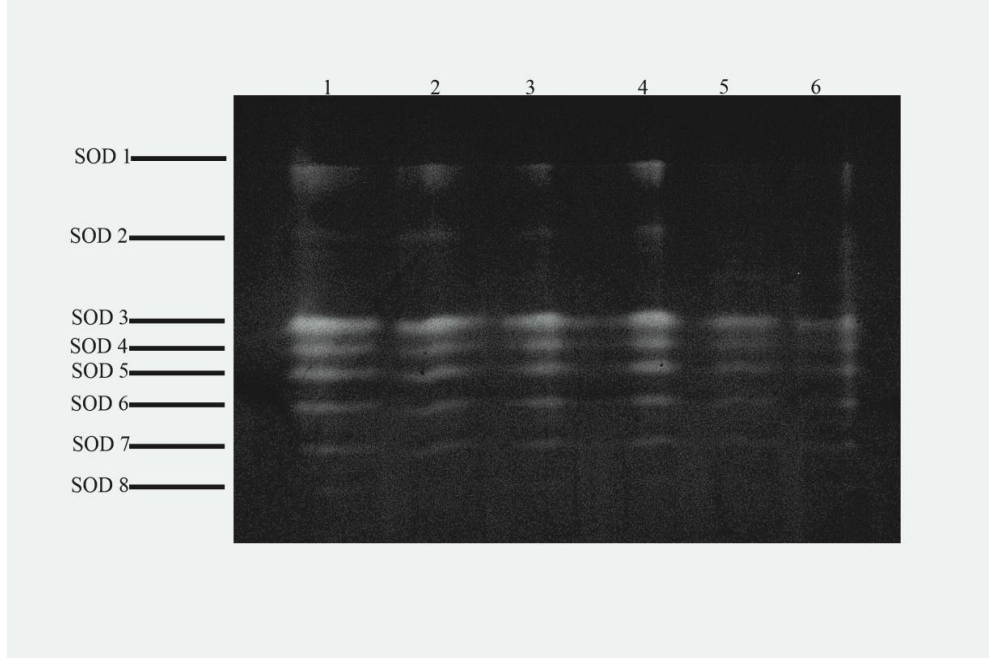
Şekil 4.6. Alfa tokoferol uygulaması (2.5 mM) sonrası tuz stresine maruz bırakılan bitkilerin 3. gün hasatı sonrasında SOD enzim aktivitesinde (ünite/mg⁻¹ protein) gözlenen değişimler

0. gün alfa tokoferol uygulamasının, kontrol grubuna göre SOD enzim aktivitesini %12 oranında azalttığı gözlenmiştir.

3. gün alfa tokoferol uygulamasının, kontrol grubuna göre SOD enzim aktivitesini %5 azalttığı gözlenmiştir.

NaCl uygulamasının kontrol grubuna göre SOD enzim aktivitesini %71 oranında azalttığı gözlenmiştir.

Alfa tokoferol+NaCl uygulamasının NaCl grubuna göre SOD enzim aktivitesini %40 oranında azalttığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.7. Alfa tokoferol uygulaması (2.5 mM) sonrası tuz stresine maruz bırakılan bitkilerin 3. gün hasatı sonrasında SOD izoenzim aktivitesinde (ünite/mg⁻¹ protein) gözlenen değişimler

Ön alfa tokoferol uygulaması sonrası tuz stresine maruz bırakılan soya kökü izozimlerinde meydana gelen değişimde 8 izoenzim (SOD 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8) belirlenmiştir.

0. gün tokoferol uygulaması kontrol grubuna göre SOD 1, 3, 4, 5, 6 ve 7 izoenzimlerinde azalma gösterirken SOD 2 izoenziminde artış göstermiştir. SOD 8 izoenzimi gözlenmemiştir.

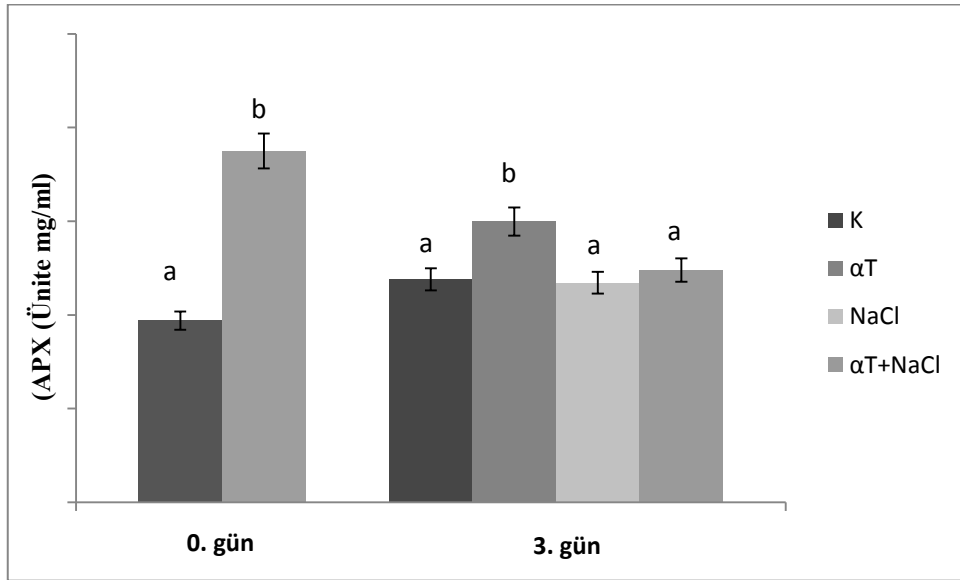
3. gün tokoferol uygulaması kontrol grubuna göre SOD 1, 2, 3, 5 ve 7 izoenzimlerinde artış gösterirken SOD 6 izoenziminde azalma göstermiştir. SOD 4 ve 8 izoenzimlerinde önemli bir değişim göstermemiştir.

NaCl uygulaması kontrol grubuna göre bütün izoenzimlerde azalma göstermiştir.

Alfa tokoferol+NaCl uygulaması NaCl grubuna göre SOD 1 ve 2 'de artmış 3, 4, 6 ve 7 de azalmış SOD 5'te bir değişiklik olmamıştır.

4.10.2 Askorbat Peroksidaz(APX) Enzim ve İzoenzim Aktivitesi

Askorbat Peroksidaz (APX) enzim aktivitesi ile ilgili veriler Şekil 4.8'de gösterilmiştir.



