

Biber Fidelerinde Yapraktan Yapılan Melatonin Uygulamalarıyla Üşüme Stresine Karşı Toleransın Arttırılması

Ahmet KORKMAZ¹, Özlem DEMİR¹, Ferit KOCAÇINAR², Yakup CUCİ³

¹KSÜ, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Kahramanmaraş

²KSÜ, Orman Fakültesi, Orman Mühendisliği Bölümü, Kahramanmaraş

³KSÜ, Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, Kahramanmaraş

Geliş (Received): 12.04.2016

Kabul (Accepted): 27.05.2016

ÖZET: Bu çalışmada melatoninin biberde fide aşamasında üşüme stresine karşı tolerans sağlama üzerine etkilerini araştırmak amaçlanmıştır. Sena çeşidi biber fideleri dört tam gerçek yaprağa sahip olduklarında, 0, 1, 5 ve 25 µM melatonin içeren saf (distile) su bitkilerin yapraklarına püskürtülmüştür. Melatonin uygulamalarından 1 gün sonra bitkiler üşüme stresine tabi tutulmuşlardır. Üşüme stresi uygulaması 3 gün sürmüş ve bitkiler 12 saat boyunca 5±1 °C (gece, aydınlatma yok) ve 12 saat boyunca da 10±1 °C'ye (gündüz, aydınlatma var, ışık şiddeti: 225 µmol m⁻²s⁻¹) maruz bırakılmışlardır. Yapraktan yapılan melatonin uygulamalarının üşüme stresi koşulları altındaki biber fidelerinin gelişmelerini olumlu şekilde etkilediği ve üşüme stresine karşı toleransı arttırdığı gözlemlenmiştir. Melatonin konsantrasyonları karşılaştırıldığında, 5 µM uygulamasının daha etkili olduğu görülmüştür ve 5 µM melatonin ile muamele edilmiş bitkilerde daha az görsel zarar oluşmuş ve fotosentetik aktivite, doku nispi su içeriği ve antioksidan enzim aktiviteleri artmıştır. Bu araştırma sonuçlarına dayanarak, melatoninin biber fidelerine yapraktan 5 µM konsantrasyonunda uygulanmasının üşüme stresine karşı toleransı arttırmada kullanılabilecek bir yöntem olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Biber, *Capsicum annuum* L., melatonin, stres toleransı, üşüme stresi

Enhancing Chilling Stress Tolerance in Pepper Seedlings by Foliar Application of Melatonin

ABSTRACT: In this research, the possibilities of improving chilling stress tolerance in pepper (*Capsicum annuum* L.) at seedling stages were investigated. In order to improve tolerance to chilling stress, melatonin was applied in various concentrations (0, 1, 5 or 25 µM) through foliar spray. After melatonin applications, plants were subjected to chilling stress at (5 °C/10 °C, night/day) for 3 days. Following stress imposition, the efficacy of melatonin treatments on improving tolerance to chilling stress was determined by various physical measurements and physiological and biochemical analyses. The results indicated that foliar application of melatonin was found to be quite effective in enhancing chilling stress tolerance. Of the melatonin concentrations tested, treating the seedlings with 5 µM of melatonin provided significant protection against chilling stress compared to non-melatonin-treated seedlings. Melatonin treatment enhanced the photosynthetic capacity and boosted antioxidant enzyme activity while reducing visual damage symptoms. Therefore, it could be deduced from the results of the current research that foliar application of melatonin in 5 µM concentrations could be used effectively in enhancing seedling tolerance to chilling stress.

Key Words: Melatonin, pepper, *Capsicum annuum* L., stress tolerance, chilling stress

GİRİŞ

Bugün varlığı hemen hemen tüm canlı organizmalarda kanıtlanan bir molekül olan melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine), ilk olarak 1958 yılında sığır beyin üstü bezinden izole edilen bir indol amindir (Lerner ve ark., 1958). İlk olarak omurgalı hayvanlarda keşfedildiği için melatonin yıllarca sadece hayvanlara özgü bir düzenleyici veya hormon olarak kabul edilmiştir (Reiter, 1991). Bu görüş, 1995 yılında iki araştırmacı grubunun birbirlerinden bağımsız olarak melatoninin bitkilerde özellikle tahıllarda, meyvelerde ve sebzelerde varlığını keşfetmeleriyle değişmiştir (Dubbels ve ark., 1995; Hattori ve ark., 1995). Daha sonra bu molekül hakkındaki araştırmalar artarak sürmüş ve melatoninin bakterilerde, alglerde, bazı yüksek bitki, omurgasız ve omurgalı birçok hayvan

türlerinde de varlığı kanıtlanmıştır (Arnao, 2014; Posmyk ve Janas, 2009; Reiter ve ark., 2015).

Bitkilerde bulunan melatonin miktarı sadece türden türe farklılık göstermekle kalmaz, aynı zamanda aynı türün içerisindeki genotipler veya çeşitler arasında veya aynı genotip bireylerinin farklı büyüme evreleri içinde de farklılık gösterir (Dubbels ve ark., 1995; Hattori ve ark., 1995; Posmyk ve Janas, 2009). Örneğin, yeşil domates meyvelerinde melatonin içeriği en düşük seviyede bulunduğu halde, olgun ve kırmızı renkli meyvelerde ise en yüksek seviyede bulunmuştur (Van Tessel ve ark., 2001). Patates yumrusunda hiç melatonin rastlanmazken (Badria, 2002), en yüksek melatonin (>3700 ng g⁻¹) Çin kökenli tıbbi bitkilerde ölçülmüştür (Chen ve ark., 2003). Bu bitkilerin yaşlanmayı geciktirici ve özellikle sinir sistemi bozuklukları gibi hastalıkları tedavi etmede

kullanılması, melatoninin antioksidan özelliklerinden kaynaklandığı tahmin edilmektedir. Ek olarak, bir bitkinin organları içerisinde de melatonin seviyeleri değişiklik gösterebilir; üreme organları ile tohumlar genelde en yüksek melatonin seviyelerine sahiptirler (Reiter ve ark., 2015).

