



## Tuz Stresi Altındaki Genç Kabak (*Cucurbita pepo* L. ve *C. moschata* Poir.) Bitkilerine Uygulanan Prolin'in, Antioksidatif Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkisi

<sup>a</sup>Rezan A. BAYAT, <sup>b</sup>Şebnem KUŞVURAN\*, <sup>c</sup>Şebnem ELLİALTIOĞLU, <sup>a</sup>A. Sülün ÜSTÜN

<sup>a</sup>Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Ankara

<sup>b</sup>Çankırı Karatekin Üniversitesi, Kızılırmak Meslek Yüksekokulu, Çankırı

<sup>c</sup>Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Ankara

\* Sorumlu yazar: skusvuran@gmail.com

Geliş Tarihi: 05.12.2013

Düzeltilme Geliş Tarihi: 11.12.2013

Kabul Tarihi: 17.12.2013

### Özet

Prolin, NaCl stresi altındaki bitkilerde protein bütünlüğünün sağlanması ve enzimlerin aktive edilmesinde görev yapan önemli bir ozmoregülatördür. Stres faktörleri, bitkilerdeki içsel prolin miktarında artışa neden olmaktadır. Dışsal prolin uygulamalarının da tuz stresine toleransta olumlu etki yaptığı bilinmektedir. Burada sunulan çalışmada tuza tolerans seviyeleri önceden belirlenmiş, birisi orta düzeyde toleran (A-19, *C. moschata* Poir.), diğeri duyarlı (Ç-1, *C. pepo* L.) olan iki yerel kabak çeşidine yapılan dışsal prolin uygulamasının, bitkilerdeki antioksidatif enzimlerin seviyesi üzerine etkisi araştırılmıştır. Kabak tohumları vermikulit ortamında çimlendirilmiş ve 2 gerçek yapraklı aşamada hidroponik kültüre aktarılmıştır. Bir hafta sonra bitkiler 'Kontrol' '100 mM tuz (NaCl)', '100 mM tuz (NaCl) + 5 mM prolin' ve '100 mM tuz (NaCl) + 10 mM prolin' olmak üzere 4 farklı uygulamaya tabi tutulmuştur. Stresin 10. gününde sürgünün ucundan geriye doğru 2-4. yapraklardan hazırlanan örnekler, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), askorbat peroksidaz (APX) ve glutayon redüktaz (GR) enzim aktiviteleri bakımından değerlendirilmiştir. Genel olarak prolin uygulamaları, kabak yapraklarının enzim aktivitelerinde kontrole göre artışa neden olmuştur. Bu etki, tuza toleransı daha yüksek olan A-19 genotipinde daha belirgin olmuştur. Dışsal prolin uygulamasının kabak bitkisinde tuza toleransın artmasında olumlu etki yaptığı, bu etkiyi antioksidatif enzim sistemini harekete geçirerek pekiştirdiği izlenimi edinilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** *Cucurbita pepo*, *C. moschata*, Tuzluluk, Prolin, SOD, CAT, GR, APX

## Effects of Proline Application on Antioxidative Enzymes Activities in the Young Pumpkin Plants (*Cucurbita pepo* L. and *C. moschata* Poir.) under Salt Stress

### Abstract

Proline is known to play an important role as an osmolyte which maintains of integrity proteins and activated of antioxidative enzymes in plants subjected to NaCl stress. The stress factors are caused increasing to internal proline amount in plants. Exogenous proline application has been known to positive effect in salt tolerance. The effect of exogenous proline application on antioxidative enzymes activity was investigated in this study, by using the semi-salt-tolerant (A-19, *C. moschata* Poir.) and the salt-sensitive (Ç-1, *C. pepo* L.) pumpkin genotypes. Pumpkin seeds were germinated in vermiculite and the seedlings at two true-leaf stage were transferred to hydroponic culture (Hoagland solution). One week after transplanting the plants were subjected to four different applications (Control, 100 mM salt (NaCl), 100 mM salt (NaCl) + 5 mM proline, and 100 mM salt (NaCl) + 10 mM proline). Superoxide dismutase (SOD), catalaz (CAT), ascorbate peroxidase (APX) and glutathione reductase (GR) enzymes activity measurements and evaluations have been completed after 10 days of salt application. Antioxidant enzymes activities increased in the salt- and proline-treated plants very effectively compared to control plants. However, this effect was clearer in the A-19 salt tolerance genotype than the C-1 sensitive genotype. Exogenous proline was found useful in protecting the adverse effects of salt stress on plants and this effect may be responded with enzymatic defense systems against salt induced oxidative stress.

**Keywords:** *Cucurbita pepo*, *C. moschata*, Salinity, Proline, SOD, CAT, GR, APX

## Giriş

Tuz stresi; değişik tuzların toprak veya suda, bitkinin büyümesini engelleyebilecek konsantrasyonlarda bulunması olarak tanımlanır ve geniş alanların tarım için kullanım dışı kalmasına neden olur. Dünya yüzeyinde bulunan alanların yaklaşık %6'sı ve sulanan alanların %20'si tuzluluk sorunu ile karşı karşıyadır ve gelecekteki 20 yıl içerisinde bu değerlerin %50 oranında artış gösterebileceği bildirilmektedir (Hasanuzzaman ve ark., 2013). Özellikle kurak ve yarı kurak bölgelerde bitkisel üretimi sınırlandıran, bitkinin morfolojisi ve anatomisini de kapsayan tüm metabolizmasını etkileyen tuzluluk, en önemli abiyotik stres faktörleri arasında yer almaktadır (Levitt, 1980; Asraf ve Foolad, 2007). Tuz stresi bitkinin ölümüne neden olabildiği gibi tolerans durumuna bağlı olarak büyümeyi engellemekte, kloroz, nekrotik lekelerin oluşumuna yol açabilmekte, verim ve kalitenin azalmasına neden olmaktadır (Hasegawa ve ark., 1986).