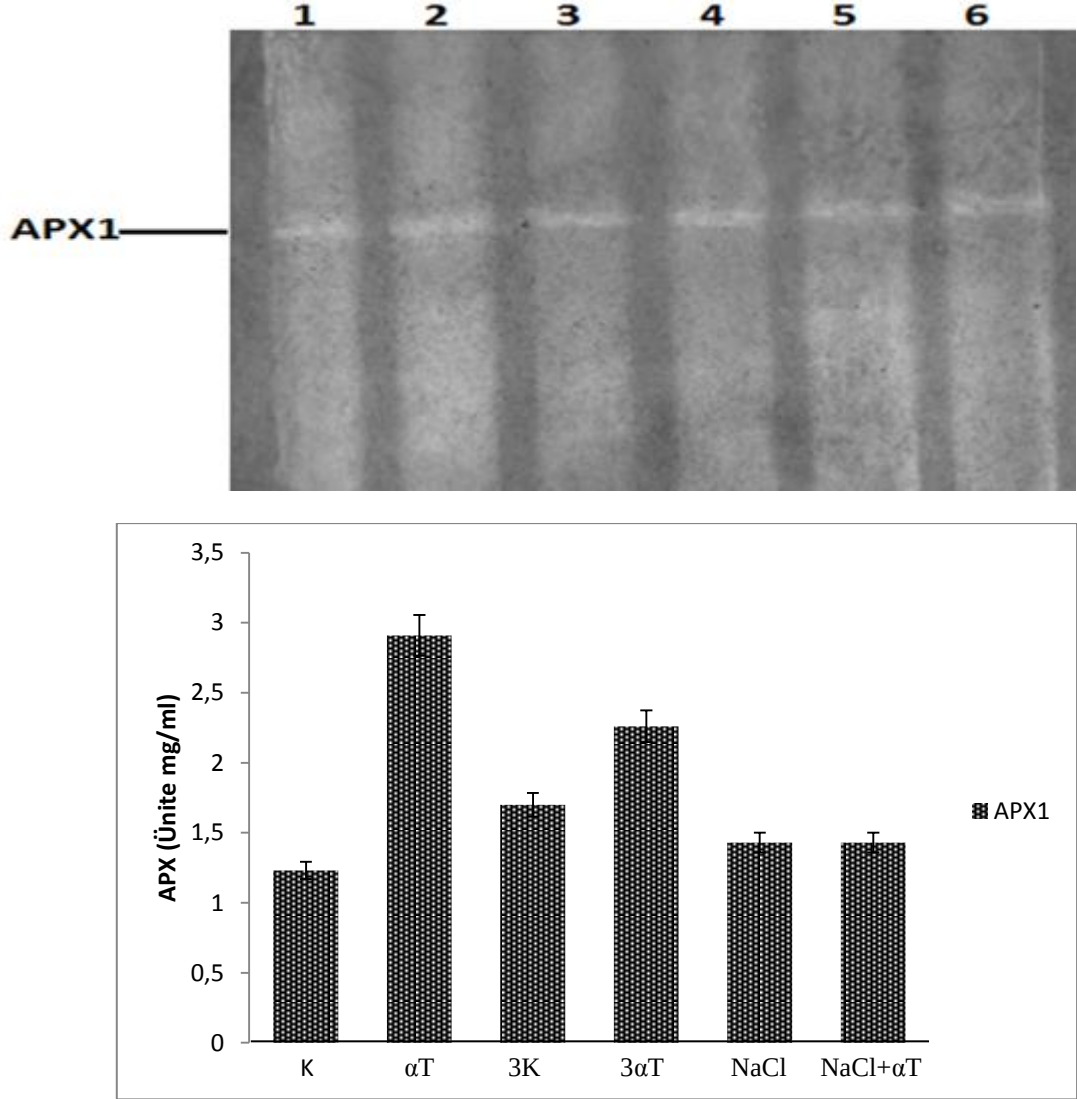
Şekil 4.8. Alfa tokoferol uygulaması (2.5 mM) sonrası tuz stresine maruz bırakılan bitkilerin 3. gün hasatı sonrasında APX enzim aktivitesinde (ünite/mg⁻¹ protein) gözlenen değişimler

0. gün alfa tokoferol uygulamasının, kontrol grubuna göre APX enzim aktivitesini %94 oranında arttırdığı gözlenmiştir.

3. gün alfa tokoferol uygulamasının kontrol grubuna göre APX enzim aktivitesini %26 oranında arttırdığı gözlenmiştir.

NaCl uygulamasının kontrol grubuna göre APX enzim aktivitesini değiştirmedığı gözlenmiştir.

Alfa tokoferol+NaCl uygulamasının NaCl grubuna göre APX enzim aktivitesini değiştirmediği gözlenmiştir.



şekil 4.9. Alfa tokoferol uygulaması (2.5 mM) sonrası tuz stresine maruz bırakılan bitkilerin 3. gün hasatı sonrasında APX izoenzim aktivitesinde (ünite/mg⁻¹ protein) gözlenen değişimler

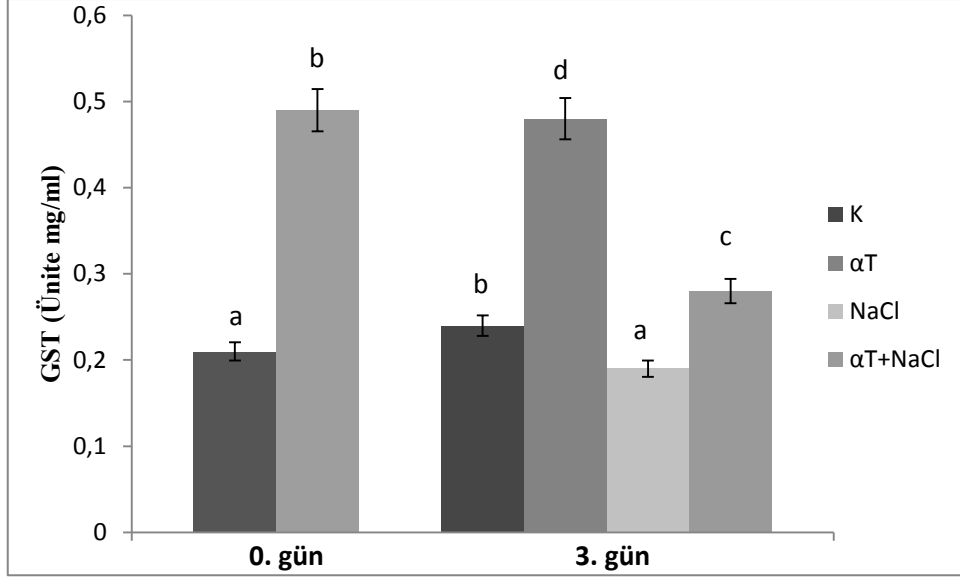
Ön alfa tokoferol uygulaması sonrası tuz stresine maruz bırakılan soya kökü izozimlerinde meydana gelen değişimde 1 izoenzim (APX 1) belirlenmiştir.

0. gün alfa tokoferol uygulamasında APX 1 izoenziminde bir değişim gerçekteşmezken 3. gün alfa tokoferol uygulamasında %25 azalma tespit edilmiştir.

NaCl uygulamasında APX 1 izoenziminde %29 artış gözlenirken alfa tokoferol+NaCl uygulamasında APX 1 izoenziminde %58 azalma gözlenmiştir.

4.10.3. Glutasyon S-Transferaz (GST) Enzim ve İzoenzim Aktivitesi

Glutasyon s-transferaz enzim aktivitesi ile ilgili veriler Şekil 4.10'da gösterilmiştir.



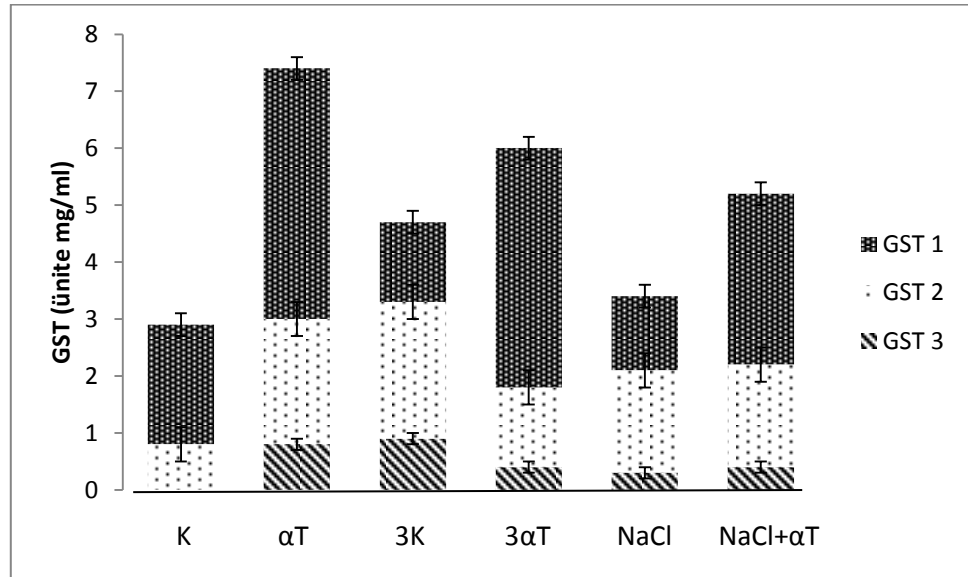
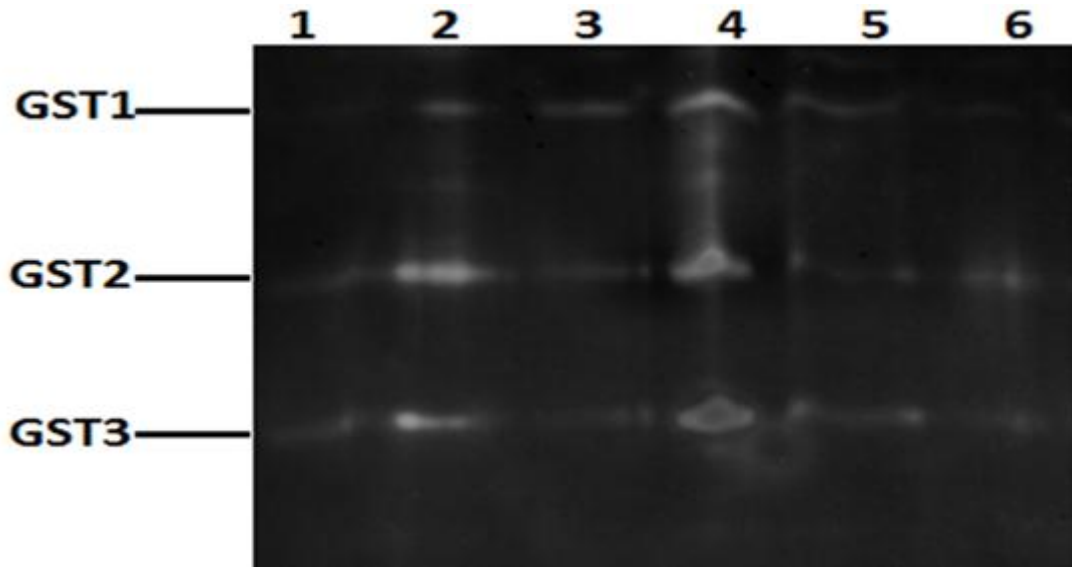
Şekil 4.10. Alfa tokoferol uygulaması (2.5 mM) sonrası tuz stresine maruz bırakılan bitkilerin 3. gün hasatı sonrasında GST enzim aktivitesinde (ünite/mg⁻¹ protein) gözlenen değişimler

