

Araştırma Makalesi

110R ANACI ÜZERİNE AŞILI ŞIRAZ ÜZÜM (*Vitis vinifera* L.) ÇEŞİDİNİN NaCl VE PROLİN UYGULAMALARINA KARŞI FİZYOLOJİK VE BİYOKİMYASAL TEPKİLERİMustafa ÖZDEN^{1*}, Murat DİKİLİTAŞ², Sadettin GÜRSÖZ, Bekir E. AK¹**ÖZET**

Bitkilerde moleküler düzeyde stres tolerans mekanizmasının tam olarak anlaşılabilmesi, ıslah programlarının stres koşullarına toleranslı bitki çeşitleri geliştirmedeki başarı düzeyini sınırlamaktadır. Islah programlarına alternatif olarak, stres koşulları altında yetiştirilen bitkilerin tolerans seviyelerini artırmak için prolin gibi farklı organik bileşiklerin kullanımı artmaktadır. Bu çalışmada, NaCl stresi altında yetiştirilen Şiraz üzüm çeşidinin NaCl ve prolin uygulamalarına fizyolojik ve biyokimyasal tepkileri araştırılmıştır. İyon akışı (EL), sürgün büyüme oranı (SBO), klorofil, prolin, malondialdehit (MDA), ve süperoksit dismutaz (SOD), peroksidaz (POD), katalaz (CAT), polifenol oksidaz (PPO) gibi antioksidan enzim aktiviteleri ölçülmüştür. NaCl stres seviyesine bağlı olarak, yaprak hücrelerindeki iyon akışı, klorofil degradesyonu, prolin ve MDA miktarlarında bir artış ölçülürken, prolin uygulanan gruplardan alınan yaprak örneklerinde ise bu parametrelerde azalmalar belirlenmiştir. Araştırmada kullanılan prolin konsantrasyonları farklı seviyedeki NaCl stres koşullarında yetiştirilen Şiraz üzüm çeşidinin antioksidan enzim sistemi üzerinde kısmi olarak etkili olduğu gözlemlenmiştir. Araştırmanın sonuçları, prolinin, bitki hücre zarı faz değişimi, lipid peroksidasyonu ve antioksidan enzim sistemlerinde aktif rol almış olabileceğini işaret etmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Vitis vinifera* L., NaCl, Prolin, İyon akışı, Klorofil, Antioksidan enzimler

PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL RESPONSES OF SYRAH VINES (*Vitis vinifera* L.) GRAFTED ON 110 R ROOTSTOCK TO NaCl AND PROLINE APPLICATIONS**ABSTRACT**

The success of breeding programs aimed stress tolerant plant varieties is limited by the lack of understanding of the molecular basis of salt tolerance. Alternatively to the breeding programs, the tolerance level of plants grown under stress conditions has been increased by using various organic solutes such as proline. In this study, physiological and biochemical responses of Syrah vines to NaCl stress and exogenously proline application were investigated. Electrolyte leakage (EL), shoot growth rate (SBO) chlorophyll, proline, malondialdehyde (MDA), and some of the antioxidant enzyme activities including superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD), catalase (CAT), and polyphenol oxidase (PPO) were measured. Depended upon NaCl levels, an increase in electrolyte loss, chlorophyll degradation, proline, and MDA levels were observed. However, with the application of proline, these parameters were ameliorated in part. Proline concentrations used in this study were moderately effective on antioxidant enzyme system of Syrah grapevines grown under NaCl stress conditions. Our results may imply that the mechanism controlled by proline may involve effects on membrane phase changes, lipid peroxidation, and antioxidant enzyme systems.

Key words: *Vitis vinifera* L., NaCl, Proline, Electrolyte leakage, Chlorophyll, Antioxidant enzymes

*Araştırma HÜBAK (HÜBAK/531) tarafından desteklenmiştir.

¹Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, Şanlıurfa

²Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, Şanlıurfa

*Sorumlu Yazar: mozden@harran.edu.tr (M. Özden)