Diğer birçok stres faktöründe olduğu gibi tuz stresi altındaki bitkiler, su kaybını azaltmak için stomalarını kapatmakta böylece CO<sub>2</sub> gazının girişi de engellenmektedir. Karbondioksit fiksasyonunda kullanılmayan elektronlar ile absorbe edilen ışık enerjisi, O<sub>2</sub>'nin aktivasyonunda kullanılmaktadır. Stres altındaki bitkilerde oluşan aktif oksijen türevleri (ROS=Reactive oxygene species); protein, membran lipitleri, nükleik asitler ve klorofil gibi hücre bileşenlerinde ve genel olarak hücrelerde hasara neden olmaktadır.

Tuz stresi sonucunda oluşan ve yüksek düzeylere ulaşan ROS'u zararsız bileşiklere dönüştüren antioksidant madde miktarları ile antioksidant enzim aktiviteleri, bitkilerde oksidatif strese karşı etkili olan en önemli dayanım mekanizmaları olarak işlev yapmaktadır. Süper oksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APX), glutatyon redüktaz (GR), katalaz (CAT) gibi enzimler etkin antioksidatif enzimler arasında yer almaktadır. Bunların yanı sıra stres altındaki bitkiler, hücrede sentezlenen ve yine hücre içerisinde sitoplazma ve organellerde çözünebilir özellik taşıyan çeşitli organik maddeler biriktirirler. Bu maddeler, enzimler üzerinde pozitif bir etki oluşturulması dışında membran bütünlüğünün de sağlanarak ozmotik dengenin yapılandırılmasında önemli rol oynamaktadır. Bu maddeler arasında yer alan prolin ve glisinbetain, strese toleransın sağlanmasında önemli etki yapan ozmotik düzenleyicilerdir (Asraf ve Foolad, 2007; Molazem ve ark., 2010; Yan ve ark., 2011; Deivanai ve ark., 2011).

Amino asit yapısındaki prolin, NaCl stresi altında ozmotik düzenlemede rol oynadığı gibi, stres koşullarında hücrelerde C ve N kaynağı olarak

da fayda sağlamaktadır (Singh ve ark., 1973; Joyce ve ark., 1992; Sanchez ve ark., 2007). Prolin sadece hücreler arası yapının korunması ve sitozolik pH'nın ayarlanmasında görevli olmayıp, protein bütünlüğünün sağlanması ve enzim aktivitelerinin harekete geçirilmesinde de rol oynamaktadır (Matysik ve ark., 2002; Büyük ve ark., 2012). Stres koşullarında serbest oksijen radikallerinin oluşumundaki en önemli faktör, NADP<sup>+</sup>'nin kısıtlı duruma gelmesi nedeniyle, ferrodoksin'in NADP<sup>+</sup> yerine oksijeni indirgemesidir. Böylece membran bütünlüğüne zarar veren reaktif O<sub>2</sub><sup>-</sup> radikalleri oluşmaktadır. Stres süresince kloroplastlardaki prolin biyosentez oranındaki artış, daha düşük NADPH/NADP<sup>+</sup> oranı sağlayarak, hücre bütünlüğüne zarar veren reaktif O<sub>2</sub><sup>-</sup> radikallerinin oluşumunu azaltmaktadır (Szabados ve Savoure, 2009; Lehman ve ark., 2010; Miller ve ark., 2010). Farklı türlerde yapılan pek çok çalışma diğer stres türlerinde olduğu gibi tuz stresi koşullarında da prolin miktarında artış meydana geldiğini, bu artışın özellikle toleransı yüksek olan bitkilerde daha yüksek oranlarda ortaya çıktığını göstermiştir (Tıprıdamaz ve Karakullukçu, 1993; Misra ve Gupta, 2005; Kaya ve ark., 2007; Turan ve ark., 2009; Marin ve ark., 2010; Molazem ve ark., 2010; Talat ve ark., 2013; Jaarsma ve ark., 2013). Bu nedenle önemli bir ozmotik koruyucu olan prolinin farklı türlerde dışsal uygulamaları, stres koşullarında toleransın artırılmasına yönelik alternatif bir yaklaşım olarak ele alınmıştır. Tıprıdamaz ve Karakullukçu (1993) tarafından domates embriyo kültürü sistemi kullanılarak yapılan bir araştırmada domates embriyoları 150 mM NaCl ilave edilmiş veya tuz katılmamış kontrol ortamları ile tuzun yanısıra değişik dozlarda prolin ve glisinbetain ilave edilmiş besin ortamlarına dikilmiştir. Tuzlu ortamlarda embriyo gelişmesinde inhibisyon görülürken, tuzun yanında besin ortamlarına prolin veya glisinbetain ilave edilmesi, embriyoların gelişimi üzerine olumlu etkide bulunmuştur. Öztekin (2009), aşılı ve aşısız domates bitkilerinde yaptığı çalışmada bitki boyu, gövde kalınlığı, yaprak alanı, vejetatif aksam ve kök yaş ve kuru ağırlığı, toplam ve pazarlanabilir verim, toplam klorofil, prolin, yaprak oransal su içeriği, bitki su tüketimi ve su kullanım randımanı gibi farklı parametrelerin, 4 ve 6 dS m<sup>-1</sup> tuz uygulaması karşısında etkilenme düzeylerini incelemiştir. 6 dS m<sup>-1</sup> tuz düzeyi ile incelenen parametrelerde azalma meydana geldiği, dışarıdan prolin uygulanan bitkilerin, prolin uygulanmayan bitkilere göre tuz stresinin olumsuz etkisini azaltıcı yönde etki ettiği belirlenmiştir. Hossain ve Fujita (2010) dışsal prolin uygulamasının, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indirgenmesi ile meydana gelen oksidatif zarar karşısında koruyucu etki yaptığından bahsetmekte ve lipid peroksidasyon

seviyesinde azalma meydana getirdiğini; Deivanai ve ark. (2011) prolin uygulaması ile ozmotik potansiyelin düzenlenerek hücre canlılığında devamlılığın sağlandığını belirtmiştir. Nounjan ve Theerakulpisut (2012) çeltik bitkisinde yaptıkları çalışmalarında, prolin uygulamasının tuz stresi süresince H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oluşumunu azaltarak antioksidatif enzim aktivitelerinde artış meydana gelmesine neden olduğunu ifade ederken; Talat ve ark., (2013) ise buğdayda prolin uygulamasının tuza toleransı artırdığını göstermiştir. Benzer sonuçlar tütün (Hoque ve ark., 2007), kavun (Kaya ve ark., 2007), kanola (Athar ve ark., 2009), sorgum (Nawaz ve ark., 2010), zeytin (Ahmed ve ark., 2010) ve çeltik (Nounjan ve ark., 2012) türlerinde de elde edilmiştir.

