

T.C.
SİNOP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

SOYA (*Glycine max* L.) YAPRAKLARINDA ALIŞTIRMA YOLU İLE
TUZLULUK TOLERANSINI ARTTIRMADA
***NPR1* BAĞIMLI SA'NIN ROLÜNÜN**
ARAŞTIRILMASI

UFKUN SARISOY

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

DOÇ. DR. BURCU SEÇKİN DİNLER

SİNOP-2018

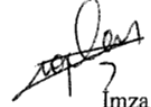
TEZ KABUL

Yazarın adı soyadı tarafından hazırlanan “Soya (*Glycine max* L.) Yapraklarında Alıştırma Yolu İle Tuzluluk Toleransı Arttırmada *NPR1* Bağımlı Salisilik Asidin Rolünün Araştırılması” başlıklı bu çalışma, 12.12.2018 tarihinde yapılan savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak, jürimiz tarafından **YÜKSEK LİSANS tezi** olarak kabul edilmiştir.

Başkan Doç. Dr. Burcu SEÇKİN DİNLER
Sinop Üniversitesi / Fen-Edebiyat Fakültesi


İmza

Üye Dr. Öğr. Üyesi Pınar ÇAM İCİK
Sinop Üniversitesi / Fen-Edebiyat Fakültesi


İmza

Üye Dr. Öğr. Üyesi Volkan GÜL
Bayburt Üniversitesi / Uygulamalı Bilimler Fakültesi


İmza

ETİK BEYANI

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım tez çalışmasında; tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı, bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Ufkun Sarısoy

SOYA (*Glycine max* L.) YAPRAKLARINDA ALIŞTIRMA YOLU İLE TUZLULUK TOLERANSINI ARTTIRMADA *NPR1* BAĞIMLI SA'NIN ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

NPR1, salisilik asit (SA) sinyal yoluna ait düzenleyici bir gendir ve ayrıntılı mekanizması tam olarak çözülememiőtir. Bu çalışmada, *NPR1*-bağlı SA düzeyindeki deĐiőimin alıştırma yolu ile soya yapraklarının tuz toleransını arttırması üzerindeki etkisi araőtırılmıőtır. Bu amaçla tuza duyarlı ('SA88') ve tuza toleranslı ('Erensoy') soya bitkilerine (*Glycine max* L.) artan NaCl konsantrasyonları (25, 50, 75 ve 100 mM; alıştırılmış) ve 100 mM NaCl (alıştırılmamış) uygulanmıőtır. Sonuçta alıştırma uygulamasının, duyarlı bir kùltivar olan SA88'de süperoksit anyonu savurma kapasitesini arttırdığı ve hidrojen peroksit (H₂O₂) ile malondialdehit (MDA) miktarını da azaltarak tuza bağlı hasarı hafiflettiği belirlenmiştir. Bununla birlikte alıştırma uygulaması, SA88 kùltivarında APX, KAT ve GST enzimlerinin aktivitesinde artışa neden olurken en yüksek artışın GST enziminde olduğu tespit edilmiştir. Dahası her iki kùltivarın *Gmnp1* gen ifadesi tüm uygulamalarda artmıştır ancak en belirgin artışın tuz uygulanan gruplarda olduğu görùlmüőtür. Bunun yanı sıra SA88'in alıştırma uygulamasının, içsel SA düzeyinde artış olduğu görùlmüőtür. Sonuç olarak bu çalışmada ilk defa alıştırma uygulamasının stres esnasında duyarlı soya bitkisinde tuz toleransının arttırılmasında etkili olduğu ve bunun ROT'un uyardığı *NPR1*'den bağımsız SA birikimi ile gerçekteőtiĐi belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: alıştırma, *NPR1*, tuz stresi, salisilik asit, soya bitkisi

THE INVESTIGATION OF THE ROLE OF *NPR1*-DEPENDENT SALICYLIC ACID WITH INCREASING SALINITY TOLERANCE IN ACCUMULATED SOYBEAN LEAVES

ABSTRACT

Non-expressor of Pathogen Related 1 (NPR1) is a regulatory gene of the salicylic acid (SA) signaling pathway, the detailed mechanism of which is still not well understood. This study investigated the effects of *NPR1*-dependent SA level change on increasing salt tolerance of soybean leaves with acclimation. Salt-sensitive ('SA88') and salt-tolerant ('Erensoy') soybean (*Glycine max* L.) plants were treated with increasing NaCl concentrations (25, 50, 75 and 100 mM; acclimation) and with 100 mM NaCl directly (non-acclimation) in two groups. The results showed that acclimation treatment alleviated salt induced damage in the sensitive cultivar with increasing superoxide anion radical scavenging activity and decreasing hydrogen peroxide (H₂O₂) and malondialdehyde (MDA) content. However, the APX, CAT, and GST enzyme activities were increased by acclimation treatment, with the highest increase observed in GST enzymes. Interestingly, the *Gmnpr1* gene expression was upregulated in all treatments but was more pronounced in non-acclimation. Furthermore, endogenous SA level was increase under acclimation treatment in 'SA88'. In conclusion, the results firstly showed that an acclimation process is useful for increasing salt tolerance in sensitive soybean plants with only ROS-induced *NPR1*-independent SA accumulation but not through the *NPR1*-dependent SA signaling pathway.

Keywords: acclimation, *NPR1*, salt stress, salicylic acid, soybean

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sırasında kıymetli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösterici ve destek olan değerli danışman hocam sayın Doç. Dr. Burcu SEÇKİN DİNLER (Sinop Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Anabilim Dalı)'e, bilgisini ve önerilerini göstermekten kaçınmayan ayrıca cihaz temini konusunda yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Dr. Emire ELMAS (Sinop Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Anabilim Dalı)'a, çalışmalarım esnasında yardımını esirgemeyen sevgili Eda TAŞCI'ya, hayatım boyunca her zaman yanımda olan maddi ve manevi açıdan beni her şekilde destekleyen ve bu günlere gelmemde büyük pay sahibi olan aileme ve tüm dostlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ufkun Sarısoy

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SEMBOLLER ve KISALTMALAR LİSTESİ.....	vii
ŞEKİLLER ve ÇİZELGELER LİSTESİ.....	xi
1.GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	4
3. MATERYAL ve METOD.....	13
3.1. Bitki Materyali ve Deneme Düzenegi.....	13
3.2.1. Uzunluk Ölçümü.....	13
3.2. Büyüme Parametreleri.....	13
3.2.2. Yaş ve Kuru Ağırlık Ölçümü.....	14
3.2.3. Bağlı Su İçeriği.....	14
3.3. Stoma İletkenliği.....	14
3.4. Klorofil İçeriği.....	14
3.5. Prolin Miktarı.....	15
3.6. Lipid Peroksidasyonu (MDA).....	15
3.7. Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂) Miktarı.....	15
3.8. Antioksidan Enzim ve İzoenzim Aktiviteleri.....	16
3.8.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim ve İzoenzim Aktivitesi.....	16
3.8.2. Peroksidaz (POD) Enzim ve İzoenzim Aktivitesi.....	17
3.8.3. Askorbat Peroksidaz (APX) Enzim ve İzoenzim Aktivitesi.....	17
3.8.4. Glutasyon s-Transferaz (GST) Enzim ve İzoenzim Aktivitesi.....	18
3.8.5. Katalaz (KAT) Enzim ve İzoenzim Aktivitesi.....	18
3.9. Süperoksit Anyonu Savurma Aktivitesi.....	19
3.10. SA Hormon Düzeyi.....	19

3.11. <i>Gmnpr1</i> Gen İfadesi.....	19
3.12. İstatistik Analizler.....	20
4. BULGULAR.....	21
4.1. Büyüme Parametrelerinin Sonuçları.....	21
4.1.1. Uzunluk, Yaş ve Kuru Ağırlık Ölçümü.....	21
4.2. Bağlı Su İçeriği, Stoma İletkenliği ve Klorofil İçeriği.....	22
4.3. Prolin Miktarı.....	23
4.4. Lipid Peroksidasyonu (MDA).....	24
4.5. Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂) Miktarı.....	25
4.6. Antioksidan Enzim ve İzoenzim Aktiviteleri.....	26
4.6.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim ve İzoenzim Aktivitesi.....	26
4.6.2. Peroksidaz (POD) Enzimve İzoenzim Aktivitesi.....	28
4.6.3. Askorbat Peroksidaz (APX) Enzim ve İzoenzim Aktivitesi.....	30
4.6.4. Glutasyon s-Transferaz (GST) Enzimve İzoenzimAktivitesi.....	32
4.6.5. Katalaz (KAT) Enzim ve İzoenzim Aktivitesi.....	34
4.7. Süperoksit Anyonu Savurma Aktivitesi.....	36
4.8. SA Hormon Düzeyi.....	37
4.9. <i>Gmnpr1</i> Gen İfadesi.....	38
5. TARTIŞMA.....	39
5.1. Büyüme Parametreleri.....	39
5.2. Prolin Miktarı.....	41
5.3. Lipid Peroksidasyonu (MDA).....	42
5.4. Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂) Miktarı.....	43
5.5. Antioksidan Enzim ve İzoenzim Aktiviteleri.....	44
5.5.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim ve İzoenzimAktivitesi.....	44
5.5.2. Peroksidaz (POD) Enzimve İzoenzim Aktivitesi.....	45
5.5.3. Askorbat Peroksidaz (APX) Enzim ve İzoenzim Aktivitesi.....	46
5.5.4. Glutasyon s-Transferaz (GST) Enzim ve İzoenzim Aktivitesi.....	47

5.5.5. Katalaz (KAT) Enzim ve İzoenzim Aktivitesi.....	48
5.6. Süperoksit Anyonu Savurma Aktivitesi.....	49
5.7. SA Hormon Düzeyi.....	50
5.8. <i>Gmnpr1</i> Gen İfadesi.....	51
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	52
KAYNAKLAR.....	53
ÖZGEÇMİŞ.....	72



SEMBOLLER VE KISALTMALAR LİSTESİ

SEMBOLLER

%	Yüzde
B	Beta
μmol	Mikromolar
ϵ	Ekstraksiyon Katsayısı
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat Derece
$^1\text{O}_2$	Singlet Oksijen
Cm	Santimetre
CO_2	Karbondiyoksit
dH ₂ O	Deiyonize Su
dk	Dakika
gr	Gram
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
L	Litre
mA	Miliamper
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
mmol	Milimol
nm	Nanometre
O ₂	Oksijen
O ₂ ⁻	Süperoksit Radikali
OH ⁻	Hidroksil Radikali

pg	Pikogram
rpm	Dakikada Devir Sayısı
SC-1	Stoma Ölçer
UV	Ultraviyole



KISALTMALAR

APX	Askorbat Peroksidaz
ATP	Adenozin Trifosfat
BATEM	Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü
BSİ	Bağıl Su İçeriği
CDNB	1-kloro-2,4-dinitrobenzen
DAB	3,3'-Diaminobenzidin Tetrahidrokloroid
DHAR	Dehidroaskorbat Redüktaz
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
EC	Enzim Numaraları
EDTA	Etil Diaminotetra Asetikasit
GPX	Glutasyon Peroksidaz
GRXC9	Glutaredoksin C9
GSH	Glutasyon
GSNO	S- Nitroglutasyon
GSSH	Okside Glutasyon
GST	Glutasyon s-transferaz
HPLC	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
KA	Kuru Ağırlık
KAT	Katalaz
MDA	Malondialdehid
MDAR	Monodehidroaskorbat Redüktaz

MeSA	Metil Salisilik Asit
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NBT	Nitro Blue Tetrazolium
<i>NPR1</i>	Patojenle İlgili Olmayan Gen 1
PAGE	Poliakrilamit Jel Elektroforez
PAL	Fenilalanin Amino Liyaz
POD	Peroksidaz
<i>PR</i>	Patojenle İlgili Gen
PVPP	Polivinil Polipirrolidin
RNA	Ribo Nükleik Asit
ROT	Reaktif Oksijen Türleri
SA	Salisilik Asit
SAGT	Salisilik Asit Glikozil Transferaz
SAR	Sistemik Kazanılmış Direnç
SGE	Salisioil Glukoz Esteri
SOD	Süperoksit Dismutaz
TA	Turgorlu Ağırlık
TBA	Tiobarbutrik Asit
TCA	Trikloroasetik Asit
TGA	Transkripsiyon Faktör
<i>TRXh</i>	Tiredoksin H
YA	Yaş Ağırlık

ŞEKİLLER VE ÇİZELGELER LİSTESİ

ŞEKİLLER

Sayfa

Şekil 2.1. ROT ile ilgili enzim ve antioksidanlar (Gechev ve ark., 2006).....	5
Şekil 2.2. SA ve SAR arasındaki ilişki (Teaching Tools in Plant Biology)'den.....	6
değiştirilerek	
Şekil 2.3. SA biyosentez yolu (Dempsey ve ark., 2011)'den değiştirilerek.....	8
Şekil 2.4. SA metabolizması, taşınması ve biyotik-abiyotik stresler.....	9
esnasında sinyal iletimi (Jayakannan ve ark., 2015)'den değiştirilerek	
Şekil 2.5. MeSA ve SAR arasındaki ilişki (Teaching Tools in Plant Biology)'den.....	10
değiştirilerek	
Şekil 2.6. SA ve <i>NPR1</i> , <i>NPR3</i> ve <i>NPR4</i> arasındaki bağlantı.....	10
(Moreau ve ark., 2012)'den değiştirilerek	
Şekil 2.7. <i>NPR1</i> , TGA ve Tioredoksin arasındaki bağlantı.....	11
(Zhou ve ark., 2015)'den değiştirilerek	
Şekil 3.1. Bitkilerin hasat sonrası genel görünümü.....	13
Şekil 4.1. İki farklı soya kültürüne (SA88, Erensoy) yapılan alıştırma ve.....	23
tuz uygulaması sonucunda prolin miktarında ($\mu\text{mol/g}^{-1}$ YA) gözlenen değişimler	
Şekil 4.2. İki farklı soya kültürüne (SA88, Erensoy) yapılan alıştırma ve.....	24
tuz uygulaması sonucunda malondialdehid (MDA)miktarında (nmol/g^{-1} YA)	
gözlenen değişimler	
Şekil 4.3. İki farklı soya kültürüne (SA88, Erensoy) yapılan alıştırma ve.....	25
tuz uygulaması sonucunda hidrojen peroksit (H_2O_2) miktarında ($\mu\text{mol/g}^{-1}$ YA)	
gözlenen değişimler	

Şekil 4.4. İki farklı soya kültürüne (SA88, Erensoy) yapılan alıştırma ve.....	26
tuz uygulaması sonucunda SOD enzim aktivitesinde (ünite mg^{-1} protein) gözlenen	
değişimler	
Şekil 4.5. İki farklı soya kültürüne (SA88, Erensoy) yapılan alıştırma ve.....	27
tuz uygulaması sonucunda SOD izoenzim aktivitesinde (ünite mg^{-1} protein) gözlenen	
değişimler	
Şekil 4.6. İki farklı soya kültürüne (SA88, Erensoy) yapılan alıştırma ve.....	28
tuz uygulaması sonucunda POD enzim aktivitesinde (ünite mg^{-1} protein) gözlenen	
değişimler	
Şekil 4.7. İki farklı soya kültürüne (SA88, Erensoy) yapılan alıştırma ve.....	29
tuz uygulaması sonucunda POD izoenzim aktivitesinde (ünite mg^{-1} protein) gözlenen	
değişimler	
Şekil 4.8. İki farklı soya kültürüne (SA88, Erensoy) yapılan alıştırma ve.....	30
tuz uygulaması sonucunda APX enzim aktivitesinde (ünite mg^{-1} protein) gözlenen	
değişimler	
Şekil 4.9. İki farklı soya kültürüne (SA88, Erensoy) yapılan alıştırma ve.....	31
tuz uygulaması sonucunda APX izoenzim aktivitesinde (ünite mg^{-1} protein) gözlenen	
değişimler	
Şekil 4.10. İki farklı soya kültürüne (SA88, Erensoy) yapılan alıştırma ve.....	32
tuz uygulaması sonucunda GST enzim aktivitesinde (ünite mg^{-1} protein) gözlenen	
değişimler	
Şekil 4.11. İki farklı soya kültürüne (SA88, Erensoy) yapılan alıştırma ve.....	33
tuz uygulaması sonucunda GST izoenzim aktivitesinde (ünite mg^{-1} protein) gözlenen	
değişimler	

Şekil 4.12. İki farklı soya kültürüne (SA88, Erensoy) yapılan alıştırma ve.....	34
tuz uygulaması sonucunda KAT enzim aktivitesinde (ünite mg^{-1} protein) gözlenen	
değişimler	
Şekil 4.13. İki farklı soya kültürüne (SA88, Erensoy) yapılan alıştırma ve.....	35
tuz uygulaması sonucunda KAT izoenzim aktivitesinde (ünite mg^{-1} protein) gözlenen	
değişimler	
Şekil 4.14. İki farklı soya kültürüne (SA88, Erensoy) yapılan alıştırma ve.....	36
tuz uygulaması sonucunda süperoksit anyonu savurma kapasitesinde(%) gözlenen	
değişimler	
Şekil 4.15. İki farklı soya kültürüne (SA88, Erensoy) yapılan alıştırma ve.....	37
tuz uygulaması sonucunda içsel salisilik asit (pg mg^{-1} YA) miktarında gözlenen	
değişimler	
Şekil 4.16. İki farklı soya kültürüne (SA88, Erensoy) yapılan alıştırma ve.....	38
tuz uygulaması sonucunda <i>Gmnp1</i> gen ifadesinde gözlenen değişimler	

ÇİZELGELER

Sayfa

Çizelge 4.1. İki farklı soya (SA88, Erensoy) kùltivarına ait büyüme parametreleri.....	21
Çizelge 4.2. İki farklı soya (SA88, Erensoy) kùltivarına ait stoma iletkenliğı, bağıl.....	22
su içeriğı ve total klorofil içeriğindeki değışimler	



1.GİRİŞ

Tuzluluk dünya genelinde ürün kaybına neden olan önemli stres faktörlerinden birisidir (Yıldız ve ark., 2010). Tarım arazilerinde meydana gelen tuzluluk, toprağın yapısını bozarak tarımsal ürünlerin verim ve kalitesinde azalmaya neden olmaktadır (Yılmaz ve ark., 2011). Yüksek tuzluluk bitkilerde çeşitli fizyolojik bozukluklara neden olmakta ve stres seviyesine bağlı olarak bitki gelişimini etkilemektedir (Kranner ve Seal, 2013; Hossain ve ark., 2015).

Tuzluluk; iyonik, ozmotik ve oksidatif ile besin dengesizliği gibi farklı sekonder streslerin oluşumunda rol oynamaktadır (Türkan ve Demiral, 2009). Tuz stresine maruz kalan bitkilerde iyonik dengenin sağlanması canlılığın devamı için gerekmektedir (Borsani ve ark., 2003). Topraktaki tuz miktarının artması, bitkinin su elde etme kapasitesini azaltarak, köklerden çok miktarda Na^+ ve Cl^- iyonunun alınmasına neden olmaktadır. Bunun sonucunda büyüme ile fotosentez olumsuz etkilenmekte ve metabolik süreçler bozulmaktadır (Flowers ve ark., 1995). Na^+ ve Na^+/K^+ oranının fazla olması çeşitli metabolik olayları engelleyebilmektedir. Ayrıca sitozolde Na^+ miktarının aşırı artışı, protein sentezinde çeşitli aksaklıklara neden olabilmektedir (Parvaiz ve ark., 2008).

Bitkiler ozmotik strese maruz kaldıklarında; moleküler ve hücresel düzeylerde çeşitli tepkiler sergilemektedir (Hasegawa ve ark., 2000). Bunlar arasında, morfolojik ve gelişimsel değişiklikler (yaşam döngüsü, sürgün büyümesinin engellenmesi ve kök büyümesinin arttırılması), iyon taşınımının ayarlanması (iyonların alınması ve tutulması gibi) ve metabolik değişiklikler (karbon metabolizması, uyumlu bileşiklerin sentezi) gibi tepkiler yer almaktadır (Xiong ve Zhu, 2002). Ayrıca ozmotik dengenin ayarlanması, stres altındaki bitkilerin büyümesinde önemli rol oynamaktadır (Osakabe ve ark., 2013). Ozmotik dengenin sağlanması için sentezlenen ozmolitler, hücresel yapıları korumaktadırlar (Ashraf ve ark., 2004; Munns ve ark., 2006).

Yüksek derecede oksitleyici metabolik aktiviteye sahip olan ROT; kloroplast, mitokondri ve peroksizom gibi elektron akışı yüksek olan organeller tarafından oluşturulmaktadır (Gill ve Tuteja, 2010).

ROT'lar hücrel büyüme ve gelişmenin yanı sıra fizyolojik süreçlerdeki adaptasyonlarda kilit rol alan önemli sinyal molekülleridir. Ayrıca hücrede membran lipidlerine, nükleik asitlere, proteinlere, klorofillere ve diğer makromoleküllere zarar vermektedir (Koca ve ark., 2007; Yaşar ve ark., 2008).

Tuz stresinin yanı sıra bitkiler virüs, bakteri, protozoa, nematod, fungus gibi çeşitli patojenik organizmaların olumsuz etkilerine de maruz kalmaktadırlar. Bitkiler biyotik streten kendilerini koruyabilmek için bir savunma mekanizması geliştirmişlerdir (Koç ve Üstün, 2008). Sistemik kazanılmış direnç (SAR) bitkinin biyotik strese karşı geliştirmiş olduğu bir savunma mekanizmasıdır (Shah, 2009). SAR, bitkide uzun süreli dayanıklılığı sağlamakta ve geniş spektrumlu olduğundan virüs, bakteri ve mantar gibi patojenlere karşı bağışıklık kazandırmaktadır. Bunun yanında patojen bulaşmış ve bulaşmamış organlar arasında iletişim kurmakta ve bağışıklığı yaymak için içsel salisilik asit miktarını arttırmaktadır (Vlot ve ark., 2009; Shah ve ark., 2014; Lu ve ark., 2016; Kuai ve Despres, 2016).

Bitki hormonları, hastalığa karşı direnç sağlamak amacıyla sinyal molekülü olarak görev almaktadırlar (Lu ve ark., 2016). Salisilik asit; bitkilerde birçok metabolik ve fizyolojik cevabı oluşturan içsel bir hormondur (Hayat ve ark., 2010). Kimyasal yapısı; bir hidroksil grubu ya da türevi taşıyan aromatik halkaya sahip ve fenolik bileşikler grubuna dahil bir yapı olarak tanımlanmaktadır (An ve Mou, 2011). SA; fotosentez mekanizmasını, azot metabolizmasını, glisin betain üretimini, su içeriğini ve antioksidan savunma sistemlerini düzenleyerek koruma sağlamaktadır (Nazar ve ark.,2011; Miura ve Tada, 2014; Khan ve ark., 2014). Salisilik asit uyarımının artması sonucunda transkripsiyon faktörleri aktif hale gelmekte ve salisilik aside duyarlı savunma ile ilişkili genlerin ifadesi artmaktadır.

Bitkiler patojen algılayan moleküllerle, enfeksiyonu tanıyıp hastalığa karşı direnç proteinlerini (*PR*) aktifleştirmektedirler (Martin ve ark., 2003). *NPR1* 'in salisilik asit aracılığıyla uyarılabilen savunma genlerini düzenlediği ve bitki bağışıklığında görev aldığı bilinmektedir (Pieterse ve ark., 2012; Vidhyasekaran, 2015).

Soya bitkisi tek yıllık olup, bitkisel yağ üretim ve tüketiminde yer alan önemli bir bitkidir. Soya'nın tarımı 5000 yıl öncesine dayanmaktadır. Çin, Kore ve Mançurya'da temel besin maddesi olarak kullanılmaktadır. Batı ülkelerinde ise 20. yüzyılda önem kazanmaya başlamıştır (Acar ve Üstün, 2010). Ayrıca insan ve hayvan beslenmesindeki önemi büyüktür. Havada bulunan serbest azotu, köklerinde yaşayan *Rhizobium bredy japonicum* bakterisi sayesinde toprağa bağlayabilmektedir. Bu sayede hem kendisinden sonra toprağa ekilecek bitkiye azotça zengin bir alan bırakmakta, hem de kendi ihtiyacı olan azotu karşılamaktadır (Arioğlu, 2013). Tuzluluk stresi soya bitkisinin verimliliğini önemli ölçüde sınırlandırmaktadır ve tuzluluğun negatif etkileri sonucunda büyüme, nodulasyon, tarımsal özellikler, tohum kalitesi ve miktarı azalmaktadır (Phang ve ark., 2008).