0. gün alfa tokoferol uygulamasının, kontrol grubuna göre GST enzim aktivitesini 1.5 kat arttırdığı gözlenmiştir.

3. gün alfa tokoferol uygulamasının, kontrol grubuna göre GST enzim aktivitesini 2 kat artırdığı gözlenmiştir.

NaCl uygulamasının kontrol grubuna göre GST enzim aktivitesini %21 azalttığı gözlenmiştir.

Alfa tokoferol+NaCl uygulamasının NaCl grubuna göre GST enzim aktivitesini %47 oranında arttırdığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.11. Alfa tokoferol uygulaması (2.5 mM) sonrası tuz stresine maruz bırakılan bitkilerin 3. gün hasatı sonrasında GST izoenzim aktivitesinde (ünite/mg⁻¹ protein) gözlenen değişimler

Ön alfa tokoferol uygulaması sonrası tuz stresine maruz bırakılan soya kökü izozimlerinde meydana gelen değişimde 3 izoenzim (GST 1,2,3) belirlenmiştir.

0. gün alfa tokoferol uygulaması kontrol grubuna göre GST 1, 2 ve 3 izoenzimlerinde artış göstermiştir.

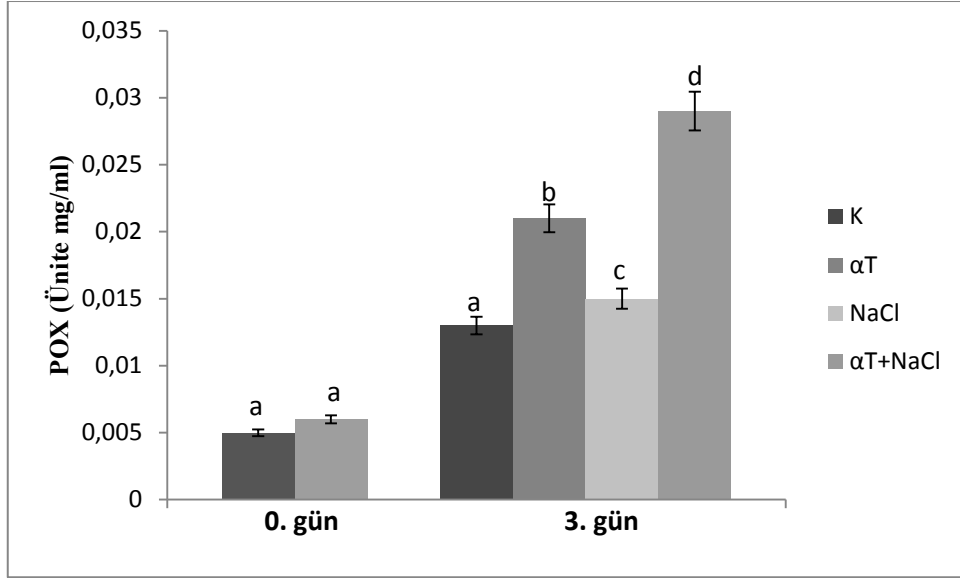
3. gün alfa tokoferol uygulaması kontrol grubuna göre GST 1 izoenziminde artış gösterirken GST 2 ve 3 izoenziminde azalma göstermiştir.

NaCl uygulaması kontrol grubuna göre bütün izoenzimlerinde azalma göstermiştir.

Alfa tokoferol+NaCl uygulaması NaCl grubuna göre GST 1 ve 3 te artışa GST 2 de ise bir değişim göstermemiştir.

4.10.4. Peroksidaz (POX) Enzim ve İzoenzim Aktivitesi

Peroksidaz (POX) enzim aktivitesi ile ilgili veriler Şekil 4.12’de gösterilmiştir.



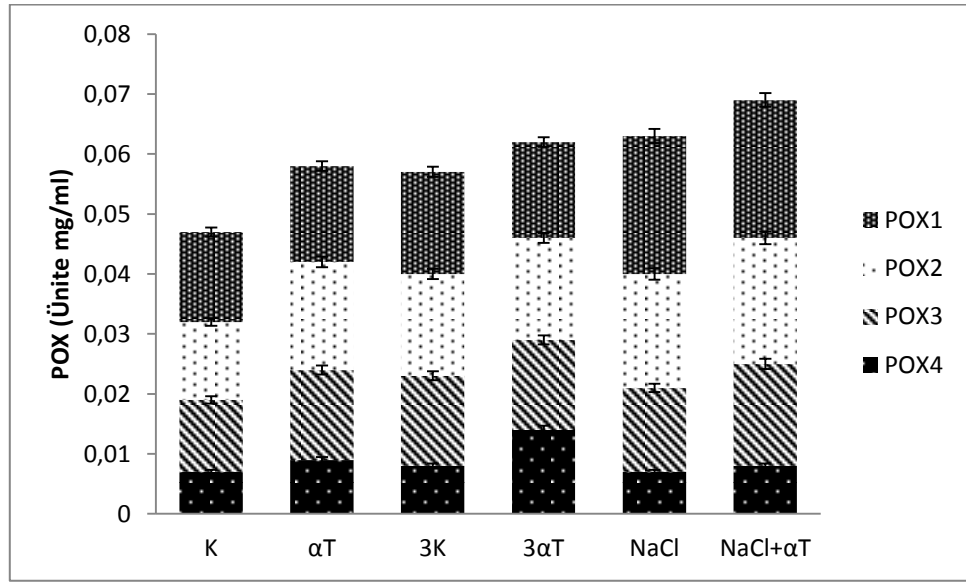
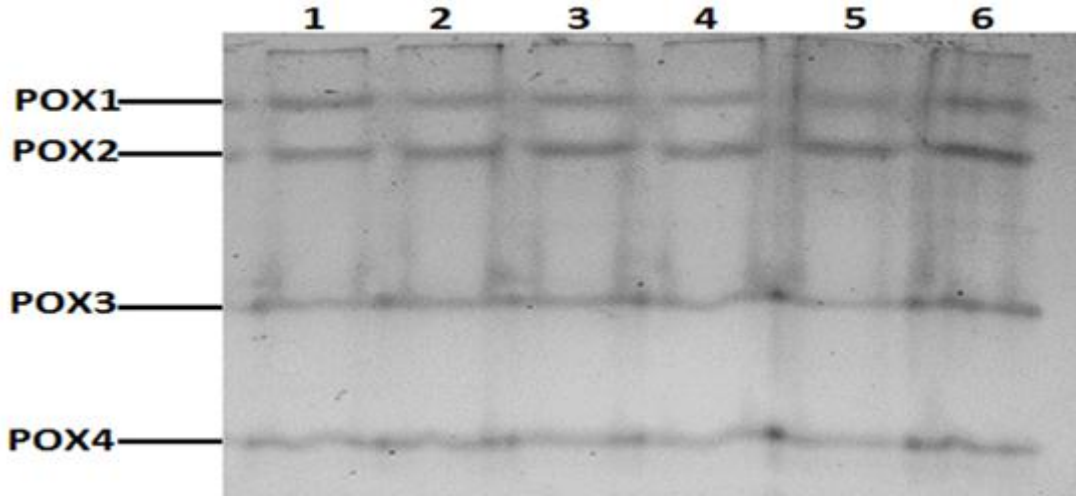
Şekil 4.12. Alfa tokoferol uygulaması (2.5 mM) sonrası tuz stresine maruz bırakılan bitkilerin 3. gün hasatı sonrasında POX enzim aktivitesinde (ünite/mg⁻¹ protein) gözlenen değişimler

0. gün alfa tokoferol uygulaması, kontrol grubuna göre POX enzim aktivitesini değiştirmemiştir.