GİRİŞ

Çok eski bir bağcılık kültürüne sahip olan ülkemiz, TÜİK'in 2009 yılı verilerine göre 479.239 hektar bağ alanı ve 4,264.720 ton üretimi ile dünyada önemli bağcı ülkelerden birisidir. Güneydoğu Anadolu, gerek bağ alanı gerekse üzüm üretimi yönüyle 4. sırada yer alan önemli bir bölgemizdir (Çelik ve ark., 1998). Bugüne kadar yapılan bir çok araştırma sonuçlarına göre, asmanın (*Vitis vinifera* L.) tuzluluğa karşı orta derecede bir dayanım gösterdiği (Downtown, 1977; McCarty ve ark., 1992) ve tuzluluktan dolayı bitkide meydana gelen zararın özellikle de klor iyonlarından kaynaklandığı belirlenmiştir (Williams ve Matthews, 1990; Walker, 1994). Bununla beraber asmanın tuzluluğa karşı fizyolojik, biyokimyasal tepkileri veya dayanım derecesi birçok faktörlere bağlı olduğu konusu üzerinde durulmuş ve bunlardan bazılarının anaç-kalem kombinasyonu, sulama sistemleri, iklim ve toprak türü olduğu belirlenmiştir. Bütün bu faktörlerin bitkinin fizyolojik ve biyokimyasal işlevlerini farklı derecede etkileyebileceği belirtilmiştir (Fisarakis ve ark., 2001). Genel olarak tuz stresi altındaki bitkilerin yapraklarında iyon birikimi olmakta ve bu iyon birikimi bitkinin net fotosentez düzeyinde bir azalmaya dolayısıyla bitki büyümesinde bir yavaşlamaya neden olmaktadır. Özellikle Na⁺ ve Cl⁻ iyonlarının birikimi hücre içi iyon dengesini bozmakta, kök hücrelerinin seçici geçirgen özelliği bozularak özellikle potasyumun alımını azaltmaktadır (Gadallah, 1999). Walker ve ark., (1981)'nin yapmış oldukları bir çalışmada, anaçsız olarak yetiştirilen Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidinde, NaCl stresinden dolayı stomaların etkilendiği ve fotosentez hızında önemli bir düşüş olduğu bildirilmiştir. Stres koşulları altındaki bitkide fizyolojik olarak en fazla hüresel zararlanma, membranların yapısının bozulması olarak ortaya çıkmakta ve tuzluluk, don, yüksek sıcaklık ve kuraklık gibi stres koşullarına dayanıklılığın belirlenmesi için yapılan ölçümlerin başında da membranların zararlanma düzeylerinin belirlenmesi gelmektedir. Lin ve ark., (2002)'nin tuz stresi (50–200 mM NaCl) altında tutulan pirinç bitkisinin (*Oryza sativa* cv. Taichung Native 1) yapraklarında glutamine tarafından sentezlenen proline birikimi görülmüş olup bu proline birikimine tuz stresinin sebep olduğu açıkça ortaya konmuştur. Ayrıca birçok araştırmanın sonuçları, stres koşulları altında, prolinin yapraklarda geçici olarak birikmesi hücrelerin

turgor basıncının korunması, enzimlerin fonksiyonlarının korunması, makromoleküllerin ve hücre organellerinin yapılarının stabilizasyonu açısından son derece önemli olduğunu göstermektedir. Gadallah (1999)'ın yapmış olduğu bir çalışmada, tuz stresi (NaCl ve CaCl) altında yetiştirilen bakla (*Vicia faba* L. cv. Calvor 103) çeşidine dıştan proline (8.7 uM) ve glycinebetaine (8.5 uM) uygulaması, membrane zararlanmasını azalttığı, K⁺ alımı, klorofil miktarı ve bitki büyümesini artırdığı görülmüştür. Bütün bu bilgilere ek olarak, stres faktörlerinin etkisi altında kalan bitkilerin hücrelerinde aktif oksijen türlerinin oluşumu ve bunların detoksifikasyonunun dengesi bozulmaktadır. Scandalios, (1993); Gutteridge, (1977); Winston, (1990); Elstner, (1982)'nin yapmış oldukları çalışmalarda stres koşulları altında oluşan bu toksik oksijen bileşikleri hücreye zarar verip, lipid peroksidasyonu, DNA zararlanması ve protein denatürasyonuna sebep olduğu belirlenmiştir. Normal büyüme ve gelişme şartları altında, aktif oksijen türleri normal olarak bitki hücrelerinde düşük seviyede ortaya çıktığı ve hücrelerin bu toksik aktif oksijen bileşiklerinden zararlanması antioksidant enzimler tarafından korunduğu belirtilmiştir. Bu antioksidant enzimler süperokside dismutaz (SOD; EC 1.15.1.1), katalaz (CAT; EC 1.11.1.6) ve peroksidaz (POD; EC 1.11.1.7) olup, detoksifikasyon sürecinde yer alan enzimler O⁻² radikalini H₂O₂ ye daha sonra H₂O₂'di su ve oksijene dönüştürdüğü açıkça ortaya konmuştur.

Bu çalışmada, farklı konsantrasyonlarda NaCl içeren ortamlarda yetiştirilen 110R anaçı üzerine aşılı asma fidanlarının NaCl stresi ve proline uygulamalarına karşı göstermiş olduğu bazı fizyolojik ve biyokimyasal tepkileri belirlemeyi amaçlamıştır. Bu amaçla fizyolojik ölçüm ve değerlendirme parametrelerinden bitki hücrelerinin EL, MDA, klorofil, proline düzeyleri ve sürgünlerin büyüme oranlarının (SBO) yanısıra biyokimyasal olarak SOD, CAT, POD ve polifenol oksidaz (PPO; EC 1.10.3.1) antioksidant enzim aktiviteleri ölçülmüştür. Araştırmada bitkisel materyal olarak kullanılan Şiraz üzüm çeşidi GAP bölgesi için yeni ve dünyaca ünlü bir kırmızı şaraplık çeşittir.

MATERYAL ve METOT

Bitki Materyali

Bu çalışma 2005 - 2006 yıllarında, Harran Üniversitesi, Ziraat Fakültesi uygulama-araştırma alanı ve bitki biyoteknoloji

laboratuvarında yürütülmüştür. Bu araştırmada bitki materyali olarak, sürgünleri iki göz ve kök budaması yapılmış 110R (*Vitis berlandieri* x *V. rupestris*) anacı üzerine aşılanmış, homojen yapıda olan bir yaşlı Şiraz asma fidanları kullanılmıştır. Fidanların dikimi, 15 Mart 2005 tarihinde, torf, kum ve perlit (1:1:1) içeren 10 litrelik saksılara yapılmıştır. Büyüme ve gelişmelerine dış koşullarda devam eden asma fidanlarına, kök bölgesi nem düzeylerine bağlı olarak, her sulamada iyonize suda çözülmüş ½ Hoagland (Hoagland ve Arnon, 1950) besin çözeltisinden 1'er litre uygulanmıştır. Asma fidanlarında gözler sürdükten belirli bir süre sonra yeşil budama işlemi gerçekleştirilmiş ve daha sonra deneme tek sürgünlü asma fidanları üzerinde yürütülmüştür.