Yukarıdaki bilgiler doğrultusunda araştırmamızda, soya bitkisine alıştırma yoluyla uygulanan tuz stresinin, tuzluluğa karşı tolerans sağlamadaki önemi ve içsel hormonlardan salisilik asidin stres esnasında *NPR1*'e bağımlı ya da bağımsız olarak hareket edip etmediğinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu nedenle iki farklı soya kültivarının bir kısmına kademeli olarak artan tuz konsantrasyonu diğer bir kısmına da tuz uygulaması yapılarak, içsel salisilik asit düzeylerindeki ve diğer biyokimyasal süreçlerdeki değişimler incelenmiştir. Bu sayede ilk defa alıştırma yapılan bitkilerde içsel salisilik asit miktarının ve *NPR1* gen ifadesinin tuzluluk stresine karşı dayanıklılık sağlamadaki rolünün ve ROT-*NPR1* arasındaki ilişkinin tespit edilmesi amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

Abiyotik stres faktörlerinden biri olan tuzluluk, tarım yapılan toprakları olumsuz etkilemektedir. Ayrıca bu topraklarda yetişen bitkilerde pek çok metabolik bozukluklara neden olmaktadır (Munns, 2000; Ekmekçi ve ark., 2005). Artan tuzluluk miktarı bitkide ozmotik stres, iyonik stres, oksidatif hasar, beslenme ve hormonal dengesizlik gibi çeşitli etkilere neden olmaktadır (Hasanuzzaman ve ark., 2012). İyonik stres; kök plazma membran bütünlüğünün bozulmasına, gerekli iyon alımının sınırlandırılmasına ve çok sayıda metabolik aktivitede hasara yol açmaktadır (Janda ve ark., 2016). Buna ek olarak bitkiler ozmotik stresin neden olduğu su kaybını azaltmaya çalışmaktadırlar. Ayrıca oksidatif hasar bitkide aşırı ROT üretimine neden olur ve bunun sonucunda hücre ölümü gerçekleşir (Sharma ve ark., 2012). Tuzluluk stresi bitkilerde reaktif oksijen türlerini (ROT) oluşturmakta ve ROT'ların zararlı etkilerinde antioksidan enzim sistemleri tarafından azaltılmaktadır (Yıldız ve ark., 2010). Hücrel ROT konsantrasyonunun artması durumunda antioksidan savunma sistemleri ve ROT arasındaki denge düzeni bozulmaktadır. ROT'lar; zarda lipid peroksidasyonuna, enzim inhibisyonuna, protein oksidasyonuna, klorofil parçalanmasına, DNA ile RNA'da hasara ve hücre ölümüne neden olurlar (Mittler, 2002). Ayrıca hormonal sinyal üretiminde, hücre duvarı polimer yapısının değişiminde, çevreyi algılayan mekanizmada, gen ifadesinde, metabolik ve fizyolojik düzenlemede çeşitli fonksiyonlara sahip olmaları nedeniyle "oksidatif sinyal molekülü" olarak görev almaktadırlar (Swanson ve Gilroy, 2010).

ROT'lar bitki hücrelerinin farklı bölümlerinde sentezlenmektedir. Kloroplastlar, ROT'ların en önemli kaynağını oluşturur ve pigmentlerin yüksek enerjili uyarımı ile elektron akışı esnasında O₂'nin indirgenmesi sonucu sentezlenir (Galvez-Valdivieso ve Mullineaux, 2010). Mitokondride; elektron taşıma sisteminde yer alan kompleksler tarafından sentezlenir ve sentezlenme düzeyi dışsal uyarımlara bağlı olarak artar (Blokhina ve Fagerstedt, 2010).

Peroksizom ise ROT'ların sentezlendiği diğer bir organel olup, burada ksantin oksidaz, glikolat oksidaz ve yağ asidi oksidasyon enzimleri tarafından sentezlenir (Mittler, 2002). Bitkilerin tuz stresine karşı tolerans sağlayabilmesi için, oksidatif hasarın azaltılması gerekmektedir.

Bu yüzden bitkiler, ROT'ların sentezlenmesini engellemek için çeşitli koruma yöntemleri geliştirmişlerdir. Bu yöntemler: 1) Yaprak hareketleri ve kıvrılma gibi anatomik adaptasyonlar 2) C4 ve CAM metabolizması gibi fizyolojik adaptasyonlar 3) Fotosentetik aparat ve anten sistemlerinin yeniden düzenlenmesi ile fotosentezin baskılanmasını içeren moleküler mekanizmalar 4) Alternatif oksidazların sentezidir (Mittler, 2002). Bunun haricinde bitkiler ROT tarafından başlatılan hasarı azaltmak için korumaya yardımcı olacak enzimatik ve enzimatik olmayan savunma mekanizmalarını geliştirmişlerdir (Sharma ve ark., 2012).

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

hd: hücre duvarı, apo: apoplast, sit: sitosol, klo: kloroplast, kro: kromoplast, ami: amiloplast, mit: mitokondri, er: endoplazmik retikulum, vak: vakuol, per: peroksisom, gli: glioksizom, nuk: nukleus

Şekil 2.1. ROT ile ilgili enzim ve antioksidanlar (Gechev ve ark., 2006)

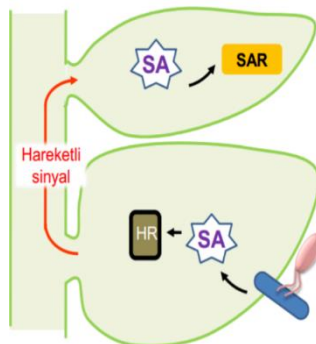
Enzimatik olmayan ve redoks tepkimelerinde görev alanlar; askorbat, glutatyon (GSH), α - tokoferol, karotenoid ve fenolik bileşiklerdir. Enzimatik olanlar ise süperoksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APX), katalaz (KAT), glutatyon redüktaz (GR), peroksidaz (POD), monodehidroaskorbat redüktaz (MDAR), dehidroaskorbat redüktaz (DHAR) ve glutatyon peroksidazdır (GPX) (Mittler ve ark., 2004).

SOD; $O_2^{\cdot-}$ 'yi hızlıca indirgeyerek H_2O_2 ve O_2 'ye dönüştürmektedir (Altınışık, 2000). KAT ile çeşitli peroksidazlar H_2O_2 'nin parçalanmasını katalizlemekte ve KAT kloroplastlarda bulunmamaktadır (Parida ve ark., 2005).

Askorbat-glutasyon döngüsünün ilk adımında askorbat peroksidaz (APX) enzimi, elektron vericisi olarak askorbatı kullanarak H_2O_2 detoksifikasyonunda rol oynamaktadır. Glutasyon peroksidaz (GPX), fenolik bileşikler ya da askorbat gibi substratların oksidasyonu ile H_2O_2 'yi parçalamaktadır. İndirgenmiş glutasyon (GSH) ve yükseltgenmiş glutasyon (GSSH) askorbat havuzunun oluşumundan sorumludur. NADPH'a bağlı GSSH indirgenmesi, sitoplazma, kloroplast ve mitokondrilerde bulunan GR enzimi ile katalizlenmektedir. GR, Halliwell-Asada enzimatik yolunun son adımını katalizlemekte ve kloroplastlarda ki CO_2 fikse edici enzimlerin aktivasyonu ile askorbat üretimi için gerekmektedir (Neto ve ark., 2006).

Çok hücreli organizmalar, çevresel uyarılara sistemik tepkiler verebilmektedir. Bitkiler; patojen saldırıları, yaralanma ve abiyotik stres gibi farklı etmenlere karşı savunma sistemlerini uyarmaktadır (Mittler ve Blumwald, 2015). Bitkilerde enfeksiyon meydana geldiğinde SAR; hem enfekte olmuş hem de enfekte olmamış organlarda aktive olmaktadır (Shah ve Zeier, 2013). SAR; sinyal molekülü olarak salisilik asidi kullanarak *PR* proteinlerinin birikmesinde ve direncin artmasında görev almaktadır (Durang ve Dong, 2004). Yapılan son çalışmalarda bitkilerde abiyotik strese karşı SAR aktivasyonunun gerçekleştiği ve bu aktivasyonunun oluşumunda farklı sinyallerin rol oynadığı belirlenmiştir (Mittler ve Blumwald, 2015).

Salisilik asit çiçeklenme, ısı üretimi, yaşlanma, patojenlere direnç ve çeşitli abiyotik streslere karşı geliştirilen yanıtları düzenleyen bitkisel hormonlardan biridir (Vicente ve Plasencia, 2011).



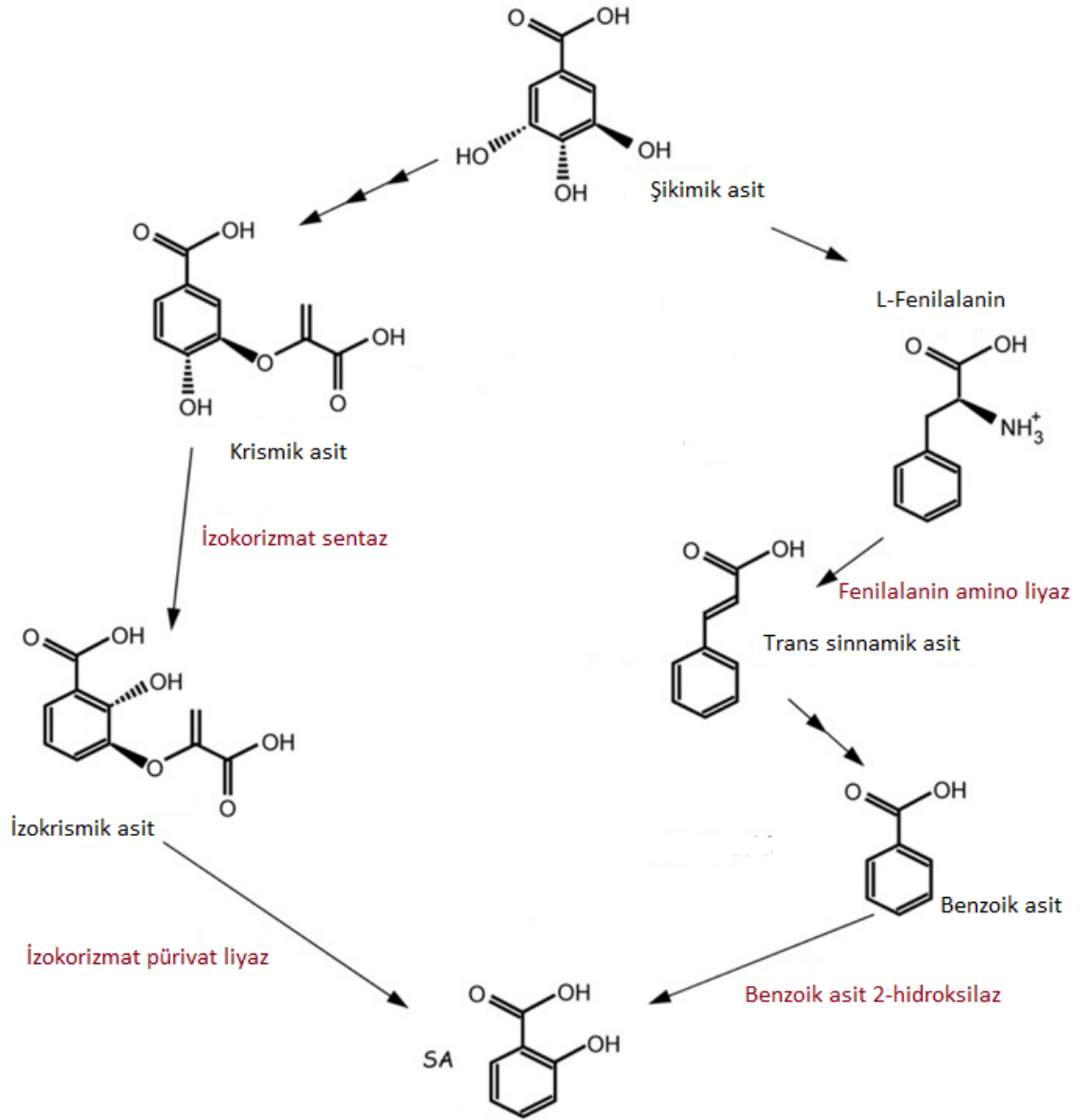
Şekil 2.2. SA ve SAR arasındaki ilişki (Teaching Tools in Plant Biology)

Bitkisel hormonların büyümede, gelişmede ve değişen ortamlara uyum sağlamada önemli rol oynadığı bilinmektedir (Fahad ve ark., 2015). Salisilik asit bitkide en çok patojen saldırısına karşı bağışıklık kazanımında yer almaktadır (Yan ve Dong, 2014). SA, bitkilerde dahil olmak üzere prokaryotik ve ökaryotik organizmaların ürettiği sekonder metabolit ürünlerinden birisidir (An ve Mou, 2011). Latince adını söğüt ağacından alan, fenolik bileşiklerindendir (Janda ve Ruelland, 2015). Eski zamanlarda söğüt ağacı kabuğunun yüksek ateşe ve ağrıya iyi geldiği bulunmuştur. 1828 yılında Johan Andreas Buchner, söğüt ağacı kabuğundan salisilin izole etmeyi başarmıştır. Daha sonra Almanya’da BAYER firmasında araştırmacı kimyager olarak çalışan Felix Hoffman salisilik asidin sentetik türevi olan asetil salisilik asit (aspirin)’i bulmuştur ve dünya da en çok satılan ilaçlar arasında yer almıştır (Vlot ve ark., 2009).

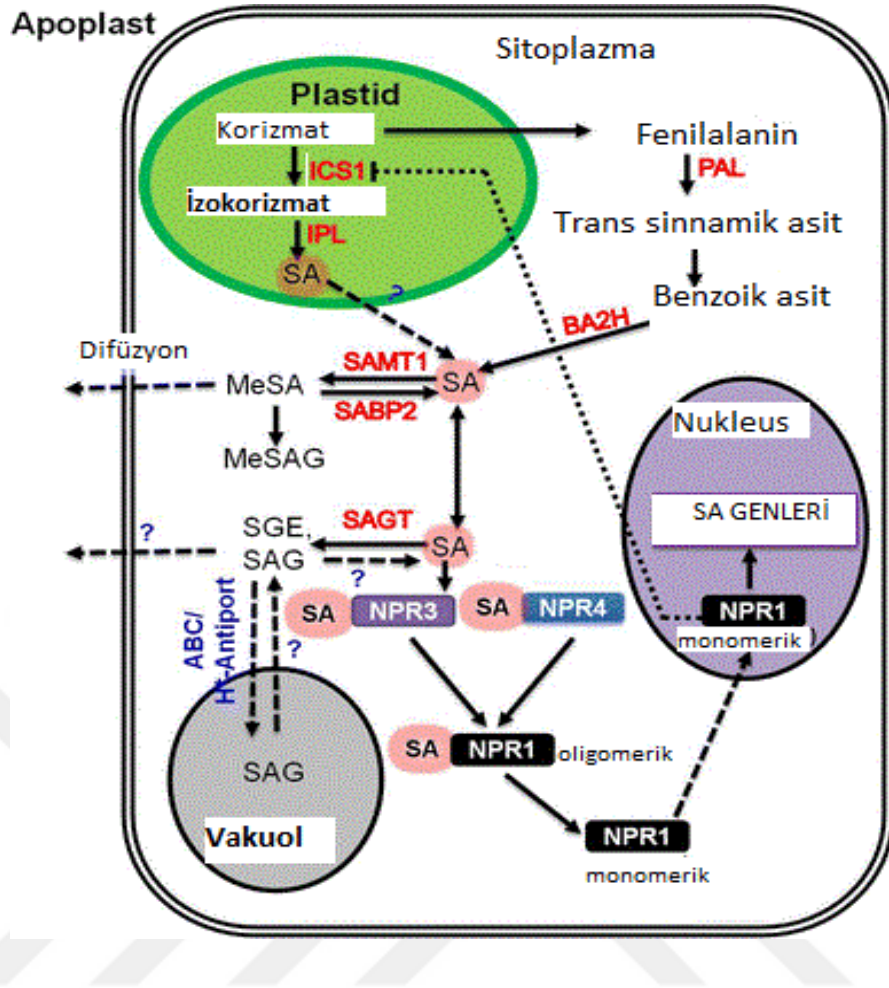
Salisilik asidin tuzluluk ve ozmotik stres dahil olmak üzere farklı abiyotik streslere karşı savunmada önemli rol aldığı bilinmektedir (Borsani ve ark., 2001). *Vicia faba* (Azooz, 2009), *Medicago sativa* (Palma ve ark., 2013) ve *Vigna radiata* (Khan ve ark., 2014) gibi birçok bitkide yapılan çalışmalarda tuzluluk stresine karşı toleransı güçlendirmede salisilik asit mekanizmasının etkili olduğu kanıtlanmıştır. Li ve arkadaşlarının (2014), tuzluluk stresi esnasında *Torreyia grandis* bitkisinde yaptığı çalışmada salisilik asit tarafından uyarılmış tolerans mekanizması sonucunda biyokütle ve klorofil miktarının arttığı bunu takiben antioksidan enzimlerinin oksidatif stresin etkisini azalttığı tespit edilmiştir. Ayrıca tuza maruz bırakılan bitkilerde dışarıdan uygulama yapılan salisilik asidin; fotosentetik kapasiteyi iyileştirdiği, karbonhidrat birikimini ve ATP içeriğini arttırdığı, antioksidan enzim aktivitesini düzenlediği ve Na^+/K^+ oranında değişimlere neden olduğu belirlenmiştir (Horvath ve ark., 2007; Ashraf ve ark., 2010; Hayat ve ark., 2010).

Salisilik asit biyosentezinde iki yol bulunmaktadır: 1) Fenilalanin yolu 2) İzokorizmat yolu. Fenilalanin yolu sitoplazmada gerçekleşmektedir. Bu yol içinde fenilalaninden sonra bir dizi reaksiyon görülmektedir. İlk adımda fenilalanin, fenilalanin amino liyaz (PAL) enzimi ile trans sinnamik aside dönüşmektedir. Daha sonra trans sinnamik asit, benzoik aside çevrilmektedir. Son adımda benzoik asit, benzoik iki hidroksilaz enzimi ile katalizlenerek salisilik asit oluşturulmaktadır (Jayakannan ve ark., 2015). İzokorizmat yolu ise kloroplastlarda gerçekleşmektedir.

İzokorizmat yolunda görev alan iki adet enzim vardır. Bunlar; izokorizmat sentaz ile izokorizmat pürivat liyaz enzimleridir. İzokorizmat sentaz enzimi korizmatı, izokorizmata çevirmektedir. Ardından izokorizmat pürivat liyaz enzimide, izokorizmatı salisilik aside dönüştürmektedir (Jayakannan ve ark., 2015).

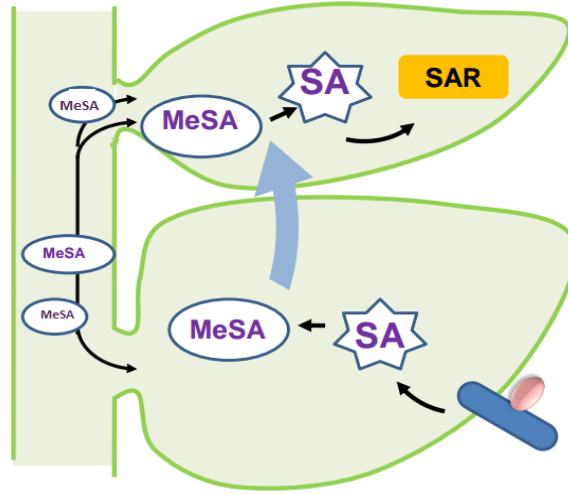


Şekil 2.3. SA biyosentez yolu (Dempsey ve ark., 2011)



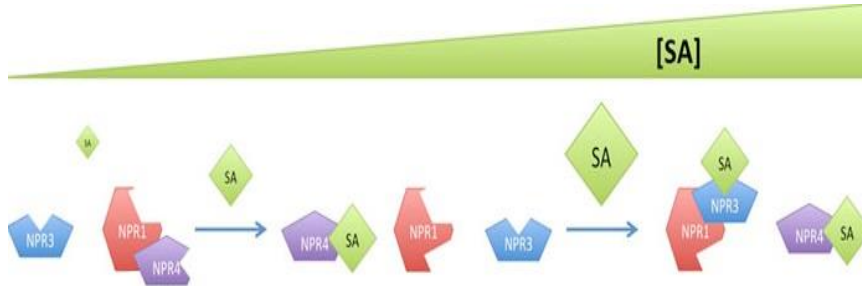
Şekil 2.4. SA metabolizması, taşınması ve biyotik-abiyotik stresler sırasında sinyal iletimi (Jayakannan ve ark., 2015)

Bitkilerde üretilen salisilik asidin çoğu, SA o- β -glukozide (SAG) dönüştürülür. Salisilik asidin SAG'a dönüşümünden sorumlu enzim SA glikozil transferazdır (SAGT). Biri salisilik asiti SAG'a çevirirken, diğeri salisilik asit türeği olan salisioil glukoz ester (SGE) oluşturur. SAG sitozolden vakuole taşınır ve vakuolde salisilik aside geri dönüştürülebilen inaktif depo formu olarak bulunur. Salisilik asit formlarından metil salisilik asidin (MeSA), patojen enfeksiyonu sırasında sistemik ve lokal olarak bitki dokusunda yol aldığı bilinmektedir (Jayakannan ve ark., 2015).



Şekil2.5.MeSA ve SAR arasındaki ilişki (Teaching Tools in Plant Biology)

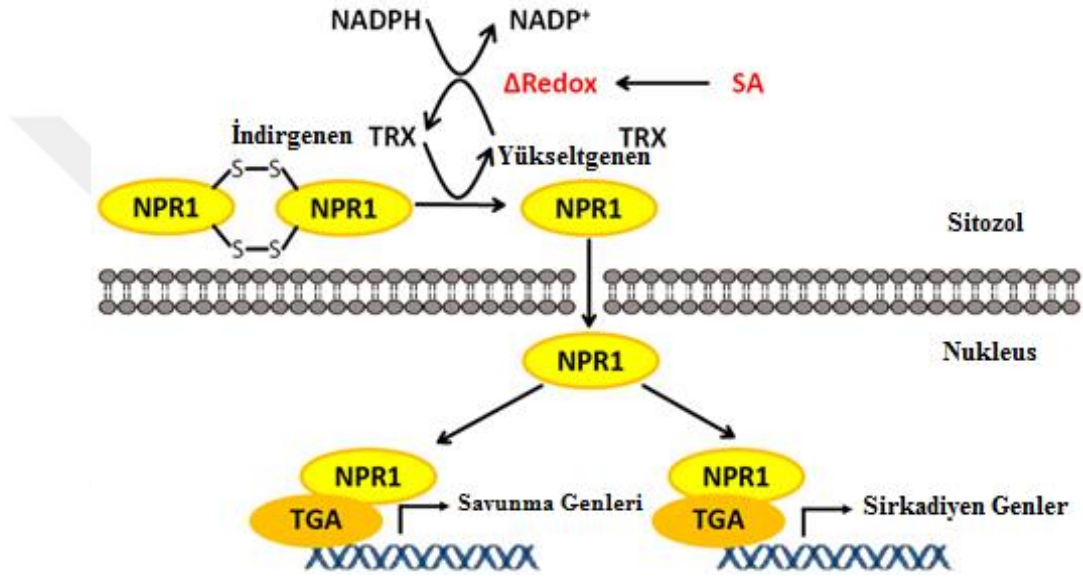
SAR'ın aktive olması sonucunda salisilik asit yanıt olarak *NPR1* genini uyarır ve savunmadan sorumlu genlerin ifadesini başlatmak için çekirdeğe girerek TGA transkripsiyon faktörlerini etkinleştirir (Durrant ve Dong, 2004). *NPR1* ise sitoplazmadan çekirdeğe geçip transkripsiyon faktörleri ile etkileşime giren, SA tarafından uyarılmış savunma genlerinin düzenleyicisidir (Jayakannan ve ark., 2015). *NPR3* ve *NPR4* salisilik asit reseptörleridir ve *NPR1*'in karalılığını düzenleyerek, salisilik aside bağlanmasında görev almaktadırlar (Yan ve Dong, 2014).



Şekil 2.6. SA ve *NPR1*, *NPR3* ve *NPR4* arasındaki bağlantı (Moreau ve ark., 2012)

SA aracılığıyla transkripsiyonel programlamaya katılan *NPR1*, TGA ile etkileşime giren bir aktivatör görevi görmektedir (Seyfferth ve Tsuda, 2014; Yan ve Dong, 2014).

Redoks değişimi nedeni ile monomerik *NPR1* oluşur ve nukleus içindeki birikimi *PR* geninin ifadesini arttırır. Tioeredoksinler, SA tarafından uyarılmış *NPR1*'in, oligomerden monomere dönüşüm reaksiyonunda görev almaktadır. Ayrıca *NPR1*' in oligomerleşmesinin ve monomerleşmesinin, s-nitrotirozin (GSNO) içerdiği belirtilmektedir (Feechan ve ark., 2005; Rusterucci ve ark., 2007; Lindermayr ve ark., 2010).



şekil 2.7. *NPR1*, TGA ve Tioeredoksin arasındaki bağlantı (Zhou ve ark., 2015)

Soya bitkisi (*Glycine max.* L.) tuzluluk stresinden olumsuz yönde etkilenen bitkilerden birisidir. Soya tipik bir glikofittir (Phang ve ark., 2008). İçeriğinde çok sayıda besin maddesi bulunması nedeniyle 250'den fazla değişik yerde kullanılmaktadır. Bu sebeple soya 'sarı altın' ya da 'asrın harika bitkisi' olarak bilinmektedir. Tohumlarında %18-24 oranında yağ, %36-40 oranında da protein bulunmaktadır (Arıoğlu, 2013). Soya bitkisi insan vücudu için gerekli olan 9 amino asidi içermektedir. Ayrıca yapılan araştırmalar sonucunda soya proteinlerinin kandaki kolesterl düşürdüğünü ve kalp hastalıkları riskini azaltabildiği gösterilmiştir. Özellikle soyadan elde edilen sütün bazı hastalıkların tedavisinde yararlı olduğu gözlenmiştir (Acar ve üstün, 2010).

