

Tuz Stresi Koşullarında Biber Bitkisine Prolin Uygulamalarının Etkileri

Mariam Kara Damour

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Haziran 2024

Effects of Proline Applications on Pepper Plants under Salt Stress Conditions

Mariam Kara Damour

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Agricultural Biotechnology

June 2024

Tuz Stresi Koşullarında Biber Bitkisine Prolin Uygulamalarının Etkileri

Mariam Kara Damour

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği Uyarınca

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Bitkisel Biyoteknoloji Bilim Dalında

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Sergül ERGİN

Haziran 2024

ONAY

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi **Mariam Kara Damour**'un YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı “Tuz Stresi Koşullarında Biber Bitkisine Prolin Uygulamalarının Etkileri” başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek oybirliği ile kabul edilmiştir.

Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Sergül ERGİN

İkinci Danışman :-

Yüksek Lisans Tez Savunma Jürisi:

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Sergül ERGİN

Üye: Doç. Dr. Gülçin IŞIK

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Sergül ERGİN

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun tarih ve
..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. FATMA TÜMSEK

Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Dr. Öğr. Üyesi Sergül ERGİN danışmanlığında hazırlamış olduğum “Tuz Stresi Koşullarında Biber Bitkisine Prolin Uygulamalarının Etkileri” başlıklı Yüksek Lisans tezimin özgün bir çalışma olduğunu; tez çalışmamın tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallarına uygun davrandığımı; tezimde verdiğim bilgileri, verileri akademik ve bilimsel ilke ve kurallara uygun olarak elde ettiğimi; tez çalışmamda yararlandığım eserlerin tümüne atıf yaptığımı ve kaynak gösterdiğimi ve bilgi, belge ve sonuçları bilimsel etik ilke ve kurallara göre sunduğumu beyan ederim. 27/06/2024

Mariam Kara Damour

ÖZET

Bu çalışmada, tuz stresine maruz kalan biber (*Capsicum annuum* L.) bitkisinin yaprak dokularında meydana gelen zararlanma ve dışsal prolin (Pro) uygulamasının tuz stresi koşullarında bitkinin fizyolojik fonksiyonları üzerine etkisi araştırılmıştır. Deneme sonunda biber yaprak örneklerinde hücre zarı zararlanma oranı, yaprak oransal su kapsamı (YOSK), turgor kaybı (TK), Pro miktarı, toplam çözünebilir protein miktarı (TÇP), katalaz (CAT) ve askorbat peroksidaz (APX) aktivitesi ile SDS-PAGE analizleri yapılmıştır. Bu araştırma sonucunda tuzluluk stresi ile artan hücre zarı zararlanma oranının prolin uygulaması ile azaldığı tespit edilmiştir. Tuz stresinin bitkilerde YOSK'un azalmasına ve TK'nın artmasına neden olduğu, dışarıdan uygulanan prolinin ise YOSK'u artırıcı TK'yı ise azaltıcı yönde etki ettiği belirlenmiştir. Tuzluluk, endojen prolin miktarının artmasına yol açmış ve dışsal prolin uygulaması bu durumu olumlu yönde etkilemiştir. Enzim aktiviteleri ile ilgili olarak, tuz stresi altında katalaz aktivitesinin 50 mM NaCl uygulamasında arttığı ve 100 mM NaCl uygulamasında azaldığı, dışsal prolin uygulamasının ise enzim aktivitesini 50 mM NaCl uygulamasında azalttığı ve 100 mM NaCl uygulamasında arttırdığı bulunmuştur. Tuz stresi altında APX aktivitesinin arttığı ve dışsal prolin uygulamasının bu artışı belirginleştirdiği belirlenmiştir. Toplam çözünebilir protein miktarı tuz stresi ile azalmış ve dışsal prolin uygulaması TÇP'yi 50 mM NaCl uygulamasında artırmış ve 100 mM NaCl uygulamasında azaltmıştır. SDS PAGE analizlerinde, yapılan uygulamalarla değişim gösteren 24,6 kDa ve 256,9 kDa aralığında bulunan protein bantları belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Biber, Tuz stresi, Prolin

SUMMARY

In this study, the damage to leaf tissues of *Capsicum annuum* L. plants exposed to salt stress and the effect of exogenous proline (Pro) application on physiological functions under salt stress conditions were investigated. At the end of the experiment, the analysis of cell membrane damage rate, leaf relative water content (RWC), turgor loss (LT), Pro amount, total soluble protein (TSP) amount, catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX) activity, and SDS-PAGE were performed in pepper leaf samples. As a result of this research, it was found that the rate of cell membrane damage, which increases with salinity stress, decreased with the application of proline. It was determined that salinity stress led to decreased leaf RWC in plants and increased LT and It was determined that salinity stress led to decreased leaf RWC in plants and increased LT and externally applied proline led to an increase in YOSK and a decrease in TK. Salinity led to higher endogenous proline content and exogenous proline application had a positive effect on it. Regarding enzyme activities, CAT activity increased at 50 mM and decreased at 100 mM NaCl application, while exogenous proline application decreased the activity at 50 mM NaCl application and increased it at 100 mM NaCl application. Ascorbate peroxidase activity increased under salt stress and exogenous proline application ameliorated this increase. While the amount of TSP decreased with salt stress, exogenous proline application increased the TSP at 50 mM NaCl application and decreased it at 100 Mm NaCl application. Protein bands between 24,6 kDa and 256,9 kDa were determined in SDS PAGE analyses which varied with the treatments.

Keywords: Pepper, Salt stress, Proline

TEŞEKKÜR

İlk aşamada bu alana girmemi sağlayan Yüce Allah'a çok şükrediyorum. Üç yıl boyunca yaşadığım ve kendimi bilimsel olarak geliştirdiğim bu güzel ülkenin güzel insanlarına da minnettarım. Öğrencilere öğretmenlik ve rehberlik yapmak dünyanın en kutsal mesleklerinden biridir ve bu görev geleceğin sektöründeki bireyi şekillendirmeyi gerektirdiği için daha da önemlidir. Bu durumu anlayan, bilgi ve tecrübelerini bizlere aktararak bizleri sosyal ve akademik hayata ve bu alanlarda başarıya hazırlamak için elinden geleni yapan değerli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Sergül ERGİN'e şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarımnda bana büyük mutluluk ve gurur veren ESOGÜ Ziraat Fakültesi ve Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü Bölüm Başkanı Prof. Dr. Ece TURHAN'a ve bölüm öğretim üyeleri ve çalışanlarına, eğitimim boyunca bilgi ve değerli yardımlarıyla yanımda olan herkese şükranlarımı sunarım.

Ayrıca bana her konuda destek olan, sabır ve tahammül gösteren ve her zaman ilgi gösteren aileme sevgi, saygı ve şükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	vi
SUMMARY	vii
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI	5
3. MATERYAL VE YÖNTEM	17
3.1. Bitki Materyal.....	17
3.2. Yöntem.....	17
3.2.1. Hücre membran zararlanma oranı.....	18
3.2.2. Yaprak oransal su kapsamı (YOSK) ve turgor kaybı (TK).....	19
3.2.3. Prolin miktarının belirlenmesi.....	20
3.2.4. Enzim aktivitelerinin belirlenmesi.....	20
3.2.4.1. <u>Katalaz (CAT) analizi</u>	20
3.2.4.2. <u>Askorbat peroksidaz (APX) analizi</u>	21
3.2.5. Toplam çözünebilir protein (TÇP) analizi.....	21
3.2.6. SDS-PAGE (Sodyum dodesilsülfat- poliakrilamid jel elektroforezi) analizi.....	22
3.2.7. İstatiksel analizler.....	24
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	25
4.1. Hücre Membran Zararlanma Oranı.....	25
4.2. Yaprak Oransal Su Kapsamı (YOSK) Ve Turgor Kaybı (TK).....	26
4.3. Prolin Miktarı.....	29

İÇİNDEKİLER

Sayfa

4.4. Antioksidan Enzim Aktiviteleri.....	31
4.4.1. Katalaz (CAT) aktivitesi	31
4.4.2. Askorbat peroksidaz (APX) aktivitesi	32
4.5. Toplam Çözünebilir Protein (TÇP) Miktarı	35
4.6. SDS-PAGE (Sodyum Dodesilsülfat- Poliakrilamid Jel Elektroforezi) Protein Profilleri.....	36
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	39
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	41
EK AÇIKLAMALAR.....	51
Ek Açıklamalar-A: Hücre Membran Zararlanması (%) İnteraksiyon Tablosu.....	52
Ek Açıklamalar-B: Yaprak Oransal Su Kapsamı (%) İnteraksiyon Tablosu.....	53
Ek Açıklamalar-C: Turgor Kaybı (%) İnteraksiyon Tablosu.....	54
Ek Açıklamalar-D: Prolin ($\mu\text{M/gTA}$) İnteraksiyon Tablosu.....	55
Ek Açıklamalar-E: Katalaz (CAT) analizi ($\mu\text{M/mg protein}$) İnteraksiyon Tablosu....	56
Ek Açıklamalar-F: Askorbat peroksidaz (APX) analizi ($\mu\text{M/mg protein}$) İnteraksiyon Tablosu.....	57
EK Açıklamalar-G: Toplam Çözünebilir Protein (mg protein/gTA) İnteraksiyon Tablosu.....	58

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.1. Deneme sonunda bitkilerin görünümü.....	18
4. 1. Tuz stresi altında ve tuz stresi olmayan koşullarda 5 mM prolin uygulamasının biber bitkisi yapraklarında hücre membran zararlanma oranlarına etkileri. Dikey barlar tekerrürler arasındaki $\pm$ SS'ları göstermektedir.....	26
4. 2. Tuz stresi altında ve tuz stresi olmayan koşullarda 5 mM prolin uygulamasının biber bitkisi yapraklarında yaprak oransal su kapsamı (YOSK) üzerine etkileri. Dikey barlar tekerrürler arasındaki $\pm$ SS'ları göstermektedir.....	27
4. 3. Tuz stresi altında ve tuz stresi olmayan koşullarda 5 mM prolin uygulamasının biber bitkisi yapraklarında turgor kaybı (TK) üzerindeki etkileri. Dikey barlar tekerrürler arasındaki $\pm$ SS'ları göstermektedir.....	28
4. 4. Tuz stresi altında prolin uygulamasının biber bitkisi yapraklarında prolin miktarına etkileri. Dikey barlar tekerrürler arasındaki $\pm$ SS'ları göstermektedir.....	30
4. 5. Tuz stresi altında ve tuz stresi olmayan koşullarda 5 mM prolin uygulamasının biber bitkisi yapraklarında Katalaz enziminin aktivitesi hakkında etkileri. Dikey barlar tekerrürler arasındaki $\pm$ SS'ları göstermektedir.....	32
4. 6. Tuz stresi altında ve tuz stresi olmayan koşullarda 5 mM prolin uygulamasının biber bitkisi yapraklarında Askorbat peroksidaz (APX) enziminin aktivitesi hakkında etkileri. Dikey barlar tekerrürler arasındaki $\pm$ SS'ları göstermektedir.....	33
4. 7. Tuz stresi altında ve tuz stresi olmayan koşullarda 5 mM prolin uygulamasının biber bitkisi yapraklarında TÇP miktarına etkisi. Dikey barlar tekerrürler arasındaki $\pm$ SS'ları göstermektedir.....	36
4.8. Tuzluluk stresi altında prolin uygulamasının biber bitkilerinin SDS-PAGE protein profilleri üzerindeki etkisi. MA: Moleküler Ağırlık Standardı (kDa), 1: Kontrol, 2: Pro, 3: 50 mM NaCl, 4: 50 mM NaCl + Pro, 5: 100 mM NaCl, 6: 100 mM NaCl+ Pro.....	37

ÇİZELGELER DİZİNİ

Cizelge

Sayfa

3.1. Çalışma sırasında kullanılan NaCl ve prolin konsantrasyonunu açıklayın.....	17
3. 2. Toplam çözünebilir protein (TÇP) ekstraksiyon çözeltisi bileşen ve miktarları.....	21
3. 3. 6X örnek yükleme çözeltisi bileşen ve miktarları.....	22
3. 4. %12,5 ayırma jeli bileşenleri.....	23
3.5. %4'lük örnek yükleme jeli bileşenleri.....	23
3. 6. 10X'lik yürütme tamponu bileşenleri.....	24

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Açıklama

%	Yüzde
~	Yaklaşık olarak
°C	Santigrad derece
Ca	Kalsiyum
cm	Santimetre
D/sm	Desimens / metre
EC	Elektriksel İletkenlik
g	Göreceli santrifüj kuvveti
g	Gram
K	Potasyum
K ₂ HPO ₄	Dipotasyum fosfat
kDa	Kilo dalton
KH ₂ PO ₄	Değiştirici dihidrojen fosfat
M	Molar
mA	Miliamper
Mg	Magnezyum
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
Na	Sodyum
NaCl	Sodyum klorür
nm	Nanometre
pH	Çözeltilerin asitlik/ bazlık ölçü birimi
Ppm	Milyonda bir
PVP-40	Poli vinil pirolidon 40

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**Simgeler****Açıklama**

rpm	Dakikadaki dönme sayısı (Revolution per minute)
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Kısaltmalar

Açıklama

ABA	Absisik asit
APS	Amonyum persülfat
APX	Askorbat peroksidaz
AsA	Askorbat
ASC-GSH	Askorbat-glutatyon
ATP	Adenozin trifosfat
BSA	Bovine Serum Albümin
Ca	Kalsiyum
CAT	Katalaz
Chl	Klorofil
Cl	Klor
DHAR	Dehidroaskorbat redüktaz
DHN	Dehidrin
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DTT	1,4 dithiothreitol
EBL	24-Epibrassinolid
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
FAO	Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
GB	Glisin betain

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
Glu	Glutamik asit
Gly I	Glioksalaz I
Gly II	De glioksalaz II
GPX	Glutasyon peroksidaz
GR	Glutasyon redüktaz
GSA	Glutamat-1-semialdehit
GSH	Glutasyon
GSSG	Glutasyon disülfid
GST	Glutasyon S-transferaz
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HCl	Hidroklorik asit
HSP	Isı şoku proteini (Heat Shock Protein)
İ.S.	İyon sızıntısı
LEA	Late embryogenesis abundant, geç embriyogenez grubu
MDA	Melondialdehyde
MDHAR	Monodehidroaskorbat redüktaz
Mg	Magnezyum
MG	Metilglükoksal
NADP	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
NO ₂	Azot dioksit
NO ₃	Nitrat
NPK	Azot (N), Fosfor (P) ve Potasyum (K)
O.D.	Absorbans değeri (Optical density)
Orn	Ornitin
P	Fosfor
P5C	Pirolin-5-karboksilat
PEG	Polietilen glikol (Polyethylene glycol)
PMSF	Phenylmethanesulfonyl fluoride
POD	Peroksidaz
PPO	Polifenol oksidaz
Pro	Prolin
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidone
RMP	Bağıl membran geçirgenliği
ROS	Reaktif oksijen türevleri (Reactive oxygen species)
RWC	Yaprak su kapsamı
SDI	Yüzeyaltı damlama sulaması
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat- Poliakrilamid jel elektroforezi

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**Kısaltmalar****Açıklama**

SOD	Superoksit dismütaz
SPSS	Statistical package for the social sciences
SS	Standart sapma
TA	Turgor ağırlığı
TBS	Tris buffer saline
TBST	Tris buffer saline tween-20
TÇP	Toplam çözünebilir protein
TEMED	N, N, N', N' -Tetrametiletildiamin
TK	Turgor kaybı
TÜİK	Türkiye istatistik kurumu
YA	Yaş ağırlık
YOSK	Yaprak oransal su kapsamı

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Bitkiler, sürekli değişen ve genellikle büyüme ve gelişim için olumsuz ya da stresli olan ortamlarda yaşarlar. Bu olumsuz çevresel koşulları, patojen enfeksiyonu ve otobur saldırısı gibi biyotik stresleri ve kuraklık, tuzluluk, yüksek ve düşük sıcaklıklar, besin eksikliği ve toprakta alüminyum, arsenat ve kadmiyum gibi toksik metallerin fazlalığı v.b. abiyotik stresleri içerir (Zhu, 2016). Kuraklık, tuz ve sıcaklık stresleri, doğada bitkilerin coğrafi dağılımını etkileyen, tarımda bitki verimliliğini sınırlandıran ve gıda güvenliğini tehdit eden ana çevresel faktörlerdir. İklim değişikliği nedeniyle aşırı hava olaylarının sıklığında bir artış olması ve bu abiyotik streslerin olumsuz etkilerinin şiddetlenmesi öngörülmektedir (Fedoroff vd., 2010).

Toprakta ve sulama suyundaki tuzluluk, bir çevresel sorun olup, tarımsal üretim için önemli bir kısıtlamadır. Tuzluluk ya da tuzlanma, genişleyen kentleşme, sanayileşme ya da tarımın modernleşmesinden kaynaklanan güncel bir küresel olay değil, sulamalı tarımın tarihi kadar eski bir sorundur (Gad, 2020). Ancak, tuzluluk, artan nüfusla birlikte daha da şiddetlenmekte ve dünya çapında tarım alanlarını tehdit etmektedir. Bu durum, biyoçeşitliliği ve tarımsal verimliliği azaltarak, çevreyi tahrip ederek, yeraltı sularını kirleterek, sel riskleri yaratarak ve toplumun ekonomik büyümesini sınırlandırarak karasal ekosistemlerin tüm şekillerinin kapasitesini azaltmaktadır (Hayat vd., 2020).

