



Yüzüncü Yıl Üniversitesi
Tarım Bilimleri Dergisi
(YYU Journal of Agricultural Science)

<http://dergipark.gov.tr/yyutbd>



Araştırma Makalesi (Research Article)

Tuz Stresi Altındaki Mısır Bitkilerinde Eksojen Askorbik Asit Uygulamasının Etkileri

Ali DOĞRU^{1*}, Ebru TORLAK²

^{1,2}Sakarya Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Sakarya, Türkiye

¹<https://orcid.org/0000-0003-0060-4691> ²<https://orcid.org/0000-0002-9871-0072>

*Sorumlu yazar e-posta: adogru@sakarya.edu.tr

Makale Bilgileri

Geliş: 21.04.2020

Kabul: 04.09.2020

Online Yayınlanma 31.12.2020

DOI: 10.29133/yyutbd.724730

Anahtar kelimeler

Antioksidan enzim,
Askorbik asit,
Mısır,
Tuz toleransı,
Zea mays.

Öz: Tuz stresi (50 mM NaCl) altındaki mısır (*Zea mays* L.) genotipinde (ADA9510) eksojen askorbik asit uygulamasının temel antioksidan enzimler, fotosentetik pigment miktarı, hidrojen peroksit ve malondialdehit üzerine etkileri araştırılmıştır. Tuz stresi klorofil a, klorofil b, toplam klorofil ve toplam karotenoid miktarı ile süperoksit dismutaz, askorbat peroksidaz ve glutatyon redüktaz aktivitesini azaltmıştır. Ancak malondialdehit ve hidrojen peroksit miktarını artırmıştır. Bu sonuçlar tuz stresinin mısır yapraklarında oksidatif strese ve fotosentetik pigmentlerin parçalanmasına neden olduğunu göstermektedir. Ancak eksojen askorbik asit uygulaması klorofil a ve toplam klorofil miktarını artırmış, antioksidan enzimlerin aktivitelerini, malondialdehit ve hidrojen peroksit miktarını azaltmıştır. Bu değişimler eksojen olarak uygulanan askorbik asidin oksidatif stresle direkt olarak etkileşime girdiğini göstermektedir. Sonuç olarak, eksojen askorbik asit uygulamasının tuz stresi altındaki mısır bitkilerinde tuz toleransını geliştirdiği söylenebilir.

Effects of Exogenous Ascorbic Acid Application in Maize Plants under Salt Stress

Article Info

Received: 21.04.2020

Accepted: 04.09.2020

Online Published 31.12.2020

DOI: 10.29133/yyutbd.724730

Keywords

Antioxidant enzyme,
Ascorbic acid,
Maize,
Salt tolerance,
Zea mays.

Abstract: The effects of the exogenous ascorbic acid application on major antioxidant enzymes, photosynthetic pigment content, malondialdehyde and hydrogen peroxide were investigated in salt-stressed (50 mM NaCl) maize genotype (ADA9510). Salt stress significantly decreased chlorophyll a, chlorophyll b, total chlorophyll and total carotenoid content and the activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase and glutathione reductase. Conversely, malondialdehyde and hydrogen peroxide contents were increased by salt stress. These results showed that salinity led to the oxidative stress and destruction of photosynthetic pigments in maize leaves. Ascorbic acid application, on the other hand, caused to the increased chlorophyll a and the total chlorophyll content, decreased level of antioxidant enzymes, malondialdehyde and hydrogen peroxide content. This kind of changes may indicate that the exogenous ascorbic acid counteract the oxidative stress directly. Thus, it may be concluded that the exogenous ascorbic acid application improves salt tolerance in maize plants under salt stress.

1. Giriş

Tuz stresi kurak ve yarı-kurak bölgelerde bitki büyüme ve gelişmesini kısıtlayan tarımsal bir problemdir. Munns ve Tester (2008), yeryüzünde yaklaşık 45 milyon hektarlık bir alanın tuz stresinden

etkilendiğini ve her yıl yaklaşık 1,5 milyon hektarlık alanın da topraktaki tuz birikiminden dolayı tarımsal amaçlar doğrultusunda kullanılamaz duruma geldiğini rapor etmiştir. Tuz stresi bitkilerde fizyolojik kuraklığa, spesifik iyon toksisitesine, mineral madde beslenmesinde bozulmalara, oksidatif strese, membranlarda yapısal ve fonksiyonel bozulmalara, hücre bölünmesinde inhibisyona ve genotoksositeye neden olabilmektedir (Hasegawa ve ark., 2000; Munns, 2002; Zhu, 2007; Uzal ve Yıldız, 2013; Fidan ve Ekinçialp, 2017; Kıpçak ve ark., 2019). Bunun dışında tuz stresine maruz kalan bitkilerde fotosentez, protein sentezi, enerji ve lipid metabolizması gibi temel fizyolojik olaylar da olumsuz yönde etkilenebilmektedir (Parida ve Das, 2005). Tuz stresine maruz kalan bitkilerde başlangıçta fizyolojik kuraklık ve bunun devamında yaprak genişlemesinde bir yavaşlama gözlenmektedir. Tuz stresinin ozmotik etkisi olarak bilinen bu durum, bitkilerin tuz stresine maruz kaldıkları süre boyunca etkisini sürdürmekte, hücre bölünmesinin inhibisyonu ile stomaların kapanmasına yol açmaktadır (Munns, 2002; Flowers, 2004). Tuz stresine uzun süre maruz kalan bitkilerde ortaya çıkan iyon toksisitesi ise olgun yaprakların erken senesense uğraması ile birlikte fotosentetik aktivitenin azalmasına neden olmaktadır (Cramer ve Nowak, 1992). Bitki hücrelerinde sodyum ve klor iyonlarının yüksek konsantrasyonlarda birikim göstermesi enzim aktivitelerinin inhibisyonu, hücrelerin şişmesi ve enerji üretiminin azalması ile sonuçlanmaktadır (Doğru ve Canavar, 2020).