3. gün alfa tokoferol uygulamasının kontrol grubuna göre POX enzim aktivitesini %62 oranında arttırdığı gözlenmiştir.

NaCl uygulamasının kontrol grubuna göre POX enzim aktivitesini %15 oranında arttırdığı gözlenmiştir.

Alfa tokoferol+NaCl uygulamasının NaCl grubuna göre POX enzim aktivitesini %93 oranında arttırdığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.13. Alfa tokoferol uygulaması (2.5 mM) sonrası tuz stresine maruz bırakılan bitkilerin 3. gün hasatı sonrasında POX izoenzim aktivitesinde (ünite/mg⁻¹ protein) gözlenen değişimler

Ön alfa tokoferol uygulaması sonrası tuz stresine maruz bırakılan soya kökü izozimlerinde meydana gelen değişimde 4 izoenzim (POX 1, 2, 3, 4) belirlenmiştir.

0. gün alfa tokoferol uygulaması kontrol grubuna göre POX 1, 2, 3 ve 4 izoenzimlerinde önemli bir artış göstermemiştir.

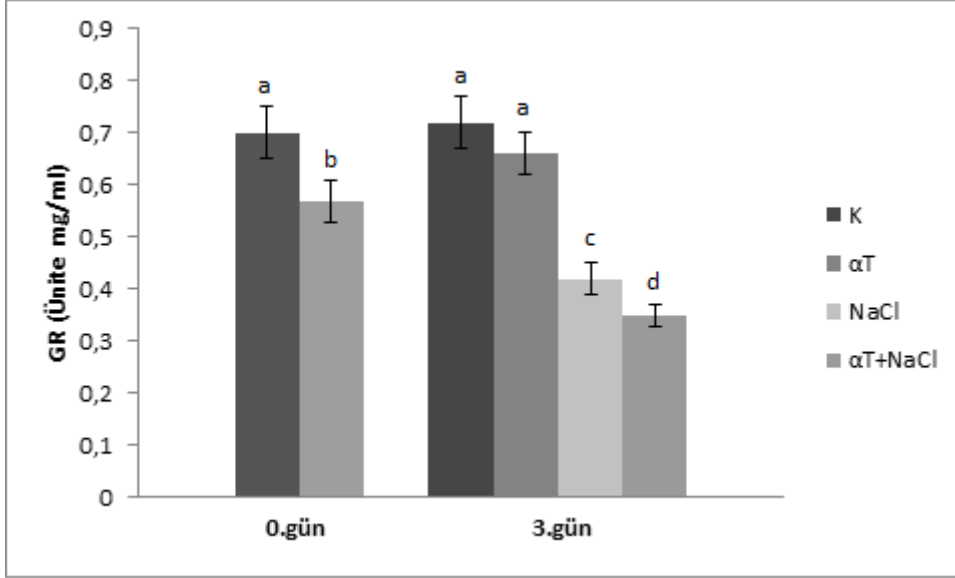
3. gün alfa tokoferol uygulaması, kontrol grubuna göre POX 4 izoenziminde artış göstermiştir.

NaCl uygulaması kontrol grubuna göre POX 1 ve 2 izoenziminde artış gösterirken POX 3 ve 4'te değişme olmamıştır.

Alfa tokoferol+NaCl uygulaması NaCl grubuna göre POX 2 ve 3 izoenziminde artış göstermiştir.

4.10.5 Glutasyon Reduktaz (GR) Enzim Aktivitesi

GR enzim aktivitesi ile ilgili veriler Şekil 4.14'te gösterilmiştir.



Şekil 4.14. Alfa tokoferol uygulaması (2.5 mM) sonrası tuz stresine maruz bırakılan bitkilerin 3. gün hasatı sonrasında GR enzim aktivitesinde (ünite/mg⁻¹ protein) gözlenen değişimler

0. gün alfa tokoferol uygulamasının, kontrol grubuna göre GR enzim aktivitesini %19 oranında azalttığı gözlenmiştir.

3. gün alfa tokoferol uygulamasını kontrol grubuna göre GR enzim aktivitesini değiştirmemiştir.

NaCl uygulamasının kontrol grubuna göre GR enzim aktivitesini %42 oranında azalttığı gözlenmiştir.

Alfa tokoferol+NaCl uygulamasının NaCl grubuna göre GR enzim aktivitesini %17 oranında azalttığı tespit edilmiştir.

5. TARTIŞMA

Bitkilerde kök uzunluğu tuz konsantrasyonunun artmasıyla azalmaktadır. Tuz stresinden dolayı hücre bölünmesi ve uzamasının engellenmesinin, tuz stresinin toksik etkisinden kaynaklı olduğu söylenebilir. Bununla birlikte kök ve gövde uzamasındaki azalma, tuz stresinin neden olduğu hormon seviyelerindeki değişim ile de açıklanabilir (Delgado ve Sanchez-Raya 2007).

Çalışmamızda tuz uygulaması yapılan grupta kök ve gövde uzunluğunda kontrol grubuna göre belirgin bir azalma gözlenmiştir (Çizelge 4.1). Buna paralel olarak Sobhanian ve ark.'nın (2010) yılında yapmış oldukları çalışmada, 0, 20, 40 ve 80 mM NaCl uygulanan soya fasulyesi tohumlarında kök ve hipokotil uzunluğunun sırasıyla %28 ve %60 oranında azaldığı gözlenmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre, hem alfa tokoferol uygulaması, hem de alfa tokoferol uygulaması altında yapılan tuz uygulaması kök ve gövde uzunluğunu arttırmıştır. (Çizelge 4.1). Buna sonuca paralel olarak buğday bitkisinde sıcaklık stresi altındaki alfa tokoferol uygulamasının kök ve gövde uzunluğunu arttırdığı tespit edilmiştir (Kumar ve ark., 2012). Bu sonuçlar değerlendirildiğinde, alfa tokoferolün soya köklerinde tuz stresinin oluşturduğu hasarı iyileştirdiği düşünülmektedir.

Tuzlu topraklarda osmotik basıncın yükselmesiyle bitkinin su alımı güçleşmekte ve böylece yaprak oransal su içeriği de düşmektedir (Katorji ve ark., 2001; Romono ve ark., 2013). Çalışmamızda tuz stresiyile azalan BSİ değerleri, alfa tokoferol altında uygulanan tuz stresiyile artış göstermiştir. Benzer şekilde, tuz stresi altındaki biber bitkisinde % BSİ değerlerinin azaldığını ve ilave besin elementi takviyesiyle bu değerlerde düzelme olduğu bildirilmiştir (Kaya ve Higgs, 2003).

Stres koşullarında üretilen aktif O₂ radikalleri membranlarda lipit peroksidasyonuna (MDA) neden olmakta ve bu durum membranların hasarıyla sonuçlanmaktadır (Kendall ve Mc Kersie, 1989). Bitkilerde tuz stresi altında lipit peroksidasyonunun arttığı yönünde birçok çalışma yapılmıştır (Hodges ve ark., 1999; Li ve ark., 2000). Buna benzer şekilde çalışmamızda, NaCl uygulaması ile soya köklerinde lipit peroksidasyonunda artış gözlenmiştir (Şekil 4.1). Öte yandan alfa tokoferol+NaCl uygulamasının MDA miktarını azaltarak oksidatif hasarı indirgediği tespit edilmiştir. MDA miktarında görülen bu azalma alfa tokoferolün bir ya da daha fazla mekanizmayla membranların strese karşı

dayanıklılığına katkıda bulunduğuna işaret etmektedir. Bu sonuçlara paralel olarak bakla (*Vicia faba* L.) bitkisine dışarıdan uygulanan tokoferolün yapraklarda antioksidan savunma sistemini uyardığı ve deniz suyunun oluşturduğu lipid peroksidasyonuna karşı koruma sağladığı tespit edilmiştir (Orabi ve ark., 2014).