Tuzluluğun çeşitli nedenleri vardır, bunlar; doğal (ana materyalin aşınması, rüzgar ve yağmurla taşınan deniz tuzunun birikimi, gelgit suyu ile kıyı topraklarının sular altında kalması vb.) ve insan faaliyetlerini (yer altı suyuyla aşırı sulama nedeniyle su tablasının yükselmesi, tuz içeren suyla sulama, yetersiz drenaj vb.) içerir (Hasanuzzaman vd., 2013; Munns, 2005; Manchanda ve Garg, 2008).

Tuzla ilgili stres çalışmalarında, sıklıkla eş anlamlı olarak kullanılan fakat birbirlerinden ayırt edici iki temel terminoloji bulunmaktadır: "Tuz Stresi" ve "Tuz Şoku". "Tuz Stresi", bitkilerin sodyum klorür (NaCl) maruziyetine verdikleri tepkileri tanımlar ve bu, iki değişik formda meydana gelebilir. İlk yaklaşım, bitkilerin kademeli olarak artan tuz konsantrasyonlarına maruz bırakılması iken; ikincisi, bitkilerin düşük tuz

konsantrasyonlarında tutulması veya bu iki yöntemin kombine edilmesi şeklinde uygulanabilir (Shavrukov, 2013). Öte yandan, "Tuz Şoku" terimi, bitkilerin yüksek tuz konsantrasyonlarına ani bir maruz kalma durumunu tanımlar (Shavrukov, 2013).

Artan tuzluluk seviyeleri, çimlenme, bitki büyümesi ve üreme, fizyolojik süreçler, fotosentez, solunum, terleme, zar özellikleri, besin dengesi, enzimatik aktivite ve metabolik aktiviteler, hücrel homeostaz ve hormon düzenlemesi üzerinde olumsuz etkilere neden olur ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimine neden olur. Ağır stres durumları bitkinin ölümüne yol açar (Mahajan ve Tuteja, 2005; Munns, 2005; Manchanda ve Garg, 2008; Hasanuzzaman vd., 2012).

Günümüzde, bitkilerin fizyolojik durumunu değerlendirmek için birçok stres belirteci ölçülmüştür (Parida ve Das, 2005). Bunlar arasında prolin ve çözünür protein içeriği, fotosentetik pigmentler ve oksidatif hasarın metabolik ürünleri bulunmaktadır. Tuz stresi ayrıca oksidatif hasara neden olur, böylece hücrel zar bütünlüğünü, enzim aktivitelerini ve bitkinin fotosentetik işleyişini etkiler (Jithesh vd., 2006). Bu tür durumlar, hem hücre dışı hem de hücre içi olarak çeşitli ROS'ların oluşumunu artırır. Reaktif oksijen türevleri oldukça reaktiftir ve birçok hücrel makromolekülle örneğin, DNA, proteinler, lipidler ve pigmentlerle etkileşebilir. Reaktif oksijen türevleri oluşumu kontrol altında tutulmadığı zaman bitki hücrelerinde yıkıcı süreçlere neden olabilir (Mittler, 2002). Bu nedenle, aşırı ROS birikimi, stres koşullarının bir göstergesi olarak kabul edilir ve özellikle uzun süreli tuz stresi sırasında bitkilerin ROS oluşumu ve yıkımı arasındaki dengeyi korumaları çok önemlidir (Light vd., 2005).

Tuz kaynaklı oksidatif strese karşı koymak için bitkilerin farklı tiplerde enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar ürettiği bilinmektedir (Gupta vd., 2005). Genellikle bilinen enzimatik antioksidanlar arasında süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), peroksidaz (POD) ve glutatyon redüktaz (GR) bulunurken, enzimatik olmayan antioksidanlar arasında da glutatyon (GSH), askorbat (AsA), karotenoidler ve tokoferoller yer alır (Gupta vd., 2005).

Prolin, sinyal üretim süreçlerini tetikleyerek, bir bitki büyüme düzenleyici olarak işlev gören çok işlevli bir amino asittir (Yang vd., 2009). Ayrıca, prolin, hidrofobik bileşiklerin çözünürlüğünü artırarak proteinlerle uyumlu bir hidrotrop olarak hareket eder (Ashraf ve Foolad, 2007). Sitoplazmik asidozu destekler ve hücrel metabolizma için hayati olan NADP⁺/NADPH oranlarını korur (Kaya vd., 2007; Ali vd., 2007). Genellikle bir osmoprotektan olarak tanınan prolin, serbest radikalleri nötralize ederek oksidatif hasarı da azaltır (Ashraf ve Foolad, 2007). Hücrel osmotik ayarlamayı modüle ederek, zar bütünlüğünü koruyarak, proteinleri ve enzimleri stabilize ederek ve ROS'ları detoksifiye ederek tuz toleransını teşvik etmede merkezi bir rol oynar (Ashraf ve Foolad, 2007).

Tuz stresi koşullarındaki bitkilere prolin uygulaması, bitki su ilişkilerini iyileştirebilir ve su kullanım verimliliğini artırabilir. Bu durum, suyun dışa akışının inhibisyonu ile sağlanır. Bu durum, su kaybının inhibisyonu ile sağlanır. Bu inhibisyon, prolinin zar stabilitesi ve stoma hareketlerinin düzenlenmesi üzerindeki etkileri yoluyla terlemenin azaltılması şeklinde gerçekleşir (Kaya ve Tuna 2006; Ali vd. 2007).

Dışsal prolin uygulaması için çeşitli teknikler mevcuttur, bunlar arasında yapraktan püskürtme ve tohum ön uygulama yapma en yaygınlarıdır (Hosseini vd., 2022). Ayrıca, prolinin yaprak üzerine uygulanması, stoma iletkenliği, buharlaşma, fotosentez oranı ve su kullanım verimliliğini artırır (Kaya vd., 2007; Ali vd., 2007). Tohum ön uygulama yapmanın faydalı etkileri, su emilimi ve çimlenme öncesi metabolizmaya bağlıdır (Paparella vd., 2015).

Biber, *Capsicum* cinsine dahil edilen botanik bir meyvedir ve Solanaceae familyasının temel üyelerindendir. Biberin karakteristik acı tadı, içeriğinde barındırdığı kapsaisin bileşiğinden kaynaklanmaktadır. Biberin farklı renk, boyut ve acılık derecelerinde çeşitleri bulunmaktadır. Zengin vitamin ve mineral içeriğiyle, özellikle C vitamini açısından dikkate değerdir. Aynı zamanda antioksidan ve anti-enflamatuar özellikleri ile tanınmaktadır. Ek olarak, biber, mutfak sanatında ve ticari değişimde binlerce yıl kullanılmış olup, dünya genelinde birçok topluluğun kültürel mirasının bir parçasıdır (Subramanyam vd., 2011).

Dünya genelindeki yarı kurak bölgeler, özellikle Akdeniz gibi, sulama için yeterli ve kaliteli su bulma konusunda zorluklar yaşamaktadır. Bu bölgelerde yaygın olarak klor bileşenli yer altı suları kullanılmaktadır, ancak bu sular genellikle aşırı çözünabilir tuz içermektedir (Ünlükara ve Karadavut, 2006). Toprak tuzluluğu, kurak ve yarı kurak bölgelerde sorunlara neden olmakla birlikte, aşırı sulama yapılan ve drenaj sorunları olan bölgelerde de ortaya çıkabilmektedir (Flowers, 1999). Toprak ve su tuzluluğu, çimlenmeyi, büyümeyi ve verimi olumsuz etkileyerek bitkilere zarar verebilmektedir (Ünlükara ve Karadavut, 2006). Bu tuzlanmanın temel nedenleri arasında çözünabilir tuzların toprak katmanlarında ve taban suyunda birikmesi, sulama suyunun kalitesizliği, sulama sularında aşırı düzeyde eriyebilir tuzların bulunması, yetersiz drenaj ve kök bölgesinde tuz birikimi bulunmaktadır (Epstein vd., 1980; Quamme ve Stushoff, 1983). Bu durumlar bitkilerin su eksikliği, Na^+ ve Cl^- iyonlarının toksik etkileri, besin maddelerinin düzensiz alınması veya sürgünlere taşınması gibi sorunlarla karşılaşmalarına neden olabilir (Martinez – Rodriguez vd., 2002). Dünya çapında yetiştirilen biberin toprak tuzluluğu için eşik EC değerinin 1,5 dS/m, sulama suyu tuzluluğu için eşik EC değerinin 1,0 dS/m olduğu bildirilmiştir (Özdemir vd., 2016).

Bu çalışmada, ülkemizde ve dünyada yaygın olarak yetiştirilen ve önemli ekonomik getirisi olan biber bitkisinin, tuz stresi koşullarında meydana gelen fizyolojik ve moleküler değişimlerin incelenmesi ve prolin uygulamalarının stres toleransına etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

Abiyotik stres, bitki büyümesini ve üretkenliğini olumsuz etkileyen morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler bir dizi değişikliğe yol açar (Wang vd., 2000). Bitkilerin abiyotik streslere verdikleri tepkileri anlamak, stres toleransının gelişimi, tüm organizma seviyesinde ve hücresel seviyede karmaşık bir süreçtir. Hücresel stres tepkileri arasında zar sisteminin ayarlanması, hücre duvarı mimarisinin modifikasyonu ile hücre döngüsünde ve hücre bölünmesinde değişiklikler bulunmaktadır (Ashraf ve Foolad, 2007; Hirayama ve Shinoza, 2010). Ek olarak, bitkiler, proteinleri ve hücresel yapıları stabilize edebilen ve/veya osmotik ayarlama ile hücre turgorunu sürdürebilen uyumlu çözümlerin (örn. prolin, rafinoz ve glisin betain gibi) üretimi de dahil olmak üzere metabolizmalarını çeşitli şekillerde değiştirirler. Ayrıca, reaktif oksijen türevlerinin (ROS) aşırı seviyelerini ortadan kaldırmak ve hücresel redoks dengesini yeniden kurmak için redoks metabolizmasını değiştirirler (Bartels ve Sunkar, 2005; Valliyodan ve Nguyen, 2006; Munns ve Tester, 2008; Janská vd., 2010).

Bitkilerde prolin biyosentezi, biyosentez, katabolizma ve hücreler arası taşıma ile düzenlenir (Liu ve Wang, 2020). Prolin-5-karboksilat (P5C) birincil öncüdür (Hossain vd., 2019). Prolinin sentez ve parçalanma yollarını çeşitli enzimler denetler (Singh vd., 2015). Stres altında, parçalanmanın azalması nedeniyle bitkilerde prolin birikir (Delauney ve Verma, 1993). Prolin sentezi kloroplast ve sitoplazmada gerçekleşirken, katabolizması ise mitokondride gerçekleşir (Szepesi ve Szöllösi, 2018). Prolin sentezi bitkilerde iki yol üzerinden gerçekleşir ve glutamik asit (Glu) ile ornitin (Orn) prolin biyosentezinin öncü maddeleridir (Liu ve Wang, 2020). Glutamik asit yolu, prolin sentezi için ana yol olup, Orn yolu, ko-ekspresyon analizleri ve radyoaktif işaretleyici çalışmaları için alternatif bir yol olarak kabul edilir (Da Rocha vd., 2012). Ornitin yolu ile prolin sentezinin aşırı optimal azot koşulları ve fide gelişimi sırasında gerçekleştiği bildirilmiştir. Bununla birlikte, Glu yolu azot eksikliği ve/veya diğer stres durumlarında prolin sentezlemek için ana yol haline gelir (Delauney ve Verma, 1993; Armengaud vd., 2004). Glutamik asit yolu ile prolin sentezi, sitoplazma ve/veya kloroplast içinde iki enzimatik adımda gerçekleşir. Glutamik asit (Glu), P5C sentaz tarafından glutamat-1-semialdehit (GSA)'e indirgenir ve ardından P5C'ye dönüştürülür. Sonraki adımda ikinci enzim, P5C redüktaz, P5C'yi proline indirgeyebilir. Bu

süreç için gereken elektronlar iki NADPH tarafından sağlanır ve prolin biyosentezinde bir ATP tüketilir (Liu ve Wang, 2020; Meena vd., 2019).

Yaprak oransal su kapsamı (YOSK), yaprak su potansiyeli (YSP) ile doğrudan ilişkili olduğundan bitki su ilişkilerinin incelendiği çalışmalarda önemli bir parametredir. Çünkü bitkinin gelişimine devam edebilmesi için kritik su miktarının belirlenmesi gerekmektedir. Yaprak su potansiyelinin düşük olduğu durumlarda bitkinin turgorunun sürdürülebilmesi büyüme ve gelişmenin az da olsa devam ettiğini göstermektedir. Turgor potansiyelinin düzenlenemediği durumlarda YOSK değerindeki azalma, YSP'nin azalmasına ve sonuçta büyümenin durmasına neden olabilmektedir (Kaynaş, 1994; Kaynaş vd., 1995).

Tuz stresi altındaki guava (*Psidium guajava* L.) cv. Paluma'da yapraktan prolin uygulamasının morfofizyolojik etkileri değerlendirilmiştir. Sulama suyunun beş EC seviyesi (0,8, 1,5, 2,2, 2,9 ve 3,6 dS.m⁻¹) ve dört prolin konsantrasyonunun (0, 8, 16 ve 24 mM) kullanıldığı çalışmada dikimden 360 gün sonra 0,8 dS.m⁻¹ üzerindeki tuzluluk seviyelerinin guava bitkilerinin gaz değişimini, fotosentetik pigment sentezini, fotokimyasal verimliliğini ve büyümesini tehlikeye engellediği belirlenmiştir. Yapraktan 24 mM prolin uygulaması, 3,6 dS.m⁻¹ su ile sulanan bitkilerde YOSK, stoma iletkenliği ve karotenoid içerikleri üzerindeki tuz stresinin olumsuz etkilerini hafifletmiştir. Bu arada, 18 mM'a kadar prolin konsantrasyonu, 0,8 dS.m⁻¹ altında daha yüksek transpirasyon, CO₂ asimilasyon oranı, anlık karboksilasyon verimliliği ve gövde çapında mutlak büyüme oranı ile sonuçlanmıştır (Silva vd., 2024).

Askorbik asit (AsA, 1 mM) ve prolin (Pro, 1 mM) uygulamasının, 100 mM NaCl varlığında yetiştirilen buğday (*Triticum aestivum* cv. Salammbo) fidelerindeki etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmada tuz stresinin, büyüme, YOSK, klorofil, protein ve karbonhidrat içeriğinin azalmasına yol açtığı, SOD, CAT ve GPX enzim aktivitelerinin düşmesine neden olduğu ve MDA ve H₂O₂ miktarını artırdığı bildirilmiştir. Prolin ve AsA'nın ayrı ayrı uygulanması, bitki büyümesini, YOSK, klorofil, protein ve karbonhidrat içeriğini ve SOD, CAT ve GPX aktivitelerini artırdığı, H₂O₂ miktarını azalttığı belirlenmiştir. Bu çalışmanın sonuçları, AsA ve Pro'nun dışarıdan uygulanmasının, buğday bitkilerinde erken fide döneminde tuz stresinin zararlı etkilerini hafifletmede etkili olduğunu göstermiştir (Horchani vd., 2024).

‘Demre’ biber çeşidinde gerçekleştirilen bir araştırmada, 4-5 gerçek yapraklı bitkilere 100 mM konsantrasyonunda tuz uygulaması yapılmıştır. Tuz stresindeki bitkilerde farklı konsantrasyonlarda (24,64 ppm, 49,28 ppm, 73,92 ppm, 98,56 ppm, 123,2 ppm) uygulanan magnezyumun (Mg) bitkilerdeki antioksidan enzimler üzerindeki etkileri incelenmiştir. Malondialdehit (MDA) miktarları analiz edildiğinde, tüm tuz uygulamalarında kontrol grubuna göre bir artış olduğu belirlenmiştir. Katalaz aktivitesi için, kontrol grubuna göre ve diğer tuz uygulamalarına göre en büyük artışın ve istatistiksel olarak anlamlı farklılığın olduğu uygulama 123,2 ppm + Tuz olarak belirlenmiştir, en düşük değer ise 24,64 ppm + Tuz uygulamasından alınmıştır. Süperoksit dismutaz aktivitesinin ise en çok 123,2 ppm + Tuz uygulamasında arttığı belirlenmiştir. Yapılan ölçümler ve analizler neticesinde, artan Mg dozlarının tuz stresine maruz kalan biber bitkilerini olumsuz etkilerinden koruma potansiyeline sahip olduğuna dair bir sonuca varılmıştır (Şevgin Zirek, 2017).