Bitkilerde tuz toleransının indüksiyonu ekonomik açıdan oldukça önemlidir. Geleneksel seleksiyon ve ıslah teknikleri kullanılarak bitkilerde tuz toleransının geliştirilmesi konusunda kayda değer ilerlemeler sağlanmıştır (Noble ve ark., 1984; Shannon, 1998; Ashraf, 2002). Seleksiyon prosedürlerinin çoğu verim, bitki boyu, canlılığın sürdürülmesi, yaprak alanı, yaprak hasarı ve nispi büyüme hızı gibi tarımsal karakterlere dayanmaktadır (He ve Cramer, 1992; Noble ve Rogers, 1992; Cramer ve ark., 1993; Franco ve ark., 1993; Munns, 1993). Ancak Yeo (1994) fizyolojik kriterlerin tarımsal kriterlerle karşılaştırıldığında daha objektif bilgiler sağlayabileceğini, Munns (1993) ise bitkilerde tuz toleransının geliştirilmesinin sadece ilgili genlerin karakterizasyonu ile mümkün olabileceğini ileri sürmüştür. Bazı araştırmacılar da bitki, doku ve hücre seviyesinde tuz toleransı ile ilgili ayırt edici belirteçlerin bulunması durumunda başarılı bir seleksiyon yapılabileceğini bildirmişlerdir (Ashraf, 2002; Munns, 2002). Ancak tarımsal bitkilerde tuz toleransının geliştirilebilmesi için bitki ıslahçıları tarafından kullanılabilir belirteç özellikler tam olarak tanımlanamamıştır. Bu durum kısmen tuz tolerans mekanizmasının oldukça karmaşık olmasından kısmen de tuz toleransı bakımından mevcut varyasyonların sadece türler arasında değil aynı zamanda aynı türün farklı çeşitleri arasında bile bulunmasından kaynaklanmaktadır (Ashraf, 2002; Doğru ve Yılmaz Kaçar, 2019).

Günümüzde tuz stresinin bitkiler üzerinde neden olduğu olumsuz etkilerin azaltılması amacıyla askorbik asit gibi enzimatik olmayan antioksidan moleküllerin uygulanması alternatif bir yol olarak değerlendirilmektedir (Khan ve ark., 2006). Askorbik asit bütün bitkilerde bulunur ve birçok tarımsal bitki türünde tuz stresinin büyüme ve gelişme üzerindeki olumsuz etkisini azaltma konusunda önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (Hamada, 1998). Genel olarak askorbik asidin bitkilerde tuz stresinin olumsuz etkilerini iyileştirmesi konusundaki rolü bazı enzimatik reaksiyonları aktive etmesine bağlanmaktadır (İrfan ve ark., 2019). Bunun dışında askorbik asidin fotosentetik pigmentleri ve fotosentetik aygıtı oksidatif stresin olumsuz etkilerinden koruduğu ve stabilizasyonunu sağladığı da bilinmektedir (Hamada, 1998).

Bu bilgiler ışığında bu çalışmanın amacı tuz stresi altındaki mısır bitkilerinde kök yoluyla uygulanan askorbik asidin antioksidan kapasite ve fotosentetik pigment metabolizması üzerindeki etkilerinin araştırılmasıdır.

2. Materyal ve Yöntem

Bu çalışmada bitki materyali olarak mısır (*Zea mays* L.) bitkisinin tescilli ve sertifikalı bir çeşidi olan ADA9510 kullanılmıştır. Tohumlar ıslahçı kurum olan Sakarya Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nden temin edilmiştir. ADA9510 at dişi tane yapısına sahip, orta-geççi (125-130 gün), tane verimi 1250-1550 kg da⁻¹, silaj verimi 8-9 ton da⁻¹ olan ulusal bir mısır çeşididir. Tuz toleransı hakkında bir bilgi yoktur.

2.1. Büyüme koşulları ve deneysel plan

Eşit büyüklükte ve sağlam olan tohumlar seçilerek cam petri kaplarında bidistile su ile ıslatılmış kurutma kağıtları arasına yerleştirilmiştir. Petri kapları 24 °C ve %40-50 oransal neme sahip olan iklim dolabında karanlık ortamda çimlenmeye bırakılmıştır. Üç gün sonra birörnek fideler perlit ve ½ oranında sulandırılmış Hoagland besin çözeltisi içeren saksılara aktarılarak 25/18 °C sıcaklık (gündüz/gece), 16/8 saat fotoperiyot (gündüz/gece), %50±5 oransal nem ve 200 µmol foton m⁻² s⁻¹ ışık şiddetine sahip iklim dolabına yerleştirilmiştir. On günlük olan bitkiler dört gruba ayrılmıştır. Birinci grupta bulunan kontrol bitkileri çalışmanın sonuna kadar ½ oranında sulandırılmış Hoagland besin çözeltisi ile sulanırken; ikinci gruptaki bitkilere tuz (50 mM NaCl) stresi, üçüncü gruptaki bitkilere Hoagland besin çözeltisine karıştırılarak askorbik asit (ASA; 100 ppm), dördüncü gruptaki bitkilere ise tuz stresi ile birlikte askorbik asit uygulaması (50 mM NaCl+100 ppm ASA) yapılmıştır. Yapılan ön çalışmalarda 50 mM'lık NaCl konsantrasyonu kullanılan mısır çeşidinde büyümeyi belirli derecede inhibe eden ancak ölüme neden olmayan tuz konsantrasyonu, 100 ppm'lik ASA konsantrasyonu ise büyümeyi olumlu yönde etkileyen konsantrasyon olarak belirlenmiştir. 3-4 yapraklı evreye ulaşan bitkiler hasat edilerek yapraklar analizlere kadar -80 °C'de muhafaza edilmiştir.