İnsanlarda ve hayvanlarda melatoninin serbest radikalleri etkisiz hale getirmede aktif rol üstlenmesinden dolayı geniş spektrumlu antioksidan olarak kabul edilmesi, birçok araştırmacıda bu maddenin bitkilerde de benzer şekilde üstlendiği fikrinin doğmasına neden olmuştur. Bu fikri ilk ortaya atan araştırmacılar olan Dubbels ve ark. (1995), yabancı domatesin (*L. pimpinellifolium*) kültür domateslerine kıyasla (*L. lycopersicum*) 5 kat daha az melatonin içerdiğini ve bunun da sonucu olarak kültür domates çeşitlerinin yüksek ozon seviyelerine karşı daha tolerant olduğunu bildirmişlerdir. Yine Alp'lerde ve Akdeniz'in yüksek kesimlerinde yüksek UV radyasyonu altında yaşayan bitkilerin, aynı türlerin daha düşük rakımlarda ve düşük UV radyasyonu altında yaşayan ekotiplerine kıyasla çok daha fazla melatonin içerdiği bildirilmiştir (Tettamanti ve ark., 2000). Ayrıca, düşük sıcaklık, yüksek sıcaklık ve toprak kirliliği gibi olumsuz çevre koşulları altında yaşayan bitkilerde melatonin içeriğinin normale göre daha fazla olduğu da değişik araştırmacılar tarafından belirtilmiştir (Tan ve ark., 2007 a ve b).

Abiyotik stres koşulları altında yaşayan bitkilerde melatonin içeriğinin normale göre daha fazla olması yeterli içsel melatonin üretmeyen bitkilerde dışarıdan yapılan uygulamalar yoluyla da stres faktörlerine karşı toleransın artırılabilceği fikrini doğurmuştur. Örneğin, Li ve ark. (2012), köklere yapılan 0.1 µM melatonin uygulamasının tuz stresi altında yetiştirilen *Malus hupehensis* bitkisinde başta peroksidaz (POX) olmak üzere antioksidan enzimlerin aktivitelerinde artışlara neden olduğu ve bunun da hücre zarındaki hasarın azalmasına ve dolayısıyla da tuza karşı toleransın artmasında etkili olduğunu bildirmişlerdir. Benzer şekilde Xu (2010) yüksek sıcaklık stresi altında yetiştirilen hıyar fidelerine dışarıdan yaptığı melatonin uygulamaları sonrasında serbest radikallerin miktarında ve doku elektrik iletkenliğinde önemli düşüşler olduğunu buna karşılık süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve POX gibi enzimatik ve askorbat ve glutathion gibi enzimatik olmayan antioksidanların aktivitelerinde önemli yükselişler olduğunu belirtmiştir. Shi ve ark. (2015) dışarıdan yapılan melatonin uygulamaları sonrası düşük sıcaklık, kuraklık ve tuzluluk gibi çeşitli stres faktörlerine maruz kalmış bermuda çimi (*Cynadon dactylon*) bitkilerinde çok daha düşük miktarlarda serbest oksijen türevlerinin oluştuğunu ve dolayısıyla daha az hücre hasarının gerçekleştiği; ancak bitki ağırlığının, dokulardaki organik asit, şeker ve aminoasit miktarlarının arttığını ortaya koymuşlardır.

Daha önce yürüttüğümüz çalışmalarda iki biber çeşidinin farklı organlarında ve farklı bitki büyüme evrelerinde melatoninin seviyesindeki değişimleri ortaya konmuş (Korkmaz ve ark., 2014) ve melatonin uygulamalarının biber tohumlarının düşük sıcaklıkta çimlenme ve fide çıkışlarını arttırmada etkili olduğu belirlenmiştir (Korkmaz ve ark., 2016). Bu çalışmada ise dışarıdan yapılan melatonin uygulamalarının üşüme stresine maruz kalan biber fidelerinin üzerindeki etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Bitkisel materyal

Araştırmada bitkisel materyal olarak Kahramanmaraş Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nde ıslah edilen, kırmızı pul ve toz biber üretimi amacıyla yaygın olarak yetiştirilen 'Sena' biber (*Capsicum annuum* L.) çeşidinin tohumları kullanılmıştır.

Bitkilerin yetiştirilmesi ve melatonin uygulamaları

Biber tohumları içerisinde 3:1 oranında torf-perlit bulunan viyollere her bir viyol gözüne ekilmiş ve viyoller 25/20 °C (gündüz/gece) sıcaklıkta iklim dolaplarında tutulmuştur. İklim dolabında 16 saat süreyle aydınlatma (225 µmol m⁻²s⁻¹) yapılmıştır. Fideler iki gerçek yaprağa sahip olduklarında 100 ppm (N'a göre) dozunda sıvı gübre (18+18+18+İZ) ile gübrelenmişlerdir. Fideler dört tam gerçek yaprağa sahip olduklarında, 0, 1, 5 ve 25 µM melatonin içeren saf (distile) su yapraklarına püskürtülmüştür. Püskürtme suyuna 0.5 mL L⁻¹ oranında Tween-20 olarak ilave edilmiştir. Püskürtme sırasında yaprakların her iki yüzeyin de tamamen ıslanmasına dikkat edilmiş ve bitkilerin arasına sünger şeritleri konularak yapraklardan sızan fazla suların kök bölgesine karışması engellenmiştir.