Tuza toleranslı (Plahi) ve tuza duyarlı (A-120) iki farklı biber çeşidinin kullanıldığı bir çalışmada, tuz stresindeki (50 mM NaCl) bitkilere yapraktan prolin püskürtme 0,8 mM) uygulamasının, her iki genotipte de sodyum ve potasyumu düzenleyerek tuz toleransını artırdığı bildirilmiştir. Prolin uygulaması tuz stresi altındaki bitkilerde antioksidanların artmasına neden olmuştur. Ayrıca, glisin betain ve prolin içerikleri arasında önemli pozitif bir korelasyon bulunmuştur. Prolin uygulanan biber bitkilerinin performansının da uygulanmayan bitkilerden daha iyi olduğu vurgulanmıştır (Butt vd., 2020).

Buğdayda, çeşitlerin tuzluluk toleranslarını belirlemek ve prolin uygulamasına verdikleri yanıtları saptamak amacıyla on buğday çeşidinin kullanıldığı bir araştırmada tohumlar ekinde önce 8 saat süreyle 4 ve 8 mM prolin konsantrasyonlarında bekletilmiştir. Çimlenme sonrasında onuncu günde fideler, 0 ve 150 mM tuz uygulamasına tabi tutulmuştur. Çimlenmeden yirmi gün sonra, yapılan analizlerde, çeşitlere bağlı olarak klorofil içeriğindeki azalma ve Na⁺ birikimi tespit edilmiştir. Benzer şekilde, K⁺ alımı ve kök ile gövde arasındaki dağılımı değişmiştir. Tuz stresine maruz kalan buğday bitkilerinde antioksidan enzimlerin, özellikle SOD, POD ve CAT'ın aktivitelerinin önemli ölçüde arttığı bulunmuştur. Ayrıca, tohumların prolin ile muamelesinin, SOD, CAT ve POD antioksidan enzimlerinin aktivitesi üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu, ancak enzim aktivitelerinin çeşitlere göre değişiklik gösterdiği belirlenmiştir. Bununla birlikte, prolin tarafından

indüklenen antioksidan enzim aktivitelerindeki artışların, stres toleransına katkıda bulunduğu belirlenmiştir. Test edilen çeşitler arasında (Faisalabad-08 ve Bhakhar-2002) nispeten tuz toleranslı ve (AARI-10, MH-97 ve Auqab-2000) nispeten tuz duyarlı olarak sıralanmıştır (Shafiq vd., 2018).

Brassica juncea'nın iki çeşidi üzerinde yapılan bir denemede farklı seviyelerde (2,8, 4,2 veya 5,6 dS.m⁻¹) tuz (NaCl) stresi uygulanan bitkilerde yapraktan prolin (20 mM) uygulamasının biyokimyasal özelliklere etkisi değerlendirilmiştir. Tohum ekiminden 29 gün sonra tuz stresi altındaki ve stresli olmayan bitkilere 0 (su) ve 20 mM prolin püskürtülmüştür. Uygulamadan 60 gün sonra yaprak örnekleri alınmıştır. Tuz stresinin kontrole göre klorofil içeriğinde azalmaya, prolin içeriği ve antioksidan enzimlerin (CAT, POX ve SOD) aktivitelerinde artışa neden olduğu belirlenmiştir. Tuz stresi koşullarında yapılan prolin uygulaması, her iki çeşitte de klorofil içeriğini, antioksidan enzim aktivitelerini ve prolin içeriğini artırmıştır (Wani vd., 2016).

İki havuç (*Daucus carota* L.) çeşidi olan 'Arwa Red Long' ve 'Red Corl' üzerinde yapraktan püskürtme ile prolin uygulamasının rolünü değerlendirmek amacıyla yapılan çalışmada, NaCl'nin iki farklı konsantrasyonu (0 mM ve 150 mM) ve üç farklı prolin konsantrasyonu (0, 5, 10 mM) kullanılmıştır. Tuzlu koşullarda enzim aktiviteleri ve prolin içerikleri artmıştır. Prolin uygulamasının, POD aktivitesini önemli ölçüde arttırdığı, kök K⁺ ve Ca⁺² içeriğini arttırdığı ve her iki havuç çeşidinin köklerinde Na⁺ içeriğini azalttığı belirlenmiştir. 'Arwa Red Long', antioksidan enzim aktivitelerinin (SOD, POD) iyileşmiş olması, yüksek serbest prolin ve K⁺ ile Ca⁺² içeriği nedeniyle Red Corl çeşidine göre daha iyi bir performans sergilemiştir (Qirat vd., 2018).

İki kanola çeşidi 'Dunkled' (tuza toleranslı) ve 'Cyclone' (tuza duyarlı) iki hafta boyunca 0 ve 120 mM NaCl'de çimlendirilip, büyütülmüşlerdir. Tuz stresine maruz kalan ve maruz kalmayan bitkilere değişen konsantrasyonlarda (0, 0,1, 0,5, 1 ve 5 mM) prolin, çimlenen tohumlara çimlendirme ortamı aracılığıyla uygulanmıştır. Tuz stresi, her iki kanola çeşidinin filizlenmesi ve fide büyümesi üzerinde belirgin bir inhibe edici etki oluşturmuştur. Prolin uygulamaları, her iki kanola çeşidinin tohum filizlenmesi üzerindeki tuz stresinin olumsuz etkilerini hafifletmiştir. Ayrıca, büyüme ortamına 1 veya 5 mM prolin eklenmesinin

her iki çeşitte de tuzlu ortamda fide büyümesi ve gelişmesinde önemli etkileri olduğu gözlenmiştir (Wahid ve Jamil, 2009).

Korunga (*Onobrychis viciaefolia* Scop.) üzerinde yapılan bir çalışmada, 15 günlük fideler, 7 gün boyunca 2,5 mM prolin içeren veya içermeyen 0, 25 mM ve 100 mM NaCl ile muamele edilmiştir ve bu fidelerde biyokimyasal parametreler araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, kontrol grubuna göre, prolin veya düşük tuzun, bitkilerin hem sürgün hem de köklerinde MDA konsantrasyonları üzerinde anlamlı bir etkisi olmadığı görülmüştür. Yüksek tuz konsantrasyonunun ise, sürgündeki MDA miktarını kontrol grubuna göre belirgin bir şekilde artırdığı, ancak, yüksek tuz + prolin uygulamasının, yüksek tuz uygulamasına göre MDA miktarını önemli ölçüde azalttığı belirlenmiştir. Hücre zarının stabilitesini gösteren sürgün bağıl membran geçirgenliğinde (RMP) de, yüksek tuz+prolin uygulanan bitkilerde, sadece yüksek tuz uygulanan bitkilere kıyasla önemli bir azalma bulunmuştur. Bu sonuçlar, dışarıdan uygulanan prolinin oksidatif hasarı azaltabileceğini ve yüksek tuzluluk stresi altında hücre zarı stabilitesini koruyabileceğini göstermektedir (Wu vd., 2017).

Üç farklı tuzluluk seviyesine sahip (düşük, orta veya yüksek tuzluluk; sırasıyla, 1,84, 6,03 ve 8,97 dS.m⁻¹) ortamda yetiştirilen fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) üzerinde yürütülen bir çalışmada, her bir bitkiye ekimden sonra 20, 30 ve 40. günlerde 5 mM dışsal prolin uygulamaları yapılmıştır. Çalışma sonucunda, tuzsuz toprakta yetiştirilen fasulye bitkilerine oranla, artan tuz konsantrasyonuna bağlı olarak, klorofil ve karotenoid içeriği, prolin ve askorbik asit içeriği ile P ve K⁺ iyon konsantrasyonlarının büyük ölçüde azaldığı belirlenmiştir. Tuzluluğun artmasıyla yapraklardaki Na⁺ iyon seviyelerinde ve NO₃ ve NO₂ iyonlarında belirgin bir artış olmuştur. Orta seviyedeki tuzluluk stresi, fasulye bitkilerinin yapraklarında SOD, CAT ve POD aktivitelerinde büyük bir artışa neden olmuştur. Toprağın en yüksek tuzluluk seviyesinde (EC = 8,97 dS.m⁻¹) ise tüm antioksidan enzim aktivitelerinde önemli düşüşler gözlenmiştir. Prolin uygulamalarının klorofil ve karotenoid içeriğini artırmaya, antioksidan enzim aktivitelerini ve hem prolin hem de AsA için içsel seviyeleri artırmaya yönelik büyük bir etkisi olduğu bulunmuştur. Ayrıca prolin uygulamaları, P ve K⁺ konsantrasyonlarında, K⁺:Na⁺ oranında büyük artışlara, tuz etkisi altındaki bitkilerde Na⁺ iyon seviyelerinde düşüşe ve tuz stresine maruz kalan fasulye bitkilerinde NO⁻³ ve NO⁻² iyon seviyelerinde azalmaya yol açmıştır (Abdelhamid vd., 2013).

Baklada (*Vicia faba* L.) yapılan bir çalışmada, iki farklı deniz suyu (3,13 ve 6,25 dS.m⁻¹) konsantrasyonu ve prolin konsantrasyonları (0, 25 ve 50 mM) uygulanmıştır, kontrol bitkileri ise musluk suyu ile sulanmıştır (0,23 dS.m⁻¹). Deniz suyu uygulanan bitkilerde tuzluluk seviyeleri yapraklarda toplam karbonhidratlarda azalmaya, çözünür karbonhidratlarda ise önemli artışlara neden olmuştur. Toplam fenol konsantrasyonları ve serbest amino asit konsantrasyonları da önemli ölçüde artmıştır. Bakla yaprak dokularındaki polifenol oksidaz (PPO) ve POD aktiviteleri, tuzluluk seviyelerindeki artışlarla kademeli ve önemli artışlar göstermiştir. Musluk suyu veya seyreltilmiş deniz suyu ile sulanan ve iki prolin seviyesi ile muamele edilen bakla bitkilerinde kontrole kıyasla, toplam ve çözünür karbonhidratlarda artış olduğu, fenol konsantrasyonlarında, serbest amino asitlerde ve enzim aktivitelerinde (PPO ve POD) ise önemli azalmalar olduğu belirlenmiştir. Bakla bitkileri üzerindeki seyreltilmiş deniz suyunun toksisitesini azaltmada 25 mM prolin konsantrasyonunun etkili olduğu, ancak 50 mM prolin uygulamasının toksik etki yarattığı tespit edilmiştir (Dawood vd., 2014).

Arpa (*Hordeum vulgare* L.) üzerinde yapılan bir çalışmada, tohumlar 12 saat 1 mM prolin veya AsA içinde bekletilmiştir. Fideler üçüncü yaprak evresine geldiğinde, NaCl (0, 100 mM veya 200 mM) uygulaması yapılmıştır. Tuz stresi, arpa yapraklarının klorofil (Chl) a, Chl b, karotenoid içeriğini ve toplam çözünebilir şeker içeriğini önemli ölçüde azaltırken, yapraklardaki prolin miktarını ve antioksidatif enzim aktivitelerini (SOD, CAT ve POD) önemli ölçüde artırmıştır. Arpa tohumlarının AsA veya proline batırılması Chl a, Chl b ve karotenoid içeriğini ve toplam çözünür şeker içeriğini artırmıştır. Tuz stresi koşullarında, tohumlara önceden uygulanan prolin veya AsA, SOD ve CAT aktivitelerinde önemli bir artışa neden olmuştur. Peroksidaz aktivitesi ise biraz artmıştır. Yapraklardaki prolin içeriği ise kontrole kıyasla önemli ölçüde azalmıştır (Agami, 2014).

Tuz toleransını iyileştirmede yaprağa prolin püskürtmenin rolünü değerlendirmek için iki biber genotipi (Plahi ve A-120) üzerinde yapılan bir çalışmada bitkiler 50 mM NaCl altında büyütülmüştür. Bir aylık fidelere farklı konsantrasyonlarda prolin (0,4, 0,6, 0,8, 1,0 ve 1,2 mM) yapraktan uygulanmıştır. Tuz stresi, yapraklarda K⁺ konsantrasyonunda önemli bir azalmaya ve Na⁺ konsantrasyonunda artışa, MDA içeriği ve antioksidan enzimlerin (SOD ve CAT) aktivitelerinde bir artışa neden olmuştur. Tuz stresi altındaki bitkilere yapraktan püskürtme ile prolin uygulamaları, her iki genotipte de yaprak K⁺

konsantrasyonunu artırmış, Na^+ konsantrasyonunu azaltırken MDA içeriğini azaltmıştır. Sonuçlar, her iki genotipte de antioksidan enzimlerin (SOD ve CAT) aktivitesinde önemli bir artışı olduğunu göstermiştir. Dahası, tüm prolin konsantrasyonları arasında, her iki genotipte de iyonik ve biyokimyasal özellikler açısından en iyi konsantrasyonun 0,8 mM olduğu ortaya konmuştur (Butt vd., 2016).

Tuz stresinin zeytin bitkileri (*Olea europaea* L. cv. Chemlali) üzerindeki etkilerini azaltma potansiyelini değerlendirmek üzere yürütülen bir çalışmada, tuzlu su ile (0, 100, 200 mM) sulamaya tabi tutulan iki yaşındaki zeytin ağaçlarına farklı seviyelerde prolin (0, 25, 50 mM) uygulaması yapılmıştır. Sonuçlar, NaCl stresinin Chemlali zeytin bitkilerinin hem yaprak hem de kök dokularındaki prolin ve çözünür şeker içeriğini farklı seviyelerde artırdığını göstermiştir. Yüksek tuzluluk, klorofil içeriğinde önemli bir azalmaya neden olmuştur. Tuz stresi ayrıca, süperoksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APX) ve katalaz (CAT) gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerini önemli ölçüde artırmıştır. Diğer yandan, tüm dokularda polifenol oksidaz (PPO) aktivitesinde önemli bir azalma gözlenmiştir. Dışarıdan uygulanan prolin, bitki dokularındaki prolin içeriğini artırırken çözünür şeker içeriğini düşürmüş ve klorofil oranını yükseltmiştir. Prolin uygulaması ayrıca, SOD, APX ve CAT aktivitelerini de artırmış ve PPO aktivitesinde belirgin bir azalma sağlamıştır. Bu sonuçlar, ekzojen prolin uygulamasının tuz stresinin olumsuz etkilerini hafifletmede potansiyel bir strateji olabileceğini göstermektedir (Ben Ahmed vd., 2010).

Tuz stresine (25 mM NaCl) maruz kalan pirinç (*Oryza sativa* L.) bitkilerinde prolinin veya glisinbetainin (1 mM) (H_2O_2) ve (MDA) üzerindeki etkilerinin incelendiği bir çalışmada tuz stresinin, lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan MDA ve H_2O_2 miktarını ve artırdığı tespit edilmiştir. Araştırmacılar, prolin veya glisinbetain uygulamalarının, H_2O_2 ve lipid peroksidasyon seviyelerini azaltarak ve bitkilerde terleme oranını artırarak tuz stresinin zararlı etkilerini azalttığını ileri sürmüşlerdir (Sobahan vd., 2016).

Tuza hassas (BRRI dhan49) ve tuza toleranslı (BRRI dhan54) pirinç (*Oryza sativa* L.) çeşitlerinde ekzojen prolin (Pro, 5 mM) ve glisin betain (GB, 5 mM)'nin tuz stres toleransını artırmadaki rolünün araştırıldığı bir çalışmada fidelere 48 saat boyunca 150 ve 300 mM NaCl uygulanmıştır. Tuz stresi, yaprak nispi bağıl su içeriğini (RWC) ve klorofil içeriğini önemli ölçüde azaltmış, içsel prolin içeriğini artırmış, lipid peroksidasyon ve H_2O_2

seviyelerini yükseltmiştir. Hassas çeşitte tuz stresi nedeniyle askorbat (AsA), glutatyon (GSH) ve GSH/GSSG, askorbat peroksidaz (APX), monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR), dehidroaskorbat redüktaz (DHAR), glutatyon redüktaz (GR), glutatyon peroksidaz (GPX), katalaz (CAT) ve glioksalaz I (Gly I) aktiviteleri azalırken, toleranslı çeşitte ise bu aktiviteler artmıştır. Tuz stresi, her iki çeşitte de glioksalaz II (Gly II), glutatyon S-transferaz (GST) ve süperoksit dismutaz (SOD) aktivitelerini artırmıştır. Ekzojen Pro ve GB uygulaması, her iki çeşitte de stresli bitkilerde fizyolojik parametreleri iyileştirmiş ve oksidatif hasarı azaltmıştır. Ancak bu etkide BRRI dhan54 çeşidi daha iyi tolerans göstermiştir. Sonuçlar, ekzojen Pro ve GB uygulamasının, pirinç fidelerinde antioksidan savunma sistemini uyararak tuz kaynaklı oksidatif hasara karşı toleranslarını artırdığını göstermektedir. Bu koruyucu moleküllerin BRRI dhan54 çeşidinde daha etkili olduğu ve Pro'nun tuz stresine karşı GB'den daha iyi bir koruma kalkanı sağladığı bildirilmiştir (Hasanuzzaman vd., 2014).