NaCl ve Prolin Uygulamaları

Asma fidanlarının sürmesinden itibaren yaklaşık 6 hafta süresince bitkilere herhangi bir stres faktörü uygulamaksızın ½ Hoagland besin çözeltisi verilerek büyüme ve gelişmeleri sağlanmıştır. Bu sürenin sonunda tesadüfi olarak seçilen, yaklaşık olarak 30 cm sürgün uzunluğu ve 8 - 10 adet yaprağa sahip olan homojen asma fidanlarının besin solüsyonlarına sulama sularıyla birlikte değişik konsantrasyonlarda NaCl uygulanmıştır. Denemede bitkilere 0, 50, 100 ve 150 mM NaCl uygulanmıştır. Uygulama konularının konsantrasyonlarının hazırlanmasında çözücü olarak ½ Hoagland besin çözeltisi kullanılmıştır. Kontrol bitkilerine sadece ½ Hoagland besin çözeltisi verilmiştir. NaCl stresi uygulamasıyla eş zamanlı olarak bitki yapraklarına 0, 5, 15 mM prolin uygulanmıştır. NaCl stresi uygulanan asma fidanları stress koşullarında 5 hafta tutulmuştur. Beş haftalık NaCl + prolin uygulama süresinin sonunda bitkiler üzerinde fizyolojik ve biyokimyasal analizler yapılmıştır.

Hücre Membran Stabilitesi

Hücre membran stabilitesinin ölçümü Gadallah (1995) yöntemine göre yapılmış olup kontrol, tuz, prolin veya NaCl + prolin uygulaması yapılmış bitkilerden yaklaşık olarak 1 g yaprak diski alınarak 10 ml lik saf su içinde 24 saat süreyle çalkalayıcıda 100 rpm de tutulmuşlardır. Daha sonra bütün örneklerin elektriksel iletkenliği (EC; Electrical Conductivity) otoklavlamadan önce EC metre ile ölçülmüştür (EC₁). Daha sonra aynı örnekler 120 °C de 15 dakika otoklavda bekletildikten sonra, örnekler oda sıcaklığında soğutulularak ikinci defa örneklerin elektriksel iletkenlikleri

ölçülmüştür (EC₂). Hücreden elektron sızmaları (EL; electrolyte leakage) yüzde olarak (EC₁/EC₂) X 100 belirlenmiştir.

Sürgün Büyüme Oranı

Sürgün büyüme oranı (SBO), uygulamanın başlangıcında ve sonunda ölçülen sürgün uzunluklarının farkıdır.

SBO = (U_s - U_b) / (t_s - t_b) formülü kullanılarak hesap edilmiştir. (U_s, deneme sonundaki sürgün uzunluğu, U_b, deneme başlangıcındaki sürgün uzunluğu, t_s, son ölçümün yapıldığı zamana kadar geçmiş olan zaman, t_b, ilk ölçümün yapıldığı zamana kadar geçmiş olan zaman).

Klorofil Analizi

Örneklerin toplam klorofil miktarları Arnon metoduna (Arnon, 1949) göre belirlenmiştir. 1 g asma yaprağı tartılarak porselen havan içerisinde 5 veya 6 ml % 80 lik aseton içinde homogenize edildikten sonra hazırlanan örnekler kaba filtre kağıdından 10 ml lik cam tüplere süzümüştür. Elde edilen süzüğün hacmi 10 ml oluncaya kadar %80 lik asetonla tamamlanmış, spektrofotometrede (UV Visible Shimadzu 1601) 645 ve 663 nm dalga boylarında ölçülmüştür. Örneklerin toplam klorofil içerikleri aşağıdaki formüllere göre hesaplanmıştır. Toplam klorofil (mg/g) = (20.2A₆₄₅ + 8.02A₆₆₃) (H/1000 W). Eşitliklerde: A, absorbans değerini; H, % 80'lik asetonun son hacmini, W, ekstrakte edilen dokunun g olarak yaş ağırlığını göstermektedir.

Prolin Tayini

Prolin ekstraksiyonu ve miktarının belirlenmesi Bates ve ark., (1973)'larına göre yapılmıştır. Asit-ninhidrin karışımı renk maddesi olarak kullanılmıştır. 1.25 g ninhidrin 30 ml glasiyal asetik asit ve 20 ml 6 M fosforik asit içerisinde çözülmüştür. 1 g ağırlığındaki yaprak örnekleri 10 ml % 3'lük sülfosalisilik asit içinde homojenize edilerek homojenat Whatman No: 2 filtre kağıdından geçirildikten sonra 2 ml lik karışım 100 °C de 1 saat kaynatılarak, reaksiyon buz içerisinde sonlandırılmıştır. Absorbans 515 nm'de toluen kontrolüne karşı okunmuştur. Standart olarak önceden hazırlanmış olan farklı konsantrasyonlardaki L-Prolin solüsyonu kullanılmıştır.