Melatonin uygulamasından 1 tam gün sonra bitkilerin yarısı iklim dolabında 3 gün süre ile üşüme stresine maruz bırakılmış (+), diğer yarısı ise iklim odasında normal koşullarda (25/20 °C) tutulmuşlardır (-). Üşüme stresine maruz kalan bitkiler 3 gün süreyle 12 saat boyunca 5±1 °C (karanlık) ve 12 saat boyunca da 10±1 °C'ye (şiddeti: 225 µmol m⁻²s⁻¹) iklim dolabında tutulmuşlardır. Stresten önce ve sonra bitkiler sulanmış ve üşüme stresi bitiminden 3 gün sonra bitkiler üzerinde aşağıda belirtilen fiziksel, biyokimyasal ve fizyolojik ölçüm ve analizler yapılmıştır. Tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulan olan deneme 4 tekerrürlü olarak kurulmuş ve her tekerrürde 12 bitki kullanılmış ve araştırma bir kez yinelenmiştir.

Yapılan ölçüm ve analizler

Her bir bitkide stres sonrası oluşan görsel hasar Korkmaz (2002)'de belirtilen skala kullanılarak belirlenmiştir. Bitkilerin yaprak alanları (yaprak sapı

hariç) LiCor LI-3000 serisi yaprak alanı ölçer yardımı ile belirlenmiştir.

Doku nispi su içeriğini ve membran geçirgenliğini belirlemek için hayatta kalan bitkiler arasında tesadüfen seçilen 2 bitkiden alınan yaprak diskleri (1 cm çapında) alınmıştır. Doku nispi su içeriği Kaya ve ark. (2003), membran geçirgenliği ise Korkmaz ve ark. (2007)'na göre belirlenmiştir.

Bitkiler arasında tesadüfen seçilen 2 bitki (her uygulamanın her bir tekrüründen) üzerinde tam olarak gelişmiş en son yaprak üzerinde fotosentez ölçer (Walz, GFS3000) ile fotosentez hızı (A), stoma iletkenliği (g_s) ve terleme (E) ölçülmüştür. Ölçüm sırasında ışık şiddeti 225 µmol m⁻² s⁻¹ (fidelerin iklim odasında yetişirken maruz kaldıkları ışık şiddeti), nispi nem %55, sıcaklık 25 °C ve CO₂ konsantrasyonu 380 ppm olarak belirlenmiştir. Fotosistem II etkinliği (F_v/F_m) bitkiler ölçüm öncesi 30 dakika karanlıkta tutulmuşlardır.

Stres sonrası dokulardaki H₂O₂ içeriği Özden ve ark.(2009)'da belirtilen yöntemle göre, bir bozulma ürünü olan malondialdehit (MDA) konsantrasyonu ise Zhang ve ark. (2005)'e göre belirlenmiştir.

Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve peroksidaz (POX) enzimlerinin aktivitelerini belirlemek amacıyla 1 g taze yaprak örneği buz üzerinde soğutulmuş porselen havanlar içinde 1 mM Na-EDTA ve %2 PVPP (w/v) bulunan 50 mM'lık 3 mL soğuk fosfat tampon çözeltisi (pH: 7.8) ile ezilerek homojenize edilmiştir. Homojenize edilen örnekler 10 dakika süresince 4 °C'de 13000 g'de santrifüj edildikten sonra analiz edilene kadar derin dondurucuya (-80 °C) konulmuştur. SOD (EC 1.15.1.1) aktivitesi Beauchamp ve Fridovich (1971), CAT (EC 1.11.1.6) aktivitesi Bergmeyer (1970) ve POX (EC1.11.1.7) aktivitesi ise Dolatabadian ve ark., (2008)'e göre hesaplanmıştır.

Melatonin analizi için tesadüfi olarak seçilen bitkilerden alınan yaprak örnekleri -20 °C de yaklaşık 1 saat bekletilmiş ve sonra içerisinde 3 mL etil asetat bulunan tüplere toz haline gelmiş örneklerden 0.25 g tartılarak eklenmiştir. Örnekler 17 saat 4 °C karanlıkta çalkalayıcı üzerinde tutulmuş ve sonra yine 4 °C'de 6000 devirde 20 dakika süre ile santrifüj edilmiştir. Süpernatant daha sonra konsantratörde (Labconco, Centrivap model, Kansas City MO, USA) 35 °C sıcaklıkta ve vakum altında yaklaşık 4-6 saat süre tutularak etilasetat uçurulmuştur. Tüplerin dibinde kristal şeklinde kalan çöküntü 0.5 mL metanolde çözülmüş ve bir şırınga yardımıyla 0.45 µm por çapı olan filtreden geçirilmiştir. Daha sonra örnekler analiz için floresan dedektörlü HPLC cihazına (Shimadzu, Prominace UFLC, CBM 20A) vialler içerisinde yüklenmiş ve melatonin analizi Korkmaz ve ark. (2014)'de belirtildiği şekilde yapılmıştır.

Sonuçların değerlendirilmesi

Çalışmada her iki tekrürde elde edilen veriler arasında yapılan istatistikî analiz sonucunda fark

olmadığının anlaşılması üzerine her iki tekrarın verileri birleştirilerek analiz edilmiştir. Veriler varyans analizine (ANOVA) tabi tutulmuş ve uygulamalar arasındaki farklılıkların belirlenmesinde LSD (asgari önemli fark) testi kullanılmıştır.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Normal koşullar altında (üşüme stresine maruz kalmayan) yetiştirilen fidelerde artan konsantrasyonlarda uygulanan melatonin, bitkilerin gelişmelerinde ve yaprak alanlarında olumlu veya olumsuz yönde bir etkisi olmamıştır (Çizelge 1).