Tuzluluk ve kuraklık sorununun potansiyel olarak mevcut olduğu, ülkemizin kurak ve yarı kurak birçok bölgesinde açıkta yetiştiriciliği yapıldığı gibi örtü altında da gün geçtikçe artan bir ilgiyle tarımı yapılan kabağın, Türkiye toplam üretimi, 598 bin dekarlık alanda yıllık ortalama 334.520 ton düzeyinde gerçekleşmektedir (Anonymous, 2012). Dünya toplam kabak ekim alanı, 1.8 milyon hektar olup, bu alanda 1.4 milyon ton üretim yapılmakta, bu değerler çerçevesinde Türkiye; Çin, Hindistan, Rusya Federasyonu, İran, A.B.D., Mısır, İtalya, Meksika, Endonezya, Bangladeş ve İspanya'dan sonra 12. sırada yer almaktadır. Tuzlanma sorununun gün geçtikçe artması ve yaygınlaşması, sebze tarımında tuzluluğa tolerant genotiplerin belirlenmesi gereksinimini ortaya çıkarmaktadır. Özellikle Nevşehir ve çevresindeki kurak yaz koşullarına rağmen hiç sulama yapılmadan yetiştiriciliği yapılan kabaklar, kurak ve yarı kurak ekolojilerde tuzluluk sorunu olan toprakların değerlendirilmesinde bu türün iyi bir alternatif olabileceğini akla getirmektedir. Kabak tür ve çeşitlerinin, karpuz ve kavuna anaç olarak kullanılması, bu türün önemini daha da artırmaktadır. Özellikle örtü altı alanlarda tuzlanma sorununun gün geçtikçe artması ve yaygınlaşması da, kabak tarımında tuzluluğa tolerant genotiplerin belirlenmesi bununla birlikte hassas genotiplerde ise tolerans seviyelerinin artırılması gereksinimini ortaya çıkarmaktadır.

Bu çalışmada, tuza orta düzeyde tolerant ve duyarlı olduğu önceki çalışmalarda belirlenmiş (Sevengör, 2010) olan iki farklı kabak türüne ait yerel popülasyonda, farklı dozdaki prolin uygulamalarının, antioksidatif enzim aktiviteleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

#### Materyal ve Metot

Bitkisel materyal olarak, tuza duyarlı (Ç-1) ve tuza orta düzeyde tolerant (A-19) olmak üzere iki adet yerel kabak popülasyonu kullanılmıştır.

(Sevengör, 2010). Bunlardan tuza duyarlı olan genotipe *C. pepo* L., toleransı yüksek olan ise *C. moschata* Poir. türüne ait kabaklardır.

Tohumlar vermikulit doldurulmuş plastik kaplara (40x25x5 cm ebatlarında) ekilmiş ve kontrollü koşulları olan iklim odasında çimlendirilmiştir. Kotiledon yaprakları yatay konuma gelen fideler, su kültürüne alınmışlardır. Su kültürü için, Hoagland besin çözeltisi (Hoagland ve Arnon, 1938) doldurulmuş 25x25x18 cm boyutlarındaki plastik küvetler kullanılmıştır. Özel olarak hazırlanmış ve her fide için üzerine delikler açılmış plastik tablalara patlıcan fideleri küçük sünger parçaları ile sarılmak suretiyle yerleştirilmiştir. Bitki kökleri besin çözeltisinde olacak şekilde tablalar küvetlerin üzerine konulmuştur. Havalandırma işlemi, iki adet akvaryum pompasına bağlı bulunan ince plastik hortumların besin çözeltisi içerisine daldırılması yoluyla yapılmıştır. Bitkiler 4 yapraklı aşamaya ulaştıklarında uygulamalara geçilmiştir. Uygulamalar 1) Kontrol, 2) 100 mM tuz (NaCl) uygulaması, 3) 100 mM tuz (NaCl) + 5 mM prolin, 4) 100 mM tuz (NaCl) + 10 mM prolin olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. İki günde bir hazırlanan yeni ortamlara transfer yapılmıştır. Bitkilerde tuz stresinin etkin olarak görüldüğü 10. günde enzim analizleri için dörder bitkiden ayrı ayrı olacak şekilde sürgün ucundan itibaren geriye doğru 2-4. yapraklar alınarak karıştırılmış ve böylece örnekler hazırlanmıştır. Elde edilen bitki yaş örneklerinde süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon redüktaz ve askorbat peroksidaz enzim aktiviteleri incelenmiştir.

Enzim analizleri için 1 g taze yaprak ve doku örnekleri sıvı azot içerisinde porselen havanlarda ezildikten sonra, içinde 0.1 mM Na-EDTA bulunan 50 mM'lık 10 ml'lik fosfor tampon çözeltisi (pH:7.6) ile homojenize edilmiş, 15 dk 15000 g'de santrifüj edildikten sonra ölçüm yapılmaya kadar +4°C sıcaklıkta tutulmuştur. Ölçümler Analytik Jena 40 model spektrofotometrede gerçekleştirilmiştir. Enzim ölçümünde son hacimler, tampon çözeltisiyle tamamlanmıştır. Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi, NBT'nin (nitro blue tetrazolium kloridin) ışık altında O<sub>2</sub><sup>-</sup> tarafından indirgenmesi yöntemine göre; katalaz aktivitesi (CAT), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nin 240 nm'de (E=39.4 mM cm<sup>-1</sup>) parçalanma oranı esas alınarak ölçülmüştür (Çakmak ve Marschner, 1992; Çakmak ve ark., 1994). Glutatyon redüktaz (GR) aktivitesi, Çakmak ve Marschner (1992) ve Çakmak ve ark. (1994)'a göre 340 nm'de (E=6.2 mM cm<sup>-1</sup>) NADPH'nin oksidasyonu esas alınarak, askorbat peroksidaz (APX) enzim aktivitesi Çakmak ve Marschner (1992) ve Çakmak (1994)'a göre, 290 nm'de (E=2.8 mM cm<sup>-1</sup>) askorbatın oksidasyonu ölçülerek belirlenmiştir.