Hidrojen peroksit, bitkilerde Fenton ve Haber-Weiss gibi çok sayıda metabolik yollarla OH⁻ gibi radikallere dönüşerek nükleik asit, lipid ve protein gibi hücresel moleküllerde oksidatif zarara neden olmaktadır (Argun, 2007). Aynı zamanda, oksidatif stres altında hidrojen peroksit miktarındaki değişim, bitkilerde AOT giderici durumun iyi bir göstergesidir (Vaidyanathan ve ark., 2003). Bu çalışmada, NaCl uygulaması soya köklerinde hidrojen peroksit miktarını arttırmıştır (Şekil 4.2). Alfa tokoferol altında yapılan tuz uygulaması, hidrojen peroksit miktarını sadece tuz uygulanan gruba göre azaltmıştır (Şekil 4.2). Bu sonuç, alfa tokoferolün antioksidan enzim sistemini uyarak hidrojen peroksit miktarını azalttığını göstermektedir.

Prolin, NaCl stresi altındaki bitkilerde protein bütünlüğünün sağlanması ve enzimlerin aktive edilmesinde görev yapan önemli bir ozmoregülatördür. Bu bileşiğin tuz ve su stresi altındaki bitkilerde önemli oranlarda yükseldiği bu sayede bitki savunma mekanizmasını harekete geçirerek bitkinin strese karşı koyma mekanizmasını desteklediği görüşü hakimdir (Oglesby,1997). Stres faktörleri bitkilerdeki içsel prolin miktarında artışa neden olmaktadır (Mehde, 2014).

Çalışmamızda, stres ortamında soya yapraklarında prolin düzeyinin kontrol gruplarına göre önemli bir oranda artmıştır (Şekil 4.3). Buna karşın alfa tokoferol altında tuz stresi uygulanan gruplarda prolin miktarındaki azalma uygulanan tokoferolün prolin aminoasidinin görevini üstlendiğini düşündürmektedir. Bu sonuca paralel olarak, dışarıdan yapılan tokoferol uygulamasının tuz stresi altındaki bakla bitkisinde prolin miktarını azalttığı tespit edilmiştir (Semida ve ark., 2014).

Kalsiyum (Ca²⁺) iyonunun, bitkilerde stresin algılanması esnasında sinyal molekül olarak hareket ederek hasarı iyileştirmede rol oynadığı bildirilmiştir (Elliott, 2000). Ca²⁺ hücre zarında adeta çimento görevini gören bir element olduğu için stresten kaynaklanan hücre zarı hasarını önleyebildiği bilinmektedir (George, 1995; Doğan, 2003). Fosforun kök gelişimini hızlandırdığı, güçlü bir kök gelişimi meydana getirdiği bilinmektedir. Çalışmamızda Ca²⁺ ve P iyon miktarları dikkate alındığında, tokoferol

uygulamasının kökteki kalsiyum ve fosfor miktarlarını arttırdığı bulunmuştur. Bu sonuç keten (*Linum utitatisimum* L.) bitkisine uygulanan tokoferolün tuz stresi altında fosfor ve kalsiyum iyon miktarını artırması ile uyum içerisinde. Köklerde meydana gelen bu değişimin stres esnasında kök savunmasının büyümeyi destekler nitelikte olduğunu göstermektedir (Dawood ve Sadak, 2014).

Süperoksit radikali, tüm aerobik hücrelerde moleküler oksijenin (O_2) bir elektron olarak indirgenmesi sonucu oluşur. Bu radikal anyonun önemi, H_2O_2 kaynağı ve geçiş metalleri iyonlarını indirgeyici olmasıdır. O_2 ile perhidroksil radikal birbiriyle reaksiyona girince biri okside olurken diğeri indirgenir. Bu ters değişim (dismutasyon) reaksiyonunda O_2 ve H_2O_2 meydana gelir (Ahmad ve ark., 2010). Çalışmamızda alfa tokoferol uygulamaları kontrol gruplarına göre süperoksit radikalini azaltmıştır (Şekil 4.4). Tuz uygulaması altında bu miktar kontrol grubuna göre artarken, alfa tokoferol + NaCl uygulaması, NaCl grubuna göre azalmıştır. Bu sonuçlar, MDA sonuçları ile uyum içerisinde.

Oksinler, hücre büyümesi ve hücre bölünmesi, kök oluşumu, tomurcuk inhibisyonu ve apikal dominansiye neden olma gibi fizyolojik etkilere sahiptir (Ünyayar ve Topçuoğlu, 1998). Çalışmamızda tokoferol uygulanan gruplarda tuz stresi altında oksin düzeylerinde önemli bir artış gözlenmiştir (Şekil 4.5). Bu sonuç, tokoferol uygulamasının köklerde tuz stresine karşı koruma sağladığını büyüme ve gelişmeyi olumlu yönde desteklediğini kanıtlar niteliktedir. Buna benzer olarak *Arabidopsis* tokoferol eksik mutantlarıyla yapılan bir çalışmada tuz stresi altında etilen sinyalinin gen ifadesinin indirgendiği tespit edilmiştir (Cela ve ark., 2010). Bu sonuçlar, tokoferolün bitkilerde içsel hormon seviyeleri ile etkileşebildiğini kanıtlar niteliktedir.

Süperoksit dismutaz enzimi (SOD), süperoksitin oksijen ve H_2O_2 'ye dismutasyonunu katalizler ve bir hücre içinde AOT'a karşı savunmanın ilk basamağının oluşturur (Alscher ve ark., 2002). SOD enzim aktivitesindeki değişiklikler tuz stresinin üstesinden gelmek için anahtar bir AOT savaşçısı olarak iş gördüğünü göstermektedir (Zhao ve ark., 2013). Çalışmamızda, tuz stresi altındaki soya köklerinde SOD enzim aktivitesi azaldığı görülmüştür. Buna benzer olarak Doğan ve ark. (2010)'da yaptığı bir çalışmada hassas domates genotiplerde SOD enzim aktivitesinin azaldığını tespit etmişlerdir.

Bununla birlikte çalışmamızda, alfa tokoferol altında uygulanan tuz stresi, SOD enzim aktivitesini sadece tuz uygulanan gruba göre % 40 oranında azaltmıştır (Şekil 4.6). Literatür taraması yapıldığında alfa tokoferolün direk olarak tekli oksijeni savuşturma özelliği olduğu ve lipid peroksidasyonu indirgediği bildirmiştir (Miret ve Munne-Bosh, 2015). Bu bilgiye dayanarak çalışmada, uygulanan tokoferolün antioksidan olma özelliğini kullanarak SOD enziminin yerini aldığı ileri sürülebilir. Ancak uygulamanın yapraklardan püskürtme yoluyla yapıldığı göz önüne alındığında, köklerde yapılan SOD enzim aktivitesinin azalması oldukça ilgi çekicidir.

SOD izoenzimi; yüksek bitkilerde SOD'un bitki hücrelerinin farklı bölmelerinde yer alan birden fazla izoenzimi bulunmaktadır (Pan ve ark., 2006). Mn-SOD genel olarak mitokondri ve peroksizomlarda bulunurken Fe-SOD ve Cu/Zn SOD kloroplast ve sitoplazmada yerleşmiştir (Bowler, 1992; Shinozaki ve ark., 2008). SOD izoformları her bitki türünde farklılaşabilirler (Bowler ve ark., 1992). Çalışmamızda, SOD izoenzim aktiviteleri total SOD enzim aktivitesi ile uyum içerisinde (Şekil 4.7). Literatür taraması yapıldığında bitkilerde alfa tokoferol uygulaması altında SOD enzimlerinin değişimine ait herhangi bir veriye rastlanmamıştır.

