



**BAZI BİTKİ BÜYÜME DÜZENLEYİCİLERİNİN TUZ
STRESİ ALTINDAKİ BUĞDAYDA (*Triticum aestivum* L.)
AZOT METABOLİZMASI ÜZERİNE ETKİLERİ**

Ayşe Gülden ALHAN

**Yüksek Lisans Tezi
Biyoloji Anabilim Dalı
Botanik Bilim Dalı
Prof. Dr. Ökkeş ATICI
2019**

Her hakkı saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAZI BİTKİ BÜYÜME DÜZENLEYİCİLERİNİN TUZ STRESİ
ALTINDAKİ BUĞDAYDA (*Triticum aestivum* L.) AZOT
METABOLİZMASI ÜZERİNE ETKİLERİ

Ayşe Gülden ALHAN

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
Botanik Bilim Dalı

ERZURUM
2019

Her Hakkı Saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
TEZ ONAY FORMU



**BAZI BİTKİ BÜYÜME DÜZENLEYİCİLERİNİN TUZ STRESİ ALTINDAKİ BUĞDAYDA
(*Triticum aestivum* L.) AZOT METABOLİZMASI ÜZERİNE ETKİLERİ**

Prof. Dr. Ökkeş ATICI danışmanlığında, Ayşe Gülden ALHAN tarafından hazırlanan bu çalışma, 21/08/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı, Botanik Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği / oy çokluğu (.../...)** ile kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Özkan AKSAKAL

İmza :

Üye : Prof. Dr. Ökkeş ATICI

İmza :

Üye : Doç. Dr. Furkan ORHAN

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu'nun **05.09/2019** tarih ve **35.../...64** nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet KARAKAN
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BAZI BİTKİ BÜYÜME DÜZENLEYİCİLERİNİN TUZ STRESİ ALTINDAKİ BUĞDAYDA (*Triticum aestivum* L.) AZOT METABOLİZMASI ÜZERİNE ETKİLERİ

Ayşe Gülden ALHAN

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ökkeş ATICI

Bu çalışmada, ekzojen nitrik oksit (NO) ve hidrojen sülfürün (H₂S), tuz (NaCl) stresi altındaki buğday (*Triticum aestivum* L.) varyetelerinde (Altındane ve Doğu-88), büyüme-gelişme parametreleri ve azot metabolizması üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bu amaç için buğday fideleri bir iklim kabininde hidroponik sistemde uygun koşullarda (24/20 °C, gündüz/gece) büyütülmüştür. Çimlenmeyi takiben 10. gün, fide yapraklarına H₂S donörü olarak NaHS (1 ve 1.5 mM), NO donörü olarak SNP (0.5 ve 1 mM) uygulanmış ve sonra hidroponik sistem 150 ve 300 mM NaCl derişimine ayarlanmıştır. Uygulamadan 4 gün sonra, kontrol dahil fidelerin kök ve gövdelerinde; boy uzunluğu, kuru ağırlık, protein ve fotosentetik pigment miktarı (klorofil ve karotenoid) ve lipid peroksidasyonu seviyesi (LPO) ölçülmüştür. Ayrıca, azot metabolizmasında rol alan enzimlerden nitrat redüktaz (NR), nitrit redüktaz (NiR), glutamin sentaz (GS) ve glutamat sentaz (GOGAT) aktiviteleri belirlenmiştir. Çalışmada tek başına tuz uygulamaları, kontrol ile kıyaslandığında, iki buğday varyetesinin gövdelerinde boy uzunluğu, kuru ve yaş ağırlığı ve protein miktarını düşürürken, köklerinde bu parametreleri artırmıştır. Aynı tuz uygulamaları her iki varyetede, LPO (malondialdehid olarak) ve karotenoid içeriğini artırmış, ancak klorofil miktarını düşürmüştür. Tuz uygulamalarından özellikle 300 mM NaCl uygulaması, NR, NiR, GS ve GOGAT aktivitelerini genelde düşürmüştür. Tuz koşulları altındaki her iki buğday varyetesinde SNP ve NaHS uygulamaları tuz koşullarının neden olduğu bu olumsuzlukları genelde iyileştirebilmiştir. Bulgulara göre NO ve H₂S uygulamalarının, tuz stresi altındaki buğdayda, azot asimilasyonunu artırarak fizyolojik parametrelerin iyileşmesine ve tuz stresi toksisitesinin yatıştırılmasına önemli katkı yaptığı ileri sürülmüştür.

2019, 82 sayfa

Anahtar Kelimeler: Azot metabolizması, Buğday, Hidrojen sülfür, Nitrik oksit, Tuz stresi,

ABSTRACT

MS Thesis

EFFECTS OF SOME PLANT GROWTH REGULATORS ON NITROGEN METABOLISM IN WHEAT (*Triticum aestivum* L.) UNDER SALT STRESS

Ayşe Gülden ALHAN

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Ökkeş ATICI

In this study, the effects of exogenous nitric oxide (NO) and hydrogen sulfide (H₂S) in wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties (Altındane and Doğu-88) under salt (NaCl) stress were investigated on growth-development parameters and nitrogen metabolism. For this aim, wheat seedlings were grown in a hydroponic system in a climate cabinet under favorable conditions (24/20 °C, day/night). On the 10th day following germination, NaHS (1 and 1.5 mM) as H₂S donor or SNP (0.5 and 1 mM) as NO donor was applied to the seedling leaves, and then the hydroponic system was adjusted to the concentrations of 150 and 300 mM NaCl. Four days after the application, it was determined length, dry and fresh weights, protein and photosynthetic pigment (chlorophyll and carotenoid) contents, and lipid peroxidation (LPO) level in root and shoot of the seedlings. In addition, nitrate reductase (NR), nitrite reductase (NiR), glutamine synthase (GS) and glutamate synthase (GOGAT) activities were assayed in the same tissues. The results showed that alone the salt applications decreased the length, dry and fresh weight, and protein content of the two wheat varieties in the shoots compared to the control, while increased these parameters in their roots. The same salt treatments increased LPO (as malondialdehyde) and carotenoid contents in both the varieties, but decreased chlorophyll amount. Of the salt applications, especially 300 mM salt generally reduced NR, NiR, GS and GOGAT activities. The SNP and NaHS applications were generally able to improve these complications caused by the salt application in both wheat varieties under salt conditions. According to the findings, it is suggested that NO and H₂S applications to wheat seedlings under salt stress contribute significantly improving physiological parameters and mitigating salt stress toxicity by stimulating nitrogen assimilation.

2019, 82 pages

Keywords: Hydrogen sulfide, Nitric oxide, Nitrogen metabolism, Salt stress, Wheat

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tezi sunduğum bu çalışmada dört yıl boyunca değerli bilgilerini bizlerle paylaşan, fikirleriyle rehber olan, her kelimesiyle hayatıma kattığı önemi asla unutmayacağım değerli hocam sayın Prof. Dr. Ökkeş ATICI'ya en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışması süresince bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan hocam Doç. Dr. Nevzat ESİM'e teşekkürlerimi sunarım. Her zaman yardımını benden esirgemeyen Özlem GÜLMEZ'e teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında ve hayatımın her anında maddi manevi destek olan kardeşim Gamze KARACA'ya çok teşekkür ederim. Deneylerim sırasında bana yardımcı olan çalışma arkadaşım İhsan YİĞİT ve laboratuvar arkadaşlarım Elif GÜNEY, Maşuka SAKLI'ya teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca her daim maddi manevi destek olan kardeşlerim M. Hakan YÜKSEL, H.Gökçen DOLU ve M. Gökhan YÜKSEL'e, özellikle benim her anımda sabırla, sevgiyle, dua ile arkamda duran biricik anneme ve babama sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Ayşe Gülden ALHAN

Ağustos, 2019

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	17
3. MATERYAL ve YÖNTEMLER.....	28
3.1. Kullanılan Alet ve Cihazlar	28
3.2. Kullanılan Çözeltiler	28
3.2.1. Toplam çözünebilir protein tayini için gerekli çözeltiler	29
3.2.2. Malondialdehid (MDA) ölçümü (lipid peroksidasyonu) çözeltileri.....	29
3.2.3. Nitrat Redüktaz (NR) ve Nitrit Redüktaz (NiR) aktivitesi için çözeltiler	29
3.2.4. Glutamin sentaz (GS) aktivitesi ölçümü için çözeltiler.....	30
3.2.5. Glutamat sentaz (GOGAT) aktivitesi çözeltileri.....	31
3.2.6. Çalışılan tuz konsantrasyonlarının hazırlanması	31
3.2.7. SNP (NO donörü olarak) konsantrasyonlarının hazırlanması	31
3.2.8. NaHS (H ₂ S donörü) konsantrasyonlarının hazırlanması.....	32
3.3. Yöntemler.....	32
3.3.1. Bitkilerin büyütülmesi ve ilgili parametreler	32
3.3.2. Arnon ve Hoagland'ın Tam Besin Reçetesinin Hazırlanması	33
3.3.3. Bitkilerin kök ve gövde uzunluklarının ölçülmesi	34
3.3.4. Kuru ağırlık tayini	34
3.3.5. Fotosentetik pigment içeriğinin belirlenmesi	34
3.3.6. Çözünebilir protein miktarının belirlenmesi	35
3.3.7. Lipid peroksidasyon seviyesinin (MDA olarak) belirlenmesi	36
3.3.8. Azot metabolizmasında rol alan enzimlerin aktiviteleri.....	37
3.3.8.a. Nitrat redüktaz (NR) aktivitesinin belirlenmesi	37

3.3.8.b. Nitrit redüktaz (NiR) aktivitesinin belirlenmesi.....	38
3.3.8.c. Glutamin sentaz (GS) aktivitesi ölçümü.....	40
3.3.8.d. Glutamat sentaz (GOGAT) aktivitesi ölçümü.....	40
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	42
4.1. Kök -Gövde Uzunluğu, Yaş -Kuru Ağırlığına Ait Bulgular	42
4.1.1. H ₂ S uygulamasından elde edilen veriler	42
4.1.2. SNP uygulamasına ait bulgular	44
4.2. Çözünebilir Protein Miktarına Ait Bulgular.....	47
4.2.1. H ₂ S uygulamasından elde edilen veriler	47
4.2.2. SNP uygulamasından elde edilen veriler.....	47
4.3. Fotosentetik Pigment Miktarına Ait Bulgular	50
4.3.1. H ₂ S uygulamasından elde edilen veriler	50
4.3.2. SNP uygulamasından elde edilen veriler.....	50
4.4. MDA İçeriğine Ait Bulgular	54
4.4.1. H ₂ S uygulamasından elde edilen veriler	54
4.4.2. SNP uygulamasından elde edilen veriler.....	54
4.5. NR Aktivitesine Ait Bulgular.....	56
4.5.1. H ₂ S uygulamasından elde edilen veriler	56
4.5.2. SNP uygulamasından elde edilen veriler.....	56
4.6. NiR Aktivitesine Ait Bulgular.....	58
4.6.1. H ₂ S uygulamasından elde edilen veriler	58
4.6.2. SNP uygulamasından elde edilen veriler.....	58
4.7. GS Aktivitesine Ait Bulgular	60
4.7.1. H ₂ S uygulamasından elde edilen veriler	60
4.7.2. SNP uygulamasından elde edilen veriler.....	60
4.8. GOGAT Aktivitesine Ait Bulgular	62
4.8.1. H ₂ S uygulamasından elde edilen veriler	62
4.8.2. SNP uygulamasından elde edilen veriler.....	62
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	65
5.1. Kök- Gövde Uzunluk, Yaş -Kuru Ağırlık Bulgularının Değerlendirilmesi	66
5.2. Çözünebilir Protein Miktarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi.....	66
5.3. Fotosentetik Pigment Miktarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi	67

5.4. MDA İçeriğine Ait Bulguların Değerlendirilmesi	68
5.5. NR Aktivitesine Ait Bulguların Değerlendirilmesi.....	68
5.6. NiR Aktivitesine Ait Bulguların Değerlendirilmesi.....	69
5.7. GS Aktivitesine Ait Bulguların Değerlendirilmesi	70
5.8. GOGAT Aktivitesine Ait Bulguların Değerlendirilmesi	71
KAYNAKLAR	73
ÖZGEÇMİŞ	83



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

E.U	: Enzim ünitesi
g	: Gram
H ₂ S	: Hidrojen Sülfür
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
NaCl	: Sodyum klorür
NaHS	: Sodyum Hidrosülfid
nm	: Nanometre
NO	: Nitrik oksit
SNP	: Sodyum nitroprusid
µM	: Mikromolar

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Bir bitki yaprak mezofil hücresinde nitratin amonyuma indirgenmesi ve amonyumun asimilasyonu	8
Şekil 1.2. NO'nun bitkilerde muhtemel biyosentez yolları	10
Şekil 3.1. Protein tayininde kullanılan standart grafik.....	36
Şekil 3.2. Nitrat Redüktaz miktarını belirlemede kullanılan grafik.....	38
Şekil 3.3. Nitrit Redüktaz miktarını belirlemede kullanılan standart grafik.....	39

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Doğada bitkiler için stres kaynakları	3
Çizelge 4.1. H ₂ S (mM NaHS olarak) uygulamalarının NaCl (mM) stresi altındaki buğdayın iki varyetesinde yaş ve kuru ağırlık ile boy uzunluklarına etkileri.	43
Çizelge 4.2. NO (mM SNP olarak) uygulamalarının NaCl (mM) stresi altındaki buğdayın iki varyetesinde yaş ve kuru ağırlık ile boy uzunluklarına etkileri.	46
Çizelge 4.3. H ₂ S (mM NaHS olarak) ve NO (mM SNP olarak) uygulamalarının NaCl (mM) stresi altındaki iki buğday varyetesinde çözünebilir protein miktarına etkileri.	49
Çizelge 4.4. H ₂ S (mM NaHS olarak) ve NO (mM SNP olarak) uygulamalarının NaCl (mM) stresi altındaki buğdayın Altındane varyetesinde fotosentetik pigment miktarına etkileri.	52
Çizelge 4.5. H ₂ S (mM NaHS olarak) ve NO (mM SNP olarak) uygulamalarının NaCl (mM) stresi altındaki buğdayın Doğu-88 varyetesinde fotosentetik pigment miktarına etkileri.	53
Çizelge 4.6. H ₂ S (mM NaHS olarak) ve NO (mM SNP olarak) uygulamalarının NaCl (mM) stresi altındaki iki buğday varyetesinde MDA içeriği üzerine etkileri.	55
Çizelge 4.7. H ₂ S (mM NaHS olarak) ve NO (mM SNP olarak) uygulamalarının NaCl (mM) stresi altındaki iki buğday varyetesinde NR aktivitesi üzerine etkileri.	57
Çizelge 4.8. H ₂ S (Mm NaHS olarak) ve NO (mM SNP olarak) uygulamalarının NaCl (mM) stresi altındaki iki buğday varyetesinde NiR aktivitesi üzerine etkileri.	59
Çizelge 4.9. H ₂ S (mM NaHS olarak) ve NO (mM SNP olarak) uygulamalarının NaCl (mM) stresi altındaki iki buğday varyetesinde GS aktivitesine etkileri.	61

Çizelge 4.10. H ₂ S (mM NaHS olarak) ve NO (mM SNP olarak) uygulamalarının NaCl (mM) stresi altındaki iki buğday varyetesinde GOGAT aktivitesine etkileri.....	64
--	----



1. GİRİŞ

Doğadaki canlıların önemli bir bölümünü oluşturan bitkiler, canlı yaşamının devamlılığı açısından ekosistemin temel elamanlarından biridir. Hem doğal hem de tarımsal koşullar altında, bitkiler sıklıkla çevresel streslere maruz kalırlar. Dünya genelinde bitkisel üretimde ürün kaybının başlıca nedeni abiyotik stres faktörleridir ve önemli tarımsal ürünlerin ortalama üretimini yaklaşık %50 azaltarak tarım endüstrisinin geleceğini tehdit etmektedir (Mahajan and Tuteja 2005). Toprak ise bitkiler için yaşamın temel kaynaklarından biri, bitkisel ve hayvansal üretimin vazgeçilmez bir parçasıdır. Tarımsal üretimin temel öğelerinden birisi olan toprağın yapısının bozulması halinde yenilenmesi uzun zaman almaktadır. Bu nedenle topraklardan yüksek verim amaçlanırken toprakların korunması, tarımsal üretimin devamlılığı açısından zorunludur. Ekilebilir alanların verimini azaltan etmenlerin başında stres gelmektedir (Taiz and Zeiger 2015).

Canlılar doğaları gereği dış çevre ile sürekli ilişki halindedirler. İçinde bulundukları çevrede uygunsuz koşullar oluşması durumunda adaptasyon eksikliğine bağlı olarak stres koşullarına maruz kalırlar. Çevre şartlarının bir bitkinin normal büyüme ve gelişmesini olumsuz yönde etkileyecek kadar değişmesi halinde bitkide meydana gelen duruma stres denir. Bir başka deyişle bitki üzerinde negatif etkileri olan dış faktörler stres olarak tanımlanır. Birçok durumda, stres bitkinin canlı kalabilmesi, ürün verebilmesi, biyokütle birikimi ve özümleme ile ilişki kurarak açıklanması gereken bir kavramdır. Bitkiler yaşam döngüleri boyunca büyüme ve gelişmelerini olumsuz yönde etkileyecek birçok stres faktörü ile karşılaşır. Biyotik ve abiyotik kökenli olabilen bu stres faktörleri bitkilerde fizyolojik ve biyokimyasal zararlar oluşturarak, ürün nicelik ve niteliğini olumsuz yönde etkileyebilir (Kaur and Asthir 2017).

Stres, yukarıdaki tanıma göre bitki için dinamik bir süreçtir. Stres faktörünün etkili olmadığı dönemde, stres olarak kabul edilmeyen kararsız bir ortam (örneğin fotosentezde hafif dalgalanmalar) olabilir. Ancak stres başladığında, dakikalar, günler hatta haftalarca kalabilen az veya çok hızlı ve güçlü bir cevap görülür. Stresin etkileri

devam ederse, aklimasyon başlar. Aklimasyon, bitkilerin stres koşullarında dayanmalarını ve performanslarını artırmalarını sağlayan orta vadeli bir süreçtir. Bunun genetik bir temeli vardır (yani genotip fizyolojik süreçleri gerçekleştirmek için birkaç olası alternatif içerir ve bazıları sadece stres başladığında işlevseldir), fakat çevresel olarak bir arabulucu gibidir. Stres faktörleri nesiller boyunca etkili olmaya devam ederse adaptasyon gerçekleşir, yani adapte olan popülasyonların genetik kompozisyonunda bir değişiklik olduğu anlamına gelir. Fenomen olarak, biyotik ve abiyotik streslerin bitki yaşamı için birer tehdit olmaktan ziyade, evrimsel motorları işleterek biyolojik çeşitliliğin kaynaklarını oluşturdukları ileri sürülmüştür (Reigosa *et al.* 2006; Dubey *et al.* 2018).

Doğada stressiz doğal bir çevrede yaşam sürdüren bitkilerin varlığını düşünmek pek olası değildir. Stres faktörleri, bitkilerin yaşamlarının herhangi bir döneminde ortaya çıkarak onları etkileyebilir, bitki türlerine göre farklı tepkilerin alınmasına yol açabilir, diğer bir deyişle farklı bitki türlerini farklı derecede etkileyebilir. Örneğin çoğu bitkiler, sürekli olarak kuraklık, sel, sıcaklık (düşük veya yüksek), aşırı tuz, ağır metaller, yüksek yoğunluklu ışınlama, allelokimyasallar veya patojenik ajanların neden olduğu enfeksiyon gibi olumsuz çevresel koşullara maruz kalmaktadırlar. Bu nedenle, doğal ekolojik nişlerinde yaşayan bitkiler, genellikle fizyolojik optimimlerinden (en azından yaşam döngüsünün bir bölümünde) daha uzakta yaşar. Bir bitkinin belirli fizyolojik parametreleri (su veya besin Emilimi, fotosentez, solunum, büyüme, gelişme, üreme veya diğerleri) optimal koşullar altında ifade edilen azami oranın altına düştüğü zaman, açıkça onun stres altında olduğunu söyleyebiliriz. Doğada çok farklı biyotik ve abiyotik çevre etmenleri bitkilerde strese neden olabilir (Çizelge 1.1) (Reigosa *et al.* 2006).

Dünyada sulanabilir tarım alanlarının artan tuzluluk sorunları sebebiyle tarımsal gıda ürünleri olumsuz yönde etkilenmektedir. İnsanların temel gıda gereksinimlerinin karşılanması, tarımsal alanların en iyi şekilde kullanılarak tarımsal üretimin artırılmasına bağlıdır. Bu yüzden tarım yapılan tuzlu topraklarda ortaya çıkan ekonomik kayıpların azaltılması veya ortadan kaldırılması bu topraklarda yetiştirilebilecek en uygun bitki türlerinin seçilmesini gerektirmektedir (Şen 2005).

Çizelge 1.1. Doğada bitkiler için stres kaynakları (Reigosa *et al.* 2006).

Çevresel Stres Kaynakları		Antropojenik Kaynaklı
Abiyotik	Biyotik	
SICAKLIK - Düşük sıcaklık (Soğuk, donma) - Yüksek sıcaklık SU: - Su kıtlığı (Kuraklık, Düşük su potansiyeli) - Su basması (aşırı yağmur, Sel, oksijen yetersizliği) RADYAYSON - Kızılötesi -Görülür ışık (fotoinhibisyon, fotooksidasyon), - UV-A, UV-B - İyonize edici radyasyon KİMYASALLAR - İyonlar - Tuzlar Mineral eksikliği/ fazlalığı - pH (fazla/düşük) - Ozon DİĞER - Yaralama, rüzgar, ses, manyetik alanlar, elektrik alanları vb.	PATOJENLER - Virüs - Mantarlar - Bakteri HAYVANLAR - Phytophagia - Otlatma - Böceklerin etkileri DİĞER Bitkiler - Parazitizm - Allelopati - Rekabet - Herbisit, mantar ilaçları, - Tarım ilacı	-Kirlilik - O ₃ ve fotokimyasal tepkimeler - Duman - ROS oluşumu - Fotooksidanlar - Asit yağmuru ve sis - Asidik su ve topraklar -Mineral eksiklikleri (Toprak kaybına veya asit yağmuruna bağlı) - Ağır metal kirliliği - Azot fazlalığı (Eutrophication) - UV ışınlarının artması - Küresel iklim değişikliği, - CO ₂ konsantrasyon artışı - Tuzlu ve kuru toprakların artışı - Gürültü - Yangın - Sıkı (geçirimsiz) topraklar

Tuz birikimi nedeniyle tarım arazilerinde meydana gelen kayıpların, yüzlerce kilometrekare olduğu ve bugün dünyada tuzla etkilenmiş 400-950 milyon hektar tarım arazisinin bulunduğu tahmin edilmektedir. Oysa tarım yapılan sulu arazilerin tamamı, bunun yalnızca 1/3 'ü kadardır. Ülkemizde ise tuzla kirlenmiş tarım arazilerinin varlığı 4 milyon hektara ulaşmıştır. Bu da sulanabilir arazi potansiyelimizin yaklaşık %20'sini oluşturmaktadır. Tuzluluk problemi olan tarım alanları genelde Akdeniz iklim kuşağında yoğunlaşmaktadır. Dünyada 130 milyon hektar civarında olan tuzlu

toprakların 80 milyon hektarı bahsedilen iklim kuşağında yer almaktadır. Arazi varlığının önemli bir kısmı Akdeniz iklim kuşağında bulunan ülkemizde de tuzlu toprakların miktarı ciddi boyutlara ulaşmıştır (Koç ve Tan 1999; Şen 2005) .

Kurak ve yarı kurak iklim bölgelerinde ykanarak yer altı suyuna karışan çözünebilir tuzların yüksek taban suyuyla birlikte kapillarite yoluyla toprak yüzeyine çıkması ve buharlaşma sonucu toprak yüzeyinde tuzun birikim göstermesi sonucu tuzluluk problemi ortaya çıkmaktadır. Bunun yanında yanlış sulama pratikleri de ekilebilir alanların bitki gelişimini indirgeyecek düzeyde tuzluluk sorunu ile karşı karşıya gelmesine neden olmaktadır (Koç ve Tan 1999; Şen 2005).

Tuz stresi, tarımsal üretimi sınırlayan en önemli stres faktörlerinden bir tanesidir. Her yıl tuzluluk nedeniyle daha sınırlı tarımsal alanlar oluşmaktadır (Demiral and Türkan 2004). Aşırı tuzluluk, dünyanın birçok bölgesinde bitkilerin doğal habitatalarında yayılmasını sınırlamakta ve şiddetle artan bir tarımsal problem oluşturmaktadır. Tuzlu koşulların bitki büyümesindeki zararlı etkileri genel olarak iki şekildedir. Birinci olarak kökleşme ortamının osmotik potansiyelinin azaltılması ve ikincisi özel iyon toksisitesidir (Zhou *et al.* 2007).

Bitkilerde tuzun en basit etkisi, topraktaki sudan bitkinin yararlanamaması yanında bitki besinlerinin alınımının azalmasıdır. Tuzlu topraklarda artan ozmotik potansiyelden dolayı bitkilerin suyu yeteri kadar kullanamaması ya da ortamda aşırı miktarlarda bulunan Na ve Cl'nin neden olduğu toksik etkiden dolayı azalma olmaktadır. Tuzlu koşullarda yetiştirilen bitkilerin iyon dengesinin bozulmasına paralel olarak mineral madde konsantrasyonlarında da önemli sayılabilecek oranlarda değişimler olmaktadır. Tuz stresinden etkilenmeyen ya da göreceli olarak daha az etkilenen bitkilerin dokularında Na ve Cl iyonları az, prolin miktarı ise daha fazladır. Bitkiler tarafından alınan aşırı miktardaki tuz (NaCl) hücre fonksiyonlarını bozar, hücre ve organel zarlarında meydana gelen tahribatlar nedeniyle fotosentez, solunum vb. işlevlerin sekteye uğraması tuz zararının sonuçlarındandır (Kalefetoğlu and Ekmekçi 2005). Ayrıca toprakta tuz kontrasyonun artmasıyla, bitkinin topraktan su alımı güçleşmekte,

toprağın yapısı bozularak bitki gelişimi yavaşlamakta, hatta durmaktadır (Kanber vd. 1992). Toprak içerisinde yeterli miktarda su bulunmasına rağmen bazı koşullar altında bitkilerin solmaya başladıkları görülmüştür. Bu durum genellikle yüksek toprak tuzluluğunun yarattığı ‘fizyolojik kuraklık’ durumundan kaynaklanmaktadır. Fizyolojik kuraklık durumunda yüksek ozmatik basınç nedeniyle bitki kökleri topraktaki mevcut suyu alamamaktadır (Ayyıldız vd. 1990). Tuzluluğun bitki büyümesine doğrudan (ozmotik stres ve iyon toksisitesi) ve dolaylı (sekonder) olmak üzere 2 şekilde etki ettiği bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda tuzlu koşulların bitki büyümesi üzerindeki doğrudan etkilerini; kökleşme ortamının ozmotik potansiyelinin azaltılması ve özel iyon toksititesi olarak belirtilmiştir (Termaat and Munns 1986; Ruiz *et al.* 1999; Zhou *et al.* 2007). Tuzluluğun bitkiler üzerindeki dolaylı etkisi ise fotosentezin engellenmesi; metabolik toksisite; K iyonu alımının engellenmesi, su alımının sağlanması için metabolik enerjinin kullanılması, verimde düşme ve hücre ölümü olarak kabul edilmektedir (Botella *et al.* 2005; Hong *et al.* 2009). Toprak suyunda fazla tuzluluğun bitki gelişimi üzerindeki zararlı etkileri şu şekilde özetlenebilir (1) yavaş ve yetersiz çimlenme (2) fizyolojik kuraklık, solma ve kuruma, (3) bodurluk, küçük yapraklar, kısa gövde ve dallar, (4) mavimsi yeşil yapraklar (5) çiçeklenmenin gecikmesi, daha az çiçek açma ve tohumların daha küçük olması, (6) meyvelerin küçük kalması, kalitenin düşmesi ve ürün kayıplarıdır (Kalefetoğlu and Ekmekçi 2005; Botella *et al.* 2005).

Azot (N), karbon (C), hidrojen (H) ve oksijenden (O) sonra canlı sistemlerin yapısında en fazla bulunan temel bir elementtir. Dünya atmosferinin %78’ni oluşturan moleküler azot, (N_2 ; $N\equiv N$) indirgenmedikçe canlı organizmaların büyük çoğunluğu tarafından kullanılamaz. Canlılar; proteinler, nükleik asitler ve birçok başka biyomoleküllerinde yüksek miktarda azot içerir. Ototrofik büyüme sırasında, hücresel organik madde oluşumu için azot ihtiyacı iki farklı yolla inorganik azottan karşılanır. Bunlar;

1. Moleküler azotun havadan fiksasyonu; veya
2. Su veya toprakta bulunan nitrat (NO_3^-) veya amonyumun (NH_4^+) asimilasyonu ile dir

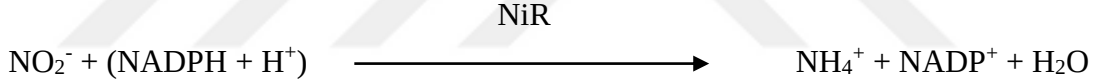
Siyanobakteriler dahil sadece bazı bakteriler, azotu (N_2) havadan fikse edebilirler. Baklagiller gibi sadece belirli bitkiler, N_2 fiksasyonu yapan siyanobakteri ve bakterilerle simbiyotik ilişkiye girebilir. Bununla birlikte, biyosferdeki organik azotun yaklaşık %99'u NO_3^- asimilasyonundan türetilir. NH_4^+ , temel olarak hayvanların ve bakterilerin metabolizmasıyla atık organik maddelerin parçalanmasının bir son ürünü olarak oluşur ve topraktaki bakteriler tarafından nitrifiye edilerek tekrar nitrat haline oksitlenir. Böylece, topraktaki nitrat ve bitkilerdeki organik azot arasında sürekli bir döngü vardır. NH_4^+ sadece yetersiz drenaja sahip, zayıf havalandırılmış topraklarda yüksek oranda birikir. Burada oksijen yetersizliği nedeniyle, nitrifikasyon bakterileri üremez. Toprakta NO_3^- yerine NH_4^+ varsa, birçok bitki bunu azot kaynağı olarak kullanabilir (Heldt and Piechulla 2011).