**Çizelge 1.** İki farklı kabak genotipinde tuz ve prolin uygulamalarının, genç yapraklardaki enzim aktiviteleri üzerine etkisi

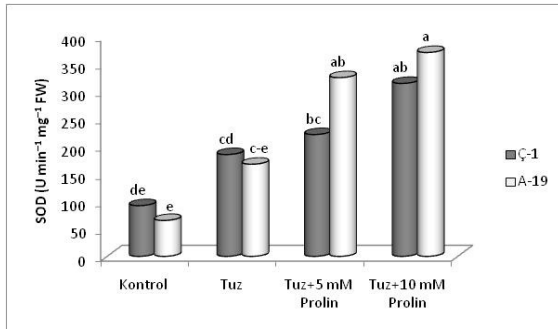
Genotip	Uygulamalar	SOD* (U dak <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> T.A.)	CAT (μmol dak <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> T.A.)	GR (μmol dak <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> T.A.)	APX (μmol dak <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> T.A.)
Ç-1	Kontrol	92.25 de	202.36 c	45.23 c	50.85 c
	Tuz (100 mM)	185.28 cd	298.6 bc	63.86 bc	70.57 bc
	Tuz + 5 mM Prolin	221.72 bc	464.30 ab	96.67 a-c	86.83 a-c
	Tuz + 10 mM Prolin	314.79 ab	487.18 ab	78.15 bc	117.46 a-c
A-19	Kontrol	65.26 e	178.96 c	36.58 c	55.56 bc
	Tuz (100 mM)	167.68 c-e	387.56 bc	71.85 bc	114.57 a-c
	Tuz + 5 mM Prolin	325.27 ab	540.61 ab	121.67 ab	138.65 ab
	Tuz + 10 mM Prolin	371.10 a	658.47 a	152.78 a	162.22 a

\* Sütunlarda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılıklar, 0.05 seviyesinde önemlidir.

Tesadüf parselleri deneme desenine göre 3 tekrarlı ve her tekrarda 10 bitki ile kurulan denemelerden elde edilen sayısal değerler, varyans analizine tabi tutulmuş, Duncan çoklu karşılaştırma testi yapılmış ve farklılık dereceleri %5 düzeyinde harflendirme yoluyla gösterilmiştir. Bu amaçla SAS (9.0) (SAS Institute Inc, Cary, NC) paket programından yararlanılmıştır.

### Sonuçlar ve Tartışma

Dışsal prolin uygulamalarının tuz stresine tolerans üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bu çalışmada, tuz ve prolin uygulamaları yapılan genç kabak bitkilerinde antioksidatif enzim aktiviteleri incelenmiştir. SOD, CAT, APX ve GR enzimlerinin incelendiği çalışmada, tuz ve prolin uygulamalarının 10. gününde elde edilen sonuçlar Çizelge 1’de verilmiştir.

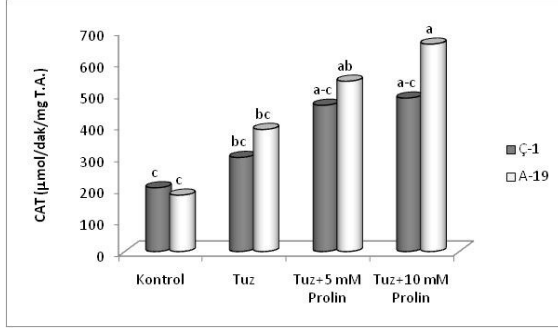


**Şekil 1.** İki farklı kabak genotipinde tuz ve prolin uygulamaları ile SOD enzim aktivitesinde meydana gelen değişimler (U dak<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> T.A.)

Her bir enzime ait değerler genotip x uygulama kombinasyonları bazında ayrı ayrı değerlendirilmiş olup, istatistiksel olarak genotip ve uygulamalar arasındaki interaksiyon önemli bulunmuştur. SOD enzim aktivitesi bakımından en yüksek değerler, aynı istatistiksel grupta yer alacak şekilde ‘A-19 x 100 mM tuz + 10 mM prolin’, ‘A-19

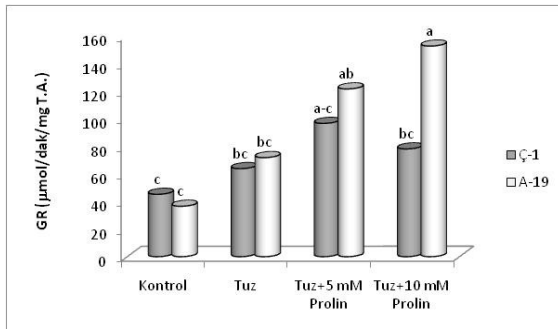
x 100 mM tuz + 5 mM prolin’, ‘Ç-1 x 100 mM tuz + 10 mM prolin’ ve ‘Ç-1 x 100 mM tuz + 5 mM prolin’ uygulamalarından elde edilmiştir (sırasıyla 371.10, 325.27, 314.79, 221.72 U dak<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> T.A.). ‘Ç-1 x 100 mM tuz’, ‘A-19 x 100 mM tuz’, ‘Ç-1 x Kontrol’ ve ‘A-19 x Kontrol’ kombinasyonları da yine aynı istatistiksel grup içerisinde yer almak suretiyle daha düşük SOD ölçümlerine sahip olmuşlardır (185.28, 167.68, 92.25, 65.26 U dak<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> T.A.) (Çizelge 1, Şekil 1).