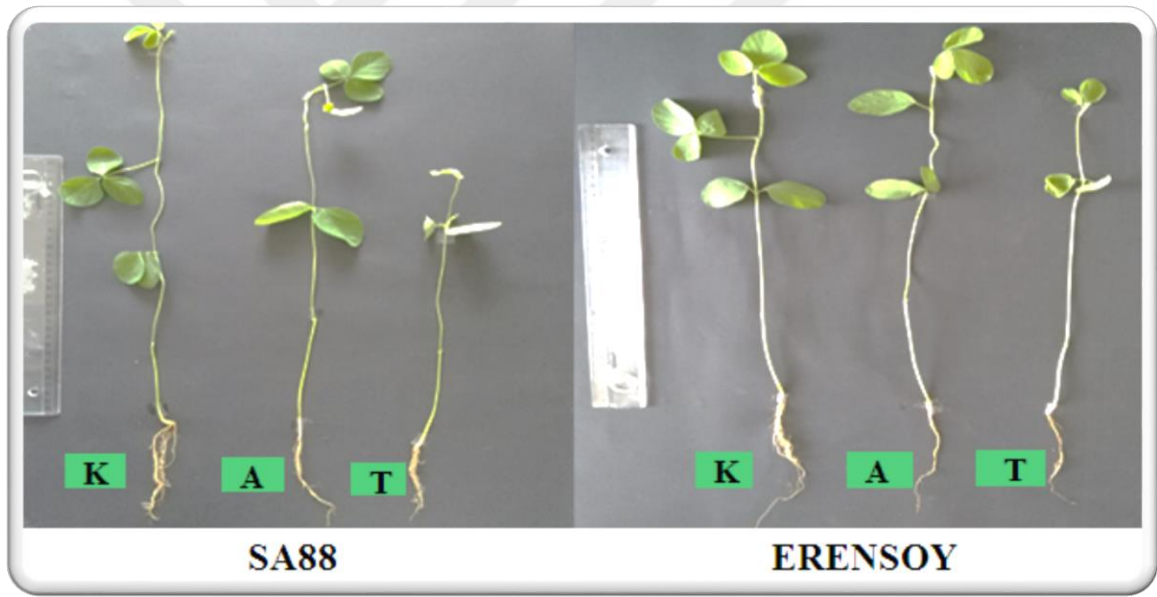
Bunun yanı sıra soya bitkisi pek çok sanayinin ham maddesi olarakta kullanılmaktadır. Soya bitkisinin içerdği özellikler 1980’li yıllarda ABD’de incelenerek, biyodizel yakıt olarakta kullanılabileceği ortaya konulmuştur (Kinney ve Clemente, 2005). Tuzluluk, soya bitkisinin gelişimini engellemektedir (Ghassemi-Golezani ve ark., 2010). Ayrıca tuz stresi altındaki soyada yaprak alanı, bitki boyu, tohum kalitesi ve protein içeriğindeki azalmanın yanı sıra azot sabitleme yeteneği ve bitkinin gelişimi engellenmektedir (Ledesma ve ark., 2016).

Tez konusu olan NPR1 ile ilgili literatür taraması yapıldığında , SA’ya bağlı *NPR1* ile redoks değişimi arasında bir bağlantı olduğu bilinmesine rağmen kontrol mekanizmasının henüz detaylı olarak açıklanamadığı görülmüştür (Dempsey ve ark., 2011). Bu sebeple çalışmamızda, daha önce belirlenmemiş olan tuza alıştırılmış ve alıştırılmamış soya bitkisinde, içsel salisilik asidin strese karşı savunmada nasıl rol aldığı, *NPR1* geninin tuz stresi altında ne derecede etkin olduğu ve ROT-*NPR1* bağlantısının aydınlatılması hedeflenmiştir.

3. MATERYAL ve METOD

3.1. Bitki Materyali ve Deneme Düzeneği

Soya tohumları BATEM ve Agrova şirketinden alınmıştır ve yapılan ön denemeler sonucunda iki farklı soya (*Glycine max* L.) kültivarı (tuza toleranslı Erensoy - tuza duyarlı SA88), belirlenmiştir. Çalışmamızda 3 tekrarlı toprak kültüründe bitki yetiştirilmesi yapılmıştır. Tohumlar toprak ortamında plastik saksılara ekilerek 23°C $\pm$ 1°C'de 5 gün boyunca karanlık ortamda çimlenmeye bırakılmıştır. Çimlenen tohumlar 16 saat aydınlık/8 saat karanlık fotoperiyotta yetiştirilmiştir. Bitkilerin bir kısmına aşamalı olarak artan 2 gün ara ile Hogland çözeltisi içinde çözölmüş NaCl (0, 25, 50, 75 ve 100 mM) uygulaması yapılırken, diğer bir kısmı ise 4 gün boyunca doğrudan 100 mM NaCl'ye maruz bırakılmıştır. Bu sayede bitkiler A (alıştırma yapılan), T (doğrudan tuz uygulanan) olmak üzere iki gruba ayrılmıştır.



Şekil 3.1. Bitkilerin hasat sonrası genel görünümü

3.2. Büyüme Parametreleri

3.2.1. Uzunluk Ölçümü

Her iki kültivarin tüm gruplarından bitki örnekleri alınarak kök ve gövdeleri birbirinden ayrılarak uzunlukları ölçölmüştür.

3.2.2. Yaş ve Kuru Ağırlık Ölçümü

Her grup için 6 tekrarlı yaş ağırlıkları tartıldıktan sonra örnekler 70 °C’de 72 saat bekletilerek kuru ağırlıklarında tartılmıştır.

3.2.3. Bağlı Su İçeriği

Her iki kültürün tüm gruplarından yaprak örnekleri alınarak yaş ağırlıkları ölçülmüştür (Smart ve Bingham, 1974). 6 saat boyunca DIH_2O içinde petrilerde bekletilerek turgorlu hale gelmeleri sağlanmıştır. Daha sonra turgorlu halleri ölçülmüştür. 70°C’de 72 saat bekletilerek kurutulduktan sonra kuru ağırlıkları belirlenmiştir. Bağlı su içerikleri % olarak:

$(\text{YA-KA}) / (\text{TA-KA}) \times 100$ formülüne göre hesaplanmıştır.

3.3. Stoma İletkenliği

Stoma iletkenliği stoma ölçer (SC-I) cihazı yardımı ile 6 tekrarlı olarak her iki kültürün tüm gruplarında ölçülmüştür.

3.4. Klorofil İçeriği

Bitki yapraklarından 100 mg alınmıştır. Örnekler porselen havanda 1-2 ml %80’lik aseton ile yapraktan tüm klorofil alınıncaya kadar homojenize edilmiştir. Daha sonra ekstraktın son hacmi 10 ml olacak şekilde %80’lik asetonla tamamlanmış ve tüp karıştırıcıda çalkalanmıştır. Klorofil a 663, klorofil b 645 nm’de Thermo Scientific Genesys (10S UV-VIS) spektrofotometre yardımı ile ölçülmüştür.

Klorofil a ve klorofil b hesaplamaları Lichtentaler ve Wellburn’a (1983) göre aşağıdaki formüller kullanılarak yapılmıştır.

$$\text{Klorofil a} = 11.75A_{662} - 2.35A_{645}$$

$$\text{Klorofil b} = 18.61A_{645} - 3.96A_{662}$$

3.5. Prolin Miktarı

Serbest prolin miktarı Bates ve arkadaşlarının (1973) saptadığı yöntemle göre belirlenmiştir. Taze bitki materyalinden 0.5 gr tartılmış ve %3 (w/v) 'lük 5 ml sülfosalisilik asit kullanılarak homojenize edilmiştir. Homojenatlar filtre kağıdından süzölmüştür. Elde edilen süpernatanta 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 içerisine sokulmuş ve reaksiyon sonlandırılmıştır. Reaksiyon karışımı 4 ml tolüen ile ekstrakte edilmiş ve 15-20 saniye tüp karıştırıcıda çalkalanmıştır. Tolüen içeren renkli sıvı oda sıcaklığında bekletilmiş ve karışımın tolüen içeren üst fazı 520 nm dalga boyunda spektrofotometrede okunmuştur. Bitki dokularındaki prolin miktarı ($\mu\text{mol/g}$ taze ağırlık) kalibrasyon eğrisi kullanılarak hesaplanmıştır.

3.6. Lipid Peroksidasyonu (MDA)

Lipid peroksidasyonun son ürünü olan MDA miktarı tiobarbitürik asit reaksiyonu kullanılarak Madhavo ve Stresty (2000) yöntemine göre belirlenmiştir. Bunun için her gruptan 0.5 gr yaprak örneği 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 g x 15 dakika santrifüjlenmiştir. Oluşan süpernatantın 532 ve 600 nm'deki absorbans değerleri okunmuştur. Malondialdehid (MDA) konsantrasyonu, ekstinksiyon katsayısı ($155\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) kullanılarak hesaplanmıştır.

3.7. Hidrojen Peroksit (H₂O₂) Miktarı

H₂O₂ miktarı, Velikova ve arkadaşlarının (2000) yöntemine göre belirlenmiştir. Bu yöntemle göre her gruptan alınan 0.1 gr yaprak örneği 5 ml TCA (trikloroasetik asit) ile homojenize edilmiştir. 15 dakika boyunca 12.000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Süpernatant 0.5 ml, buffer (potasyum fosfat 10mM, pH:7) solüsyonu 0.5 ml ve 1 ml KI tampon maddesi ile karıştırılmıştır. Thermo Scientific Genesys (10S UV-VIS) spektrofotometre yardımı ile 390 nm'de absorbans değerleri ölçölmüştür.

3.8. Antioksidan Enzim ve İzoenzim Aktiviteleri

Antioksidan enzimlerin ekstraksiyonu için derin dondurucuda saklanmış olan yapraklardan 0.5 gr yaprak örneği 1 mM EDTA.Na₂ ve %2 polivinil-polipirrolidin (PVPP) içeren 50 mM sodyum fosfat tamponu (pH: 7.8) ile homojenize edilmiştir. Homojenatlar, 12.000 g'da 30 dakika 4°C' de santrifüj edilmiştir. Bu süpernatantlar enzim aktivitesi ölçümlerinde kullanılmıştır. Ekstraksiyon prosedürünün tümü $\pm$ 4°C de gerçekleştirilmiştir. Boyanmış olan jeller ise; Software (4.6.00.0; UVP BioImaging systems, UK) programına göre görüntülenmiştir.

3.8.1. Süperoksit Dismutaz (SOD; EC:1.15.1.1) Enzim ve İzoenzim Aktivitesi

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

3.8.2. Peroksidaz (POD; EC:1.11.1.7) Enzim ve İzoenzim Aktivitesi

POD aktivitesi Herzog ve Fahimi'ye (1973) 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 H₂O₂, dH₂O ve enzim ekstraktından oluşturulmuştur. Reaksiyon H₂O₂'nin ilave edilmesiyle başlatılmış ve 180 sn boyunca absorban artışı izlenmiştir. Spesifik enzim aktivitesi dakikada tüketilen $\mu\text{mol ml}^{-1}$ H₂O₂ olarak ifade edilmiştir. POX izoenzim aktivitesi SeEVERS ve arkadaşlarına (1971) göre yapılmıştır. 75 μg protein içeren örnekler % 10'luk denatüre olmayan akrilamid jelde (PAGE) sabit akım altında (60 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.

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

APX aktivitesinin tayini Nakano ve Asada'ya (1981) 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 ile ifade edilmiştir. Askorbat peroksidaz izoenzim aktivitesi; Mittler ve Zilinkas'ın (1993) 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.

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

Glutasyon s-transferaz aktivitesi Habig ve arkadaşlarının (1974) yöntemine göre belirlenmiştir. Glutasyon s-transferaz, 1-kloro-2.4-dinitrobenzen (CDNB) ile glutasyonun –sh grubu arasındaki tepkimeyi katalizlemiştir. Enzim aktivitesi 340 nm’de GSH ve CDNB kullanılarak dakikada oluşan s-2.4-dinitrofenilglutasyonun 1 mikro molünü katalizleyen enzim miktarının ölçülmesiyle belirlenmiştir. GST aktivitesi, CDNB ekstinksiyon katsayısı ($\epsilon = 9.6 \text{ mmol L}^{-1}\text{cm}^{-1}$) kullanılarak hesaplanmıştır. Laemmli’nin (1970) yöntemine göre %10 native PAGE’de eşit oranda protein yüklenerek yürütme yapılmıştır. GST izoenzim aktivitesi Ricci ve arkadaşlarının (1984) metoduna göre tespit edilmiştir. Daha sonra jel 10 dakika boyunca 0.1 M potasyum fosfat tamponunda (pH 6.5) dengelendi ve 4.5 mM GSH, 1 mM CDNB ve 1 mM nitrobluetetrazolyum içeren reaksiyon karışımına aktararak 37°C 10 dakika bekletilmiştir. Ardından jel oda sıcaklığında 3 mM fenazin metosülfat içeren 0.1 M Tris / HCl (pH 9.6) içinde inkübe edilmiştir. Boyanmış olan jeller; Software (4.6.00.0; UVP BioImaging systems, UK) programına göre görüntülenmiştir. GST aktivitelerinin densiyometrik analizleri için; kontrol grupları %100 olarak alınmış ve elde edilen değerler % olarak gösterilmiştir. Elde edilen veri; birbirinden bağımsız 3 jelin ortalaması alınarak elde oluşturulmuştur.

3.8.5. Katalaz (KAT; EC: 1.11.1.6) Enzim ve İzoenzim Aktivitesi

Katalaz enziminin aktivitesi Bergmeyer’in (1970) metoduna göre gerçekleştirilmiştir. H₂O₂’nin miktarında oluşan azalma; 240 nm’de gösterdiği maksimum absorbanstaki düşüşle belirlenmiştir. 1 ml’lik son hacime sahip kuvartz küvetlerdeki reaksiyon karışımı; 0.1 mM EDTA, 50 mM Na-fosfat tamponu (pH: 7), dH₂O ve %0.3 H₂O₂’den oluşturulmuştur. Reaksiyon boyunca absorbansta oluşan düşüş 180 sn boyunca takip edilmiştir. KAT aktivitesi dakikada harcanan $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ olarak ifade edilmiştir. KAT izoenzim aktivitesi Woodbury ve arkadaşlarının (1971) yöntemine göre belirlenmiştir. İzoenzim ayrımı için %10 separating ve %4 sticking solüsyonları kullanılmış ve sabit akımda (60 mA), 0-4 °C’de jeller yürütülmüştür (Laemli, 1970). Ardından jeller, 5 dakika boyunca %0.01 H₂O₂ içinde inkübe edildikten sonra saf su ile iki kez yıkanmıştır. Daha sonra 14.8 mM demir klorür ve 12.2 mM potasyum ferrisiyanür içeren boya içerisinde 20 dakika bekletilmiştir.

3.9. Süperoksit Anyonu Savurma Kapasitesi

Süperoksit anyonsavurma kapasitesi 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.

3.10. SA Hormon Düzeyi

SA hormon düzeyine Flores ve arkadaşlarının (2011) yöntemine uygun olarak (UHPLC-MS/MS; AGILENT 6064, Belgium) cihazı ile bakılmıştır. Bileşiklerin stok standart çözeltileri (200 ile 300 mg / L arasında değişen konsantrasyonlarda) ayrı ayrı tartılarak hazırlanmıştır.

3.11. *Gmnpr1* Gen İfadesi

Gen ifadesinin kuantatif ölçümü ve istatistiksel analizi Q-Real Time PCR data ile REST software kullanılarak yapılmıştır (Pfaffl ve ark., 2002). *Gmnpr1*'e özgü sonuçlar aşağıdaki primerler kullanılarak elde edilmiştir. Aktin beta geni referans gen olarak kullanılmıştır.

İleri primer:TCAGATGATGTTGAGCTTGTTAAAC-3

Ters primer:ACCAAGTACCTCAGAAACAACCTT

GmActF;GAGCTATGAATTGCCTGATGG

GmActR;CGTTTCATGAATTCCAGTAGC, prob upl 61 (roche)

Primer tasarımı, Acs numarası, gen bankaları tarafından tasarlanmış ve bunun için Genmar laboratuvarından hizmet alımı yapılmıştır.

3.12. 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. Uzunluk, Yaş ve Kuru Ağırlık Ölçümü

İki farklı soya kültivarının (SA88, Erensoy) bir kısmına kademeli olarak artan konsantrasyonlarda Hoagland çözeltisi içinde 0, 25, 50, 75 ve 100 mM NaCl, diğer bir kısmına ise 4 gün boyunca 100 mM NaCl uygulaması yapılmıştır. Uygulamayı takiben 4. gün hasatı yapılmış olan bitkilerin kök-gövde uzunluklarında, yaş ve kuru ağırlıklarında meydana gelen değişimler Çizelge 4.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. İki farklı soya (*Glycine max*) kültivarına ait büyüme parametreleri (uzunluklar cm, ağırlıklar gr)

Kültivarlar		SA 88			ERENSOY		
Gruplar	K	A	T	K	A	T	
Kök U.	14.9±1.6 ^a	11.5±1.1 ^b	10.0±0.5 ^c	10.8 ±1.1 ^a	8.2 ±2.2 ^b	7.7± 0.4 ^c	
Kök Y.A.	0.24±0.09 ^a	0.14±0.02 ^b	0.091±0.06 ^c	0.19± 0.03 ^a	0.16± 0.03 ^b	0.10±0.02 ^c	
Kök K.A.	0.010±0.002 ^a	0.005±0.002 ^b	0.004±0.004 ^c	0.013± 0.003 ^a	0.010± 0.003 ^b	0.007± 0.002 ^c	
Gövde U.	45.83±2.4 ^a	42.5± 1.04 ^b	38.16±1.47 ^c	43.6±4.15 ^a	40.57±3.30 ^b	36.6 ±3.37 ^c	
Gövde Y.A.	1.91±0.22 ^a	1.35± 0.21 ^a	1.23± 0.15 ^a	1.32± 0.24 ^a	1.1 ±0.28 ^a	1.25± 0.16 ^a	
Gövde K.A.	0.14±0.03 ^a	0.13± 0.03 ^a	0.14± 0.03 ^a	0.14± 0.015 ^a	0.13± 0.04 ^a	0.13± 0.01 ^a	

K: Kontrol, **A:** Alıştırma uygulaması, **T:**Tuz uygulaması

Her iki kültivarda yapılan tuz uygulaması sonucunda kontrole kıyasla, alıştırma ve tuz uygulanan grupların kök-gövde uzunluğunda azalma olduğu tespit edilmiştir. SA88 kültivarının alıştırma grubunun, tuz uygulanan gruba kıyasla kök uzunluğu %15 oranında artarken gövde uzunluğunda bu oran %11 olarak belirlenmiştir. Ayrıca Erensoy’un alıştırma grubunun, tuz uygulanan gruba göre kök uzunluğu %6 artarken gövde uzunluğunda bu oranın %10 olduğu belirlenmiştir.

SA88'in alıştırma grubunda, tuz uygulanan gruba kıyasla yaş kök ağırlığı %53 oranında artarken, Erensoy da bu oran %60 olarak belirlenmiştir. Ayrıca her iki kültürün uygulama yapılan gruplarında kök yaşve kuruağırlığı azalmış, gövde de ise belirgin bir değişim olmamıştır.

4.2. Bağlı Su İçeriği, Stoma İletkenliği ve Klorofil İçeriği

Stoma iletkenliği, bağlı su içeriği ve total klorofil içeriği Çizelge 4.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. İki farklı soya (*Glycine max.*) kültürüne ait stoma iletkenliği, BSİ ve total klorofil içeriğindeki değişimler.

Kültivarlar	SA88			ERENSOY		
Gruplar	K	A	T	K	A	T
BSİ (%)	56.55±0.08 ^a	59.96± 0.12 ^b	54.83±0.13 ^b	75.75±0.18 ^a	83.44±0.25 ^b	74.50±0.35 ^a
Stoma (gs)	74.35± 5.90 ^a	93.36± 0.90 ^b	93.36±0.90 ^b	26.22 ± 3.22 ^a	34.35± 3.52 ^b	24.85±4.87 ^a
Tot. klo. (mg)	0.15±0.2 ^a	0.12±0.5 ^b	0.10±0.5 ^b	0.078±0.2 ^a	0.076±0.5 ^a	0.060±0.03 ^b

K: Kontrol, **A:** Alıştırma uygulaması, **T:**Tuz uygulaması

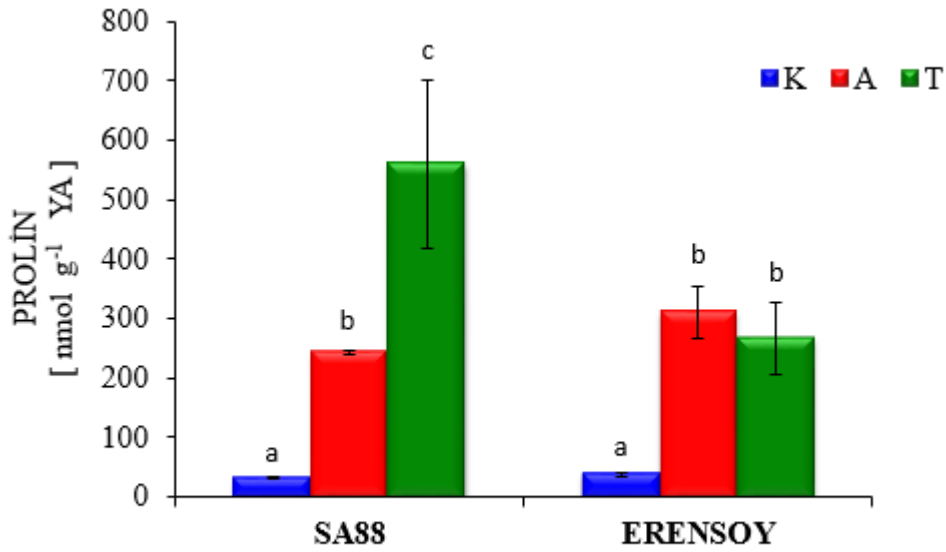
SA88'in bağlı su içeriği alıştırma grubunda, kontrol grubuna kıyasla %6 oranında artarken Erensoy'da ise bu oran %10 olarak belirlenmiştir. Bunun yanı sıra Erensiy'un alıştırma grubunda bağlı su içeriği tuz uygulanan gruba kıyasla %12 oranında artarken SA88'de ise değişmemiştir.

SA88'in stoma iletkenliği alıştırma grubu, kontrol grubuna kıyasla %26 oranında artmıştır. Erensoy çeşidinde ise kontrole göre alıştırma grubunda %31 oranında artış gözlenmiştir. Buna ek olarak toleranslı kültürün alıştırma grubu, tuz uygulanan grubuna kıyasla %38 oranında artarken, duyarlı kültürde belirgin değişim olmamıştır.

Her iki soya kültürünün tuz gruplarındaki total klorofil miktarının kontrol gruplarına kıyasla azaldığı tespit edilmiştir. SA88 kültürünün alıştırma grubunda, tuz uygulanan gruba göre belirgin bir değişim göstermemiştir fakat Erensoy kültüründe ise alıştırma grubu, tuz uygulanan gruba kıyasla %26 artmıştır.

4.3. Prolin Miktarı

Prolin miktarı ile ilgili her iki kültüvara ait veriler Şekil 4.1’de gösterilmiştir.

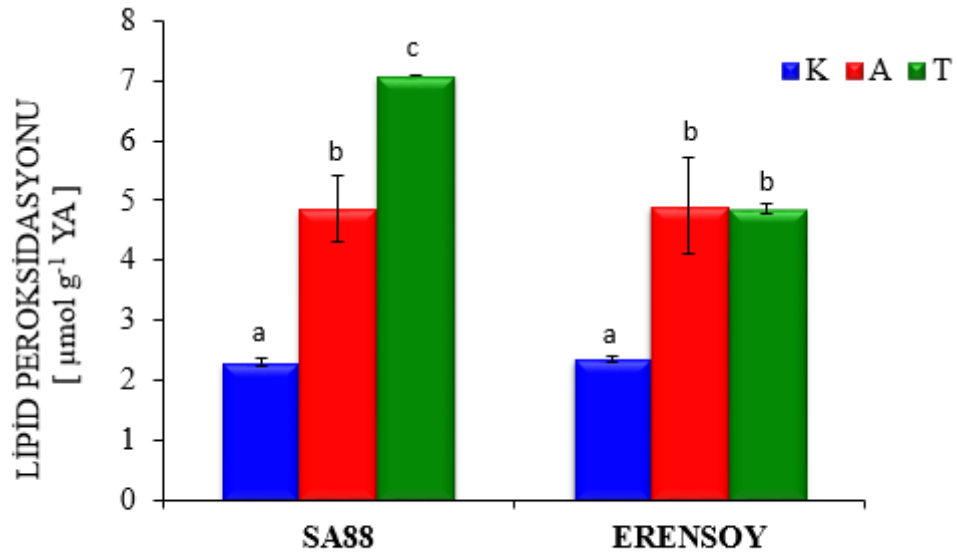


Şekil 4.1. İki farklı soya kültüvarına (SA88, Erensoy) yapılan alıştırma ve tuz uygulaması sonucunda prolin miktarında ($\mu\text{mol/g}^{-1}$ YA) gözlenen değişimler

Prolin miktarı SA88’in alıştırma grubunda, kontrol grubuna göre 7.79 kat artarken tuz uygulanan grupta ise 17.95 kat artmıştır. Bunun yanı sıra SA88’in alıştırma grubu, tuz uygulanan gruba kıyasla 2.30 kat azalma göstermiştir. Erensoy’un alıştırma grubunda, kontrole 8.12 kat artarken tuz uygulanan grupta bu oranın 6.99 kat arttığı belirlenmiştir. Bunun yanında alıştırma grubunda, tuz uygulanan gruba kıyasla belirgin bir değişim gözlenmemiştir.