Çizelge 1. Biber fidelerine yapılan melatonin uygulamalarının görsel hasar indeksi ve yaprak alanı üzerine etkileri

| Melatonin (µM) | Üşüme stresi | Görsel hasar indeksi ^z (0-5) | Yaprak alanı (cm ² bitki ⁻¹) |
|---------------------|--------------|---|---|
| 0 | - | 0.09 d | 117.9 ab |
| 1 | - | 0.18 d | 120.5 a |
| 5 | - | 0.17 d | 116.6 ab |
| 25 | - | 0.15 d | 122.0 a |
| 0 | + | 2.30a | 86.0 b |
| 1 | + | 1.61b | 101.5 ab |
| 5 | + | 1.45bc | 102.3 ab |
| 25 | + | 1.28 c | 104.4 ab |
| LSD _{0.05} | | 0.28 | 34.0 |
| Önemlilik | | <.0001 | 0.05 |

^z 0= hasar yok, 5= bitki ölü

Üşüme stresine maruz kalmış fidelerde ise orta seviyede hasar meydana gelmiştir. Hiç melatonin uygulanmamış bitkiler en yüksek hasara indeksine sahip olmuşlar ve bu fidelerde yaprak kıvrılmaları, solgunluk ve nekrotik hasarın başladığı, buna karşılık yaprakta yapılan melatonin uygulamalarının görsel hasarın azaltılmasında etkili olduğu gözlemlenmiş ve en az görsel hasar 25 µM melatonin uygulamasında gözlemlenmiştir. Yine üşüme stresindeki fidelerde melatonin uygulamaları yaprak alanını artırmış fakat bu artış kontrol bitkilerine (0 µM melatonin) kıyasla istatistiksel anlamda önemli bulunmamıştır.

Farklı konsantrasyonlarda yaprakta yapılan melatonin uygulamalarının normal koşullarda ve üşüme stresi altındaki biber fidelerinin doku nispi su içeriği ve membran geçirgenliği üzerine etkileri ile ilgili veriler Çizelge 2'de sunulmuştur. Membran geçirgenliği değerleri bitkilerin stres altında membran bütünlüğünü ne ölçüde koruyabildiklerinin bir ifadesidir. Yüksek ölçülen değerler hücre membranlarının yapılarının bozulduğunu ve hücre içerisinde bulunan su ve suda erimiş maddelerin hücreler arası boşluklara aktığını ve dolayısı ile stresten olumsuz etkilendiğini göstermektedir. Ayrıca doku nispi su içeriği de bize bitkilerin stresten ne ölçüde etkilendikleri ve o anki su içerikleri hakkında fikir vermektedir.

Çizelge 2. Biber fidelerine yapılan melatonin uygulamalarının doku nispi su içeriği ve membran geçirgenliği üzerine etkileri

| Melatonin (µM) | Üşüme stresi | Nispi su içeriği | Membran geçirgenliği |
|---------------------|--------------|------------------|----------------------|
| | | % | |
| 0 | - | 87.5 ab | 30.6 e |
| 1 | - | 88.9 a | 31.4 cde |
| 5 | - | 90.9 a | 35.6 b-d |
| 25 | - | 89.6 a | 31.0 de |
| 0 | + | 74.3 c | 57.6 a |
| 1 | + | 81.1 bc | 46.1 ab |
| 5 | + | 84.2 ab | 43.6 bc |
| 25 | + | 81.7 ab | 43.2 bcd |
| LSD _{0.05} | | 7.2 | 12.5 |
| Önemlilik | | <.0001 | <.0001 |

Üşüme stresi yaprakların su içeriğini etkilemiş ve strese maruz kalan bitkilerde doku nispi su içeriği değerleri düşmüştür. Yapılan melatonin uygulamaları ise strese maruz kalmayan bitkilerin dokularının su içeriği üzerinde önemli bir değişikliğe neden olmamıştır. Ancak, üşüme stresine maruz kalan

bitkilerde yapılan 5 ve 25 µM melatonin uygulanmış bitkilerde doku nispi su içeriği hiç melatonin uygulanmamış bitkilere kıyasla önemli seviyede yüksek bulunmuştur. Yine benzer sonuçlar doku elektriki iletkenlik değerlerine bakıldığında görülmüştür. Normal koşullara maruz kalan bitkilerde yapılan melatonin uygulamalarının herhangi bir etkisinin olduğu görülmemişken, melatonin uygulanmış ve üşüme stresine tabi tutulmuş bitkilerde doku iletkenlik değerlerinin hiç melatonin uygulanmamış bitkilere göre daha düşük olduğu görülmüştür. En düşük doku elektriki iletkenlik değeri 5 ve 25 µM melatonin uygulanmış bitkilerden elde edilmiş ve bu değerlerin hiç melatonin uygulanmamış bitkilerle kıyaslandığında yaklaşık %25 olarak daha düşük olduğu görülmüştür.

Melatonin uygulamalarının fotosentetik parametreler üzerine etkileri incelendiğinde normal koşullar altında yetiştirilen bitkilerde melatonin uygulamaları sonucu özellikle terleme ve stoma iletkenliği değerlerinde istatistikî anlamda öneme sahip bir fark olduğu görülmüştür (Çizelge 3).