2.2. Fotosentetik pigment analizi

Fotosentetik pigment ekstraksiyonu yaprak parçacıkları kullanılarak %100'lük aseton içerisinde yapılmıştır. Özütler 10 000 g ve 4 °C'de 10 dk santrifüj edildikten sonra absorbans değerleri Shimadzu mini 1240 UV visible spektrofotometre kullanılarak 470, 644.8 ve 661.6 nm'de ölçülmüştür. Klorofil a, klorofil b, toplam klorofil ve toplam karotenoid miktarları Lichtenthaler (1987)'ye göre mg g⁻¹ taze ağırlık olarak hesaplanmıştır.

2.3. Malondialdehit (MDA) ve hidrojen peroksit (H₂O₂) analizi

MDA ve H₂O₂ miktarı sırasıyla Heath ve Packer (1968) ve Ohkawa ve ark. (1979)'a göre belirlenmiştir. Taze yaprak materyali (0.1 g) 6 ml %5'lik TCA (trikloro asetik asit) ile homojenize edildikten sonra 10 000g'de 15 dk santrifüjlenmiş ve üst fazlar toplanmıştır. 0.5 ml üst faz, 0.5 ml 0.1 M Tris-HCl (pH 7.6) ve 1 ml TCA-TBA (tiobarbitürik asit) ile karıştırılmış ve bir saat boyunca 95 °C sıcaklığındaki sıcak su banyosunda bekletildikten sonra buz banyosunda hızla soğutulmuştur. 10 000 g'de 5 dklık santrifüjden sonra üst fazların absorpsiyonu spektrofotometre yardımıyla 532 ve 600 nm'de belirlenmiştir. MDA miktarı ekstinksiyon katsayısı (155 mM⁻¹ cm⁻¹) kullanılarak nmol g⁻¹ taze ağırlık olarak hesaplanmıştır. H₂O₂ miktarının belirlenmesi için 0.5 ml üst faz ile 0.5 ml 0.1 M Tris-HCl (pH 7.6) ve 1 ml 1 M KI karıştırılmış ve karışımın absorbans değeri 90 dk sonra 390 nm'de ölçülmüştür. H₂O₂ miktarı standart grafik yardımıyla nmol g⁻¹ taze ağırlık olarak hesaplanmıştır.

2.4. Antioksidan enzim aktivitelerinin belirlenmesi

Yaprak örneklerinin protein konsantrasyonları, Bradford metoduna (Bradford, 1976) göre sığır serum albümini (BSA) standardı kullanılarak belirlenmiştir.

Toplam süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi Beyer and Fridovich (1987)'e göre belirlenmiştir. Yaklaşık 0.3 g taze yaprak dokusu, sıvı azotla öğütülmüş ve 1.5 ml, 100 mM K-PO₄ (pH 7.0), %2'lik polivinilpirolidon (PVP) ve 1 mM Na₂EDTA içeren ekstraksiyon çözeltisi ile homojenize edilmiştir. Homojenat, 14 000 g ve 4 °C'de 20 dk santrifüj edilmiştir. Son hacim 1030 µl olacak şekilde 100 mM K-PO₄ tamponu (pH 7.8), 9.9x10⁻³ M metionin, 5.7x10⁻⁵ M nitroblue tetrazolyum (NBT), %1'lik triton-X-100 ve enzim karışımından oluşan bir reaksiyon çözeltisi hazırlanmıştır. Reaksiyon 0.9 µM riboflavin ilavesi ile başlatılmış, bu karışım 15 dk boyunca 375 µmol m⁻² s⁻¹ şiddetinde ışığa maruz bırakıldıktan sonra 560 nm'de absorbans değerleri belirlenmiştir. Toplam SOD aktivitesi daha önce hazırlanmış olan standart grafikten faydalanarak hesaplanmıştır (U mg protein⁻¹).

Toplam askorbat peroksidaz (APOD) aktivitesi Wang ve ark. (1991)'a göre belirlenmiştir. Yaklaşık 0.3 g taze yaprak dokusu, sıvı azotla öğütülmüş ve 1.5 ml, 50 mM Tris-HCl (pH 7.2), %2'lik PVP, 1 mM Na₂EDTA ve 2 mM askorbat içeren ekstraksiyon çözeltisi ile homojenize edilmiştir. Homojenat, 12 000 rpm ve 4 °C'de 20 dk santrifüj edilmiştir. Son hacim 1000 µl olacak şekilde 50 mM

K-PO₄ tamponu (pH 6.6), 2.5 mM askorbat, 10 mM H₂O₂ ve 100 µg protein içeren enzim karışımından oluşan reaksiyon çözeltisi hazırlanmıştır. Reaksiyon, H₂O₂'nin eklenmesiyle başlatılmıştır. Askorbat konsantrasyonundaki azalma, spektrofotometrede 290 nm'de yapılan okumalarla enzim özütü içermeyen reaksiyon çözeltisine karşılık kaydedilmiştir. Enzim aktivitesi, askorbatın ekstinksiyon katsayısı kullanılarak reaksiyonun başlangıç hızından hesaplanmıştır (nmol askorbat dk⁻¹mg protein⁻¹).