4.4. Lipid Peroksidasyonu (MDA)

Her iki k ltivara ait lipid peroksidasyon verileri Şekil 4.2’de gösterilmiştir.

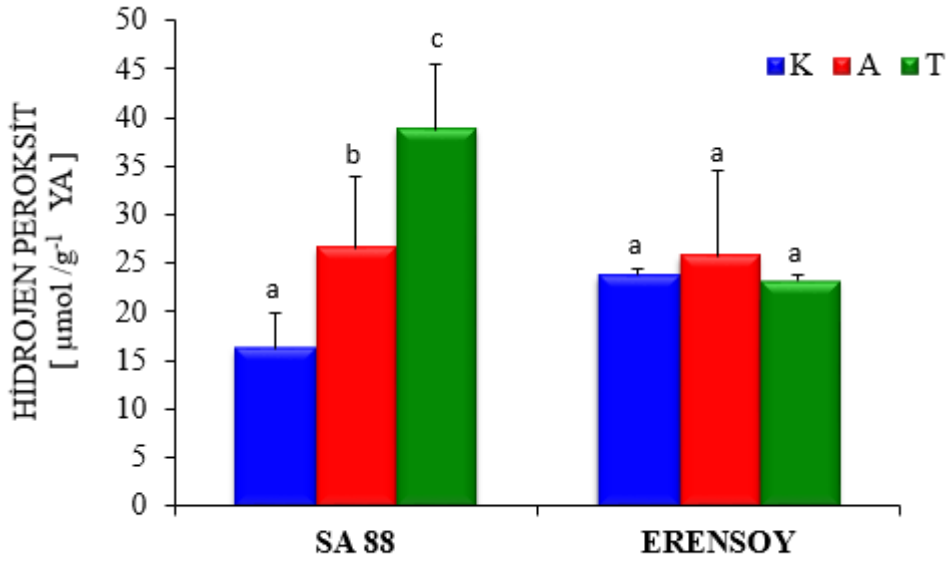


Şekil 4.2. İki farklı soya kültivarına (SA88, Erensoy) yapılan alıştırma ve tuz uygulaması sonucunda malondialdehid miktarında (nmol/g⁻¹ YA) gözlenen değişimler

Lipid peroksidasyonu SA88’in alıştırma grubunda, kontrole göre 2.11 kat artarken tuz uygulanan grupta bu oranın 3.09 kat olduğu belirlenmiştir. SA88’in tuz uygulanan grubu, alıştırma grubuna göre %45 oranında artmıştır. Erensoy’un alıştırma ve tuz uygulanan grubu, kontrole kıyasla birbirine yakın bir Şekilde artmıştır. Erensoy’un alıştırma grubu, tuz uygulanan gruba kıyasla belirgin bir değişim göstermemiştir.

4.5. Hidrojen Peroksit Miktarı (H₂O₂)

Şekil 4.3'te hidrojen peroksit miktarında meydana gelen değişimler verilmiştir.



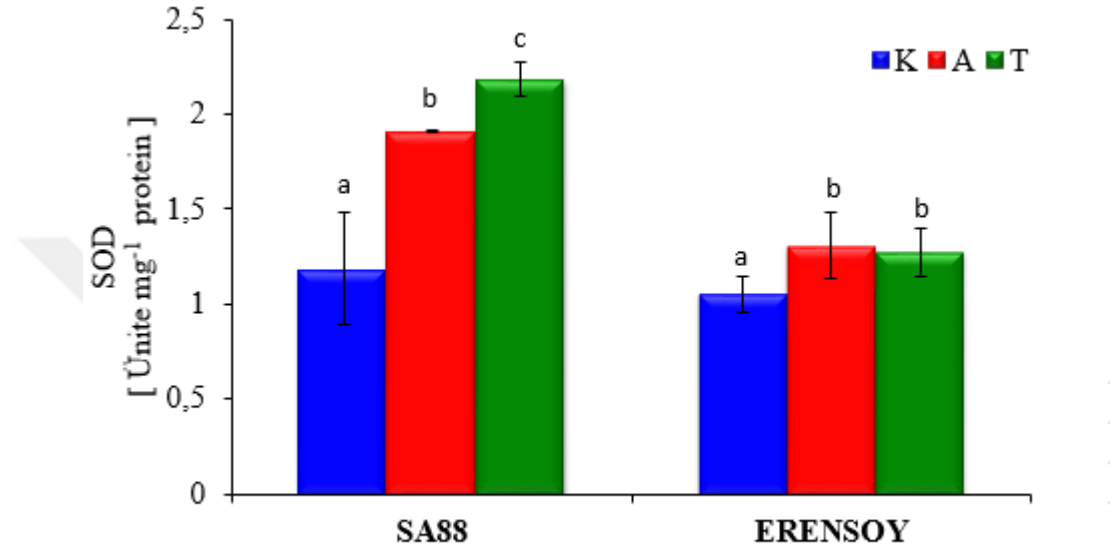
Şekil 4.3. İki farklı soya kültivarına (SA88, Erensoy) yapılan a         ve tuz uygulaması sonucunda hidrojen peroksit (H₂O₂) miktarında (         YA) g      n de          

Hidrojen peroksit miktarı, SA88'in a         grubunda kontrole g  re %63 oranında artarken tuz uygulanan grupta bu oran 2.3 kat olarak belirlenmi      . AyırcaSA88'in tuz uygulanan grubunda, a         grubuna g  re %46 oranında artı   g          . Bunun yanı sıra Erensoy'un a         ve tuz uygulanan grubunda, kontrole kıyasla belirgin bir de         g  r          .

4.6. Antioksidan Enzim ve İzoenzim Aktiviteleri

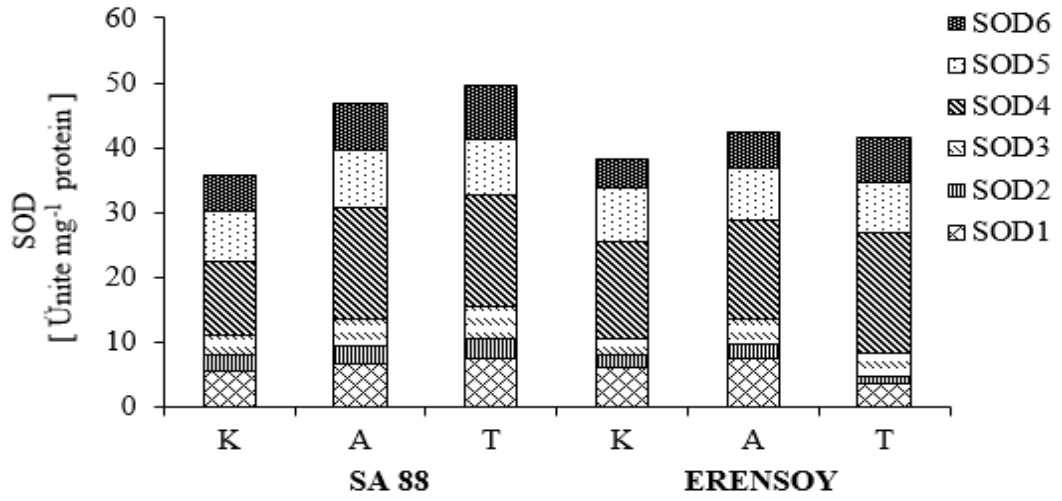
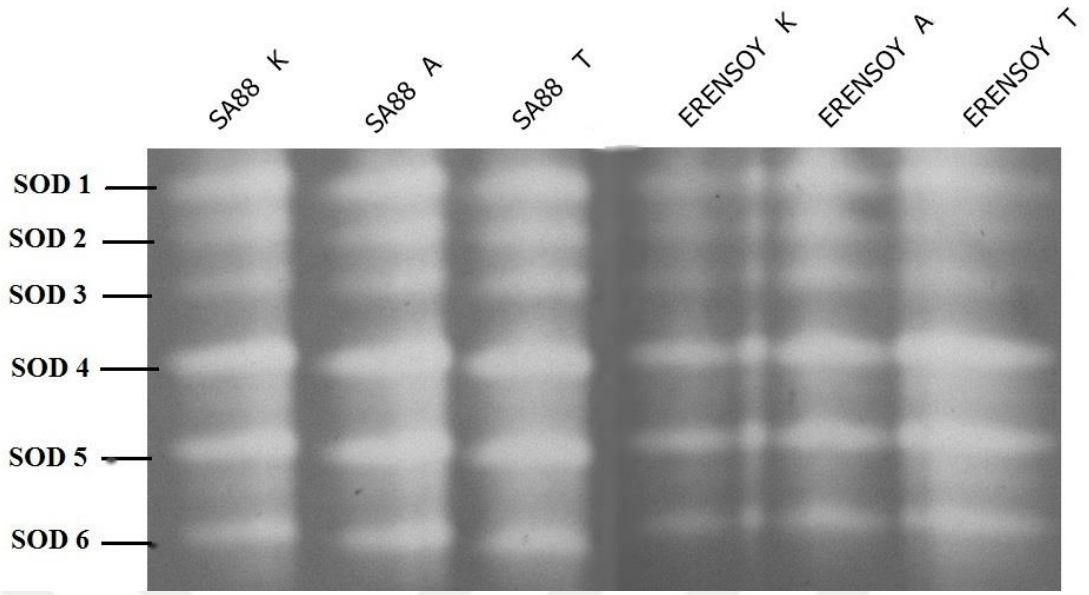
4.6.1. Süperoksit Dismutaz Enzim ve İzoenzim Aktivitesi

Süperoksit dismutaz (SOD) enzim ve izoenzim aktivitesi ile ilgili her iki kültüvara ait veriler Şekil 4.4'te gösterilmiştir.



Şekil 4.4. İki farklı soya kültüvarına (SA88, Erensoy) yapılan alıştırma ve tuz uygulaması sonucunda SOD enzim aktivitesinde (ünite mg⁻¹protein) gözlenen değişimler

SOD enzim aktivitesi SA88'in alıştırma grubunda, kontrol grubuna göre %61 oranında artarken, tuz uygulanan grupta bu oran %84 olarak belirlenmiştir. Ayrıca SOD enzim aktivitesi, SA88'in tuz uygulanan grubunda, alıştırma grubuna göre %14 oranında artmıştır. Bunun yanı sıra Erensoy'un alıştırma grubunda, tuz uygulanan gruba kıyasla belirgin bir değişim görülmemiştir.

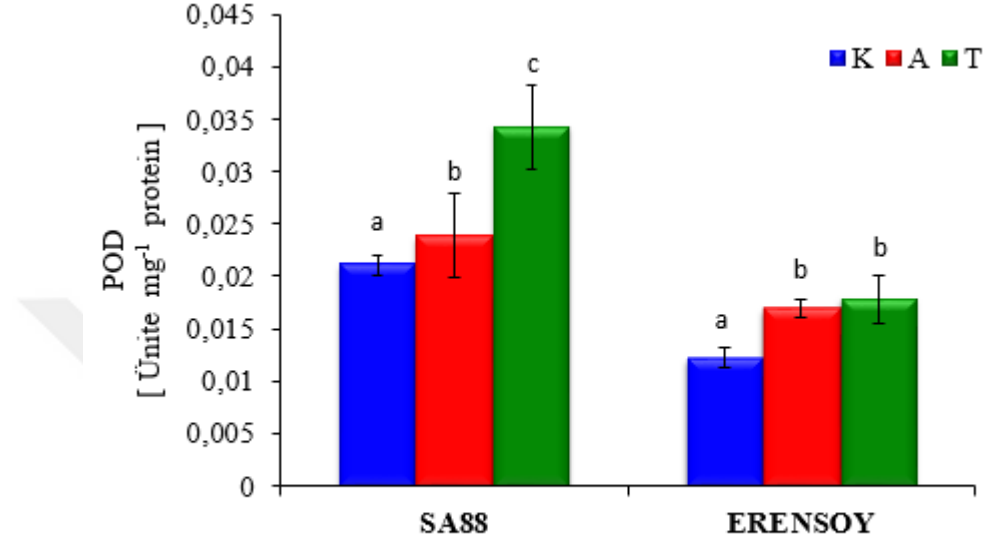


Şekil 4.5. İki farklı soya kültivarına (SA88, Erensoy) yapılan alıştırma ve tuz uygulaması sonucunda SOD izoenzim aktivitesinde (ünite mg⁻¹ protein) gözlenen değişimler

Her iki soya kültivarında 6 adet SOD izoenzimi (SOD 1, 2, 3, 4, 5, 6) belirlenmiştir. SOD 4 izoenzim ifadesi, SA88'in alıştırma yapılan grubunda, kontrol grubuna göre %49 oranında artarken, tuz uygulanan grupta bu oranın %48 olduğu tespit edilmiştir.

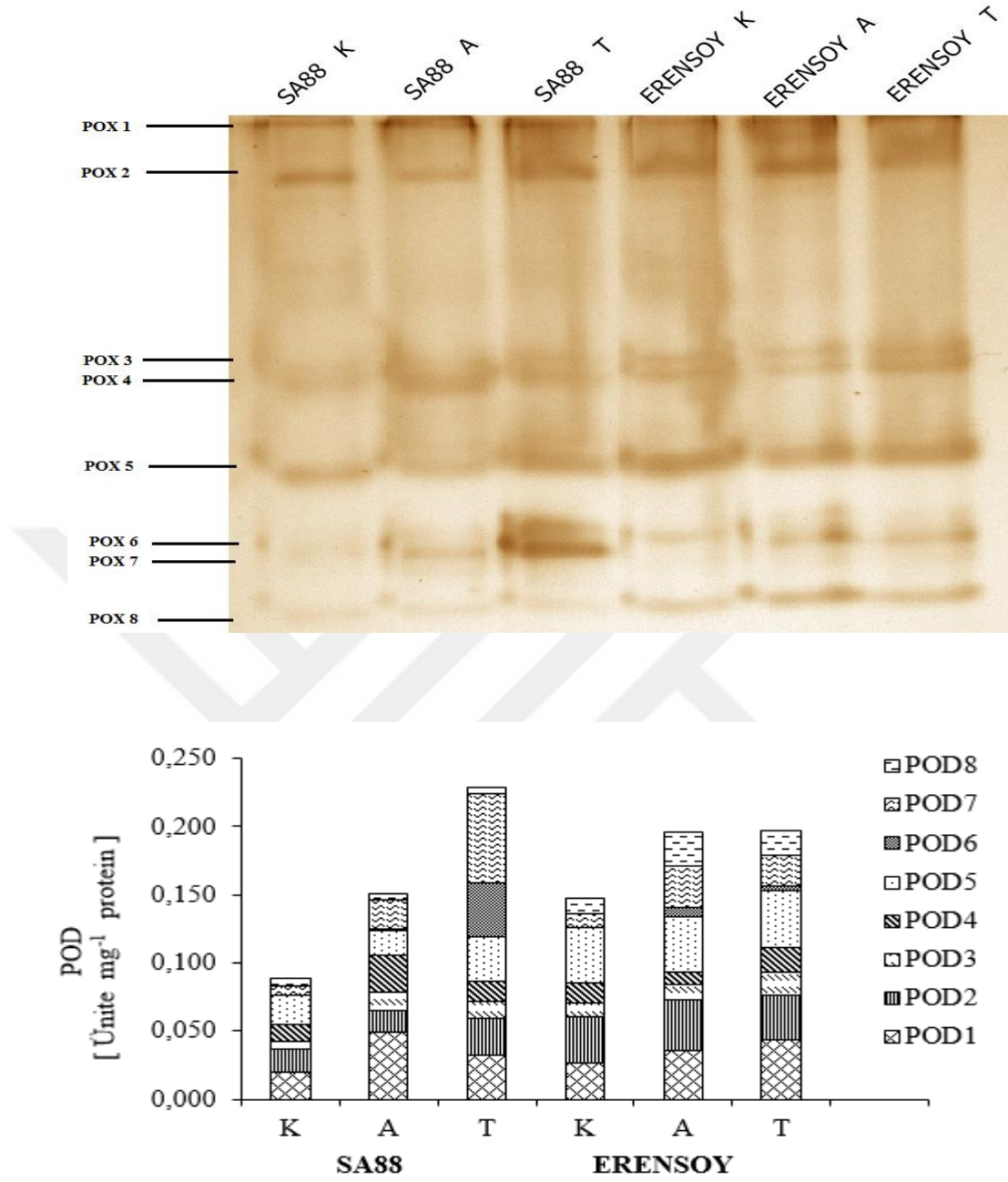
4.6.2. Peroksidaz Enzim ve İzoenzim Aktivitesi

Her iki kültüvara ait peroksidaz (POD) enzim ve izoenzim aktivitesi verileri Şekil 4.6'da gösterilmiştir.



Şekil 4.6. İki farklı soya kültivarına (SA88, Erensoy) yapılan alıştırma ve tuz uygulaması sonucunda POD enzim aktivitesinde (ünite mg⁻¹protein) gözlenen değişimler

POD enzim aktivitesi, SA88'in alıştırma grubunda, kontrol grubuna göre %9 oranında artarken, tuz uygulanan gruplarda bu oran %61 olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte POD enzim aktivitesi SA88'in alıştırma grubunda, tuz uygulanan grubuna göre %47 oranında azaldığı tespit edilmiştir. Erensoy'un alıştırma uygulanan grubunda, kontrole kıyasla %33 artış gözlenirken tuz uygulanan gruba kıyasla değişmemiştir.

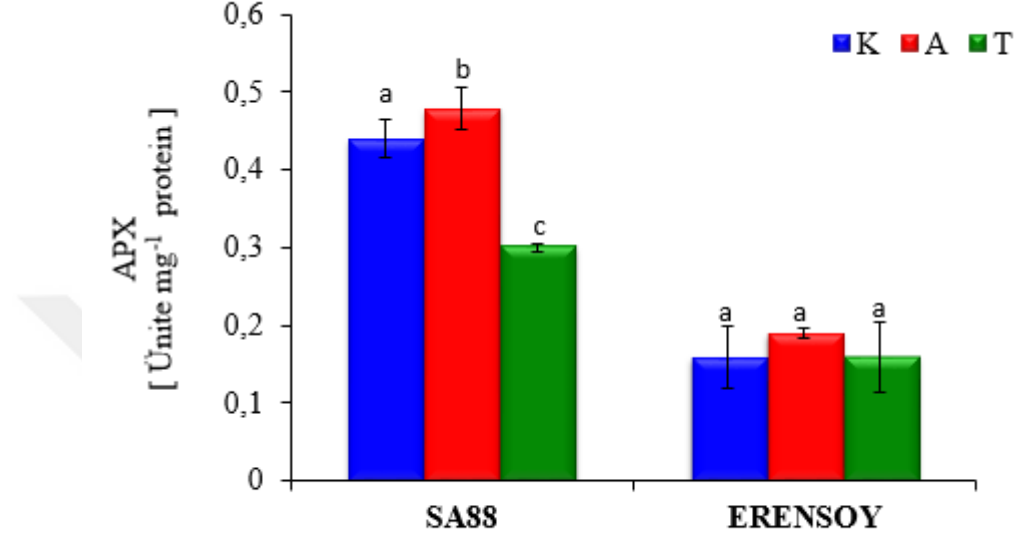


Şekil 4.7. İki farklı soya kültivarına (SA88, Erensoy) yapılan alıştırma ve tuz uygulaması sonucunda POD izoenzim aktivitesinde (ünite mg^{-1} protein) gözlenen değişimler

Her iki soya kültivarında 8 adet POD izoenzim (POD 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8) ifadesi belirlenmiştir. En belirgin artışın SA88'in tuz uygulanan grubunda POD7 izoenziminde olduğu gözlenmiştir.

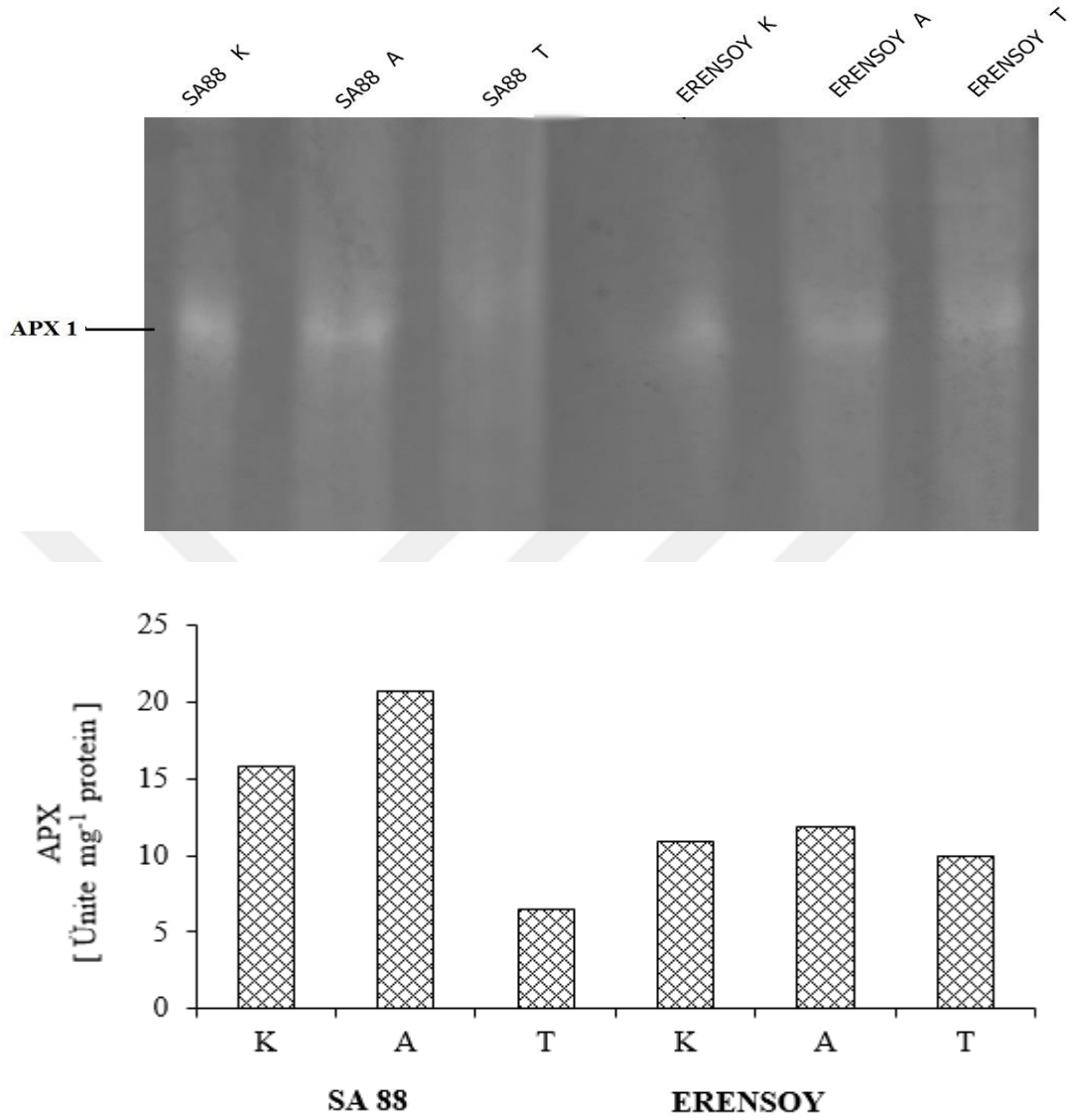
4.6.3. Askorbat Peroksidaz Enzim ve İzoenzim Aktivitesi

Şekil 4.8’de askorbat peroksidaz (APX) enzim ve izoenzim aktivitesine ait veriler gösterilmiştir.



Şekil 4.8. İki farklı soya kültürüne (SA88, Erensoy) yapılan alıştırma ve tuz uygulaması sonucunda APX enzim aktivitesinde (ünite mg⁻¹protein) gözlenen değişimler

APX enzim aktivitesi, SA88’in alıştırma grubunda, kontrole göre %9 oranında artarken tuz uygulanan grupta ise %31 oranında azaldığı ve bunun yanı sıra tuz uygulanan grubun, alıştırma grubuna göre %37 oranında azaldığı belirlenmiştir. Ayrıca Erensoy’un alıştırma grubu, tuz uygulanan gruba göre belirgin bir değişim göstermemiştir.