APX enzimi, bitki hücrelerinin sitosolünde ve kloroplastlarında H_2O_2 'nin yok edilmesini sağlayarak bitkinin oksidatif strese karşı savunmasında temel rolü oynamaktadır (Asada, 1992). Tuzluluk ve kuraklık gibi farklı abiyotik streslerin APX aktivitesi üzerindeki etkisinin incelendiği birçok çalışmada, APX enzim aktivitesinde artış olduğu rapor edilmiştir (Mitler ve Zilinska, 1993; Hernandez ve ark., 1995). Çalışmamızda, sadece alfa tokoferol uygulanan gruplarda, APX enzim aktivitesinin arttığı görülmüştür (Şekil 4.8). Öte yandan hem sadece tuz stresi altındaki hem de alfa tokoferol altında uygulanan tuz stresinde, APX enzim aktivitesinde bir değişiklik olmamıştır. Bu sonuç, dışarıdan uygulanan alfa tokoferolün APX enzim aktivitesi üzerinde olumlu bir etkisi olmadığını göstermektedir.

APX'un bitkilerde bir ya da daha fazla izozimi bulunmaktadır (Perez-Lopez ve ark., 2009). Bu çalışmada tuz stresi altındaki soya köklerinde sadece 1 APX izoenzimi belirlenmiş olup, total APX enzim aktivitesi sonuçları ile uyum içerisinde. Çalışmamıza paralel olarak, ıspanak bitkisiyle yapılan başka bir çalışmada tuz stresinin APX izoenzim seviyeleri üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir (Yashimura ve ark., 2000).

Glutasyon-s-transferaz; dimerik yapıda ve çok fonksiyonlu bir enzim grubudur. Glutasyon (GSH) detoksifikasyonu için ksenobiyotik bileşikler ile konjugasyona girerek onları katalize eder (Tausz ve ark., 2004). Çalışmamızda alfa tokoferol uygulamasının GST enzim aktivitesini arttırdığı tespit edilmiştir (Şekil 4.10). Bu sonuçla uyumlu olarak GST1, 2 ve 3 izoenzimleri de kontrol gruplarına göre artış göstermiştir (Şekil 4.11). Buna karşılık NaCl uygulaması yapılan soya köklerinde, GST enzim aktivitesinin azaldığı gözlenmiştir. Bu sonuca zıt olarak tuz stresi altında domates bitkisinde yapılan bir çalışmada, GST enzim aktivitesinin arttığı bildirilmiştir (Gapinska ve ark., 2008). Öte yandan NaCl+alfa tokoferol uygulamasının, GST enzim aktivitesini tuz uygulanan gruplara kıyasla arttırdığı gözlenmiştir. Bu sonuç, APX enzimin aksine dışarıdan uygulanan alfa tokoferolün köklerdeki GST enzim aktivitesini normal koşullarda uyurabildiği gibi tuz stresinin altında da uyarıcı etkisi olduğunu göstermektedir.

Peroksidaz savunma mekanizmasının işleyişinde etkin olarak yer alan öncül enzimdir. Bitkilerdeki çoklu savunma sisteminin önemli bir bölümünü oluşturmaktadır ve çoğunlukla kloroplastlarda sentezlenmektedir (Malolepsa ve Urbarek, 1994). Yapılan birçok araştırmada NaCl' nin peroksidaz (Jaleel, 2008) aktivitesini arttırdığı ve lipid peroksidasyonunun artışına neden olduğunu bulunmuştur (Sairam, 2002). Çalışmamızda, POX aktivitesinin NaCl stresinde ve alfa tokoferol altında uygulanan tuz stresinde artmış olması bununla paralellik göstermektedir. Bu sonuca benzer şekilde Semida ve ark.'nın (2014) yılında yaptıkları bir çalışmada, tuz stresi altında bakla bitkisine dışarıdan uygulanan tokoferolün, POX enzim aktivitesini arttırdığı tespit edilmiştir.

Peroksidaz izoenzimlerinin bitkilerin tuz toleransında rol oynadıkları bilinmektedir (Sreenivasulu ve ark., 1999). Çalışmamızda her gruba ait 4 izoenzim tespit edilmiştir (POX1, POX2, POX3 ve POX4). Tespit edilen bu enzimlerden sadece tuz uygulaması grubunda POX1 ve POX 2 izoenziminde bir artış gözlenmiştir ancak diğer gruplarda ve izoenzimlerde bir değişim gözlenmemiştir. Radic ve ark. (2006), *Centaurea ragusina* L. türü üzerinde yaptıkları bir çalışmada tuz stresine bağlı olarak izozimlerin yoğunluklarının değiştiğini rapor etmişlerdir. Öte yandan alfa tokoferol altında yapılan tuz uygulaması ile artan POX 2 ve POX 3 izoenzim aktivitesi ile uyum içerisindedir.

Glutasyon redüktaz, hidrojen peroksitin detoksifikasyon sürecinde okside glutasyonun indirgenmesinden sorumludur. GR enzim aktivitesinin tuz stresi altında arttığı daha önce yapılan bazı araştırmalarda kaydedilmiştir (Lin ve Kao, 2002; Karanlık, 2001). Çalışmamızda tuz stresinde azalan GR enzim aktivitesi, alfa tokoferol uygulaması sonrası uygulanan tuz stresıyla azalmaya devam etmiştir (Şekil 4.14). Bu sonuç, MDA değerlerindeki iyileşme de göz önüne alındığında, SOD enzim aktivitesinde olduğu gibi alfa tokoferolün GR enzimin yerini aldığını düşündürmektedir.

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Elde edilen veriler, dışarıdan uygulanan α - tokoferolün azalan hidrojen peroksit ve lipit peroksidasyon ürünü olan malondialdehid (MDA) miktarları dikkate alındığında tuz stresinin oluşturduğu oksidatif hasarı hem antioksidan enzimlerin görevlerini üstlenerek hem de uyarıcı etki yaparak iyileştirdiğini ortaya koymuştur. Ayrıca, tuz stresi altında yapraklar yapılan α - tokoferol uygulamasının, köklerde içsel IAA düzeylerinin birikimini uyarması, kalsiyum ve fosfor iyonlarının miktarlarını arttırması stres esnasında yapraklardan köklere iletilmek üzere sinyal görevi üstlenebileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle bitkilerde stres esnasında alfa tokoferolün yapmış olduğu sinyallemenin ve hormonlar ile olan etkileşimlerinin daha iyi aydınlatılması için biyokimyasal ve moleküler düzeyde çalışmalar yapılması gerektiği düşüncesindeyiz.

7. KAYNAKLAR

- Ahmad, P., Jaleel, C.A., Salem, M.A., Nabi, G., Sharma, S. 2010. Roles of enzymatic and non enzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. *Critical Reviews in biotechnology.*, 30(3): 161-175.
- Akkuş, I. 1995. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Mimoza Yay., Konya, 38.
- Alscher, R.G., Erturk, N., Heath, L.S. 2002. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J. Exp. Bot.*, 53(372): 1331-41.
- Anaç, H. ve Ertürk, Y. E., 2003. Soya Fasulyesi, TEAE Dergisi, 2: 1-4.
- Anonim, www.wikipedia.org/wiki/Soya (01.11.2015).
- Apel, K., Hirt, H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol.*, 55: 373-99.
- Argun, M.E., Dursun, S., Ozdemir, C., Karatas, M. 2007. Heavy metal adsorption by modified oak sawdust Thermodynamics and kinetics. *Journal of Hazardous Materials.*, 141: 77-85.
- Asada, K. 1992. Ascorbate peroxidase - a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiolgia Plantarum.*, 85: 235-241.
- Asada, K. 1999. The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of Active Oxygens and Dissipation of Excess Photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology.*, 50: 601-639.
- Ashraf, M., Wu, L. 1994. Breeding for Salinity Tolerance in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences.*, 13: 17-42.
- Bartels, D., Sunkar, R. 2005. Drought and Salt Tolerance in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences.*, 24(1): 23-58.
- Baskin, S.I., Salem, H. 1997. Oxidants, antioxidants, and free radicals. Taylor and Francis, Washington DC, 1-16.
- Bates, L.S., Waldren, R.P., Teare, I.D. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and soil.*, 39(1): 205-207.
- Beauchamp, C., Fridovich, I. 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.*, 44(1): 276-87.
- Bowler, C., Van Montagu, M., Inze, D. 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 43: 83-116.
- Burton, G.W., Webb, A., Ingold, K.U. 1985. A mild, rapid and efficient method of lipid extraction for use in determining vitamin E/lipid ratios. *Methods.*, 20: 29-39.
- Cela, J., Chang, C., Munne-Bosh, S. 2011. Accumulation of γ - Rather than α -Tocopherol Alters Ethylene Signaling Gene Expression in the *vte4* Mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant and cell physiology.*, 52(8): 1389–1400.