Çizelge 3. Biber fidelerine yapılan melatonin uygulamalarının fotosentez hızı (A), terleme (E), stoma iletkenliği (gs) ve fotosistem II'nin etkinliği (F_v/F_m) üzerine etkileri

| Melatonin (µM) | Üşüme stresi | A (µmol m ⁻² s ⁻¹) | E (mmol m ⁻² s ⁻¹) | g _s (mmol m ⁻² s ⁻¹) | F _v /F _m |
|---------------------|--------------|---|---|--|--------------------------------|
| 0 | - | 3.08 ab | 0.63 b | 36.7 bc | 0.790 ab |
| 1 | - | 3.01 ab | 0.67 ab | 40.1 ab | 0.788 ab |
| 5 | - | 3.62 a | 0.91 a | 54.5 a | 0.778 b |
| 25 | - | 3.55 a | 0.91 a | 56.0 a | 0.794 ab |
| 0 | + | 1.49 d | 0.36 c | 22.9 c | 0.748 c |
| 1 | + | 2.23 bcd | 0.43 bc | 28.2 bc | 0.783 ab |
| 5 | + | 2.41 bc | 0.65 b | 38.6 b | 0.793 ab |
| 25 | + | 2.54 bc | 0.47 bc | 30.7 bc | 0.794 a |
| LSD _{0.05} | | 0.91 | 0.24 | 15.6 | 0.016 |
| Önemlilik | | 0.02 | 0.01 | 0.01 | <.0001 |

Çizelge 4. Biber fidelerine yapılan melatonin uygulamalarının H₂O₂ ve MDA içeriği üzerine etkileri

| Melatonin (µM) | Üşüme stresi | H ₂ O ₂ (µmol g ⁻¹ TA) | MDA (µmol g ⁻¹ TA) |
|---------------------|--------------|---|-------------------------------|
| 0 | - | 72.5 bc | 0.144 bc |
| 1 | - | 62.3 c | 0.108 c |
| 5 | - | 60.4 c | 0.127 c |
| 25 | - | 69.2 bc | 0.131 c |
| 0 | + | 102.6 a | 0.389 a |
| 1 | + | 96.3 ab | 0.318 a |
| 5 | + | 81.7 b | 0.305 ab |
| 25 | + | 80.8 bc | 0.323 a |
| LSD _{0.05} | | 20.1 | 0.17 |
| Önemlilik | | 0.02 | 0.01 |

Artan konsantrasyonlarda yapılan melatonin uygulamaları sonucunda terleme ve stoma iletkenliği önemli ölçüde artmış ve buna karşılık da fotosentez miktarında gözle görülür fakat istatistikî anlamda önemsiz artışlar görülmüş ancak fotosistem II'nin etkinliğinde herhangi bir değişikliğe neden olmamıştır. Üşüme stresine maruz kalan bitkilerde de tüm fotosentetik parametrelerde gözle görülür artışlar gözlemlenmiş ve en yüksek stoma iletkenliği ve terleme değerleri 5 µM melatonin uygulanmış bitkilerden elde edilirken, en yüksek fotosentez hızı 5 ve 25 µM melatonin ile muamele edilmiş bitkilerde ölçülmüştür. Ayrıca artan konsantrasyonlarda yapılan melatonin uygulamaları sonucunda fotosistem II'nin etkinliği de artmış ve melatonin ile muamele edilmiş bitkilerin fotosistem II etkinlikleri hiç melatonin uygulanmamış

bitkilerin değerleriyle kıyaslandığında istatistiksel anlamda yüksek olduğu görülmüştür.

Farklı konsantrasyonlarda yapraktan yapılan melatonin uygulamalarının normal koşullarda ve üşüme stresi altındaki biber fidelerinin H₂O₂ ve MDA içeriği üzerine etkileri ile ilgili veriler Çizelge 4’de sunulmuştur. Özellikle stres koşullarına maruz kalan bitkilere dışarıdan yapılan melatonin uygulamaları sonucunda bitki dokularının H₂O₂ içeriğinde önemli düşüşler gözlemlenmiş ve en düşük H₂O₂ içeriği 5 ve 25 µM melatonin ile muamele edilmiş bitkilerde ölçülmüştür. Üşüme stresine maruz kalmış bitkilerde melatonin uygulamaları sonucu MDA içeriklerinde de düşüşler gözlemlenmiş (%22 civarında) fakat bu düşüşler istatistiki anlamda önemli bulunmamıştır.

Yapılan melatonin uygulamalarının antioksidan enzimler olarak bilinen SOD, CAT ve POX aktiviteleri üzerine etkileri Çizelge 5’te verilmiştir.

Çizelge 5. Biber fidelerine yapılan melatonin uygulamalarının SOD, CAT ve POX enzim aktiviteleri üzerine etkileri

| Melatonin (µM) | Üşüme stresi | SOD | CAT | POX |
|---------------------|--------------|------------------------------|----------|---------|
| | | (U mg ⁻¹ protein) | | |
| 0 | - | 32.52 c | 0.075 cd | 0.58 ab |
| 1 | - | 30.39 c | 0.061 cd | 0.69 ab |
| 5 | - | 35.97 bc | 0.063 cd | 0.54 ab |
| 25 | - | 33.29 c | 0.050 d | 0.55 ab |
| 0 | + | 36.21 bc | 0.074 cd | 0.48 b |
| 1 | + | 43.90 ab | 0.090 bc | 0.58 ab |
| 5 | + | 47.17 a | 0.122 a | 0.75 a |
| 25 | + | 38.48 abc | 0.106 ab | 0.60 ab |
| LSD _{0.05} | | 9.21 | 0.029 | 0.23 |
| Önemlilik | | 0.01 | <.0001 | 0.05 |

Strese maruz kalmamış bitkilerde melatonin uygulamasının üç enzimin de aktiviteleri üzerine bir etkisinin olmadığı görülmüştür. Fakat strese maruz kalmış bitkilerde ise melatonin uygulamaları sonrasında stres enzimlerinin aktivitelerinde kayda değer artışlar gözlemlenmiş ve 5 µM melatonin uygulanmış bitkilerde her üç enzimin de aktivitesi en yüksek ölçülmüştür. Yapraktan yapılan 5 µM melatonin uygulaması sonucu hiç melatonin uygulanmamış bitkilere kıyasla SOD aktivitesinde %30, CAT aktivitesinde %64 ve POX aktivitesinde ise %56 oranında artışlar kaydedilmiştir.