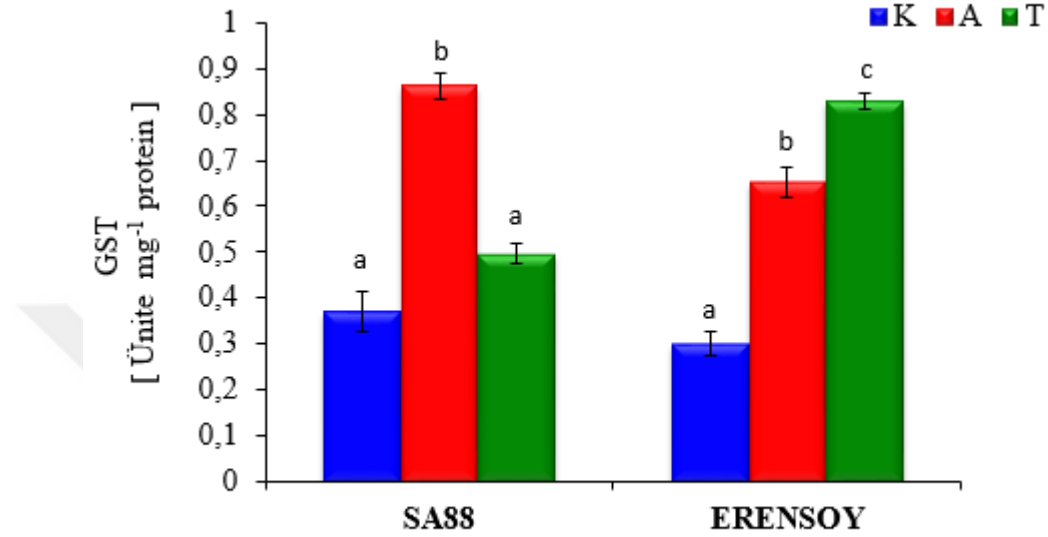


Şekil 4.9. İki farklı soya kültivarına (SA88, Erensoy) yapılan alıştırma ve tuz uygulaması sonucunda APX izoenzim aktivitesinde (ünite mg⁻¹ protein) gözlenen değişimler

APX izoenzimi her iki soya kültivarında 1 adet (APX1) belirlenmiştir. APX 1 izoenzim ifadesi Erensoy'un alıştırma grubunda, kontrole göre belirgin bir değişim göstermezken SA88'in alıştırma grubu kontrole kıyasla %31 oranında artmıştır.

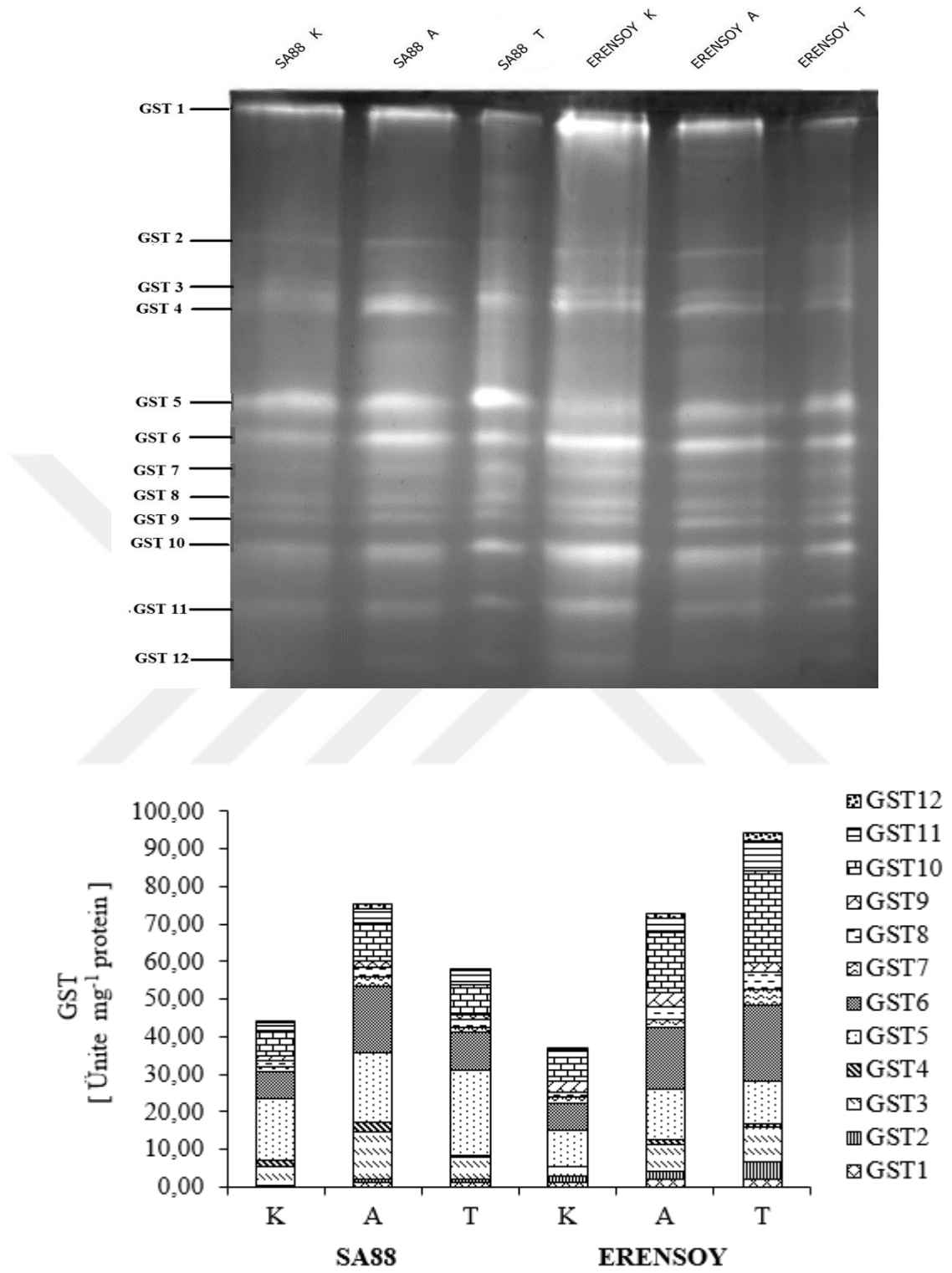
4.6.4. Glutasyon S-Transferaz Enzim ve İzoenzim Aktivitesi

Glutasyon s-Transferaz (GST) enzim ve izoenzim aktivitesi ile ilgili her iki kültüvara ait veriler Şekil 4.10'da gösterilmiştir.



Şekil 4.10. İki farklı soya kültüvarına (SA88, Erensoy) yapılan alıştırma ve tuz uygulaması sonucunda GST enzim aktivitesinde (ünite mg⁻¹protein) gözlenen değişimler

GST enzim aktivitesi, SA88'in tuz uygulanan grubunda, kontrole göre belirgin bir değişim göstermezken, alıştırma grubunda kontrole göre 2.32 kat artmıştır. Ayrıca alıştırma grubu, tuz uygulanan gruba kıyasla %43 oranında artış göstermiştir. Erensoy'un alıştırma grubunda, kontrole göre 2.16 kat artarken tuz uygulanan grubunda bu oran 2.73 kat olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte Erensoy'un tuz uygulanan grubu, alıştırma grubuna göre %26 oranında artmıştır.



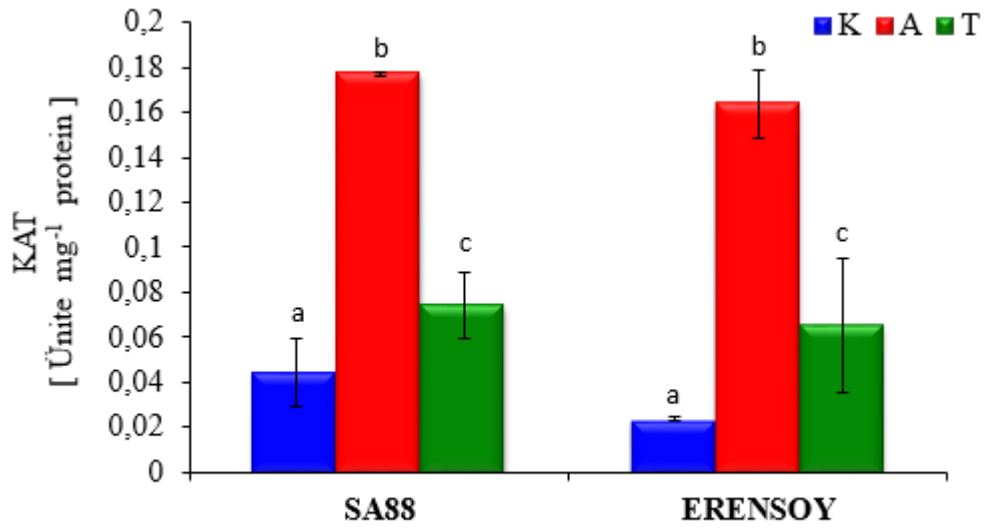
Şekil 4.11. İki farklı soya kültürüne (SA88, Erensoy) yapılan alıştırma ve tuz uygulaması sonucunda GST izoenzim aktivitesinde (ünite mg^{-1} protein) gözlenen değişimler

Her iki soya kültivarında 12 adet GST (GST 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12) izoenzimi belirlenmiştir ve en belirgin artışın GST 5, GST 6, GST 10 izoenzimlerinde olduğu tespit edilmiştir.

SA88'in alıştırma grubunda, izoenzim ifadeleri kontrole göre sırasıyla GST 5'te %14, GST 6'da 2.48 kat ve GST 10'da %56 oranında artmıştır. SA88'in tuz uygulanan grubunda, kontrole kıyasla GST 5'in % 37, GST 6'nın % 40, GST 10'un %24 oranında artmış olduğu gözlenmiştir. Erensoy'unalıştırma grubunda izoenzim ifadeleri, kontrole göre GST 5'te %38, GST 6'da 2.3 kat ve GST 10'da 2.5 oranında artarken, tuz uygulanan grupta GST 5'in %14, GST 6'nın 2.8 kat GST 10'un 3.8 kat oranında arttığı belirlenmiştir.

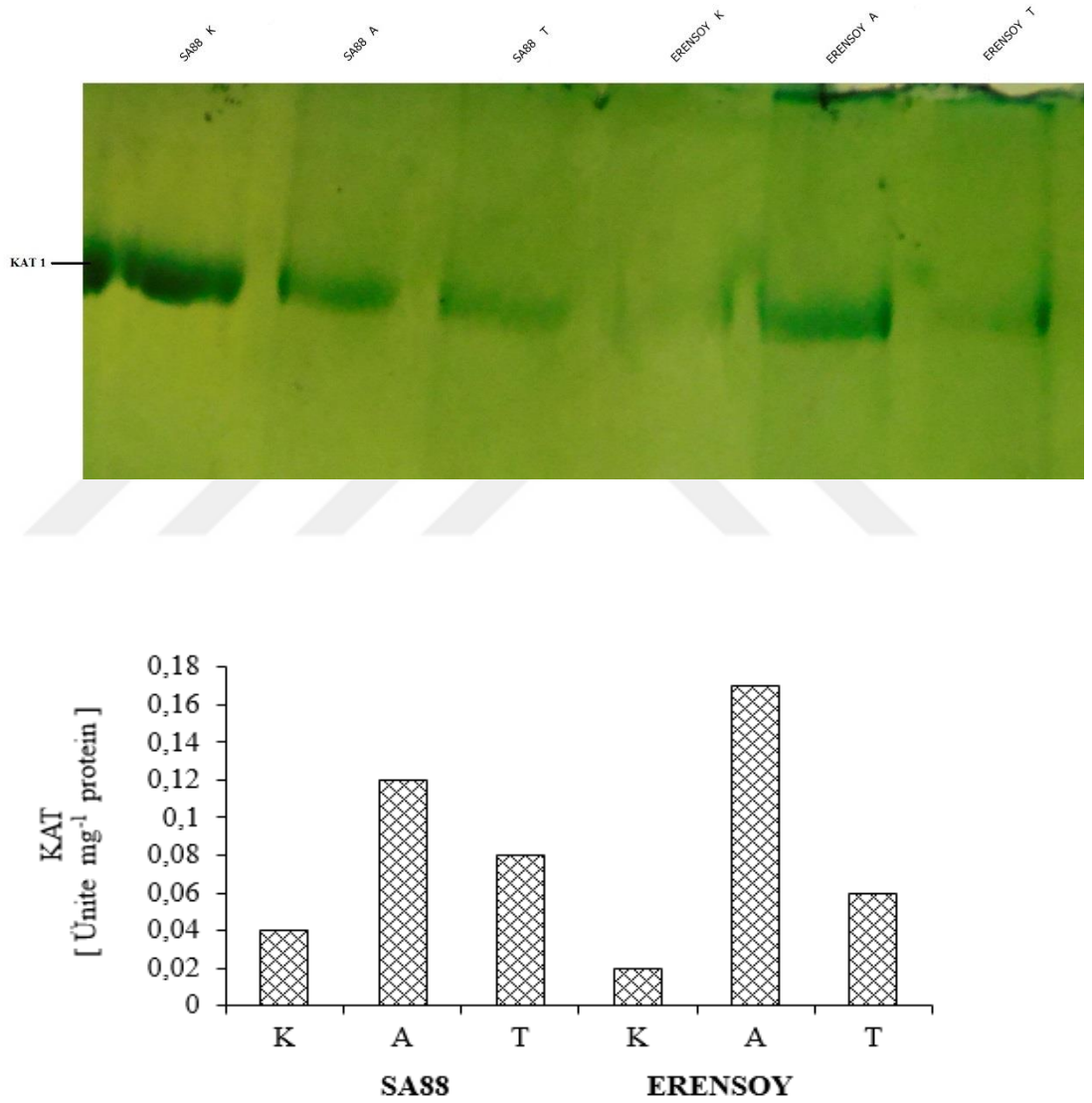
4.6.5. Katalaz Enzim ve İzoenzim Aktivitesi

Her iki kltivara ait katalaz (KAT) enzim ve izoenzim aktivitesi ile ilgili veriler şekil 4.12'de gösterilmiştir.



şekil 4.12. İki farklı soya kültivarına (SA88, Erensoy) yapılan alıştırma ve tuz uygulaması sonucunda KAT enzim aktivitesinde (nite mg⁻¹protein) gözlenen değişimler

KAT enzim aktivitesi SA88'in alıştırma grubunda, kontrole göre 4.25 kat artarken tuz uygulanan grupta bu oran %75 olarak belirlenmiştir. Buna ek olarak SA88'in alıştırma grubu, tuz uygulanan gruba kıyasla %75 oranında artış göstermiştir. Erensoy'un alıştırma grubunda, kontrole göre 8 kat artarken tuz uygulanan grupta bu oranın 3 kat olduğu tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra Erensoy'un alıştırma grubu, tuz uygulanan gruba kıyasla %60 oranında artış göstermiştir.

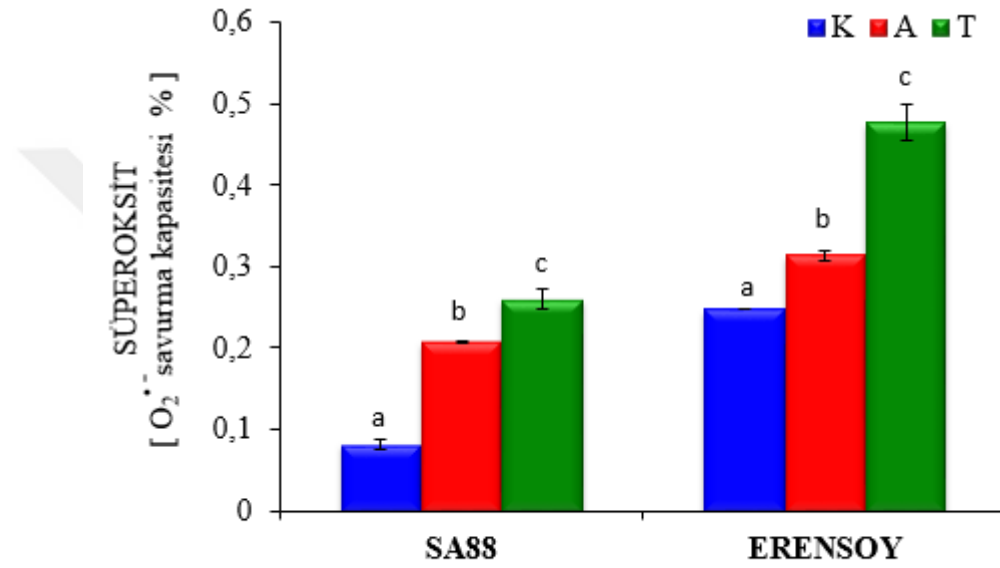


Şekil 4.13. İki farklı soya kültivarına (SA88, Erensoy) yapılan alıştırma ve tuz uygulaması sonucunda KAT izoenzim aktivitesinde (ünite mg⁻¹ protein) gözlenen değişimler

KAT 1 izoenzim ifadesi SA88'in alıştırma grubunda, kontrole kıyasla 3 kat artış artarken tuz uygulanan grupta bu oran 2 kat olarak belirlenmiştir. KAT 1 izoenzim ifadesi Erensoy'un alıştırma grubunda, kontrole göre 8.5 kat artarken tuz uygulanan grupta bu oranın 3 kat olduğu gözlenmiştir.

4.7. Süperoksit Anyonu Savurma Kapasitesi

Şekil 4.14'te süperoksit anyonu savurma kapasitesine ait değerler verilmiştir.

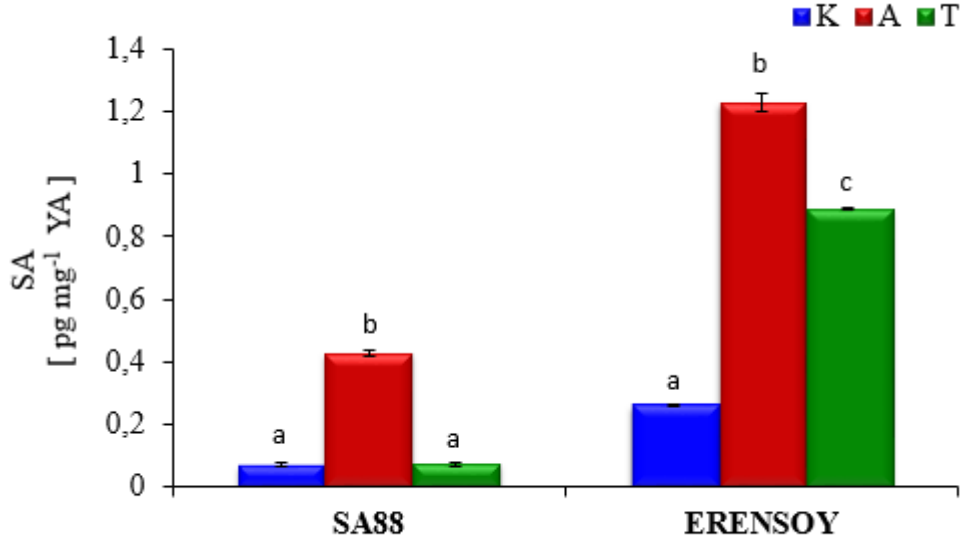


Şekil 4.14. İki farklı soya kültürüne (SA88, Erensoy) yapılan alıştırma ve tuz uygulaması sonucunda süperoksit anyonu savurma kapasitesinde (%) gözlenen değişimler

SA88'de alıştırma grubu, kontrole göre 2.6 kat artmış ve bunun yanı sıra tuz uygulanan grupta kontrole göre 3.2 kat oranında artış göstermiştir. Ayrıca SA88'in tuz uygulanan grubu, alıştırma grubuna göre %23 oranında artmıştır. Erensoy'da ise alıştırma grubu, kontrole göre %24 oranında artarken, tuz uygulanan grupta bu oran %92 olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte tuz uygulanan grupta, alıştırma grubuna kıyasla %54 oranında artış gözlenmiştir.

4.8. İçsel Salisilik Asit Düzeyleri

İçsel salisilik asit düzeyi ile ilgili her iki kültüvara ait veriler Şekil 4.15’de gösterilmiştir.

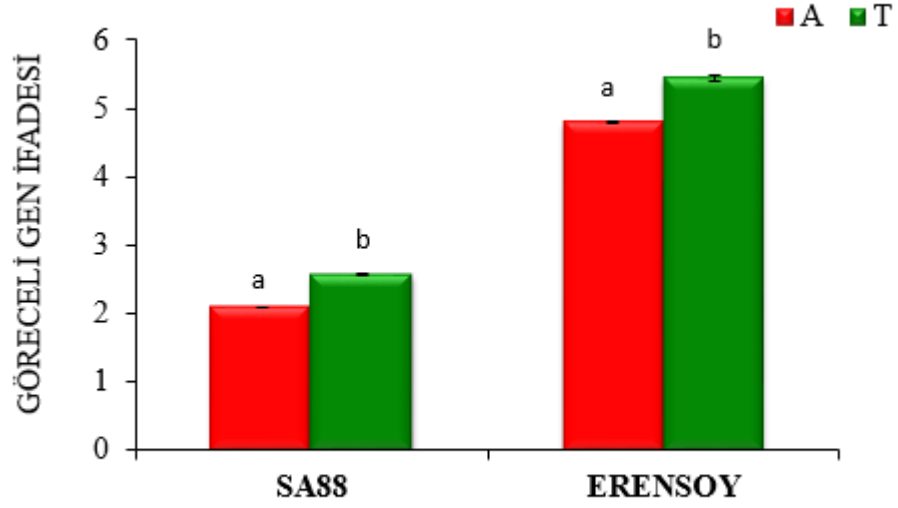


Şekil 4.15. İki farklı soya kültüvarına (SA88, Erensoy) yapılan alıştırma ve tuz uygulaması sonucunda içsel salisilik asit (pg mg⁻¹ YA) miktarında gözlenen değişimler

Salisilik asit düzeyi, SA88’in alıştırma grubunda, kontrol göre 5.9 kat, tuz uygulanan gruba göre ise 5.7 kat olarak belirlenmiştir. Bunun yanı sıra Erensoy’un alıştırma grubu kontrole göre 4.7 kat artarken tuz uygulanan grubunda bu oranın 3.4 kat olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca alıştırma grubu, tuz uygulanan gruba kıyasla %27 oranında artmıştır.

4.9. *Gmnpr1* Gen İfadesi

Her iki k ltivara ait *Gmnpr1* gen ifadesi ile ilgili veriler Şekil 4.16'da gösterilmiştir.



Şekil 4.16. İki farklı soya kültivarına (SA88, Erensoy) yapılan alıştırma ve tuz uygulaması sonucunda *Gmnpr1* gen ifadesinde gözlenen değişimler

Sonuçlar incelendiğinde, *Gmnpr1* gen ifadesindeki artışın toleranslı k ltivarda duyarlı olana kıyasla daha belirgin olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca SA88'in tuz uygulanan grubunda, alıştırma grubuna göre %22 oranında artarken, Erensoy'da bu oran %13 olarak belirlenmiştir.

5.TARTIŞMA

5.1. Büyüme Parametreleri

Tuz stresi bitkilerde büyüme ve gelişmeyi etkileyen önemli bir abiyotik stres faktörüdür. Çalışmamızda, duyarlı SA88 ve toleranslı Erensoy kültürünün alıştırma yapılan ve tuz uygulanan gruplarında, kontrol grubuna göre kök ve gövde uzunluklarında azalma görülmüştür (Çizelge 4.1). Benzer şekilde, Saha ve arkadaşlarının (2010), tuz stresi altında *Vigna radiata* L. Wilczek bitkisinde yaptıkları çalışmada; kök ve gövde uzunluğunun azaldığı ve bu azalmanın kökte daha belirgin olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmamızda her iki kültürün alıştırma ve tuz uygulanan gruplarında, kontrol grubuna göre kök yaş ağırlıkları azalırken, gövde yaş ağırlığında herhangi bir değişim gözlenmemiştir (Çizelge 4.1). Buna paralel olarak Acar ve arkadaşlarının (2011) *Pisum sativum* bitkisi üzerinde yaptıkları çalışmada, 25 mM ve 50 mM NaCl uygulaması yapılan grupların, gövde yaş ağırlığında kontrole göre belirgin bir değişim olmadığı gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde; alıştırma uygulamasının kök yaş ağırlık üzerindeki olumsuz etkiyi bitkinin su dengesini düzenleyerek hafiflettiğini düşünmekteyiz. Ayrıca her iki kültürün alıştırma ve tuz uygulanan gruplarında, kontrole kıyasla gövde kuru ağırlıklarında belirgin bir değişim gözlenmezken, kök kuru ağırlığında azalma meydana gelmiştir (Çizelge 4.1). Benzer şekilde tuz stresi altında *Zea mays* bitkisinin özellikle duyarlı olan kültüründe, tuz uygulaması sonucunda kök ve gövde kuru ağırlığında, kontrol grubuna göre belirgin bir değişim olmadığı belirlenmiştir (Mansour ve ark., 2005).

Essa'nın (2002) tuz stresi altındaki üç farklı soya bitkisi üzerinde yaptığı çalışmada, toleranslı kültürün diğer kültürlerle göre K^+ / Na^+ oranını daha iyi koruduğunu tespit etmiştir. Ayrıca toleranslı kültürün yapraklarındaki makrobesin birikimi ile tuz toleransı arasında bir ilişki olduğunu belirtmiştir. Bunun yanı sıra Lauchli ve Wieneke'nin (1979) soya bitkisi üzerinde yaptıkları çalışmada, kökte Cl^- iyonunu dışlama mekanizmasının bulunduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde, soya bitkisi köklerinin sodyum ve klor iyonlarını, gövdeye iletmeden bitkiyi korumaya çalıştığı kanısındayız.

Tuzlu topraklarda ozmotik basıncın artması nedeniyle bitkinin su alım yeteneği azalmakta ve böylece su içeriği düşmektedir. Ayrıca stresin şiddeti arttıkça bitki su kaybederken stoma iletkenliği de azalmaktadır.