Karasal bitkilerde kökler vasıtasıyla alınan nitrat, hem yapraklarda hem de köklerde asimile edilir, yani organik madde yapısına katılır. Otsu bitkilerin çoğunda, nitrat asimilasyonu daha çok yapraklarda meydana gelir, ancak köklerde de nitrat asimile edilebilir. Bu durum, özellikle otsu bitkilerin erken büyüme dönemlerinde önemli bir rol oynar. Aksine, birçok odunsu bitki (örneğin ağaçlar, çalılar) ve ayrıca soya fasulyesi gibi baklagiller esas olarak köklerde nitratı özümsemektedirler. Genel olarak kök hücrelerine alınan nitratın 3 akıbeti vardır. Bunlar şöyle özetlenebilir; alınan nitrat geçici olarak vakoul içerisinde depolanabilir (i), veya kökün epidermal ve korteks hücrelerinde NH_4^+ 'e düşürülür (ii). Burada oluşan NH_4^+ , esas olarak, glutamin ve asparagin amino asitlerinin sentezi için kullanılır. Bu iki amino asit (amidler), ksilem kanalları aracılığıyla yapraklara taşınabilir. Ancak, köklerdeki nitrat asimilasyon kapasitesi maksimum seviyeye ulaştığında, absorplanan nitratın fazlası, yapraklara iletmek üzere, köklerden ksileme yüklenir (iii). Yapraklara iletilen nitrat, mezofil hücrelerinde ya hemen indirgenerek NH_4^+ oluşturulur veya nitrat aynı hücrelerin vakoullerinde depolanabilir (Heldt and Piechulla 2011). Nitrat, bitkilerde dokular ve organlar arasında kolayca taşınabilir ve vakoulde uzun bir süre depolanabilir, ancak NO_3^- 'ün protienle ve diğer organik bileşiklerin biyosentezinde kullanılması için NH_4^+ 'e indirgenmesi gerekir.

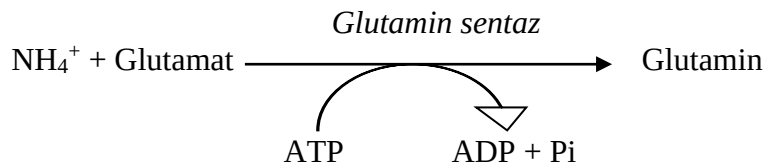
Bitkilerde NO_3^- 'ün indirgenmesi ve sonra asimilasyonunda 4 anahtar enzim rol alır (Şekil 1.1) (Heldt and Piechulla 2011). Bunlar; Nitrat Redüktaz (NR), Nitrit Redüktaz (NiR), Glutamin Sentaz (GS) ve Glutamat Sentaz (GOGAT) enzimleridir. Bu enzimlerin aktivitelerindeki değişimleri izleyerek bitkide azot asimilasyonunun mevcut durumu belirlenebilir (Sangwan *et al.* 2014). Yüksek bitkilerin sitoplazmasında bulunan NR, NO_3^- 'ün indirgenmesinde görev alan ana enzimdir (Heldt and Piechulla 2011). Bu olayda elektron verici olarak NADH veya NADPH kullanılır.



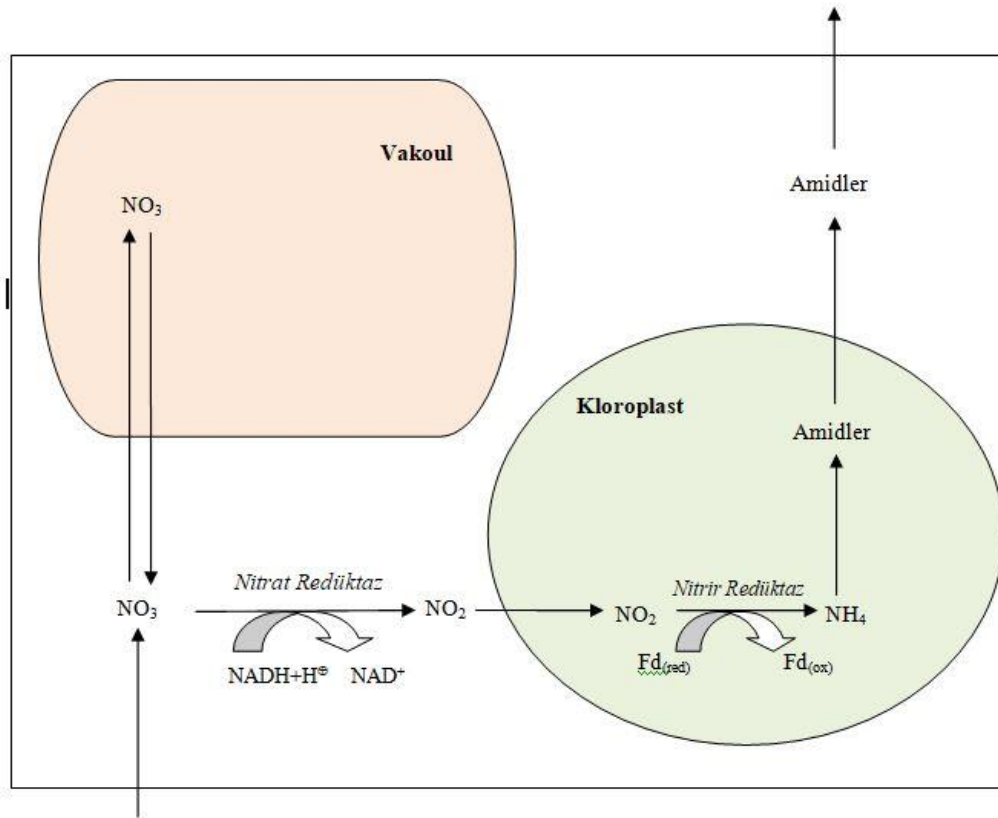
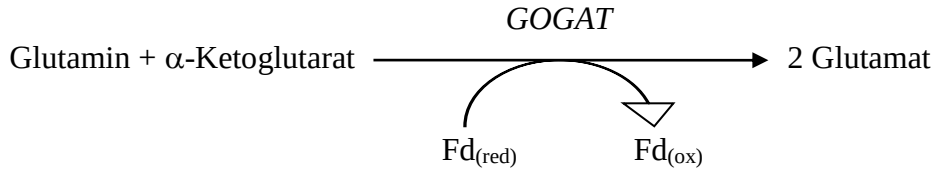
Sitozolde meydana gelen bu olay neticesinde oluşan nitrit (NO_2^-) yapraklarda kloroplastlara, köklerde ise plastitlere taşınır ve taşındıkları yerlerde NiR ile NH_4^+ 'e dönüştürülür (Barro *et al.* 1991).



Yukarıdaki reaksiyonda elde edilen NH_4^+ , kloroplastta (köklerde plastidlerde) GS enzim aktivitesi ile glutamin oluşturmak üzere glutamatla birleşir. Glutamin ise GOGAT'ın katalitik etkisi ile 2 adet glutamata indirgenir. Böylece NH_4^+ organik madde yapısına katılmış yani asimile edilmiş olur (Şekil 1.1). Kloroplastlardaki GS, ATP tüketerek NH_4^+ 'e glutamata aktarır ve sonuçta glutaminin sentezini gerçekleştirir. Bu reaksiyon aşağıda özetlenmiştir.



Daha sonra, α -ketoglutarat ile birlikte glutamin, glutamat sentaz (aynı zamanda glutamin oxoglutarat amino transferaz, kısaltılmışı **GOGAT**) ile iki glutamat molekülüne dönüştürülür. Bunun reaksiyonu aşağıdaki şekilde gerçekleşir.



Şekil 1.1. Bir bitki yaprak mezofil hücresinde nitratin amonyuma indirgenmesi ve amonyumun asimilasyonu (Fd: Ferredoksin) (Heldt and Piechulla 2011'den modifiye edilerek).

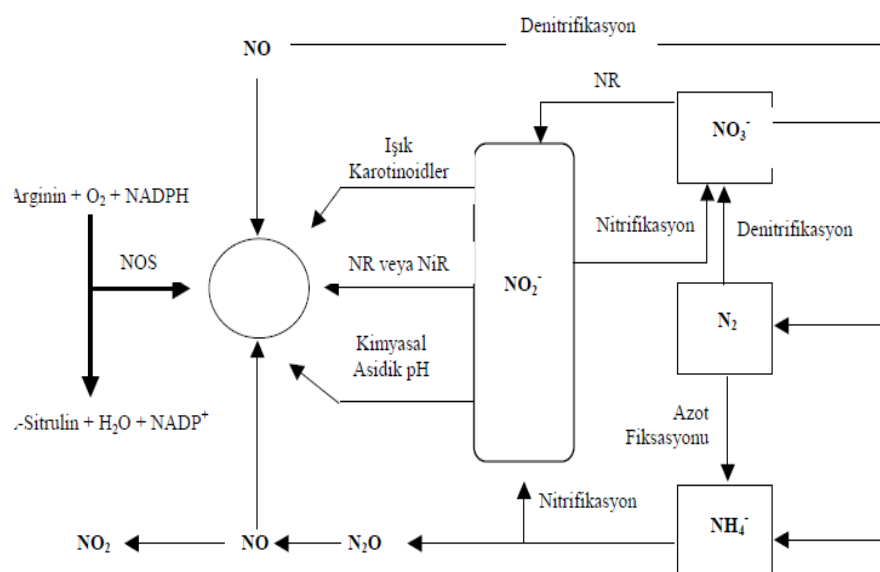
Yukarıda ifade edildiği gibi NO_3^- asimilasyonu kısmen ve hatta bazı türlerde esas olarak köklerde de meydana gelir. Toprakta alınan NH_4^+ normalde köklerde asimile edilir. Kök hücrelerinde NO_3^- ve NO_2^- 'in NH_4^+ 'e indirgenmesi, mezofil hücrelerindeki reaksiyonlara benzer şekilde ilerler. Bununla birlikte, kök hücrelerinde gerekli

indirgeyici güçler (NADH veya NADPH), yalnızca karbohidratların oksidasyonu (Pentoz Fosfat Yolu gibi) yoluyla sağlanır. Köklerde NO_2^- 'in indirgenmesi ve ardından NH_4^+ 'ün asimilasyonu yine bir plastid formu olan lökoplastlarda meydana gelir. Kloroplastlarda olduğu gibi, lökoplastlardaki nitrit indirgenmesi için indirgeyici olarak indirgenmiş ferredoksin (Fd) gerekir. Lökoplastlarda ferredoksin, oksidatif pentoz fosfat yolu (PPP) tarafından üretilen NADPH ile indirgenir. Lökoplastlarda glutamin sentezi için gereken ATP, mitokondri tarafından üretilir ve ADP ile takas halinde bir plastid ATP translokatorü tarafından lökoplastlara aktarılır. Kök hücre lökoplastları doğrudan indirgeyici olarak NADPH veya NADH kullanan bir glutamat sentaz (GOGAT) içermesine rağmen, lökoplastdaki GOGAT indirgenmiş ferredoksin de kullanabilir. Köklerde nitrat asimilasyon ürünleri, bitkinin toprak üstü kısımlarına, ksilem borularındaki transpirasyon akımı yoluyla, genelde glutamin ve asparajin (amidler) formunda organik azot bileşikleri olarak taşınır. Bu durum NH_4^+ 'ün topraktaki tek azot kaynağı olması durumunda da geçerlidir (Heldt and Piechulla 2011). Bitki büyümesi için gereken NO_3^- , biyokütlenin parçalanmasından türetilir. Diğer bitki besin maddelerinin aksine (örneğin, fosfat veya sülfat), NO_3^- kayaların aşınması ile sağlanamaz. Daha küçük miktarlarda NO_3^- , yıldırım ile üretilir ve toprağa yağmur suyuyla taşınır (ılıman bölgelerde yılda yaklaşık 5 kg N/ha). Antropojenik faaliyetlerden dolayı (örneğin, araba trafiği, hayvan üretimi vb.) toprağa taşınan NO_3^- , diğer azot oksitler ve amonyak miktarı kişi başına yılda 15 ila 70 kg N/ha arasında olabilmektedir. Günümüzde tarımsal üretim için neredeyse zorunlu olan sentetik veya doğal gübreler, tarımsal ürünlerin hasatıyla topraktan çekilen azotu telafi etmek için önemli bir kaynaktır. Mısır (*Zea mays*) tarımı için, örneğin, yılda yaklaşık 200 kg N/ha gübre olarak nitrat veya amonyum kullanılır (Heldt and Piechulla 2011). Nitrat alımının ve azot metabolizmasının stres altında olumsuz etkilendiğini gösteren bazı çalışmalar mevcuttur (Silveira *et al.* 1999; Sangwan *et al.* 2014; Chen *et al.* 2017). Bu çalışmalara göre, stres esnasında azot metabolizması enzimlerinin aktivitelerinin düzenlenmesi, stres hasarının azaltılması bakımından önemlidir.

Stres toleransını düzenleyen bitki büyüme regülatörlerinin etkilerini araştırmak, bitkilerin olumsuz çevresel koşullara nasıl uyum gösterdiğinin daha iyi anlaşılması için

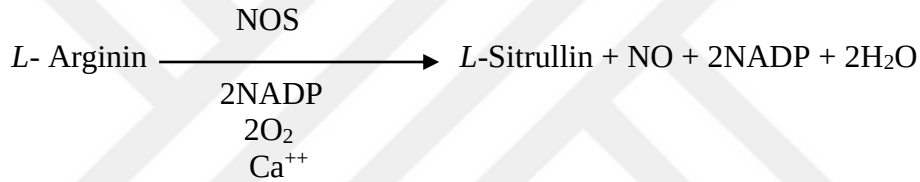
önemli bir adım olmuştur (Mutlu and Atıcı 2012). Nitrik oksit/azot monoksit (NO) uzun yıllardan bu yana bilim dünyasında bilinen gaz yapıda bir moleküldür. Bitkilerde NO'nun etkileri ile ilgili çalışmalar azot oksitler tarafından oluşturulan atmosferik kirlenme üzerine yoğunlaşmıştır. Bitkilerde NO salınımı ve bitki büyümesi üzerine olan etkileri ilk kez 1970'li yıllarda tanımlanmıştır (Anderson and Mansfield 1979; Klepper 1979; Leshem 2000). Sonraki yıllarda bitkilerin sadece atmosferik NO'ya cevap vermediği aynı zamanda önemli miktarlarda içsel olarak NO ürettikleri de kesinlik kazanmıştır (Wildt *et al.* 1997). İlk defa memeli hücrelerinde, daha sonra da bitkilerde NO'nun büyüme ve gelişme süreçlerinde, biyotik ve abiyotik stres cevaplarının oluşmasında haberci molekül olduğu ispat edilmiştir (Anbar 1995; Graziano and Lamattina 2005). Bununla birlikte, NO'nun 1998 yılında bitki savunma sinyali olarak tanımlanmasına kadar bitki büyüme ve gelişmesi üzerine olan etkileri Leshem (Leshem and Haramaty, 1996) ve Laxalt (Laxalt *et al.* 1997) gibi birkaç öncü araştırmacı ile sınırlı kalmıştır. Bu araştırmacılardan sonra NO ve bitki biyolojisi ile ilgili çalışmaların sayısı gün geçtikçe artmıştır (Graziano and Lamattina 2005).

Bitkilerde NO sentezinde enzimatik ve enzimatik olmayan başlıca iki metabolik yol olduğu ileri sürülmüştür (Şekil 1.2).

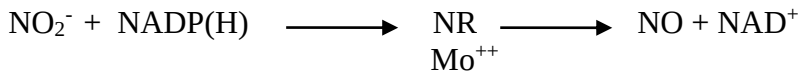


Şekil 1.2. NO'nun bitkilerde muhtemel biyosentez yolları (Wojtaszek 2000; Selçukcan 2005).

Enzimatik yollardan birinde, *L*-argininin NO ve *L*-sitruiline dönüşümü nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi tarafından katalizlenmektedir (Şekil 1.2) (Selçukcan 2005). NOS'un bezelye yapraklarının kloroplast ve peroksizom matriksinde bulunduğu gösterilmiştir (Barroso *et al.* 1999). Tütün, soya fasulyesi, mısır, bezelye gibi bazı bitki türlerinde biyokimyasal, immunolojik ve moleküler teknikler kullanılarak NOS aktivitesinin olduğu rapor edilmiştir (Delledonne *et al.* 1998; Durner and Klessig 1999; Yamasaki and Sakihama 2000; Del Rio *et al.* 2004). Ayrıca, Cueto vd. (1996) *Lupinus albus* kök ve nodüllerinde NOS'a benzer bir enzim aktivitesinin varlığını da bildirmişlerdir. Mısır fidelerinin kök ucu ve genç yapraklarında 116 kDa'luk NOS'a benzer bir protein saptanmıştır (Ribeiro *et al.* 1999).



Diğer enzimatik yolda ise NO üretiminin başlıca kaynağı NADP(H)'a bağımlı bir nitrat redüktaz (NR) enzimidir (Şekil 1.2). Kofaktör olarak molibden (Mo^{++}) içeren bu enzim elektron vericisi NADP(H)'ı kullanarak NO_2^- 'den NO üretimini katalizlemektedir (Lamattina *et al.* 2003). *Phytophthora infestans* mantarı ile enfekte olmuş patates tuberlerinde NR aktivitesinin teşvik edildiği gösterilmiştir (Yamamoto *et al.* 2003). Böylece bitki stres koşulları altında iken ayçiçeği ve mısır bitkisinde, ıspanak yapraklarında NR'a bağlı NO üretiminin artabileceği ileri sürülmüştür (Rockel *et al.* 2002).



Bitkilerde NO üretiminin diğer enzimatik kaynakları ksantin oksidoredüktaz (XOR), peroksidaz, sitokrom P450 ve bazı Fe^{++} içeren proteinler olduğu ileri sürülmüştür. Örneğin XOR'un bezelye yaprak peroksizomlarında bulunduğu ve bitkilerde haberci molekül olarak NO üretiminde anahtar rol oynadığı gösterilmiştir (Corpas *et al.* 2009).

Bitki hücrelerinde önemli fizyolojik süreçlerde yaygın bir şekilde görev alan peroksidaz enziminin hem *N*-hidroksiarginin ve H_2O_2 'den, hem de hidroksiüre ve H_2O_2 'den NO ürettiği rapor edilmiştir (Boucher *et al.* 1992; Huang *et al.* 2002). Enzimatik olmayan yolda, NO_2 , NO ve dihidroaskorbik asiti üretmek üzere pH 3-6 da askorbik asitle kimyasal olarak indirgenir. Bu reaksiyonun apoplastik alanlarda ve kloroplastlarda meydana geldiği ve arpa alevron hücrelerinde NO'nun bu şekilde sentezlendiği gösterilmiştir (Stöhr and Ullrich 2002). Ayrıca NO karotenoidler tarafından NO_2 'in ışığa bağımlı yolla indirgenmesi ile de oluşur (Cooney *et al.* 1994). Bununla birlikte NO, bitkilere eksojen olarak uygulanan sodyum nitropurissid (SNP) ve *S*-nitroso-*N*-asetil-penisilamin (SNAP) gibi NO vericilerinden (donörlerinden) enzimatik olmayan şekilde de ortaya çıkar (Leshem 1996). NO, tek başına yüksek konsantrasyonlarda dahi hücreleri öldürmeyen toksik olmayan bir moleküldür (Pryor and Squadrito 1995). Bununla birlikte aerobik ortamda NO kararlı bir molekül değildir. Değişiminin artması ile oksidasyonu hızlanır. Bu nedenle ortamdaki değişimi ile kendi ömrü arasında ters bir orantı vardır. NO biyolojik sistemlerde O_2 ile kuvvetli reaksiyona girdiğinde nitrozonyum iyonu (NO^+), nitroksil anyonu (NO^-), nitrit (NO_2^-), nitrat (NO_3^-), peroksinitrit ($ONOO^-$) gibi “aktif azot oksit türleri” meydana gelir. Hücrede NO aktif oksijen türleriyle (H_2O_2 , $OH^\cdot$, $O_2^\cdot$, $ONOO^\cdot$ vb.) kimyasal reaksiyona girdiğinde ise ya toksik ya da koruyucu etki gösterir. Ayrıca NO ve hücre içi antioksidan sistem (glutatyon, askorbat, karotenoidler ile antioksidan enzimler) arasında dolaylı bir koruyucu sinyal iletim yolu da mevcuttur (Beligni and Lamattina 1999; Neill *et al.* 2003).

NO bitki büyüme, gelişme ve savunma cevaplarında yaygın hücre içi ve hücreler arası haberci molekül olduğu ileri sürülmüştür (Leshem 1996). Tüm bitkiye ya da hücre kültürüne eksojen NO uygulamaları bu molekülün bazı fizyolojik ve biyokimyasal süreçleri nasıl etkilediği hakkında kayda değer bilgiler elde edilmesine olanak sağlamıştır. Eksojen olarak uygulanan NO, bitki büyüme ve gelişiminin çeşitli yönlerine ilave olarak (Ribeiro *et al.* 1999), patojenlere (Durner and Klessig 1999), ışığa (Beligni and Lamattina 1999) ve oksidatif strese (Beligni and Lamattina 1999) karşı oluşturulan cevapları etkilemektedir. Ayrıca bitkilerde katalaz, askorbat peroksidaz ve akonitaz

enzim aktivitelerinin düzenlenmesinde, hücre çeperi lignifikasyonunda (Ferrer and Ros Barcelo 1999), bekçi hücrelerinde iyon kanallarının düzenlenmesinde (Garcia Mata *et al.* 2003), kloroplast ve mitokondri fonksiyonlarında (Yamasaki *et al.* 2001) ve senesens ve yaralanma sinyalinde (Hung and Kao 2003) NO'nun muhtemel rolleri tespit edilmiştir.

Hidrojen sülfür (H_2S) kızıllımsı renkte, çürük yumurta kokusunda bir gazdır. Polar ve apolar çözeltilerde çözünür (Wang 2008; Wang 2012). H_2S , sülfür dioksit sülfat ve elementer sülfür ile kolayca oksitlenir. Bu oksitlenme iki basamakta gerçekleşir. İlk olarak tekli iyonize proton hidrojen sülfid anyonuna verilir. İkinci basamakta protonun hidrojen sülfid anyonundan ayrılır ve sülfid iyonuna verilir. Bu tepkime hidrojen sülfidin 3:1 oranında bulunduğu sulu çözeltilerinde gerçekleşir. H^+ iyonu suda kalır. HS^- iyonu ayrılır (Das *et al.* 1999; Wang 2008; Wang 2012).



H_2S 'nin biyolojik sistemlerdeki aktif formu tam olarak bilinmemektedir. Bu yüzden H_2S ve HS^- olarak kabul edilir. Ayrıca H_2S 'den H^+ iyonu ayrılması ve elektron transferi ile sülfür radikali ($HS^\bullet$) üretilir. HS^- sulu çözeltilerde reaksiyona girerek HS^- formundan $HSSH^-$ formuna dönüşür (Das *et al.* 1999).



Önemli bir reaktif sülfür türü olan H_2S bitkilerde etilen ve NO'dan sonra 3. gaz halindeki bir sinyal moleküldür (Li *et al.* 2011; Mancardi *et al.* 2009). Çoğunluğu hücrede üretilen H_2S yüksek dozlarda çok toksiktir, çünkü sitokrom-c oksidazın (COX) çalışmasına engel olur ve sonuçta hücre fonksiyonlarında oksijen kullanımını engeller (Mancardi *et al.* 2009). Bitkilerde birçok pyridoxal 5-fosfata (PLP) dayalı D/L-sistein desulfihidraz (D/L-CDs) enzimleri H_2S üretiminden ana sorumludur (Bloem *et al.* 2004, Papenbrock *et al.* 2007). Diğer bir PLP'ye dayalı enzim β -siyanoalanin sentaz (CAS),

sistein ve siyaniti H_2S ve β -siyanoalanine çevirerek H_2S üretimine katkı sağlar (Garcia *et al.* 2010). H_2S sitotoksik olduğu için sitosoldeki seviyesi tam olarak ayarlanmalıdır.

H_2S 'nin bitkide düşük dozlarda antioksidan aktiviteyi arttırarak savunma sinyali olarak görev yaptığı ileri sürülmüştür (Zhang *et al.* 2010a ve b) ve ayrıca stoma kapanmasını sağlayarak da koruyucu sinyal rolü oynadığı rapor edilmiştir (Garcia-Mata and Lamattina 2010). Bitkilerde H_2S farklı gelişim süreçlerinde de araştırılmıştır. Bunların başında kök gelişimi, yan kök gelişimi (Zhang *et al.* 2009a; Lin *et al.* 2012) ve tohum çimlenmesi gelmektedir (Zhang *et al.* 2008; Wang *et al.* 2012). Bitki hücrelerinde H_2S abiyotik strese karşı potansiyel bir antioksidan gibi davranır. Bunu pektin metilesteraz (PME) enzimi kodlayan genin transkripsiyonunu değiştirerek (Wang *et al.* 2010) veya antioksidan enzimlerin toplam ve izoenzimatik aktivitelerini değiştirerek yapar (Zhang *et al.* 2009, 2010a). Bunlar H_2S 'in bitki stres cevabında aktif rol aldığını gösterir. Son çalışmalar, bitkilerin H_2S donörü sodyum bisülfid ($NaHS$) ile ön uygulamasının kuraklık, ısı, ağır metaller ve ozmotik stresler gibi bir dizi abiyotik strese karşı önemli tolerans gösterdiğini göstermiştir (Christou *et al.* 2013; Shi *et al.* 2013; Ali *et al.* 2014; Mostofa *et al.* 2015). H_2S 'nin stres azaltmadaki olumlu etkileri, antioksidan aktiviteler ve ROS detoksifikasyon sisteminin modülasyonu gibi çoklu savunma mekanizmaları ile olan ilişkisine bağlanmıştır (Chen *et al.* 2011; Mostofa *et al.* 2015). H_2S 'in tuz stresine karşı bitki toleransını arttırmada etkili olduğu, bu etkinin NO ile de sağlanabileceği rapor edilmiştir (Wang *et al.* 2012). Yukarıda verilen bilgilere göre H_2S ve NO önemli sinyal molekülleridir. Bitki gelişmesinde hayati öneme sahip biyo düzenleyiciler arasındadır ve abiyotik stres cevabında etkilidirler. Buna rağmen ikisinin tuz stresi toleransındaki etkileri hakkında sınırlı bir bilgi vardır (Liang *et al.* 2018; Janicka *et al.* 2018). NO ve H_2S donörleri olan SNP ve $NaHS$ 'nin önceden uygulamasıyla kadmiyum toksisitesinin azaldığı görülmüştür. Bunu lipid peroksidasyonunun ve kadmiyum birikiminin azalması ayrıca tohum büyüme inhibisyonunun azalması desteklemiştir. Çalışmalar sadece kadmiyum stresi uygulanmış bitkiye göre izlenmiştir. H_2S ve NO'nun abiyotik stres toleransını iyileştirmede sorumlu olduğu gözlemlenmiştir (Li *et al.* 2011).

Tuzluluk problemi sularda ve toprakta var olan çeşitli çözünmüş mineral elementlerin yoğunluk artışlarından kaynaklanır. Toprak ve su tuzluluğundaki artış ise başta toprak suyunun yarayışlılığı olmak üzere çimlenme, büyüme, gelişme ve verim kaybına neden olmaktadır. Fotosentetik dokularda tuzluluğun artışına bağlı olarak; tilakoid membranlarda bozulma, grana zarlarında yığılma, klorofillerde ve pigment sistemlerinde (PSII gibi) parçalanma olur (Ashraf and Harris 2004). Tilakoit zarlarında fotosentetik elektron taşıma sisteminin (ETS) aktivitesi yüksek tuzlulukta düşer (Parida *et al.* 2005). Ayrıca tuz stresi, baklagil bitkilerde nitrat redüktaz aktivitesi ve nodül oluşumu azaltmaktadır (Wahab and Zahran 1981). Tuzlu koşullarda bitkilerin yaşamsal faaliyetlerini devam ettirebilmeleri için çeşitli fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler cevap mekanizmalarına sahip oldukları ileri sürülmektedir (Gupta and Huang 2014). Örneğin tuz stresine maruz kalan bitkilerde hücre içi ve dışı ozmotik dengeyi düzenlemek için bu alanlarda genelde moleküler ağırlığı küçük olan birtakım ozmolitler biriktirilir. Birçok bitkide ise tuz stresi koşullarında prolin, şeker ve glisin-betain gibi metabolitlerin seviyelerinde anlamlı artışlar belirlenir (Mahajan and Tuteja 2005). Glisin-betain ile prolin, bitkiler ve birçok organizmada ozmotik regülasyonda önemli rol oynarlar (Banu *et al.* 2009).

Topraklarda, yeraltı ve yer üstü su kaynaklarında seviyesi giderek artan tuzun bitki metabolizması üzerinde etkilerinin bilinmesi büyük önem arz etmektedir. Bu etkilerin bilinmesi, günümüzde ve ileride bitkiler üzerinde tuz sorununun çözümüne önemli katkı sağlayacaktır. Bitki metabolizmasının en önemli yollarından biri azot metabolizmasıdır. Bu yolak içerisinde bitkiye alınan inorganik azot formları (NO_3^- ve NH_4^+), asimile edilerek organik azot formlarına (amino asitlere) dönüştürülür. Amino asitler ise başta protein sentezi olmak üzere solunum, klorofil ve nükleotid metabolizması dahil birçok yolakta ham madde olarak kullanılır. Bu nedenle azot metabolizmasını inhibe eden bir faktör, neredeyse metabolizmanın tümünü etkiler ve bitki yaşamında geri dönüşümsüz hasarlar oluşturur.

Literatürde tuzun bitkilerde biyokimyasal ve moleküler sürede üzerine etkilerini açıklayan çok sayıda araştırma bulunmaktadır. Tuz stresinin bitkiler üzerine etkisi ile

ilgili çalışmalar, diğ er stresler kadar yoğun bir şekilde çalışılmaktadır. Ancak, yaptığımız araştırmalara göre, tuzun bitkide azot metabolizması üzerine etkilerini açıklayan herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Azot metabolizması bitki yaşamı ve veriminde en temel biyokimyasal süreçleri içermektedir. Azot metabolizmasında küçük bir bozulma, protein sentezinden hücre bölünmesine ve nihayetinde verime kadar bütün bitki süreçlerini doğrudan veya dolaylı olarak etkileyecektir. Bu nedenle, tuz stresine karşı bitkide azot metabolizmasında meydana gelen değişmelerin ve tuz stresine karşı bitki cevabının bilinmemesi önemli bir eksikliktir.

Buğday (*Triticum aestivum* L.) dünyanın en yaygın yetiştirilen tahıl ürünlerinden biridir ve ayrıca bitki fizyolojisi ve moleküler biyoloji araştırmaları için model bir organizmadır. Bu yüzden mevcut araştırmamızda, farklı derişimlerde tuz (NaCl) stresi altındaki buğdayın iki varyetesinde NO ve H₂S uygulamalarının azot metabolizmasında rol alan enzimler (NR, NiR, GS ve GOGAT)  zerindeki etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda genel streslere toleransları farklı iki buğday eşiidi (toleranslı olarak Doğu-88, duyarlı olarak Altındane) kullanılmıştır. Böylelikle genel streslere duyarlı ve toleranslı çeşitlerin cevapları da belirlenmiş olacaktır. Tuz stresi uygulanmış fidelerde bahsi geçen azot metabolizması enzimlerine ilave olarak her iki buğday eşiidinde fizyolojik parametreler (uzunluk, yaş ve kuru ağırlık, klorofil, çözünebilir protein ve lipid peroksidasyonu seviyeleri) belirlenmiştir. Bu parametreler, azot metabolizması enzimlerine ilave olarak, bitkide azot metabolizmasıyla dolaylı olarak ilgili süreçlerin değişimi hakkında bilgi vermesi açısından önemlidir. Çalışmadan elde edilen sonuçların, tuz stresinin azot metabolizması üzerinde etkilerinin anlaşılmasına önemli bir katkı yapmakla birlikte literatüre de önemli bir veri sağlayacağı düşünülmektedir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

En önemli çevresel stres ajanlarından biri olan tuzluluk stresi, kurak ve yarı kurak çevrelerde etkisini gösteren en önemli problemler arasındadır. Özellikle zirai alanlarda etkisini gösteren tuzluluk stresi, toprak tekstürünü bozarak bitkilerin verim kalitesi ve üründe ciddi kayıplara yol açmaktadır (Chinnusamy *et al.* 2005; Deinlein *et al.* 2014). Literatürlerde abiyotik stres faktörlerinden tuz stresinin bitki gelişimi üzerine olumsuz etkileri hakkında çok sayıda araştırma mevcuttur. Özellikle tuz stresinin bitkide meydana getirdiği metabolik bozukluklar, fizyolojik hasarlar ve ürün kaybı ile alakalı deneysel veriler birçok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir. Bunlardan çalışma alanımız için önemli olanlar aşağıda özetlenmiştir.