Yapraktan melatonin uygulamalarının üşüme stresine maruz kalmayan biber fidelerinin yaprak melatonin içeriği üzerine küçük fakat önemsiz artışlara neden olmuştur (Çizelge 6).

Üşüme stresine maruz kalmış bitkilerde ise yapraklarda içsel melatonin miktarı önemli seviyede artmıştır; bunun nedeni de melatoninin bir antioksidan madde olması nedeniyle bitki dokularında strese verilen bir cevap olduğu düşünülmektedir. Dışarıdan yapılan

melatonin uygulamaları sonucunda ise doğal olarak yapraklarda melatonin içeriğini uygulanan konsantrasyonuna bağlı olarak artmış ve en yüksek melatonin içeriğinin 25 µM melatonin ile muamele edilmiş bitkilerde ölçülmüştür.

Sonuçlar incelendiğinde yapraktan yapılan melatonin uygulamaları sonucunda biber fidelerin üşüme stresine karşı toleransı artırdığı görülmüştür. Melatonin ile muamele edilen bitkiler daha az görsel zarar belirtileri gösterirken, melatonin ile muamele edilmeyen bitkilerin yapraklarında nekrotik alanların fazla olduğu ve yaprak alanının bir kısmının kaybedildiği görülmüştür.

Yine melatonin uygulamaları sonucu bitkilerde doku iletkenlik değerlerinin düşmesi buna karşılık doku nispi su içeriği değerlerinin yükselmesi de üşüme stresine karşı toleransın arttığına bir belirtisi olduğu söylenebilir. Ayrıca özellikle 5 µM melatonin ile muamele edilmiş bitkilerde tüm fotosentetik parametreler ve klorofil floresan değerleri kontrol bitkilerine kıyasla önemli seviyelerde yüksek bulunmuştur. Melatonin uygulamaları sonrasında strese maruz kalan bitkilerin strese karşı tolerans kazandıkları ve daha az zarar gördükleri bilinmektedir. Örneğin, 0.1 µM melatonin uygulaması sonrasında sıvı azot (-196 °C) içerisinde bir hafta bekletilen *Rhodiola crenulata* kalluslarının hayatta kalma oranlarının kontrol uygulamasına kıyasla daha fazla olduğu (Zhao ve ark., 2011), yine 0.1 mM melatonin uygulanmış domates fidelerinin fide sağlık indeksinin, fotosentez hızının ve fotosistem II’nin etkinliğinin kontrol bitkilerine kıyasla daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Liu ve ark., 2015).

Çizelge 6. Biber fidelerine yapılan melatonin uygulamalarının yaprak melatonin içeriğine etkileri

| Melatonin (µM) | Üşüme stresi | Melatonin (ng g ⁻¹ TA) |
|---------------------|--------------|-----------------------------------|
| 0 | - | 8.59 d |
| 1 | - | 9.87 d |
| 5 | - | 12.07 d |
| 25 | - | 14.72 d |
| 0 | + | 28.81 c |
| 1 | + | 30.73 bc |
| 5 | + | 37.34 b |
| 25 | + | 45.85 a |
| LSD _{0.05} | | 8.0 |
| Önemlilik | | <.0001 |

MDA düşük sıcaklık, kuraklık ve tuz stresi gibi oksidatif stres faktörlerinin yarattığı olumsuz etkilerin ürettiği süper oksit ve H₂O₂ gibi serbest radikallerin hücre zarındaki çoklu doymamış yağ asitlerini ve fosfolipitleri oksidasyona uğratması sonucu ortaya çıkan zararlı bir maddedir. Bu çalışmada MDA miktarı normal koşullarda yetiştirilen biber fidelerinde istatistikî olarak önemli miktarlarda değişiklik göstermemiş ve üşüme stresi altında yetiştirilen fidelerde yapılan melatonin

uygulamaları sonucu dokulardaki MDA içeriğinde azalma gözlemlenmiş ancak bu azalışlar kontrol uygulamalarına kıyasla genelde istatistikî açıdan önemsiz bulunmuştur. Ayrıca, üşüme stresine maruz kalmış fidelerde melatonin uygulamaları sonucu H₂O₂ içeriğinin önemli seviyelerde azaldığı saptanmıştır. Bu durum stresin olumsuz etkilerini ortadan kaldırmada melatonin uygulamalarının ne kadar etkili olduğunu ortaya koymaktadır. Wang ve ark. (2009), UV-B radyasyonuna maruz bırakılan Maş fasulyesi (*Vigna radiata*) bitkisinin yapraklarında melatoninin, reaktif oksijen türlerinin neden olduğu MDA'nın seviyesini azalttığını belirlemişlerdir. Aynı zamanda Xu ve ark. (2010), yüksek sıcaklık stresine maruz bırakılmış hıyar fidelerine yaprakten sprey şeklinde yapılan melatonin uygulanmasının dokularda MDA, H₂O₂ ve süper oksit iyonlarını önemli ölçüde azalttığını bildirmişlerdir. Benzer şekilde düşük sıcaklık stresi altında çimlendirilen hıyar fidelerinde tohumla yapılan 50 µM melatonin uygulamasının fidelerin dokularında MDA birikiminin önemli ölçüde gerilemesine neden olduğu bildirilmiştir (Posmyk ve ark., 2009).