Lipid Peroksidaz Aktivitesi

Lipid Peroksidasyonu, thiobarbiturik asit (TBA) reaksiyonu ile ortaya çıkan malondialdehid (MDA) miktarına göre Heath ve Packer (1968) metoduna göre ölçülmüştür. Bu metoda göre 0.5 g örnek 3 ml % 10 luk

trikloroasetik asit (TCA) içinde hazırlanan % 0.25 lik 2-thiobarbiturik asit (TBA) içinde mortar ve pestle kullanarak homojenize edildikten sonra, elde edilen karışım 95 °C'de 30 dakika kadar inkübe edilmiştir. Daha sonra karışım hızlıca buz içerisinde soğutulmuş, 10,000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiş ve elde edilen supernatant 532 nm'de okunmuş ve ölçümler spesifik olmayan 600 nm'deki okumalardan çıkarılarak hata düzeltmeleri yapıldıktan sonra örneklerin MDA kapsamı 'extinction katsayısı' $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ kullanılarak hesaplanmıştır.

Antioksidan Enzim Aktiviteleri

Enzim ekstraktları için, her bir uygulama gruplarına ait 0.3 g taze asma yaprağı sıvı azot içerisinde, 2mM Na-EDTA, ve %1 (w/v) polivinyl-polypirrolidone (PVP) içeren 50 mM lik 2 ml soğuk potasyum fosfat tampon solüsyonu ile ezildi (Badiani ve ark., 1993; Badiani ve ark., 1990). 4 °C ve 10,000 rpm'de 10 dk santrifüj edilen ekstraktlar SOD, CAT, POD, PPO ve protein analizlerinde kullanılmak üzere -84 °C de muhafaza edildi. Örneklerin çözünebilir protein miktarları bovin serum albumin (BSA) standart eğrisi kullanılarak, Coomassie blue dye binding metodu (Bradford, 1976)'na göre ölçülmüştür.

SOD enzim aktivitesi, Chowdhury ve Choudhury (1985) metoduna göre belirlenmiş olup, 3 ml lik reaksiyon karışımı 63 µl nitroblue tetrazolium (NBT), 13 mM methionine, 0.1 mM EDTA, 50 mM fosfat tampon çözeltisi (pH 7.8), 20 µl enzim ekstraktı ve 0.3 mL riboflavin (1.3 µM) den oluşmuştur. Test tüpleri 4000 lükslük floresans lambası altında 5 dakika bekletildikten sonra NBT deki azalma örneklerin 560 nm'deki absorbans değerinin ölçümü ile belirlenmiştir. CAT aktivitesi, Chance ve Maehly (1955) metoduna göre ölçülmüştür. Bunun için 50 mM fosfat tampon çözeltisi (pH 7.0) ve 25 µl enzim ekstraktı içeren 3 ml'lik reaksiyon karışımındaki H₂O₂ ayrışması, 2 dk'lık bir zaman aralığında, 240 nm'de ölçülen absorbans değerindeki azalma ile belirlenmiştir. POD aktivitesi, Change ve Maehly (1955) metoduna göre iki dakikalık bir zaman dilimi içerisinde guaiacol'un oksidasyonunun 470 nm'de ölçülmesi ile belirlenmiştir. Bunun için enzim çözeltisi, 20 µl guaiacol, 10 mM lik 960 µl P-fosfat tampon çözeltisi, 10 µl H₂O₂ ve 10 µl ekstraktan oluşmuştur. PPO aktivitesi Zaubermann ve ark, (1991)'larına göre 4-metil kateşol substrat olarak kullanılmış ve 3 ml'lik küvet 0.2 ml enzim ekstraktı ve 10 mM'lık 2.8

ml 4-metil kateşoldan (0.2 M fosfat çözeltisi, pH 6.3) oluşmuştur. Ayrıca ölçümde kullanılan kör 3 ml 4-metil kateşoldan oluşmuştur. 25 °C, 410 nm'deki artış 5 dakikalık sürede kaydedilerek, absorbanstaki 0.001/d artış bir enzim ünitesi olarak kabul edilmiştir.

İstatistiksel Analiz

Deneme 3 yinelemeli olarak yürütülmüş ve her bir yinelemede en az 3 bitki kullanılmıştır. Denemede faktör olarak kullanılan farklı NaCl ve prolin doz uygulamaları arasındaki farkı belirlemek için elde edilen veriler varyans analizine tabi tutulmuş ve uygulamalar arasındaki farklılıkları belirlemek için LSD (least significant test) testi ($p \leq 0.05$) kullanılmıştır. (SAS Institute Inc., 1995).

ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

NaCl ve prolin uygulamalarına fizyolojik tepkiler

Bitkiler canlılıkları süresince karşılaştıkları kuraklık, yüksek sıcaklık ve tuzluluk gibi abiyotik stress koşullarında temel olarak hücre bütünlüğünü koruma çabası gösterirler. Bunun için morfolojik, fizyolojik, gelişimsel ve moleküler düzeyde bazı adaptasyon mekanizmaları geliştirirler (Bray, 1997). Araştırma sonuçları, artan düzeyde uygulanan NaCl konsantrasyonları, Şiraz üzümünün yaprak hücrelerinin zararlanma düzeyinde (EL), hücrelerin prolin ve MDA içeriklerinde kontrol grubuna göre önemli düzeyde bir artışa sebep olurken, SBO ve klorofil kapsamlarında bir azalışa neden olmuştur. Buna karşılık iki farklı konsantrasyonda dışsal olarak uygulanan prolin dozları farklı NaCl konsantrasyonlarının olumsuz etkilerini azalttığını göstermiştir (Çizelge 1). Araştırmada 0, 50, 100 ve 150 mM'lık NaCl konsantrasyonlarının uygulandığı asma fidanlarından alınan yaprak örneklerinin EL (%) değerleri sırasıyla 28.60, 37.00, 54.70 ve 88.30 olarak ölçülmüştür. En yüksek EL değeri, en yüksek NaCl konsantrasyonunun (150 mM) uygulandığı asma fidanlarının yaprak örneklerinde ölçülmüştür (% 88.30). Buna karşılık en düşük EL değeri (% 28.60) kontrol gruplarındaki bitkilerden ölçülmüştür. Ayrıca 15 mM'lık prolin konsantrasyonunun etkinliği 5 mM'lık proline göre daha önemli bulunmuştur (Çizelge 1). Farklı NaCl ve prolin uygulamalarının SBO üzerine etkileri, aynı uygulamaların EL üzerine etkisine benzer bir eğilim göstermiş fakat 150 mM'lık NaCl uygulamalarında prolin dozlarının etkisi önemsiz bulunmuştur. Araştırma sonuçlarına göre en yüksek klorofil düzeyi kontrol + 15

mM'lık prolin uygulamalarında yer alan asma fidanlarının yaprak örneklerinde ölçülmüşken, en düşük klorofil içeriğine sahip bitkiler 150 mM'lık NaCl uygulamalarında yer alan bitkiler olarak belirlenmiştir. Ayrıca, 150 mM'lık NaCl konsantrasyonu hariç, diğer NaCl dozlarını içeren ortamlarda yetiştirilen ve 15 mM'lık prolin uygulaması yapılan bitkilerin klorofil içerikleri ile kontrol grupları arasında önemli fark belirlenmiş olup 15 mM'lık prolin uygulamasının bitki yapraklarının klorofil miktarlarının korunması üzerine olumlu etkisi açıkça ortaya konmuştur. (Çizelge 1). Araştırmada 150 mM NaCl + prolin uygulamalarının dışındaki diğer tuz ve prolin uygulamalarına ait bitkilerin prolin içerikleri arasındaki fark önemli bulunmuştur. En yüksek prolin 50 mM NaCl + 15 mM prolin uygulamasındaki bitkilerden alınan yaprak örneklerinde ölçülmüştür ($1.46 \mu\text{mol g}^{-1}$ fwt). Buna ek olarak artan tuz stresine karşılık bitkilerdeki prolin birikimlerinde önemli azalışlar olduğu belirlenmiştir (Çizelge 1). Araştırma sonuçlarına göre, NaCl konsantrasyonu arttıkça bitki hücrelerindeki stresin bir göstergesi olarak kabul edilen thiobarbiturik asit (TBA) reaksiyonuyla ortaya çıkan MDA miktarında da önemli düzeyde farklılıklar belirlenmiştir. 15 mM'lık prolinin olumlu etkisi 50 mM'lık NaCl stresinin uygulandığı grupta yer alan bitkilerde daha açık görülmüştür. Fakat artan NaCl stresine paralel olarak prolin uygulamalarının MDA oluşumunun azaltılması üzerine etkileri arasındaki fark önemsiz bulunmuştur (Çizelge 1). Bitkilerin hücresel düzeyde MDA, H_2O_2 kapsamları ve EL seviyeleri oksidatif stresin sonucu olarak hücrelerin zararlanma seviyelerini yansıtır (Dhinsa ve ark., 1981). Araştırmada ölçülen fizyolojik parametreler birlikte değerlendirildiğinde, artan NaCl stresi koşullarında 110R anacı üzerine aşılı Şiraz üzümünün yaprak hücrelerinin zararlanma düzeyinde (EL), prolin ve MDA içeriklerinde kontrol grubuna göre önemli düzeyde bir artışa sebep olurken, SBO ve klorofil kapsamlarında da bir azalışa neden olmuştur. Buna karşılık iki farklı dozda dışsal olarak uygulanan prolinin farklı seviyelerdeki NaCl stresinin olumsuz etkilerini azalttığını göstermiştir (Şekil 1). Bu araştırmanın sonuçlarına paralel olarak farklı bitki türlerinde abiyotik stres faktörlerinin hücrede prolin birikimine, MDA konsantrasyonu ve EL oranında artışa, bitki büyümesinde ise bir durgunluğa ve klorofil miktarında azalışa sebep olduğu daha önceki birçok araştırmada rapor edilmiştir (Ehsanpour

ve Fatahian, 2003; Woodward ve Bennett, 2005; Sairam ve ark., 2005; Kaya ve ark., 2007; Ozden ve ark., 2009).