Prolin uygulamasının tuzun etkilerine direnme yeteneği mısır (*Zea mays*) bitkilerinde incelenmiştir. Tuz varlığında (80 mM NaCl) veya yokluğunda yetiştirilen on günlük bitkiler üzerine damıtılmış su (kontrol) veya 30 mM prolin çözeltisi püskürtülmüştür. Prolinin en çarpıcı etkileri 14 günlük uygulamadan sonra kaydedilmiştir. Prolinin, artan K^+ içeriğiyle birlikte azalan Na^+ ve Cl^- birikimiyle yakından ilişkili olan tuz hasarı tepkisini hafiflettiği bulunmuştur. Ayrıca prolin uygulaması, CAT, APX ve SOD aktivitesini artırarak ve askorbat ve glutatyon seviyelerini azaltarak antioksidan sistemleri etkili bir şekilde aktive etmiştir. Prolin uygulanan bitkilerde, bu amino asidin daha fazla biriktiği, bu durumun, azalmış Δ^1 -pirolin-5-karboksilat enzim aktivitesi ve artan prolin dehidrojenaz aktivitesi ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir. Sonuç olarak, prolin uygulanan stresli bitkiler, tek başına stresli bitkilerle karşılaştırıldığında daha düşük H_2O_2 ve lipid peroksidasyon içeriği göstermiştir. Sonuçlar, prolin uygulamasının, inorganik çözünen madde içeriğinde ve antioksidan sistemlerde olumlu değişikliklere yol açtığını, tuzun neden olduğu oksidatif hasarı azalttığını ve mısır bitkilerinde tuza alışmayı iyileştirdiğini göstermiştir (De Freitas vd., 2018).

Prolin ve betainin (20 mM) Bright Yellow-2 (BY-2) tütün kültür hücrelerinin tuz stresi altında (200 mM NaCl) büyüme ve antioksidan enzim aktiviteleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Hem prolin hem de betain, BY-2 hücrelerinin tuz stresi altında büyüme

inhibisyonunu hafifletmiş ve prolinin hafifletici etkisi betaininkinden daha büyük olmuştur. Tuz stresi, BY-2 hücrelerinde SOD, CAT ve POD aktivitelerini önemli ölçüde azaltmıştır. Prolin veya betainin uygulanması, tuz stresi altında CAT ve POD aktivitelerindeki azalmayı hafifletmiştir ancak SOD aktivitesini hafifletmemiştir. Ayrıca, prolinin BY-2 hücrelerinde tuz stresi tarafından indüklenen katalaz ve peroksidaz aktivitelerinin inhibisyonunu hafifletmede etkili olduğu bulunmuştur. Prolin uygulamasının antioksidan enzim aktivitelerini artırma konusundaki üstün yeteneği nedeniyle tuz stresinin zararlı etkilerini azaltmada betain uygulamasından daha etkili olduğu bulunmuştur (Hoque vd., 2007).

Brassica juncea (L.) Varuna ve RH-30 olmak üzere iki farklı hardal çeşidinde gerçekleştirilen araştırmada, prolin ve/veya 24-epibrassinolid (EBL) içeren uygulamaların farklı tuz stresi seviyelerinde (78, 117, 156 mM) zararlı etkilerini azaltıp azaltmadığı araştırılmıştır. Her bitkinin yapraklarına, ekimden 28 gün sonra 20 mM prolin ile ve/veya ekimden 29 gün sonra 10-8 M EBL ile 10 dakika arayla üç kez püskürtülmüştür. Tuz stresi, her iki çeşitte de kontrol bitkilerine kıyasla klorofil değerlerinde azalma, prolin içeriğinde artış ve antioksidan enzimlerin (CAT, POX, SOD) aktivitesinde artışa neden olmuştur. Prolin ve/veya EBL uygulaması, iki tuz stresi seviyesinde (78 ve 117 mM) klorofil değerlerini artırırken, 156 mM uygulamasında ise NaCl'nin olumsuz etkisini kısmen ortadan kaldırmıştır. Prolin ve/veya 24-EBL ilavesi, her iki çeşidin yapraklarında antioksidan enzimlerin aktivitesini ve prolin içeriğini artırmıştır. Prolin ile birlikte dışarıdan uygulanan EBL'nin, 78 mM veya 117 mM tuz stresi seviyelerinde zararlı etkileri nötralize ettiği ve yüksek tuz konsantrasyonunun (156 mM) etkisini ise antioksidan sistemi düzenleyerek kısmen hafiflettiği bildirilmiştir (Wani vd., 2019).

Şeker kamışı kültür hücrelerinde tuz (NaCl) stresine karşı L-prolin, L-glutamin ve glisin betaine (GB)'nin büyüme, prolin birikimi ve antioksidan enzim aktiviteleri üzerindeki iyileştirici etkileri araştırılmıştır. Tuz stresi, kontrol grubuna kıyasla büyüme oranını önemli ölçüde azaltmıştır. Ancak, ortamda prolin veya glutamin takviyesi ile büyüme yeniden sağlanmıştır. Tuzlu veya tuzsuz ortamlarda prolin takviyesi, serbest prolin birikimini kontrol gruplarına ve diğer (prolin, GB ve glutamin) uygulamalarına kıyasla önemli ölçüde artırmıştır. Tuz stresi, süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon redüktaz aktivitesini artırmış, guaiacol peroksidaz (GPX), katalaz ve askorbat peroksidaz aktivitelerini ise önemli ölçüde azaltmıştır. Tuzlu ortamda prolin takviyesi, glutamin veya glisin betain ile takviye edilen

tuzlu ortamlara kıyasla GPX aktivitesini artırmıştır. Tuz toleransı için biyokimyasal belirteç olarak değerlendirilen SOD ve H_2O_2 giderici enzim aktiviteleri arasındaki aktivite oranı, prolinle takviye edilen tuzlu ortamda daha düşük bulunmuştur. Bu nedenle, daha yüksek büyüme oranı ve daha düşük aktivite oranı, şeker kamışı kültür hücrelerinde prolinin tuz stresine karşı en fazla iyileştirici etkiye sahip olduğunu göstermiştir (Patade vd., 2014).

Tuz stresi (100 mM) altındaki iki kavun (*Cucumis melo* L.) çeşidinde (cv. Yuhuang ve cv. Xuemei) yapılan bir çalışmada, 0,2 mM prolin uygulamasının etkileri incelenmiştir. Tuz stresinin klorofil içeriği, süperoksit radikal anyon seviyesi, H_2O_2 içeriği, malondialdehit (MDA) içeriği, köklerdeki elektrolit sızıntısı ve POD aktivitesinde belirgin bir artışa neden olduğu bulunmuştur. Ayrıca SOD, CAT, APX, DHAR ve GR gibi antioksidan enzimlerin, aktiviteleri de kontrol grubuna kıyasla her iki çeşidin köklerinde azaldığı belirlenmiştir. Sonuçlar, prolin uygulamasının klorofil içeriğini artırdığını, SOD, POD, CAT, APX, DHAR ve GR aktivitesini artırdığını, süperoksit radikal anyon düzeyini azalttığını ve H_2O_2 ve MDA içeriğini düşürdüğünü göstermiştir. Prolin uygulaması, her iki kavun çeşidinde de tuzluluk kaynaklı membran hasarını azaltarak, her iki kavun çeşidinde tuzluluk toleransını artırmış ve tuzluluktan kaynaklanan hasarı hafifletmiştir. Ancak, prolinin yukarıdaki tüm etkileri cv. Xuemei'de cv. Yuhuang'a kıyasla belirgin olarak daha fazla olduğundan, prolinin farklı kavun çeşitleri üzerinde farklı etkileri olduğu belirtilmiştir (Yan vd., 2011).

Pirinçte (*Oryza sativa* L. cv. KDML105) prolin ve/veya glisin betaine (GB) uygulamasının tuz stresi altındaki bitkilerde büyüme, fotosentetik pigmentler, H_2O_2 içeriği ve antioksidan enzim aktiviteleri üzerine etkileri araştırılmıştır. Üç haftalık fidelere, 0 (kontrol), 60, 120 veya 160 mM NaCl içeren besin solüsyonuna çeşitli konsantrasyonlarda GB (1, 5, 15 veya 30 mM) veya prolin (15, 30 veya 45 mM) veya her ikisi (30 mM prolin ve 1 mM GB) birlikte 3 gün boyunca uygulanmış ve ardından kontrol koşullarına geri getirilmiştir. Tuz stresi altında H_2O_2 içeriği ve süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon redüktaz (GR) ve askorbat peroksidaz (APX) aktivitelerinin arttığı, ancak katalaz (CAT) aktivitesinde bir değişiklik olmadığı belirtilmiştir. 160 mM NaCl'da, prolin varlığında CAT aktivitesi stres öncesi seviyede tutulurken, GB varlığında GR aktivitesi GB uygulamasız duruma göre daha fazla artmıştır. 30 mM prolin ve 1 mM GB'nin birlikte uygulanması, NaCl stresinin neden olduğu H_2O_2 artışını her bir osmoprotektantın tek tek uygulamak kadar azaltmadığı ve antioksidan enzimler üzerinde sinerjik bir etkisi olmadığı belirlenmiştir.

Ancak, her iki osmoprotektanının birlikte uygulanmasının, fotosentetik pigmentlerin bozulmasını hafifletmede en etkili yöntem olduğu bildirilmiştir (Wutipraditkul vd., 2015).

Tuz stresine maruz bırakılan (200 mM NaCl, 48 saat) maş fasulyesi (*Vigna radiata* cv. Binamoog) fidelerine uygulanan prolin ve glisin betainin (5 mM prolin veya 5 mM betain) antioksidan savunma ve metilglükoksal (MG) detoksifikasyon sisteminde sinerjistik etkilerini değerlendirmek amacıyla yapılan bir çalışmada, yedi günlük maş fasulyesi fideleri, prolin veya betain ile ön işleme tabi tutulduktan sonra tuz stresine maruz bırakılmıştır. Tuz stresi, yapraklardaki indirgenmiş glutatyon (GSH) ve oksitlenmiş glutatyon (GSSG) içeriğinde keskin bir artışa neden olurken, GSH/GSSG oranı ve askorbat (AsA) içeriğinde ise önemli ölçüde azalmaya neden olmuştur. Glutatyon redüktaz (GR), glutatyon peroksidaz (GPX), glutatyon S-transferaz (GST) ve glioksalaz II (Gly II) aktivitelerinin tuz stresine yanıt olarak arttığı monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR), dehidroaskorbat redüktaz (DHAR), katalaz (CAT) ve glioksalaz I (Gly I) aktivitelerinin ise, hidrojen peroksit (H_2O_2) ve lipid peroksidasyon seviyesindeki (MDA) artışla bağlantılı olarak keskin bir şekilde azaldığı belirlenmiştir. Prolin veya betain ön uygulaması, genellikle kontrole kıyasla enzimatik olmayan ve enzimatik bileşenler üzerinde az bir etkiye sahip olmuştur. Bununla birlikte, prolin veya betain ile muamele edilen tuz stresindeki fidelerde, AsA ve GSH içeriğinde ve GSH/GSSG oranında artış olduğu, APX, DHAR, GR, GST, GPX, CAT, Gly I ve Gly II aktivitelerinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar, antioksidan savunmanın koordinasyonunun ve glioksalaz sisteminin prolin ve betain tarafından uyarılmasının sinerjistik olarak bitkileri tuzluluğun neden olduğu oksidatif strese karşı toleranslı hale getirdiğini göstermektedir (Hossain vd., 2011).

Tuz stresi (100 mM) altındaki çeltik fideleri (*Oryza sativa* L. cv. KDML105) üzerinde prolin (10 mM) uygulamasının etkisi araştırılmıştır. Tuz stresi, Na^+/K^+ oranının yükselmesine, prolin seviyelerinin artmasına, prolin sentez genlerinin (P5CS ve P5CR) yukarı regülasyonuna, hidrojen peroksit (H_2O_2) birikimine, antioksidatif enzimlerin (SOD, POX, APX, CAT) aktivitesinin artmasına ve antioksidan enzimleri kodlayan genlerin yukarı regülasyonuna neden olmuştur. Tuz stresindeki bitkilere prolin uygulaması, Na^+/K^+ oranını azaltmıştır ve P5CS ve P5CR'in transkript seviyelerini daha da arttırmıştır. Ancak dört antioksidan enzimin aktivitesini de azaltmıştır. Geri kazanım sırasında, Pro+tuz uygulanan bitkiler, NaCl uygulanan bitkilerle karşılaştırıldığında endojen prolinde daha büyük bir

azalma olduğu tespit edilmiştir. Artan CAT aktivitesinin H_2O_2 'deki önemli azalmayla yakından ilişkili olduğu, prolinin yararlı etkilerinin aynı zamanda iyileşme sırasında APX aktivitesindeki artışla da bağlantılı olduğu bildirilmiştir (Nounjan vd., 2012).

Tuzlu sulama suyu ($6,57 \text{ dS.m}^{-1}$) ile sulanan iki domates çeşidi (*Solanum lycopersicum*, cv. Rio Grande ve Heinz-2274) üzerinde yapılan bir çalışmada bitkilere çiçeklenme aşamasında, iki farklı prolin konsantrasyonu (10 ve 20 mg.L^{-1}) yapraktan püskürtme yoluyla verilmiştir. Kontrol grubuna ise tuz ve prolin uygulaması yapılmamıştır. Her iki domates çeşidinde de tuzlu su ($6,57 \text{ dS.m}^{-1}$) ile sulanmış ve daha düşük konsantrasyonda prolin uygulanmış bitkilerde prolin miktarı ve toplam çözünür protein içeriğinde önemli artışlar olduğu belirlenmiştir. Glutamin sentetaz ve prolin oksidaz aktivitelerinde ise düşüşler görülmüştür. Elde edilen sonuçlar göz önüne alındığında, düşük konsantrasyonda prolinin yapraktan püskürtülmesinin, saha koşullarında her iki domates çeşidinin de tuzluluğa karşı toleransını artırabileceği sonucuna varılmıştır (Kahlaoui vd., 2018).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu araştırma, 20/10/2023-25/03/2024 tarihleri arasında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü serasında ve laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

3.1. Bitki Materyali

Araştırmada ‘Sera Demre’ biber çeşidi tohumları kullanılmıştır. Tohumlar, 20 Ekim 2023 tarihinde, her gözde birer adet olmak üzere, torf içeren 45’lik 31.5×51.5 cm boyutunda fide yetiştirme viyollerine ekilmiştir. Musluk suyuyla düzenli olarak sulama yapılmıştır. Fideler 4-6 yapraklı olduğu dönemde, 11×10.50 cm boyutunda, toprak, perlit ve torf karışımı (1:1:1) içeren saksılara aktarılmıştır. Fideler kontrollü serada; 18/25 °C gece ve gündüz sıcaklığı ± 5 nem, 16/8 saat (aydınlık/karanlık) koşullarında yetiştirilmişlerdir.

3.2. Yöntem

Bitkiler saksıya alındıktan sonraki 40. gün, Çizelge 3.1’de belirtilen konsantrasyonlara göre uygulamalara başlanmıştır. Belirlenen konsantrasyonlara ulaşılan osmotik şoku önlemek için, tuz konsantrasyonları 0, 25, 50, 75 ve 100 mM olacak şekilde verilmiştir. Bitkilerin ihtiyaç duyduğu su miktarı saksılar tartılarak, tarla kapasitesine göre belirlenmiştir. Bitkilerin mineral ihtiyaçlarını karşılamak için, düzenli aralıklarla 7:7:7 NPK gübresi uygulanmıştır (Vural vd., 2000).

Çizelge 3.1 Çalışma sırasında kullanılan NaCl ve prolin konsantrasyonları

NaCl (mM)	Prolin (mM)
0	0
50	
100	
0	5
50	
100	

Tuz stresinde son konsantrasyona ulaşıldığında (100 mM) yapraktan püskürtme yapılarak prolin uygulamalarına başlanmıştır. Prolin uygulamaları haftada bir kez olacak şekilde toplamda 4 kez uygulanmıştır. Prolinin yaprak tarafından emilmesini sağlamak için, çözeltiye %0.1 tween-20 yüzey aktif maddesi eklenmiştir.

Deneme, tesadüf parselleri deneme desenine göre üç tekrarlı olarak yürütülmüştür. Bitkilere tuz stresi uygulamasının başlamasından sonraki 5. hafta sonunda deneme sonlandırılmıştır. Bitkilerden alınan yaprak örnekleri laboratuvara getirilerek bir kısmında hücre membran zararlanma oranı, yaprak oransal su kapsamı (YOSK) ve turgor kaybı (TK) analizleri gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.1. Deneme sonunda bitkilerin görünümü

Katalaz (CAT) ve askorbat peroksidaz (APX) aktivitesi ile prolin miktarı, toplam protein miktarı ve SDS-PAGE analizleri -80°C’de tutulan örneklerde daha sonra gerçekleştirilmiştir.