Bununla birlikte iyon ve su dengesindeki hızlı değişimler büyümenin durdurulmasına neden olmaktadır (Zhu, 2001).

Çalışmamızda SA88 kùltivarının tuz uygulanan grubunda, kontrole göre bağıl su içeriğinde azalma olurken, Erensoy’da belirgin bir değişim gözlenmemiştir (Çizelge 4.2). Ayrıca her iki kùltivarın alıştırma uygulanan gruplarında, kontrole kıyasla bu değerlerde artış olduğu gözlenmiştir. Benzer şekilde tuz stresi altında *Oryza sativa* bitkisinde yapılan bir çalışmada; 100mM NaCl uygulanan gruplarda kontrole kıyasla bağıl su içeriğinde azalma olduğu rapor edilmiştir (Djanaguiraman ve ark., 2006). Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde; tuz stresi altında yapılan alıştırma uygulamasının; su ve iyon dengesini düzenleyerek bağıl su içeriğindeki azalmayı iyileştirdiği kanısındayız.

Kök sisteminden gelen kimyasal sinyaller, stomaların strese karşı yanıtında görev almaktadır (Davies ve ark., 2002). Toprak tuzluluğundan kaynaklanan ozmotik etki; bitkinin su dengesinde bozulmalara, turgorun azaltılmasına ve büyümenin engellenmesine, ayrıca stoma kapanmasında azalmaya neden olmaktadır (Poljakoff-Mayber 1982; Sanchez-Blanco ve ark., 1991; Alarcon ve ark., 1993).

Çalışmamızda SA88 ve Erensoy kùltivarının stoma iletkenliğinin alıştırma grubunda, kontrole göre arttığı belirlenmiştir. Ayrıca duyarlı kùltivarının tuz uygulanan grubunda kontrole göre artarken toleranslı olanda değişmemiştir (Çizelge 4.2). Benzer şekilde tuz stresi altında yapılan bir çalışmada, *Zea mays* bitkisinin alıştırma uygulanan grubunda stoma iletkenliğinin, alıştırma uygulanmayan gruba göre arttığı rapor edilmiştir (Pandolfi ve ark., 2016). Buna ek olarak Etehadnia ve arkadaşlarının (2010) patates bitkisi üzerinde yaptıkları çalışmada alıştırma uygulamasının stoma iletkeniğini arttırdığı belirlenmiştir.

Çalışmamızda alıştırma uygulamasının stoma iletkenliğindeki artışın, bağıl su içeriğini etkilediğini düşünmekteyiz. Bu sonuçlara bağlı olarak; alıştırma uygulamasının her iki kùltivarda stoma iletkenliğini iyileştirici yönde etkilediği ve Erensoy kùltivarının, SA88’e oranla stoma iletkenliğini daha iyi düzenlediği belirlenmiştir.

Yüksek tuz konsantrasyonlarında görölen iyon birikimi ile stoma kapanmasındaki düzensizlikler nedeniyle total klorofil miktarında azalma meydana gelmekte ve bunun sonucunda fotosentez etkinliği azalarak bitkinin gelişimi olumsuz yönde etkilenmektedir (Yaşar, 2003).

Çalışmamızda her iki k ltivarın tuz uygulanan grubunda, kontrole göre klorofil miktarında azalma olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.2). Buna paralel olarak Turan ve arkadaşlarının (2007) tuz stresi altında *Lens calinaris* L. var. Sultan bitkisinde yaptıkları bir çalışmada; bitkinin fidelerinde total klorofil içeriğinin, kontrole göre önemli düzeyde azaldığı belirlenmiştir. Benzer şekilde Mai ve Hang'ın (2016) DT26 kültivarında yaptıkları çalışmada; tuz stresinin klorofil birikimini engellediğı tespit edilmiştir.

SA88 kültivarının alıştırma grubunda total klorofil içeriğı kontrol grubuna göre azalırken Erensoy'un alıştırma grubunda belirgin bir değişim gözlenmemiştir (Çizelge 4.2). Benzer şekilde *Vigna radiata* L. Wilczek ve *Triticum aestivum* L. Cv. Mv Beres bitkisinde yapılan çalışmada; tuz uygulanan gruplarda, total klorofil içeriğinin azaldığı, tuza alıştırılan gruplarda ise kontrole yakın sonuç verdiğı tespit edilmiştir (Saha ve ark., 2010; Janda ve ark., 2016). Bu sonuçlara bağlı olarak çalışmamızda; her iki k ltivarın klorofil içeriğindeki azalmanın, alıştırma uygulaması ile iyileştirildiğı belirlenmiştir. Dahası alıştırma gruplarının bağlı su içeriğı ve stoma iletkenliğindeki artışın, tuz stresinin klorofil içeriğine verdiğı hasarın hafifletilmesinde etkili olduğu kanısındaız.

5.2. Prolin Miktarı

Bitkilerde prolin birikiminin tuzluluk, kuraklık, sıcaklık, ağır metal, patojen enfeksiyonu, besin kıtlığı gibi stres durumlarında arttığı bildirilmiştir (Hare ve Cress, 1997; Siripornadulsil ve ark., 2002). Prolin membran kararlılığına katkıda bulunarak, tuzluluğun hücre membranına olan olumsuz etkisini azaltmaktadır (Mansour, 1998). Çok fonksiyonlu amino asit olarak prolin; proteinler, membranlar, alt hücreli yapıların dengelenmesi ve reaktif oksijen türlerini (ROT) temizleyerek hücresel işlevlerin korunması gibi stres koşulları altında farklı roller oynamaktadır (Kaur ve Asthir, 2015). Bitkilerde yaygın olarak bulunan prolin; kullanılabilir azot birikimini düzenlemektedir ve prolin birikim seviyesi türden t re göre değişmektedir (Abraham ve ark., 2003). Ayrıca Mai ve Hang'ın (2016) *Glycine max* L. DT26 k ltivarı üzerinde yaptıkları çalışmada; tuz stresi esansında bitkinin kök, gövde ve sap kısmındaki prolin miktarını arttırarak, tolerans mekanizmasını tetiklediğı tespit edilmiştir.

Çalışmamızda her iki k ltivarın alıştırma ve tuz uygulanan grubunda prolin miktarı kontrole göre artmıştır (şekil 4.1).

Buna paralel olarak tuz stresi altında *Oryza sativa* L. bitkisinde yapılan çalışmada; alıştırma yapılan ve tuz uygulanan grupların, prolin miktarının kontrole kıyasla arttığı tespit edilmiştir (Djanaguiraman ve ark., 2006). Benzer şekilde *Arachis hypogaea* L. ve *Phaseolus aureus* bitkisinin tuza duyarlı ve toleranslı kùltivarları üzerinde yapılan çalışmada; tuz stresi altında her iki kùltivarın prolin miktarında artış olduğu belirlenmiştir (Jain ve ark., 2001; Misra ve Gupta, 2005).

Çalışmamızda SA88'in alıştırma grubunda prolin miktarı, tuz uygulanan gruba kıyasla azalmıştır. Ancak Erensoy'un alıştırma uygulanan grubunda prolin miktarı, tuz uygulanan gruba göre belirgin bir değışim göstermemiştir (şekil 4.1). Ayrıca her iki kùltivarın alıştırma grubunda, bağıl su içeriğı kontrole göre artmıştır (Çizelge 4.2). Bu sonuçlara göre çalışmamızda; prolin üretiminin; tuz stresinden etkilenme derecesine bağılı olarak artmış olduğu ve bu artışın özellikle duyarlı bir kùltivar olan SA88'in tuz uygulanan grubunda daha belirgin olduğu belirlenmiştir. Erensoy'un tuz stresine karşı toleranslı bir kùltivar olması nedeniyle SA88 oranla prolin miktarında artışın daha az olduğu kanısındayız.

5.3. Lipid Peroksidasyon Miktarı (MDA)

Lipid peroksidasyon ürünü olan malondialdehid miktarının belirlenmesi, oksidatif zararın göstergesi olarak kullanılmaktadır (Zhang ve Kirkham, 1996). Çalışmamızda tuza duyarlı SA88 kùltivarının alıştırma ve tuz uygulanan grubunda, MDA miktarı kontrole göre artmıştır (şekil 4.2). Bunun yanında alıştırma grubunun MDA miktarı, tuz uygulanan gruba kıyasla azalmıştır. Benzer şekilde tuz stresi altında *Vigna radiata* L. Wilczek bitkisinde yapılan bir çalışmada; tuz uygulanan gruplarda MDA miktarının, kontrole göre arttığı ancak alıştırma uygulanan gruptaki artışın, tuz uygulanan gruba göre daha az olduğu belirlenmiştir (Saha ve ark., 2010). Buna paralel olarak tuz stresi altında *Glycine max* L. bitkisinde yapılan bir çalışmada; alıştırma uygulanan grubun MDA miktarının, kontrole yakın sonuç verdiğı, alıştırma yapılmayan grubun ise kontrole göre arttığı tespit edilmiştir (Aksoy ve Dinler, 2014).

Ayrıca Erensoy kùltivarının alıştırma ve tuz uygulanan grubunda MDA miktarı kontrole kıyasla artmıştır ancak alıştırma uygulanan grubun MDA miktarı, tuz uygulanan gruba göre belirgin bir değışim göstermemiştir (şekil 4.2).

Elde edilen sonuçlara göre; tuza toleranslı olan Erensoy kültivarının, SA88'e oranla MDA miktarını alıştırma uygulaması yapılmaksızın da düzenleyebildiği tespit edilmiştir.

5.4. Hidrojen Peroksit Miktarı (H₂O₂)

Hidrojen peroksit, normal ve stres koşullarında çeşitli hücre süreçlerine katılabilecek çok yönlü bir moleküldür (Quan ve ark., 2008). Düşük konsantrasyonlarda H₂O₂, birçok biyotik ve abiyotik strese karşı tolerans uyandıran bir sinyal molekülü gibi davranır ancak yüksek konsantrasyonlarda programlanmış hücre ölümünü tetikler (Love ve ark., 2008). Bitki hücrelerindeki fazla H₂O₂'nin, oksidatif stres oluşumuna yol açtığı iyi bilinmektedir (Gill ve Tuteja, 2010). Bu nedenle H₂O₂ konsantrasyonunun kontrolü, hücre içi denge için önem taşımaktadır.

Çalışmamızda SA88 kültivarının tuz uygulanan grubunda H₂O₂ miktarı, kontrol ve alıştırma grubuna göre artmıştır (şekil 4.3). Bunun yanında alıştırma grubunda ise H₂O₂ miktarı, tuz uygulanan gruba kıyasla azalmıştır. Ayrıca Erensoy kültivarının tuz uygulanan grubunun H₂O₂ miktarı, alıştırma grubuna kıyasla belirgin bir değişim göstermemiştir (şekil 4.3). Buna paralel olarak Nazar ve arkadaşlarının (2011) *Vigna radiata* L. bitkisinin tuza duyarlı ve toleranslı k ltivarları üzerinde yaptıkları çalışmada; 50 mM NaCl uygulanan grupların H₂O₂ miktarının arttığı belirlenmiştir.

Benzer şekilde *Zea mays* L. bitkisinin iki farklı k ltivarı üzerinde yapılan çalışmada tuz uygulanan gruplarda H₂O₂ miktarının kontrole göre arttığı tespit edilmiştir (Kaya ve ark., 2015). Tuz stresi altında bitki; hidrojen peroksit (H₂O₂), s peroksitanyonu (O₂^{·-}), singlet oksijen (¹O₂) ve hidroksil radikali (OH[·]) gibi ROT'ları üretmektedir. Reaktif oksijen türlerinin artması sonucunda antioksidan enzim sistemleri harekete geçmektedir.

Çalışmamızda Erensoy'a oranla, SA88'in alıştırma grubunda H₂O₂ üretimini engellenmek için daha fazla sayıda enzim görev almaktadır. Bu sonuçlara bağlı olarak her iki k ltivarin alıştırma gruplarının H₂O₂ miktarındaki azalmanın; antioksidan enzimlerinin uyarılması ve artan içsel salisilik asit miktarı (şekil 4.15) ile bağlantılı olduğu kanısındayız.

5.5. Antioksidan Enzim ve İzoenzim Aktiviteleri

Bitkiler oksidatif stresin etkisini en aza indirmek için antioksidan savunma sistemini geliştirmişlerdir (Azooz ve ark., 2011; Ahmad ve ark., 2012). *Carthamus tinctorius* L. (Siddiqi ve ark., 2011), *Glycine max.* L. (Dehghan ve ark., 2011), *Brassica napus* (Farhoudi ve ark., 2012) ve *Brassica juncea* L. (Ahmad ve ark., 2012) bitkilerinde tuz stresi altında yapılan çalışmalarda; ROT üretiminde ve birçok antioksidan enzim aktivitelerinde artış olduğu bildirilmiştir.

5.5.1. Süperoksit Dismutaz (SOD; EC: 1.15.1.1) Enzim ve İzoenzim Aktivitesi

SOD, aerobik organizmalarda bulunan bir enzimdir ve ROT'a karşı hücrel savunma mekanizmalarında anahtar rol oynayan önemli bir O_2^- süpürücüsüdür. Buna ek olarak enzim aktivitesi, H_2O_2 ve O_2 'in oluşumuyla sonuçlanır (Neto ve ark., 2006). Bir hücre içindeki süperoksit dismutazlar (SOD), ROT'a karşı savunmanın ilk hattını oluşturmaktadır. Enzim tarafından kullanılan metal kofaktöre dayanarak SOD'lar; demir SOD (FeSOD), manganez SOD (MnSOD) ve bakır-çinko SOD (Cu-Zn SOD) olmak üzere üç gruba ayrılır ve bu SOD'lar hücrenin farklı bölmelerinde yer almaktadırlar. FeSOD'lar kloroplastta, MnSOD'lar mitokondri ve peroksizomda, Cu-ZnSOD'larda kloroplast, sitozol ve muhtemelen hücre dışı boşlukta bulunmaktadır (Alscher ve ark., 2002).

Çalışmamızda SA88 kùltivarının alıştırma ve tuz uygulanan grubunda, SOD enzim aktivitesi kontrol grubuna göre artarken bu artışın tuz uygulanan grupta daha belirgin olduğu ve Erensoy kùltivarında ise herhangi bir değişim gözlenmediği tespit edilmiştir (Şekil 4.4). Bunun yanı sıra, SA88 kùltivarının SOD 4 izoenzim ifadesi alıştırma ve tuz uygulanan grubunda, kontrol grubuna göre artış gösterirken, Erensoy'da belirgin bir değişim göstermemiştir (Şekil 4.5).

Benzer şekilde tuz stresi altındaki *Oryza sativa* L., *Beta vulgaris* L. ve *Cassia angustifolia* bitkisi üzerinde yapılan çalışmalarda; SOD enzim aktivitesinin arttığı tespit edilmiştir (Lee ve ark., 2001; Bor ve ark., 2003; Agarwal ve Pandey, 2004). Ayrıca Hernandez ve arkadaşlarının (2000) tuz stresi altında *Pisum sativum* L. bitkisinde yaptıkları çalışmada; 70 mM NaCl uygulaması sonucunda SOD izoenzim aktivitesinin arttığı rapor edilmiştir.

Çalışmamızda toleranslı k ltivarın süperoksit anyon savurma kapasitesinin ( ekil 4.14) a ı tırma ve tuz uygulanan grubunda artmış olması; H₂O₂ ve MDA miktarının Erensoy'da neden belirgin bir değişim göstermediğini açıklar niteliktedir ( ekil 4.2,  ekil 4.3). Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, toleranslı k ltivarıns peroksit savurma kapasitesinin yüksek olmasından dolayı SOD enzim ve izoenzim aktivitesini arttırmadan da strese karşı bir koruma sağladığı kanısındayız.

5.5.2. Peroksidaz (POD; EC: 1.11.1.7) Enzim ve İzoenzim Aktivitesi

POD, bitkide çeşitli fizyolojik süreçlerin yanı sıra biyotik-abiyotik stres ve lignin biyosentezini içeren birçok süreçte yer alır. Lignin, bitkiyi güçlü ve hücre duvarlarınd  hidroforik hale getiren bir polimerdir. POD; hücre oluşumu, meyve gelişimi, etilen biyosentezi gibi biyokimyasal ve fizyolojik süreçlerde etkili olmasının yanında çevresel strese karşı cevaplarda da rol almaktadır (Matamoros ve ark., 2003). Ayrıca hücrenin oksidatif hasarına neden olan ROT'ların atılmasıyla ve H₂O₂'in yok edilmesiyle ilgilenirler (Vicuna, 2005). Hatta bazı araştırmacılar POD'un patojen enfeksiyonu ile uyarılabildi i ve belirli bir savunma sürecine girdiğini ileri sürmüşlerdir (Chittor ve ark., 1997). Peroksidazlar; fenolik bileşikler, lignin   c leri, oksin veya sekonder metabolitler gibi çeşitli elektron verici moleküllerden elektron alarak, H₂O₂ üretiminin azalmasını sağlarlar (Hiraga ve ark., 2001).

Çalışmamızda her iki kültivarının a ı tırma ve tuz uygulanan grubunda, POD enzim ve izoenzim aktivitesi kontrol grubuna kıyasla artmıştır ( ekil 4.6). Ayrıca Erensoy'un a ı tırma grubu, tuz uygulanan gruba göre belirgin bir değişim göstermemiştir ( ekil 4.7). Bu sonuçlara benzer şekilde Koca ve arkadaşlarının (2007) *Sesamum indicum* bitkisi üzerinde yaptıkları çalışmada; 100 mM NaCl uygulamasının, tuza duyarlı k ltivardaki POD enzim aktivitesini arttırdığı belirlenmiştir. Bunun yanı sıra tuz stresi altında *Jatropha curcas* ve *Vigna sinensis* L. bitkisinde yapılan çalışmalarda, POD izoenzim aktivitesinin arttığı tespit edilmiştir (Gao ve ark., 2008; El-Mashad ve ark., 2012)

Elde edilen sonuçlara göre; SA88'in tuz uygulanan grubunda POD enzim ve izoenzim aktivitesinin a ı tırma grubuna göre daha fazla arttığı belirlenmiştir. SA88 kültivarının tuz uygulanan grubundaki artan ROT  retimini, POD enzimini aktifle tirerek azalttığı kanısındayız.

Ayrıca duyarlı k ltivarın tuz uygulanan gruptaki enzimlerin, alıştırma grubuna göre daha az aktif olması; MDA ve H₂O₂ miktarındaki artışı açıklar niteliktedir. Tuzlulu a karşı verilen cevapların, aynı bitkinin farklı kültivarında da değişkenlik gösterdiği bilinen bir gerçektir. Bu bilgiyi göz önünde bulundurarak Erensoy'un POD enzim ve izoenzim aktivitesini aktifleştirmeden de, diğer enzim mekanizmaları ile tolerans sa layabildi i düşüncesindeyiz.

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

Askorbat peroksidazlar, bitki hücrelerinin kloroplast ve sitoplazmasında bulunan birincil H₂O₂ temizleyici enzimlerdir ve askorbat-glutasyon döngüsünde önemli rol oynamaktadırlar (Asada, 1987). Bitkilerde, kloroplast hasarına karşı, APX'in toleransı arttırdığı bildirilmiştir (Tanaka ve ark., 1985). Kloroplast ve diğer hücre bölümleri, oksidatif hasara neden olan hidrojen peroksitten korunmak için elektron taşıyıcısı olan askorbatı kullanır ve böylece H₂O₂, askorbat peroksidaz tarafından temizlenmiş olur (Halliwell ve Gutteridge, 1986; Asada, 1992). APX; KAT ve POD'a kıyasla H₂O₂'ye karşı daha yüksek bir ilgiye sahiptir (Ahmad ve ark., 2010).

Çalışmamızda SA88 kültivarının APX enzim ve izoenzim aktivitesi alıştırma grubunda, kontrol grubuna kıyasla artarken tuz uygulanan grubunda ise kontrol grubuna göre azalmıştır (şekil 4.8). Ayrıca Erensoy'un alıştırma ve tuz uygulanan grubunda, kontrole göre belirgin bir değişim göstermemiştir (şekil 4.9). Buna paralel olarak Badawi ve arkadaşlarının (2004) yaptıkları çalışmada tütün kloroplastlarındaki askorbat peroksidazın ifadesindeki artışın tuz stresine karşı toleransı arttırdığı tespit edilmiştir. Benzer şekilde Ahmad ve arkadaşlarının (2012) tuz stresi altındaki *Pisum sativum* L. bitkisinde yaptıkları çalışmada; APX enzim aktivitesinin arttığı rapor edilmiştir.

Buna paralel olarak Aksoy ve Dinler'in (2014) tuz stresi altında *Glycine max* L. bitkisinde yaptıkları çalışmada; tuza alıştırılan grupta APX enzim aktivitesinin tuza alıştırılmayan gruba kıyasla arttığı bildirilmiştir. Ayrıca Yoshimura ve arkadaşlarının (2000) *Spinacia oleracea* bitkisi üzerinde yaptıkları çalışmada; tuz stresinin APX izoenzim ifadesini arttırıcı yönde etki ettiği belirlenmiştir.

Bu sonuçlara bağılı olarak; SA88 kültivarında yapılan alıştırma uygulamasının, APX enzim ve izoenzim aktivitesinin artışında daha etkili olduğu ve alıştırma grubunun H₂O₂ miktarının azaltılmasında; artmış olan APX enzim ve APX 1 izoenzim aktivitesinin görev aldığı kanısındayız. Ayrıca Erensoy'da herhangi bir değişim gözlenmesinin, SA88'e göre daha toleranslı bir k ltivar olmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

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

GST'ler bitkilerde büyük bir gen ailesi içermektedir (Dalton ve ark., 2009). *Glycine max* L. bitkisinde 25, *Zea mays*, 42 ve *Arabidopsis thaliana*'da ise 47 adet GST geni olduğu belirlenmiştir (Mcgonigle ve ark., 2000; Wagner ve ark., 2002). Bunun yanı sıra biyotik ve abiyotik strese, gelişimsel değişim ve hormonlar ile bağlantısı bulunduğu tespit edilmiştir (Marrs, 1996; Dixon ve ark., 2002; Moons, 2005; Frova, 2006). Glutasyon s-transferazlar, çoğunlukla     nebilir sitoplazmik enzimlerdir. Bugüne kadar bitkiler, hayvanlar ve bakterilerde bulunan 200'den fazla kristal yapıda glutasyon s-transferaz bulunmuştur ve bunların yapıları işlevlerini etkilemektedir (Mohsenzadeh ve ark., 2011). Bazı GST'ler H₂O₂ ile güçlü bir şekilde uyarılabilir (Levine ve ark., 1994; Wagner ve ark., 2002). Bazı GST transkriptleri, hücre içinde artmış H₂O₂ için yararlı işaretleyiciler olarak düşünülebilir (Vanderauwera ve ark., 2005; Queval ve ark., 2007, 2009; Chaouch ve ark., 2010), ve birkaçı da salisilik asit ile uyarılabilir (Sappl ve ark., 2009). GST'lerin metabolizma üzerindeki rolü açık değildir ancak çevresel uyaranlara göre karmaşık düzenlemeleri önemli koruyucu fonksiyonlara sahip olduklarını göstermektedir. Son yıllardaki araştırmalar GST'lerin, glutasyon bağımlı izomerleşmelerin katalize edilmesinde, GSH'ye bağımlı katalitik işlevlerde, herbisitlerin konj gasyonunda ve oksidatif stres sırasında oluşan organik hidroperoksitlerin azaltılmasında görev aldığı belirtilmektedir (Dixon ve ark., 2002). Bitkilerdeki GST ailesinin biyokimyasal ve fizyolojik fonksiyonları tam olarak açıklığa kavuşturulmamıştır (Noctor ve ark., 2012).

Çalışmamızda, her iki k ltivarda alıştırma uygulamasının, kontrole göre GST enzim ve izoenzim aktivitesinin arttığı belirlenmiştir fakat SA88 kültivarının tuz uygulanan grubunda; kontrol kıyasla değişmemiştir (şekil 4.10). Ayrıca Erensoy'un tuz uygulanan grubunda kontrol grubuna göre belirgin bir artış göstermiştir (şekil 4.11).

Paralel olarak Sudhakar ve arkadaşlarının (2001) tuz stresi altındaki *Morus alba* L. bitkisi üzerinde yaptıkları çalışmada, GST enzim aktivitesinin arttığı tespit edilmiştir. Buna ek olarak Dinler ve arkadaşlarının (2014) *Glycine max* L. bitkisi üzerinde yaptıkları çalışmada tuz uygulanan grupların GST izoenzim aktivitesinin arttığı belirlenmiştir.

Bu sonuca bağlı olarak SA'nın hidrojen peroksit (Şekil 4.3) haricinde GST enzimi (Şekil 4.10) ile ilişki kurarak, ROT'un oluşturacağı hasara karşı savunmada görev aldığı düşüncesindeyiz. Daha önce tespit edilmiş olan Arabidopsis *GRXC9* ve *TRXh5* geninin, hem SA hem de GSH indirgenmesi ile bağlantılı olması, SA'nın GST enzimi ile etkileşimde bulunabileceğini göstermektedir (Meyer ve ark., 2012). Bu bilgiler ışığında, çalışmamızda her iki kültüvardaki artan ROT'un, *TRXh5* ve *GRXC9* genlerini aktive ederek GST ve *NPR1*'i (Şekil 4.16) uyardığı kanısındayız.