Cromer, D.T., Hall, J.H., Lee, Y., Ryan, R.R. 1988. The structure of the ethylenediammonium salt of 3-nitro-1,2,4-triazol-5-one, $C_2H_4(NH_3)_2 \cdot 2C_2N_4O_3H$. *Acta Crystallographica Section C*, 44: 1144-1147.

Dawood, M.G., Sadak, M.S. 2014. Physiological Role of Glycine Betaine in Alleviating the Deleterious Effects of Drought Stress on Canola Plants (*Brassicanapus* L.). *Middle East J.*, 3(4): 943-954.

Delgado, I.C., Sanchez-Raya, J. 2007. Effects of Sodium Chloride and Mineral Nutrients on Initial Stages of Development of Sunflower Life. *Communications in Soil Science and Plant Analysis.*, 38: 15-16.

Rosa, G., Duncan, D.S., Keen, C.L., Hurley, L.S. 1979. Evaluation of negative staining technique for determination of CN-insensitive superoxide dismutase activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology.*, 566(1): 32-39.

Demir, I., Ellis, R.H. 1992. Changes in seed quality during seed development and maturation in pepper. *Ann. App. Biol.*, 121: 385-399.

Doğan, M., Alkan, M. 2003. Adsorption kinetics of methyl violet onto perlite. *Chemosphere.*, 50: 517-528.

Dogan, M., Tırdamaz, R., Demir, Y. 2010. Effective salt criteria in callus-cultured tomato genotypes. *Zeitschrift für Naturforschung C.*, 65(9-10): 613-618..

Elliott, D.B., Patla, A.E., Furniss, M., Adkin, A. 2000. Improvements in clinical and functional vision and quality of life after second eye cataract surgery. *Optometry & Vision Science.*, 77: 13-24.

Engle, W.A., Yoder, M.C., Baurley, J.L., Yu, P.L. 1988. Vitamin E decreases superoxide anion production by polymorphonuclear leukocytes. *Pediatr Research.*, 23(3): 245-248.

Flores, M.I.A., Romero-Gonzalez, R., Garrido-Frenich, A., Vidal, J.L.M. 2011. QuEChERS-based extraction procedure for multifamily analysis of phytohormones in vegetables by UHPLC-MS/MS. *J. Sep. Sci.*, 34: 1517–1524.

Foyer, C.H., Halliwell, B. 1976. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: A proposed role in ascorbate metabolism. *Planta.*, 133: 21–25.

Gapińska, M., Skłodowska, M., Gabara, B. 2008. Effect of short-and long-term salinity on the activities of antioxidative enzymes and lipid peroxidation in tomato roots. *Acta Physiologiae Plantarum.*, 30(1): 11-18.

George, E., Marschner, H., Jakobsen, I. 1995. Role of arbuscular mycorrhizal fungi in uptake of phosphorus and nitrogen from soil. *Critical Reviews in Biotechnology.*, 15: 257-270.

Grobas, S., Mendez, J., Lopez Bote, B.C., De Blas, B.C., Mateos, G.G. 2002. Effect of vitamin E and A supplementation on egg yolk α -tocopherol concentration. *Poultry Science.*, 81(3): 376-381.

Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B. 1974. Glutathione S-transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.*, 249: 7130–7139.

Hanlon, E. 1998. Elemental Determination by AAS. *Handbook of Reference Methods for Plant Analysis*. Yash P. Kaira, CRS Press, USA, 157-165.

Hasegawa, M.P., Handa, S., Handa, K.A., Bressan, A.R. 1986. Proline Accumulation and the Adaptation of Cultured Plant Cells to Water Stress. *American Society of Plant Biologists.*, 80: 938-945.

Hernandez, J.A., Olmos, E., Corpas, F.J., Sevilla, F., Del Rio, L.A., 1995. Salt-induced oxidative stress in chloroplasts of pea plants. *Plant Science.*, 105: 151-167.

Herzog, V., Fahimi, H.D. 1973. A new sensitive colorimetric assay for peroxidase, using 3,3-Diaminobenzidine as hydrogendonor. *Anal. Biochem.*, 55: 554–562.

Ho, C.E., Tsai, R.Y., Lin, Y.L., Kao, C.R. 2002. Effect of Cu concentration on the reactions between Sn-Ag-Cu solders and Ni. *Journal of Electronic Material.*, 31: 584-590.

Hofius, D., Sonnewald, U. 2003. Vitamin E biosynthesis: biochemistry meets cell biology. *Plant Science.*, 8(1): 6-8.

Hu, Y., 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.

Jaleel, C.A., Manivannan, P., Sankar, B., Kishorekumar, A.R., Gopi, S.R., Panneerselvam, R. 2007. Water deficit stress mitigation by calciumchloride in *Catharanthus roseus*; effects on oxidative stress, proline metabolism and indole alkaloid accumulation. *Colloids Surf. B: Biointerfaces.*, 60: 110–116.

Jaleel, C.A., Lakshmanan, G.M.A., Gomathinayagam, M., Panneerselvam, R. 2008. Triadimefon induced salt stress tolerance in *Withania somnifera* and its relation ship to antioxidant defense system. *South African Journal of Botany.*, 74(1): 126-132.

Johnson, C.H., Galonsky, A., Ulrich, J.P. 1958. Proton strength functions from (p, n) cross sections. *Physical Review.*, 109(4): 1243.

Johnson, C.M., Ulrich, A. 1959. II. Analytical methods for use in plant analysis. *Calif. AES. Bull.*, 766: 30-33.

Johnson, R., de la Houssaye, P.R., Chang, C.E., Chen, P.F., Wood, M.E., Garcia, G.A., Isaac, I., Asbeck, P.M. 1998. Advanced thin-film silicon-on-sapphire technology: microwave circuit applications. *Electron Devices, IEEE Transactions on.*, 45(5): 1047-1054.

Karanlık, S. 2001. Resistance to salinity in different wheat genotypes and physiological mechanisms involved in salt resistance Ph.D. Thesis, Institute of Natural and Applied Science, University of Cukurova, Turkey, 122.

Kavutcu, M., Canbolat, O., Öztürk, S., Olcay, E., Ulutepe, S., Ekinci, C., Gökhan, I.H., Durak, I. 1996. Reduced enzymatic antioxidant defense mechanism in kidney tissues from gentamicin-treated guinea pigs: effects of vitamins E and C. *Nephron.*, 72(2): 269-274.

Kaya, C., Higgs, D., Kirnak, H., Tas, I. 2003. Mycorrhizal colonisation improves fruit yield and water use efficiency in watermelon (*Citrullus lanatus* Thunb.) grown under well-watered and water-stressed conditions. *Plant and soil.*, 253: 287-292.

Khalvati, M.A., Hu, Y., Mozafar A., Schmidhalter, U. 2005. Quantification of Water Uptake by Arbuscular Mycorrhizal Hyphae and its Significance for Leaf Growth, Water Relations, Gas Exchange of Barley Subjected to Drought Stress. *Plant Biol.* 7: 706-712

Kendall, E.J., McKersie, B.D. 1989. Freeradical and freezing injury to cell membranes of winter wheat. *Physiologia Plantarum.*, 76: 86-94.

Koveshnikov, V.G., Pikaliuk, V.S. 1993. The proliferative processes in the skeleton of white rats administered dipal experimentally and after antioxidant therapy with to copherol. *Morfologija.*, 104(3-4): 34-9.

Kumar, S., Singh, R., Nayyar, H. 2013. α -Tocopherol Application Modulates the Response of Wheat (*Triticum aestivum* L.) Seedlings to Elevated Temperatures by Mitigation of Stress Injury and Enhancement of Antioxidants. *Journal Plant Growth Regulation.*, 32: 307–314.

Levitt, J. 1980. Responses of plants to environmental stresses. Volume II. Water, radiation, salt, and other stresses. Cabdirect., 607.