3.2.1. Hücre zarı zararlanma oranı

Hücre zarı zararlanma oranını belirlemek için Arora vd., (1998) tarafından geliştirilen yöntem bazı değişikliklerle kullanılmıştır. Bu amaçla, yapraklarından 1 cm çapında çıkarılan diskler saf su ile yıkandıktan sonra havlu kağıt ile nazikçe kurulanmış ve cam deney tüplerine yerleştirilmiştir (her tüpe bir disk yerleştirilmiştir). Tüpler, üzerlerine 10 ml saf su ilave edildikten sonra orbital çalkalayıcıda (Thermo Scientific, 4334, ABD) ve 100 rpm’de 4 saat inkübe edilmiştir. İyonların hücreden dışarı sızma (İ.S.) derecesi bir

Elektiriksel iletkenlik metre (EC metre) (Mettler-Toledo, SevenCompact Conductivity S230, İsviçre) ile belirlenmiştir. Bu aşamadan sonra örnekler otoklavda (ALP, CLG-32L, Japonya) 121°C sıcaklıkta 15 dakika bekletilerek dokuların yok edilmesi sağlanmıştır. Otoklavdan çıkarılan örnekler oda sıcaklığına geldikten sonra EC metre ile ikinci kez okunmuştur. Bu yöntemle göre, aşağıdaki formüller kullanılarak hücre zarı zararlanma oranını belirlenmiştir.

$$\dot{I}.S. (\%) = (O.D1 / O.D2) \times 100$$

(3.1)

O.D1 = 1. Okuma Değeri

O.D2 = 2. Okuma Değeri

$$\% \text{ Zararlanma} = [(\% \dot{I}.S. (U.) - \% \dot{I}.S. (K.)) / (100 - \% \dot{I}.S. (K.))] \times 100$$

(3.2)

U= Uygulama

K= Kontrol

3.2.2. Yaprak oransal su kapsamı (YOSK) ve turgor kaybı (TK)

Yapraklardan alınan 1 cm çaplı disklerin ilk olarak taze ağırlıkları, 4 saat saf suda bekletildikten sonra turgor ağırlıkları ve son olarak 70°C'deki etüvde 48 saat tutulduktan sonraki kuru ağırlıkları tartılmıştır. Elde edilen verilerle YOSK ve TK değerleri Gülen ve Eris (2003) tarafından önerilen formüle göre % olarak hesaplanmıştır. Her uygulamadan 3 tekrarlı ölçümler yapılmıştır.

$$YOSK = (YA) - (KA) / (TA - KA) \times 100$$

$$TK = (TA - YA) / TA \times 100$$

(3.3)

YOSK = Yaprak oransal su kapsamı

YA = Yaş Ağırlık

KA = Kuru Ağırlık

TK = Turgor Kaybı

TA = Turgor Ağırlığı

3.2.3. Prolin miktarının belirlenmesi

Bates vd. (1973) tarafından geliştirilen yöntem, yaprak dokularındaki prolin miktarını belirlemek için kullanılmış ve bir dizi değişiklik yapılarak uygulanmıştır. Ninhidrinin prolin ile gerçekleştirdiği renk reaksiyonu sonucu pembe renkli bir bileşik oluşmaktadır.

Prolin miktarını hesaplamak için kullanılan ninhidrin reaktifi, bir gün önceden 0,25 g ninhidrin, 4 ml 6M fosforik asit ve 6 ml glasiyel asetik asit karışımı ile hazırlanmış ve 4°C'de saklanmıştır. -80°C'de saklanan örneklerden 200 mg alınarak 1 mL %3 oranında sülfosalisilik ile havanda homojenleştirilmiştir. Elde edilen karışım daha sonra 1,5 ml'lik tüplerde 5000 g hızda 4°C'de 15 dakika süreyle santrifüj edilmiştir (Beckman, ABD). Santrifüjlemeden sonra, süpernatantın 100 ul'si alınarak cam tüplere aktarılmıştır ve üzerlerine 200 ul reaktif ninhidrin, 200 ul glasiyal asetik asit ve 100 ul %3 sülfosalisilik ilave edilmiştir. Hazırlanan reaksiyon, 100 °C'lik bir su banyosunda 1 saat süreyle inkübe edildikten sonra tüpler buz üzerine alınarak reaksiyon durdurulmuştur. Örnekler oda sıcaklığına geldikten sonra üzerilerine 1,5 ml tolüen ilave edilip ardından vortekslenmiştir (Phoenix instruments RS-VA 10, Belçika). Vortekslenen örneklerin üst fazı alınarak 520 nm'de spektrofotometrik okumaları gerçekleştirilmiştir (Perkin Elmer Lambda 25, ABD). Farklı konsantrasyonlarda L-prolin çözeltileri kullanılarak hazırlanan standart eğriye göre örneklerin prolin miktarı hesaplanmıştır.

3.2.4. Enzim aktivitelerinin belirlenmesi

3.2.4.1. Katalaz (CAT) analizi

Katalaz enzim aktivitesinin belirlenmesi için, 200 mg yaprak örneği, 0,2 M K₂HPO₄, 0,2 M KH₂PO₄ (pH 7,0), 0,1 mM etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) ve %0.1 Triton içeren buffer kullanılarak kum ve %1 poli vinil piroldon 40 (PVP-40) ile 4 °C'de homojenize edilmiştir. Örnekler, 4 °C'de 760 g'de 20 dakika boyunca santrifüj edilmiştir ve süpernatant, enzim analizleri için bir buz sandığı içindeki eppendorf tüplerine aktarılmıştır.

Katalaz aktivitesi, H_2O_2 tüketiminin 260 nanometre dalga boyunda izlenmesi yoluyla değerlendirilmiştir (Nakano ve Asada, 1980).

3.2.4.2. Askorbat peroksidaz (APX) analizi

200 mg yaprak örneği, 1 ml 50 mM K-fosfat tamponu (pH 7,8) ile kum ve %1 polivinilpirolidon 40 (PVP-40) ile desteklenerek 4°C'de öğütülmüştür. Örnekler, 4°C'de 10.000 g'de 15 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar aynı sıcaklık koşulları altında bir tüpte toplanarak enzim aktivitesinin belirlenmesinde kullanılmıştır. Askorbat peroksidaz aktivitesi, Nakano ve Asada (1980) tarafından belirtildiği gibi oksitlenmiş askorbatın 290 nm'de azalmasının ölçülmesiyle belirlenmiştir.

3.2.5. Toplam çözünebilir protein (TÇP) analizi

Shen vd. (2003) tarafından geliştirilen yöntem kullanılarak, toplam çözünebilir protein miktarı belirlenmiştir. Bu amaçla, örneklerden 250 mg alınarak 1 ml ekstraksiyon çözeltisi ile porselen havanda homojenize edilmiştir. Ekstraksiyon çözeltisi (50 mL), Çizelge 3.2'de belirtildiği gibi hazırlanmıştır. pH değeri morfolinoetansülfonik asit monohidrat (MES) kullanılarak 7,8 olarak ayarlanmıştır.

Çizelge 3. 2. Toplam çözünebilir protein (TÇP) ekstraksiyon çözeltisi bileşen ve miktarları.

Bileşenler	Miktar
25 mM Tris base	0,151 g
275 mM Sakkaroz	4,705 g
2 mM Etilen Diamin Tetra Asetik Asit (EDTA)	1 mL
10 mM 1,4 dithiothreitol (DTT)	0,0771 g
0,5 mM Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF)	0,25 mL
%1 PolyVinylPolyPyrrolidone (PVPP)	0,5 g

Havanda homojenize edilen örnekler, küçük santrifüj tüplerine aktarıldıktan sonra 4°C’de ve 10000 rpm’de, 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra pellet kısmı atılarak, süpernatant kısmı kullanılmıştır. Süpernatanttan alınan 5 µL örnek üzerine 45 µL ultra saf su ve 1 mL Bradford boyası çözeltisi eklenmiştir. Örneklerin boya ile reaksiyona girmesi için 15 dakika beklendikten sonra 595 nm dalga boyunda spektrofotometrede (Perkin Elmer Lambda 25, USA) absorbans değerleri ölçülmüştür. Toplam protein miktarının belirlenmesinde, 0, 4, 8, 10, 20 ve 40 mg aralığında bovine serum albumin (BSA) standartları kullanılarak elde edilen standart eğri kullanılmıştır

3.2.6. SDS-PAGE (Sodyum dodesilsülfat- poliakrilamid jel elektroforezi) analizi

Biber bitkisinde tuz stresi ve prolin uygulamalarının protein profilleri üzerindeki etkisi, SDS-PAGE analizi ile incelenmiştir (Lim vd., 1999). Her örnekten 10 µg protein içerecek miktarda örnekler alınmış ve toplam hacmin 1/6’sı oranında 6X örnek yükleme tamponu (Çizelge 3.3) ilave edilmiştir ve örneklerin son hacmi saf suyla eşitlenmiştir. Örnekler 3 dakika boyunca kaynar suda bekletilerek proteinlerin denatüre olması sağlanmıştır. Süre sonunda, bütün örnekler 5 dakika boyunca buz üzerinde bekletilerek SDS-PAGE’de kullanılmaya hazır hale getirilmiştir (Shen vd., 2003).

Çizelge 3. 3. 6X örnek yükleme çözeltisi bileşen ve miktarları

Bileşenler	Miktar
1 M Tris pH 6,8	3,5 ml
Gliserol	1,8 ml
Sodyum dodesilsülfat (SDS)	0,5 g
Dithiothreitol (DTT)	0,465 g
Bromophenol Blue	0,0006 g

Sodyum dodesilsülfat- poliakrilamid jel elektroforezi için mini PROTEAN Tetra (Bio-Rad) elektroforez sisteminin kullanıldığı analizde, ayırma jeli %12,5’luk ve yükleme jeli %4’lük ve jel kalınlığı 0,75 mm olacak şekilde jel kasetleri hazırlanmıştır

Çizelge 3. 4. %12,5 ayırma jeli bileşenleri

Bileşenler	Miktar
Saf su	1000 Ml
1 M Tris Buffer pH 8,8 (+4 °C'de stok)	2200 µL
%1 SDS (oda sıcaklığında stok)	600 µL
%36 Acrylamide/Bis (29:1)	2100 µL
%3 Amonyum persülfat (APS)	100 µL
Tetrametiletilendiamin(TEMED)	4 µL

Çizelge 3.4.'de bileşenleri verilen %12,5'luk ayırma jeli hazırlanarak, jel kasetine yaklaşık 3,5 mL dökülmüştür. Jelde sızıntı olmadığından emin olduktan sonra havayla teması engellemek için 200 µL saf su eklenerek yaklaşık, 40-45 dakika polimerizasyon için beklenmiştir.

Çizelge 3.5. %4'lük örnek yükleme jeli bileşenleri.

Bileşenler	Miktar
Saf su	1662 µL
1 M Tris-HCl ph 6,8	310 µL
%36 Acrylamide/Bis (29:1)	250 µL
%3 Amonyum persülfat (APS)	25 µL
Tetrametiletilendiamin(TEMED)	4 µL

Polimerleşmesi gerçekleşen ayırma jelinin üzerine eklenen saf su filtre kağıdına emdirilerek ortamdan uzaklaştırılmıştır. Çizelge 3.5'de açıklanan yükleme jelinin bileşenleri karıştırıldıktan sonra mikro pipet aracılığıyla kasete dökülmüştür. Bu işlemten sonra tarakların yerleşimi, hava boşluğu bırakılmadan dikkatlice yapılmıştır. Ardından, jelin polimerleşmesi için 40-45 dakika kadar beklendikten sonra, kasetler tank içerisine yerleştirilerek elektroforez işlemi için hazır hale getirilmiştir.

Elektroforez işleminde yürütme tamponu olarak Çizelge 3.6.'da bileşenleri verilen Tris-Glisin-SDS çözeltisi kullanılmıştır (1L, 10X). Konsantre olarak (10X) hazırlanan çözelti kullanım aşamasında 1X'e seyreltilmiştir.

Çizelge 3. 6. 10X'lik yürütme tamponu bileşenleri

Bileşenler	Miktar
250 mM Tris-base	30 g
1,92 M Glycine	144 g
%0,5 SDS	5 g

Jel yürütme tamponu, elektroforez tankında yer alan jelleri tamamen kapatacak şekilde doldurulmuştur. Her bir kuyucuğa mikropipet yardımıyla 10 µg protein içeren örnekler yüklenmiştir. Örnekler, 40 mA'de Bio-Rad PowerPac™ Basic güç kaynağı kullanılarak jelin sonuna kadar yürütülmüştür. Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra jeller kasetten çıkarılarak 3 kez saf suyla yıkanmıştır. Protein bantlarını görülebilir hale getirmek için jeller, Coomassie Brilliant Blue G-250 çözeltisine (1:4 oranında metanol:boya solüsyonu) alınarak gece boyunca çalkalayıcıda bekletilmiştir. İnkübasyonun ardından fazla boyayı temizlemek amacıyla, jeller %25 metanol içeren çözelti içerisinde 5 dakika inkübe edilmiş ve ardından üç kez saf su ile yıkanmıştır. Bu işleminden sonra, protein bantlarının görselleştirilmesi Vilber Quantum ST4 Gel Imaging System kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen protein bantlarının moleküler ağırlıklarının hesaplanmasında, SDS-PAGE moleküler ağırlık standartları (BioRad, Precision Plus Protein Unstained Standards) kullanılmıştır. Moleküler ağırlıkları bilinen standart protein bantları referans alınarak, örneklerin karşılaştırmalı analizleri yapılmış ve böylece örneklerin moleküler ağırlıkları doğru bir şekilde hesaplanmıştır.

3.2.7. İstatiksel Analizler

Bu çalışmanın istatistiksel analizleri, "IBM SPSS STATISTICS (Version 20)" istatistik programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Uygulamalar arasındaki farklılıklar, 0,05 önem düzeyi göz önünde bulundurularak "Duncan" testi ile değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Hücre Zarı Zararlanma Oranı

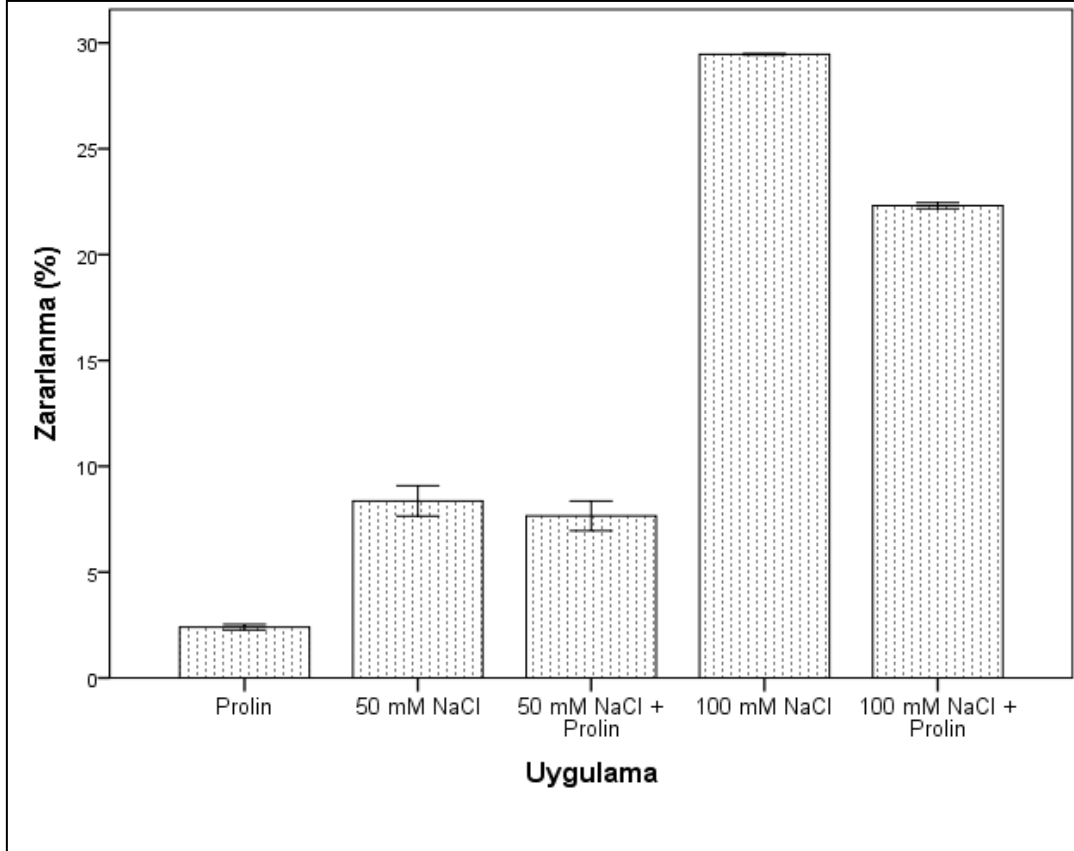
Tuz stresine maruz bırakılan 'Sera Demre' biber çeşidine ait bitkilerde prolin uygulamalarının hücre zarı zararlanma oranları Şekil 4.1'de görülmektedir. Tuz stresi uygulanmayan, 5 mM prolin uygulanan bitkilerde zararlanma oranı %2,40 olarak belirlenirken, tuz stresi koşullarında, 50 mM'de %8,36 ve 100 mM'de %29,46 oranında zararlanma tespit edilmiştir. Tuz stresi altındaki prolin uygulanmış bitkilerde ise zararlanma oranı 50 mM'de %7,65 ve 100 mM'de %22,30 olarak belirlenmiştir. Tuz stresindeki bitkilere 5 mM prolin uygulamasının diğer konsantrasyonlara göre zararlanma oranını azalttığı belirlenmiştir. Prolin uygulamasının stres kaynaklı hasar oranında azalmaya neden olduğu gözlenmiştir. İstatistiksel olarak uygulamalar arasındaki farklılıkların önemli olduğu bulunmuştur (Ek Açıklama-A).