5.5.5. Katalaz (KAT; EC:1.11.1.6) Enzim ve İzoenzim Aktivitesi

H₂O₂'nin su ve oksijene indirgenmesinde görev yapan katalaz, tüm aerobik organizmalarda bulunan H₂O₂ temizleyici bir enzimdir (Afzal ve ark., 2006). Bitkilerde katalaz; mitokondriyal elektron taşıma sisteminde ve yağ asitlerinin beta oksidasyonunda görev almaktadır. (Scandalios ve ark., 1997). Yapılan çalışmalar ışığında; katalazın savunma ve yaşlanmada önemli rol oynadığı, aktivitesinde çeşitli faktörlerden etkilendiği bildirilmiştir (Yang ve Poovaiah, 2002). Salisilik asit, hücrenin redoks durumuna bağlı olarak; katalaz aktivitesini geçici olarak engeller veya korur (Chen ve ark., 1993; Durner ve ark., 1996). Buna ek olarak farklı bitkilerin SA bağlama aktivitesi ile KAT enzimlerinin SA'ya karşı duyarlılığı arasında bir bağlantı olduğu öne sürülmüştür (Gayatri Devi ve ark., 2012).

Çalışmamızda her iki kültürün alıştırma uygulanan grubunda KAT enzim ve izoenzim aktivitesinin arttığı ve bu artışın SA88 kültüründe daha belirgin olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.12). Ayrıca her iki kültürün tuz uygulanan grubunun KAT enzim ve izoenzim aktivitesinin, kontrole göre arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.13). Benzer şekilde Aksoy ve Dinler (2014) tuz stresi altında *Glycine max* L. Merr bitkisi üzerinde yaptıkları çalışmada; alıştırma uygulanan grupta KAT enzim aktivitesinin tuz uygulanan gruba kıyasla artış gösterdiği bildirilmiştir.

Buna paralel olarak Janda ve arkadaşlarının (2016) tuz stresi altında *Triticum aestivum* L. cv. mv Beres bitkisi üzerinde yaptıkları çalışmada; tuza alıştıırılan gruplarda, KAT enzim aktivitesinin arttığı belirlenmiştir. Ayrıca SA88 kùltivarının tuz uygulanan grubunda H₂O₂ miktarı artarken, Erensoy’da belirgin bir değişim gözlenmemiştir. Bu sonuç, SA88’in tuz uygulanan grubunda APX, POD ve KAT enziminin aktivitesindeki artışın yeterli olmadığını düşündürmektedir. Sonuç olarak, alıştırma grubunda salisilik asitteki artışın KAT enzim aktivitesini engellemediği kanısındayız.

5.6. Süperoksit Anyonu Savurma Kapasitesi

Reaktif oksijen türleri (ROT) kısmen O₂^{•-}’nin indirgenmesi veya O₂’ye enerji aktarımı sonucu kloroplastlarda sürekli olarak üretilmektedir ve çeşitli çevresel koşullara karşı cevapta sinyal molekülü olarak işlev görmektedir (Zelko ve ark., 2002; Apel ve Hirt, 2004; Das ve Roychoudhury, 2014). En önemli reaktif oksijen türlerinden biri olan süperoksit anyon radikalleri, özellikle mitokondriyal solunumda metabolizmanın yan ürünleri olarak üretilmekte ve hidrojen peroksit, peroksinitrit ve hidroksil kökleri gibi diğer toksik ROT türlerinin üretimi için öncül madde olarak görev almaktadır (Gao ve ark., 2014).

Çalışmamızda her iki kùltivarın alıştırma ve tuz uygulanan grubunda, süperoksit anyon savurma kapasitesinin kontrole göre arttığı ve bu artışın özellikle Erensoy kùltivarında daha belirgin olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca her iki kùltivarın tuz uygulanan grubunda, alıştırma grubuna kıyasla artmıştır (Şekil 4.14). Buna paralel olarak Sharma ve Ramawat’ın (2013) *Salvadora persica* bitkisi üzerinde yaptıkları bir çalışmada; tuz stresi altında süperoksit anyonu savurma kapasitesinin arttığı tespit edilmiştir.

Bu sonuçlara bağlı olarak çalışmamızda; duyarlı kùltivarın SOD enzim aktivitesinin (Şekil 4.4), süperoksit anyonu savurma kapasitesinden daha etkili olduğu, toleranslı kùltivarın tuz uygulanan grubunda SOD enzimini tam olarak aktifleştirmeden de süperoksit anyonunu savurabildiği kanısındayız.

5.7. İçsel Salisilik Asit Düzeyi

Salisilik asit, bitkilerde savunma mekanizmasını başlatılmasından sorumlu bir sinyal molekülü olarak bilinmektedir (Halim ve ark., 2006). SA'nın, tuz ve ozmotik stres altında *Arabidopsis thaliana*'nın fotosentetik dokularındaki reaktif oksijen türlerinin (ROT) retimini güçlendirdiği böylece stres belirtilerinin gelişimine katkıda bulunduğu ve ayrıca eltik tohumlarında tuz stresi altında SA'nın içsel seviyesinin arttığı tespit edilmiştir (Borsani ve ark., 2001; Sawada ve ark., 2006). Çeşitli abiyotik ve biyotik streslerde SA ve H₂O₂ arasındaki etkileşimi açıklamak için bir "kendi kendini yükselten geri bildirim döngüsü" kavramı önerilmiştir. H₂O₂, SA birikimine neden olur ve SA, H₂O₂ konsantrasyonunu arttırır (Shirasu ve ark., 1997). Buna ek olarak Agarwal ve arkadaşlarının (2005) *Triticum aestivum* L. bitkisinde yaptıkları çalışmada; dışardan yapılan salisilik asit uygulamasının, bitkinin hidrojen peroksit miktarını arttırdığı tespit edilmiştir.

Çalışmamızda her iki kltivarın alıştırma grubunda, kontrole göre içsel salisilik asit değerlerinin arttığı ve bu artışın Erensoy kültivarında daha belirgin olduğu tespit edilmiştir (şekil 4.15). Bunun yanında, Erensoy kültivarının tuz uygulanan grubunda içsel salisilik asit kontrole göre artarken, SA88 kültivarında belirgin bir değişim görülmemiştir. Ayrıca toleranslı kltivarın alıştırma grubu içsel salisilik asit miktarını, tuz uygulanan gruba göre arttırmıştır (şekil 4.15). Buna paralel olarak, Hamayun ve arkadaşlarının (2010) tuz stresi altında *Glycine max* L. bitkisinde yaptıkları çalışmada; tuz uygulanan gruplarda içsel salisilik asit seviyesinin arttığı belirlenmiştir. Bu bilgiler doğrultusunda artan konsantrasyonlarda uygulanan NaCl'nin, salisilik asidi uyararak üretimini arttırdığını düşünmekteyiz.

Çalışmamızda dışardan herhangi bir salisilik asit uygulaması olmadığı gibi her iki kltivarın alıştırma uygulanan grubunda, içsel salisilik asit üretimi artarken; alıştırma gruplarında H₂O₂ miktarının azaldığı belirlenmiştir (şekil 4.3). Buna paralel olarak Khan ve arkadaşlarının (2014) yaptıkları çalışmada; *Vigna radiata* L. bitkisinin 50 mM NaCl uygulanan grupta H₂O₂ miktarı artarken, dışardan salisilik asit uygulanan grupta azalmıştır.

Elde edilen sonuçlara göre,içsel salisilik asidin hidrojen peroksit üretimini azaltabildiği ve tuz stresi altında yapılan alıştırma uygulamasının, SA üretimini uyarıcı yönde etkilediği kanısındayız.

5.8. *Gmnpr1* Gen İfadesi

NPR1; pek çok bitki türünde hastalığa karşı dirençte, *PR* genlerinin sentezlenmesinde ve sistemik kazanılmış direnç mekanizmasının düzenlenmesinde önemli rol oynar (Barsalobres-Cavallari ve ark., 2013). *NPR1* 'in salisilik asit (SA) aracılı gen ifadesinin anahtar düzenleyicisi olduğu bilinmesine rağmen (Fan ve Dong, 2002), *PR* geninin aktifleşmesine neden olan SA reseptörü hala belirlenememiştir. Gen aktivasyonu ve SA'nın algılanması ile ilgili önerilen modelde; SA'nın gen aktivasyonunu gerçekleştirmek için *NPR1* ile doğrudan etkileşime girdiği düşünülmektedir (Wu ve ark., 2012). Salisilik asit, *NPR1*-redoks düzenlenmesi için gereklidir ancak bu işlemi nasıl kontrol ettiği çok iyi anlaşılmamıştır (Vasquez ve ark., 2015). *NPR1* hem çekirdekte hem de sitozolde yer alır ve çekirdekte lokalize olmuş hali *PR-1*'i aktive etmek için gereklidir (Despres ve ark., 2000; Kinkema ve ark., 2000).

NPR1 aktivitesi, SA ve oksidatif stres tarafından teşvik edilen *TRXh* gen sınıfının üyesi olan tioredoksin (*TRXh5*) tarafından katalize edilir (Laloi ve ark., 2004; Tada ve ark., 2008; Kneeshaw ve ark., 2014; Belin ve ark., 2015).

GRXC9 (glutaredoksin C9 veya *GRX480*) ifadesi SA tarafından kontrol edilen ve redoks modifikasyonunun aracılık ettiği, Arabidopsis'e ait bir gendir (Vasquez ve ark., 2015). Ayrıca Arabidopsis bitkisinde *NPR1* bağımlı ve *NPR1* bağımsız SA sinyalleme olduğu bilinmektedir (Uquillas ve ark., 2004; Jayakannan ve ark., 2015). *TRXh5* ve *GRXC9*'un, sırasıyla NADPH'nin ve GSH'nin indirgenmesini azaltabildiği ve bu enzimlerin transkripsiyonu sonucunda hücrel redoks durumunun düzenlenebildiği belirlenmiştir (Meyer ve ark., 2012).

Çalışmamızda duyarlı ve tolarensli kùltivarın alıştırma gruplarındaki *Gmnpr1* gen ifadesi artmıştır ancak en belirgin artışın her iki kùltivarın tuz uygulanan gruplarında olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.16). Bunun yanı sıra Sandhu ve arkadaşlarının (2009) soya bitkisi üzerinde yaptıkları çalışmada, biyotik strese maruz kalan bitkide *Gmnpr1* gen ifadesini arttığı tespit edilmiştir.

Ayrıca Jayakannan ve arkadaşlarının (2015) tuz stresi altında Arabidopsis bitkisinin mutantları üzerinde yaptıkları çalışmada, *NPR1* geni aktif olan mutantın, köklerden Na^+ girişini daha iyi kontrol ettiği ve K^+ kaybını önlediği belirlenmiştir. Sonuç olarak *Gmnpr1* gen ifadesinin; Erensoy'un tuz uygulanan grubunda, SA88'in tuz uygulanan grubuna oranla daha fazla arttığı, *NPR1*'den bağımsız bir SA sinyallenmesinin olduğu ve her iki kültürün tuz uygulanan gruplarında, tuz stresinin oluşturduğu aşırı ROT birikiminin, SA'dan bağımsız olarak *NPR1* gen ifadesini arttırmada rol oynadığı kanısındayız.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Elde edilen veriler, duyarlı bir kültür olan SA88'de, tuz stresinin oluşturduğu oksidatif hasarı, alıştırma uygulamasının antioksidan enzimleri (APX, KAT, GST) aktifleştirerek azaltabildiği belirlenmiştir. Ayrıca tuz stresi altında her iki kültürün alıştırma grubunda, içsel SA düzeyi birikiminin arttığı gözlenmiştir. Bu çalışmada ilk defa, ROT'un sinyal rolü üstlenerek çeşitli genlerin uyarımında yer alabildiği, kademeli olarak artan tuz uygulamasının stres esnasındaki sinyallemede ve SA hormonu ile etkileşimde bulunduğu tespit edilmiştir. Bunun yanında her iki kültürün tuz uygulanan gruplarının *Gmnpr1* gen ifadesindeki artışta, stres esnasında oluşan ROT ürünlerinin rol oynadığı belirlenmiştir. Böylece ROT'un uyarımı sayesinde, *NPR1*'in SA'dan bağımsız olarak aktifleştiği sonucuna varılmıştır. Bu etkileşimin daha iyi aydınlatılması için biyokimyasal, moleküler ve gen düzeyindeki çalışmaların devam etmesi gerektiği kanısındayız.

KAYNAKLAR

- Abraham, E., Rigo, G., Szekely, G., Nagy, R., Koncz, C., and Szabados, L. 2003. Light dependent induction of proline biosynthesis by abscisic acid and salt stress is inhibited by brassinosteroid in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology*, 51:363-372.
- Acar, M., ve Üstün, A. 2010. Mucize bitki soya ve Türkiye için önemi. *Hasad Dergisi*, 231:18-21.
- Acar, R., Yorgancılar, M., Atalay, E., ve Yaman, C. 2011. Farklı tuz uygulamalarının bezelyede (*Pisum sativum* L.) bağıl su içeriği, klorofil ve bitki gelişimine etkisi. *Selçuk Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 25:42-46.
- Afzal, I., Basra, S.M.A., Hameed, A., and Farooq, M. 2006. Physiological enhancements for alleviation of salt stress in wheat. *Pakistan Journal of Botany*, 38:1649-1659.
- Agarwal, S., and Pandey, V. 2004. Antioxidant enzyme responses to NaCl stress in *Cassia angustifolia*. *Biologia Plantarum*, 48:555-560.
- Agarwal, S., Sairam, R.K., Srivastava, G.C., and Meena, R.C. 2005. Changes in antioxidant enzymes activity and oxidative stress by abscisic acid and salicylic acid in wheat genotypes. *Biologia Plantarum*, 49:541-550.
- Ahmad, P., Jaleel, C.A., and Sharma, S. 2010. Antioxidant defense system, lipid peroxidation, proline-metabolizing enzymes, and biochemical activities in two *Morus alba* genotypes subjected to NaCl stress. *Russian Journal of Plant Physiology*, 57:509-517.
- Ahmad, P., Jaleel, C.A., Salem, M.A., Nabi, G., and Sharma, S. 2010. Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. *Critical Reviews in Biotechnology*, 30:161-175.
- Ahmad, P., John, R., Sarwat, M., and Umar, S. 2012. Responses of proline lipid peroxidation and antioxidative enzymes in two varieties of *Pisum sativum* L. under salt stress. *International Journal of Plant Production*, 2:353-366.
- Ahmad, P., Kumar, A., Ashraf, M., and Akram, N.A. 2012. Salt induced changes in photosynthetic activity and oxidative defense system of three cultivars of mustard (*Brassica juncea* L.). *African Journal of Biotechnology*, 11:2694.

- Aksoy M., and Dinler B.S. 2014. Different responses in acclimated and non-acclimated processes of soybean leaves to salinity. *Fresenius Environmental Bulletin*, 238:1915-1919.
- Alarcon, J.J., Sanchez-Blanco, M.J., Bolarin, M.C., and Torrecillas, A. 1993. Water relations and osmotic adjustment in *Lycopersicon esculentum* and *L. pennellii* during short-term salt exposure and recovery. *Physiologia Plantarum*, 89:441-447.
- Alscher, R.G., Erturk, N., and Heath, L.S. 2002. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*, 53:1331-1341.
- Altınışik, M. 2000. Serbest oksijen radikalleri ve antioksidanlar. ADÜ Tıp Fakültesi, Biyokimya AD., Aydın.
- An, C., and Mou, Z. 2011. Salicylic acid and its function in plant immunity. *Journal of Integrative Plant Biology*, 53:412-428.
- Apel, K., and Hirt, H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55:373-399.
- Arioğlu, 2013 <http://halisarioglu.com/doc/atlas-soya-halis.doc>
- Asada, K. 1987. Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. *Photoinhibition*, 227-287.
- Asada, K. 1992. Ascorbate peroxidase a hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plantarum*, 85:235-241.
- Ashraf, M. 2010. Inducing drought tolerance in plants: recent advances. *Biotechnology Advances*, 28:169-183.
- Ashraf, M.P.J.C., and Harris, P.J.C. 2004. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Science*, 166:3-16.
- Azooz, M.M. 2009. Salt stress mitigation by seed priming with salicylic acid in two faba bean genotypes differing in salt tolerance. *International Journal of Agriculture and Biology*, 11:343-350.

- Azooz, M.M., Youssef, A.M., and Ahmad, P. 2011. Evaluation of salicylic acid application on growth, osmotic solutes and antioxidant enzyme activities on broad bean seedlings grown under diluted seawater. *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry*, 3:253-264.
- Badawi, G. H., Kawano, N., Yamauchi, Y., Shimada, E., Sasaki, R., Kubo, A., and Tanaka, K. 2004. Over-expression of ascorbate peroxidase in tobacco chloroplasts enhances the tolerance to salt stress and water deficit. *Physiologia Plantarum*, 121:231-238.
- Barsalobres C.C., Petitot, A., Severino, F., Maia, I., and Fernandez, D. 2013. Host response profiling to fungal infection: molecular cloning, characterization and expression analysis of *NPR1* gene from coffee (*Coffea arabica*) microbial pathogens and strategies for combating them. *Science Technology and Education*, 1.
- Bates, L.S., Waldren, R.P., and Teare, I.D. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil*, 39:205-207.
- Beauchamp, C., and Fridovich, I. 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 44:276-287.
- Belin, C., Bashandy, T., Cela, J., Delorme-Hinoux, V., Riondet, C., and Reichheld, J.P. 2015. A comprehensive study of thiol reduction gene expression under stress conditions in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell and Environment*, 38:299-314.
- Bergmeyer, N. 1970. Methoden der enzymatischen analyse. Akademie Verlag, Berlin pp. 599-607.
- Blokhina, O., and Fagerstedt, K.V. 2010. Oxidative metabolism ROS And no under oxygen deprivation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48:359-373.
- Bor, M., Özdemir, F., and Türkan, I. 2003. The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in leaves of sugar beet *Beta vulgaris* L. and wild beet *Beta maritima* L. *Plant Science*, 164:77-84.
- Borsani, O., Valpuesta, V., and Botella, M. A. 2001. Evidence for a role of salicylic acid in the oxidative damage generated by NaCl and osmotic stress in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Physiology*, 126:1024-1030.

- Borsani, O., Valpuesta, V., and Botella, M.A. 2003. Developing salt tolerant plants in a new century: a molecular biology approach. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 73:101-115.
- Chaouch, S., and Noctor, G. 2010. Myo-inositol abolishes salicylic acid-dependent cell death and pathogen defence responses triggered by peroxisomal hydrogen peroxide. *New Phytologist*, 188:711-718.
- Chen, Z., Silva, H., and Klessig, D.F. 1993. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science*, 262:1883-1886.
- Chittor, S.S. 1997. Method and apparatus for enhancing the fault-tolerance of a network. U.S. Patent and Trademark Office, Washington, DC.
- Choudhury, S., Panda, P., Sahoo, L., and Panda, S.K. 2013. Reactive oxygen species signaling in plants under abiotic stress. *Plant Signaling & Behavior*, 8:E23681.
- Dalton, D. A., Boniface, C., Turner, Z., Lindahl, A., Kim, H. J., Jelinek, L., and Taylor, C.G. 2009. Physiological roles of glutathione S-transferases in soybean root nodules. *Plant Physiology*, 150:521-530.
- Das, K., and Roychoudhury, A. 2014. Reactive oxygen species and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science*, 2:53.
- Davies, W.J., Wilkinson, S., and Loveys, B. 2002. Stomatal control by chemical signalling and the exploitation of this mechanism to increase water use efficiency in agriculture. *New Phytologist*, 153:449-460.
- De Azevedo Neto A.D., Prisco J.T., Enéas-Filho J., De Abreu C.E.B., and Gomesfilho, E. 2006. Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes. *Environmental and Experimental Botany*, 56:87-94.
- De Rosa, G., Duncan, D.S., Keen, C.L., and Hurley, L.S. 1979. Evaluation of negative staining technique for determination of CN insensitive superoxide dismutase activity. *Biochimica Et Biophysica Acta Enzymology*, 566:32-39.

- Dehghan, G., Rezazadeh, L., and Habibi, G. 2011. Exogenous ascorbate improves antioxidant defense system and induces salinity tolerance in soybean seedlings. *Acta Biologica Szegediensis*, 55:261-264.
- Dempsey, D.M.A., Vlot, A.C., Wildermuth, M.C., and Klessig, D.F. 2011. Salicylic acid biosynthesis and metabolism. *The Arabidopsis Book*, e0156.
- Despres, C., Delong, C., Glaze, S., Liu, E., and Fobert, P.R. 2000. The Arabidopsis *NPR1/NIM1* protein enhances the DNA binding activity of a subgroup of the TGA family of bZIP transcription factors. *The Plant Cell*, 12:279-290.
- Dinler, B.S., Antoniou, C., and Fotopoulos, V. 2014. Interplay between GST and nitric oxide in the early response of soybean (*Glycine max* L.) plants to salinity stress. *Journal of Plant Physiology*, 171:1740-1747.
- Dixon, D. P., Lapthorn, A., and Edwards, R. 2002. Plant glutathione transferases. *Genome Biology*, 3:3004-1.
- Djanaguiraman, M., Sheeba, J.A., Shanker, A.K., Devi, D.D., and Bangarusamy, U. 2006. Rice can acclimate to lethal level of salinity by pretreatment with sublethal level of salinity through osmotic adjustment. *Plant and Soil*, 284:363-373.
- Durang, W.E., and Dong, X. 2004. Systemic Acquired Resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 42:185-209.
- Durner, J., and Klessig, D.F. 1996. Salicylic acid is a modulator of tobacco and mammalian catalases. *Journal of Biological Chemistry*, 271:28492-28501.
- Ekmekçi, Y., and Terzioglu, S. 2005. Effects of oxidative stress induced by paraquat on wild and cultivated wheats. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 83:69-81.
- El-Mashad, A.A.A. and Mohamed, H. I. 2012. Brassinolide alleviates salt stress and increases antioxidant activity of cowpea plants (*Vigna sinensis*). *Protoplasma*, 249:625-635.
- Essa, T.A. 2002. Effect of salinity stress on growth and nutrient composition of three soybean (*Glycine max* L. Merrilli) cultivars. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 188:86-93.

- Etehadnia, M., Schoenau, J., Waterer, D., and Karen, T. 2010. The effect of CaCl_2 and NaCl salt acclimation in stress tolerance and its potential role in ABA and scion/rootstock-mediated salt stress responses. *Plant Stress*, 4:72-81.
- Fahad, S., Hussain, S., Matloob, A., Khan, F.A., Khaliq, A., Saud, S., and Faiq, M. 2015. Phytohormones and plant responses to salinity stress: a review. *Plant Growth Regulation*, 75:391-404.
- Fan, W., and Dong, X. 2002. In vivo interaction between *NPR1* and transcription factor TGA2 leads to salicylic acid-mediated gene activation in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 14:1377-1389.
- Farhoudi, R., Hussain, M., and Lee, D.J. 2012. Modulation of enzymatic antioxidants improves the salinity resistance in canola (*Brassica napus*). *International Journal of Agriculture and Biology*, 14:465-468.
- Feechan, A., Kwon, E., Yun, B.W., Wang, Y., Pallas, J.A., and Loake, G.J. 2005. A central role for s-nitrosothiols in plant disease resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102:8054-8059.
- Flores, M.I., Romero-Gonzalez, R., Frenich, A.G., and Martinez-Vidal J.L. 2011. Quechers-based extraction procedure for multifamily analysis of phytohormones in vegetables by uhpl cms/ms. *Journal of Separation Science*, 34:1517-1524.
- Flowers, T.J., and Yeo, A.R. 1995. Breeding for salinity resistance in crop plants: where next?. *Functional Plant Biology*, 22:875-884.
- Frova, C. 2006. Glutathione transferases in the genomics era: new insights and perspectives. *Biomolecular Engineering*, 23:149-169.
- Galvez-Valdivieso, G., and Mullineaux, P.M. 2010. The role of reactive oxygen species in signalling from chloroplasts to the nucleus. *Physiologia Plantarum*, 138:430-439.
- Gao, S., Ouyang, C., Wang, S., Xu, Y., Tang, L., and Chen, F. 2008. Effects of salt stress on growth, antioxidant enzyme and phenylalanine ammonia-lyase activities in *Jatropha curcas* L. seedlings. *Plant Soil Environmental*, 54:374-381.

- Gao, X., Ding, C., Zhu, A., and Tian, Y. 2014. Carbon-dot-based ratiometric fluorescent probe for imaging and biosensing of superoxide anion in live cells. *Analytical Chemistry*, 86:7071-7078.
- Gayatri Devi, S., Jayalakshmi, S.K., and Sreeramulu, K. 2012. Salicylic acid is a modulator of catalase isozymes in chickpea plants infected with *Fusarium oxysporum* f. sp. Ciceri. *Plant Physiology and Biochemistry*, 52:154-161.
- Gechev, T.S., Van Breusegem, F., Stone, J.M., Denev, I., and Laloi, C. 2006. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *Bioessays*, 28:1091-1101.
- Ghassemi-Golezani, K., Taiefeh-Noor, M., Oustan, S., Moghaddam, M., and Seyyed-Rahmani, S., 2010. Oil and protein accumulation in soybean grains under salinity stress. *Notulae Scientia Biologicae*, 2:64-67.
- Gill, S.S., and Tuteja, N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48:909-930.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., and Jakoby, W.B. 1974. Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, 249:7130-7139.
- Halim, V.A., Vess, A., Scheel, D., and Rosahl, S. 2006. The role of salicylic acid and jasmonic acid in pathogen defence. *Plant Biology*, 8:307-313.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J.M. 1986. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 246:501-514.
- Hamayun, M., Khan, S.A., Khan, A.L., Shinwari, Z.K., Hussain, J., Sohn, E.Y., and Lee, I.J. 2010. Effect of salt stress on growth attributes and endogenous growth hormones of soybean cultivar hwangkeumkong. *Pakistan Journal of Botany*, 42:3103-3112.
- Hare, P.D., and Cress, W.A. 1997. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regulation*, 21:79-102.