Tuz stresinin bitkiler üzerindeki etkileri; bitkinin çeşidine, tuza maruz kalma süresi ve miktarına göre değişmektedir. Bitkiler genotipik farklılıklara bağlı olarak tuzluluğa karşı farklı büyüme ve gelişme cevapları verirler (Dajic 2006). Bazı bitkiler tuzluluğa karşı daha hassas iken, bazıları daha dayanıklıdır. Tuz stresi altında bitkilerde aşırı miktarlarda biriken Na^+ iyonu, K^+ 'un alınımını engellemekte (Siegel *et al.* 1980), aşırı Cl^- ise özellikle NO_3^- alınımı üzerine olumsuz etki yaparak bitkilerde iyon dengesinde bozulmalara sebep olabilmektedir (Kirkby and Knight 1987; İnal *et al.* 1995). Tuz stresine maruz kalan bitkilerin büyüme ve gelişmesinde ortaya çıkan azalmanın nedenleri arasında bitkiler tarafından mineral besinlerin alınması, taşınması ve kullanılmasının engellenmesi gelir. Bir çalışmada, sodyum ve potasyum tuzlarının salatalık (*Cucumis sativus* L.) fidelerinin gelişimi üzerine etkisini belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada tuz uygulamasının çimlenme oranı ve süresi, gerçek yaprak çıkış zamanı, hipokotil ile kotiledon boyu ve kök-sürgün uzunluğu, yaprakların sayısı ile sürgün ve kök ağırlıklarına etkileri araştırılmıştır. Sonuç olarak artan tuz (NaCl) dozlarının kök ve gövde çıkışı ve fide gelişimine negatif etki yaptığı tespit edilmiştir (Türkmen *et al.* 2000). Diğer bir çalışmada hidroponik sistemde tuz stresine maruz genç mısır (*Zea mays* L.) fidelerinde nitrat redüktaz (NR) aktivitesindeki değişimler araştırılmıştır. Tuz uygulamasının artmasıyla yaprak ve köklerde Na^+ ve Cl^- iyonları ile çözünebilir şeker ve amino asit birikimi artmıştır. Aynı çalışmada nitrat içeriği

yapraklarda azalırken köklerde ise artış göstermiştir. Kontrol bitkilerinde yapraklardaki NR aktivitesi hızlıca artmışken, tuz uygulanmış bitkilerde ise düşüş göstermiştir (Abdelbaki *et al.* 2000). Faustino vd. (2000) ise 12 toleranslı, 2 orta tolerant ve 6 adet de duyarlı mısır (*Zea mays*) çeşitleriyle yaptığı çalışmada, tuz stresine karşı mısır bitkilerinin büyüme ve NR aktivitesini incelemiştir. Tuza duyarlı varyeteler ile tolerantlı varyeteler arasında kök büyümesi ve NR aktivitesi bakımından önemli farklılıklar bulunmuştur. Özellikle hassas varyetelerde taze ve kuru ağırlıklarda azalma meydana gelmiştir. Aynı şekilde NR aktivitesi duyarlı varyetelerde diğer dayanıklı varyetelerden daha düşük olmuştur. Bu çalışmaları destekleyen başka bir çalışmada, Turan vd. (2010) tarafından tuz uygulaması sonrası mısır bitkisinin büyüme parametreleri ve iyon içeriğinin değerlendirildiği bir çalışma yapılmıştır. Dört farklı tuz konsantrasyonu (25, 50, 75 ve 100 mM) uygulanmış bitkiler, 6 hafta sonra hasat edilmiştir. Artan tuz toksitesiyle, kök ve gövde uzunluğunda görülen azalmaya paralel olarak fide kuru ağırlıklarında da düşüş olmuştur. Tuz stresi ve stoma etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada, artan miktarlarda uygulanan tuzun, asma bitkisinin bitki hücrelerini olumsuz yönde etkileyerek stomaların hareketini azalttığı belirlenmiş ve buna bağlı olarak da fotosentezin azaldığı gözlenmiştir. Diğer taraftan, tuz stresi ile birlikte bitkide besin elementi eksiklikleri de ortaya çıkmaktadır. Örneğin Cramer ve Nowak (1992), Mn konsantrasyonu düşük bir ortamda yetiştirilen ve tuz stresine maruz kalan arpa bitkisi üzerinde yapmış oldukları çalışmada, bitkinin büyüme ve gelişmesinin yavaşladığını ve bunun yüksek tuz miktarına bağlı olarak gelişen Mn eksikliğinden kaynaklandığını belirtmişlerdir. Benzer bir çalışmada Na^+ ve Cl^- miktarının artışı yüzünden diğer iyonlar yeterince alınamadığı için bitkilerde mineral madde beslenmesinde dengesizlik meydana geldiği bulunmuştur (Çakırlar ve Topçuoğlu 1985). Tuz bitkilerde hücrel protein içeriğini de etkilemektedir. Örneğin, arpa, ayçiçeği ve çeltik gibi monokotil bitkilerin tuza toleranslı genotiplerinde daha fazla çözünebilir protein içeriği bulunduğu tespit edilmiştir (Parvaiz and Satyawati 2008). Tuzluluk koşullarında domatestte yapılan bir çalışmada köklerde 30, 62, 75 kDa ve yapraklarda 38 ve 46 kDa moleküler ağırlıkta proteinleri teşvik ettiği gözlenmiştir (Amini *et al.* 2007). Tuz stresinde ortamdaki tuzun dozu da önemlidir. Örneğin *Triticum aestivum* ve *Triticum turgidum* buğday türlerinde 100 mM NaCl uygulamasında verimin, ekmeklik buğdayda %7, makarnalık buğdayda ise %38 oranında azaldığını; 150 mM NaCl uygulamasında ise verimin ekmeklik

buğdayda %43, makarnalık buğdayda ise %54 oranında azaldığını bildirmişlerdir (Munns *et al.* 2006). Konuyla alakalı bir çalışmada, tuz stresine maruz bırakılan domates bitkilerinin bazı fizyolojik özellikleri ve toplam protein miktarı üzerine bitki aktivatörünün etkisini araştırmışlardır. Yapılan çalışmanın sonucunda NaCl uygulamasının domates bitkilerinin kök ve gövde kısmındaki büyümeyi engellediği ortaya konularak aynı zamanda gövde yaş ağırlığı ve kuru ağırlığının azaldığı tespit edilmiştir. Bunun yanında tuz stresine maruz kalan bitki yapraklarındaki oransal su içeriğinde oluşan azalmanın bitkinin uzamasını engellediği ortaya konulmuştur (Sekmen *vd.* 2005). Bir çalışmada ise tuz stresine bırakılmış 8 mısır çeşidinde prolin, Na ve klorofil içerikleri araştırılmıştır. Çeşitler arasında çalışılan parametreler değişkenlik göstermekle birlikte kontrolleriyle kıyaslandığında tüm çeşitlerde artan tuzla birlikte yapraklardaki Na içeriği ve prolin miktarları artmıştır. Klorofil miktarları ise kontrollerine göre tüm çeşitlerde azalma göstermiştir. Bununla birlikte yaprakların nisbi su içerikleri bakımından çeşitler arasında önemli bir fark bulunmamıştır (Molazem *et al.* 2010). Bunlara ilave olarak, tuzluluk bitkilerde nitrat ve sülfat asimilasyon yolunda yer alan birçok enzimin aktivitesini değiştirir, azot ve kükürt gereksinimini artırmaktadır (Siddiqui *et al.* 2008). Buğday, pirinç ve üzüm gibi farklı bitkiler ile yapılan çalışmalarda uygulanan NaCl konsantrasyonunun artışına bağlı olarak yapraklardaki total klorofil miktarının azaldığı bildirilmektedir (Sivritepe ve Eriş 1999; Sairam and Srivastava 2002; Lutts *et al.* 1996). Bu verileri destekleyen bazı çalışmalarda da örneğin buğday, pirinç, üzüm gibi çeşitli bitkilerde uygulanan NaCl konsantrasyonu artışına bağlı olarak yapraklardaki total klorofil miktarının azaldığı bildirilmektedir (Sivritepe ve Eriş 1999; Sairam and Srivastava 2002; Lutts *et al.* 1996). Yukarıda özetlenen çalışmalara göre tuz stresi bitkilerde gerek fizyolojik gerekse metabolik süreçleri olumsuz etkileyerek bitki büyüme ve gelişmesini azalttığı görülmektedir. Bu etkide özellikle Na iyonunun toksik etkisi ve tuzun hücrelerde ortaya çıkardığı ozmotik dengesizlik öne çıkmaktadır.

Bitki kökleri çeşitli taşıyıcılar kullanarak topraktan nitrat (NO_3^-), amonyum (NH_4^+) ve diğer besin maddelerini absorbe eder. Örneğin, AMT protein ailesi üyeleri NH_4^+ 'ü taşır ve NRT protein ailesi üyeleri ise NO_3^- 'ü taşır. NO_3^- , NR enzimi ile nitrite, daha sonra da

NiR ile NH_4^{+} 'e indirgenir. Hem NO_3^- indirgenmesinden elde edilen hem de toprak kaynaklı NH_4 , amino asit sentezi için glutamin sentetaz (GS) ve glutamat sentaz (Fd-GOGAT ve NADH-GOGAT) veya alternatif glutamat dehidrojenaz (GDH) yolu asimile edilir. Bir çalışmada tuz stresinin azot metabolizması üzerinde yaşlı yapraklarda, genç yapraklarda olduğundan daha güçlü bir etkisi olduğunu göstermiştir. Tuz stresi altında yaşlı yapraklar, genç yapraklardan daha yüksek oranda serbest NO_3^- içeriği sergilemiştir (Wang *et al.* 2012). Tuzluluk, NR aktivitesini önemli ölçüde azaltmış ve NR'deki en yüksek azalma, en yüksek tuzluluk seviyesi altında kaydedilmiştir. Ancak aynı çalışmada salisilik asit (SA) uygulanmasına verilen yanıt, çeşitli tuzluluk seviyelerinde anlamlı olarak farklı bulunmuştur. 100 mg L^{-1} SA düzeyi, mung bean fasulyesinde NR aktivitesinin iyileştirilmesinde en etkili olduğu belirlenmiştir. En yüksek tuzluluk seviyesinde, SA uygulaması NR aktivitesini istenen seviyeye yükseltmediği gözlenmiştir. Bununla birlikte, toleranslı mung bean çeşitleri, toleranslı olmayanlardan daha yüksek NR aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada NiR aktivitesi de tuzluluktaki artışla azalmış ve en yüksek tuzluluk seviyesindeki minimum olurken, en yüksek NiR aktivitesi normal şartlar altında yetişen bitkilerde kaydedilmiştir. SA'nın foliar uygulaması, NiR aktivitesini önemli ölçüde artırmıştır (Akhtar *et al.* 2013). NaCl uygulaması, maş fasulyesi (*Vigna radiata* L.) yaprağı, kökü ve nodülünde toplam azot içeriğinde yaklaşık %52, %50 ve %55 azalma sağlamıştır. Nodülde, nitrojenaz aktivitesi, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, stres altında yaklaşık %84 oranında azaltılmıştır. GS aktivitesi de sırayla yaklaşık %31, %16 ve %23 azalmıştır. Glutamat oksanotarat aminotransferaz aktivitesi de aynı dokularda %78, %57 ve %42 düşmüştür. NaCl tuzluluğu altında metabolik bozuklukların iyileştirilmesinde her biri 0.1 ila $10 \mu\text{M}$ arasında değişen indol-3-asetik asit (IAA), gibberellik asit (GA3) ve kinetin (K) ile ön muamele, maş fasulyesinde tuzun olumsuz etkisini yatıştırabilmiştir (Chakrabarti and Mukherji 2003). Yukarıda özetlenen çalışmalar tuz stresinin bitkide azot metabolizmasında rol alan NR, NiR, GS ve GOGAT enzimlerin aktivitesini düşürdüğü ve bu düşüşe paralel olarak bitkide büyüme ve gelişmenin azaldığı ortaya konmuştur.

Hidrojen sülfid (H_2S), genel olarak bitki büyümesi ve gelişmesi üzerinde zararlı etkileri olan bir fitotoksin olarak kabul edilir. Son yıllarda, bitkilerde NO ve karbon monoksit

(CO)'ye benzer fizyolojik etkilere sebep olan potansiyel bir sinyal molekülü olarak yeniden tanımlanmıştır (Chen *et al.* 2016). Bitkilere uygulanan NaHS (sodyum hidrosülfid) hücre özsuyunda çözünür, HS^- ve Na^+ üretmek için ayrışır ve sonra HS^- ortamdan 1 proton (H^+) alarak H_2S oluşmasına neden olur (Lin *et al.* 2012). Domates ile yapılan bir çalışmada, 100 μM NaHS (H_2S donörü olarak) uygulaması, bitki boyu, sürgün taze ve kuru ağırlığı, kök uzunluğu, endojen H_2S içeriği ve L-sistein desülhidraz aktivitelerini anlamlı bir şekilde artırmıştır. Baka bir çalışmada ise NaHS, süperoksit dismutaz (SOD), peroksidaz (POD), katalaz (CAT) aktivitelerinin artışıyla birlikte reaktif oksijen türlerinde (ROS) birikiminde ve lipid peroksidasyonunda (LPO) düşüşe neden olmuştur. Ayrıca, NaHS uygulaması nitrik oksit (NO) ve toplam S-nitrosotiyollerin (SNO) içeriğini, NR aktivitelerini stimüle etmiştir (Guo *et al.* 2018). Bu konuda yapılan bir çalışmada, buğday (*Triticum aestivum* L.) çimlenmesi esnasında H_2S donörü olarak kullanılan NaHS, tuz stresine maruz buğdaylarda, katalaz (CAT), guaiacol peroksidaz (POD), askorbat peroksidaz (APX) aktiviteleri ile malondialdehit (MDA) seviyesini düşürerek oksidatif hasardan korumada önemli bir rol oynamıştır (Ye *et al.* 2015). Tuza duyarlı bir buğday çeşidi (Deng *et al.* 2016) ve pirinç fideleriyle yapılan (Mostofa *et al.* 2015) ayrı ayrı iki çalışmada, eksojen H_2S 'nin fide büyümesi üzerindeki etkisi ile birlikte Na ve K transportu araştırılmıştır. Sonuçlar, bir H_2S donörü olan 0.05 mM sodyum hidrosülfid (NaHS) ile ön muamelenin, 12 saat boyunca, 100 mM NaCl altında buğday fidelerinin büyüme inhibisyonunu önemli ölçüde azalttığını göstermiştir. Ek olarak, NaHS ile ön muamele Na konsantrasyonu ve Na/K oranını da düşürmüştür. Bu sonuçlara göre eksojen H_2S 'nin düşük bir Na içeriği sağlayarak büyüme inhibisyonunu hafiflettiği ileri sürülmüştür. Farlı bir çalışmada, buğday tohumlarının çimlenmesi sırasında tuzluluk stresinin yatıştırılması için H_2S 'in rolün araştırılmıştır. H_2S donörü olarak NaHS ile yapılan ön muamele, tuzluluk stresinin buğday çimlenmesi üzerindeki inhibe edici etkisini önemli ölçüde azaltabildiği belirlenmiştir. Ayrıca NaHS ile ön işleme tabi tutulmuş tohumlar, kontrolünden daha yüksek amilaz ve esteraz aktiviteleri sergilemiştir. NaHS ön muamelesi, katalaz (CAT), guaakol peroksidaz (POD) ve askorbat peroksidaz (APX) aktivitelerini farklı şekilde uyarmış, NaCl etkisiyle fidelerin kök uçlarında azalan plazma zarı bütünlüğünü iyileştirmiştir. Çalışmada H_2S 'nin çimlenen buğday tohumlarında tuzluluk stresi ile indüklenen oksidatif hasardan korumada önemli bir rol oynadığı sonucuna varılmıştır.

(Ye *et al.* 2015). H₂S'nin farklı abiyotik streslerde koruyucu rolü üzerinde çalışmalar da bulunmaktadır. Örneğin H₂S'nin Cd toksisitesi üzerindeki etkileri *Populus euphratica* hücrelerinde floresans görüntüleme tekniği ve non-invaziv titreşimli iyon seçici bir mikroelettrot kullanılarak incelenmiştir. H₂S donörü sodyum hidrosülfid (NaHS) ile yapılan ön muamele, *P. euphratica* hücrelerinde Cd kaynaklı programlanmış hücre ölümünü önemli ölçüde azaltmıştır. NaHS'nin hafifletici etkisi, düşük (25 µM) ve yüksek dozlara (200 µM) kıyasla, 50 ve 100 µM'de daha belirgin olmuştur. Cd stresi altında, APX, CAT ve glutatyon redüktaz (GPX) gibi antioksidan enzimlerin toplam aktiviteleri, NaHS ile muamele edilmiş hücrelerde önemli ölçüde artmış, H₂O₂ birikimi ve LPO seviyesinin düşmesine yol açmıştır. Üstelik NaHS, sitoplazmada Cd birikimini azaltmıştır, fakat vakoulde Cd'nin oranını artırmıştır. NaHS, vakoul içine Cd akışını artırmış ve Cd akışı, tonoplast üzerindeki pH gradyanlarına bağlı olmuştur. Bu sonuçlar H₂S'nin antioksidan sistemi indükleyerek ve hücrel Cd homeostazının geliştirerek Cd toksisitesini hafiflettiğini göstermektedir. Antioksidan enzimlerin H₂S tarafından düzenlenmesi, H₂O₂ birikimini azaltmış ve bu nedenle H₂O₂ ile aktive olan plazma zarı kalsiyum kanallarından Cd akışını azaltılmıştır (Sun *et al.* 2013). İlginç bir çalışmada H₂S'nin hasat edilmiş süs bitkileri türlerinde çiçek senesensi üzerindeki etkileri çalışılmıştır. H₂S'nin *Erigeron annuus* (L.), *Euonymus maackii* Rupr., *Hibiscus syriacus* (L.)'den hasat edilen çiçek ve dallarda çiçek açılmasını ve yaşlanmayı (senesensi) geciktirdiği belirlenmiştir. LPO seviyeleri, eksplantlardaki endojen H₂S konsantrasyonuyla ters ilişkili olduğu görülmüştür. Senesense uğrayan çiçekler daha yüksek LPO seviyeleri ve daha az miktarda H₂S göstermiştir. Ayrıca, H₂S uygulaması CAT, SOD, APX ve POD aktivitelerini yükseltmiş ve *E. annuus* explant ve yapraklarında kesilen çiçeklerde çok daha düşük seviyelerde H₂O₂ ve O₂⁻ sağlamıştır. Bu çalışma, H₂S'nin hasat edilen çiçeklerin ömür uzunluğunu artırmada rol oynadığını ve bitkilerde antioksidan enzimlerin aktiviteleri üzerindeki stimüle edici işlevlerini göstermektedir (Zhang *et al.* 2011). H₂S'nin etilen hormonu düzeyi ile ilişkilerini belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada ise lazer taramalı konfokal mikroskopik (LSCM) ve spektrofotografik yaklaşımlar ile *Vicia faba* L.'de, ışık altında doza bağlı tek başına etilen uygulaması stomaların kapanmasına neden olmuştur. Ancak stoma kapanması H₂S biyosentezi inhibitörleri tarafından bloke edilmiştir. Ayrıca etilen, H₂S

oluşumunu indüklemiş ve yapraklarda L-D-sistein desülfhidraz (piridoksalfosfat bağımlı enzim) aktivitesini artırmıştır. Çalışmada H₂S ve NO'nun muhtemelen etilen kaynaklı stoma kapanmasının sinyal iletim yolunda yer aldıkları sonucuna varılmıştır (Jing *et al.* 2012). Bitki hücrelerinde 2 tane sistein desülfhidraz (CD) enzimi (L-sistein desülfhidraz ve D-sistein desülfhidraz) H₂S'nin üretilmesi için esas olarak sisteinin katabolizmasından sorumlu olduğu bilinmektedir. Bir çalışma, bu genlerin ekspresyon düzenlemesini ve bunların Arabidopsis'teki kuraklık toleransı ile ilişkilerini araştırmıştır. İlk olarak, Arabidopsis'te CD'lerin ekspresyon paterni araştırılmıştır. CD'lerin ekspresyon seviyeleri yaşa bağlı olarak kademeli olarak artmıştır. CD'lerin ekspresyonu köklerde ve gerçek yapraklarda; köklerden, rozet yapraklarından ve çiçeklerden önemli ölçüde yüksek çıkmıştır. İkinci olarak H₂S'nin kuraklığa karşı koruyucu etkisi değerlendirilmiştir. CD'lerin ekspresyon paterni, dehidrasyon tarafından indüklenen kuraklığa bağlı genlere çok benzediği görülmüş ve H₂S fumigasyonunun, kuraklıkla ilişkili genlerin ekspresyonunu daha da uyardığı bulunmuştur. Kuraklık, önemli ölçüde, yeniden sulama ile tersine çevrilmiş bir süreçte H₂S üretimini de artırmıştır. Ek olarak, NaHS (H₂S donörü) uygulamasından sonra fideler daha yüksek hayatta kalma oranı gösterdi ve kontrole kıyasla stoma açıklığının boyutunda önemli bir azalma göstermiştir. Bu bulgular, H₂S'nin Arabidopsis'teki kuraklık direncini arttırdığına dair kanıtlar sunmuştur (Jin *et al.* 2011). Ozmotik stres altında tatlı patates (*Ipomoea batatas*) fide yapraklarında, bir hidrojen sülfür (H₂S) donörü olan NaHS'nin klorofil ve antioksidan metabolizması üzerindeki etkisi incelenmiştir. PEG-6000 tarafından taklit edilen ozmotik stresin artmasıyla, tatlı patates fidesi yapraklarındaki klorofil çarpıcı biçimde azalmıştır. %15 PEG'de klorofil konsantrasyonu, kontrollere kıyasla sadece %50'ye ulaşmıştır. Klorofil konsantrasyonundaki ozmotik kaynaklı azalma, eksojen H₂S donörü NaHS'nin doza bağlı bir şekilde püskürtülmesiyle hafifletilebilirken, kontrol koşulları altında NaHS ile püskürtülen yapraklarda çok az belirgin semptom gözlenmiştir. Ayrıca çalışmada, NaHS spreylemesinin, süperoksit dismutaz, katalaz, askorbat peroksidaz aktivitelerini önemli ölçüde artırdığını ve lipoksijenaz ve hidrojen peroksit (H₂O₂) ve MDA konsantrasyonlarını azalttığını göstermiştir. Bu veriler, H₂S'nin ozmotik stres sırasında tatlı patates fidelerinde koruyucu bir rol oynadığını göstermiştir. Bu çalışmalara ilave olarak H₂S

uygulamasının yüksek sıcaklık, bakır ve alimünyum streslerinde de koruyucu rolü gösterilmiştir (Zhang *et al.* 2008; Zheng *et al.* 2010; Dawood *et al.* 2012).

Nitrik oksit (NO), bitkilerde farklı fizyolojik fonksiyonları olan önemli bir sinyal molekülüdür. Çimlenmeden başlayarak çiçeklenmeye, meyvenin olgunlaşmasına ve organların yaşlanmasına kadar, bitki büyümesinde ve gelişiminde çok önemli bir rol oynadığı ileri sürülmüştür. NO, bitki hücrelerinde hem yararlı hem de zararlı etkileri tetikleyebilir. Bu ikili rol muhtemelen, sentez hızının, translokasyonun, onun üretim etkililiğinin yanı sıra diğer moleküller ve sinyal bileşiklerle doğrudan etkileşime girme yeteneğinin bir etkisi olarak lokal NO konsantrasyonuna bağlıdır. NO, hücrelerde geçiş metalleriyle, özellikle demir sülfür protein merkezleriyle kolayca reaksiyona girer. Ayrıca, elektrofilik reaktif olarak katyon formu, sayısız organik bileşiğin kükürt, demir, azot ve karbon merkezlerine saldırabilir (Arasimowicz *et al.* 2007). Literatürde NO'nun bitkilerde sentezlenebildiği ve özellikle stres koşullarında bir sinyal bileşik rolü üstlenerek bitkiyi strese karşı korumada etkili olduğuna dair pek çok çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalar içerisinde çalışmamızla ilgili olanlar aşağıda kısaca özetlenmiştir. NO'nun, stres koşullarında bitki hücrelerinde içsel olarak arttığına dair bazı çalışmalar mevcuttur. Tuzluluk stresi altında *Arabidopsis* peroksizomlarında içsel olarak NO miktarının arttığı belirlenmiştir (Corpas *et al.* 2009). Kuraklık stresi altındaki bezelye, buğday ve tütünde de içsel NO üretiminin arttığı rapor edilmiştir (Leshem and Haramaty 1996; Gould *et al.* 2003; Kolbert *et al.* 2005). Carlos ve Lorenza (2001), oksidatif stres koşulları altında buğday bitkisiyle yaptıkları çalışmada NO donörü olan SNP etkisini araştırmışlardır. Kuraklığa maruz bırakılan buğdaya 150 µM SNP uygulanmış ve 1 haftanın sonunda buğday yapraklarında SNP etkisinin hala devam ettiğini belirlemişlerdir. Çalışmada SNP uygulamasının yapraklardaki transpirasyon oranını %20 oranında azalttığı görülmüştür. Bilindiği gibi tuzluluk stresi nedeniyle hücresel düzeyde meydana gelen hasarın çoğu, ROS kaynaklı oksidatif hasar ile ilişkilidir. Bitkilerin oksidatif hasardan korunmak için çok çeşitli savunma stratejilerine sahip oldukları görülmektedir. Bununla birlikte, bitkilerin tuz stresine toleransına NO'nun etkisi hakkında daha az şey bilinmektedir. NO donörü olan eksojen SNP tuz stresi altındaki pirinç fidesinde (Uchida *et al.* 2002), acıbaklada (Kopyra and Gwozdz

2003) ve salatalıkta oksidatif hasarı önemli ölçüde azaltarak (Fan *et al.* 2007; Yu-qing *et al.* 2007) fidelerin büyümesini arttırmıştır (Song *et al.* 2009). Ayrıca mısır ve *Kosteletzky virginica* fidanlarının kuru ağırlığını da arttırmıştır (Zhang *et al.* 2006; Guo *et al.* 2009). NO ön uygulaması, tuz stresi altındaki bitkilerde toplam çözünebilir protein içeriğini ve endopeptidaz ve karboksipeptidaz aktivitelerini artırarak karbon ve azot metabolizması arasında daha iyi bir dengeye katkıda bulunmuştur (Zheng *et al.* 2010). Diğer yapılan bir çalışmada eksojen NO uygulaması buğday yaprakları ve fidelerinin kuraklık toleransını artırdığı gösterilmiştir. NO birikiminin, ABA'nın stomanın kapanması sırasında *Vicia faba* stomalarında da gerekli olduğu kanıtlanmıştır. Çalışmada NO ile birlikte strese bağlı ABA birikiminin Arabidopsis'te stoma kapanmasına eşlik eden H₂O₂ sentezine bağlı olduğu ileri sürülmüştür (Arasimowicz *et al.* 2007). NO ayrıca yüksek ve düşük sıcaklık stresine karşı bitki cevaplarına da katılır. Örneğin, yüksek sıcaklık adı yonca hücrelerinde NO sentezinde bir artışa yol açarken, eksojen NO'nun uygulanması domates, buğday ve mısırdaki soğuk toleransını artırmıştır. Muhtemelen gözlenen etkiler, termal stresteki peroksidatif metabolizmanın artmasından kaynaklanan olumsuz etkileri düşüren NO'nun antioksidan etkisiyle ilişkilidir. Benzer olarak tuzluluk stresinde pirinç fidelerine SNP uygulaması, tuz etkisiyle oluşan kayıpların en aza düşmesine neden olmuştur. Bu durumda NO uygulamasından sonra, bitkilerin daha güçlü bir şekilde büyümesi, PSII aktivitesinin artışıyla birlikte, antioksidan enzimatik aktivitede bir artış ve spesifik olarak tuzluluk stresi direnç genlerinin ekspresyonu gözlenmiştir. Öte yandan, uzun süreli stres koşulları, NO ve NO'den türetilmiş reaktif ürünlerin aşırı üretilmesine neden olabilir ve bu da nitrosatif stres olarak bilinen bir dizi spesifik yanıtlara yol açabilir. Son zamanlarda, zeytin yapraklarında tuzluluk stresinin, reaktif azot türleri (RNS) üretimini, yani NO, GSNO ve RSNO üretimini indüklediğini ve bunun sonucunda, iyi nitrosatif stres markerleri olan tirozin içerikli proteinlerde bir artışa neden olduğu ileri sürülmüştür (Arasimowicz *et al.* 2007).