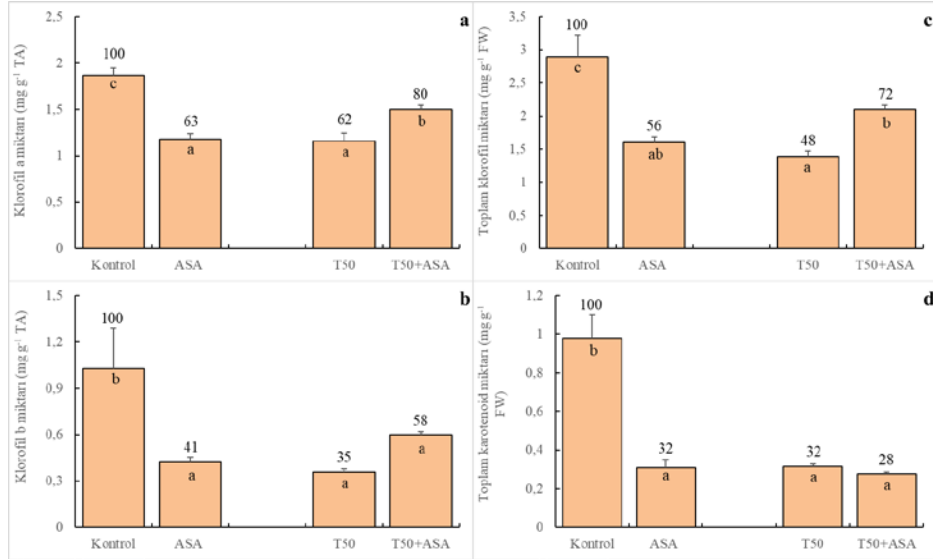
Toplam glutatyon redüktaz (GR) aktivitesi Sgherri ve ark. (1994)'e göre belirlenmiştir. Yaklaşık 0.3 g taze yaprak dokusu, sıvı azotla öğütölmüş ve 1.5 ml, 100 mM K-PO₄ (pH 7.0), %2'lik PVP ve 1 mM Na₂EDTA içeren ekstraksiyon çözeltisi ile homojenize edilmiştir. Homojenat, 14 000 rpm ve 4 °C'de 20 dk santrifüj edilmiştir. Son hacim 1000 µl olacak şekilde 100 mM K-PO₄ tamponu (pH 7.8), 2 mM Na₂EDTA, 0.5 mM okside glutatyon (GSSG), 0.2 mM NADPH ve 100 µg protein içeren enzim karışımından oluşan reaksiyon çözeltisi hazırlanmıştır. Reaksiyon, NADPH'nin eklenmesiyle başlatılmıştır. Enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak 340 nm'de yapılan okumalarla ölçölmüştür. Düzeltme, NADPH yokluğunda GSSG oksidasyonu ile yapılmıştır. Enzim aktivitesi, NADPH'nin ekstinksiyon katsayısı kullanılarak reaksiyonun başlangıç hızından hesaplanmıştır (nmol NADPH dk⁻¹mg protein⁻¹).

2.5. İstatistik analizler

Elde edilen verilerin aritmetik ortalama ve standart hataları hesaplanmış, daha sonra veriler SPSS 22.0 paket programı kullanılarak, istatistiki varyans analizi (ANOVA) uygulanmıştır. Her bir bağımsız değişken için uygulamaların kontrole göre neden olduğu farkın önem kontrolü (Anlamlı Önemli Fark; AÖF) %5 düzeyinde Duncan testi ile hesaplanmıştır.