Plazma membranları iyona özgü tuz hasarının birincil bölgesidir (Mansour ve Salama, 2004). Bu nedenle plazma membranlarından elektrolit sızıntısının tuza dayanıklı bitkilerin tanımlanmasında en önemli seçim kriterlerinden biri olduğu bildirilmektedir (Ashraf ve Ali, 2008).

Karpuz bitkisinde yapılan bir çalışmada, 150 mM tuz uygulamasının elektrolit sızıntısında, tuz stresi olmayan kontrol bitkilerine kıyasla artışa neden olduğu bulunmuştur. Ayrıca, dışarıdan uygulanan 5 mM prolinin elektrolit sızıntısını önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir (Kaya et al. 2007).

Brassica juncea'nın iki çeşidi (Varuna ve RH-30) üzerinde yapılan bir çalışmada, tuz stresinin her iki çeşitte de elektrolit sızıntısında önemli bir artışa neden olduğu, dışarıdan uygulanan prolinin ise elektrolit sızıntısını önemli ölçüde azalttığı rapor edilmiştir (Wani vd., 2016).

Bu çalışmada en düşük hücre zarı zararı, kontrol bitkileri ile kıyaslandığında stressiz koşullarda 5 mM prolin uygulamasında tespit edilmiştir. Zararlanma oranı tuz konsantrasyonu artışına bağlı olarak artarken, prolin uygulaması yapılan bitkilerde bu oran bir azalış göstermiştir.

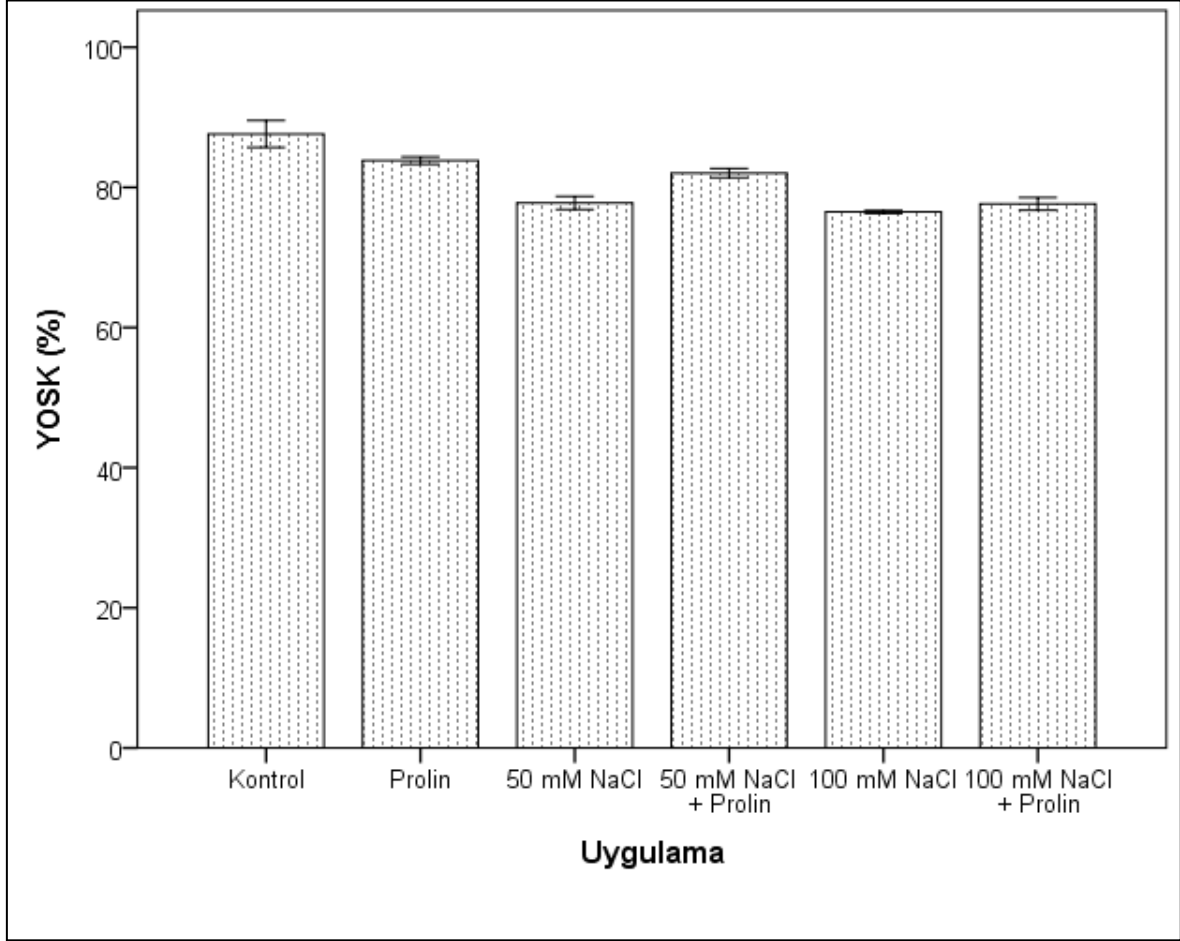


Şekil 4. 1. Tuz stresi altında ve tuz stresi olmayan koşullarda 5 mM prolin uygulamasının biber bitkisi yapraklarında hücre membran zararlanma oranlarına etkileri. Dikey barlar tekerrürler arasındaki $\pm$ SS'leri göstermektedir.

4.2. Yaprak Oransal Su Kapsamı (YOSK) ve Turgor Kaybı (TK)

Tuz stresi ve 5 mM prolin uygulamasının biber bitkisinde YOSK üzerine etkileri Şekil 4.2'de gösterilmiştir. Sonuçlar, NaCl uygulamalarıyla yaprağın YOSK değerinin azaldığını göstermiştir. Ortalama YOSK oranları değerlendirildiğinde; kontrol bitkilerinin %87,61 oranıyla en yüksek YOSK'a sahip olduğu, bunu %83,83 oranıyla 5 mM prolin uygulanan tuz stresi olmayan bitkilerin takip ettiği belirlenmiştir. Tuz stresi uygulanan bitkilerdeki YOSK değerleri 50 ve 100 mM'da sırasıyla %77,79 ve %76,50 olarak belirlenirken, 5 mM prolin uygulaması yapılan bitkilerde bu oran, 50 ve 100 mM'da sırasıyla

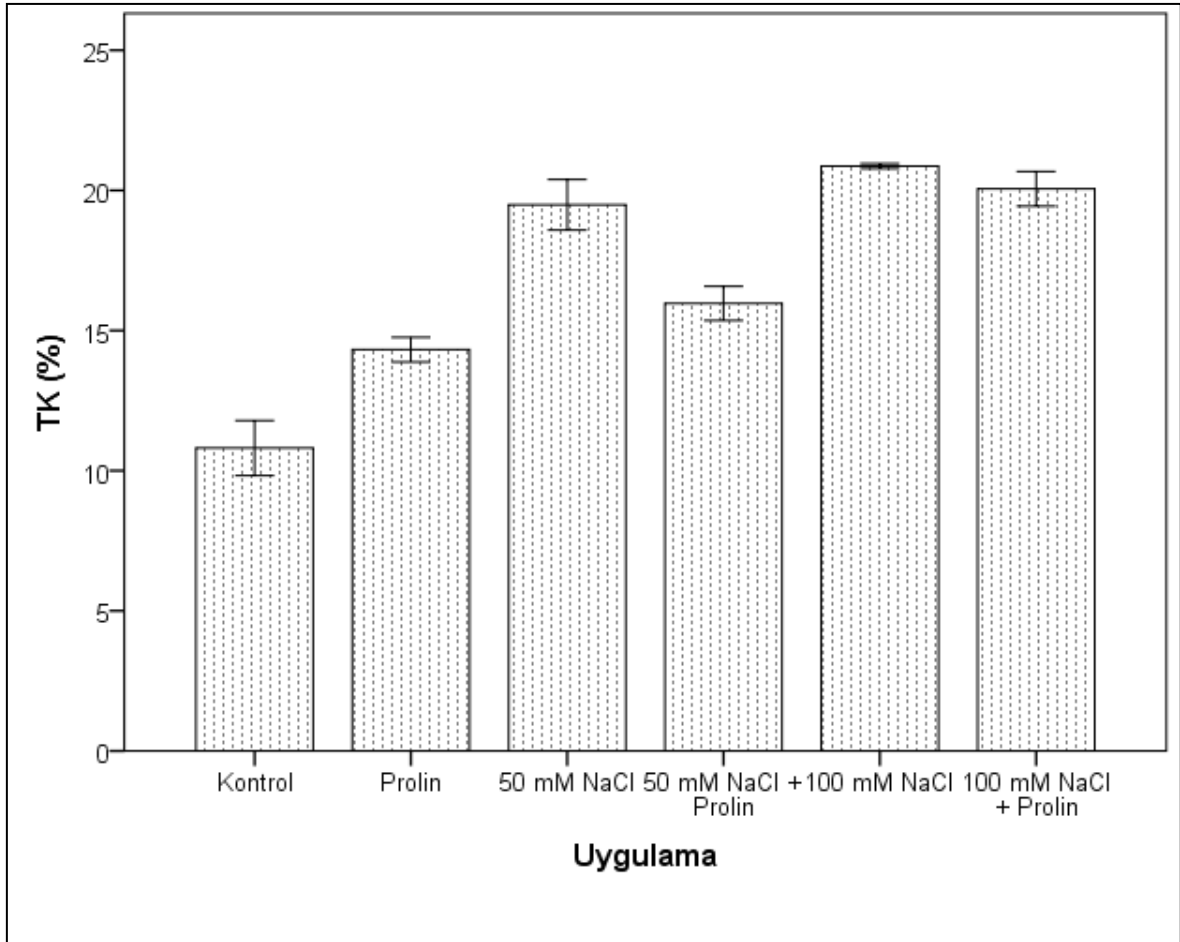
%82,03 ve %77,64 olarak belirlenmiştir. İstatistiksel olarak uygulamalar arasındaki farklılıkların önemli olduğu bulunmuştur (Ek Açıklama-B).



Şekil 4. 2. Tuz stresi altında ve tuz stresi olmayan koşullarda 5 mM prolin uygulamasının biber bitkisi yapraklarında yaprak oransal su kapsamı (YOSK) üzerine etkileri. Dikey barlar tekerrürler arasındaki $\pm$ SS'ları göstermektedir.

'Sera Demre' biber çeşidinin yapraklarında tuz stresi ve 5 mM prolin uygulamasından elde edilen TK değerleri Şekil 4.3'te gösterilmiştir. Ortalama TK değerleri uygulamalara göre değerlendirildiğinde; tuz stresi altında, TK oranı kontrol bitkilerinde %10,81, prolin uygulanan tuz stresi olmayan bitkilerde %14,32, 50 mM tuz uygulamasında %19,49 ve 100 mM'da %20,86 olarak belirlenmiştir. Tuz stresi altında ve prolin uygulanan bitkilerde ise TK 50 mM'da %15,96, 100 mM'da ise %20,06'e olmuştur. İstatistiksel olarak uygulamalar arasındaki farklılıkların önemli olduğu bulunmuştur (Ek Açıklama C).

Yaprak oransal su kapsamı, bitkilerin su içeriğini tanımlamak için sıklıkla kullanılan bir kriterdir (Schonfeld vd., 1988). Yüksek YOSK'a sahip bitkilerin daha kararlı bir ozmotik dengeye sahip olduğu düşünülmektedir (Morgan, 1984). Tuz stresi koşullarında yaprak oransal su içeriğinin azaldığı bildirilmektedir (Srivatsava vd., 1988; Katerji vd., 2003; Kaya vd., 2003).



Şekil 4. 3. Tuz stresi altında ve tuz stresi olmayan koşullarda 5 mM prolin uygulamasının biber bitkisi yapraklarında turgor kaybı (TK) üzerindeki etkileri. Dikey barlar tekerrürler arasındaki $\pm$ SS'leri göstermektedir.

Kırmızı biber bitkisinde farklı seviyelerde tuz stresi uygulanan bir çalışmada, YOSK'un artan tuzluluk seviyesinden olumsuz etkilendiği, yapraklara dışarıdan prolin uygulamasının ise YOSK değerlerinde önemli bir artışa neden olduğu tespit edilmiştir (Jamil vd., 2018). Hıyar bitkisi üzerinde yapılan bir başka çalışmada, 100 mM tuz uygulamasının YOSK'u azalttığı, 10 mM prolin uygulamasının ise YOSK'u olumlu yönde etkilediği görülmüştür (Huang vd., 2009).

Çilek bitkisi üzerinde yapılan bir çalışmada, kısa süreli tuz uygulamalarının bitkilerde turgor kaybına (TK) neden olmadığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte, orta ve uzun vadeli tuz uygulamalarının genellikle TK'yı arttırdığı belirlenmiştir (Turhan, 2002).

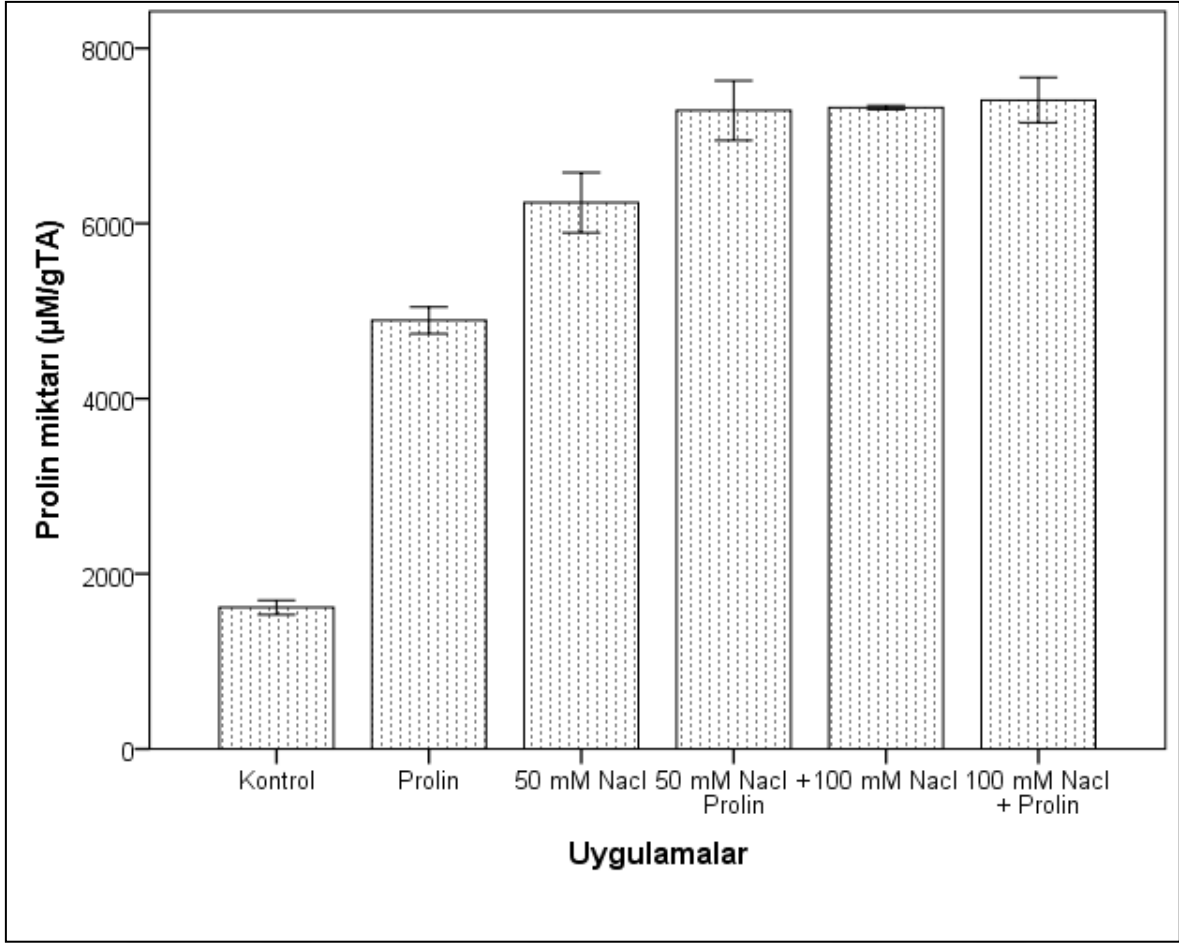
Mısırdaki yapılan bir çalışmada bitkilere kuraklık (0.5 MPa PEG 6000), tuz (50 mM NaCl) ve tuz ile kuraklık stresi (- 0.5 MPa PEG 6000 ve 50 mM NaCl) birlikte uygulanmıştır. Hem tuz ve kuraklık stresinin ayrı ayrı uygulandığı koşullarda, hem de tuz ve kuraklık stresinin birlikte olduğu koşullarda YOSK'un azaldığı, TK'nın ise arttığı tespit edilmiştir (Coşkun ve Aksu, 2024).