Çimlenme aşamasında yapılan çalışmalarda da NO uygulamasının stres toleransını artırdığını gösteren bazı çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin buğdayın tohum çimlenmesi sırasında eksojen NO etkisi; nişasta parçalanması, mitokondride oksidasyon ve K⁺/Na⁺

birikimi üzerine etkileri yüksek tuzluluk seviyelerinde incelenmiştir. Kışlık buğday tohumları (*Triticum aestivum* L., cv. Huaimai 17), 300 mM NaCl altında çimlenmeden hemen önce 20 saat boyunca 0.1 mM SNP ile ön ıslatmaya tabi tutulmuştur. Çalışmada 300 mM NaCl'de, dışsal NO, çimlenme oranını, koleoptil ve kök ağırlığını artırmış, fakat tohum besisi doku ağırlığını azaltmıştır. Eksojen NO ayrıca, tohum solunum hızını ve ATP sentezini artırmıştır. Ek olarak, tohum nişasta içeriği azalırken, çözünür şekerlerin içeriği ve amilaz aktivitesi yükselmiştir. Bundan başka, eksojen NO, SOD ve CAT, MDA ve H₂O₂ içeriğini ve mitokondride süperoksit anyonlarının (O₂⁻) oranını düşürmüştür. Eksojen NO ayrıca içsel Na⁺ iyonu konsantrasyonunu düşürürken, tohumlardaki K⁺ konsantrasyonunu artırmıştır. Bu bulgulara göre, NO uygulaması tuz stresi altında çimlenme sırasında K⁺ ve Na⁺ arasında bir denge sağlamıştır. Çalışmada eksojen NO muamelesinin, tuzlu koşullar altında buğday tohumları çimlenmesini ve fide oluşumunu iyileştirmek için iyi bir seçenek olabileceği ileri sürülmüştür (Zheng *et al.* 2009). Benzer bir çalışmada ise 200 mM NaCl stresi altındaki kamış (*Phragmites communis*) kalluslarında, SNP uygulaması, plazma membranı H⁺-ATPaz ekspresyonunu uyarmıştır. Yine ayçiçeği fidelerinde, NO'nin tuzluluk koşulları altında fidelerde Na/K oranı, köklerde 4 kat artmış ve Na hızlı bir şekilde kotiledonlara taşınmış ve bu oranla birlikte bir artış göstermiştir. Literatürde NO uygulamasının tuz stresi koşullarında bitki büyüme ve gelişmesini artırdığını gösteren başka çalışmalar da bulunmaktadır. Örneğin, NO ön uygulamasının hücrelerde karbon ve azot metabolizması arasında daha iyi bir dengeye katkıda bulunduğu ileri sürülmüştür (Zheng *et al.* 2010). Son yıllarda yapılan bir çalışmada, yüksek tuzluluğun, *Nicotiana tabacum* yapraklarında H₂S ve NO sinyal moleküllerinin endojen seviyeleri üzerindeki etkisine ve bunların abiyotik stres esnasında biyokimyasal cevap mekanizmalar üzerine odaklanmıştır. NaCl uygulaması, H₂S ve NO seviyelerinin anlamlı bir şekilde artmasına neden olmuştur. Bu artış, L-sistein ve L-argininin yükselmesi ve L-sistein desülfhidraz, siyanoalanin sentaz, sistein sentaz, nitrat redüktaz ve arginazın indüksiyonunu, H₂S veya NO'nun biyosentezinde yer aldığı bilinen enzim aktivitelerindeki artışla ilişkiliydi. İlave olarak stresli bitkilerde kontrol grubuna göre daha düşük stoma iletkenliği gözlenmiş ve antioksidan enzimlerin yüksek aktivitesi ve tuz stresi sonrası yüksek glutatyon oksidasyon oranı azalmıştır. Bu nedenle, NO ve H₂S seviyelerinde artış ve bunların etkileşimi, metabolik ve fizyolojik değişikliklerle birlikte aşırı tuzluluk

koşullarında tütünün hayatta kalmasına katkıda bulunduğu öne sürülmüştür (Da Silva *et al.* 2017).

NO ve H₂S etkisini bitki büyüme ve gelişmesinde önemi ve stres koşullarında koruyucu rolleri yukarıda ayrıntılı olarak ifade edilmiştir. Ancak yapılan dikkatli literatür incelemelerimize göre, ekzojen NO ve H₂S uygulamalarının tuzluluk stresi altındaki bitkilerde azot metabolizması üzerine etkilerini açıklayan herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Azot metabolizması bitki yaşamı ve veriminde en temel biyokimyasal süreçleri içermektedir. Azot metabolizmasında küçük bir bozulma, protein sentezinden hücre bölünmesine ve nihayetinde verime kadar bütün bitki proseslerini doğrudan veya dolaylı olarak etkileyecektir. Bu nedenle, NO ve H₂S etkisiyle tuz stresine karşı bitkide azot metabolizmasında meydana gelen değişmelerin ve bitki cevabının bilinmemesi önemli bir eksikliktir. Diğer canlılarda olduğu gibi bitkiler için de en önemli elementlerin başında gelen azot (N), bitkiler tarafından topraktan NO₃⁻ ve NH₄⁺ formlarında alınır. Azot kaynağı olarak kullanılan NO₃⁻ eksikliğinde bitki büyümesi sınırlanır. NO₃⁻ bitkiye alındıktan sonra doğrudan organik madde yapısına katılamaz. NO₃⁻'ün asimilasyonu için NH₄⁺'e indirgenmesi ve sonra asimile edilerek organik madde yapısına katılması gerekir. NO₃⁻'ün asimilasyonunda 4 önemli enzim rol alır. Bunlar; Nitrat Redüktaz (NR), Nitrit Redüktaz (NiR), Glutamin Sentaz (GS) ve Glutamat Sentaz (GOGAT) enzimleridir. Bu enzimlerin aktivitelerindeki değişimleri izleyerek bitkide azot asimilasyonunun mevcut durumu belirlenebilir (Sangwan *et al.* 2014) ve stres esnasında azot metabolizması enzimlerinin aktivitelerinin düzenlenmesi stres hasarının azaltılmasına önemli katkı yapabilir.

3. MATERYAL ve YÖNTEMLER

3.1. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Çimlenme kabini (İnkübatör)	: Memmert, Germany, INBE, 410 1583
Çalkalayıcı	: Gallenkamp
Otoklav	: Hirayama, Japan, HVE 50
Dijital hassas terazi	: Shimadzu, Japan, AY220
İklim kabini	: Jeno Tech, Güney Kore
Soğutucu	: Arçelik
Derin dondurucu (-30 °C)	: Arçelik
Derin dondurucu (-80 °C)	: Nuaire
Tüp Karıştırıcı	: Fisons Whirlimixer
Manyetik karıştırıcı	: Chiltern HS31
Masa santrifüjü	: Hettich EBA 21, Germany
Soğutmalı masa santrifüjü	: Hettich Micro 22 R, Germany
Otomatik pipetler	: Axigen, Ependhof
pH metre	: WTW unilab
Sıcak su banyosu	: Wise-Hot Bath
UV-visible spektrofotometre	: Shimadzu, Japan, UVmini-1240
Multiskan spektrofotometre	: Multiscan Go
Vortex tüp karıştırıcı	: IKA, USA, MS2
Kuru blok inkübatör	: Allsheng

3.2. Kullanılan Çözeltiler

Araştırma süresi içinde kullanılan çözeltilerin kullanım yerleri ile hazırlanış biçimleri aşağıda sunulmuştur. Kullanılan kimyasallar, Sigma, Merck ve Fluka şirketlerinden temin edilmiştir.

3.2.1. Toplam çözünebilir protein tayini için gerekli çözeltiler

1. KH_2PO_4 (0.1 M; pH 6.75): 4.35 gr KH_2PO_4 200 mL saf suda çözünmüş, 1N HCl kullanılarak pH 6.75'e ayarlandıktan sonra, son hacim 250 mL'ye tamamlanmıştır.
2. BCA reaktifi: 15 mL Bicionchonic asit 0.3 mL CuSO_4 ile karıştırılır.

3.2.2. Malondialdehid (MDA) ölçümü (lipid peroksidasyonu) çözeltileri

1. TCA-trikloroasetik asit (%5): 80 mL saf su içerisine 5 gr TCA ilave edilerek çözünür ve son hacim 100 mL'ye tamamlanır.
2. TBA Reaktifi: %20 TCA içinde %0.5'lik TBA-tiobarbutirik asit (Lipid peroksidasyonu reaksiyon çözeltisi): 80 mL saf su içinde 20 gr TCA çözülür ve daha sonra içerisine 1 gr TBA ilave edilerek iyice çözünmesi sağlanır ve son hacim 100 mL'ye tamamlanır.

3.2.3. Nitrat Redüktaz (NR) ve Nitrit Redüktaz (NiR) aktivitesi için çözeltiler

1. Homojenat tamponu (50 mM; 2 mL; pH: 7.5): 3 mM EDTA, %1(w/v) BSA, 5 mM sistein ve %0.1 PVP. 2.738 gr KH_2PO_4 yaklaşık 300 mL saf su içerisinde çözülmüştür. 0.35 gr EDTA, 4 gr BSA, 0.4 gr PVP. Daha sonra içerisine 0.24 gr sistein ilave edilerek karıştırılmış ve pH:7.5 olarak ayarlanmıştır. Son hacim 400 mL'ye tamamlanmıştır.
2. 25 mM KH_2PO_4 , pH: 7.5; 200 mM NaNO_3 , (NR aktivitesi için kullanılan: 0.68 gr KH_2PO_4 yaklaşık 150 mL saf suda çözülmüştür ve 3.4 gr NaNO_3 ilave edilerek pH:7.4 olarak ayarlanmıştır. Daha sonra son hacim 200 mL'ye tamamlanmıştır. 2 mM NADH NR aktivitesi için; 0.07 gr NADH 40 mL saf suda çözünmüştür ve son hacim 50 mL'ye tamamlanmıştır. 100 μL 1M zinc sulfate, 7.2 gr çinko sülfat 20 mL saf su içerisinde çözünmüştür ve son hacim 25 mL'ye tamamlanmıştır. NiR aktivitesinde kullanılan çözeltiler: KH_2PO_4 (0.5 M; pH 7.4; 1.5 mL), 100 μL NaNO_2 (15 mM), 200 μL metilviolet (5 mM) ve 200 μL 190 mM sodyum bikarbonat (86 mM sodyum dithionit içerir). 10.2675 gr KH_2PO_4 100 mL saf suda çözdükten sonra pH: 7.4 olarak ayarlanmış ve son hacim 150 mL'ye tamamlanmıştır. 0.015 gr NaNO_2 10 mL saf suda çözünmüştür

ve daha sonra 15 mL'ye tamamlanmıştır. 0.038 gr metilviolet 20 mL saf su içerisinde çözünmüştür ve 30 mL'ye tamamlanmıştır. 10 mL saf su içerisinde 0.235 gr sodyum bikarbonat çözünmüştür ve 15 mL'ye tamamlanmıştır. Bundan 10 mL alınmış ve içerisinde (10 M) 0.224 gr sodyum dityonit çözölmüştür ve son hacim ilk hazırlanan (10 mL: 0.235 gr) sodyum bikarbonat çözeltisi ile 15 mL'ye tamamlanmıştır.

3. NR ve NiR aktivitesi için: %1 sülfanilamid (1 mL; 1.5 M HCl içerisinde hazırlanmış). %0.02 N-(1-Naftil etilenediamin dihidroklorür (NED-HCl) (1.5 M HCl içinde hazırlanmış). 20 mL HCl 100 mL saf su üzerine dökölmüştür ve 2 gr sülfanilamid eklenmiştir. Son hacim 150 mL'ye tamamlanmıştır. 20 mL HCl 100 mL saf su üzerine dökölmüştür ve içerisinde 0.04 gr NED ilave edilmiştir. Son hacim 150 mL'ye tamamlanmıştır.

3.2.4. Glutamin sentaz (GS) aktivitesi ölçümü için çözelti

1. Ekstraksiyon Çözeltisi (250 mL için): 6 gr HEPES alınır yaklaşık 200 mL saf suda çözünür ve üzerine 0.19 gr DTT, 0.07 gr EDTA, 18 µL 2-Merkaptoetanol ve 0.24 gr MgCl₂ ilave edilir. Karışım iyice çözöndükten sonra pH'sı 7.6'ya ayarlanır. Son olarak hacmi saf su ile 250 mL yapılır.

2. Reaksiyon Karışımı (100 mL için): 12.15 gr TRİS-HCl alınır ve yaklaşık 80 mL saf suda çözünür, çözelti karıştırılırken üzerine yavaş yavaş 0.5 gr ATP, 0.24 gr sistein, 0.96 gr MgSO₄, 0.55 gr hidroksilamin hidroklorür (NH₂OH·HCl) ve 0.95 gr Glutamat ilave edilir ve pH'sı 7.6'ya ayarlanır. Son olarak çözeltinin hacmi 100 mL yapılır.

3. %10'luk FeCl₃ Reaktifi (80 mL için): Bunun için ayı ayrı 2 çözelti hazırlanır.

(A) 12 gr FeCl₃ alınır ve yaklaşık 30 mL 0.2 M HCl içinde çözünür ve son hacmi 40 mL'ye tamamlanır. (B) 14.4 gr TCA alınır ve yaklaşık 30 mL saf su içinde çözünür ve son hacmi 40 mL'ye tamamlanır. Hazırlanan bu iki çözelti yavaş yavaş sırayla karıştırılır, yani (A+B = 80 mL)

3.2.5. Glutamat sentaz (GOGAT) aktivitesi çözeltileri

1. Ekstraksiyon Çözeltisi (100 mL için): 1.19 gr HEPES yaklaşık 70 mL saf suda çözünür. Bunun üzerine, 0.015 gr DTT, 0.037 gr Na-EDTA, 0.11 gr KCl, 0.1 gr PVP ve son olarak 0.0174 gr PMSF, ilave edilir. Sonra çözeltinin pH'sı 7.6'ya ayarlanır ve son hacmi 100 mL yapılır. Bu çözeltiye PMSF en son katılır. PMSF katıldıktan sonra çözelti günlük kullanılır. Direkt ışıktan korunur.
2. Reaksiyon karışımı (100 mL için): 0.6 gr HEPES yaklaşık 70 mL saf suda çözünür. Bunun üzerine 0.146 gr Oxoglutarat (α -Ketoglutarat), 0.145 gr Glutamin, 0.01 gr NADH, 0.075 gr KCl, 0.037 gr Na-EDTA, 500 μ L merkaptotanol ilave edilir. Çözeltinin pH'sı 7.6'ya ayarlanır. Çözeltinin son hacmi 100 mL yapılır. Bu çözelti taze hazırlanmalıdır. Hemen kullanılmayacaksa (3-8 saat gibi) +4°C'de tutulur. Ancak çalışma esnasında önce 30°C'de tutulmalıdır. Direkt ışıktan korunur.

3.2.6. Çalışılan tuz konsantrasyonlarının hazırlanması

1. 150 mM NaCl (10 L için): 87.75 gr NaCl 300 mL saf su içerisinde çözünür ve üzerine 9.700 mL su içerisine ilave edilir.
2. 300 mM NaCl (10 L): 175.5 gr NaCl 500 mL saf su içerisinde çözünür ve üzerine 9.500 mL su içerisine ilave edilir.

3.2.7. SNP (NO donörü olarak) konsantrasyonlarının hazırlanması

1. SNP (1000 mM; 300 mL ve 500 mM, 150 mL): 1000 mM için 0.1340 gr SNP 400 mL saf suda çözünerek son hacmi 500 mL'ye tamamlanır. 500 mM için bu çözeltiden 150 mL alınıp son hacim 300 mL'ye tamamlanır. Direkt ışıktan korunur.

3.2.8. NaHS (H₂S donörü) konsantrasyonlarının hazırlanması

1. H₂S (1000 mM; 500 mL): 0.02803 gr H₂S 400 mL saf su içerisinde çözünerek son hacmi 500 mL'ye tamamlandı.
2. H₂S (1500 mM; 500 mL): 0.42045 gr H₂S 400 mL saf su içerisinde çözünerek son hacmi 500 mL'ye tamamlandı.

3.3. Yöntemler

3.3.1. Bitkilerin büyütülmesi ve ilgili parametreler

Araştırmamızda bitki materyali olarak stres toleransları farklı iki buğday (*Triticum aestivum* L., cv. Doğu-88 ve cv. Altındane) çeşidi kullanıldı. Buğday tohumları ekimden önce %10'luk çamaşır suyu ile 10 dk ve daha sonra %70'lik alkolle 5 dk steril edildikten sonra saf su ile durulandı. Hidroponik sistemde her sepet saksıya (5 cm çapında) yaklaşık 10 buğday tohumu ekildi. Çimlenme sonrası fideler sıcaklık (24/20°C, gündüz/gece) ve nem (%65) kontrolü olan bir iklim kabininde hidroponik (bitki besinlerini içeren su kültürü) ortamda çimlenmeye müteakiben 9 gün büyütüldü. Dokuzuncu gün bitki su kültürü ortamına Arnon ve Hoagland'ın 1/2 besin reçetesi verildi ve 10. gün farklı konsantrasyonlarda NaHS (1000 ve 1500 µM) ve SNP (500 ve 1000 µM) yapraklara püskürtülerek uygulandı. Uygulama işlemi yapraklardan damlamalar oluncaya kadar devam edildi. Bu işlemden 2 saat sonra farklı konsantrasyonlarda NaCl (150 ve 300 mM) uygulaması yapıldı. Bu uygulamadan 4 gün sonra NaCl uygulama yapılmış ve uygulama yapılmamış bitkilerin kök ve gövde dokuları hasat edildi. Hasat edilen örnekler deneylerde kullanılıncaya kadar -80°C şartlarında bir derin dondurucuda saklandı. Azot metabolizması enzimleri çevresel faktörlere çok hızlı yanıt vermektedirler. Bu nedenle uygulama yapılmış bitkilerde örnek alınması gündüz (ışık periyodunda) ve aynı vaktine denk getirildi.

3.3.2. Arnon ve Hoagland'ın Tam Besin Reçetesinin Hazırlanması

Makro Besin Elementleri (100 mL stok)

Aşağıda verilen stok çözelti 100 mL hacimde hazırlanır. Bunun için;

- a. KH_2PO_4 : Gerekli miktar, 2.3 gr
- b. KNO_3 : Gerekli miktar, 6 gr
- c. $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$: Gerekli miktar, 4.9 gr
- d. MgSO_4 : Gerekli miktar, 4.9 gr

Yukarıda verilen miktarlar sırayla yaklaşık 80 mL saf suda yaş yavaş çözünür ve son hacim 100 mL'ye tamamlanır. Hazırlanan makro besin stok çözeltisi buzdolabında saklanır. Hazırlanan bu stok çözeltiden 1 L tam besin çözeltisi hazırlamak için 10 mL kullanılır (10 mL/1 L).

Mikro Besin Elementleri (100 mL stok)

- e. H_3BO_3 : Gerekli miktar, 0.286 gr
- f. $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: Gerekli miktar, 0.181 gr
- g. $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: Gerekli miktar, 0.022 gr
- h. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: Gerekli miktar, 0.008 gr
- j. $\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$: Gerekli miktar, 0.009 gr

Yukarıda verilen miktarlar sırayla yaklaşık 80 mL saf suda çözünür ve son hacim 100 mL'ye tamamlanır. Hazırlanan mikro besin stok çözeltisi buzdolabında saklanır. Hazırlanan bu stok çözeltiden 1 L tam besin çözeltisi hazırlamak için 1 mL kullanılır (1 mL/1 L).

Demir stok çözeltisi hazırlama

Stok çözelti (40.34 mM Fe-EDTA): 0.74 gr Fe-EDTA alınır ve 40 mL saf suda hafif ısıtılarak çözünür. Son hacmi 50 mL'ye tamamlanır. Bu çözelti alüminyum folyo ile kaplı bir şişede (karanlıkta) buzdolabında saklanır. Hazırlanan bu stok çözeltiden 1 L tam besin çözeltisi için 0.5 mL kullanılır (0.5 mL/1 L). Bu işlemle besiyerinde 0.02 mM Fe-EDTA bulunur. Fe-EDTA çözeltisi uzun süre saklanmaz. Taze hazırlanır ve kullanılır. Direkt ışıktan korunur.

3.3.3. Bitkilerin kök ve gövde uzunluklarının ölçülmesi

Bitkilerin kök ve gövdeleri, bileşme yerlerinden bisturi yardımı ile kesilerek uzunlukları milimetrik cetvel yardımı ile ölçüldü. Kökler ölçülürken ana kökün uzunluğu esas alındı. Uygulamalara ait kök ve gövdelerin uzunlukları ayrı ayrı toplanıp, bitki sayısına bölünerek ortalama kök ve gövde uzunluğu cm/bitki olarak hesaplandı.

3.3.4. Kuru ağırlık tayini

Kök-gövde uzunlukları ölçülen, her gruptan toplam 10 bitki alındı ve alüminyum-folyoya sarılarak Pastör fırınında 60°C'de 72 saat boyunca kurutulup sonra tekrar tartılarak her bir uygulamaya ait organların kuru ağırlıkları (mg/fide) hesaplandı.

3.3.5. Fotosentetik pigmnet içeriğinin belirlenmesi

Bitki yalpaklarında klorofil a, klorofil b, toplam klorofil ve karotenoid miktarlarını belirlemek için (Witham *et al.* 1971) tarafından kullanılan prosedür uygulandı. Taze yaprak örnekleri (0.2 gr) %80 soğuk aseton içerisinde son hacim 10 mL olacak şekilde homojenize edildi. Daha sonra homojenat filtreye kâğıdından süzülerek elde edilen ekstrakt 5000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Tüplerden süpernatantlar alınarak 450, 645 ve 663 nm'de absorbans değerleri kaydedildi. Süpernatantların üç farklı dalga boyunda

kaydedilen absorbans değerleri aşağıda verilen eşitliklerde yerine konulmasıyla bitki yapraklarında bulunan klorofil a, klorofil b, total klorofil ve karotenoid miktarları hesaplandı ve tez içinde mg/doku olarak sunulmuştur.

$$\text{mg/klorofil a/gr doku} = [(12.7 \times \text{OD663}) - (2.69 \times \text{OD645})] \times (V/1000 \times W)$$

$$\text{mg/klorofil b/gr doku} = [(22.9 \times \text{OD645}) - (4.68 \times \text{OD663})] \times (V/1000 \times W)$$

$$\text{mg/ toplam klorofil /gr doku} = [(20.2 \times \text{OD645}) + (8.02 \times \text{OD663})] \times (V/1000 \times W)$$

$$\text{mg toplam karotenoid /gr doku} = (4.07 \times \text{OD450}) - (0.0435 \times \text{Kla miktarı} + 0.367 \times \text{Klb miktarı})$$

OD : Klorofil ekstraktının belirtilen dalga boylarındaki absorbans değerini,

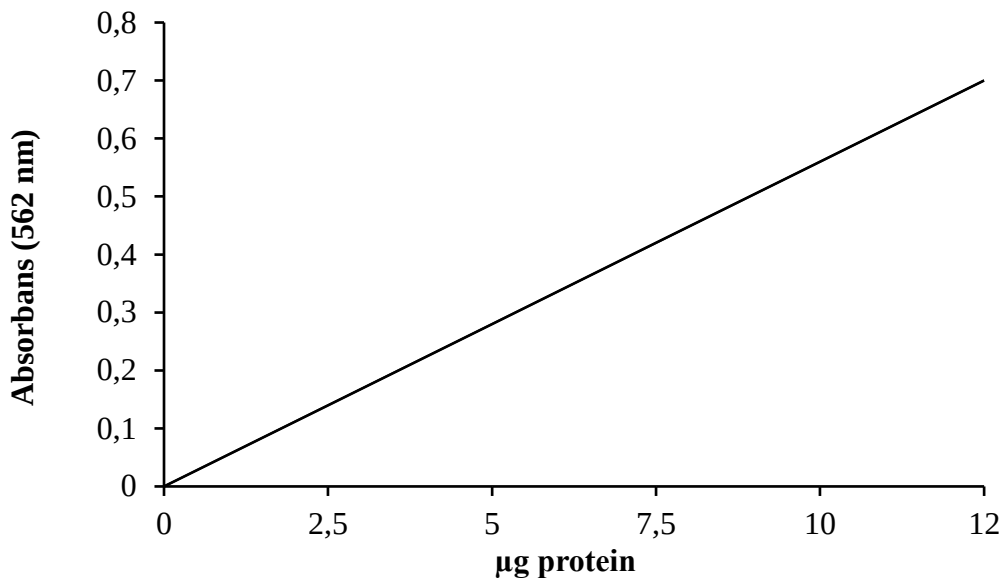
V : %80'lik asetonun son hacmini,

W : Ekstre edilen dokunun gram olarak yağ ağırlığını gösterir.

3.3.6. nebilir protein miktarının belirlenmesi

Buğday fidelerine ait kök veya yapraklardan rastgele alınan 0.2 gr örnek, bir porselen havan içerisine alınmış ve sıvı azot içinde un haline gelinceye kadar parçalanmıştır. Daha sonra bu ekstrakt üzerine fosfat tamponundan (100 mM KH₂PO₄, pH: 7.0) 2,5 mL ilave edilmiş ve doku bir havan eliyle iyice homojenize edilmiştir. Elde edilen karışım bir santrifüj tüpüne alınarak +4°C'de 12000 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiş ve sonra tüpteki süpernatant başka temiz bir tüpe alınmıştır. Bu tüpten 20 L alınarak bir mikropleyte pipetlenmiş ve zerine BCA (Bicinchoninic asid+CuSO₄) reaktifinden 200 L ilave edilmiştir. Bu mikropleyt içeriğiyle beraber kısa bir müddet hafif çalkalandıktan sonra 60°C'de 15 dk inkübe edilmiştir. Mikropleyttteki rneğin absorbansı 562 nm'de bir Multiscan'da Kr'e karşı okunmuştur. Kr numune olarak 20 L saf su ve 200 L BCA reaktifi kullanılmıştır. Dokuların protein içeriğinin hesaplanmasında standart bir grafikten yararlanılmıştır. Bunun için önce, 10 mL fosfat tamponu (100 mM; pH: 6.75) içerisinde 10 mg BSA (bovine serum albumin) zlerek bir stok çözelti hazırlanmıştır. Bu şekilde hazırlanan stok BSA (1 mg/1 mL) zeltiden 0.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10, 12 L'lik hacimler bir mikroplate kuyularına 3 tekrarlı olacak şekilde pipetlenmiş ve üzerleri saf su ile 20 L'ye tamamlanmıştır. Sonra kuyuların her

birine 200 μ L BCA reaktifi ilave edilmiş ve bu mikropleyt içeriğiyle beraber kısa bir müddet hafif çalkalandıktan sonra 60°C’de 15 dk inkübe edilmiştir. Yapılan ölçümler sonunda, 562 nm’deki absorbans değerlerine karşılık gelen protein değerlerinden yararlanarak standart bir grafik türetilmiştir (Şekil 3.1). Hazırlanan standart grafik kullanılarak yaprak ve köklerin protein miktarı μ g /gr doku olarak sunulmuştur (Smith *et al.* 1985).



Şekil 3.1. Protein tayininde kullanılan standart grafik

3.3.7. Lipid peroksidasyon seviyesinin (MDA olarak) belirlenmesi

Tiyobarbitürik asit reaktiflerinin (TBA) spektrofotometrik ölçülmesi ile lipid peroksidasyonu seviyesi belirlenebilir (Ohkawa *et al.* 1979). Yaprak veya kök örneklerinden 0.2 gr alınarak önce sıvı azotla un haline getirilmiştir. Bu ekstrakt üzerine %5’lik TCA çözeltisinden 5 mL ilave edilerek tamamen parçalanıncaya kadar havanda homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenat ependorf tüplerine aktararak 13000 rpm’de 15 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmından 1.5 mL alınmış ve üzerine 1.5 mL %0.5’lik TBA reaktifi (%20 TCA içinde) pipetlenmiştir. Karışım iyice vortekslendikten sonra 30 dk 95°C sıcak su banyosunda inkübasyona bırakılmıştır. Süre

sonunda tüpler buz banyosuna alınarak reaksiyon durdurulmuştur. Elde edilen pembe-kırmızı renkli çözelti tekrar 12000 rpm'de 5 dk daha santrifüj edildikten sonra, süpernatantın 440, 532 ve 600 nm'deki absorbans değerleri belirlenmiştir. Bir mL karışım içerisindeki malondialdehid (MDA) miktarı aşağıdaki formüle göre hesaplanıp sonuçlar nmol/gr doku olarak sunulmuştur.

$$\text{MDA (nmol/ml)} = [[(A_{532}-A_{600}) - [(A_{440}-A_{600}) \times (0.0571)]] / 157000] \times 10^6$$

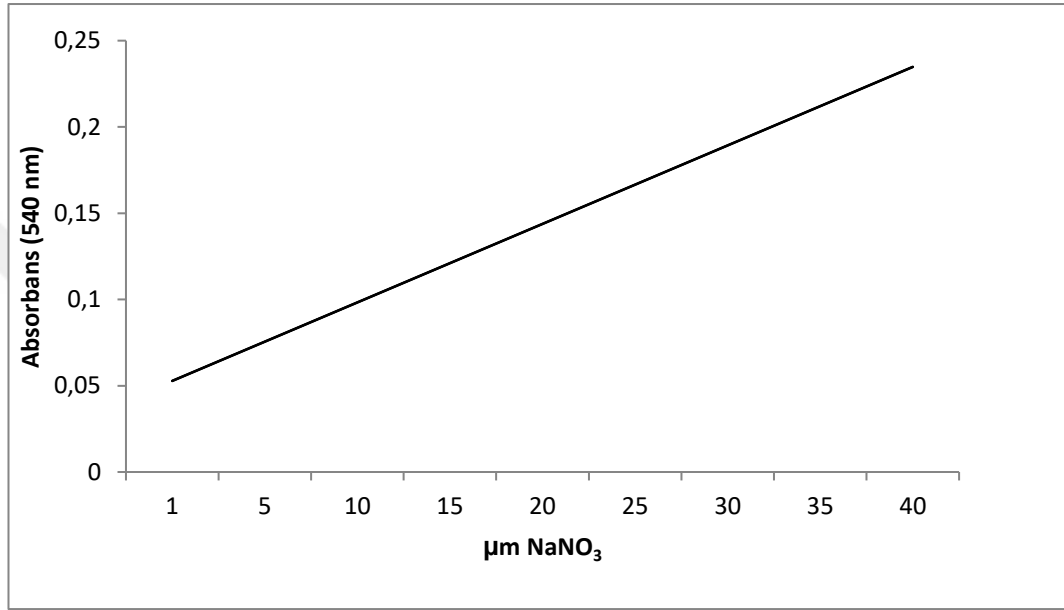
3.3.8. Azot metabolizmasında rol alan enzimlerin aktiviteleeri

Enzimlerin eksraksiyonu için buğday fidelerine ait kök ve yapraklardan 0.25 gr doku örneği, önce sıvı azot ve daha sonra 2.5 mL, 0.2 mM EDTA, %0.1 polivinilprilidon (PVP) ve 1 mM dithiyotreitol (DTT) içeren 50 mM fosfat tamponu (pH: 7) içinde homojenize edildi. Homojenize edilen örnekler 12000xg'de 15 dakika santrifüjlendi (+4 °C). Berrak süpernatant ham enzim kaynağı olarak kullanıldı (Khan 1996; Zheng-xun *et al.* 2007).

3.3.8.a. Nitrat redüktaz (NR) aktivitesinin belirlenmesi

NR aktivitesi, Jaworski (1971) metoduna göre belirlenmiştir. Reaksiyon karışımı (2 mL), 25 mM fosfat tamponu (pH 7.5), 10 mM NaNO₃, 0.05 mM EDTA ve 2 mM NADH'tan 1.8 mL ve 0.2 mL enzim özütü içerir. Reaksiyonu başlatmak için 0.2 mL enzim özütü ve 1.7 mL'lik reaksiyon karışımı içeren tüp içine 0.1 mL NADH pipetlenir. Peşine deney solüsyonu alt-üst edilerek karıştırılır ve 30 dakika 30 °C'de inkübe edilir. Karışımın renk reaksiyonu için; 1 mL %1 sülfanilamid ve 1 mL 1.5 M HCl + %0.02 N-(1-Naftil etilenediamin dihidroklorür (NED-HCL) ilave edilir ve karışım bu haliyle 30 dakika inkübe edilir. Gelişen pembe rengin absorbansı 540 nm'de ölçülür (Barro *et al.* 1991). Reaksiyon sonunda oluşan nitrit iyonlarının miktarı üzerinden enzim ünitesi hesaplanır. Bunun için önce, bilinen miktarlarda (0, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 µM) NaNO₂ içeren çözeltiler hazırlanır. Bu çözeltilerden 1.8 mL alınır ve üzerine 1 mL %1 sülfanilamid (1.5 M HCl içinde hazırlanmış olacak) + 1 mL %0.02 NED-HCl ilave

edilir. 30 dakika sonra gelişen pembe rengin absorbanansı 540 nm'de ölçülür. Bu çözeltilerden elde edilen standart eğri (Şekil 3.2) denklemiyle örneklerde oluşan nitrit miktarı hesaplanır. Bir ünite (EU) NR, 1 μmol nitrit üretmek için gerekli enzim miktarı olarak hesaplanır. Sonuçlar EU/mg doku olarak sunulmuştur.