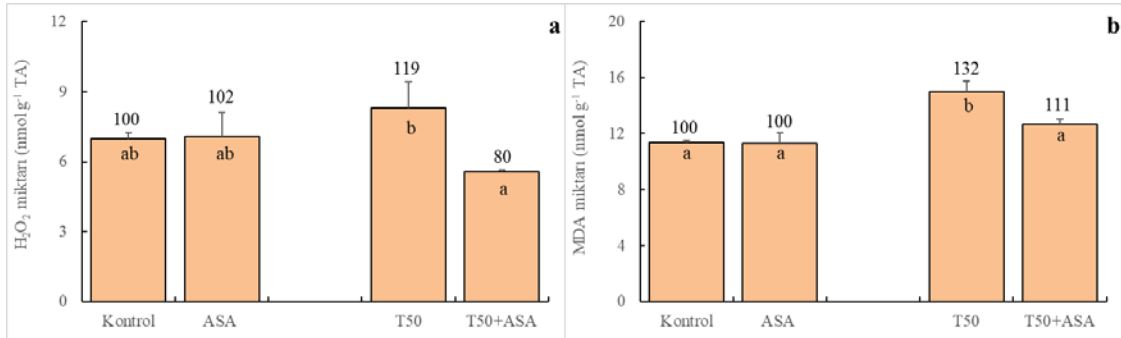
3. Bulgular

Tuz stresi (50 mM NaCl) ve ASA (100 ppm) uygulamalarının mısır bitkilerinde fotosentetik pigment miktarı üzerindeki etkileri şekil 1'de verilmiştir. Buna göre kök yoluyla gerçekleştirilen askorbik asit uygulaması yapraklardaki klorofil a miktarını kontrol bitkileriyle karşılaştırıldığında %37, tuz stresi ise %38 oranında azaltmıştır (P<0.05) (Şekil 1a). Tuz stresi altındaki mısır bitkilerine yapılan askorbik asit uygulaması ise klorofil a miktarını sadece tuz stresi uygulanan bitkilere göre %18 oranında artırmıştır (P<0.05). Yapraklardaki klorofil b miktarında meydana gelen değişimlerin de klorofil a miktarına benzer olduğu gözlenmiştir. Yapraklardaki klorofil b miktarı askorbik asit uygulaması sonucunda kontrole göre %59, tuz stresi uygulaması sonucunda ise %65 oranında azalmıştır (Şekil 1b). Bu değişimlerin kontrole göre istatistiksel anlamda farklı olduğu belirlenmiştir (P<0.05). Tuz stresi altındaki mısır bitkilerine yapılan askorbik asit uygulaması ise, sadece tuz stresi uygulanan bitkilerle karşılaştırıldığında klorofil b miktarının %18 oranında artmasına yol açmıştır. Ancak bu değişim istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır (P>0.05). Mısır yapraklarındaki toplam klorofil miktarı askorbik asit uygulaması sonucunda kontrole göre %44, tuz uygulaması sonucunda ise %52 oranında azalmıştır (P<0.05) (Şekil 1c). Tuz stresi altındaki bitkilerde ise askorbik asit uygulaması toplam klorofil miktarını, sadece tuz stresi altındaki bitkilerle karşılaştırıldığında %24 oranında artırmış ve bu artış istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (P<0.05). Askorbik asit ve tuz stresi uygulamaları mısır yapraklarındaki toplam karotenoid miktarını kontrol bitkileriyle karşılaştırıldığında %68 oranında ve istatistiksel olarak belirgin derecede azaltmıştır (P<0.05) (Şekil 1d). Ancak askorbik asit uygulaması tuz stresi altındaki mısır yapraklarındaki toplam karotenoid miktarını sadece tuz stresi altındaki bitkilerle karşılaştırıldığında %4 oranında azaltmış, ancak bu değişim istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır (P>0.05).



Şekil 1. Kök yoluyla uygulanan askorbik asidin (100 ppm) tuz stresi (50 mM NaCl) altındaki mısır yapraklarındaki (a) klorofil a, (b) klorofil b, (c) toplam klorofil ve (d) toplam karotenoid miktarı üzerine etkisi (Barların içindeki farklı harfler uygulamalar arasındaki farkın Duncan testine göre P=0.05 seviyesinde farklı olduğunu, barların üzerindeki rakamlar ise kontrole göre değişimi % olarak göstermektedir, kontrol=100; ASA: askorbik asit; T: tuz).

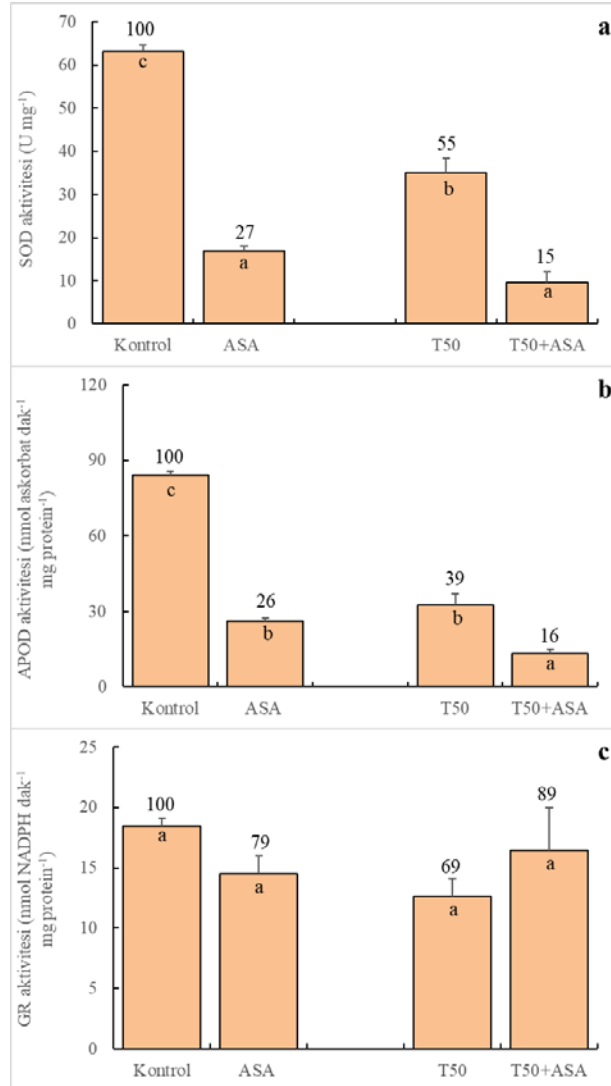
Askorbik asit ve tuz stresi uygulamaları mısır yapraklarındaki H₂O₂ miktarını kontrolle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak etkilememiştir (P>0.05) (Şekil 2a). Ancak H₂O₂ miktarı askorbik asit uygulanan bitkilerde kontrole göre %2, tuz uygulanan bitkilerde ise %19 oranında artmıştır. Ancak tuz stresi altındaki mısır bitkilerine yapılan askorbik asit uygulaması yaprak dokularındaki H₂O₂ miktarını, sadece tuz stresi altındaki bitkilere göre %39 oranında ve önemli derecede azaltmıştır (P<0.05). Benzer şekilde askorbik asit uygulaması mısır yapraklarındaki MDA miktarını kontrole göre etkilememiş (P>0.05), ancak tuz stresi uygulanan bitkilerin yapraklarında %32 oranında ve istatistiksel olarak önemli derecede artırmıştır (P<0.05) (Şekil 2b). Tuz stresi altındaki mısır bitkilerine yapılan askorbik asit uygulaması ise yapraklardaki MDA miktarını sadece tuz uygulanan bitkilerle karşılaştırıldığında %21 oranında azaltmıştır (P<0.05).



Şekil 2. Kök yoluyla uygulanan askorbik asidin (100 ppm) tuz stresi (50 mM NaCl) altındaki mısır yapraklarındaki (a) H₂O₂ ve (b) MDA miktarı üzerine etkisi (Barların içindeki farklı harfler uygulamalar arasındaki farkın Duncan testine göre P=0.05 seviyesinde farklı olduğunu, barların üzerindeki rakamlar ise kontrole göre değişimi % olarak göstermektedir, kontrol=100; ASA: askorbik asit; T: tuz).