Katalaz (CAT) enzim aktivitesi bakımından en düşük değerler her iki genotipin de kontrol grubunda belirlenmiş (Ç-1: 202.36, A-19: 178.96 μmol dak<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> T.A.); tuz stresi karşısında ise sırasıyla %47 ve %116 oranında artışlar meydana gelmiştir (298.6 ve 387.56 μmol dak<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> T.A.). Prolin uygulamaları kabak genotiplerinde CAT enzim aktivitesi bakımından artışın devam etmesini sağlarken 100 mM NaCl+10 mM prolin uygulaması karşısında Ç-1 kabak genotipinde %140, A-19 kabak genotipinde ise %267 oranında artış olduğu tespit edilmiştir. Aralarındaki farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmayan uygulamalar, elde edilen sayısal değerlere göre şu şekilde sıralanmıştır: ‘A-19 x 100 mM tuz + 10 mM prolin’, ‘A-19 x 100 mM tuz + 5 mM prolin’, ‘Ç-1 x 100 mM tuz + 10 mM prolin’ ve ‘Ç-1 x 100 mM tuz + 5 mM prolin’ (sırasıyla 658.47, 540.61, 487.18, 464.30 μmol dak<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> T.A.). Sayısal olarak prolin uygulanan stres konularında daha yüksek veriler alınmasıyla birlikte, sadece tuz uygulanan bitkilerdeki sonuçlar ile 5 mM prolin uygulanan bitkilerdeki CAT değerleri, istatistiksel olarak önemli bir fark ile ayrılmamıştır. Bununla birlikte prolin uygulamasının 10 mM’a çıkartılmasıyla birlikte elde edilen CAT değeri özellikle orta tolerant genotipte, tuz uygulamasına göre önemli düzeyde farklılık göstermiştir (Çizelge 1, Şekil 2).



**Şekil 2.** İki farklı kabak genotipinde tuz ve prolin uygulamaları ile CAT enzim aktivitesinde meydana gelen değişimler ( $\mu\text{mol dak}^{-1} \text{mg}^{-1}$  T.A.)

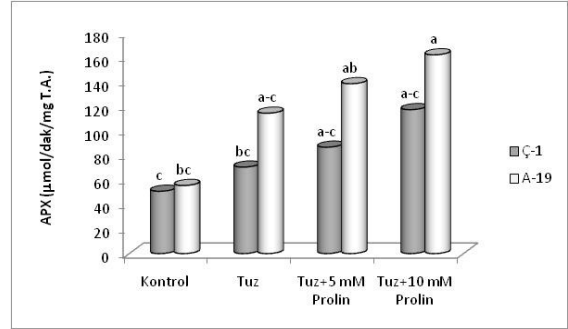
Glutasyon reduktaz (GR) enzim aktivitesi, en yüksek değerlerini 'A-19 x 100 mM tuz + 10 mM prolin', 'A-19 x 100 mM tuz + 5 mM prolin', 'Ç-1 x 100 mM tuz + 5 mM prolin' ve 'Ç-1 x 100 mM tuz + 10 mM prolin' uygulamalarında vermiştir (sırasıyla 152.78, 121.67, 96.67, 78.15  $\mu\text{mol dak}^{-1} \text{mg}^{-1}$  T.A.). 'A-19 x 100 mM tuz' ve 'Ç-1 x 100 mM tuz' uygulamaları ikinci sırada yer alan grubu oluşturmakla birlikte (sırasıyla 71.85 ve 63.86  $\mu\text{mol dak}^{-1} \text{mg}^{-1}$  T.A.); stres uygulaması yapılmayan kontrol bitkilerindeki GR değerleri ile aynı istatistiksel grup içerisinde yer almıştır (sırasıyla 36.58 ve 45.23  $\mu\text{mol dak}^{-1} \text{mg}^{-1}$  T.A.) (Çizelge 1, Şekil 3).



**Şekil 3.** İki farklı kabak genotipinde tuz ve prolin uygulamaları ile GR enzim aktivitesinde meydana gelen değişimler ( $\mu\text{mol dak}^{-1} \text{mg}^{-1}$  T.A.).

Askorbat peroksidaz enzim aktivitesinin de incelendiği çalışmada tuz ve farklı dozlardaki prolin uygulamaları APX enzim aktivitesinde artışa neden olmuştur. En düşük değerler 50.85 ve 55.56  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  T.A. değerleri ile 'Ç-1 x Kontrol' ve 'A-19 x Kontrol' bitkilerinden elde edilmiştir. Bu artış prolin uygulaması ile birlikte hız kazanırken her iki genotipte de en yüksek değerler 100 mM NaCl + 10 mM prolin uygulamasında tespit edilmiştir ('A-19 x 100 mM tuz + 10 mM prolin': 162.22 ve 'Ç-1 x 100

mM tuz + 10 mM prolin': 117.46  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  T.A.) (Çizelge 1, Şekil 4).



**Şekil 4.** İki farklı kabak genotipinde tuz ve prolin uygulamaları ile APX enzim aktivitesinde meydana gelen değişimler ( $\mu\text{mol dak}^{-1} \text{mg}^{-1}$  T.A.)

Stres sonucu bitki hücrelerinde oluşan süperoksit radikalleri, süperoksit dismutaz (SOD) enziminin reaksiyonu ile hidrojen peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) dönüştürülür (Dixit ve ark., 2001; Mittiova ve ark., 2002). SOD'un katalizlediği reaksiyon sonucu oluşan ve kuvvetli bir oksidant olan  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'nin hücrede birikimi, katalaz ya da askorbat- glutasyon döngüsü ile önlenir. Oksidatif stres sonucu ortaya çıkan aktif oksijen türevlerinden süperoksit radikalinin yok edilmesinden sorumlu olan SOD enzim aktivitesi tuz stresi ile birlikte prolin uygulamaları karşısında artış göstermiştir. Bu artış, prolin uygulamaları ile paralellik gösterirken, tuz toleransı daha yüksek olan A-19 genotipinin bu anlamda daha başarılı olduğu belirlenmiştir. *C. moschata* türüne ait olan A-19 kod'lu yerel genotip, Köse (2011) tarafından yapılan çalışmada da kuraklık stresine oldukça yüksek tolerans gösteren bir çeşit olmuş ve katalaz enzimi ile diğer antioksidatif enzimlerini Ç-1 (*C. pepo*) genotipine göre çok daha etkin kullanmıştır. Katalaz enzimi, oksidatif stres sonucu oluşan hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türevlerinin suya ve moleküler oksijene dönüşerek yok edilmesinde görevli bir enzim olarak rol almaktadır (Dionisio-Sese ve Tobita, 1998).