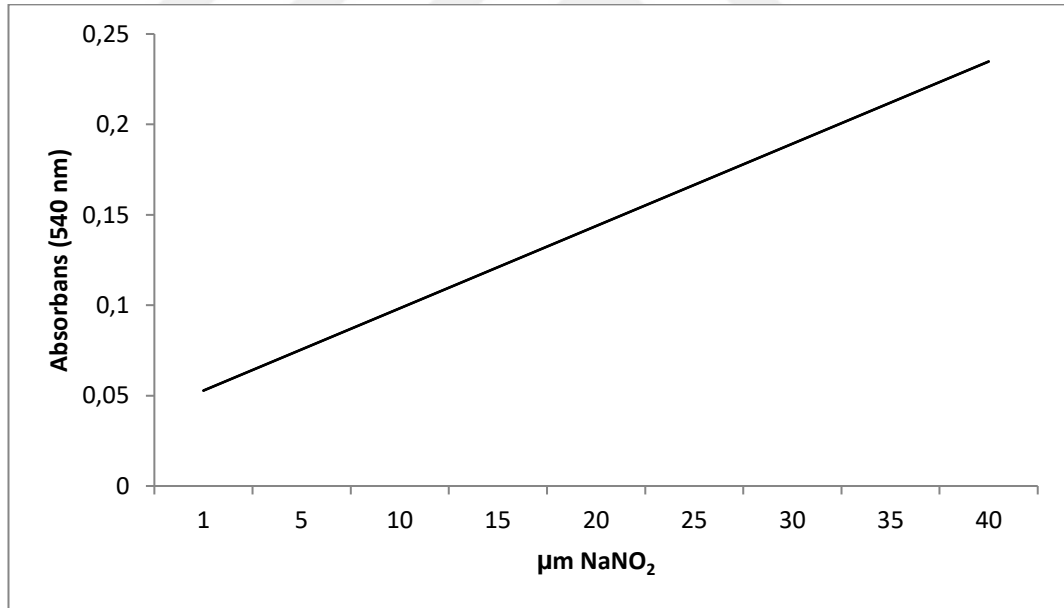


Şekil 3.2. Nitrat Redüktaz miktarını belirlemede kullanılan grafik

3.3.8.b. Nitrit redüktaz (NiR) aktivitesinin belirlenmesi

Aktivite ölçümü için bir tüpe; 2.5 mL fosfat tamponu (0.05 M; pH 7.4), 100 μL sodyum nitrit (15 mM NaNO_2), 200 μL metilviolen (5 mM) ve 200 μL 190 mM sodyum bikarbonat (86 mM sodyum dithionit içerir) konulur. Bu karışımın üzerine 250 μL enzim özütü (Kök için 300 μL) pipetlenir ve tüp hafifçe alt-üst edilir. Tüp 35°C 'de 30 dk inkübe edilir. Sonra, tüpteki reaksiyon, koyu mavi renk kaybolana kadar şiddetli çalkalanır ve kaynar suda 1 dk tutulur (reaksiyonu durdurmak için). Tüp, 10000 rpm'de 5 dk santrifüj edilir ($+4^\circ\text{C}$) ve elde edilen süpernatant temiz bir tüpe alınır. Karışımın renk reaksiyonu için; Tüp üzerine 1 mL %1 sülfanilamid (1.5 M HCl içinde hazırlanmış olacak) + 1 mL %0.02 N-(1-Naftil etilenediamin dihidroklorür (NED-HCL) (1.5 M HCl içinde hazırlanmış olacak) ilave edilir. Tüp karıştırıldıktan sonra, gelişen pembe rengin

absorbansı 30 dk sonra 540 nm'de ölçülür. Kör örnek, NaNO_2 haricindeki tüm bileşenleri içermektedir. Tüpte kalan ve tüketilmeyen nitrit iyonlarının miktarı üzerinden enzim ünitesi hesaplanır. Bunun için önce, bilinen miktarlarda (0, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 μM) NaNO_2 içeren çözeltiler hazırlanır. Bu çözeltilerden 1.8 mL alınır ve üzerine 1 mL %1 sülfanilamid (1.5 M HCl içinde hazırlanmış olacak) + 1 mL %0.02 NED-HCl ilave edilir. 30 dakika sonra gelişen pembe rengin absorbansı 540 nm'de ölçülür (Barro *et al.* 1991; Khan 1996). Bu çözeltilerden elde edilen standart eğri (Şekil 3.3; nitrat redüktazdaki grafik kullanılır) denklemiyle örneklerde oluşan nitrit miktarı hesaplanır. Bir ünite (EU) NR, 1 μmol nitrit üretmek için gerekli enzim miktarı olarak hesaplanır. Sonuçlar EU/mg protein olarak sunulur. Bir ünite NiR, 30 °C'de 1 dakika başına 1 μmol nitriti tüketmek için gereken enzim miktarı olarak hesaplanır. Sonuçlar EU/mg doku olarak sunulmuştur.



Şekil 3.3. Nitrit Redüktaz miktarını belirlemede kullanılan standart grafik

3.3.8.c. Glutamin sentaz (GS) aktivitesi ölçümü

GS aktivitesi ölçümü, hidroksamat biyosentetik yöntem olarak bilinen Zheng-xun vd. (2007) tarafından belirtilen protokole göre yapılmıştır. Özüt elde etmek için diğer enzimler için yapılan ekstraksiyonlardan farklı olarak, örneklerin (0.25 gr) ekstraksiyonunda 5 mM DTT, 1 mM EDTA, 1 mM 2-Merkaptoetanol ve 10 mM MgCl₂ içeren 2.5 mL 0.1 M HEPES tamponu (pH 7.6) kullanılır. Reaksiyon karışımı; 0.1 M Tris-HCl tamponu (pH 7.6), 10 mM ATP, 80 mM MgSO₄, 80 mM hidroksilamin hidroklorür, 20 mM sistein, 50 mM glutamat ve 250 µL enzim özütü içerir. Bu karışım, 30°C'de 30 dakika inkübe edilir ve sonra üzerine 1 ml FeCl₃ reaktifi eklenmesinden sonra kahverengi kompleks olarak γ-glutamilhidroksamat (GGH) oluşur. FeCl₃ reaktifi; 0.37 M FeCl₃, 0.2 M trikloroasetik asit (TCA) ve 0.67 M HCl'den oluşmaktadır. Kahverengi GGH kompleksinin absorbansı 540 nm'de ölçülür. Kör örnek, ATP dışındaki tüm bileşenleri içermektedir. Bir ünite GS, 30°C ve 1 dakikada absorbansı 0.01 değiştiren enzim miktarıdır (1 µmol GGH-kompleksi üretmek için gerekli enzim miktarı). Sonuçlar EU/gr doku olarak sunulmuştur. Enzim ünitesinin hesaplanması aşağıdaki formüle göre yapılır (<http://www.cohesionbio.com/>).

$$GS \text{ (EU/gr doku)} = [(OD_{\text{Örnek}} - OD_{\text{Kör}}) \times V_{\text{Total}} / (V_{\text{Örnek}} \times W/V_{\text{Toplam}})] / 0.01 / T$$

W : Homojenize edilen dokunun ağırlığı

V_{total} : Reaksiyon karışımının toplam hacmi

V_{örnek} : Enzim özütünün hacmi

T : Reaksiyon zamanı (30 dk)

OD_{örnek} : Örneğin absorbansı

OD_{kör} : Kör'ün absorbansı

3.3.8.d. Glutamat sentaz (GOGAT) aktivitesi ölçümü

NADH'a bağımlı GOGAT aktivitesi, Singh ve Srivastava (1986) tarafından önerilen yöntemle belirlenmiştir. Reaksiyon karışımı (1.8 mL); 25 mM HEPES tamponu

(pH 7.5) olup içinde 10 mM Oxoglutarat (α -Ketoglutarat), 10 mM Glutamin, 0.14 mM NADH, 10 mM KCl, 1 mM Na-EDTA ve %0.5 merkaptotanol içermelidir (Deney yapmadan hemen önce 30 °C’de tutulmalıdır ve her zaman taze hazırlanır). Kör olarak, NADH, 2-OG ve glutamin yerine, 750 μ L 40 mM fosfat tamponu (pH 7.5) kullanılır. Reaksiyon, 1.8 mL reaksiyon karışımı üzerine 200 μ L enzim özütü (kök için 400 μ L enzim özütü) pipetlenerek başlatılır. NADH oksidasyonu 3 dakika boyunca 340 nm’de izlenir. Enzim aktivitesi nmol mL⁻¹ olarak hesaplanır. Sonuçlar EU/gr doku olarak sunulmuştur. Enzim ünitesinin hesaplanması aşağıdaki formüle göre yapılır (<http://www.cohesionbio.com/>).

$$\text{GOGAT (EU/gr doku)} = (\text{OD}_{\text{örnek}} (0. \text{ dk}) - \text{OD}_{\text{örnek}} (3. \text{ dk})) / (\epsilon \times d) \times V_{\text{Total}} \times 10^9 / (W \times V_{\text{örnek}} / V_{\text{Assay}}) / T$$

- E : Molar ekstinksiyon katsayısı, 6.22×10³ L/mol/cm;
W : Doku örneğinin ağırlığı
V_{Total} : Enzimatik reaksiyonun toplam hacmi
V_{örnek} : Çalışılan örneğin hacmi
V_{Assay} : Örnek hazırlamada kullanılan tamponunun hacmi
T : Reaksiyon süresi

İstatistik analiz

Çalışmada sunulan veriler ($\pm$ SE olarak), her bir uygulamadan üç örnek (3 paralel) ve her bir örnekten 2 tekerrür yapıldıktan sonra elde edilen 6 bağımsız değerin ortalamasıdır. Sonuçların karşılaştırılması, SPSS 15 paket programı kullanılarak tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile yapılmış ve gruplar arasındaki farklılıklalar p<0.05 önem seviyesinde Duncan’ın Çoklu Karşılaştırma Testi kullanılarak belirlenmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu çalışmada, ekzojen NO ve H₂S uygulamasının tuz (NaCl) stresi altındaki buğdayda azot metabolizması üzerindeki etkilerini belirlemek amaçlanmıştır. Bu amaç için stres toleransları farklı iki buğday (*Triticum aestivum* L., cv. Altındane ve cv. Doğu-88) çeşidi kullanılmıştır. Fideler, kontrollü bir iklim kabininde hidroponik sistemde çimlenmeye müteakiben 9 gün büyütülmüş ve fide yapraklarına 10. gün H₂S donörü olarak NaHS (1 ve 1.5 mM) ve NO donörü olarak SNP (0.5 ve 1 mM) püskürtülmüştür. Daha sonra, fidelerin hidroponik sistemi 150 ve 300 mM tuz konsantrasyonlarına ayarlanmıştır. Bu uygulamadan 4 gün sonra, uygulama yapılmış ve uygulama yapılmamış bitkilerin kök ve gövde dokuları hasat edilmiştir. Bu kök ve gövdelerde, fizyolojik büyüme parametreleri (yaş ve kuru ağırlık ile uzunluk), protein ve fotosentetik pigment miktarları, lipid peroksidasyonu içeriği (MDA olarak) ve azot metabolizmasında rol alan anahtar enzimlerin (NR, NiR, GS ve GOGAT) aktiviteleri belirlenmiştir. Bu parametrelere ait bulgular, istatistik anlamda (P<0.05) kontrolleri ile karşılaştırılarak elde edilen veriler aşağıda sunulmuştur.

4.1. Kök -Gövde Uzunluğu, Yaş -Kuru Ağırlığına Ait Bulgular

4.1.1. H₂S uygulamasından elde edilen veriler

Altındane çeşidinde, tek başına 1 ve 1.5 mM H₂S uygulaması, kök ve gövde uzunluğunu, kök ve gövde yaş ağırlığı ile kuru ağırlığını kontrol grubuna göre artırmıştır (P<0.05)(Çizelge 4.1). Ancak tek başına 150 ve 300 mM tuz (NaCl) uygulamaları kontrole göre, kök uzunluğunu ve kök yaş ağırlığını artırırken, her iki dokuda kuru ağırlık ve gövde uzunluğunu önemli (P<0.05) oranda düşürmüştür. H₂S+tuz uygulamalarında ise her iki H₂S uygulaması 150 ve 300 mM tuzda, kontrollerine göre, yaş ağırlık üzerinde anlamlı (P>0.05) bir etki yapmazken, kök ve gövdede kuru ağırlıklarını artırmıştır (Çizelge 4.1). Ancak aynı uygulamalar, kök uzunluğunu düşürürken, gövde uzunluğunu önemli (P<0.05) derecede artırmıştır.

Çizelge 4.1. H₂S (mM NaHS olarak) uygulamalarının NaCl (mM) stresi altındaki buğdayın iki varyetesinde yaş ve kuru ağırlık ile boy uzunluklarına etkileri.

Altındane						
Uygulamalar	Kök			Yaş ağırlık (gr/bitki)	Gövde	
	Yaş ağırlık (gr/bitki)	Kuru ağırlık (gr/bitki)	Boy uzunluğu (cm/bitki)		Kuru ağırlık (gr/bitki)	Boy uzunluğu (cm/bitki)
KONTROL	0.200	0.023	16.73±.57 ^e	0.538	0.059	20.86±.33 ^{bc}
1.0 mM H₂S	0.407	0.034	32.11±.57 ^a	0.758	0.083	34.21±.57 ^a
1.5 mM H₂S	0.302	0.026	28.95±.00 ^b	0.675	0.071	21.10±.00 ^b
150 mM NaCl	0.274	0.017	23.85±.00 ^c	0.655	0.048	17.78±.57 ^d
300 mM NaCl	0.257	0.021	21.75±.00 ^a	0.328	0.058	16.88±.57 ^d
1.0 H₂S+150 NaCl	0.264	0.018	22.51±.57 ^e	0.517	0.057	20.23±.57 ^{bc}
1.0 H₂S+300 NaCl	0.350	0.025	20.81±.58 ^f	0.415	0.076	15.58±.57 ^e
1.5 H₂S+150 NaCl	0.168	0.026	18.11±.57 ^f	0.371	0.076	19.90±.57 ^c
1.5 H₂S+300 NaCl	0.185	0.022	17.76±.57 ^g	0.398	0.074	18.56±.57 ^d
Doğu-88						
KONTROL	0.312	0.027	17.83±.33 ^e	0.450	0.060	23.50±.00 ^b
1.0 mM H₂S	0.377	0.037	30.91±.57 ^a	0.452	0.062	31.75±.00 ^a
1.5 mM H₂S	0.334	0.028	25.98±.57 ^b	0.450	0.060	23.58±.57 ^b
150 mM NaCl	0.358	0.026	22.83±.57 ^c	0.428	0.054	15.16±.57 ^f
300 mM NaCl	0.329	0.019	20.66±.57 ^d	0.347	0.048	16.75±.00 ^e
1.0 H₂S+150 NaCl	0.338	0.029	18.91±.57 ^e	0.342	0.057	18.32±.57 ^d
1.0 H₂S+300 NaCl	0.326	0.024	17.12±.10 ^f	0.357	0.050	16.85±.57 ^g
1.5 H₂S+150 NaCl	0.250	0.027	19.98±.64 ^g	0.519	0.072	19.16±.57 ^c
1.5 H₂S+300 NaCl	0.324	0.031	15.83±.57 ^h	0.416	0.063	16.58±.57 ^e

Bir sütundaki aynı harflerle gösterilen değerler arasındaki fark Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma Testine göre (p>0.05) önemsizdir. ± standart hatayı ifade eder.

Doğu-88 çeşidinde, tek başına tek başına 1 ve 1.5 mM H₂S uygulaması, kök ve gövde uzunluğunu, kök ve gövde yaş ağırlığı ile kuru ağırlığını kontrol grubuna göre artırmıştır (P<0.05) (Çizelge 4.1). Tek başına 150 ve 300 mM tuz (NaCl) uygulamaları kontrole göre, kök uzunluğu ve kök yaş ağırlığını artırırken, kök kuru ağırlığını düşürmüştür. Ancak gövdelerde çalışılan tüm parametreleri (kuru ve yaş ağırlık ile uzunluk) önemli onaranda düşürmüştür. H₂S+tuz uygulamalarında ise 1 mM H₂S uygulaması, köklerde her iki tuz koşullarında, yaş ağırlık üzerinde etkili olmamıştır. Ancak aynı uygulamalarda kök kuru ağırlığı artarken, kök uzunluğu düşmüştür. Aynı fidelerin gövdelerinde ise yine 1 mM H₂S uygulaması yaş ağırlığı düşürürken, kuru ağırlık ve gövde uzunluğu artmıştır (Çizelge 4.1).

Bulgular genel olarak değerlendirildiğinde H₂S uygulaması buğdayın strese hassas çeşidinde (Altındane) bitki büyümesi parametrelerinin hemen hepsini kontrole göre artırmıştır. İlginç olarak her iki varyetede tuz uygulamalarında kök kuru ağırlığı düşerken, kök uzunluğu artmıştır. H₂S+tuz uygulamalarında, tek başına tuza göre, her iki H₂S konsantrasyonunda hem Altındane hem de Doğu-88'de, kök ve gövdelerde özellikle kuru ağırlığın arttığı belirlenmiştir.

4.1.2. SNP uygulamasına ait bulgular

Altındane çeşidinde, tek başına 0.5 mM SNP uygulaması kök ve gövdelerde, kuru ağırlığı, yaş ağırlığı ve uzunluğu artırmıştır (P<0.05)(Çizelge 4.2). Ancak, 1 mM SNP sadece kök ve gövde uzunluklarını artırırken, diğer parametreleri düşürmüştür. Ancak tek başına 150 ve 300 mM tuz (NaCl) uygulamaları kontrole göre, kök uzunluğunu ve kök yaş ağırlığını artırırken, her iki dokuda kuru ağırlık ve gövde uzunluğunu önemli (P<0.05) oranda düşürmüştür. SNP+tuz uygulamalarında, 0.5 ve 1 mM SNP her iki tuz konsantrasyonunda kök uzunluğu ve kök yaş ağırlığını düşürürken, kök kuru ağırlığını artırmıştır. Aynı uygulamalar gövdede yaş ağırlığı düşürürken, kuru ağırlığı artırmıştır. Ancak gövde uzunluğunu arttırmıştır (Çizelge 4.2).

Doğu-88 çeşidinde 0.5 ve 1 mM SNP kök, gövde uzunluğu, yaş ağırlığı ve kuru ağırlıklarını artırmıştır ($P<0.05$)(Çizelge 4.2.). Tek başına 150 ve 300 mM tuz (NaCl) uygulamaları kontrole göre, kök uzunluğu ve kök yaş ağırlığını artırırken, kök kuru ağırlığını düşürmüştür. Ancak gövdelerde çalışılan tüm parametreleri (kuru ve yaş ağırlık ile uzunluk) önemli onaranda düşürmüştür. SNP+tuz uygulamalarında, 0.5 ve 1 mM SNP kök yaş ağırlığı üzerinde belirgin bir etki sergilememiştir. Ancak aynı uygulamalar kök kuru ağırlığını artırırken, kök uzunluğunu düşürmüştür. Gövdelerde ise aynı SNP uygulamaları yaş ağırlık ve gövde uzunluğu vekuru ağırlığını önemli ölçüde ($P<0.05$) artırmıştır (Çizelge 4.2).

Bulgular genel olarak değerlendirildiğinde tuz uygulamaları her iki varyetede kök ve gövdede özellikle kuru ağırlığı düşürmüştür. Her iki varyetede tuz uygulamalarında kök kuru ağırlığı artarken, kök uzunluğu azalmıştır. SNP uygulaması buğdayın strese hassas çeşidinde (Altındane) özellikle 0.5 mM; 1 mM SNP kontrole göre genelde büyüme parametrelerini artırmıştır. SNP+tuz uygulamalarında, tek başına tuza göre, her iki SNP konsantrasyonunda hem Altındane hem de Doğu-88'de, kök ve gövdelerde özellikle kuru ağırlığın arttığı belirlenmiştir.

Çizelge 4.2. NO (mM SNP olarak) uygulamalarının NaCl (mM) stresi altındaki buğdayın iki varyetesinde yaş ve kuru ağırlık ile boy uzunluklarına etkileri.

Altındane						
Uygulamalar	Kök			Gövde		
	Yaş ağırlık (gr/bitki)	Kuru ağırlık (gr/bitki)	Boy uzunluğu (cm/bitki)	Yaş ağırlık (gr/bitki)	Kuru ağırlık (gr/bitki)	Boy uzunluğu (cm/bitki)
KONTROL	0.116	0.026	20.53±.33 ^e	0.533	0.077	23.50±.00 ^{bc}
0.5 mM SNP	0.138	0.029	32.83±.30 ^a	0.611	0.085	31.75±6.92 ^a
1.0 mM SNP	0.094	0.023	27.98±.33 ^b	0.459	0.065	24.91±.57 ^b
150 mM NaCl	0.389	0.026	24.83±33 ^c	0.389	0.026	17.16±.57 ^{de}
300 mM NaCl	0.412	0.026	22.64±.33 ^d	0.412	0.026	18.45±.00 ^{de}
0.5 SNP+150 NaCl	0.149	0.028	20.88±.33 ^e	0.396	0.071	20.32±.57 ^{cd}
0.5 SNP+300 NaCl	0.126	0.027	18.12±.06 ^f	0.423	0.069	19.85±.60 ^e
1.0 SNP+150 NaCl	0.259	0.032	16.81±.42 ^g	0.284	0.058	21.16±.57 ^{bcd}
1.0 SNP+300 NaCl	0.178	0.032	15.83±.33 ^h	0.220	0.055	18.58±.57 ^{de}
Doğu-88						
KONTROL	0.121	0.022	21.66±.57 ^e	0.423	0.060	24.28±.57 ^b
0.5 mM SNP	0.219	0.026	35.41±.57 ^a	0.556	0.074	34.66±.57 ^a
1.0 mM SNP	0.208	0.023	29.68±.11 ^b	0.575	0.073	25.97±.62 ^b
150 mM NaCl	0.224	0.017	26.26±.57 ^c	0.410	0.053	19.14±.68 ^f
300 mM NaCl	0.201	0.014	24.57±.56 ^d	0.323	0.048	20.03±.05 ^e
0.5 SNP+150 NaCl	0.239	0.021	21.87±.82 ^e	0.486	0.071	21.85±.52 ^d
0.5 SNP+300 NaCl	0.123	0.017	19.23±.64 ^f	0.250	0.064	20.80±.60 ^g
1.0 SNP+150 NaCl	0.207	0.022	19.26±.15 ^f	0.436	0.066	23.55±.00 ^c
1.0 SNP+300 NaCl	0.292	0.026	16.65±.53 ^g	0.272	0.076	19.96±.57 ^{ef}

Bir sütundaki aynı harflerle gösterilen değerler arasındaki fark Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma Testine göre ($p>0.05$) önemsizdir. $\pm$ standart hatayı ifade eder.

4.2. Çözünebilir Protein Miktarına Ait Bulgular

4.2.1. H₂S uygulamasından elde edilen veriler

Çözünebilir protein miktarı, buğdayın Altındane çeşidinde tek başına 1 ve 1.5 mM H₂S uygulamasında kök ve gövdede kontrole göre artmıştır ($P<0.05$)(Çizelge 4.3). Tuz uygulamaları da (150 ve 300 mM) kontrole göre protein miktarını kök ve gövdede artmıştır. H₂S+tuz uygulamalarında ise kontrollerine göre 1.0 mM H₂S, 150 mM tuz koşullarında kökte artmış, gövdede ise düşürmüştür. Ancak diğer H₂S+tuz uygulamaları genel olarak protein içeriğini kontrollerine göre düşürmüştür ($P<0.05$) (Çizelge 4.3).

Doğu-88 çeşidinde kontrol grubuna göre 1.0 mM ve 1.5 mM H₂S uygulaması, protein miktarını kökte artırırken, gövdede ise düşürmüştür (Çizelge 4.3). Tek başına tuz uygulamalarının her ikisi, kök ve gövde protein miktarını ($P<0.05$) artmıştır. H₂S+tuz uygulamalarında ise kontrollerine göre 1.0 mM H₂S, 150 mM tuz koşullarında kökte artmış, gövdede ise düşürmüştür. Ancak diğer H₂S+tuz uygulamaları genel olarak protein içeriğini kontrollerine göre düşürmüştür ($P<0.05$) (Çizelge 4.3).

H₂S uygulamasından elde edilen veriler genel olarak değerlendirildiğinde, tuz uygulamaları buğdayın her iki çeşidinde çözünebilir protein miktarını artırmıştır. Ancak tuz stresine maruz bitkilerde H₂S uygulamaları (H₂S+tuz), kontrollerine göre (tek başına tuz uygulaması) protein içeriğini genelde her iki varyetenin dokularında düşürmüştür.

4.2.2. SNP uygulamasından elde edilen veriler

Protein miktarı, buğdayın Altındane çeşidinde tek başına 1 ve 1.5 mM SNP uygulamasında kök ve gövdede kontrole göre artmıştır ($P<0.05$) (Çizelge 4.3). Tuz uygulamalarının her ikisi de kontrole göre protein miktarını kök ve gövdede artmıştır. SNP+tuz uygulamalarında ise kontrollerine göre SNP uygulamasının her ikisi hem 150 hem de 300 mM tuz koşullarında kök ve gövdelerde protein içeriğini düşürmüştür (Çizelge 4.3).

Doğu-88 eşidinde tek başına SNP uygulamaları (0.5 mM ve 1 mM) protein içeriğini kökte düşürmüştür, gövdede artırmıştır. Tuz uygulamaları Altındane’de olduğu gibi Doğu-88’de de protein miktarını her iki dokuda (kök ve gövde) artırmıştır. SNP+tuz uygulamaları ise kontrollerine göre kök ve gövdelerde protein içeriğini düşürmüştür (Çizelge 4.3).

SNP uygulamasından elde edilen veriler genel olarak değerlendirildiğinde, tuz uygulamaları buğdayın her iki çeşidinde çözünebilir protein miktarını artırmıştır. Ancak tuz stresine maruz bitkilerde H₂S uygulamaları (H₂S+tuz), kontrollerine göre (tek başına tuz uygulaması) protein içeriğini genelde her iki varyetenin dokularında düşürmüştür.

Çizelge 4.3. H₂S (mM NaHS olarak) ve NO (mM SNP olarak) uygulamalarının NaCl (mM) stresi altındaki iki buğday varyetesinde çözünebilir protein miktarına etkileri.

Çözünebilir Protein Miktarı (µg/gr doku)				
Uygulamalar	Altındane		Doğu-88	
	Kök	Gövde	Kök	Gövde
KONTROL	752.15±.85 ^d	1233.1±115.8 ^d	729.80±.888 ^e	1327.7±1.38 ^c
1.0 mM H₂S	850.36±4.7 ^b	1414.6±1.29 ^e	737.30±9.00 ^{de}	1006.3±9.78 ^e
1.5 mM H₂S	885.73±4.8 ^b	1728.1±36.6 ^{de}	753.38±5.18 ^{de}	1136.5±52.5 ^d
150 mM NaCl	837.50±2.8 ^b	1998.1±31.3 ^{bc}	903.41±6.79 ^c	1405.1±39.9 ^c
300 mM NaCl	869.12±3.4 ^c	1982.0±47.3 ^{bc}	808.57±21.5 ^{cd}	1896.9±26.1 ^b
1.0 H₂S+150 NaCl	890.55±12.3 ^a	1845.4±19.4 ^c	1036.83±33.9 ^a	1025.6±36.1 ^e
1.0 H₂S+300 NaCl	844.47±2.3 ^b	2186.2 ±74.0 ^b	850.36±16.1 ^c	1335.8±8.19 ^c
1.5 H₂S+150 NaCl	810.18±22.2 ^{bc}	1634.8±21.4 ^d	967.71±7.33 ^b	1184.7±49.2 ^{de}
1.5 H₂S+300 NaCl	692.29±11.9 ^e	2433.8±43.3 ^a	765.17±22.8 ^{cd}	2072.7±64.0 ^a
KONTROL	755.25±1.41 ^d	1233.1±.88 ^e	729.80±22.5 ^{bc}	1327.8±21.9 ^g
0.5 mM SNP	759.81±7.66 ^d	1593.6±49.6 ^e	688.01±5.24 ^{de}	1559.3±13.4 ^f
1.0 mM SNP	885.73±4.80 ^b	2082.2±13.8 ^c	644.07±4.66 ^f	2052.8±21.4 ^c
150 mM NaCl	866.44±9.97 ^b	2575.2±25.8 ^a	782.85±8.09 ^b	1952.6±19.4 ^{cd}
300 mM NaCl	950.03±5.04 ^a	2593.4±12.9 ^a	909.84±5.65 ^a	2104.2±59.2 ^b
0.5 SNP+150 NaCl	834.29±5.82 ^c	1700.7±16.6 ^d	737.84±4.95 ^c	1681.4±15.9 ^e
0.5 SNP+300 NaCl	819.82±4.90 ^c	2348.6±183 ^b	683.18±15.21 ^d	2275.1±28.8 ^a
1.0 SNP+150 NaCl	731.41±18.6 ^e	1471.4±15.8 ^e	763.56±11.59 ^b	1932.2±12.1 ^d
1.0 SNP+300 NaCl	749.09±13.1 ^d	2113.9±56.4 ^c	656.91±4.22 ^{ef}	1974.0±6.4 ^d

Bir sütundaki aynı harflerle gösterilen değerler arasındaki fark Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma Testine göre (p>0.05) önemsizdir. ± standart hatayı ifade eder.

4.3. Fotosentetik Pigment Miktarına Ait Bulgular

4.3.1. H₂S uygulamasından elde edilen veriler

Buğdayın Altındane çeşidinde, kontrolleriyle kıyaslandığında, klorofil a (Kla), Klorofil b (Klb), total klorofil ve karotenoid miktarları, tek başına 1.0 mM ve 1.5 mM H₂S ve tek başına 150 mM NaCl uygulamaları tarafından artmıştır (P<0.05). Ancak genelde H₂S+tuz uygulamaları aynı parametrelerin içeriklerini düşürmüştür (Çizelge 4.4). Buğdayın Doğu-88 çeşitte ise kontrolleriyle kıyaslandığında (Çizelge 4.5), Kla, Klb, total klorofil ve karotenoid miktarları, tek başına 1.0 mM ve 1.5 mM H₂S ve tek başına 150 mM NaCl uygulamaları tarafından düşürülmüştür (P<0.05). H₂S+tuz uygulamaları değerlendirildiğinde, her iki H₂S uygulaması tuz koşullarında aynı parametrelerin içeriklerini artırmıştır. Ancak H₂S uygulamaları tuz koşullarında karotenoid içeriğini düşürmüştür (Çizelge 4.5).