Askorbik asit uygulanan mısır bitkilerinin yapraklarındaki SOD aktivitesi kontrole göre %73, tuz stresi altındaki bitkilerde ise %45 oranında azalmıştır (Şekil 3a). Bu değişimlerin istatistiksel anlamda önemli olduğu gözlenmiştir (P<0.05). Tuz stresi altındaki mısır bitkilerine uygulanan askorbik asit ise yapraklardaki SOD aktivitesinin sadece tuz stresi altındaki bitkilere göre %40 oranında

azalmasına neden olmuştur ($P<0.05$). Benzer şekilde askorbik asit uygulaması mısır yapraklarındaki APOD aktivitesini kontrole göre belirgin derecede ve %74 oranında azaltmıştır ($P<0.05$) (Şekil 3b). Tuz stresi altındaki mısır yapraklarında ise APOD aktivitesi kontrole göre %61 oranında azalmıştır ($P<0.05$) (Şekil 3b). Tuz stresi altındaki mısır bitkilerinde askorbik asit uygulaması yapraklardaki APOD aktivitesinin sadece tuz uygulanan bitkilere göre %84 oranında azalmasına yol açmıştır ($P<0.05$). GR aktivitesi askorbik asit uygulanan mısır bitkilerinin yapraklarında kontrole göre %21, tuz stresi uygulanan bitkilerin yapraklarında ise %31 oranında azalmış ve bu değişimler istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($P>0.05$) (Şekil 3c). Tuz stresi altındaki bitkilere yapılan askorbik asit uygulaması yapraklardaki GR aktivitesinin sadece tuz stresi altındaki bitkilere göre %20 oranında artmasına neden olmuştur. Ancak bu değişim de istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($P>0.05$).



Şekil 3. Kök yoluyla uygulanan askorbik asidin (100 ppm) tuz stresi (50 mM NaCl) altındaki mısır yapraklarındaki (a) SOD, (b) APOD ve (c) GR aktivitesi üzerine etkisi (Barların içindeki farklı harfler uygulamalar arasındaki farkın Duncan testine göre $P=0.05$ seviyesinde farklı olduğunu, barların üzerindeki rakamlar ise kontrole göre değişimi % olarak göstermektedir, kontrol=100; ASA: askorbik asit; T: tuz).

4. Tartışma ve Sonuç

Çalışmamızda elde edilen sonuçlar tuz stresi altındaki mısır bitkilerinde klorofil a, klorofil b, toplam klorofil ve toplam karotenoid miktarlarının kontrollere göre önemli derecede azaldığını göstermiştir. Elde edilen sonuçlara benzer olarak bezelye, buğday, domates ve pirinç gibi bitkilerin

yapraklarında da tuz stresi etkisiyle fotosentetik pigment miktarının azaldığı rapor edilmiştir (Ashraf ve ark., 2002; Anuradha ve Rao, 2003; Al-Aghabary ve ark., 2004; Ahmad ve Jhon, 2005). Bybordi (2012) tuz stresine maruz bırakılan bitkilerin yapraklarındaki fotosentetik pigment miktarında gözlenen azalmanın nedeni olarak yaprak dokularında birikim gösteren sodyum iyonlarının pigment biyosentez mekanizmasını inhibe etmesini göstermiştir. Taibi ve ark. (2016) ise tuz stresi altındaki bitkilerde fotosentetik pigment miktarındaki azalmanın oksidatif stres göstergesi olduğunu ve proteolitik bir enzim olan klorofillazın tuz stresi ile aktive olarak pigmentleri parçaladığını ileri sürmüştür. Buna göre çalışmamızda kullanılan ve tuz stresine maruz bırakılan mısır yapraklarında pigment sentezinin yavaşladığı ve/veya pigment parçalanma hızının arttığı söylenebilir. Diğer bir olasılık da Siddiqui ve ark. (2018)'in belirttiği gibi tuz stresinin kloroplast yapısını bozması ve pigmentlerin tilakoid membranlardan ayrılması olabilir. Nitekim Bybordi (2012) tuz stresine maruz kalan bitkilerin yapraklarında kloroplastların bazı yapısal hasarlara uğradığını bildirmiştir. Elde edilen sonuçlar ayrıca mısır bitkisinde klorofil b moleküllerinin klorofil a moleküllerine göre, karotenoidlerin de klorofillere göre tuz stresine daha duyarlı olduğunu göstermiştir.

Çalışmada mısır bitkilerine kök yoluyla uygulanan askorbik asidin tuz stresinin fotosentetik pigmentler üzerinde neden olduğu olumsuz etkileri kısmen iyileştirdiği belirlenmiştir. Örneğin tuz stresi altındaki mısır bitkilerine kök yoluyla verilen askorbik asit yapraklardaki klorofil a ve toplam klorofil miktarını artırmıştır. Bu sonuç, mısır yapraklarında klorofil a biyosentezi ile parçalanması arasındaki dengenin askorbik asit uygulaması ile biyosentez lehine bozulduğunu ve klorofil a biyosentez yolunun klorofil b ile karşılaştırıldığında askorbik asit uygulamasına daha hızlı cevap verdiğini göstermektedir. Siddiqui ve ark. (2018) askorbik asit uygulamalarının bitkilerde klorofil sentezini indükleyebileceğini rapor etmiştir. Karotenoidler ise bitkilerde oksidatif strese ve pigment kaybına karşı koruma sağladığı bilinen bir pigment grubudur. Çalışmada askorbik asit uygulaması tuz stresi altındaki bitkilerde toplam karotenoid miktarını etkilememiştir. Bu sonuç kullanılan mısır çeşidinde askorbik asit uygulamasının karotenoid biyosentezini indükleme konusunda bir fonksiyona sahip olmadığını göstermektedir. Sonuç olarak tuz stresi altındaki mısır çeşidinde askorbik asit uygulaması ile karotenoidlere bağlı koruyucu mekanizmanın aktifleşmediği söylenebilir (Doğru ve Çakırlar, 2020a).