Yapılan bu çalışmada, tuz stresi YOSK oranında önemli bir azalmaya neden olurken, prolin uygulaması tuz stresine maruz kalan bitkilerde bu oranı önemli ölçüde artırmıştır. Turgor kaybı bakımından ise tuz stresi altında artış, prolin uygulaması ile azalma gözlemlenmiştir.

4.3. Prolin Miktarı

Şekil 4.4, tuz stresinin ve 5 mM prolin uygulamasının 'Sera Demre' biber çeşidinin yapraklarındaki prolin miktarı üzerindeki etkilerini göstermektedir. Prolin miktarları uygulamalara göre değerlendirildiğinde; kontrol grubunda 1615,27 $\mu\text{M/gTA}$ olarak belirlenirken, sadece prolin uygulamasında 4893,44 $\mu\text{M/gTA}$ olmuştur. Tuz stresi koşullarında 50 mM ve 100 mM'da sırasıyla 6237,58 ve 7322,87 $\mu\text{M/gTA}$ olmuştur. Prolin uygulaması yapılan tuz stresindeki bitkilerde ise sırasıyla 50 mM NaCl uygulanan bitkilerde 7288,90 $\mu\text{M/gTA}$ ve 100 mM'da 7408,35 $\mu\text{M/gTA}$ olarak belirlenmiştir. İstatistiksel olarak uygulamalar arasındaki farklılıkların önemli olduğu bulunmuştur (Ek Açıklama-D).

Prolin iyi bilinen ozmoprotektanlardan biridir ve tuz stresi altındaki çeşitli organizmalarda birikimi yaygın olarak gözlenmektedir. Prolin içeriği sentezine, katabolizmasına ve diğer dokulardan taşınmasına bağlıdır (Agami, 2014). Prolin uygulaması ozmotik potansiyeli etkili bir şekilde düzenler ve ozmotik stres altında bitki büyümesinin sürdürülmesinde hayati bir rol oynar (Serraj ve Sinclair, 2002; Ali vd., 2007; Ashraf ve Foolad, 2007; Hoque vd., 2007).



Şekil 4. 4. Tuz stresi altında prolin uygulamasının biber bitkisi yapraklarında prolin miktarına etkileri. Dikey barlar tekerrürler arasındaki $\pm$ SS'leri göstermektedir.

Tuz stresi uygulanan 'Plahi' (tuza toleranslı) ve 'A-120' (tuza duyarlı) acı biber çeşitlerinde yapılan bir çalışmada, tuz stresinin her iki çeşitte de prolin konsantrasyonunu artırdığı, ayrıca dışsal prolin uygulaması yapılan stresli bitkilerde ise bu artışın daha belirgin olduğu bildirilmiştir (Butt vd ., 2020).

Tuz stresi (NaCl ve CaCl₂) altında yetiştirilen domates bitkilerinin prolin konsantrasyonlarında önemli bir artış olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, yapraktan prolin uygulaması, NaCl ve CaCl₂ altında yetiştirilen bitkilerde içsel prolin konsantrasyonunu artırmıştır (El-Banna ve Mosa, 2024).

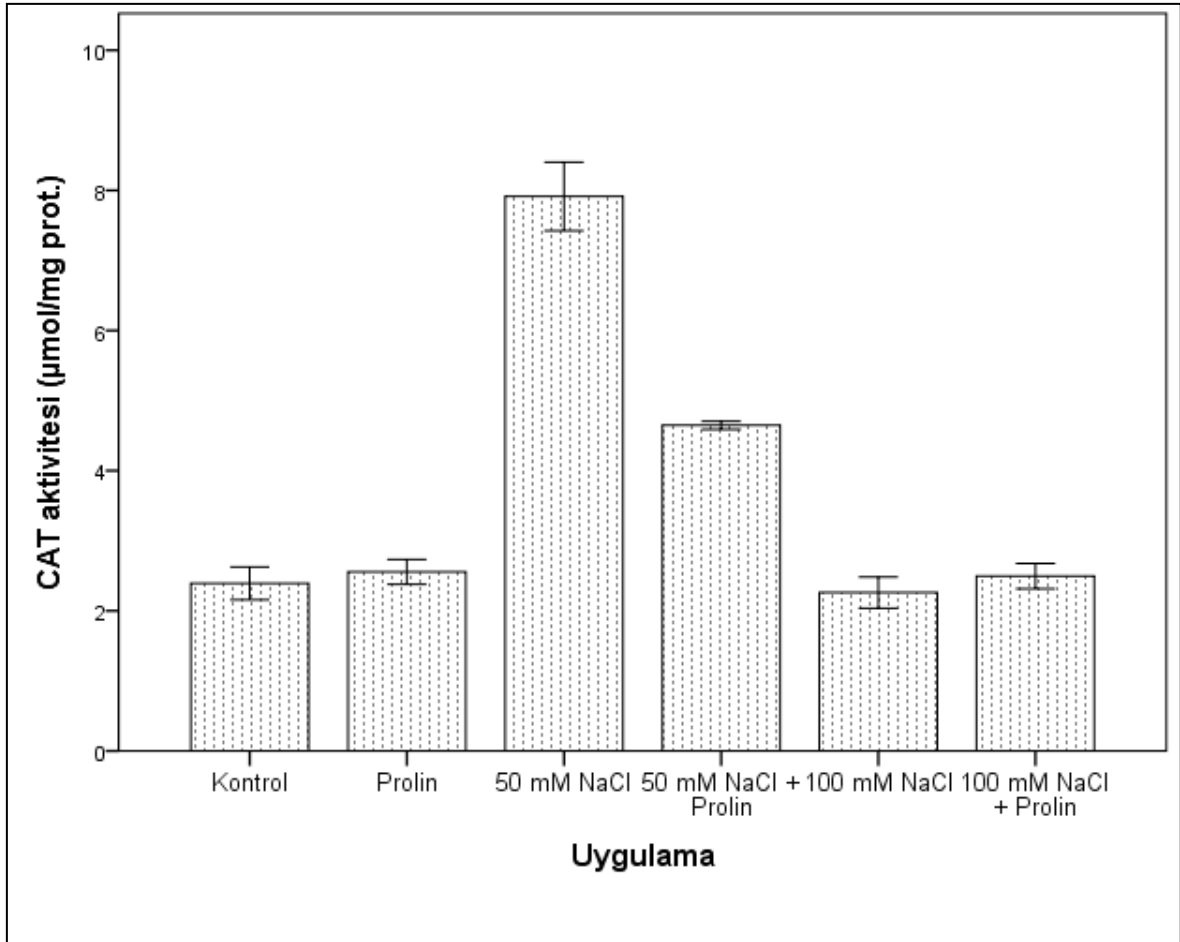
Bu çalışmada, her iki tuz stresi seviyesinin de yaprak prolin içeriğinde belirgin bir artışa neden olduğu belirlenmiştir. 50 mM tuz uygulanan bitkilere 5 mM prolin uygulandığında belirgin bir artış gözlenirken, 100 mM tuz uygulanan bitkilerde bu artışın

daha az olduğu ve en yüksek prolin seviyesinin 100 mM tuz ve 5 mM prolin uygulanan bitkilerde olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar, prolin uygulamasının tuz stresinin biber bitkileri üzerindeki olumsuz etkilerini azaltmada etkili olabileceğini göstermektedir.

4.4. Antioksidan Enzim Aktiviteleri

4.4.1. Katalaz (CAT) aktivitesi

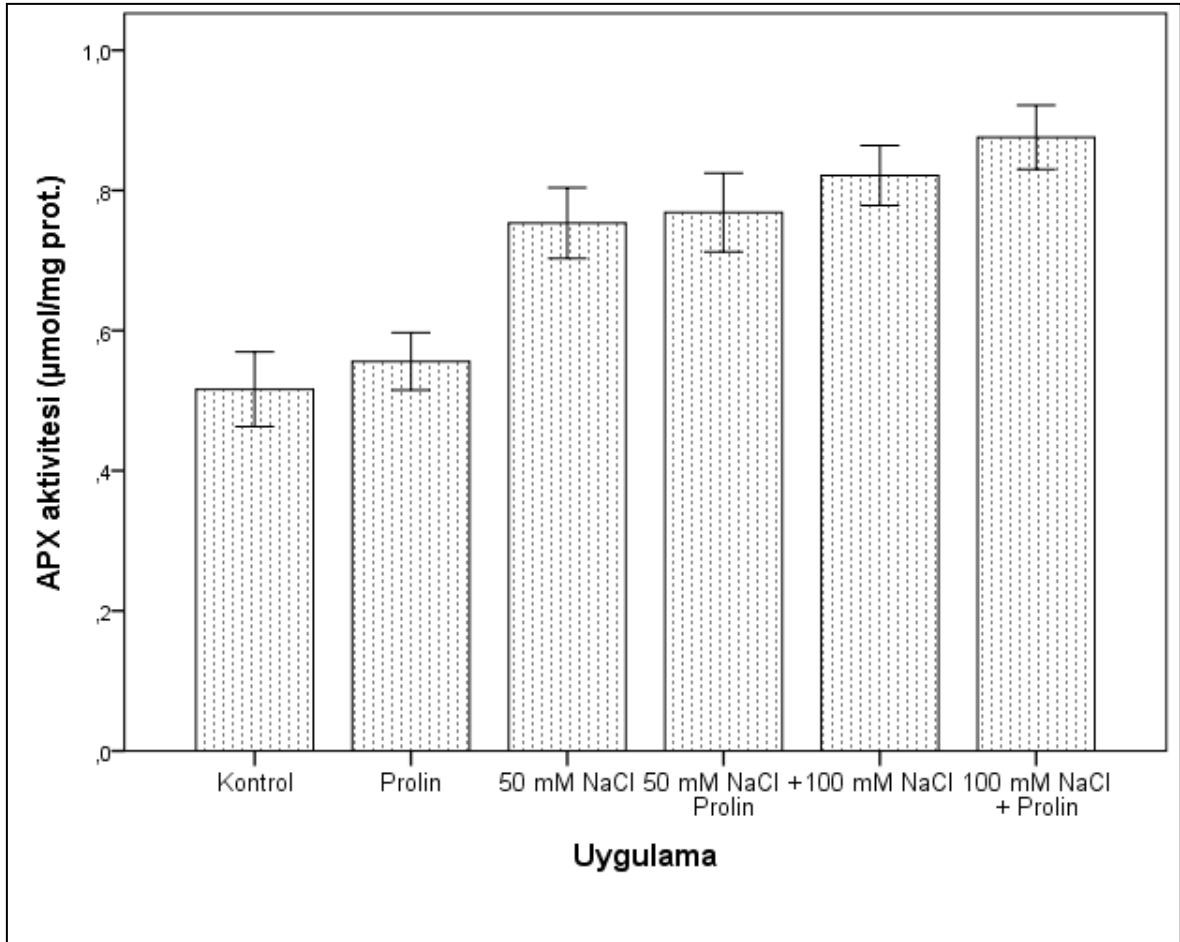
şekil 4.5, "Sera Demre" biber çeşidinin yapraklarında 5 mM prolin uygulamasının ve tuz stresinin CAT aktivitesi üzerindeki etkilerini göstermektedir. Kontrol grubunda CAT aktivitesi 2,392 $\mu\text{Mol/mg.prot.}$ iken, tuz stresi olmayan ve 5 mM prolin uygulanan bitkilerde 2,556 $\mu\text{Mol/mg.prot.}$ olarak llmřtir. Tuz stresi koşullarında, sırasıyla 50 mM ve 100 mM için 7,914 $\mu\text{Mol/mg.prot.}$ ve 2,261 $\mu\text{Mol/mg.prot.}$ değerlerine ulaşmıştır. Tuz stresi altındaki bitkilere prolin uygulandığında, sırasıyla 50 mM NaCl uygulanan bitkilerde 4,647 $\mu\text{Mol/mg.prot.}$ ve 100 mM uygulanan bitkilerde 2,495 $\mu\text{Mol/mg.prot.}$ olarak belirlenmiştir. İstatistiksel olarak uygulamalar arasındaki farklılıkların önemli olduğu bulunmuştur (Ek Açıklama-E).



Şekil 4. 5. Tuz stresi altında ve tuz stresi olmayan koşullarda 5 mM prolin uygulamasının biber bitkisi yapraklarında Katalaz enziminin aktivitesi hakkında etkileri. Dikey barlar tekerrürler arasındaki $\pm$ SS'ları göstermektedir.

4.4.2. Askorbat peroksidaz (APX) aktivitesi

Şekil 4.6, "Sera Demre" biber çeşidinin yapraklarında, 5 mM prolin uygulamasının ve tuz stresinin APX aktivitesi üzerindeki etkilerini göstermektedir. Kontrol bitkilerinde APX aktivitesi 0,516 $\mu\text{mol/mg.prot.}$ olarak belirlenirken, tuz stresi olmayan ve prolin uygulanan bitkilerde 0,556 $\mu\text{mol/mg.prot.}$ olarak belirlenmiştir. Tuz stresi koşullarında, APX aktivitesinin arttığı, 50 mM'da 0,753 $\mu\text{mol/mg.prot.}$ 'e, 100 mM'da ise 0,821 $\mu\text{mol/mg.prot.}$ 'e ulaştığı saptanmıştır. Prolin uygulandığında, aktivite 50 mM'da 0,769 $\mu\text{mol/mg.prot.}$ 'e, 100 mM'da ise 0,876 $\mu\text{mol/mg.prot.}$ 'e yükselmiştir. İstatistiksel olarak uygulamalar arasındaki farklılıkların önemli olduğu bulunmuştur (Ek Açıklama-F).



Şekil 4. 6. Tuz stresi altında ve tuz stresi olmayan koşullarda 5 mM prolisin uygulamasının biber bitkisi yapraklarında Askorbat peroksidaz (APX) enziminin aktivitesi hakkında etkileri. Dikey barlar tekerrürler arasındaki $\pm$ SS'leri göstermektedir.

Süperoksit dismutaz tarafından sentezlenen hidrojen peroksit POD, APX ve CAT enzimleri tarafından detoksifiye edilir. Katalaz, H_2O_2 'yi oksijen ve suya dönüştüren enzimdir ve yüksek bitkilerin peroksizomunda bulunur (Jamei vd., 2009).

Hidrojen peroksitin detoksifikasyonunda görev alan diğer enzim APX olarak tanımlanmıştır. Bu enzimin homolog enzim grupları kloroplast stroması, tilakoid duvar, mitokondri, sitozol ve peroksizom olmak üzere dört farklı kompartmanda bulunur. Askorbat peroksidaz, H_2O_2 'yi suya dönüştürür (Mittler vd, 2004). Tuz stresi de dahil olmak üzere çevresel stres koşulları altında antioksidan enzimlerin aktivite seviyesindeki değişiklikler rapor edilmiştir. Tuz, aktif oksijen türlerini nötralize eden enzimatik sistemleri bozarak lipid peroksidasyonunun artmasına, hücre zarı hasarına ve pigmentlerin yok olmasına yol açar. Araştırmacılar şiddetli tuz stresi ile protein sentezinin azaldığını ve şiddetli tuz stresinde enzim aktivitesinin de azalabileceğini bildirmişlerdir (Çulha ve Çakırlar, 2011).

Hıyar bitkileri üzerinde yapılan bir çalışmada, tuzluluğun CAT ve APX aktivitelerini artırdığı, prolinle muamele edilen ve edilmeyen bitkiler arasında CAT aktivitesinde önemli bir fark olmadığı bildirilmiştir. Prolinle muamele edilen, stres uygulanmayan koşullar altında bitkilerin daha yüksek APX aktivitesine sahip olduğu, ancak bu farkın, prolinle muamele edilmeyen ve tuz stresi uygulanan bitkiler arasında anlamlı olmadığı belirtilmiştir (Huang vd., 2009). De Freitas (2018) tarafından mısır üzerinde yapılan bir çalışmada, veriler dışsal prolin uygulamasının özellikle yapraklarda CAT ve APX gibi bazı antioksidan enzimleri potansiyel olarak aktive ettiğini göstermiştir. Prolinle muamele edilen stres altındaki bitkilerde yaprak CAT aktivitesi, 7 ve 14. günlerde tuz stresi altındaki bitkilerden daha yüksek bulunmuştur.

Yapılan bu çalışmada CAT aktivitesinin 50 mM tuz uygulamasında kontrol bitkilerine göre dört kat artarak maksimum seviyeye ulaştığı, 100 mM uygulamasında ise hemen hemen kontrol bitkileri ile aynı seviyeye gerilediği tespit edilmiştir. Bu durumun, şiddetli stres koşullarının bitki savunmalarını bastırarak CAT aktivitesindeki artışı sınırlamasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Yapılan prolin uygulaması 50 mM tuz uygulamasında aktiviteyi azaltırken, 100 mM tuz uygulamasında ise artmıştır. Orta düzey (50 mM) tuz stresi altındaki bitkilerde dışarıdan prolin uygulaması oksidatif savunma ihtiyacını azaltarak CAT aktivitesinin azalmasına, yüksek düzeyde (100 mM) tuz stresi oksidatif savunma ihtiyacının fazla olmasından dolayı CAT aktivitesinin artmasına yol açmış olabileceği sanılmaktadır.