NaCl ve prolin uygulamalarına biyokimyasal tepkiler

Normal büyüme koşulları altında, bitkilerin sahip oldukları antioksidatif sistemler bitki hücrelerinde normal olarak oluşan serbest radikallerin detoksifikasyonu için yeterlidir. Fakat bitkiler stres koşulları altında enzimatik savunma sistemlerini de aktif hale getirir (Hideg, 1997). Bu araştırmada, Şiraz asma fidanlarının gelişmelerinin belirli bir aşamasında farklı NaCl stres seviyeleri ve prolin uygulamalarına göstermiş oldukları enzimatik (SOD, CAT, POD ve PPO) tepkiler ölçülmüştür (Çizelge 2). Genellikle antioksidan enzim aktiviteleri stres koşullarında artmakta ve bazı durumlarda bitkilerin stres faktörlerine tolerans düzeyi ile enzim aktiviteleri arasında pozitif bir korelasyonun olduğu belirtilmektedir (Ozden ve ark., 2009). Bu araştırmada da SOD enzim aktivitesi artan NaCl stresine paralel olarak artmış fakat 150 mM'lık NaCl stresinde SOD aktivitesi düşmüştür. Ayrıca araştırmada kullanılan prolin dozları, NaCl stresi uygulanmayan kontrol bitkilerinin ve 50 mM'lık NaCl stresi uygulanan bitkilerinin SOD aktivitesini artırırken, benzer artış 100 ve 150 mM'lık NaCl stresi altındaki bitkilerde belirlenmemiştir. Kısaca, araştırmada kullanılan prolin dozlarının SOD aktivitesi üzerine kısmi bir etkisi görülmüş fakat bu olumlu etki artan NaCl stresiyile birlikte önemli bulunmamıştır (Çizelge 2). Benzer bir eğilimle CAT ve POD aktiviteleri artan NaCl stresine bağlı olarak artmış, fakat prolin dozlarının enzim aktiviteleri üzerine olumlu etkisi kısmi seviyede kalmış ve istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. PPO aktivitesi stressiz koşullarda $24.90 \text{ Umg protein}^{-1}$ olarak ölçülmüşken, 5 ve 15 mM'lık prolin uygulanan bitkilerden alınan yaprak örneklerindeki PPO aktivitesi sırasıyla 26.00 ve $24.00 \text{ Umg protein}^{-1}$ olmuştur. Daha sonra artan NaCl stresine bağlı olarak PPO aktivitesi artmış ve en yüksek PPO aktivitesi en yüksek NaCl stresi uygulanan (150 mM NaCl) bitkilerin yaprak örneklerinde kaydedilmiştir. Daha sonra farklı NaCl stresi + prolin uygulanmış bitkilerin PPO aktivitelerinde bir azalma kaydedilmiştir. PPO aktivitesindeki bu düşüş prolinin biyokimyasal etkisiyle ilişkili olabilir. Prolin dozlarının bu etkisi NaCl stres seviyeleri arasında önemli bulunmamıştır (Çizelge 2). Özellikle NaCl ve kuraklık gibi abiyotik stres koşullarında bitki

hücrelerinde farklı düzeyde prolin birikiminin bitki türüne, bitkinin gelişim aşamasına, stresin seviyesi ve süresine bağlı olduğu rapor edilmiştir (Delauney ve ark., 1993; Kohl ve ark., 1991). Prolinin serbest radikallerin detoksifikasyonundan sorumlu sistemlerin mekanizması, proteinlerin, zarların ve hücresel yapıların ve fonksiyonlarının korunması üzerine etkili olduğu belirtilmektedir (Bohnert ve Shen, 1999). Bu çalışmada da prolinin NaCl stresinin olumsuz etkilerini ortadan

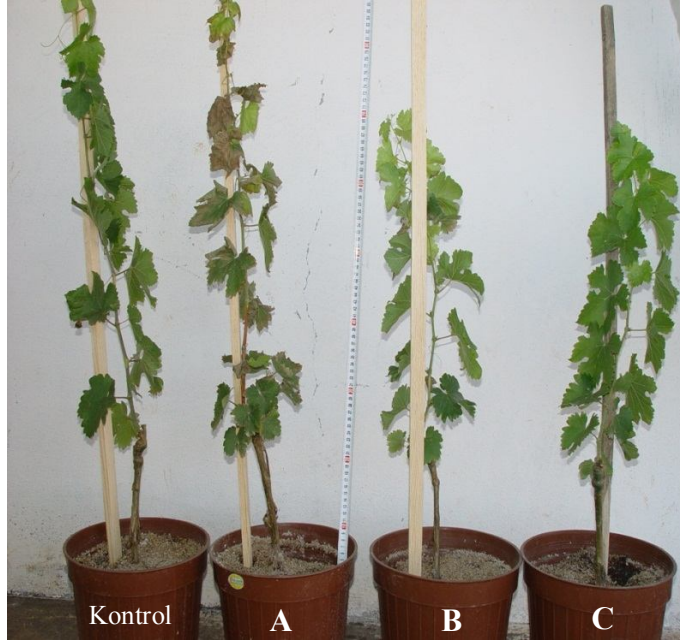
kaldırma veya azaltmadaki olumlu etkileri fizyolojik ve biyokimyasal analizlerle belirlenmiştir. Sonuç olarak uygulamasının pratik oluşu, hem dayanıklılığı arttırmada hem de stres koşullarında iyileştirici etkilerinin yanında diğer kimyasallara göre ucuz ve çevre dostu olması prolinin kullanılmasını önemli kılmaktadır. Fakat ileriki çalışmalarda, stres faktörüne, şiddetine ve süresine bağlı olarak kullanılacak prolin dozu eşik değerinin üzüm çeşitleri için belirlenmesi gerekmektedir.