SOD bitkilerde enzimatik antioksidan savunma sisteminin ilk basamağını oluşturmaktadır ve süperoksid radikalının dismutasyonundan sorumludur (Doğru ve Çakırlar, 2020b). APOD elektron vericisi olarak askorbatı kullanarak H₂O₂'nin su ve oksijene parçalanmasını sağlayan reaksiyonu katalizlemektedir. GR ise okside glutatyonun NADPH'ye bağımlı olarak indirgenmesini sağlayan reaksiyonu katalizlemekten sorumludur. APOD ve GR'nin eşgüdüm halinde askorbat-glutatyon döngüsünde H₂O₂'nin parçalanmasından sorumlu olduğu bilinmektedir (Doğru ve Çakırlar, 2020a). Benzer şekilde askorbik asidin de süperoksit ve singlet oksijen gibi radikallerle H₂O₂'yi direkt olarak detoksifiye ettiği bilinmektedir (Bybordi, 2012). Çalışmada mısır bitkilerine kök yoluyla gerçekleştirilen askorbik asit uygulaması yapraklardaki SOD ve APOD enzimlerinin aktivitelerini kontrole göre azaltırken, GR aktivitesini etkilememiştir. Buna göre, askorbik asit uygulaması sonucunda mısır bitkilerinin yapraklarında oluşmuş olan radikallerin detoksifiye edildiği, SOD ve APOD enzimlerinin aktivitelerinin bu nedenle azaldığı söylenebilir (Bybordi, 2012). Diğer bir deyişle, askorbik asit uygulaması sonucunda SOD ve APOD aktivitelerinde meydana gelen azalmanın nedeni, bu enzimlerin substratlarının askorbik asit tarafından parçalanması olabilir. Aynı zamanda tuz stresi altındaki mısır bitkilerinde de yapraklardaki SOD ve APOD aktiviteleri kontrole göre düşük bulunmuştur. Bu sonuç çalışmada kullanılan mısır genotipinin tuz stresine duyarlı bir genotip olduğunu gösteriyor olabilir. Tuz stresi altındaki mısır yapraklarında meydana gelen H₂O₂ ve MDA birikimi de bu iddiayı ispatlamaktadır. Azevedo ve ark. (2011), antioksidan enzim aktivitelerindeki artışların bitkilerde stres koşulları altında büyümeye katkıda bulunduğunu ve tuz toleransı belirteci olabileceğini bildirmiştir. Çalışmamızda tuz stresi altındaki mısır bitkilerinde askorbik asit uygulaması sonucunda SOD ve APOD aktivitelerinde meydana gelen artışlar, süperoksit dismutasyonu ve H₂O₂ detoksifikasyon etkinliğinin arttığını göstermektedir. Bu bitkilerin yapraklarında H₂O₂ ve MDA miktarlarının azalması da membran bütünlüğünün daha iyi korunduğunu gösterir niteliktedir.

Sonuç olarak, kökten gerçekleştirilen askorbik asit uygulamasının çalışmamızda kullanılan mısır çeşidinde belli oranda tuz toleransı sağladığı belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar askorbik asit uygulamasının mısır çeşidinde tuz stresinin yol açtığı oksidatif stres seviyesini azalttığını göstermektedir. Buna göre askorbik asidin mısır bitkilerinde tuz toleransının geliştirilmesi amacıyla kök yoluyla kullanılmasının faydalı olacağı söylenebilir.