Sevengör ve ark. (2011) tuz stresi karşısında tolerant olan kabak genotiplerinde CAT enzim aktivitesinin hassas genotiplere oranla artış gösterdiğini bildirmiştir. Bu çalışmada ise prolin uygulaması ile birlikte CAT enzim aktivitesinde artış meydana geldiği görülmüştür. Hoque ve ark. (2007) tütünde yaptıkları çalışmalarında CAT enzim aktivitesinin tuz koşullarında kontrol bitkilerine oranla azalma gösterirken, NaCl + prolin uygulaması karşısında enzim aktivitesinde önemli artış meydana geldiğini, prolinin  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'nin detoksifikasyonunda etkili olarak CAT enzim

aktivitesinde artışa imkan sağladığını bildirmişlerdir.

Tuz stresi gibi oksidatif stres koşullarında enzimatik savunma mekanizmaları içerisinde yer alan glutation redüktaze ve askorbat peroksidaz enzimleri genellikle hidrojen peroksinin suya indirgenerek kloroplastlar ve mitokondriden temizlenmesinde etkili olmaktadır (Scandalios, 1997; Shalata ve ark., 2001). APX, askorbat – glutasyon döngüsünde hidrojen peroksidi suya indirgemekle görevlidir. Bu sırada askorbat monodehidroaskorbata (MDHA) okside olur. MDHA monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR) tarafından askorbata dönüştürülür. Bununla beraber MDHA'nın iki molekülü enzimatik olmayan yol ile MDHA'ya ve dehidroaskorbata (DHA) oransız olarak dönüştürülür. DHA, dehidroaskorbat redüktaz (DHAR; EC: 1.6.5.4) ve GR (GR; EC: 1.6.4.2) tarafından askorbata indirgenir. Bu reaksiyondan sonra ise glutasyon (GSH), DHAR'ın etkisi ile okside glutatyon (GSSG) dönüşür ve GSSG, GR tarafından GSH' geri indirgenir (Shalata ve ark., 2001; Shigeoka ve ark., 2002). Tuz ve prolin uygulamalarının stres süresince oluşturduğu değişimlerin incelendiği bu çalışmada, her iki enzim aktivitesinde de artışlar meydana gelmiştir. Bu artışlar özellikle toleransı daha yüksek olan A-19 genotipinde dikkat çekici bir biçimde gerçekleşmiştir.

Hong ve ark. (2000) prolinin bir ozmolit olarak görünmesinin yanı sıra, serbest oksijen radikallerinin yok edilmesinde olan etkisinin daha önemli olduğunu ifade etmişlerdir. Nitekim çalışmalarımızın önceki aşamasında (Bayat ve ark., 2012), 100 mM NaCl ile birlikte farklı dozlarda prolin uygulaması yapıldığında, bitki bünyesindeki prolin içeriğinde de artış görüldüğü, bu artışa bağlı olarak hücre zararlanması (MDA miktarı üzerinden) bakımından, sadece tuz (100 mM NaCl) uygulanmış bitkilere oranla azalma ortaya çıktığı belirlenmiştir. Prolin ilave edilen besin ortamlarında yetiştirilen bitkilerin bünyesindeki prolin miktarı ortalama olarak %169-320 oranında artış göstermiştir. Tuzlu koşullar altında hücrelerde meydana gelen zararlanma %171-375 oranında seyrederken, prolin uygulaması ile birlikte MDA miktarında azalma meydana gelmiş, 10 mM prolin uygulaması ile bu oran %115-201 düzeyine kadar düşmüştür (Bayat ve ark., 2012). Prolin uygulaması ile MDA miktarı arasındaki negatif korelasyonun nedenleri arasında, prolinin enzim aktivitelerindeki olumlu etkisinin hücrede meydana gelen zararlanmanın da önüne geçmesi olduğu düşünülmektedir. Nitekim Mansour (1998), dışarıdan prolin veya glisinbetain uygulaması ile tuza toleransın arttırılabileceğini ve tuz stresi koşullarında hücre membranının korunabileceğini bildirirken; Banua ve ark. (2009)

da, prolinin antioksidatif savunma mekanizmasını kapsayan enzim aktivitelerinde artışı sağlayarak tuza tolerans özelliğini geliştirdiğini rapor etmişlerdir. Campos ve ark. (2011), dışsal prolin uygulamasının reaktif oksijen türevlerinin oluşumunun hızlanarak SOD, CAT, APX ve GR gibi enzimlerin aktivasyonunu artırabileceğini bildirmişlerdir. Benzer sonuçlar Ahmed ve ark. (2010) tarafından da saptanmış olup, zeytinde tuz stresi karşısında SOD, CAT ve APX gibi enzim aktivitelerinde artış meydana geldiği, dışsal prolin uygulamaları ile enzim aktivitelerindeki bu yükselmenin pozitif yönde etkilediği gösterilmiştir. Bunlardan başka Carvalho ve ark. (2013) ile Ali ve ark. (2013) da dışsal prolin uygulamalarına bağlı olarak enzim aktivitelerinde artış meydana geldiğini bildirmişlerdir. Huang ve ark. (2013) ise prolin sentezinde görev yapan P5CS geni aktarılmış *Helianthus tuberosus* L. bitkilerinde tuz stresi karşısında enzim aktivitelerinde artış meydana geldiğini ortaya koymuşlardır.

Prolin, önemli bir ozmoregülatör olmasının yanı sıra, serbest oksijen radikallerinin zararlı etkilerinin ortadan kaldırılmasında da, antioksidant enzim sistemlerini harekete geçirmek ve olumlu yönde etkilemek suretiyle etkili olmaktadır. Tuza toleransı yüksek ve tuza duyarlı iki farklı kabak türüne ait yerel genotiplerin materyal olarak kullanıldığı bu çalışmada, tuz stresi genel olarak antioksidatif enzim aktivitelerinde artışa yol açmış, prolin uygulamaları ise bu aktiviteleri güçlendirmiştir. *C. moshata* türüne ait yerel genotip, *C. pepo* türüne ait olana göre stres koşulları altında daha yüksek enzim aktivitesi sergilemiş, bu etki prolin uygulamasıyla olumlu bir şekilde artmıştır. Sonuç olarak prolin uygulamalarının, tuz stresinin yol açtığı zararlı etkilerin azaltılmasında olumlu etki yapabilecek fizyolojik temelli bir yardımcı uygulama olarak değerlendirilmesi olası görülmüştür.