Li, Z.Y., Chen, S.Y. 2000. Differential accumulation of the S-adenosylmethionine decarboxylase transcript in rice seedlings in response to salt and drought stresses. *Theoretical and Applied Genetics.*, 100(5): 782-788.

Madhava R.K.V., Sresty T.V. 2000. Antioxidative parameters in the seedlings of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses. *Plant Sci.*, 157(1):113-128.

Mahajan, S., Tuteja, N. 2005. Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Arch Biochem Biophys.*, 444(2): 139-58.

Maiorano, D. 1999. Functional conservation and cell cycle localization of the Nhp2 core component of H + ACA snoRNPs in fission and budding yeasts. *Exp. Cell Res.*, 252(1): 165-74.

Mangal, J.L., Singh, R.K., Yadav, A.C., Lal, S., Pandey, U.C. 1990. Evaluation of garlic cultivars for salinity tolerance. *Journal of Horticultural Science.*, 65: 657-658.

Mehde, A.A., Resan, A.K. 2014. Study of Several Biochemical Features in Sera of Patients with Polycystic Ovaries and Compared with the Control Group. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences.*, 8(10): 620-627.

Meloni, D.A., Olivia, M.A., Martinez, C.A., Cambraia, J. 2003. Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. *Environmental and Experimental Botany.*, 49: 69-76.

Miret, J.A., Munne-Bosh, S. 2015. Redox signaling and stress tolerance in plants: a focus on vitamin E. *Annals of the New York Acedemy of Sciences.*, 1340: 29-38.

- Mittler, R., Zilinska, B.A. 1993. Detection of ascorbate peroxidase activity in native gels by inhibition of the ascorbate-dependent reduction of nitroblue tetrazolium. *Analytical Biochem.*, 212: 540-546.
- Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.*, 7(9): 405-10.
- Mittler, R., Sandy, V., Gollery, M., Breusegem, F.V. 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science.*, 9: 490-498.
- Moyle, R., Fairbairn, D.J., Ripi, J., Crowe, M., Botella, J.R. 2005. Developing pineapple fruit has a small transcriptome dominated by metallothionein. *Journal of Experimental Botany.*, 56(409): 101-112.
- Munne-Bosh, S. 2005. The role of α -tocopherol in plant stress tolerance. *Journal of Plant Physiology.*, 162: 743-748.
- Munns, R., Termaat, A., 1986. Whole-plant responses to salinity. *Australian Journal of Plant Physiology.*, 13(1): 143-160.
- Munns, R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment.*, 25: 239-250.
- Nakano, Y., Asada, K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.*, 22: 867-880.
- Noctor, G., Foyer, C.H. 1998. Ascorbate And Glutathione: Keeping Active Oxygen Under Control. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.*, 49: 249-279.
- Oglesby, T., Peng, Q., Shannen, V., Snodgrass, J., Taylor, P. 1997. Use of Ion-Pair Reagents for Quantitation of Polar Analytes from Biological Matrices by Reverse-Phase LC/MS. In proceedings of the asms conference on mass spectrometry and allied topics., 1063-1063.
- Orabi, S.A., Abdelhamid, M.T. 2014. Protective role of α -tocopherol on two *Vicia faba* cultivars against seawater-induced lipid peroxidation by enhancing capacity of anti-oxidative system. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences.*
- Pandya, D.H., Mer, R.K., Prajith, P.K., Pandey, A.N. 2005. Effect of salt stress and manganese supply on growth of barley seed lings. *Journal of Plant Nutrition.*, 27(8): 1361-1379.
- Radic, S., Radic-Stojkovic, M., ve Pevalsek-Kozlina, B., 2006. Influence of NaCl and mannitol on peroxidase activity and lipid peroxidation in *Centaurea ragusina* L. roots and shoots. *Journal of Plant Physiology*, 163, 1284—1292.
- Romano, A., Sorgonà, A., Lupini, A., Araniti, F., Stevanato, P., Cacco, G., Abenavoli, M.R. 2013. Morpho-physiological responses of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) genotypes to drought stress. *Acta Physiologiae Plantarum.*, 35(3): 853-865.
- Sairam, R.K., Rao, K.V., Srivastava, S.C. 2002. Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. *Plant Sci.*, 163: 1037-1046.

Sairam, R.K., Tyagi, A. 2004. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. Division of Plant Physiology., 86: 407-421.

Secenji, M., Bebes, A., Hideg, E., Györgyey, J. 2008. Transcriptional changes in ascorbate-glutathione cycle under drought conditions. Acta Biologica Szegediensis., 52(1): 93-94.

Seevers, P.M., Daly, J.M., Catedral, F.F. 1971. The role of peroxidase isozymes in resistance to wheat stem rust disease. Plant Physiology., 48(3): 353-360.

Semida, W.M., Taha, R.S., Abdelhamid, M.T., Rady, M.M. 2014. Foliar-applied α -tocopherol enhances salt-tolerance in *Vicia faba* L. plants grown under saline conditions. South African Journal of Botany., 95: 24–31.

Seven, A., Seyman, O., Hatemi, S., Hatemi, H., Yiğit, G., Candan, G. 1996. Antioxidant status in experimental hyperthyroidism: effect of vitamin E supplementation. Clinica Chimica Acta., 256: 65-74.

Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. 2000. Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. Curr. Opin. Plant Biol., 3: 217-223.

Smart, R.E., Bingham, G.E. 1974. Rapid estimates of relative water content. Plant Physiology., 53(2): 258-260.

Snapp, S.S., Shennan, C. 1992. Effects of salinity on root growth and death dynamics of tomato, *Lycopersicon esculentum* Mill. New Phytologist., 121: 71-79.

Sreenivasulu, N., Ramanjulu, S., Ramachandra-Kini, K., Prakash, H.S., Shekar-Shetty, H., Savithri, H.S., Sudhakar, C. 1999. Total peroxidase activity and peroxidase isoforms as modified by salt stress in two cultivars of fox-tail millet with differential salt tolerance. PlantScience., 141: 1-9.

Swanson, S., Gilroy, S. 2010. ROS in plant development. Physiologia Plantarum., 138: 384-392.

Sobhanian, H., Razavizadeh, R., Nanjo, Y., Ehsanpaur, A.A., Jazi, R.F., Motamed, N., Komatsu, S. 2010. Proteome analysis of soybean leaves, hypocotyls and roots under salt stress. Proteome Science., 8-19.

Tausz, M., Sircesj, H., Grill, D. 2004. The glutathione system as a stress marker in plant ecophysiology: is a stress-response concept valid. J. Exp. Bot., 55: 1955–1962.

Teige, M., Scheikl, E., Eulgem, T., Dóczi, R., Ichimura, K., Shinozaki, K., Hirt, H. 2004. The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in *Arabidopsis*. Molecular cell., 15: 141-152.

Tuteja, N. 2007. Chapter Twenty-Four Mechanisms of High Salinity Tolerance in Plants. Elsevier., 428: 419-438.

Ünyayar, S., Topçuoğlu, Ş.F. 1998. *Phanerochaete chrysosporium* ME 446'dan Elde Edilen Indol-3-Asetik Asit (IAA), Gibberellik Asit (GA3), Absisik Asit (ABA) ve Zeatin'in Biyolojik Aktivitelerinin Tayini. J. Of Biology., 22: 29-42.

Vaidyanathan, H., Sivakumar, P., Chakrabarty, R., 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.*, 165: 1411–1418.

Velikova, V., Yordanov, I., Edreva, A. 2000. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective roles of exogenous polyamines. *Plant Sci.*, 151: 59-66.

Venus, J.C., Causton, D.R., 1979. Plant growth analysis: a re-examination of the methods of calculation of relative growth and net assimilation rates without using fitted functions. *Annals of Botany.*, 43(5): 633-638.

Yaşar, F., Kuşvuran, Ş., Ellialtıoğlu, Ş. 2008. Tuzluluk ve Kuraklık Stresi Çalışmalarında Antioksidant Enzim Aktiviteleri ile Dayanıklılık Arasındaki İlişkilerin İncelenmesi. *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi.*, 31(3): 41-48.

Zhao, Q., Zhang, H., Wang, T., Chen, S., Dai, S. 2013. Proteomics-based investigation of salt-responsive mechanisms in plant roots. *Journal of proteomics.*, 82: 230-253.

Zhu, J.K. 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 53: 247-73.