Kaynakça

- Ahmad, P. & Jhon R. (2005). Effect of salt stress on growth and biochemical parameters of *Pisum sativum* L. *Archives of Agronomy and Soil Science* 51, 665-672.
- Al-Aghabary, K., Zhu, Z. & Qinhu, S. (2004). Influence of silicon supply on chlorophyll content, chlorophyll fluorescence and antioxidative enzyme activities on tomato plants under salt stress. *Journal of Plant Nutrition*, 27, 2101-2115.
- Anuradha, S. & Rao, S. S. R. (2003). Application of brassinosteroids in rice seeds (*Oryza sativa* L.) reduced the impact of salt stress on growth and improved photosynthetic pigment levels and nitrate reductase activity. *Plant Growth Regulation*, 40, 29-32.
- Ashraf, M. (2002). Salt tolerance of cotton: some new advances. *Critical Rev. in Plant Sci.* 21, 1-30.
- Ashraf, M., Athar, H. R., Harris, P. J. C., & Kwon, T. R. (2008). Some prospective strategies for improving crop salt tolerance. *Advances in Agronomy*, 97, 45-110.
- Azevedo, R. A., Carvalho, R. F., Cia, M. C., & Gratao, P. L. (2011). Sugarcane under pressure: an overview of biochemical and physiological studies of abiotic stress. *Trop. Plant Bio.* 4, 42-51.
- Beyer, W. F., & Fridovich, I. (1987). Assaying for superoxide dismutase activity: Some large consequences of minor changes in conditions. *Analytical Biochemistry*, 161, 559-566.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Bybordi, A. (2012). Effect of ascorbic acid and silicium on photosynthesis, antioxidant enzyme activity, and fatty acid contents in canola exposure to salt stress. *Journal of Integrative Agriculture*, 11, 1610-1620.
- Cramer, G. R., & Nowak, R. S. (1992). Supplemental manganese improves the relative growth, net assimilation and photosynthetic rates of salt-stressed barley. *Physiologia Plantarum*, 84, 600-605.
- Cramer, G. R., Epstein, E., & Lauchli, A. (1993). Effects of sodium, potassium and calcium on salt-stresses barley. *Physiologia Plantarum*, 80, 83-88.
- Doğru, A & Canavar, S. (2020). Bitkilerde tuz toleransının fizyolojik ve biyokimyasal bileşenleri. *Academic Platform Journal of Engineering and Science*, 8, 155-174.
- Doğru, A. & Çakırlar, H. (2020b). Effects of leaf age on chlorophyll fluorescence and antioxidant enzymes in winter rapeseeds leaves under cold acclimation conditions. *Brazilian Journal of Botany*, 43, 11-20.
- Doğru, A., & Çakırlar, H. (2020a). Is leaf age a predictor for cold tolerance in winter oilseed rape plants? *Functional Plant Biology* 47, 250-262.
- Doğru, A., & Yılmaz Kaçar, M. (2019). A preliminary study on salt tolerance of some barley genotypes. *SAU Journal of Science*, 23, 755-762.
- Fidan, E., Ekinci, A. (2017). Bazı fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) genotiplerinin farklı seviyelerdeki tuz stresine gösterdikleri tepkilerin incelenmesi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 27(4), 558-568.
- Flowers, T. J. (2004). Improving crop salt tolerance. *Journal of Experimental Botany* 55, 307-319.
- Franco, J. A., Esteban, C., & Rodriguez C. (1993). Effects of salinity on various growth stages of muskmelon cv. Revigal. *Journal of Horticultural Science*, 68, 899-904.
- Hamada, A. M. (1998). *Effect of exogenously added ascorbic acid, thiamine or aspirin on photosynthesis and some related activities of drought-stressed wheat plants*. In: Proceedings of XIth International Photosynthesis Conference. Budapest, Hungary, August, pp. 17-22.
- Hasegawa, P. M., Bressan, R. A., Zhu, J. K., & Bohnert, H. J. (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 51, 463-499.
- He, T., & Cramer, G.R. (1993). Growth and mineral nutrition of six rapid-cycling Brassica species in response to seawater salinity. *Plant and Soil*, 139, 285-294.
- Heath, R. L., & Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts I. Kinetic and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophy.* 125, 189-198.

- Irfan, M., Nabeela, Ilyas, M., & Rahman, K. U. (2019). Effects of ascorbic acid against salt stress on the morphological and physiological parameters of *Solanum melongana* (L.). *Pure Applied Biology*, 8, 1425-1443.
- Khan, A., Ahmad, M. S. A., Athar, R. E., & Ashraf, M. (2006). Interactive effect of foliarly applied ascorbic acid and salt stress on wheat (*Triticum aestivum* L.) at the seedling state. *Pakistan Journal of Botany*, 38, 1407-1414.
- Kıpçak, S., Ekincialp, A., Erdiñ, Ç., Kabay, T., Şensoy, S. (2019). Tuz stresinin farklı fasulye genotiplerinde bazı besin elementi içeriği ile toplam antioksidan ve toplam fenol içeriğine etkisi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 29(1), 136-144.
- Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic membranes. *Methods in Enzymology*, 148, 350-382.
- Munns, R. (1993). Physiological processes limiting plant growth in saline soils: some dogmas and hypothesis. *Plant Cell and Environment*, 16, 15-24.
- Munns, R. (2002). Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell and Environment*, 33, 453-467.
- Munns, R., & Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 651-681.
- Noble, C. L., & Rogers, M. E. (1992). Arguments for the use of physiological criteria for improving the salt tolerance in crops. *Plant and Soil*, 146, 99-107.
- Noble, C. L., Halloran, G. M., & West, D. W. (1984). Identification and selection for salt tolerance in lucerne (*Medicago sativa* L.). *Australian Journal of Agricultural Research*, 35, 239-252.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., & Yagi, N. Y. (1979). Assay of lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95, 351-358.
- Parida, A. K., & Das, A. B. (2005). Salt tolerance and salinity effects on plants: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60, 324-349.
- Sgherri, C. L. M., Loggini, B., Puliga, S. & Navari-Izzo, F. (1994). Antioxidant system in *Sporobolus stapfianus*: changes in response to desiccation and rehydration. *Phytochemistry* 35, 561-565.
- Shannon, M.C. (1998). Adaptation of plants to salinity. *Advances in Agronomy*, 60, 75-119.
- Siddiqui, M. H., Alamri, S. A., Al-Khaishany, Y. Y., Al-Qutami, M. A., & Ali, H. M. (2018). Ascorbic acid application improves salinity stress tolerance in wheat. *Chiang Mai Journal of Science*, 45, 1-11.
- Taibi, K., Taibi, F., Abderrahim, L. A., Annejah, A., Belkhodja, M., & Mulet, J. M. (2016). Effect of salt stress on growth, chlorophyll content, lipid peroxidation and antioxidant defence system in *Phaseolus vulgaris* L. *South African Journal of Botany*, 105, 306-312.
- Uzal, Ö., Yıldız, K. (2013). Changes in micronutrients, chlorophyll contents and plant growth of some strawberry cultivars (*Fragaria x ananassa* L.) under salt stress. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 23(2), 76-82.
- Wang, S. Y., Jiao, H., & Faust, M. (1991). Changes in ascorbate, glutathione and related enzyme activity during thidiazuron-induced bud break of apple. *Plant Physiology*, 82, 231-236.
- Yeo, A. R. (1994). Physiological criteria in screening and breeding. Springer-Verlag, Berlin.
- Zhu, J.K., (2007). *Plant Salt Stress*. John Wiley & Sons, Ltd.