#### Kaynaklar

- Ahmed, C. B., Rouina, B. B., Sensoy, S., Boukhriss, M., Abdullah, F. B., 2010. Exogenous proline effects on photosynthetic performance and antioxidant defense system of young olive tree. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58 (7), 4216–4222.
- Ali, Q., Anwar, F., Ashraf, M., Saari, N., Perveen, R., 2013. Ameliorating effects of exogenously applied proline on seed composition, seed oil quality and oil antioxidant activity of maize (*Zea mays* L.) under drought stress. *Int. J. Mol. Sci.* 14(1), 818-835.
- Anonymous, 2012. Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK). <http://tuikapp.tuik.gov.tr>

- Asraf, M. ve Foolad, M. R., 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany* 59, 206-216.
- Athar, H., Ashraf, M., Wahid, A., Jamil, A., 2009. Inducing salt tolerance in canola (*Brassica napus* L.) by exogenous application of glycinebetaine and proline: response at the initial growth stages. *Pak. J. Bot.* 41, (3): 1311-1319.
- Banua, M. N. A., Hoquea, M. A., Watanabe-Sugimoto, M., Matsuoka, K., Nakamura, Y., Shimoishia, 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: 146-156.
- Bayat, R., Kuşvuran, Ş., Üstün, A. S., Ellialtıoğlu, Ş., 2012. Tuza tolerans özelliği farklı iki kabak genotipine ait fidelere yapılan dışsal prolin uygulamalarının etkileri üzerinde araştırmalar. 9. *Ulusal Sebze Tarımı Sempozyumu*, 12-14 Eylül, Konya, 456-460.
- Büyük İ., Aydın, S. S., Aras, S., 2012. Bitkilerin stres koşullarında verdiği moleküler cevaplar. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 69 (2), 97-110.
- Campos, M. K. F., Carvalho, K., Souza, F. S., Marur, C. J., Pereira, L. F. P., Filho, J. C. B., Vieira, L. G. E., 2011. Drought tolerance and antioxidant enzymatic activity in transgenic 'Swingle'citrumelo plants over-accumulating proline. *Environmental and Experimental Botany* 72, 242–25.
- Carvalho, K., Freitas de Campo, M. K., Domingues, D. S., Pereira, L. F. P., Vieira, L. G. E., 2013. The accumulation of endogenous proline induces changes in gene expression of several antioxidant enzymes in leaves of transgenic Swingle citrumelo. *Molecular Biology Reports* 40 (4), 3269-3279.
- Çakmak, I., Marschner, H., 1992. Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase and glutathione reductase in bean leaves. *Plant Physiology* 98, 1222-1226.
- Çakmak, I., Atli, M., Kaya, R., Evliya, H., Marschner, H., 1994. Association of high light and zinc deficiency in cold-induced leaf chlorosis in grapefruit and mandarin trees. *Journal of Plant Physiology* 146, 355-360.
- Deivanai, S., Xavier, R., Vinod, V., Timalata, K., Lim, O. F., 2011. Role of exogenous proline in ameliorating salt stress at early stage in two rice cultivars. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry* 7 (4), 157-174.
- Dionisio-Sese, M. L., Tobita, S., 1998. Antioxidant responses of rice seedling to salinity stress. *Journal of Plant Science* 135, 1-9.
- Dixit, V., Pandey, V., Shyam, R., 2001. Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L.cv. Azad). *Journal of Experimental Botany* 52 (358), 1101-1109.
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Fujita, M., 2013. Plant response to salt stress and role of exogenous protectants to mitigate salt-induced damages. (in: *Ecophysiology and Responses of Plants under Salt Stress*, Eds: P.Ahmad et al.), pp: 25-87.
- Hasegawa, P. M., Bressan, R. A., Handa, A. K., 1986. Cellular mechanism of salinity tolerance. *HortScience* 21, 1317–1324.
- Hoagland, D. R., Arnon, D., 1938. The water culture method for growing plants without soil. *Journal Circular California Agricultural Experiment Station*. No. 347.
- Hong, Z., Lakkineni, K., Zhnag, Z., Verma, D. P. S. 2000. Removal of feedback inhibition of  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. *American Society of Plant Physiologists* 122 (4), 1129-1136.
- Hossain, M. A., Fujita, M., 2010. Evidence for a role of exogenous glycinebetaine and proline in antioxidant defense and methylglyoxal detoxification systems in mung bean seedlings under salt stress. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 16 (1), 19-29.
- Hoque, M. A., Okuma, E., Banu, M. N. A., Nakamura, Y., Shimoishi, Y., Murata, Y., 2007. Exogenous proline mitigates the detrimental effects of salt stress more than exogenous betaine by increasing antioxidant enzyme activities. *Journal of Plant Physiology* 164, 553-561.
- Huang, Z., Zhao, L., Chen, D., Liang, M., Liu, Z., Shao, H., Long, X., 2013. Salt stress encourages proline accumulation by regulating proline biosynthesis and degradation in jerusalem artichoke plantlets. *PLoS one* 8 (4), 62-85
- Jaarsma, R., Vries, R. S. M., Boe, A. H., 2013. Effect of salt stress on growth, Na<sup>+</sup> accumulation and proline metabolism in potato (*Solanum tuberosum*) cultivars. *PLoS One* 8 (3), 1-10.
- Joyce, P. A., Aspinall, D., Paley, L. G. 1992. Photosynthesis and the accumulation of proline in response to water deficit.