Çizelge 1. 110R Anacı Üzerine Aşılı Şiraz Üzüm Çeşidinin NaCl ve Prolin Uygulamalarına Fizyolojik Tepkileri.

UYGULAMALAR						
NaCl (mM)	Prolin (mM)	EL (%)	SBO (cm)	Klorofil (mg g ⁻¹)	Prolin (µmol g ⁻¹ fwt)	MDA (µmol g ⁻¹ fwt)
0	0	28.60 _{fg}	0.63 _{bc}	5.63 _{dc}	0.13 _h	5.00 _f
0	5	28.00 _{fgh}	0.66 _{bc}	6.45 _{ab}	1.10 _d	5.10 _f
0	15	24.80 _h	0.93 _a	6.62 _a	1.39 _b	7.11 _f
50	0	37.00 _d	0.38 _{de}	6.27 _{ab}	1.05 _d	17.00 _c
50	5	34.40 _{de}	0.53 _{cd}	6.40 _{ab}	1.25 _c	15.08 _d
50	15	30.80 _f	0.77 _b	6.53 _a	1.46 _a	12.23 _e
100	0	54.70 _c	0.30 _{ef}	5.17 _d	0.23 _g	25.05 _a
100	5	31.00 _{ef}	0.44 _{de}	6.01 _{bc}	0.32 _f	22.04 _b
100	15	26.60 _{gh}	0.46 _d	6.21 _{bc}	0.59 _e	20.01 _b
150	0	88.30 _a	0.15 _f	1.80 _f	0.15 _h	25.09 _a
150	5	70.10 _b	0.20 _f	2.16 _f	0.17 _h	20.03 _b
150	15	67.10 _b	0.30 _{ef}	3.12 _e	0.17 _h	23.00 _a

*Aynı harf grubuna giren ortalamalar arasındaki fark $p \leq 0.05$ seviyesinde önemli değildir.

Şekil 1. 100 mM'lık NaCl İçeren Ortamda Yetiştirilen ve Prolin Uygulanmış Şiraz Asma Fidanları.



*A: 100 mM NaCl + 0 mM Prolin; B: 100 mM NaCl + 5 mM Prolin;
C: 100 mM NaCl + 15 mM Prolin uygulamaları yapılmış Şiraz asma fidanları.

Çizelge 2. 110R Anacı Üzerine Aşılı Şiraz Üzüm Çeşidinin NaCl ve Prolin Uygulamalarına Biyokimyasal Tepkileri.

UYGULAMALAR		SOD	CAT	POD	PPO
NaCl (mM)	Prolin (mM)	(U mg Protein ⁻¹)	(μ mol H ₂ O ₂ mg protein ⁻¹ dk ⁻¹)	(μ mol gdhp mg protein ⁻¹ dk ⁻¹)	(U mg protein ⁻¹)
0	0	5.00 _{dc}	13.90 _{dc}	13.90 _a	24.90 _b
0	5	5.21 _{cb}	15.10 _b	10.90 _{dc}	26.00 _b
0	15	5.20 _{cb}	15.11 _b	10.30 _{dc}	24.00 _b
50	0	5.20 _{cb}	15.00 _{cb}	9.97 _{dc}	18.00 _c
50	5	5.40 _{cb}	15.13 _b	10.10 _{dc}	17.90 _c
50	15	6.00 _a	15.10 _b	10.90 _{cb}	16.10 _c
100	0	5.40 _{cb}	15.12 _b	11.30 _{cb}	23.10 _b
100	5	5.50 _{ba}	18.00 _a	10.30 _{dc}	18.00 _c
100	15	5.00 _{dc}	14.09 _{dc}	10.70 _{dc}	18.00 _c
150	0	5.30 _{cb}	14.14 _{cb}	11.80 _b	35.00 _a
150	5	4.90 _{dc}	14.13 _{cb}	10.00 _{dc}	18.00 _c
150	15	4.60 _d	13.00 _d	9.40 _d	17.00 _c

*Aynı harf grubuna giren ortalamalar arasındaki fark $p \leq 0.05$ seviyesinde önemli değildir.