4.3.2. SNP uygulamasından elde edilen veriler

Her iki SNP uygulaması Kla ve karotenoid miktarını kontrollerine göre artırmıştır (P<0.05). Tek başına tuz uygulamaları ise Özellikle Klb içeriğini düşürmüştür. Bu düşüşle doğal olarak total klorofil de düşmüştür. Ancak tek başına tuz uygulamaları karotenoid içeriğini artırmıştır. SNP+tuz uygulamaları değerlendirildiğinde, genelde her iki SNP uygulaması tuz koşullarında çalışılan tüm fotosentetik pigment parametreleri içeriğini artırmıştır. Doğu-88 çeşidinde ise, SNP uygulamasına ait veriler incelendiğinde, her iki SNP uygulaması Kla ve karotenoid miktarını kontrollerine göre artırmıştır (P<0.05). Tek başına tuz uygulamaları ise Özellikle Klb içeriğini düşürmüştür. Bu düşüşle doğal olarak total klorofil de düşmüştür. Ancak tek başına tuz uygulamaları karotenoid içeriğini artırmıştır. SNP+tuz uygulamaları değerlendirildiğinde, genelde her iki SNP uygulaması tuz koşullarında çalışılan tüm fotosentetik pigment parametreleri içeriğini artırmıştır.

SNP uygulamasına ait veriler incelendiğinde, her iki SNP uygulaması K_{la}, K_{lb}, total K_l ve karotenoid miktarını kontrollerine göre istatistik anlamda ($P>0.05$) önemli etkilememiştir ($P<0.05$). Tek başına tuz uygulamaları bu parametrelerin içeriğini düşürürken ($P<0.05$), SNP+tuz uygulamalarında özellikle SNP uygulamaları 150 mM tuz koşullarında K_{la}, K_{lb} ve total K_l içeriğini artırmıştır. Aynı uygulamalar 300 mM tuzda anlamlı ($P>0.05$) bir etki gösterememiştir (Çizelge 4.5).

Fotosentetik pigment içeriklerine ait veriler genel olarak değerlendirildiğinde, tek başına tuz uygulaması her iki buğday çeşidinde özellikle K_{la}, K_{lb} ve total klorofil içeriğini düşürmüştür. Bu düşüşler Doğu-88'de daha güçlü olmuştur. Karotenoid içeriği ise tuzun etkisiyle özellikle Altındane çeşidinde artmış, Doğu-88'de ise hafif düşme eğilimi göstermiştir. Ancak tuz stresi koşullarında uygulanan H₂S, klorofil içeriğini özellikle Doğu-88'de artırmıştır. Altındane'de H₂S'nin bu olumlu etkisi görülememiştir. Buna karşılık SNP uygulamaları her iki buğday çeşidinde tuz koşullarında (150 ve 300 mM) klorofil içeriğini artırmış ve bitkide tuz stres koşulunda bir iyileşme sağlayabilmiştir. Ancak karotenoidler üzerinde her iki çeşitte, H₂S ve SNP uygulamaları, kontrollerine göre tuz koşullarında belirgin bir etki sergileyememiştir.

Çizelge 4.4. H₂S (mM NaHS olarak) ve NO (mM SNP olarak) uygulamalarının NaCl (mM) stresi altındaki buğdayın Altındane varyetesinde fotosentetik pigment miktarına etkileri.

Altındane				
FotosentetikPigment Miktarı(mg/gr doku)				
Uygulamalar	Klorofil a	Klorofil b	Total klorofil	Karotenoid
KONTROL	15.63±.31 ^g	21.58±.55 ^{bcd}	19.02±.74 ^{bc}	7.04±.36 ^b
1.0 mM H₂S	18.17±.22 ^{cd}	22.13±.14 ^{bc}	19.51±.76 ^{ab}	7.87±.45 ^{ab}
1.5 mM H₂S	18.87±.25 ^e	24.33±.47 ^b	22.06±.56 ^{ab}	7.63±.56 ^{ab}
150 mM NaCl	20.49±.25 ^a	24.11±.24 ^a	22.30±.74 ^a	8.66±.45 ^a
300 mM NaCl	17.85±.24 ^d	21.07±.63 ^{bcd}	18.57±.34 ^c	7.82±.25 ^{ab}
1.0 H₂S+150 NaCl	19.56±.49 ^b	22.49±.96 ^{bcd}	18.82±.58 ^{bc}	8.17±.49 ^{ab}
1.0 H₂S+300 NaCl	18.35±.15 ^d	21.64±.98 ^{bcd}	19.31±.53 ^{bc}	8.31±.50 ^{ab}
1.5 H₂S+150 NaCl	19.49±.29 ^{bc}	21.62±.82 ^{cd}	18.82±.42 ^{bc}	7.90±.51 ^{ab}
1.5 H₂S+300 NaCl	16.26±.27 ^{ef}	19.85±.27 ^d	17.50±.54 ^{bc}	7.19±.50 ^b
KONTROL	15.18±.74 ^{bcd}	20.91±.1.0 ^a	19.50±1.1 ^a	5.35±.47 ^{abc}
0.5 mM SNP	15.25±.81 ^e	16.35±1.8 ^b	14.41±1.6 ^b	6.58±.36 ^{bc}
1.0 mM SNP	16.02±.91 ^d	18.53±1.7 ^{ab}	16.33±1.5 ^{ab}	6.55±.96 ^c
150 mM NaCl	17.07±.95 ^{bcd}	20.12±1.5 ^{ab}	17.74±1.33 ^{ab}	7.40±.34 ^{abc}
300 mM NaCl	17.30±.95 ^{cd}	18.88±1.1 ^{ab}	14.91±1.0 ^{ab}	7.34±.34 ^{abc}
0.5 SNP+150 NaCl	19.88±.81 ^{bc}	22.24±1.2 ^{ab}	19.60±1.2 ^{ab}	8.22±.44 ^{ab}
0.5 SNP+300 NaCl	17.44±.66 ^{bcd}	22.09±.66 ^{ab}	19.48±1.2 ^{ab}	7.63±1.28 ^{bc}
1.0 SNP+150 NaCl	18.11±.68 ^a	25.07±.86 ^a	22.10±.93 ^a	8.65±.26 ^a
1.0 SNP+300 NaCl	18.71±.54 ^b	20.76±.1.0 ^{ab}	18.30±1.3 ^{ab}	8.14±.18 ^{ab}

Bir sütundaki aynı harflerle gösterilen değerler arasındaki fark Dunsan'ın Çoklu Karşılaştırma Testine göre ($p>0.05$) önemsizdir. ± standart hatayı ifade eder.

Çizelge 4.5. H₂S (mM NaHS olarak) ve NO (mM SNP olarak) uygulamalarının NaCl (mM) stresi altındaki buğdayın Doğu-88 varyetesinde fotosentetik pigment miktarına etkileri.

Doğu-88				
FotosentetikPigment Miktarı(mg/gr doku)				
Uygulamalar	Klorofil a	Klorofil b	Total klorofil	Karotenoid
KONTROL	19.39±.90 ^{ab}	24.91±1.5 ^{ab}	21.96±1.3 ^{ab}	8.04±.31 ^{ab}
1.0 mM H₂S	16.59±1.5 ^{bc}	22.49±1.9 ^{ab}	19.83±1.7 ^{ab}	7.28±.49 ^b
1.5 mM H₂S	17.24±1.1 ^{bc}	18.26±1.8 ^b	16.11±1.6 ^b	7.06±.37 ^b
150 mM NaCl	18.76±.89 ^{ab}	20.53±1.7 ^{ab}	20.01±1.0 ^{ab}	7.88±.30 ^{ab}
300 mM NaCl	16.81±1.1 ^{bc}	21.72±1.4 ^{ab}	19.82±1.3 ^{ab}	7.73±.41 ^{ab}
1.0 H₂S+150 NaCl	20.53±.9 ^a	26.62±1.2 ^a	22.83±1.0 ^a	8.66±.32 ^a
1.0 H₂S+300 NaCl	19.34±1.3 ^d	22.62±1.6 ^c	21.13±1.4 ^c	4.90±.51 ^c
1.5 H₂S+150 NaCl	19.57±.9 ^{ab}	25.80±.6 ^a	22.74±1.7 ^a	8.28±.34 ^{ab}
1.5 H₂S+300 NaCl	19.17±1.3 ^c	20.37±1.9 ^b	19.96±.62 ^b	7.30±.46 ^b
KONTROL	19.39±.90 ^{ab}	24.91±1.5 ^{ab}	21.96±1.3 ^{ab}	8.04±.31 ^{ab}
0.5 mM SNP	19.21±.77 ^a	21.41±.76 ^a	18.87±.67 ^a	8.05±.28 ^a
1.0 mM SNP	16.94±.87 ^{ab}	19.26±1.0 ^{ab}	16.98±.94 ^{ab}	7.31±.33 ^{abc}
150 mM NaCl	18.66±.46 ^a	19.03±.55 ^a	18.54±.48 ^a	7.99±.15 ^{ab}
300 mM NaCl	14.76±.46 ^{bc}	15.69±.32 ^{cd}	13.83±.28 ^{cd}	6.59±.17 ^c
0.5 SNP+150 NaCl	19.00±.89 ^{ab}	20.09±.79 ^{ab}	19.83±.69 ^{ab}	7.20±.15 ^{bc}
0.5 SNP+300 NaCl	17.55±.80 ^c	18.25±.57 ^d	17.56±.50 ^c	6.69±.30 ^c
1.0 SNP+150 NaCl	14.93±.76 ^{bc}	18.05±.77 ^{bc}	15.91±.67 ^{bc}	6.63±.23 ^c
1.0 SNP+300 NaCl	14.21±.60 ^c	17.67±.45 ^{bc}	15.57±.40 ^{bc}	7.12±.18 ^{abc}

Bir sütundaki aynı harflerle gösterilen değerler arasındaki fark Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma Testine göre ($p>0.05$) önemsizdir. ± standart hatayı ifade eder.

4.4. MDA İçeriğine Ait Bulgular

4.4.1. H₂S uygulamasından elde edilen veriler

Altındane çeşidinde H₂S uygulamalarının her ikisi kontrole kıyasla MDA içeriğini kök ve gövdede artırmış, ancak aynı uygulamalar Doğu-88'de genelde MDA içeriğini düşürmüştür (Çizelge 4.6). Her iki buğday çeşidinde, tek başına tuz uygulamaları, kontrole göre MDA içeriğini kök ve gövdede önemli seviyelerde ($P<0.05$) artırmıştır. Artışlar köklere göre gövdelerde ve 300 mM tuz konsantrasyonunda daha belirgin ve daha yüksek olmuştur. H₂S+Tuz uygulamaları incelendiğinde, her iki buğday çeşidinde H₂S uygulamalarının her ikisi, kontrollerine göre MDA içeriğini düşürmüştür (Çizelge 4.6). MDA içeriğindeki düşüşler 1.5 mM H₂S uygulamasında daha belirgin olmuştur.

4.4.2. SNP uygulamasından elde edilen veriler

Hem Altındane hem de Doğu-88 çeşidinde SNP uygulamalarının her ikisi kontrole kıyasla MDA içeriğini kök ve gövdede artırmıştır (Çizelge 4.6). Her iki buğday çeşidinde, tek başına tuz uygulamaları verileri incelendiğinde, tek başına 150 ve 300 mM tuz, kontrole göre MDA içeriğini kök ve gövdede önemli seviyelerde ($P<0.05$) artırmıştır. Artışlar köklere göre gövdelerde ve 300 mM tuz konsantrasyonunda daha belirgin ve daha yüksek olmuştur. SNP+Tuz uygulamaları incelendiğinde, her iki buğday çeşidinde SNP uygulamalarının her ikisi, kontrollerine göre, MDA içeriğini düşürmüştür (Çizelge 4.6).

MDA içeriğinden elde edilen veriler genel değerlendirildiğinde, her iki buğday çeşidinin kök ve gövdelerinde, tek başına tuz uygulamalarının her ikisi (150 ve 300 mM) MDA içeriğini artırmıştır. Bu artış tuz konsantrasyonunun artışıyla doğru orantılı artmıştır. MDA içeriğindeki artışta varyete farkı çok belirgin olmamıştır. Ancak MDA içeriğindeki artış gövdelerde daha yüksek olmuştur. Ancak, H₂S ve SNP

uygulamalarının her ikisi tuz stresi altındaki buğday varyetelerinin her ikisinin kök ve gövdelerinde MDA içeriğini düşürmüştür.

Çizelge 4.6. H₂S (mM NaHS olarak) ve NO (mM SNP olarak) uygulamalarının NaCl (mM) stresi altındaki iki buğday varyetesinde MDA içeriği üzerine etkileri.

MDA içeriği (nmol/gr doku)				
Uygulamalar	Altındane		Doğu-88	
	Kök	Gövde	Kök	Gövde
KONTROL	0.135±.002 ^d	0.218±.001 ^g	0.136±.003 ^a	0.336±.007 ^e
1.0 mM H₂S	0.151±.005 ^{bc}	0.213±.004 ^e	0.101±.001 ^b	0.284±.000 ^e
1.5 mM H₂S	0.167±.002 ^b	0.201±.005 ^e	0.142±.002 ^a	0.212±.003 ^c
150 mM NaCl	0.154±.000 ^e	0.391±.005 ^d	0.79±.002 ^e	0.469±.004 ^d
300 mM NaCl	0.251±.006 ^a	0.695±.005 ^b	0.90±.005 ^{bc}	0.588±.007 ^b
1.0 H₂S+150 NaCl	0.143±.010 ^c	0.247±.002 ^f	0.69±.000 ^d	0.451±.007 ^d
1.0 H₂S+300 NaCl	0.133±.004 ^d	0.510±.005 ^a	0.76±.002 ^{bc}	0.588±.019 ^b
1.5 H₂S+150 NaCl	0.131±.002 ^d	0.311±.003 ^e	0.091±.002 ^{cd}	0.225±.002 ^f
1.5 H₂S+300 NaCl	0.169±.003 ^c	0.484±.003 ^c	0.101±.000 ^{bc}	0.823±.008 ^a
KONTROL	0.135±.002 ^d	0.218±.000 ^g	0.136±.002 ^g	0.327±.002 ^{bc}
0.5 mM SNP	0.156±.001 ^{abc}	0.225±.000 ^g	0.112±.001 ^{dc}	0.228±.009 ^e
1.0 mM SNP	0.144±.004 ^c	0.349±.004 ^b	0.151±.004 ^d	0.248±.005 ^a
150 mM NaCl	0.157±.008 ^{bc}	0.324±.000 ^e	0.295 ±.011 ^a	0.469±.004 ^c
300 mM NaCl	0.181±.002 ^a	0.412±.002 ^g	0.377±.004 ^e	0.548±.011 ^e
0.5 SNP+150 NaCl	0.139±.001 ^e	0.366±.001 ^d	0.177±.007 ^b	0.346±.005 ^d
0.5 SNP+300 NaCl	0.172±.005 ^{bc}	0.588±.003 ^g	0.278±.003 ^f	0.687±.007 ^e
1.0 SNP+150 NaCl	0.129±.003 ^{de}	0.238±.000 ^f	0.198±.004 ^e	0.266±.006 ^d
1.0 SNP+300 NaCl	0.140±.002 ^d	0.451±.004 ^c	0.241±.001 ^c	0.421±.006 ^b

Bir sütundaki aynı harflerle gösterilen değerler arasındaki fark Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma Testine göre ($p>0.05$) önemsizdir. ± standart hatayı ifade eder.

4.5. NR Aktivitesine Ait Bulgular

4.5.1. H₂S uygulamasından elde edilen veriler

Hem Altındane hem de Doğu-88 çeşidinde H₂S uygulamalarının her ikisi kontrole kıyasla NR aktivitesini kök ve gövdede artırmıştır ($P<0.05$). Artışlar 1.5mMH₂S uygulamasında daha yüksek olmuştur (Çizelge 4.7). Her iki buğday çeşidinde, tek başına tuz uygulamaları, kontrole göre NR aktivitesini kök ve gövdede önemli seviyelerde ($P<0.05$) düşürmüştür. Düşüşler, köklere göre gövdelerde ve 300 mM tuz konsantrasyonunda daha belirgin ve daha yüksek olmuştur. H₂S+Tuz uygulamaları incelendiğinde, her iki buğday çeşidinde H₂S uygulamalarının her ikisi, kontrollerine göre NR aktivitesini artırmıştır (Çizelge 4.7). NR aktivitesindeki artışlar 1.5mM H₂S uygulamasında daha belirgin olmuştur.

4.5.2. SNP uygulamasından elde edilen veriler

Hem Altındane hem de Doğu-88 çeşidinde SNP uygulamalarının her ikisi kontrole kıyasla NR aktivitesini kök ve gövdede artırmıştır ($P<0.05$). Artışlar genelde 1.5 mM H₂S uygulamasında daha yüksek olmuştur (Çizelge 4.7). Her iki buğday çeşidinde, tek başına tuz uygulamaları, kontrole göre NR aktivitesini kök ve gövdede önemli seviyelerde ($P<0.05$) düşürmüştür. Düşüşler, köklere göre gövdelerde ve 300 mM tuz konsantrasyonunda daha yüksek olmuştur. H₂S+Tuz uygulamaları incelendiğinde, her iki buğday çeşidinde SNP uygulamalarının her ikisi, kontrollerine göre, NR aktivitesini artırmıştır (Çizelge 4.7).

NR aktivitesinden elde edilen veriler genel değerlendirildiğinde, her iki buğday çeşidinin kök ve gövdelerinde, tek başına tuz uygulamalarının her ikisi NR aktivitesini önemli ölçüde düşürmüştür. Bu artış tuz konsantrasyonunun artışıyla doğru orantılı artmıştır. SNP içeriğindeki düşüş Altındane çeşidinde daha belirgin olmuştur. NR aktivitesindeki bu düşüş, gövdelerde daha yüksek olmuştur. Ancak, H₂S ve SNP

uygulamalarının her ikisi tuz stresi altındaki buğday varyetelerinin her ikisinin kök ve gövdelerinde NR aktivitesini artırarak tuz stresi etkisini hafifletmiştir.

Çizelge 4.7. H₂S (mM NaHS olarak) ve NO (mM SNP olarak) uygulamalarının NaCl (mM) stresi altındaki iki buğday varyetesinde NR aktivitesi üzerine etkileri.

NR aktivitesi (EU/gr doku)				
Uygulamalar	Altındane		Doğu-88	
	Kök	Gövde	Kök	Gövde
KONTROL	31.13±.348 ^d	82.45±1.03 ^c	31.13±.817 ^{cd}	113.0±.556 ^d
1.0 mM H₂S	28.94±.296 ^d	37.80±1.23 ^e	28.94±.148 ^g	69.53±2.12 ^e
1.5 mM H₂S	32.41±.926 ^c	192.1±28.9 ^b	32.41±.767 ^c	134.3±3.38 ^b
150 mM NaCl	38.27±.677 ^a	58.71±1.16 ^{cd}	36.10±.371 ^b	121.3±.416 ^c
300 mM NaCl	28.09±.561 ^e	37.89±.561 ^e	28.03±.897 ^{de}	56.15±1.34 ^g
1.0 H₂S+150 NaCl	36.24±.456 ^b	239.7±2.16 ^a	40.19±.467 ^a	189.6±1.92 ^a
1.0 H₂S+300 NaCl	30.55±.148 ^d	35.24±.857 ^e	28.85±.230 ^{ef}	44.24±.956 ^h
1.5 H₂S+150 NaCl	39.08±.297 ^a	189.3±.555 ^b	31.04±.610 ^{cd}	162.5±1.15 ^b
1.5 H₂S+300 NaCl	41.64±1.24 ^a	33.05±.411 ^e	31.04±.622 ^{cd}	65.38±.687 ^f
KONTROL	30.90±.868 ^g	81.95±.573 ^f	30.49±.653 ^a	49.76±.418 ^g
0.5 mM SNP	33.05±.476 ^{ef}	143.9±1.25 ^d	25.11±.184 ^e	71.36±1.36 ^e
1.0 mM SNP	37.61±.271 ^d	194.4±1.23 ^b	30.13±1.10 ^b	82.99±.406 ^d
150 mM NaCl	45.65±.709 ^b	188.5±1.82 ^c	32.41±.549 ^a	134.23±.871 ^b
300 mM NaCl	31.22±.362 ^g	88.30±.82 ^{ef}	28.76±.178 ^{bc}	61.90±1.18 ^f
0.5 SNP+150 NaCl	42.82±.766 ^c	252.9±6.32 ^a	21.91±.419 ^f	165.0±1.22 ^a
0.5 SNP+300 NaCl	30.11±.663 ^a	46.02±.11 ^g	27.21±.338 ^{cd}	45.83±.881 ^h
1.0 SNP+150 NaCl	37.38±.610 ^d	91.77±.79 ^e	26.20±.292 ^{de}	84.50±1.21 ^c
1.0 SNP+300 NaCl	32.34±.963 ^e	47.66±.52 ^g	30.86±.508 ^{cd}	44.55±1.03 ⁱ

Bir sütundaki aynı harflerle gösterilen değerler arasındaki fark Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma Testine göre (p>0.05) önemsizdir. ± standart hatayı ifade eder.

4.6. NiR Aktivitesine Ait Bulgular

4.6.1. H₂S uygulamasından elde edilen veriler

Altındane çeşidinde H₂S uygulamalarının her ikisi kontrole kıyasla, NiR aktivitesini kökte artırmış, ancak gövdede düşürmüştür ($P<0.05$). Doğu-88 çeşidinde, aynı uygulamalar kök ve gövdenin her ikisinde NiR aktivitesini kontrole göre artırmıştır (Çizelge 4.8). Tek başına tuz uygulamalarında, Altındane çeşidinde 150 ve 300 mM tuz, kök ve gövdede NiR aktivitesini düşürmüştür, ancak ilginç olarak Doğu-88 çeşidinin kök ve gövdesinde artırmıştır. H₂S+Tuz uygulamaları incelendiğinde, her iki buğday çeşidinde H₂S uygulamalarının her ikisi, tuz koşullarında, kontrollerine göre, NiR aktivitesini artırmıştır (Çizelge 4.8). Bu koşullarda NiR aktivitesini artırmada H₂S konsantrasyonları arasında belirgin bir fark görülmemiştir.

4.6.2. SNP uygulamasından elde edilen veriler

Hem Altındane hem de Doğu-88 çeşidinde SNP uygulamalarının her ikisi kontrole kıyasla NiR aktivitesini kök ve gövdede genelde artırmıştır ($P<0.05$) (Çizelge 4.8). Tek başına tuz uygulamalarında, Altındane çeşidinde 150 ve 300 mM tuz, kökte artırmış, ancak gövdede NiR aktivitesini düşürmüştür. Doğu-88 çeşidinin kök ve gövdesinde genelde artırmıştır. H₂S+Tuz uygulamaları incelendiğinde, her iki buğday çeşidinde SNP uygulamalarının her ikisi, tuz koşullarında, kontrollerine göre, NiR aktivitesini artırmıştır (Çizelge 4.8). Bu koşullarda NiR aktivitesini artırmada SNP konsantrasyonları arasında belirgin bir fark görülmemiştir.

NiR aktivitesinden elde edilen veriler genel değerlendirildiğinde, tek başına tuz uygulamalarında, Altındane çeşidinde tuz, NiR aktivitesini kökte artırmış, ancak gövdede düşürmüştür. Doğu-88 çeşidinin kök ve gövdesinde genelde artırmıştır. Bu bulgulara göre Altındane'ye göre daha dayanıklı bir çeşit olan Doğu-88'de aktiviteyi her iki dokuda artırmıştır. Ancak, H₂S ve SNP uygulamalarının her ikisi tuz stresi

altındaki buğday varyetelerinin her ikisinin kök ve gövdelerinde NiR aktivitesini genelde artırarak tuz stresi etkisini hafifletmiştir.

Çizelge 4.8. H₂S (Mm NaHS olarak) ve NO (mM SNP olarak) uygulamalarının NaCl (mM) stresi altındaki iki buğday varyetesinde NiR aktivitesi üzerine etkileri.

NiR aktivitesi (EU/mg doku)				
Uygulamalar	Altındane		Doğu-88	
	Kök	Gövde	Kök	Gövde
KONTROL	318.00±11.4 ^{bc}	379.06±01.8 ^e	348.45±06.5 ^e	250.07±09.4 ^a
1.0 mM H₂S	494.75±03.3 ^e	238.20±12.9 ^e	499.68±16.0 ^a	326.73±18.2 ^{ab}
1.5 mM H₂S	332.16±13.5 ^a	332.21±08.4 ^d	391.88±11.8 ^c	413.57±13.1 ^c
150 mM NaCl	329.23±18.0 ^b	355.40±03.9 ^{ab}	329.17±09.1 ^b	304.35±09.1 ^d
300 mM NaCl	293.54±07.2 ^d	362.43±06.6 ^a	366.11±09.2 ^b	286.63±06.3 ^{ab}
1.0 H₂S+150 NaCl	414.94±15.4 ^f	408.09±15.1 ^a	386.55±05.9 ^g	406.99±09.4 ^{ab}
1.0 H₂S+300 NaCl	423.80±11.4 ^f	373.30±09.0 ^a	393.65±04.7 ^a	396.22±03.1 ^b
1.5 H₂S+150 NaCl	373.07±11.6 ^c	394.53±07.1 ^{cd}	339.88±07.8 ^f	344.26±13.0 ^c
1.5 H₂S+300 NaCl	469.91±16.5 ^e	294.13±11.5 ^{bc}	359.52±05.3 ^g	418.07±01.3 ^a
KONTROL	346.86±07.8 ^c	383.43±03.9 ^b	347.43±.64 ^e	250.04±2.2 ^{ef}
0.5 mM SNP	389.73±04.3 ^e	383.07±10.7 ^b	396.27±9.6 ^{cd}	338.78±7.7 ^{bc}
1.0 mM SNP	344.72±07.1 ^d	381.98±12.4 ^b	405.25±4.3 ^d	322.98±5.0 ^{de}
150 mM NaCl	384.66±11.8 ^{ab}	398.96±7.6 ^{ab}	335.84±6.7 ^{bc}	312.75±9.1 ^{de}
300 mM NaCl	356.17±10.9 ^{bc}	332.11±7.3 ^c	328.95±8.5 ^{cd}	277.32±3.5 ^g
0.5 SNP+150 NaCl	421.46±05.7 ^a	375.31±6.0 ^b	356.53±6.1 ^{cd}	318.19±6.4 ^{cd}
0.5 SNP+300 NaCl	335.90±06.3 ^c	432.47±14.4 ^a	346.80±5.2 ^b	391.01±3.5 ^a
1.0 SNP+150 NaCl	415.62±14.3 ^a	390.37±15.5 ^c	375.35±7.3 ^a	364.17±7.7 ^{ab}
1000 SNP+300 NaCl	375.53±47.4 ^c	393.17±8.3 ^{ab}	332.23±8.7 ^{cd}	361.79±3.7 ^{ab}

Bir sütundaki aynı harflerle gösterilen değerler arasındaki fark Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma Testine göre (p>0.05) önemsizdir. ± standart hatayı ifade eder.

4.7. GS Aktivitesine Ait Bulgular

4.7.1. H₂S uygulamasından elde edilen veriler

Tek başına H₂S uygulamalarında, 1 mM H₂S uygulaması, Altındane ve Doğu-88 çeşidinde kontrole kıyasla, GS aktivitesini kök ve gövdede düşürürken, 1.5 mM H₂S artırmıştır (Çizelge 4.9). Tek başına tuz uygulamalarında, her iki çeşitte 150 ve 300 mM tuz, kök ve gövdede GS aktivitesini kontrole göre genelde düşürmüştür (Çizelge 4.9). H₂S+Tuz uygulamaları incelendiğinde, Altındane çeşidinde H₂S uygulamalarının her ikisi, tuz koşullarında, kontrollerine göre, GS aktivitesini genelde artırmıştır (Çizelge 4.9). Bu koşullarda GS aktivitesini artırmada 1.5 mM H₂S özellikle 300 mM tuzda daha belirgin olmuştur.

4.7.2. SNP uygulamasından elde edilen veriler

Hem Altındane hem de Doğu-88 çeşidinde SNP uygulamalarının her ikisi kontrole kıyasla GS aktivitesini kök ve gövdede genelde düşürmüştür ($P<0.05$) (Çizelge 4.9). Tek başına tuz uygulamalarında, her iki çeşitte 150 ve 300 mM tuz, kök ve gövdede GS aktivitesini kontrole göre genelde düşürmüştür (Çizelge 4.9). H₂S+Tuz uygulamaları incelendiğinde, her iki buğday çeşidinde SNP uygulamalarının her ikisi, tuz koşullarında, kontrollerine göre, GS aktivitesini artırmıştır (Çizelge 4.9). Bu koşullarda GS aktivitesini artırmada SNP konsantrasyonları arasında 1 mM SNP daha etkin olmuştur.

GS aktivitesinden elde edilen veriler genel değerlendirildiğinde, tuz uygulamaları, her iki çeşitte tuz stresi, kök ve gövdede GS aktivitesini kontrole göre genelde düşürmüştür. Doğu-88 çeşidinin kök ve gövdesinde genelde artırmıştır. Ancak, H₂S ve SNP uygulamalarının her ikisi tuz stresi altındaki buğday varyetelerinin her ikisinin kök ve gövdelerinde GS aktivitesini genelde artırarak tuz stresi etkisini hafifletmiştir.

Çizelge 4.9. H₂S (mM NaHS olarak) ve NO (mM SNP olarak) uygulamalarının NaCl (mM) stresi altındaki iki buğday varyetesinde GS aktivitesine etkileri.

GS Aktivitesi (EU/gr doku)				
Uygulamalar	Altındane		Doğu-88	
	Kök	Gövde	Kök	Gövde
KONTROL	6.34±0.00 ^{cd}	58.03±0.003 ^c	20.69±0.006 ^a	53.34±0.001 ^b
1.0 mM H₂S	3.99±0.00 ^e	50.41±0.003 ^c	14.51±0.002 ^b	48.43±0.006 ^{bc}
1.5 mM H₂S	10.02±0.00 ^b	73.82±0.003 ^a	22.82±0.001 ^e	62.49±0.002 ^a
150 mM NaCl	6.83±0.00 ^c	66.99±0.004 ^{abc}	8.56±0.001 ^a	44.44±0.008 ^a
300 mM NaCl	2.98±0.00 ^e	39.31±0.002 ^{bc}	13.86±0.003 ^e	39.07±0.001 ^{bc}
1.0 H₂S+150 NaCl	4.91±0.00 ^e	70.20±0.002 ^a	10.24±0.003 ^c	58.46±0.002 ^b
1.0 H₂S+300 NaCl	3.13±0.00 ^{ef}	68.06±0.004 ^{ab}	18.96±0.001 ^c	52.27±0.002 ^b
1.5 H₂S+150 NaCl	8.14±0.00 ^a	75.74±0.009 ^a	13.20±0.004 ^d	63.37±0.017 ^a
1.5 H₂S+300 NaCl	3.85±0.001 ^f	73.82±0.039 ^a	15.97±0.001 ^e	46.30±0.003 ^c
KONTROL	6.62±0.001 ^{bc}	55.86±0.006 ^g	20.77±0.001 ^e	53.74±0.005 ^e
0.5 mM SNP	5.97±0.007 ^c	51.85±0.002 ^{bc}	20.99±0.001 ^e	58.09±0.004 ^e
1.0 mM SNP	6.89±0.002 ^{abc}	54.59±0.001 ^e	18.14±0.00 ^a	64.42±0.002 ^c
150 mM NaCl	4.96±0.004 ^{ab}	51.21±0.002 ^{bc}	10.03±0.004 ^b	51.69±0.005 ^c
300 mM NaCl	4.89±0.001 ^{abc}	37.34±0.000 ^f	5.33±0.001 ^{cd}	43.77±0.021 ^d
0.5 SNP+150 NaCl	9.60±0.001 ^a	52.90±0.002 ^b	12.13±0.02 ^{ef}	66.62±0.003 ^a
0.5 SNP+300 NaCl	5.76±0.002 ^c	48.43±0.002 ^d	4.91±0.00 ^d	51.85±0.005 ^d
1.0 SNP+150 NaCl	8.32±0.003 ^{abc}	67.64±0.004 ^a	7.25±0.00 ^f	68.73±0.003 ^b
1.0 SNP+300 NaCl	7.04±0.001 ^{bc}	49.93±0.005 ^{cd}	6.83±0.002 ^c	61.48±0.001 ^c

Bir sütundaki aynı harflerle gösterilen değerler arasındaki fark Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma Testine göre (p>0.05) önemsizdir. ± standart hatayı ifade eder.