- Australian Journal of Plant Physiology* 19, 249-261.
- Levitt, J., 1980. Responses of plants to environmental stresses. Vol. I Chilling, freezing, and high temperature stress (London, NewYork, Toronto: Academic Press), 607.
- Kaya, C., Tuna, A. L., Ashraf, M., Altunlu, H. 2007. Improved salt tolerance of melon (*Cucumis melo* L.) by the addition of proline and potassium nitrate. *Environmental and Experimental Botany* 60, 397-403.
- Köse, Ş., 2011. Türkiye’de Yetiştirilen Bazı Kabak Türlerinde (*Cucurbita sp.*) Kuraklık Stresine Tolerans Bakımından Genotipik Varyasyonun Belirlenmesi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, *Fen Bilimleri Enstitüsü*, Yüksek Lisans Tezi, Van, 100 s.
- Lehmann, S., Funck, D., Szabados, L., Rentsch, D., 2010. Proline metabolism and transport in plant development. *Amino Acids* 39, 949-962.
- Mansour, M. M. F., 1998. Protection of plasma membrane of onion epidermal cells by glycinbetaine and proline against NaCl stress. *Plant Physiology Biochemistry* 36 (10), 7647-772.
- Matysik, J., Bhalu, B., Mohanty, P., 2002. Molecular mechanism of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. *Current Science Association*, 82: 525–532.
- Marin, J. A., Andreu, P., Carrasco, A., Arbeloa, A., 2010. Determination of proline concentration, an abiotic stress marker, in root exudates of excised root cultures of fruit tree rootstocks under salt stress. *Revue des Régions Arides – Numéro spécial – 24 (2/2010) Actes du 3ème Meeting International “Aridoculture et Cultures Oasisennes: Gestion et Valorisation des Ressources et Applications Biotechnologiques dans les Agrosystèmes Arides et Sahariens”* Jerba (Tunisie), 722-727.
- Miller, G., Suzuki, N., Yılmaz, S. C., Mittler, R., 2010. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant, Cell and Environment*, 33: 453–467.
- Misra, N., Gupta, A. K., 2005. Effect of salt stress on proline metabolism in two high yielding genotypes of green gram. *Plant Sci.* 169: 331-339.
- Mittiova, V., Tal, M., Volokita, M., 2002. Salt stress induces up-regulation of N efficient chloroplast antioxidant system in the salt-tolerant wild tomato species *Lycopersicon pennellii* but not in the cultivated species. *Physiologia Plantarum* 115, 393-400.
- Molazem, D., Qurbanov, E. M., Duniyaliev, S. A., 2010. Role of proline, Na and chlorophyll content in salt tolerance of corn (*Zea mays* L.). *American-Eurasian Journal Agriculture Environment Science* 9 (3), 319-324.
- Nawaz, K., Talat, A., Iqra, Hussain, K., Majeed A., 2010. Induction of salt tolerance in two cultivars of sorghum (*Sorghum bicolor* L.) by exogenous application of proline at seedling stage. *World Applied Sciences Journal* 10 (1), 93-99.
- Nounjan, N., Theerakulpisut, P., 2012. Effects of exogenous proline and trehalose on physiological responses in rice seedlings during salt-stress and after recovery. *Plant Soil Environ.* 58 (7), 309–315.
- Öztekin, G. B., 2009. Aşılı Domates Bitkilerinde Tuz Stresine Karşı Anaçların Etkisi. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, İzmir, 342 s.
- Sanchez, E., Avila-Quezada, G., Gardea, A. A., Ruiz, J. M., Romero, L. 2007. Biosynthesis of proline in fruits of green bean plants: deficiency versus toxicity of nitrogen. Deficiency versus toxicity of nitrogen. *Phyton* 76, 143–152.
- Scandalios, J. G., 1997. Oxidative stress and molecular biology of antioxidant defenses. Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses. *Cold Spring Laboratory Pres.* 890 pp.
- Sevengör, Ş., 2010. Kabakta (*Cucurbita pepo* L.) Tuz Stresine Toleransın Belirlenmesinde Antioksidant Enzim Aktivitelerinin *in vitro* ve *in vivo* Olarak İncelenmesi. Ankara Üniversitesi, *Fen Bilimleri Enstitüsü*, Doktora Tezi, Ankara, 165 s.
- Sevengör, S., Yasar, F., Kusvuran, S., Ellialtıoğlu, S., 2011. The effect of salt stress on growth, chlorophyll content, lipid peroxidation and antioxidative enzymes of pumpkin seedling. *African Journal of Agricultural Research* 6 (21), 4920-4924.
- Shalata, A., Mittova, V., Volokita M., Guy, M., Tal, M., 2001. Response of cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to salt dependent oxidative stress: The root antioxidative system. *Physiologia Plantarum* 112, 487-494.
- Shigeoka, S., Ishikawa, T., Tamoi, M., Miyagawa, Y., Takeda, T., Yabuta, Y., Yoshimura, K., 2002. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany* 53 (372), 1305-1319.



- Singh, T. N., Aspinall, D., Paleg, L. G., Boggess, S. F., 1973. Changes in proline concentration in excised plant tissues. *Australian Journal Biology Science*, 26: 57-63.
- Szabados, L., Savoure, A., 2009. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science*, 15 (2): 89-97.
- Talat, A., Nawaz, K., Hussian, K., Bhatti, K. H., 2013. Foliar application of proline for salt tolerance of two wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *World Applied Sciences Journal*, 22 (4): 547-554.
- Tıprıdamaz, R., Karakullukçu, Ş., 1993. Prolin ve glisinbetain'in, tuzlu koşullarda kültüre alınmış domates embriyolarının gelişmesi ve bazı içsel madde değişimleri üzerine etkileri. *Doğa-Tr. J. of Botany*, 17: 57-64.
- Turan, M. A., Elkarim, A. H. A., Taban, N., Taban, S., 2009. Effect of salt stress on growth, stomatal resistance, proline and chlorophyll concentrations on maize plant. *African Journal of Agricultural Research*, 4 (9): 893 – 897.
- Yan, Z., Guo, S., Shu, S., Sun, J., Tezuka, T., 2011. Effects of proline on photosynthesis, root reactive oxygen species (ROS) metabolism in two melon cultivars (*Cucumis melo* L.) under NaCl stress. *African Journal of Biotechnology*, 10 (80): 18381-18390.