- Hasanuzzaman, M., Gill, S.S., and Fujita, M. 2012. Physiological role of nitric oxide in plants grown under adverse environmental conditions, plant acclimation to environmental stress, Springer: Newyork, pp. 269-322
- Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.K., and Bohnert, H.J. 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Biology*, 51:463-499.
- Hayat, Q., Hayat, S., Irfan, M., and Ahmad, A. 2010. Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: a review. *Environmental and Experimental Botany*, 68:14-25.
- Hernandez, J.A., Jimenez, A., Mullineaux, P., and Sevilla, F. 2000. Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defences. *Plant Cell & Environment*, 23:853-862.
- Herrera-Vasquez, A., Carvallo, L., Blanco, F., Tobar, M., Villarroel-Candia, E., Vicente-Carbajosa, J., and Holuigue, L. 2015. Transcriptional control of glutaredoxin *GRXC9* expression by a salicylic acid-dependent and *NPR1*-independent pathway in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology Reporter*, 33:624-637.
- Herrera-Vasquez, A., Salinas, P., and Holuigue, L. 2015. Salicylic acid and reactive oxygen species interplay in the transcriptional control of defense genes expression. *Frontiers in Plant Science*, 6:171.
- Herzog V, and Fahimi H. 1973. Determination of the activity of peroxidase. *Analytical Biochemistry*, 5:554-562.
- Hiraga, S., Sasaki, K., Ito, H., Ohashi, Y., and Matsui, H. 2001. A large family of class III plant peroxidases. *Plant and Cell Physiology*, 42:462-468.
- Horvath, E., Pál, M., Szalai, G., Paldi, E., and Janda, T. 2007. Exogenous 4-hydroxybenzoic acid and salicylic acid modulate the effect of short-term drought and freezing stress on wheat plants. *Biologia Plantarum*, 51:480-487.
- Hossain, M. A., Bhattacharjee, S., Armin, S. M., Qian, P., Xin, W., Li, H. Y., and Tran, L.S.P. 2015. Hydrogen peroxide priming modulates abiotic oxidative stress tolerance: insights from ROS detoxification and scavenging. *Frontiers in Plant Science*, 6:420.

- Jain, M., Mathur, G., Koul, S., and Sarin, N. 2001. Ameliorative effects of proline on salt stress-induced lipid peroxidation in cell lines of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Cell Reports*, 20:463-468.
- Janda, M., and Ruelland, E. 2015. Magical mystery tour: salicylic acid signalling. *Environmental and Experimental Botany*, 114:117-128.
- Janda, T., Darko, E., Shehata, S., Kovács, V., Pal, M., and Szalai, G. 2016. Salt acclimation processes in wheat. *Plant Physiology and Biochemistry*, 101:68-75.
- Jayakannan, M., Bose, J., Babourina, O., Shabala, S., Massart, A., Poschenrieder, C., and Rengel, Z. 2015. The *NPR1*-dependent salicylic acid signalling pathway is pivotal for enhanced salt and oxidative stress tolerance in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, 66:1865-1875.
- Kaur, G., and Asthir, B. 2015. Proline: a key player in plant abiotic stress tolerance. *Biologia Plantarum*, 59:609-619.
- Kaya, C., Ashraf, M., and Sönmez, O. 2015. Promotive effect of exogenously applied thiourea on key physiological parameters and oxidative defense mechanism in salt-stressed *Zea mays* L. plants. *Turkish Journal of Botany*, 39:786-795.
- Khan, M.I.R., Asgher, M., and Khan, N.A. 2014. Alleviation of salt-induced photosynthesis and growth inhibition by salicylic acid involves glycine betaine and ethylene in mungbean (*Vigna radiata* L). *Plant Physiology and Biochemistry*, 80:67-74.
- Kinkema, M., Fan, W., and Dong, X. 2000. Nuclear localization of *NPR1* is required for activation of *PR* gene expression. *The Plant Cell*, 12:2339- 2350.
- Kinney, A.J., and Clemente, T.E. 2005. Modifying soybean oil for enhanced performance in biodiesel blends. *Fuel Processing Technology*, 86:1137-1147.
- Kneeshaw, S., Gelineau, S., Tada, Y., Loake, G.J., and Spoel, S.H. 2014. Selective protein denitrosylation activity of thioredoxin-h5 modulates plant immunity. *Molecular Cell*, 56: 153-162.

- Koca, H., Bor, M., Özdemir, F., and Türkan, I. 2007. The effect of salt stress on lipid peroxidation, antioxidative enzymes and proline content of sesame cultivars. *Environmental and Experimental Botany*, 60:344-351.
- Koç, E., ve Üstün, A.S. 2008. Patojenlere karşı bitkilerde savunma ve antioksidanlar. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 24:82-100.
- Kranner, I., and Seal, C.E. 2013. Salt stress signalling and redox control in seeds. *Functional Plant Biology*, 40:848-859.
- Kuai, X., and Despres, C. 2016. Defining Arabidopsis *NPR1* orthologues in crops for translational plant immunity. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 38:25-30.
- Laemli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685.
- Laloi, C., Mestres-Ortega D., Marco Y., Meyer, Y., and Reichheld, J.P. 2004. The Arabidopsis cytosolic thioredoxin h5 gene induction by oxidative stress and its w-box-mediated response to pathogen elicitor. *Plant Physiology*, 134:1006-1016.
- Lauchli, A., and Grattan, S.R. 2007. Plant growth and development under salinity stress. in *advances in molecular breeding toward drought and salt tolerant crops*. Springer: Dordrecht, pp. 1-32.
- Lauchli, A., and Wieneke, J. 1979. Studies on growth and distribution of Na⁺, K⁺ and Cl⁻ in soybean varieties differing in salt tolerance. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde*, 142:3-13.
- Ledesma, F., Lopez, C., Ortiz, D., Chen, P., Korth, K.L., Ishibashi, T., and Florez-Palacios, L. 2016. A simple greenhouse method for screening salt tolerance in soybean. *Crop Science*, 56:585-594.
- Lee, D.H., Kim, Y.S., and Lee, C.B. 2001. The inductive responses of the antioxidant enzymes by salt stress in the rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Plant Physiology*, 158:737-745.
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R., and Lamb, C. 1994. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*, 79:583-593.

- Li, T., Hu, Y., Du, X., Tang, H., Shen, C., and Wu, J. 2014. Salicylic acid alleviates the adverse effects of salt stress in *Torreyia grandis* cv. Merrilli seedlings by activating photosynthesis and enhancing antioxidant systems. PLOS One, 9:e109492.
- Lichtenthaler, H.K., and Wellburn, A.R. 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. Biochemical Society Transactions, 591-592.
- Lindermayr, C., Sell, S., Müller, B., Leister, D., and Durner, J. 2010. redox regulation of the *NPR1-TGA1* system of *Arabidopsis thaliana* by nitric oxide. The Plant Cell, 22:2894-2907.
- Love, A.J., and Milner, J.J., Sadanandom, A. 2008. Timing is everything: regulatory overlap in plant cell death. Trends in Plant Science, 13:589-595.
- Lu, H., Greenberg, J.T., and Holuigue, L. 2016. Salicylic acid signaling networks. Frontiers in Plant Science, 7:238.
- Madhavo, R., and Sresty, T. 2000. Antioxidative parameters in the seedlings of pigeon pea (*Cajanus cajan* L. Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses. Plant Science, 157:113-12.
- Mai, L.Q., and Hang, H.T. 2016. Evaluation of the proline content in tissues of soybean *Glycine max* [L] Merr Dt26 cultivar during salt acclimation. Vnu Journal of Science: Natural Sciences and Technology, 32:307-312.
- Mansour, M.M.F., Salama, K.H.A., Ali, F.Z.M., and Hadid, A.F. 2005. Cell and plant responses to NaCl in *Zea mays* L. cultivars differing in salt tolerance. General and Applied Plant Physiology, 31:29-41.
- Mansour, M.M.F. 1998. Protection of plasma membrane of onion epidermal cells by glycinebetaine and proline against NaCl stress. Plant Physiology and Biochemistry, 36:767-772.
- Marrs, K.A. 1996. The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. Annual Review of Plant Biology, 47:127-158.

- Martin, G.B., Bogdanove, A.J., and Sessa, G. 2003. Understanding the functions of plant disease resistance proteins. *Annual Review of Plant Biology*, 54:23-61.
- Matamoros, M.A., Dalton, D. A., Ramos, J., Clemente, M.R., Rubio, M.C., and Becana, M. 2003. Biochemistry and molecular biology of antioxidants in the rhizobia-legume symbiosis. *Plant Physiology*, 133:499-509.
- McGonigle, B., and O'keefe, D.P. 2000. U.S. Patent No. 6,063,570. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Meyer, Y., Belin, C., Delorme-Hinoux, V., Reichheld, J.P., and Riondet, C. 2012. Thioredoxin and glutaredoxin systems in plants: molecular mechanisms, crosstalks, and functional significance. *Antioxidants Redox Signaling*, 17:1124–1160.
- Misra, N., and Gupta, A.K. 2005. Effect of salt stress on proline metabolism in two high yielding genotypes of green gram. *Plant Science*, 169:331-339.
- Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7:405-410.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., and Van-Breusegem, F. 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, 9:490-498.
- Mittler, R., and Blumwald, E. 2015. The roles of ROS and ABA in systemic acquired acclimation. *The Plant Cell*, 27:64-70.
- Mittler, R., and Zilinskas, B.A. 1993. Detection of ascorbate peroxidase activity in native gels by inhibition of the ascorbate-dependent reduction of nitroblue tetrazolium. *Analytical Biochemistry*, 212:540-546.
- Miura, K., and Tada, Y. 2014. Regulation of water salinity and cold stress responses by salicylic acid. *Frontiers Plant Science*, 5:4.
- Mohsenzadeh, S., Esmaeili, M., Moosavi, F., Shahrtash, M., Saffari, B., and Mohabatkar, H. 2011. Plant glutathione S-transferase classification, structure and evolution. *African Journal of Biotechnology*, 10:8160-8165.

- Moons, A. 2005. Regulatory and functional interactions of plant growth regulators and plant glutathione s-transferases (GSTs). *Vitamins & Hormones*, 72:155-202.
- Moreau, M., Tian, M., and Klessig, D.F. 2012. Salicylic acid binds NPR3 and NPR4 to regulate *NPR1*-dependent defense responses. *Cell Research*, 22:1631.
- Mou, Z., Fan, W., and Dong, X. 2003. Inducers of plant systemic acquired resistance regulate *NPR1* function through redox changes. *Cell*, 113:935-944.
- Munns, R., Guo, J., Passioura, J.B., and Cramer, G.R. 2000. Leaf water status controls day-time but not daily rates of leaf expansion in salt-treated barley. *Functional Plant Biology*, 27:949-957.
- Munns, R., James, R.A., and Lauchli, A. 2006. Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. *Journal of Experimental Botany*, 57:1025-1043.
- Nakano, Y., and Asada, K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell and Physiology*, 22:867-880.
- Nazar, R., Iqbal, N., Syeed, S., and Khan, N.A. 2011. Salicylic acid alleviates decreases in photosynthesis under salt stress by enhancing nitrogen and sulfur assimilation and antioxidant metabolism differentially in two mungbean cultivars. *Journal of Plant Physiology*, 168:807-815.
- Noctor, G., Mhamdi, A., Chaouch, S., Han, Y. I., Neukermans, J., Marquez Garcia, B E.L. E.N., and Foyer, C.H. 2012. Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant Cell & Environment*, 35:454-484.
- Osakabe, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., and Tran, L.S.P. 2013. Sensing the environment: key roles of membrane-localized kinases in plant perception and response to abiotic stress. *Journal of Experimental Botany*, 64:445-458.
- Palma, F., Tejera, N.A., and Lluch, C. 2013. Nodule carbohydrate metabolism and polyols involvement in the response of *Medicago sativa* to salt stress. *Environmental and Experimental Botany*, 85:43-49.
- Pandolfi, C., Azzarello, E., Mancuso, S., and Shabala, S. 2016. acclimation improves salt stress tolerance in *Zea mays* plants. *Journal of Plant Physiology*, 201:1-8.

- Parida, A.K., and Das, A.B. 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60:324-349.
- Parvaiz, A., and Satyawati, S. 2008. Salt stress and phyto-biochemical responses of plants-a review. *Plant Soil and Environment*, 54:89.
- Pfaffl, M., Horgan G., and Dempfle, L. 2002. Relative expression software tool (rest©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, 30:E36-E36.
- Phang, T.H., Shao, G., and Lam, H.M. 2008. Salt tolerance in soybean. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50:1196-1212.
- Pieterse, C.M., Van , D.D., Zamioudis, C., Leon, R.A., and Van W.S.C. 2012. Hormonal modulation of plant immunity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 28:489-521.
- Poljakoff-Mayber, A. 1982. Biochemical and physiological responses of higher plants to salinity stress biosaline research a look to the future. Plenum Press: New York, 245-270.
- Quan, L.J., Zhang, B., Shi, W.W., and Li, H.Y. 2008. Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50:2-18.
- Queval, G., and Noctor, G. 2007. A plate reader method for the measurement of NAD, NADP, glutathione, and ascorbate in tissue extracts: application to redox profiling during *Arabidopsis* rosette development. *Analytical Biochemistry*, 363:58-69.
- Queval, G., Thominet, D., Vanacker, H., Miginiac-Maslow, M., Gakière, B., and Noctor, G. 2009. H₂O₂ activated up-regulation of glutathione in *Arabidopsis* involves induction of genes encoding enzymes involved in cysteine synthesis in the chloroplast. *Molecular Plant*, 2:344-356.
- Ricci, G., Bello, M.L., Caccuri, A.M., Galianzo, F., and Federici, G. 1984. Detection of glutathione transferase activity on polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 143:226-230.

- Rusterucci, C., Espunya, M. C., Díaz, M., Chabannes, M., and Martínez, M.C. 2007. S-nitrosogluthathione reductase affords protection against pathogens in *Arabidopsis* both locally and systemically. *Plant Physiology*, 143:1282-1292.
- Saha, P., Chatterjee, P., and Biswas, A.K. 2010. NaCl pretreatment alleviates salt stress by enhancement of antioxidant defense system and osmolyte accumulation in mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek). *Indian Journal of Experimental Biology*, 48:593-600.
- Sanchez-Blanco, M.J., Bolarin, M.C., Alarcon, J.J., and Torrecillas, A. 1991. Salinity effects on water relations in *Lycopersicon esculentum* and its wild salt-tolerant relative species *L. pennellii*. *Physiologia Plantarum*, 83:269-274.
- Sandhu, D., Tasma, I.M., Frasc, R., and Bhattacharyya, M.K. 2009. Systemic acquired resistance in soybean is regulated by two proteins, orthologous to *Arabidopsis NPR1*. *BMC PlantBiology*, 9:105.
- Sappl, P.G., Carroll, A.J., Clifton, R., Lister, R., Whelan, J., Harvey Millar, A., and Singh, K. B. 2009. The *Arabidopsis* glutathione transferase gene family displays complex stress regulation and co-silencing multiple genes results in altered metabolic sensitivity to oxidative stress. *The Plant Journal*, 58:53-68.
- Sawada, H., Shim, I.S., and Usui, K. 2006. Induction of benzoic acid 2-hydroxylase and salicylic acid biosynthesis modulation by salt stress in rice seedlings. *Plant Science*, 2: 263-270.
- Scandalios, J.G., Guan, L., and Polidoros, A.N. 1997. Catalases in plants: gene structure, properties, regulation, and expression. *Cold Spring Harbor Monograph Series*, 34:343-406.
- Seevers, P.M., Daly, J.M., and Catedral, F.F. 1971. The role of peroxidase isozymes in resistance to wheat stem rust disease. *Plant Physiology*, 48: 353-360.
- Seyfferth, C., and Tsuda, K. 2014. Salicylic acid signal transduction: the initiation of biosynthesis, perception and transcriptional reprogramming. *Frontiers in Plant Science*, 5:697.
- Shah, J. 2009. Plants under attack: systemic signals in defence. *Current Opinion in Plant Biology*, 12:459-464.

- Shah, J., and Zeier, J. 2013. Long-distance communication and signal amplification in systemic acquired resistance. *Frontiers in Plant Science*, 4:30.
- Shah, J., Chaturvedi, R., Chowdhury, Z., Venables, B., and Petros, R.A. 2014. Signaling by small metabolites in systemic acquired resistance. *The Plant Journal*, 79:645-658.
- Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R.S., and Pessarakli, M. 2012. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany*, 26.
- Sharma, V., and Ramawat, K.G. 2013. Salinity-induced modulation of growth and antioxidant activity in the callus cultures of miswak (*Salvadora persica*). *3 Biotech*, 3:11-17.
- Shirasu, K., Nakajima, H., Rajasekhar, V.K., Dixon, R.A., and Lamb, C. 1997. Salicylic acid potentiates an agonist-dependent gain control that amplifies pathogen signals in the activation of defense mechanisms. *The Plant Cell*, 9:261-270.
- Siddiqi, E.H., Ashraf, M., Al-Qurainy, F., and Akram, N.A. 2011. Salt-induced modulation in inorganic nutrients, antioxidant enzymes, proline content and seed oil composition in safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91:2785-2793.
- Siripornadulsil, S., Traina, S., Verma, D.P.S., and Sayre, R.T. 2002. Molecular mechanisms of proline-mediated tolerance to toxic heavy metals in transgenic microalgae. *The Plant Cell*, 14:2837-2847.
- Smart, R.E., and Bingham, G.E. 1974. Rapid estimates of relative water content. *Plant Physiology*, 53:258-260.
- Sudhakar, C., Lakshmi, A., and Giridarakumar, S. 2001. Changes in the antioxidant enzyme efficacy in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) under NaCl salinity. *Plant Science*, 161:613-619.
- Swanson, S., and Gilroy, S. 2010. ROS in plant development. *Physiologia Plantarum*, 138:384-392.

- Tada, Y., Spoel, S.H., Pajerowska-Mukhtar, K., Mou, Z., Song, J., Wang, C., and Dong, X. 2008. Plant immunity requires conformational changes of *NPR1* via s-nitrosylation and thioredoxins. *Science*, 321:952-956.
- Tanaka, K., Suda, Y., Kondo, N., and Sugahara, K. 1985. O₃ tolerance and the ascorbate-dependent H₂O₂ decomposing system in chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 26:1425-1431.
- Turan, M.A., Türkmen, N., and Taban, N. 2007. Effect of NaCl on stomatal resistance and proline, chlorophyll, Na, Cl and K concentrations of lentil plants. *Journal of Agronomy*, 6:378–381.
- Türkan, I., and Demiral, T. 2009. Recent developments in understanding salinity tolerance. *Environmental and Experimental Botany*, 67:2-9.
- Uquillas, C., Letelier, I., Blanco, F., Jordana, X., and Holuigue, L. 2004. *NPR1*-independent activation of immediate early salicylic acid-responsive genes in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17:34-42.
- Vanderauwera, S., Zimmermann, P., Rombauts, S., Vandenabeele, S., Langebartels, C., Grissem, W., and Van, B.F. 2005. Genome-wide analysis of hydrogen peroxide-regulated gene expression in *Arabidopsis* reveals a high light-induced transcriptional cluster involved in anthocyanin biosynthesis. *Plant Physiology*, 139:806-821.
- Velikova, V., Yordanov, I., and Edreva, A. 2000. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. *Plant Science*, 151:59-66.
- Vicente, M.R., and Plasencia, J. 2011. Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. *Journal of Experimental Botany*, 62:3321–3338.
- Vicuna, D. 2005. The role of peroxidases in the development of plants and their responses to abiotic stresses. Doctoral thesis, Dublin Institute of Technology, 146 page.

- Vidhyasekaran, P. 2015. Salicylic acid signaling in plant innate immunity. plant hormone signaling systems in plant innate immunity, Springer: Netherlands, pp. 27–122.
- Vlot, A.C., Dempsey, D.M.A., and Klessig, D.F. 2009. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. Annual Review of Phytopathology, 47:177-206.
- Wagner, U., Edwards, R., Dixon, D.P., and Mauch, F. 2002. Probing the diversity of the Arabidopsis glutathione S-transferase gene family. Plant Molecular Biology, 49:515-532.
- Woodbury, W., Spencer, A.K., Stahmann, M.A. 1971. An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isozymes. Analytical Biochemistry, 44:301-305.
- Wu, Y., Zhang, D., Chu, J.Y., Boyle, P., Wang, Y., Brindle, I.D., and Despres, C. 2012. The Arabidopsis *NPR1* protein is a receptor for the plant defense hormone salicylic acid. Cell Reports, 1:639-647.
- Xiong, L., Schumaker, K.S., and Zhu, J.K. 2002. Cell signaling during cold, drought, and salt stress. The Plant Cell, 14:165-183.
- Yan, S., and Dong, X. 2014. Perception of the plant immune signal salicylic acid. Current Opinion in Plant Biology, 20:64-68.
- Yang, T., and Poovaiah, B.W. 2002. Hydrogen peroxide homeostasis: activation of plant catalase by calcium/calmodulin. Proceedings of the National Academy of Sciences, 99: 4097-4102.
- Yaşar, F. 2003. Tuz stresi altındaki patlıcan genotiplerinde bazı antioksidant enzim aktivitelerinin in vitro ve in vivo olarak incelenmesi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri, Doktora Tezi, 139.
- Yaşar, F., Ellialtıglu, S., ve Yıldız, K. 2008. Effect of salt stress on antioxidant defence system, lipid peroxidation, and chlorophyll content in green bean. Russian Journal of Plant Physiology, 55:782-786.
- Yıldız, M., Terzi, H., Cenkci, S., Arıkan Terzi, E.S., ve Uruşak, B. 2010. Bitkilerde tuzluluğa toleransın fizyolojik ve biyokimyasal markörleri. Anadolu University Journal of Science and Technology-C Life Sciences and Biotechnology, 1:1-33

Yılmaz, E., Tuna, A.L., ve Bürün, B. 2011. Bitkilerin tuz stresi etkilerine karşı geliştirdikleri tolerans stratejileri. Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi, 47-66.

Yoshimura, K., Yabuta, Y., Ishikawa, T., and Shigeoka, S. 2000. Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. Plant Physiology, 123:223-234.

Zelko, I.N., Mariani, T.J., and Folz, R.J. 2002. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-Sod (SOD1), Mn-Sod (SOD2), and Ec-Sod (SOD3) gene structures, evolution and expression. Free Radical Biology and Medicine, 33:337-349.

Zhang, J., and Kirkham, M.B. 1996. Antioxidant responses to drought in sunflower and sorghum seedlings. New Phytologist, 132:361-373.

Zhou, M., Wang, W., Karapetyan, S., Mwimba, M., Marqués, J., Buchler, N.E., and Dong, X. 2015. Redox rhythm reinforces the circadian clock to gate immune response. Nature, 523:472.

Zhu, J.K. 2001. Plant salt tolerance. Trends in Plant Science, 6:66-71.

ÖZGEÇMİŞ

1. Kişisel Bilgiler

Ad Soyad	Ufkun Sarısoy
Doğum Tarihi	09.03.1992
Doğum Yeri	Ayancık
E-posta Adresi	ufkunsarisoy@outlook.com

2. Eğitim Bilgileri

Lisans	Sinop Üniversitesi - Biyoloji Bölümü - 2015
--------	---

3. Yayınlar, Çalışmalar

Makale

1. Gül, V., Dinler, B.S., Sarısoy, U. (2017). Effect of different NaCl concentrations on germinations period of oil sunflower seeds (*Helianthus annuus* L.) grown in the black sea region. Journal of Agricultural Science, 9:217.
2. Seckin, D.B., Tasci, E., Sarısoy, U., Gül, V. (2018). The cooperation between methyl jasmonate and salicylic acid to protect soybean (*Glycine max* L.) from salinity. Fresenius Environmental Bulletin, 27:1618-1626.
3. Sarısoy, U., Dinler, B.S., Tasci, E. (2018). The effects of *NPR1* dependent salicylic acid change in increasing salt tolerance of soybean leaves by acclimation. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 46:356-364.

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

Sarısoy Ufkun, Burcu Seckin Dinler, Eda Tascı (2016). Soya (*Glycine max*. L) bitkisinde alıştırma yolu ile tuz toleransını artırmada *NPR1* bağımlı salisilik asidin rolü. 2. Ulusal Bitki Fizyolojisi Sempozyumu, 85-85.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

Seckin Dinler Burcu, Tascı Eda, Sarısoy Ufkun, Gül Volkan (2017). The role of methyl jasmonate application in salicylic acid dependent reactive oxygen species scavenging in soybean (*Glycine max* L.) . ISEEP-2017 VIII. International Symposium on Ecology and Environmental Problems, 91.