Bitkiler strese maruz kaldıklarında moleküler seviyede vermiş oldukları tepkilerden birisi de enzimatik ya da enzimatik olmayan antioksidanların seviyelerini arttırmalarıdır. Stres enzimi olarak bilinen bu enzimatik antioksidanlar, stres sırasında ve sonrasında dokularda oluşan reaktif oksijen türlerinin ortadan kaldırılmasında görev alırlar ve aktivitelerinin yüksekliği ile bitkilerin strese karşı gösterdikleri tolerans arasında pozitif bir ilişki olduğu bilinmektedir. Bu enzimlerden SOD, POX ve CAT aktivitelerini ele aldığımızda bu çalışmada melatonin uygulamalarının üşüme stresi altındaki biber fidelerinde aktivitelerinin teşvik edildiği görülmüştür. Melatonin uygulamaları arasında özellikle 5 µM uygulaması her üç enzimin aktivitesini melatonin uygulanmamış fidelere kıyasla önemli derecede yükseltmiştir. Melatoninin bir hormon olmasının yanında reaktif oksijen ve azot türlerini ortamdaki uzaklaştırma özelliğine sahip olmasından dolayı geniş spektrumlu antioksidan olarak da bilinir (Reiter ve ark., 2001; Tan ve ark., 2007b). Ayrıca melatonin başta SOD, CAT ve POX olmak üzere birçok antioksidan enzim aktivitesini stres koşulları altında düzenlemekte ya da teşvik etmektedir (Arnao ve Hernandez-Ruiz, 2015; Reiter ve ark., 2015; Zhang ve ark., 2015). Örneğin, Liu ve ark. (2015), köklere yapılan 0.1 µM melatonin uygulamasının kuraklık stresi altında yetiştirilen domates fidelerinde başta SOD, CAT, POX olmak üzere antioksidan enzimlerin aktivitelerini ve askorbik asit gibi enzimatik olmayan antioksidanların seviyelerini arttırdığını ve bunun da membranlardaki zararın azalmasına ve de dolayısıyla da kuraklığa karşı toleransın artmasında etkili olduğunu bildirmişlerdir. Benzer şekilde Zhao ve ark. (2011) melatonin uygulamaları sonrasında sıvı azot içerisinde muhafaza edilen *R. crenulata* kalluslarında dokuların MDA

içeriğinde önemli düşüşler olduğu, buna karşılık CAT ve POX antioksidan enzimlerin aktivitelerinde önemli artışlar olduğunu bildirmişlerdir.

SONUÇ

Bu araştırma sonuçlarına bakıldığında bitkilerde strese karşı tolerans artırıcı olarak bilinen ve bir bitki büyüme düzenleyicisi adayı olan melatoninin biber fidelerinde üşüme stresine karşı toleranslarını arttırmada kullanılabileceği ortaya çıkmıştır. Araştırmada kullanılan tüm melatonin konsantrasyonları dikkate alındığında 5 µM konsantrasyonunun en etkin konsantrasyon olduğu görülmüştür. Melatoninin üşüme stresine karşı tolerans sağlamada etkin olmasının antioksidan enzimlerin aktivitelerinde artışlara ve dolayısıyla lipit peroksidasyonunda da düşüşlere neden olması söylenebilir.

TEŞEKKÜR

Bu araştırma TÜBİTAK tarafından desteklenen projenin (Proje no: 110O655) bir parçasıdır. Mali destek için teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- Arnao, M.B. 2014. Phytomelatonin: Discovery, Content, and Role in Plants. *Advances in Botany*, e815769. doi:10.1155/2014/815769.
- Arnao, M.B., Hernandez-Ruiz, J. 2015. Functions of Melatonin in Plants: A Review. *Journal of Pineal Research*, 59: 133–150.
- Badria, F.A. 2002. Melatonin, Serotonin, and Tryptamine in Some Egyptian Food and Medicinal Plants. *Journal of Medicinal Food*, 5: 153-157.
- Beauchamp C, Fridovich I. 1971. Superoxide dismutase: Improved Assays and an Assay Applicable to Acrylamide Gels. *Analytical Biochemistry*, 44: 276-87.
- Bergmeyer, N. 1970. *Methoden der Enzymatischen Analyse*. Vol. 1, Akademie Verlag, Berlin, pp. 636–647.
- Chen, G., Huo, Y., Tan, D.X., Liang, Z., Zhang, W., Zhang, Y. 2003. Melatonin in Chinese Medicinal Herbs. *Life Sciences*, 73: 19–26.
- Dolatabadian, A., Sanavy, S.A.M.M., Chashmi, N.A. 2008. The Effects of Foliar Application of Ascorbic Acid (Vitamin C) on Antioxidant Enzymes Activities, Lipid Peroxidation and Proline Accumulation of Canola (*Brassica napus* L.) under Conditions of Salt Stress. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 194: 206-213.
- Dubbels, R., Reiter, R.J., Klenke, E., Goebel, A., Schnakenberg, E., Ehlers, C. 1995. Melatonin in Edible Plants Identified by Radioimmunoassay and by High Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry. *Journal of Pineal Research*, 18: 28–31.