KAYNAKLAR

- Arnon, D.T. 1949. Copper enzymes in insolated chloroplast polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, 23: 1-15.
- Badiani, M., De Biasi, M.G.D. ve Felici, M. 1990. Soluble peroxidase from winter wheat seedlings with phenoloxidase-like activity. *Plant Physiology*, 93: 489-494.
- Badiani, M., Paolacci, A.R., D'Annibale, A. ve Sermanni, G.G. 1993. Antioxidants and photosynthesis in the leaves of *Triticum durum* L. seedlings acclimated to low, non-chilling temperature. *Journal of Plant Physiology*, 142:18-24.
- Bates, L.S., Waldren, R.P. ve Teare, I.D. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil*, 39: 205-207.
- Bohnert, H. J. Ve Shen, B. 1999. Transformation and compatible solutes. *Scientia Horticulturae*, 78: 237-260.
- 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.
- Bray, E.A. 1997. Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science*, 2: 48-54.
- Chance, B. ve Maehly, A.C. 1955. Assay of catalase and peroxidases. *Methods Enzymology*, 2: 764-775.
- Chowdhury, S.R. ve Shoudhuri, M.A. 1985. Hydrogen peroxide metabolism as an index of water stress tolerance in Jute. *Physiologia Plantarum*, 65: 476-480.
- Çelik, H., Ağaoglu, Y.S., Fidan, Y., Maraslı, B. ve Söylemezoğlu, G. 1998. Genel Bağcılık. Sun Fidan A.Ş. Mesleki Kitaplar Serisi: 1, Ankara.
- Delauney, A. J. ve Verma, D. P. S. 1993. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *The Plant Journal*, 4: 215-223.
- Dhindsa, R.S., Plumb-Dhindsa, P. ve Thorpe, T.A. 1981. Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *Journal of Experimental Botany*, 32: 93-101.
- Downtown, W.J.S. 1977. Photosynthesis in salt-stressed grapevines. *Australian Journal of Plant Physiology*, 4: 183-192.
- Ehsanpour, AA., Fatahian, N. 2003. Effects of salt and proline on *Medicago sativa* callus. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 73: 53-56.
- Elstner, E.F. 1982. Oxygen activation and toxicity. *Annual Review of Plant Physiology*, 33: 73-96.
- Fisarakis, I., Chartzoulakis, K., Stavrakas, D. 2001. Response of Sultana vines (*V. vinifera* L.) on six rootstocks to NaCl salinity exposure and recovery. *Agricultural Water Management*, 51: 13-27.
- Gadallah, M.A.A. 1995. Effects of waterlogging and kinetin on the stability of leaf membranes, leaf osmotic potential, soluble carbon and nitrogen compounds and chlorophyll content of *Ricinus* plants. *Phyton*, 35: 199-208.
- Gadallah, M.A.A. 1999. Effects of proline glycine betaine on *Vicia faba* responses to salt stress. *Biologia Plantarum*, 42(2): 249-257.
- Gutteridge, J.M. 1977. The effects of calcium on phospholipid peroxidation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 74: 529-37.
- Heath, R.L. ve Packer, L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125: 189-198.
- Hideg, E. 1997. Free radical production in photosynthesis under stress conditions. In: Pessarakli, M., (ed.) *Handbook of Photosynthesis*. Marcel Decker, New York, pp. 911-930.
- Hoagland D.R. ve Arnon, D.I. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. Circular 347. Agricultural Experiment Station, University of California, Berkeley.

- Kaya, C., Tuna, A.L., Ashraf, M. ve 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.
- Kohl, D.H., Keennelly, E.H., Zhu, Y., Schubert, K.R. ve Shearer, G.1991. Proline accumulation, nitrogenase(C_2H_2 reducing) activity and activities of enzymes related to proline metabolism in drought stressed soybean nodules. *Journal of Experimental Botany*, 42:831– 837.
- Lin, C.C., Hsu, Y.T. ve Kao, C.H. 2002. The effect of NaCl on Proline accumulation in rice leaves. *Plant Growth Regulation*, 36(3): 275-278.
- McCarthy, M.G., Jones, L.D. ve Due, G. 1992. Irrigation, principles and practices. In: Coombe, B.G., Dry, P.R. (Eds.), *Viticulture*, vol. II. Practices, Adelaide, Australia, pp. 104- 128.
- Ozden, M., Demirel, U. ve Kahraman, A. 2009. Effects of proline on antioxidant system in leaves of grapevine (*Vitis vinifera* L.) exposed to oxidative stress by H_2O_2 . *Scientia Horticulturae*, 119: 163-168.
- Sairam, R.K., Srivastava, G.C., Agarwal, S. ve Meena, R.C. 2005. Differences in antioxidant activity in response to salinity stress in tolerant and susceptible wheat genotypes. *Biological Plantarum*, 49(1): 85–91.
- SAS, 1995. SAS/STAT User's Guide. Version 6.12. SAS Institute, Cary, North Carolina.
- Scandolios, J.G. 1993. Oxygen stress and superoxide dismutase. *Plant Physiology*, 101: 7-12.
- Walker, R.R., Torokfaly, E., Scott, N.S. ve Kriedemann, P.E. 1981. An analysis of photosynthetic response to salt treatment in *Vitis vinifera* L. *Australian Journal of Plant Physiology*, 8: 359-374.
- Williams, L.R. ve Matthews, M.A. 1990. Grapevine. Irrigation of Agricultural Crops. Agr. Monog. No 30, ASA-CSSA- SSSA, Madison, WI 53711, USA, pp. 1019-1055.
- Winston, G.W. 1990. Physiological basis for free radical formation in cell: Production and defenses. In *Stress Responses in plants: Adaptation and Acclimation Mechanisms*. Edited by Alscher, R.G. and Cumming, J.R. pp,57-86. Wiley- Liss, Inc., New York.
- Woodward, A.J. ve Bennett, I.J. 2005. The effect of salt stress and abscisic on proline production, chlorophyll content and growth of in vitro propagated shoots of *Eucalyptus camaldulensis*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 82: 189–200.
- Zauberman G, Ronen R, Akerman M, Weksler A., Rot, I. ve Fuchs Y. 1991. Postharvest retention of the red colour of litchi fruit pericarp. *Scientia Horticulturae*, 47: 89-97.