4.8. GOGAT Aktivitesine Ait Bulgular

4.8.1. H₂S uygulamasından elde edilen veriler

Tek başına H₂S uygulamalarında, 1 mM H₂S uygulaması, Altındane ve Doğu-88 çeşidinde kontrole kıyasla, GOGAT aktivitesini genelde düşürürken, 1.5 mM H₂S artırmıştır (Çizelge 4.10). Tek başına tuz uygulamalarında, her iki çeşitte 150 ve 300 mM tuz, kök ve gövdede GOGAT aktivitesini kontrole göre genelde artırmıştır (Çizelge 4.10). H₂S+Tuz uygulamaları incelendiğinde, Altındane çeşidinde H₂S uygulamalarının her ikisi, tuz koşullarında, kontrollerine göre, GS aktivitesini genelde artırmıştır (Çizelge 4.10). Bu koşullarda GS aktivitesini artırmada 1.5 mM H₂S özellikle 300 mM tuzda daha belirgin olmuştur. Doğu-88 çeşidinde ise aynı uygulamalar kökte aktiviteyi düşürürken, gövdede artırmıştır.

4.8.2. SNP uygulamasından elde edilen veriler

Altındane çeşidinde SNP uygulamalarının her ikisi kontrole kıyasla GOGAT aktivitesini kökte artırmış, gövdede ise genelde düşürmüştür ($P < 0.05$) (Çizelge 4.10). Doğu-88 çeşidinde ise aynı uygulamalar kök ve gövdede aktiviteyi düşürmüştür. Tek başına tuz uygulamalarında, her iki çeşitte 150 ve 300 mM tuz, kök ve gövdede GOGAT aktivitesini kontrole göre genelde artırmıştır (Çizelge 4.10). SNP+Tuz uygulamaları incelendiğinde, Altındane çeşidinde SNP uygulamalarının her ikisi, tuz koşullarında, kontrollerine göre, GS aktivitesini kökte artırmıştır. Gövdede ise aynı uygulamalar özellikle 150 mM tuz koşullarında aktiviteyi artırmıştır (Çizelge 4.10). Doğu-88'de ise SNP uygulamaları GOGAT aktivitesi üzerinde kökte anlamlı ($P > 0.05$) etki göstermezken, gövdede aktiviteyi artırmıştır.

GOGAT aktivitesinden elde edilen veriler genel değerlendirildiğinde, tuz uygulamaları, her iki çeşitte tuz stresi, kök ve gövdede GOGAT aktivitesini kontrole göre genelde artırmıştır. H₂S+Tuz uygulamaları incelendiğinde, Altındane çeşidinde H₂S uygulamalarının her ikisi, tuz koşullarında, kontrollerine göre, GS aktivitesini genelde

artırmıştır. Bu koşullarda GS aktivitesini artırmada 1.5 mM H₂S özellikle 300 mM tuzda daha belirgin olmuştur. Doğu-88 çeşidinde ise aynı uygulamalar kökte aktiviteyi düşürürken, gövdede artırmıştır. SNP+Tuz uygulamaları incelendiğinde, Altındane çeşidinde SNP uygulamalarının her ikisi, tuz koşullarında, GS aktivitesini kökte artırmıştır. Doğu-88’de ise SNP uygulamaları GOGAT aktivitesi üzerinde kökte anlamlı etki göstermezken, gövdede aktiviteyi artırmıştır.



Çizelge 4.10. H₂S (mM NaHS olarak) ve NO (mM SNP olarak) uygulamalarının NaCl (mM) stresi altındaki iki buğday varyetesinde GOGAT aktivitesine etkileri.

GOGAT Aktivitesi (EU/gr doku)				
Uygulamalar	Altındane		Doğu-88	
	Kök	Gövde	Kök	Gövde
KONTROL	3.86±.00 ^e	15.01±.00 ^{cd}	4.93±.00 ^e	17.15±.00 ^f
1.0 mM H₂S	3.43±.00 ^f	15.01±.00 ^d	3.86±.00 ^g	4.72±.00 ^a
1.5 mM H₂S	4.50±.00 ^{de}	15.01±.00 ^{bcd}	3.86±.00 ^f	20.58±.00 ^d
150 mM NaCl	4.93±.00 ^a	15.86±.00 ^b	7.93±.00 ^b	19.72±.00 ^e
300 mM NaCl	4.93±.00 ^{cd}	15.29±.00 ^{bcd}	6.00±.00 ^d	14.15±.00 ^g
1.0 H₂S+150 NaCl	5.15±.00 ^a	24.01±.00 ^b	6.43±.00 ^c	28.30±.00 ^b
1.0 H₂S+300 NaCl	5.57±.00 ^a	25.72±.00 ^a	4.29±.00 ^f	17.58±.00 ^f
1.5 H₂S+150 NaCl	5.36±.00 ^c	18.44±.00 ^{bcd}	5.14±.00 ^a	27.01±.00 ^c
1.5 H₂S+300 NaCl	5.50±.00 ^b	24.01±.00 ^{bc}	4.29±.00 ^f	27.87±.00 ^c
KONTROL	3.92±.00 ^b	15.72±.00 ^h	4.72±.00 ^e	16.01±.00 ^{cd}
0.5 mM SNP	7.50±.00 ^{ab}	8.57±.00 ^g	3.86±.00 ^{de}	9.00±.00 ^f
1.0 mM SNP	8.57±.00 ^{ab}	7.72±.00 ^e	3.86±.00 ^{cd}	17.72±.00 ^d
150 mM NaCl	4.50±.00 ^{ab}	14.14±.00 ^{bc}	5.36±.00 ^b	14.29±.00 ^c
300 mM NaCl	4.57±.00 ^{ab}	15.57±.00 ^f	6.65±.00 ^a	12.86±.00 ^e
0.5 SNP+150 NaCl	10.29±.00 ^a	15.86±.00 ^a	4.50±.00 ^c	18.44±.00 ^b
0.5 SNP+300 NaCl	9.86±.00 ^{ab}	10.72±.00 ^{cd}	6.43±.00 ^a	17.58±.00 ^b
1.0 SNP+150 NaCl	4.72±.00 ^{ab}	18.44±.00 ^b	4.29±.00 ^c	17.58±.00 ^b
1.0 SNP+300 NaCl	9.22±.00 ^{ab}	10.72±.00 ^d	6.43±.00 ^a	27.87±.00 ^d

Bir sütundaki aynı harflerle gösterilen değerler arasındaki fark Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma Testine göre (p>0.05) önemsizdir. ± standart hatayı ifade eder.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bitkilerde en önemli metabolik yollarından biri azot metabolizmasıdır. Bitkiye alınan inorganik azot formları (NO_3^- ve NH_4^+), asimile edilerek organik azot formlarına (amino asitlere) dönüştürülür. Bu nedenle azot metabolizmasını etkileyen herhangi bir faktör, metabolizmanın tümünü etkiler ve bitki yaşamında önemli sonuçlar doğuracaktır (Wang *et al.* 2012). Tuz stresi cevap mekanizmaları ile ilgili çalışmalar, günümüzde yoğun bir şekilde artmaktadır. Ancak, tuz (NaCl) stresinin bitkide azot metabolizması üzerine etkilerini açıklayan herhangi bir çalışma bulunmaktadır. Azot metabolizması bitki yaşamı için temel biyokimyasal süreçleri içerir. Örneğin, azot metabolizmasında herhangi bir problemin oluşması, protein sentezinden hücre bölünmesine ve sonuçta bitkisel verime kadar bütün bitki süreçlerini doğrudan veya dolaylı olarak etkiler (Wang *et al.* 2012; Akhtar *et al.* 2013). Bu nedenle, tuz stresi koşullarında bitki azot metabolizması cevabının bilinmesi ve bitkide tuz stresi etkilerinin iyileştirilmesi önemlidir. Buğday (*Triticum aestivum* L.) dünyada besin kaynaklarının başında gelir ve bitki biyolojisinde araştırmalar için model bir organizmadır. Bu çalışmada, ekzojen NO ve H_2S uygulamasının, tuz stresi altındaki buğdayın iki varyetesinde büyüme-gelişme parametreleri (kök-gövde uzunluğu, kuru ve yaş ağırlık, protein ve fotosentetik pigment içeriği, lipid peroksidasyonu) ve azot metabolizması enzimleri (NR, NiR, GS ve GOGAT) üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada genel streslere duyarlı ve toleranslı iki buğday çeşidi (toleranslı olarak Doğu-88, duyarlı olarak Altındane) kullanılarak, çeşitlerin tuz stresi cevapları da belirlenmiştir. Çalışma amacı doğrultusunda, buğday fideleri sıcaklık kontrolü ($24/20^\circ\text{C}$, gündüz/gece) bir iklim kabininde hidroponik sistemde büyütülmüştür. Sonra, 10 günlük fidelerin yapraklarına H_2S donörü olarak NaHS (1 ve 1.5 mM) ve NO donörü olarak SNP (0.5 ve 1 mM) uygulandı. Bu işlemten sonra hidroponik ortama NaCl (150 ve 300 mM) uygulaması yapıldı. Uygulamadan 4 gün sonra, fidelerin kök ve gövdeleri hasat edildi ve bu örnekler deneysel materyal olarak kullanıldı.

5.1. Kök- Gövde Uzunluk, Yaş -Kuru Ağırlık Bulgularının Değerlendirilmesi

Tek başına H₂S ve SNP uygulaması buğdayın strese hassas çeşidinde (Altındane) bitki büyümesi parametrelerinin hemen hepsini kontrole göre artırmıştır (Çizelge 4.1 ve 4.2). Ayrıca her iki varyetede tuz uygulamalarında kök kuru ağırlığı düşerken, kök uzunluğu artmıştır. H₂S+tuz ve SNP+tuz uygulamalarında, tuz stresi etkisiyle azalan kuru ağırlık artırılarak iyileştirilmiş ve kök uzunluğu ise düşürülmüştür (Çizelge 4.1 ve 4.2). Tuz stresinde bitki kuru ağırlığının düştüğünü gösteren pek çok çalışma bulunmaktadır (Türkmen *et al.* 2000; Aydın ve Atıcı 2013). Ancak çalışmamızda tuz uygulamaları buğdayın her iki çeşidinde kök ve gövdenin kuru ağırlığını düşürürken, ilginç olarak gövde uzunluğunu düşürmüş ve kök uzunluğunu artırmıştır. Literatürde genelde toprak koşullarında (saksı) yapılan çalışmalarda tuzun kök ve gövde uzunluğunu azalttığı belirlenmiştir (Aydın ve Atıcı 2013). Ancak bizim çalışmamızda hidroponik sistemde yapıldığından dolayı, tek başına tuz koşullarında bitki strese bir cevap olarak daha fazla su alabilmek için kök uzunluğunu artırmış olabilir. Bu bilgi literatür için yeni olup başka çalışmalarla desteklenmeye ihtiyacı vardır.

5.2. Çözünebilir Protein Miktarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Tek başına H₂S ve NO uygulamaları, kök ve gövdede çözünebilir protein miktarını, buğdayın Altındane çeşidinde artmış, ancak Doğu-88 çeşidinde kontrol grubuna göre protein miktarını kökte artırırken, gövdede ise düşürmüştür (Çizelge 4.3). H₂S'nin S-sülfhidrasyon yoluyla çok sayıda proteindeki sisteinleri fizyolojik olarak modifiye ettiği ve bu nedenle, sülfhidrasyonun proteinlerin fizyolojik bir post-translasyonel modifikasyonu gibi görüldüğü iddia edilmiştir (Mustafa *et al.* 2017). İlave olarak H₂S'nin içsel protein içeriğini artırdığı da gösterilmiştir (Zou *et al.* 2019). NO'nun da bitkilerde protein içeriğini artırdığı gösteren deliller vardır (Wendehenne *et al.* 2004). Tuz uygulamaları da (150 ve 300 mM) kontrole göre protein miktarını kök ve gövdede artırmıştır. Literatürde birçok bitkide tuz stresinde içsel protein miktarının düştüğü ileri sürülse de bazı çalışmalarda ise tuz stresinde içsel protein yoğunluğunun arttığı belirlenmiştir (Win and Oo 2017). Biz bunu tuz stres koşullarında su miktarının

azalmasına ve deney yapılırken kontrole göre alınan doku örneğinin miktarının daha fazla olmasına bağlamaktayız (Çizelge 4.3). Ancak tuz stresine maruz bitkilerde H₂S uygulamaları (H₂S+tuz), kontrollerine göre (tek başına tuz uygulaması) protein içeriğini genelde her iki varyetenin dokularında düşürmüştür (Çizelge 4.3). SNP uygulamasından elde edilen veriler genel olarak değerlendirildiğinde, tuz uygulamaları buğdayın her iki çeşidinde çözünebilir protein miktarını artırmıştır (Çizelge 4.3). Tuz stresi altındaki bitkilerde toplam çözünebilir protein içeriğini gösteren pek çok çalışma bulunmaktadır (Parvaiz and Satyawati 2008; Zheng *et al.* 2010). Ancak tuz stresine maruz bitkilerde, H₂S (H₂S+tuz) ve SNP (NO+tuz) uygulamaları, kontrollerine göre (tek başına tuz uygulaması) protein içeriğini genelde her iki varyetenin dokularında düşürmüştür (Çanakçı ve Munzuroğlu 2004). Yani H₂S ve SNP uygulamaları tuz stresinden kaynaklı protein yıkımını durdurmuştur.

5.3. Fotosentetik Pigment Miktarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Buğdayın her iki çeşidinde, kontrolleriyle kıyaslandığında, K_{la}, K_{lb}, total klorofil ve karotenoid miktarları, tek başına H₂S ve SNP uygulamaları tarafından artmıştır (Çizelge 4.4-5). Birçok çalışmada NO ve H₂S'in bitkilerde klorofil içeriğini iyileştirdiği gösterilmiştir (Lazalt *et al.* 1997; Mostofa *et al.* 2015). Tek başına tuz uygulaması ise her iki buğday çeşidinde özellikle K_{la}, K_{lb} ve total klorofil içeriğini düşürmüştür. Bu düşüşler Doğu-88'de daha güçlü olmuştur. Tuz stresinin fotosentetik pigment miktarını düşüğünü gösteren bazı çalışmalar bulunmaktadır (Sairam and Srivastava 2002; Molazem *et al.* 2010). Ancak, bizim çalışmalara göre karotenoid içeriği ise tuzun etkisiyle özellikle Altındane çeşidinde artmış, doğu-88'de ise hafif düşme eğilimi göstermiştir (Çizelge 4.4-5). Ancak tuz stresi koşullarında uygulanan H₂S, klorofil içeriğini özellikle Doğu-88'de artırmıştır (Çizelge 4.5). Altındane'de H₂S'nin bu olumlu etkisi görülememiştir. Buna karşılık SNP uygulamaları her iki buğday çeşidinde tuz koşullarında (150 ve 300 mM) klorofil içeriğini artırmış ve bitkide tuz stres koşulunda bir iyileşme sağlayabilmiştir. Bu durum, 'tuzlu koşullarda büyüyen bitkilerin yaprakları küçük, rengi de koyu yeşildir' ifadesini kullanan Mangal ve Lal (1990)'in tespitleriyle uyumaktadır. Ancak karotenoidler üzerinde her iki çeşitte, H₂S ve SNP

uygulamaları, kontrollerine göre tuz koşullarında belirgin bir etki sergileyememiştir (Çizelge 4.4-5).

5.4. MDA İçeriğine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Altındane çeşidinde H₂S uygulamaları kontrole kıyasla MDA içeriğini kök ve gövdede artırmış, ancak Doğu-88'de genelde düşürmüştür. SNP uygulamaları ise kontrole kıyasla MDA içeriğini her iki varyetenin kök ve gövdesinde artırmıştır (Çizelge 4.6). Tek başına tuz uygulamaları her iki buğday çeşidinin kök ve gövdelerinde MDA içeriğini artırmıştır (Çizelge 4.6). Bu artış tuz konsantrasyonunun artışıyla doğru orantılı olmuştur. MDA içeriğindeki artışta varyete farkı çok belirgin olmamıştır. MDA içeriğindeki artış gövdelerde daha yüksek olmuştur. Tuz stresinin LPO seviyesini (MDA olarak) artırdığı ile ilgili olarak çok sayıda bilgi bulunmaktadır (Lutts *et al.* 1996; Sivritepe ve Eriş 1999; Sairam and Srivastava 2002; Mostofa *et al.* 2015). Ancak, H₂S ve SNP uygulamalarının her ikisi tuz stresi altındaki buğday varyetelerinin kök ve gövdelerinde MDA içeriğini düşürmüştür (Çizelge 4.6). Bazı çalışmalar bizim sonucu desteklemektedir (Dolatabadian *et al.* 2008; Mostofa *et al.* 2015). MDA seviyesi H₂S ve SNP uygulamalarında tuz uygulamalarına göre düşerek (%50'nin üzerinde) iyileşme sağlamıştır.

5.5. NR Aktivitesine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Her iki buğday çeşidinde H₂S ve SNP uygulamaları kontrole göre NR aktivitesini kök ve gövdede artırmıştır. Artışlar genelde 1.5 mM H₂S uygulamasında daha yüksek olmuştur (Çizelge 4.7). NO'nun SNP olarak bitkide NR aktivitesini artırdığını gösteren kısıtlı çalışma bulunmaktadır (Dong *et al.* 2014; Balotf *et al.* 2018). Tek başına tuz uygulamalarının her ikisi her iki buğday çeşidinin kök ve gövdelerinde, NR aktivitesini önemli ölçüde düşürmüştür (Çizelge 4.7). NR aktivitesindeki bu düşüş, gövdelerde daha yüksek olmuştur. Elde ettiğimiz bu veriyi destekleyen bazı çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin tuzluluk koşullarında yetişen pamuk fidelerinde de tuz stresi NR aktivitesini düşürmüştür (Dong *et al.* 2014). Ayrıca, yapılan bir çalışmada kontrol bitkilerinde

yapraklardaki NR aktivitesi yüksekken, tuz uygulanmış bitkilerde ise düşüş göstermiştir (Abdelbaki *et al.* 2000). Bu artış tuz konsantrasyonunun artışıyla doğru orantılı artmıştır. Ancak, H₂S ve SNP uygulamalarının her ikisi tuz stresi altındaki buğday varyetelerinin her ikisinin kök ve gövdelerinde NR aktivitesini artırarak tuz stresi etkisini hafifletmiştir. Bu enzimin tuzluluk koşullarında SNP ve H₂S uygulaması ile nasıl değiştiğini gösteren çok az çalışma bulunmaktadır. Örneğin Dong vd (2014) yaptıkları çalışmada NO'nun tuz stresi ile düşen NR aktivitesini artırarak iyileştirdiği ileri sürülmüştür. Ancak H₂S'nin tuz koşullarında NR aktivitesi üzerinde etkisini gösteren herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bizim bulgularımız literatür için önemli bir kaynak olacaktır. NO ve H₂S ile NR aktivitesinin tuz koşullarına göre iyileştirilmesi oldukça önemli bir olaydır. Çünkü tuz NR aktivitesini düşürdüğünde asimile edilemeyen içsel NO₃⁻ bitki sitoplazma ve vakuolünde birikecek ve bitki azot eksikliği çekecektir.

5.6. NiR Aktivitesine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Altındane çeşidinde H₂S uygulamalarının her ikisi kontrole kıyasla, NiR aktivitesini kökte artırmış, ancak gövdede düşürmüştür. Doğu-88 çeşidinde ise kontrole göre artırmıştır (Çizelge 4.8). SNP uygulamaları da NiR aktivitesini kök ve gövdede genelde artırmıştır (Çizelge 4.8). Bu iki sinyal bileşiğinin NiR aktivitesini gösteren literatür verisi bulunmamaktadır. Ancak NO'nun SNP olarak NiR aktivitesini kök ve gövdede artırması önemlidir. Hücrede NiR artışı, toksik olan ve NR aktivitesinin ürünü olan nitritin (NO₂⁻) hücrede hızlı bir şekilde NH₄⁺'e indirgenmesine neden olmaktadır. Hücrelerde NO₂ artışı aşırı yüksek reaktif azot bileşiklerinin oluşmasına neden olmaktadır (Balotf *et al.* 2018). Tek başına tuz uygulamalarında, Altındane çeşidinde NiR aktivitesi kökte artmış, ancak gövdede düşmüştür. Doğu-88 çeşidinin kök ve gövdesinde ise genelde artmıştır (Çizelge 4.8). Bu bulgulara göre Altındane'ye göre daha dayanıklı bir çeşit olan Doğu-88'de aktiviteyi her iki dokuda artırmıştır (Çizelge 4.8). Tuzun NiR aktivitesi üzerine literatürde çelişkili veriler bulunmaktadır. Örneğin domateste tuzun NiR aktivitesi üzerinde özellikle ilk 3 günde anlamlı bir etki yapmadığı gözlenmiştir (Debouba *et al.* 2007). Ancak tuzluluk hassas pirinç çeşitlerinin fidelerinde

NiR aktivitesini artırırken, toleranslıda kök NiR aktivitesinde inhibisyon gözlenmiştir (Katiyar and Dubey 1992). Bizim çalışmamızda ise dayanıklı çeşit tuz koşullarında NiR aktivitesini artırmıştır. H₂S ve SNP uygulamalarının her ikisi tuz stresi altındaki buğday varyetelerinin kök ve gövdelerinde NiR aktivitesini genelde artırarak tuz stresi etkisini hafifletmiştir. H₂S ve SNP tuz koşullarında NR aktivitesi üzerinde etkisini gösteren herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bizim bulgularımız literatür için önemli bir kaynak olacaktır. NO ve H₂S ile NiR aktivitesinin tuz koşullarına göre iyileştirilmesi oldukça önemli bir olaydır. Çünkü tuz NiR aktivitesini düşürdüğünde asimile edilemeyen içsel NO₂⁻ bitki sitoplazma ve vakuolünde birikecek ve bitkide toksik etki yapacaktır.

5.7. GS Aktivitesine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Tek başına H₂S uygulamalarında, 1 mM H₂S uygulaması, Altındane ve Doğu-88 çeşidinde kontrole kıyasla, GS aktivitesini kök ve gövdede düşürürken, 1.5 mM H₂S artırmıştır (Çizelge 4.9). SNP uygulamaları ise her iki çeşitte GS aktivitesini kök ve gövdede genelde düşürmüştür (Çizelge 4.9). Buğday fideleri üzerinde yapılan bir çalışmada (Balotf *et al.* 2018) SNP uygulamasının bazı azot uygulamaları ile birlikte GS aktivitesini düşürdüğü gösterilmiştir. Tuz uygulamaları, her iki çeşitte tuz stresi, kök ve gövdede GS aktivitesini kontrole göre genelde düşürmüştür (Çizelge 4.9). Ancak, H₂S ve SNP uygulamalarının her ikisi tuz stresi altındaki buğday varyetelerinin kök ve gövdelerinde GS aktivitesini genelde artırarak tuz stresi etkisini hafifletmiştir. H₂S ve SNP, tuz koşullarında GS aktivitesi üzerinde etkisini açıklayan herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bizim bulgularımız literatür için önemli bir kaynak olacaktır. NO ve H₂S ile GS aktivitesinin tuz koşullarına göre iyileştirilmesi oldukça önemli bir olaydır. GS aktivitesinin artışı bitkide tuz toksisitesinin yatıştırılmasına önemli katkı yapmaktadır. GS amonyumun asimilasyonunu artırarak hem aminoasit gereksinimini iyileştirmekte hem de amonyum birikimini önlemektedir.

5.8. GOGAT Aktivitesine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Tek başına 1 mM H₂S uygulaması, Altındane ve Doğu-88 çeşidinde kontrole kıyasla, GOGAT aktivitesini genelde düşürürken, 1.5 mM H₂S artırmıştır (Çizelge 4.10). SNP uygulamaları Altındane çeşidinde GOGAT aktivitesini kökte artırmış, gövdede ise genelde düşürmüştür. Doğu-88 çeşidinde ise aynı uygulamalar kök ve gövdede aktiviteyi düşürmüştür (Çizelge 4.10). Bulgularımıza göre NO ve H₂S uygulamaları konsantrasyona ve bitki organına göre GOGAT üzerinde farklı etki yapmıştır. Son yıllarda buğday (Balotf *et al.* 2018) ve Brassica'da (*Brassica juncea* L.) (Praveen *et al.* 2019) yapılan çalışmalarda SNP'nin GOGAT aktivitesini artırdığı belirlenmiştir. Ancak H₂S ile ilgili bir veriye rastlanılmamıştır. Tuz uygulamaları ise her iki çeşitte, kök ve gövdede GOGAT aktivitesini kontrole göre genelde artırmıştır (Çizelge 4.10). Bazı çalışmalar GOGAT aktivitesinin tuz stresinden olumsuz etkilendiği ileri sürülmüştür (Chakrabarti and Mukherji 2003). Bizim çalışmamızda yukarıda (5.7.) tuz etkisiyle GS aktivitesinin düştüğü belirlenmiştir. Bu durum ortamda amonyum birikimine neden olacaktır. Amonyum birikmesi daha fazla 2-oxoglutarat kullanılmasına ve GOGAT aktivitesinin artmasına neden olabilir. Bizim bulgularımıza benzer olarak bir türün tuza duyarlı çeşidinde GOGAT aktivitesi düşerken toleranslı olanlarda arttığı rapor edilmiştir (Garg and Gupta 2011). H₂S+Tuz uygulamaları incelendiğinde, Altındane çeşidinde H₂S uygulamaları, tuz koşullarında, GOGAT aktivitesini genelde artırmıştır (Çizelge 4.10). Bu koşullarda GOGAT aktivitesini artırmada 1.5 mM H₂S özellikle 300 mM tuzda daha belirgin olmuştur. Doğu-88 çeşidinde ise aynı uygulamalar kökte aktiviteyi düşürürken, gövdede artırmıştır (Çizelge 4.10). SNP+Tuz uygulamaları incelendiğinde, Altındane çeşidinde SNP uygulamalarının her ikisi, tuz koşullarında, GOGAT aktivitesini kökte artırmıştır. Doğu-88'de ise SNP uygulamaları GOGAT aktivitesi üzerinde kökte anlamlı etki göstermezken, gövdede aktiviteyi artırmıştır.

Sonuç:

Bu çalışmada, ekzojen nitrik oksit (NO) ve hidrojen sülfürün (H₂S), tuz (NaCl) stresi altındaki buğday (*Triticum aestivum* L.) varyetelerinde (Altındane ve Doğu-88), büyüme-gelişme parametreleri ve azot metabolizması üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Çalışmadan elde edilen önemli bulgular aşağıda özetlenmiştir.

1. Tuz tresi buğdayın çalışılan iki varyetesinde büyüme ve gelişme parametrelerini düşürmüştür. Ancak H₂S ve NO uygulaması tuz stresine maruz kalan buğday fidelerinde bu etkiyi genelde yatıştırabilmiştir.
2. Tuz tresi buğdayın çalışılan iki varyetesinde biyokimyasal parametrelerden özellikle klorofil içeriğini düşürürken, MDA içeriğini artırarak toksik bir etki yapmıştır. Ancak H₂S ve NO uygulaması tuz stresine maruz kalan buğday fidelerinde bu toksik etkiyi iyileştirebilmiştir.
3. Tuz tresi buğdayın çalışılan iki varyetesinde azot metabolizmasında rol alan NR, NiR, GS aktivitelerini genelde düşürürken, GOGAT aktivitesini artırmıştır. Ancak H₂S ve NO uygulaması tuz stresine maruz kalan buğday fidelerinde bu enzim aktivitelerini genelde artırmış ve tuz koşullarında azot metabolizmasının regülasyonuna önemli katkı yapmıştır.
4. NO ve H₂S uygulamalarının, tuz stresi altındaki buğdayda, azot asimilasyonunu artırarak fizyolojik parametrelerin iyileşmesine ve tuz stresi toksisitesinin yatıştırılmasına önemli katkı yaptığı belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

- Abdelbaki, G.K., Siefert, F., Man, H.M., Weiner, H., Kaldenhoff, R. and Kaiser, W.M., 2000. Nitrate reductase in *Zea mays* L. in salinity. *Plant, Cell and Environment*, 23, 515-521.
- Akçin, A., Yalçın, E., Akçin, T.A., 2017. *Spergularia marina* (L.) Griseb. (Caryophyllaceae)'da tuzluluğun prolin ve klorofil pigmentleri üzerine etkisi. *Sinop Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 2(1), 80-92.
- Akhtar, J., Ahmad, R., Ashraf, M. Y., Tanveer, A., Waraich, E.A., Oraby, H., 2013. Influence of exogenous application of salicylic acid on salt-stressed mungbean (*Vigna radiata*): growth and nitrogen metabolism. *Pak. J. Bot.*, 45(1), 119-125.
- Ali, B. Gill, R.A., Yang, S., Gill, M.B., Ali, S., Rafiq, M.T., 2014. Hydrogen sulfide alleviates cadmium-induced morpho-physiological and ultrastructural changes in *Brassica napus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 110, 197-207.
- Amini, F., Ehsanpour, A.A., Hoang, Q.T., Shin, J.S. 2007. Protein pattern changes in tomato under in vitro salt stress. *Russian Journal of Plant Physiology*, 54(4), 464-471.
- Anbar, M., 1995. Nitric oxide: a synchronizing chemical messenger, *Experientia*, 51, 481-490.
- Anderson, L., Mansfield, T.A., 1979. The effects of nitric oxide pollution on the growth of tomato. *Environmental Pollution*, 20, 113-121.
- Arasimowicz, M., Floryszak-Wieczorek, J., 2007. Nitric oxide as a bioactive signalling molecule in plant stress responses. *Plant Science*, 172(5), 876-887.
- Ashraf, M.P.J.C., Harris, P.J.C., 2004. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant science*, 166(1), 3-16.
- Aydın, İ. Atıcı, Ö., 2013. Tuz Stresinin Bazı Kültür Bitkilerinde Çimlenme ve Fide Gelişimi Üzerine Etkileri. *Muş Alparslan Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 3(2), 1-15.
- Ayyıldız, M., 1990. Sulama Suyu Kalitesi ve Tuzluluk Problemleri, Ankara Üniv. Ziraat Fakültesi, Kültürteknik Bölümü, Ankara Üniv. Ziraat Fakültesi Yayınları, 344, 282s, Ankara.
- Balotf, S., Islam, S., Kavooosi, G., Kholdebarin, B., Juhasz, A., Ma, W., 2018. How exogenous nitric oxide regulates nitrogen assimilation in wheat seedlings under different nitrogen sources and levels. *PloS one*, 13(1), e0190269.
- Banu, M.N A., Hoque, M.A., Watanabe-Sugimoto, M., Matsuoka, K., Nakamura, Y., Shimoishi, Y., Murata, Y., 2009. Proline and glycinebetaine induce antioxidant defense gene expression and suppress cell death in cultured tobacco cells under salt stress. *Journal of Plant Physiology*, 166(2), 146-156.
- Barro, F., Fontes, A.G., Maldonado, J.M., 1991. Organic nitrogen content and nitrate and nitrite reductase activities in tritordeum and wheat grown under nitrate or ammonium. *Plant and Soil*, 135, 251-256.
- Barroso, J.B., Corpas, F.J., Carreras, A., Sandalio, L.M., Valderrama, R., Palma, J.M., Lupianez, J.A., del Rio, L.A., 1999. Localization of nitric oxide synthase in plant peroxisomes. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 36729-36733.