- Hattori, A., Migitaka, H., Masayaki, I., Itoh, M., Yamamoto, K., Ohtani-Kaneko, R., Hara, M., Suzuki, T., Reiter, R.J. 1995. Identification of Melatonin in Plant Seed Its Effects on Plasma Melatonin Levels and Binding to Melatonin Receptors in Vertebrates. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 35: 627–634.
- Kaya C., Ak, B.E., Higgs, D. 2003. Response of Salt-Stressed Strawberry Plants to Supplementary Calcium Nitrate and/or Potassium Nitrate. *Journal of Plant Nutrition*, 6: 543-560.
- Korkmaz, A. 2002. Amelioration of Chilling Injuries in Watermelon Seedlings by Abscisic Acid. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. 26: 17-20.
- Korkmaz, A., Uzunlu, M., Demirkiran, A.R. 2007. Treatment with Acetyl Salicylic Acid Protects Muskmelon Seedlings Against Drought Stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 29: 503-508.
- Korkmaz, A., Değer, Ö., Cuci, Y. 2014. Profiling the Melatonin Content in Organs of the Pepper Plant During Different Growth Stages. *Scientia Horticulturae*, 172: 242–247.
- Korkmaz, A., Karaca, A., Kocaçınar, F., Cuci, Y. 2016. The effects of Seed Treatment with Melatonin on Germination and Emergence Performance of Pepper Seeds under Chilling Stress. *Tarım Bilimleri Dergisi/Journal of Agricultural Sciences*, (in press).
- Lerner, A.B., Case, J.D., Takahashi, Y. 1958. Isolation of Melatonin, a Pineal Factor That Lightness Melanocytes. *Journal of American Chemical Society*, 80: 2587-2591.
- Li, C., Wang, P., Wei, Z., Liang, D., Liu, C., Yin, L., Jia, D., Fu, M., Ma, F. 2012. The Mitigation Effects of Exogenous Melatonin on Salinity-Induced Stress in *Malus hupehensis*. *Journal of Pineal Research*, 53: 298-306.
- Liu, J., Wang, W., Wang, L., Sun, Y. 2015. Exogenous Melatonin improves Seedling Health Index and Drought Tolerance in Tomato. *Plant Growth Regulation*, 77: 317–326.
- Ozden, M., Demirel, U., Kahraman, A. 2009. Effects of Proline on Antioxidant System in Leaves of Grapevine (*Vitis vinifera* L.) Exposed to Oxidative Stress by H₂O₂. *Scientia Horticulturae*, 119: 163-168.
- Posmyk, M. M., Janas, K. M. 2009. Melatonin in Plants. *Acta Physiologia Plantarum*, 31: 1–11.
- Reiter, R.J. 1991. Pineal Melatonin: Cell Biology of Its Physiological Interactions. *Endocrine Reviews*, 12: 151–181.
- Reiter, R.J., Tan, D.X., Burkhardt, S., Manchester, L.C., 2001. Melatonin in Plants. *Nutrition Reviews*, 59: 286-290.
- Reiter, R.J., Tan, D.X., Zhou, Z., Cruz, M.H.C., Fuentes-Broto, L., Galano, A. 2015. Phytomelatonin: Assisting Plants to Survive and Thrive. *Molecules*, 20: 7396-7437.
- Shi, H., Jiang, C., Ye, T., Tan, D.X., Reiter, R.J., Zhang, H., Liu, R., Chan, Z. 2015. Comparative Physiological, Metabolomic, and Transcriptomic Analyses Reveal Mechanisms of Improved Abiotic Stress Resistance in Bermudagrass *Cynodon dactylon* L. Pers. by Exogenous Melatonin. *Journal of Experimental Botany*, 66: 681–694.
- Tan, D.X., Manchester, L.C., Di Mascio, P., Martinez, G.R., Prado, F.M., Reiter, R.J. 2007(a). Novel Rhythms of N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine and Its Precursor Melatonin in Water Hyacinth: Importance for Phytoremediation. *Faseb Journal*, 21: 1724–1729.
- Tan, D.X., Manchester, L.C., Helton, P., Reiter, R.J. 2007(b). Phytoremediative Capacity of Plants Enriched with Melatonin. *Plant Signaling and Behavior*, 2: 514–516.
- Tettamanti, C., Cerabolini, B., Gerola, P., Conti, A. 2000. Melatonin Identification in Medicinal Plants. *Acta Phytotherapeutica*, 3: 137–144.
- Van Tassel, D. L., Roberts, N., Lewy, A., O'Neill, S. D. 2001. Melatonin in Plant Organs. *Journal of Pineal Research*, 31: 8–15.
- Xu, X. D. 2010. Effects of Exogenous Melatonin on Physiological Response of Cucumber Seedlings under High Temperature Stress. Thesis for Master's Degree, Northwest A&F University, Yangling Shanxi, China.
- Xu, S.C., Li, Y.P., Hu, J., Guan, Y.J., Ma, W.G., Zheng, Y.Y., Zhu, S.J. 2010. Responses of Antioxidant Enzymes to Chilling Stress in Tobacco Seedlings. *Agricultural Sciences in China*, 9: 1594-1601.
- Wang, Y., Hao, J., Li, Q., Jia, J. 2009. Defend Effects of Melatonin on Mung Bean UV- B Irradiation. *Acta Photonica Sinica*, 38: 2629-2633.
- Zhang, J.H., Huang, W.D., Liu, Y.P., Pan, Q.H. 2005. Effects of Temperature Acclimation Pretreatment on The Ultrastructure of Mesophyll Cells in Young Grape Plants (*Vitis vinifera* L. cv. Jingxiu) under Cross-Temperature Stresses. *Journal of Integrative Plant Biology*, 47: 959-970.
- Zhang, N., Sun, Q., Zhang, H., Cao, Y., Weeda, S., Ren, S., Guo, Y.D. 2015. Roles of Melatonin in Abiotic Stress Resistance in Plants. *Journal of Experimental Botany*, 66: 647-656.
- Zhao, Y., Qi L.W., Wang, W.M., Saxena, P.K., Liu, C.Z. 2011. Melatonin Improves the Survival of Cryopreserved Callus of *Rhodiola crenulata*. *Journal of Pineal Research*, 50: 83-8.