- Beligni, M.V., Lamattina, L., 1999. Is nitric oxide toxic or protective?, Trends Plant Sci., 4, 299-300.
- Bloem, E., Riemenschneider, A., Volker, J., Papenbrock, J., Schmidt, A., Salac, I., Haneklaus, S., Schnug, E., 2004. Sulphur supply and infection with *Pyrenopeziza brassicae* influence L-cysteine desulphydrase activity in *Brassica napus* L. J. Exp. Bot., 55, 2305-2312.
- Botella, M.A., Rosado, A., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., 2005. Plant adaptive responses to salinity stress plant abiotic stress. Blackwell Publishing Ltd., 270p.
- Boucher, J.L., Genet, A., Vadon, S., Delaforge, M., Mansuy, D., 1992. Formation of nitrogen oxides and citrulline upon oxidation of Nw-hydroxy-larginine by hemeproteins. Biochem. Biophys. Res. Commun., 184, 1158-1164.
- Çakırlar, H., Topçuoğlu F., 1985. Stres Terminolojisi, Çölleşen Dünya ve Türkiye Örneği Sempozyumu. Atatürk Üniv. Çevre Sorunları Araştırma Merkezi. Erzurum.
- Çanakçı, Songül; Munzuroğlu, Ömer. Fasulye Phaseolus Vulgaris L. Çeliklerinde Ağırlık Değişimleri, Pigment ve Protein Miktarları Üzerine Asetilsalisilik Asit ve Tuz NaCl Uygulamasının Karşılıklı Etkileri. Gazi Üniversitesi Gazi Eğitim Fakültesi Dergisi, 2004, 24.1.
- Carlos, G.M., Lorenzo, L., 2001. Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress. Plant Physiology, 104, 1015-1025.
- Chakrabarti, N., Mukherji, S., 2003. Effect of phytohormone pretreatment on nitrogen metabolism in *Vigna radiata* under salt stress. Biologia Plantarum, 46(1), 63-66.
- Chen, G., Fan, P.S., Feng, W.M., Guan, A.Q., Lu, Y.Y., Wan, Y.L., 2017. Effects of 5-aminolevulinic acid on nitrogen metabolism and ion distribution of watermelon seedlings under salt stress. Russian Journal of Plant Physiology, 64, 116–123.
- Chen, J., Shangguan, Z.P., Zheng, H.L., 2016. The function of hydrogen sulphide in iron availability: Sulfur nutrient or signaling molecule? Plant Signaling and Behavior, 11(6), 6605-6622.
- Chen, J., Wu, F.H., Wang, W.H., Zheng, C.J., Lin, G.H., Dong, X.J., 2011. Hydrogen sulfide enhances photosynthesis through promoting chloroplast biogenesis, photosynthetic enzyme expression, and thiolredox modification in *Spinacia oleracea* seedlings. J. Exp. Bot., 62, 4481–4493.
- Chinnusamy, V., Jagendorf, A., Zhu, J.K., 2005. Understanding and improving salt tolerance in plants. Crop Science, 45(2), 437-448.
- Christou, A., Manganaris, G.A., Papadopoulos, I., Fotopoulos, V., 2013. Hydrogen sulfide induces systemic tolerance to salinity and non-ionic osmotic stress in strawberry plants through modification of reactive species biosynthesis and transcriptional regulation of multiple defence pathways. J. Exp. Bot., 64, 1953–1966.
- Cooney, R.V., Harwood, P.J., Custer, L.J. ve Franke, A.A., 1994. Light mediated conversion of nitrogen dioxide to nitric oxide by carotenoids, Environmental Health Perspectives, 102:460-462.
- Corpas, F.J., Hayashi, M., Mano, S., Nishimura, M., Barroso, J.B., 2009. Peroxisomes are required for *in vivo* nitric oxide accumulation in the cytosol following salinity stress of Arabidopsis plants. Plant Physiology, 151(4), 2083-2094.

- Corpas, F.J., Palma, J.M., Del Rio, L.A., and Barroso, J.B., 2009. Evidence supporting the existence of L-arginine-dependent nitric oxide synthase activity in plants. *New Phytol.* 184, 9-14.
- Cramer, G.R., Nowak, R.S., 1992. Supplemental manganese improves the relative growth, net assimilation and photosynthetic rates of salt-stressed barley. *Plant Physiology*, 84, 600-605.
- Cueto, M., Hernandez-Perera, O., Martin, R., Bentura, M.L., Rodrigo, J., Lamas, S. Golvano, M.P., 1996. Presence of nitric oxide synthase activity in roots and nodules of *Lupinus albus*, *FEBS Letters*, 398, 159-164.
- Da Silva, C.J., Fontes, E.P.B., Modolo, L.V., 2017. Salinity-induced accumulation of endogenous H₂S and NO is associated with modulation of the antioxidant and redox defense systems in *Nicotiana tabacum* L. cv. Havana. *Plant Science*, 256, 148-159.
- Dajic, Z., 2006. Salt Stress, Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants. Dordrecht, The Netherlands, 345 pp.
- Das, T.N., Huie, R.E., Neta, P., Padmaja, S., 1999. Reduction potential of the sulfhydryl radical: pulse radiolysis and laser flash photolysis studies of the formation and reactions of 'SH and HSSH⁻ in aqueous solutions. *J. Phys. Chem. A*, 103, 5221-5226.
- Dawood, M., Cao, F., Jahangir, M.M., Zhang, G., Wu, F., 2012. Alleviation of aluminum toxicity by hydrogen sulfide is related to elevated ATPase, and suppressed aluminum uptake and oxidative stress in barley. *Journal of Hazardous Materials*, 209, 121-128.
- Debouba, M., Maâroufi-Dghimi, H., Suzuki, A., Ghorbel, M. H., Gouia, H., 2007. Changes in growth and activity of enzymes involved in nitrate reduction and ammonium assimilation in tomato seedlings in response to NaCl stress. *Annals of Botany*, 99(6), 1143-1151.
- Deinlein, U., Stephan, A.B., Horie, T., Luo, W., Xu, G., Schroeder, J.I., 2014. Plant salt-tolerance mechanisms. *Trends in Plant Science*, 19(6): 371-379.
- Del Rio, L.A., Corpas, F.J., Barroso, J.B., 2004. Nitric oxide and nitric oxide synthase activity in plants. *Phytochemistry*, 65(7), 783-792.
- Delledonne, M., Xia Y., Dixon R.A., Lamb, C., 1998. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance, *Nature*, 394, 585-588.
- Demiral, T., Türkan, İ., 2004. Does exogenous glycinebetaine affect antioksidative system of rice seedlings under NaCl treatment, *J. Plant Physiol.*, 161, 1089-1100.
- Deng, Y.Q., Bao, J., Yuan, F., Liang, X., Feng, Z.T., Wang, B.S., 2016. Exogenous hydrogen sulfide alleviates salt stress in wheat seedlings by decreasing Na⁺ content. *Plant Growth Regulation*, 79(3), 391-399.
- Dolatabadian, A., Sanavy SAMM., Chashmi, N.A., 2008. The effects of foliar application of ascorbic acid (vitamin C) on antioxidant enzymes activities, lipid peroxidation and proline accumulation of canola (*Brassica napus* L.) under conditions of salt stress. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 194, 206-213.
- Dong, Y. J., Jinc, S. S., Liu, S., Xu, L. L., Kong, J., 2014. Effects of exogenous nitric oxide on growth of cotton seedlings under NaCl stress. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 14(1), 1-13.

- Downton, W.J.S., Loveys, B.R., Grant, W.J.R., 1990. Salinity effects on the stomatal-behaviour of grapevine. *New Phytology*, 116, 499-503.
- Dubey, S., Shri, M., Gupta, A., Rani, V., Chakrabarty, D., 2018. Toxicity and detoxification of heavy metals during plant growth and metabolism. *Environ. Chem. Lett.*, 16, 1169–1192.
- Durner, J., Klessig, D.F., 1999. Nitric oxide as a signal in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2, 369–374.
- Fan, H., Guo, S., Jiao, Y., Zhang, R., Li, J., 2007 Effects of exogenous nitric oxide on growth, active oxygen species metabolism, and photosynthetic characteristics in cucumber seedlings under NaCl stress. *Front. Agri. China* 1, 308–314.
- Faustino, F.C., Garcia, R.N., Agtarap, M.L., Mendoza, E.M.T. and Lips, S.H., 2000. Salt tolerance in corn: growth responses, ion accumulation, nitrate reductase and PEP- Carboxylase activities. *Philipp. J. Crop. Sci.*, 25 (1), 17-26.
- Ferrer, M.A., Ros Barcelo, A., 1999. Differential effects of nitric oxide on peroxidase and H₂O₂ production by the xylem of *Zinnia elegans*. *Plant, Cell and Enviroment*, 22, 891-897.
- Garcia Mata, C., Gay, R., Sokolovski, S., Hills A., Lamattina, L., Blatt, M.R., 2003. Nitric oxide regulates K⁺ and Cl⁻ channels in guard cells throught a subset of abscisic acid-evoked signalling pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100, 11116-11121.
- Garcia, I., Maria J., Castellano, Vioque, B., Solano, R., Gotor, C., Romero, L.C., 2010. Mitochondrial beta-cyanoalanine synthase is essential for root hair formation in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Cell*, 22, 3268-3279.
- Garg, B.K., Gupta, I.C., 2011. Salinity tolerance in plants: Methods, mechanisms and management. Scientific Publishers.
- Gould, K.S., Lamotte, O., Klinguer, A., Pugin, A., Wendehenne, D., 2003. Nitric oxide production in tobacco leaf cells: a generalized stress response?. *Plant, Cell and Environment*, 26(11), 1851-1862.
- Graziano, M. and Lamattina, L., 2005. Nitric oxide and iron in plants: an emerging and converging story. *Trends in Plant Science*, 10(1), 4-8.
- Guo, Y., Tian, Z., Yan, D., Zhang, J. and Qin, P., 2009. Effects of nitric oxide on salt stress tolerance in *Kosteletzkya virginica*. *Life Sci. J.*, 6, 67–75.
- Guo, Z., Liang, Y., Yan, J., Yang, E., Li, K., Xu, H., 2018. Physiological response and transcription profiling analysis reveals the role of H₂S in alleviating excess nitrate stress tolerance in tomato roots. *Plant Physiology and Biochemistry*, 124, 59-69.
- Gupta, B., Huang, B., 2014. Mechanism of salinity tolerance in plants: physiological, biochemical, and molecular characterization. *International Journal of Genomics*, 2014, 1-18
- Heldt, H.-W., Piechulla, B., 2011. *Plant Biochemistry*, Translation of the 4th German edition, Elsevier, 32 Jamestown Road, London NW1 7BY, UK.
- Hong, C-Y., Chao, Y-Y., Yang, M-Y., Cho, S-C. ve Kao, C.H., 2009. Na⁺ but not Cl⁻ osmotic stress is involved in NaCl induced expression of glutathione reductase in roots of rice seedlings, *J. Plant Physiol.*, 166, 1598-1606.
- Huang, J., Sommers, E.M., Kim-Shapiro, D.B ve King, S.B., 2002. Horseradish peroxidase catalyzed nitric oxide formation from hydroxyurea. *J. Am. Chem. Soc.*, 124, 3473-3480.

- Hung, K.T. and Kao, C.H., 2003. Nitric oxide counteracts the senescence of rice leaves induced by abscisic acid. *J. Plant Physiol.*, 160(8), 871-879.
- İnal, A., Günes, A., Aktas, M., 1995. Effects of chloride and partial substitution of reduced forms of nitrogen for nitrate in nutrient solution on the nitrate, total nitrogen, and chloride contents of onion. *Journal of Plant Nutrition*, 18(10), 2219-2227.
- Janicka, M., Reda, M., Czyżewska, K., Kabała, K., 2018. Involvement of signalling molecules NO, H₂O₂ and H₂S in modification of plasma membrane proton pump in cucumber roots subjected to salt or low temperature stress. *Functional Plant Biology*, 45(4), 428-439.
- Jin, Z., Shen, J., Qiao, Z., Yang, G., Wang, R., Pei, Y., 2011. Hydrogen sulfide improves drought resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 414(3), 481-486.
- Jing, L.I. U., HOU, Z.H., LIU, G.H., HOU, L.X., Xin, L.I.U., 2012. Hydrogen sulfide may function downstream of nitric oxide in ethylene-induced stomatal closure in *Vicia faba* L. *Journal of Integrative Agriculture*, 11(10), 1644-1653.
- Kalefetoğlu, T., Ekmekçi, Y., 2005. The effect of drought on plant and tolerance mechanisms. *G.Ü. Fen Bil. Derg.*, 18(4), 723-740.
- Kanber, R., Kırdı, C., Tekinel, O., 1992. Sulama suyu niteliği ve sulamada tuzluluk sorunları, Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Genel Yayın No: 21, Ders kitapları Yayın no: 6, Adana.
- Katiyar, S., Dubey, R. S., 1992. Influence of NaCl salinity on behaviours of nitrate reductase and nitrite reductase in rice seedlings differing in salt tolerance. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 169(5), 289-297.
- Kaur, G., Asthir, B., 2017. Molecular responses to drought stress in plants. *Biologia Plantarum*, 61 (2), 201-209.
- Kirkby, E.A., Knight, A.H., 1977. The influence of the level of nitrate nutrition on ion uptake and assimilation, organic acid accumulation and cation anion balance in whole tomato plants. *Plant Physiology*, 60, 349-353.
- Klepper, L., 1979. Nitric oxide (NO) and nitrogen dioxide (NO₂) emissions from herbicide-treated soybean plants. *Atmospheric Environment*, 13(4), 537-542.
- Kolbert, Z., Bartha, B., Erdei, L., 2005. Generation of nitric oxide in roots of *Pisum sativum*, *Triticum aestivum* and *Petroselinum crispum* plants under osmotic and drought stress. *Acta Biologica Szegediensis*, 49(1-2), 13-16.
- Kopyra, M. and Gwozdz, E.A., 2003. Nitric oxide stimulates seed germination and counteracts the inhibitory effect of heavy metals and salinity on root growth of *Lupinus luteus*. *Plant Physiol. Biochem.*, 41, 1011–1017.
- Lamattina, L., Garcia Mata, C., Graziano, M., Pagnussat, G., 2003. Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 54, 109-136.
- Lazalt, A.M., Beligni, M.V. ve Lamattina, L., 1997. Nitric oxide preserves the level of chlorophyll in potato leaves infected by *Phytophthora infestans*. *European Journal of Plant Pathology*, 103, 643-651.
- Leshem, Y.Y., 1996. Nitric oxide in biological systems, *Plant Growth Regulation*, 18,155-169.
- Leshem, Y.Y., Haramaty, E., 1996. Plant aging: the emission of NO and ethylene and effect of NO-releasing compounds on growth of pea (*Pisum sativum*) foliage. *J. Plant Physiol.*, 148, 258-263.

- Leshem, Y.Y., Wills, R., KU, V., 2000. Applications of nitric oxide (NO) for postharvest control. In: IV International Conference on Postharvest Science 553, 571-576.
- Li, L., Rose, P., Moore, P.K., 2011. Hydrogen sulfide and cell signaling, in: A.K. Cho (Ed.), *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 51, 169-187.
- Liang, Y., Zheng, P., Li, S., Li, K.Z., Xu, H.N., 2018. Nitrate reductase-dependent NO production is involved in H₂S-induced nitrate stress tolerance in tomato via activation of antioxidant enzymes. *Scientia Horticulturae*, 229, 207-214.
- Lin, Y.T., Li, M.Y., Cui, W.T., Lu, W., Shen, W.B., 2012. Haem oxygenase-1 is involved in hydrogen sulfide-induced cucumber adventitious root formation. *J Plant Growth Regul.*, 31, 519-528.
- Lutts, S., Kinet, J.M. and Bouharmont, J., 1996. NaCl induced senescence in leaves of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance, *Annals of Botany*, 78, 389-398.
- Mahajan, S. and Tuteja, N., 2005. Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 444, 139-158.
- Mancardi, D., Penna, C., Merlino, A., DelSoldato, P., Wink, D.A., Pagliaro, P., 2009. Physiological and pharmacological features of the novel gasotransmitter: hydrogensulfide. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1787, 864-872.
- Mangal, J.L., Lal, S., 1990. Salt tolerance behavior of Khorif onion variety N.53. *Hort. Abst.*, 53:5129.
- Molazem, D., Qurbanov, E.M. and Duniyaliyev, S.A., 2010. Role of proline, Na and chlorophyll content in salt tolerance of corn (*Zea mays* L.). *American-Eurasian J. Agric. Environ. Sci.*, 9 (3), 319-324.
- Mostofa, M.G., Rahman, A., Ansary, M.M.U., Watanabe, A., Fujita, M., Tran, L.S., 2015. Hydrogensulfide modulates cadmium-induced physiological and biochemical responses to alleviate cadmium toxicity in rice. *Sci. Rep.*, 5, 1-17.
- Mostofa, M.G., Saegusa, D., Fujita, M., Tran, L.S.P., 2015. Hydrogen sulfide regulates salt tolerance in rice by maintaining Na⁺/K⁺ balance, mineral homeostasis and oxidative metabolism under excessive salt stress. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1055.
- Munns, R., James, R. A., Lauchli, A., 2006. Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. *J. Exp. Bot.*, 57, 1025-1043.
- Mustafa, A.K., Gadalla, M.M., Sen, N., Kim, S., Mu, W., Gazi, S.K., Barrow, R.K., Yang, G., Wang, R., Snyder, S.H., 2009. H₂S signals through protein S-sulfhydration. *Sci. Signal.*, 2(96), ra72.
- Mutlu, S., Atıcı, Ö., 2013. Alleviation of high salt toxicity-induced oxidative damage by salicylic acid pretreatment in two wheat cultivars. *Toxicology and Industrial Health*, 29(1), 89-96.
- Neill, S.J., Desikan, R., Hancock, J.T., 2003. Nitric oxide signalling in plants. *New Phytologist*, 159, 11-35.
- Papenbrock, J., Riemenschneider, A., Kamp, A., Schulz-Vogt, H.N., Schmidt, A., 2007. Characterization of cysteine-degrading and H₂S-releasing enzymes of higher plants-from the field to the test tube and back. *Plant Biol.*, 9, 582-588.
- Parida, A.K., Das, A.B., 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60, 324-349.

- Parvaiz, A., Satyawati, S. 2008. Salt stress and phytochemical responses of *Planta* Review. *Plant Soil Environment*, 54(3), 89-99.
- Praveen, A., Pandey, A., Gupta, M., 2019. Nitric oxide alters nitrogen metabolism and PIN gene expressions by playing protective role in arsenic challenged *Brassica juncea* L. *Ecotoxicology and environmental safety*, 176, 95-107.
- Pryor, W.A., Squadrito, G.L., 1995. The chemistry of preoxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide? *American Journal of Physiology*, 268, 699-700.
- Reigosa, M.J., Pedrol, N., Luís González, L. 2006. Allelopathy: A physiological process with ecological implications, Springer. Printed in the Netherlands.
- Ribeiro, E.A., Cunha, F.Q., Tamashiro, W.M.S.C. ve Martins, I.S., 1999. Growth phase-dependent subcellular localization of nitric oxide syntase in maize cells. *FEBS Letters*, 445, 283-286.
- Rockel, P., Strube, F., Rockel, A., Wildt, J. Ve Kaiser, W.M., 2002. Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase in vivo and in vitro, *J. Exp. Bot.*, 53, 103-110.
- Ruiz, D., Martinez, V., Cerdá, A., 1999. Demarcating specific ion (NaCl, Cl⁻, Na⁺) and osmotic effects in the response of two citrus rootstocks to salinity. *Scientia Horticulturae*, 80(3), 213-224.
- Sairam, R.K., Srivastava, G.C., 2002. Changes in antioxidant activity in subcellular fractions of tolerant and susceptible wheat genotypes in responses to long term salt stress, *Plant Science*, 162, 897-904.
- Sangwan, P., Kumar, V., Joshi, U.N., 2014. Effect of chromium (VI) toxicity on enzymes of nitrogen metabolism in clusterbean (*Cyamopsis tetragonoloba* L.). *Hindawi Publishing Corporation Enzyme Research*, 1, 1-9.
- Sedjati, S., Santosa, G.W., Yudiati, E., Supriyanti, E., Ridlo, A., Kimberly, F.D., 2019. Chlorophyll and Carotenoid Content of *Dunaliella salina* at Various Salinity Stress and Harvesting Time. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, Volume 246, Number 1.
- Sekmen, H., Demiral, T., Tosun, N., Türküsay, H., Türkan, İ., 2005. Tuz stresi uygulanan domates bitkilerinin bazı fizyolojik özellikleri ve toplam protein miktarı üzerine bitki aktivatörünün etkisi. *Ege Üniversitesi. Ziraat Fakültesi Dergisi*, 421, 85-95.
- Selçukcan, Ç., 2005. Ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) bitkisinde senesens ile nitrik oksit arasındaki ilişkinin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Şen, A., 2005. Buğday (*Triticum aestivum*) doku kültüründe tuz stresinin etkileri. *İstanbul Üni. Fen Bil. Ens.*, T-467/25062004.
- Shi, H., Ye, T., Chan, Z., 2013. Exogenous application of hydrosulfide donor sodium hydrosulfide enhanced multiple abiotic stress tolerance in Bermuda grass (*Cynodon dactylon* (L). Pers.). *Plant Physiol. Biochem.*, 71, 226-234.
- Siddiqui, M.H, Khan, M.N, Mohammad, F. and Khan, M.M.A., 2008. Role of nitrogen and gibberellic acid (GA3) in the regulation of enzyme activities and in osmoprotectant accumulation in *Brassica juncea* L. under salt stress. *J. Agron. Crop Sci.*, 194, 214-224.
- Siegel, S.M., Siegel, B.Z., Massey J., Lahne, P., Chen, J., 1980. Growth of corn in saline waters. *Physiologia Plant.*, 50, 71-73.

- Silveira, J.A.G., Cardoso, B.B., Melo, A.R.B., Viegas, R.A., 1999. Salt-induced decrease in nitrate uptake and assimilation in cowpea plants. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 11 (2), 77-82.
- Sivritepe, N., Eriş, A., 1999. Determination of salt tolerance in some grapevine cultivars (*Vitis vinifera* L.) under *in vitro* conditions, *Tr. J. Biology*, 23, 473-485.
- Song, J., Shi, G., Xing, S., Chen, M., Wang, B., 2009. Effects of nitric oxide and nitrogen on seedling emergence, ion accumulation, and seedling growth under salinity in the euhalophyte *Suaeda salsa*. *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, 172, 544–549.
- Stöhr, C., Ullrich, W.R., 2002. Generation and possible roles of NO in plant roots and their apoplastic space. *Journal of Experimental Botany*, 53(379), 2293-2303.
- Sun, J., Wang, R., Zhang, X., Yu, Y., Zhao, R., Li, Z., Chen, S., 2013. Hydrogen sulfide alleviates cadmium toxicity through regulations of cadmium transport across the plasma and vacuolar membranes in *Populus euphratica* cells. *Plant Physiology and Biochemistry*, 65, 67-74.
- Taiz, L. Zeiger, E., Moller, I.M., Murphy, A., 2015. *Plant Physiology and Development*. 6th Edition, Sinauer Associates, Sunderland, CT.
- Tan M., Koç A., 1999. Sun'î Çayır Tesisinde Kullanılabilecek Uygun Yem bitkileri ve Karışımlarının Belirlenmesi. *Tr. J. Agriculture and Forestry*, 22, 13-20.
- Termaat, A., Munns, R., 1986. Use of concentrated macronutrient solutions to separate osmotic from NaCl-specific effects on plant growth. *Aust. J. Plant Physiol.*, 13, 509- 522.
- Türkmen, Ö., Şensoy, S., Erdal, İ., 2000. Effect of potassium on emergence and seedling growth of cucumber grown in salty conditions. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 10(1), 113-117.
- Uchida, A., Jagendorf, A. T, Hibino, T., Takabe, T., Takabe, T., 2002. Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice. *Plant Sci.*, 163, 515-523.
- Wahab, A.A., Zahran, H.H., 1981. Effects of salt stress on nitrogenase activity and growth of four legumes. *Biología Plantarum*, 23(1), 16.
- Wang, B.L., Shi, L., Li, Y.X., Zhang, W.H., 2010. Boron toxicity is alleviated by hydrogen sulfide in cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings. *Planta*, 231, 1301–1309.
- Wang, H., Zhang, M., Guo, R., Shi, D., Liu, B., Lin, X., Yang, C., 2012. Effects of salt stress on ion balance and nitrogen metabolism of old and young leaves in rice (*Oryza sativa* L.). *BMC Plant Biology*, 12(1), 194.
- Wang, R., 2008. H₂S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase. *Science*, 322, 587–590.
- Wang, R., 2012. Physiological implications of hydrogen sulfide: A whiff exploration that blossomed. *Physiol. Rev.*, 92, 791–896.
- Wang, Y., Li, L., Cui, W., Xu, S., Shen, W., Wang, R. 2012. Hydrogen sulfide enhances alfalfa (*Medicago sativa*) tolerance against salinity during seed germination by nitric oxide pathway. *Plant Soil.*, 351, 107–119.
- Wendehenne, D., Durner, J., Klessig, D.F., 2004. Nitric oxide: a new player in plant signalling and defence responses. *Current opinion in plant biology*, 7(4), 449-455.

- Wildt, J., Kley, D., Rockel, A., Rockel, P., Segschneider, H.J., 1997. Emission of NO from several higher plant species. *Journal of Geophysical Research Atmospheres*, 102(5), 5919-5927.
- Win, K.T., Oo, A.Z., 2017. Salt-stress-induced changes in protein profiles in two blackgram (*Vigna Mungo* L.) varieties differing salinity tolerance. *Adv. Plants Agric. Res.*, 7(1), 206-210.
- Wojtaszek, P., 2000. Nitric oxide in plants: to NO or not to NO, *Phytochemistry*, 54(1), 1-4.
- Yamasaki, H., Sakihama, Y., 2000. Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase: in vitro evidence for the NR-dependent formation. *FEBS Lett.*, 468, 89-92.
- Ye, S.C., Hu, L.Y., Hu, K.D., Li, Y.H., Yan, H., Zhang, X.Q., Zhang, H., 2015. Hydrogen sulfide stimulates wheat grain germination and counteracts the effect of oxidative damage caused by salinity stress. *Cereal Research Communications*, 43(2), 213-224.
- Yu-qing, W., Zhu-jun, Z., Yong, H.E., 2007. Alleviation of membrane lipid peroxidation by nitric oxide in cucumber leaves under salt stress. *J. Zhejiang Uni. Agric. Life Sci.*, 33, 533-538.
- Zhang, H., Tan, Z.Q., Hu, L.Y., Wang, S.H., Luo, J.P., Jones, R.L., 2010a. Hydrogen sulfide alleviates aluminum toxicity in germinating wheat seedlings. *J. Integr. Plant Biol.*, 52, 556-567.
- Zhang, H., Hu, L.Y., Hu, K.D., He, Y.D., Wang, S.H., Luo, J.P., 2008. Hydrogen sulfide promotes wheat seed germination and alleviates oxidative damage against copper stress. *J. Integr. Plant Biol.*, 50, 1518-1529.
- Zhang, H., Hu, S.L., Zhang, Z.J., Hu, L.Y., Jiang, C.X., Wei, Z.J., Jiang, S.T., 2011. Hydrogen sulfide acts as a regulator of flower senescence in plants. *Postharvest Biology and Technology*, 60(3), 251-257.
- Zhang, H., Jiao, H., Jiang, C.X., Wang, S.H., Wei, Z.J., Luo, J.P., Jones, R.L., 2010b. Hydrogen sulfide protects soybean seedlings against drought-induced oxidative stress. *Acta Physiol. Plant.*, 32, 849-857.
- Zhang, H., Ye, Y.K., Wang, S.H., Luo, J.P., Tang, J., Ma, D.F., 2009. Hydrogen sulfide counteracts chlorophyll loss in sweet potato seedling leaves and alleviates oxidative damage against osmotic stress. *Plant Growth Regul.*, 58, 243-250.
- Zhang, Y., Wang, L., Liu, Y., Zhang, Q., Wei, Q., Zhang, W., 2006. Nitric oxide enhances salt tolerance in maize seedlings through increasing activities of proton-pump and Na^+/H^+ antiport in the tonoplast. *Planta*, 224, 545-555.
- Zheng, C., Jiang, D., Dai, T., Jing, Q., Cao, W., 2010. Effects nitroprusside, a nitric oxide donor, on carbon and nitrogen metabolism and the activity of the antioxidation system in wheat seedlings under salt stress. *Acta Ecol. Sinica.*, 30, 1174-1183.
- Zheng, C., Jiang, D., Liu, F., Dai, T., Liu, W., Jing, Q., Cao, W., 2009. Exogenous nitric oxide improves seed germination in wheat against mitochondrial oxidative damage induced by high salinity. *Environmental and Experimental Botany*, 67(1), 222-227.
- Zhou, S. F., Chen, X.Y., Xue, X.N., Zhang, X.G., Li, Y.X., 2007. Physiological and growth responses of tomato progenies harboring the betaine aldehyde

dehydrogenase gene to salt stress. *Journal of Integrative Plant Biology*, 49(5), 628-637.

Zou, H., Zhang, N.N., Pan, Q., Zhang, J.H., Chen, J., Wei, G.H., 2019. Hydrogen Sulfide Promotes Nodulation and Nitrogen Fixation in Soybean–Rhizobia Symbiotic System. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, bioRxiv: 367896.



ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Ankara’da doğdu. Lise öğrenimini Yozgat’da tamamladı. 2010 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünden 2015’de Biyolog olarak mezun oldu. Aynı yıl içerisinde başladığı Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans öğrenimine devam etmektedir.