Tuz stresi altında bitkiler, H_2O_2 gibi ROS'ların neden olduğu oksidatif hasarla mücadele etmek için APX aktivitesini artırır. Tuz stresi ROS üretimini artırarak antioksidan savunma sistemini tetikler ve gen ekspresyonu ve post-translasyonel modifikasyonlar yoluyla APX aktivitesini artırır. Prolin ise, bir ozmoprotektan olarak hareket ederek, ROS'ları temizleyerek, antioksidan enzimleri uyararak, ilgili genleri yukarı doğru düzenleyerek ve enzim yapılarını stabilize ederek APX aktivitesini daha da artırır (Ashraf ve Foolad, 2007; Szepesi ve Szöllösi, 2018).

Yapılan bu çalışmada da APX aktivitesinin her iki NaCl konsantrasyonunda da tuz stresi ile arttığı belirlenmiştir. Prolin uygulamasının APX enzim aktivitesini her iki NaCl konsantrasyonunda da attırdığı ve aktivitenin 100 mM tuz + 5 mM prolinde en yüksek seviyeye ulaştığı görülmüştür.

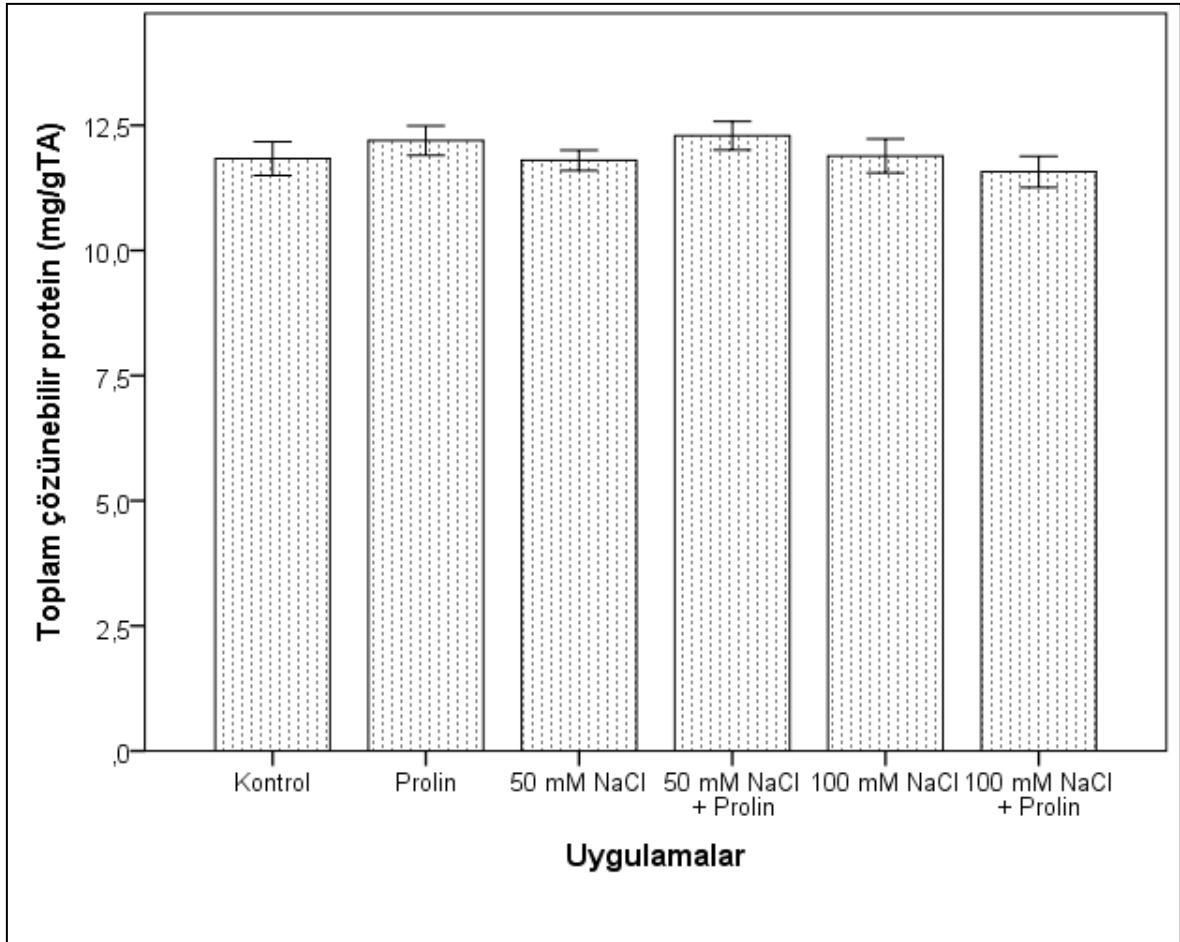
4.5. Toplam Çözünabilir Protein (TÇP) Miktarı

Şekil 4.7.'de tuz stresi altında ve 5 mM prolın uygulaması yapılan "Sera Demre" biber yapraklarında TÇP miktarındaki değişimler, gösterilmiştir. Kontrol bitkilerinde yapraklardaki protein miktarı 11,84 mg/gTA olarak bulunurken, tuz stresi olmayan koşullarda prolın uygulanan yapraklarda bu miktar 12,19 mg/gTA olmuştur. Tuz stresi koşullarında, TÇP miktarı sırasıyla 50 ve 100 mM için 11,80 ve 11,89 mg/gTA olmuştur. Tuz stresi altındaki bitkilere prolın uygulandığında, TÇP miktarı 50 mM'da 12,29 mg/gTA'ye yükselmiş, ancak 100 mM'da 11,57 mg/gTA'ye düşmüştür. İstatistiksel olarak uygulamalar arasındaki farklılıkların önemsiz olduğu bulunmuştur (Ek Açıklama-G).

Biri tuza duyarlı (Heinz-2274) diğeri toleranslı (Rio Grande) iki domates çeşidi üzerinde yapılan bir çalışmada, tuz stresinin bitkilerin yaprak ve köklerinde TÇP içeriğinin toleranslı çeşitte (Rio Grande) tuza duyarlı çeşide (Heinz-2274) kıyasla önemli ölçüde arttığı gözlemlenmiştir. Eksojen prolın ilavesi, her iki çeşitte de hem yapraklarda hem de köklerde toplam çözünabilir protein içeriğini önemli ölçüde artırmıştır (Kahlaoui vd., 2018).

Kök bitkileri üzerinde yapılan bir başka çalışmada, tuz stresi altındaki havuç bitkilerinde TÇP'nin azaldığını, yapraklara uygulanan prolın muamelesinin ise proteinleri önemli ölçüde değiştirmedığını bulmuşlardır (Qirat vd., 2018).

Bu çalışmada ise, tuz stresinin TÇP miktarını konrole kıyasla önemli oranda değiştirmedığı, ancak prolın uygulaması yapılan ve 50 mM NaCl uygulanan bitkilerde TÇP miktarının bir miktar arttığı belirlenmiştir. Yüksek tuz konsantrasyonlarında (100 mM) ise prolın uygulamasının TÇP miktarını azalttığı tespit edilmiştir.

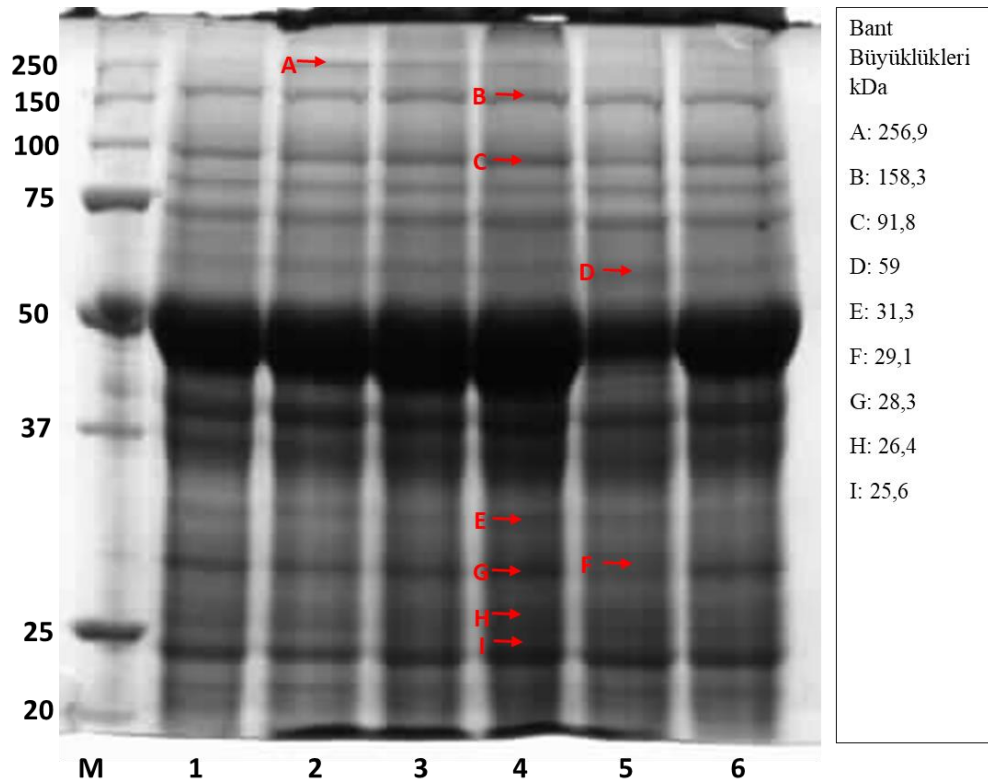


Şekil 4. 7. Tuz stresi altında ve tuz stresi olmayan koşullarda 5 mM prolin uygulamasının biber bitkisi yapraklarında TÇP miktarına etkisi. Dikey barlar tekerrürler arasındaki $\pm$ SS'ları göstermektedir.

4.6. Sodyum Dodesilsülfat- Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) Protein Profilleri

Şekil 4.8'de tuz stresi ve 5 mM prolin uygulamasının 'Sera Demre' biber çeşidi yapraklarının toplam protein profilleri üzerine etkisi görülmektedir. Protein profilleri incelendiğinde, uygulamalara göre yoğunlukları değişen en büyüğü 256,9 kDa ve en küçüğü 25,6 kDa olarak belirlenen bantlar tespit edilmiştir. Uygulamalar incelendiğinde, 256,9 kDa'luk bantın yoğunluğunun 5 mM prolin, 50 mM NaCl ve 50 mM NaCl +5 mM prolin uygulamasında arttığı gözlenmiştir. Büyüklükleri 158,3 kDa ve 91,8 kDa olarak belirlenen protein bantlarının yoğunluklarının 50 mM NaCl ve 50 mM NaCl+5 mM Pro uygulamasında arttığı, diğer uygulamalarda değişmediği görülmüştür. Büyüklüğü 59 kDa olarak belirlenen protein bantının kontrolde yoğunluğunun daha az olduğu ancak prolin ve tuz stresi uygulamalarında arttığı belirlenmiştir. Büyüklüğü 31,3 kDa olarak belirlenen protein

bandının tüm uygulamalarda mevcut olduğu, 50 mM NaCl + 5 mM Pro uygulamasında ise yoğunluğunun arttığı gözlenmiştir. 100 mM NaCl uygulamasında 29,1 kDa büyüklüğünde bir protein bandı gözlenirken diğer uygulamalarda bu bant gözlenememiştir. Tüm uygulamalarda görülen ve 28,3 kDa büyüklüğünde olan protein bandının yoğunluğunun 50 mM NaCl+Pro ve 100 mM NaCl+Pro uygulamasında arttığı tespit edilmiştir. Tüm uygulamalarda tespit edilen 26,4 kDa protein bandının yoğunluğunun 100 mM NaCl uygulamasında diğer uygulamalara göre arttığı gözlenmiştir. Büyüklüğü 25,6 kDa olarak tespit edilen protein bandının, tuz stresi ve tuz stresi+Pro uygulamalarında yoğunluğunun arttığı gözlenmiştir.



Şekil 4. 8. Tuzluluk stresi altında prolin uygulamasının biber bitkilerinin SDS-PAGE protein profilleri üzerindeki etkisi. MA: Moleküler Ağırlık Standardı (kDa), 1: Kontrol, 2: Pro, 3: 50 mM NaCl, 4: 50 mM NaCl + Pro, 5: 100 mM NaCl, 6: 100 mM NaCl+ Pro.

Elektroforez, makromolekülleri bir elektrik alanında ayırma yöntemidir. Sodyum dodesilsülfat- poliakrilamid jel elektroforezi, destek ortamı olarak bir poliakrilamid jel ve proteinleri doğrusal hale getirmek amacıyla denatüre etmek için sodyum dodesil sülfat (SDS) kullanır (Raymond ve Weintraub, 1959). Sodyum dodesilsülfat- poliakrilamid jel elektroforezi ile protein ayrımı, proteinlerin göreceli moleküler kütlelerini, bir numunedeki

proteinlerin göreceli bolluğunu ve proteinlerin fraksiyonlar arasındaki dağılımının yanı sıra protein numunelerinin saflığını tahmin etmek için kullanılabilir (Maizel, 2000).

Bezelye bitkisinde yapılan bir çalışmada üç farklı tür deniz otu preparatının etkisi incelenmiştir. Sodyum dodesilsülfat- poliakrilamid jel elektroforezi, 12 ila 179 kilodalton arasında değişen moleküler ağırlıklara sahip 32 protein bandını ortaya çıkarmıştır. Sodyum klorür muamelelerine maruz kalan fidelerin protein profillerinde bulunan bant sayısı (19-21), deniz otu ile tek başına (15 bant) veya sodyum klorür muameleleri ile birlikte (12-17 bant) hazırlanan fidelerin protein profillerinde bildirilen bant sayısından daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Hamouda vd., 2023).

Deniz tuzu stresi altında (3000 ve 6000 ppm) yetiştirilen soya fasulyesinde salisilik asit (SA) varlığında veya yokluğunda SDS-PAGE ile protein desenleri incelenmiştir. Kontrolle karşılaştırıldığında 110 ile 27 kDa arasında değişen moleküler ağırlıklara sahip farklı protein bantları belirlenmiştir. Sonuçlar, tuz stresi ve SA ile işlem görmüş bitkilerde, yeni protein bantlarının ortaya çıktığını ve ayrıca farklı muamelelerin bazı bantların kaybolmasına yol açtığını göstermiştir. Tuzluluğun soya yapraklarının protein değişiklikleriyle ilgili morfolojik ve fizyolojik değişiklikler üzerindeki etkisi, yeni protein desenleri olarak gösterilmiştir. 3000 ppm tuzluluk altında kontrol bitkisiyle karşılaştırıldığında 110 ve 81 kDa'lık yeni bantların ortaya çıktığı, buna karşılık, kontrol koşulunda var olan 84 kDa'luk bandın tuz stresi altında yok olduğu bildirilmiştir. Kontrol bitkileriyle karşılaştırıldığında 6000 ppm deniz tuzu uygulanan bitkilerde, 86 ve 81 kDa'luk yeni bantlarının ortaya çıktığı, 42 kDa'luk bandın ise kaybolduğu belirtilmiştir. Diğer yandan, tuz stresi olmadan SA uygulamasının (50 ve 100 mg/l) 97 kDa'lık yeni bir bandın ortaya çıkmasına neden olduğu belirtilmiştir. Tuz stresi altında ve SA ile işlem görmüş bitkilerde yeni protein bantlarının ortaya çıkması, bu proteinlerin genlerinin tuz stresine ve bitkilere SA uygulamasına direnç göstermesi sonucu olabileceği bildirilmiştir. Hem SA muamelesi hem de tuz stresi, protein desenlerinde farklılıklar sergilemiştir (Asmaa vd., 2017).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tuz stresi bitki büyümesini, gelişmesini ve verimliliğini olumsuz yönde etkileyen yaygın bir çevresel sorundur. Tuza toleransın belirli fiziksel özelliklerini tanıma ve ilgili fizyolojik süreçleri anlama çabaları devam etmektedir. Bitkilerde stresin olumsuz etkilerini azaltmak için prolin gibi osmolit uygulamaları kullanılmaktadır. Yapılan bu tez çalışmasında, değişen konsantrasyonlarda (50 mM ve 100 mM) tuz stresine maruz bırakılan ‘Sera Demre’ (*Capsicum annuum* L.) biber çeşidinde 5 mM prolin uygulamasının neden olduğu fizyolojik ve moleküler değişiklikler araştırılmış ve elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir:

Tuz konsantrasyonu arttıkça hücre zarı zararının arttığı belirlenmiştir. Tuz stresi koşullarında prolin uygulaması, hücre zarı zararını oranını önemli ölçüde azaltmıştır.

Tuz stresinin bitkilerde YOSK’u azalttığı ve TK’yı artırdığı gözlenmiştir. Prolin uygulamasının tuz stresindeki bitkilerde YOSK değerini artırıcı, TK değerini ise azaltıcı yönde etkisi olduğu belirlenmiştir.

Tuz stresinin bitkilerde prolin miktarını önemli ölçüde artırdığı, dışsal prolin uygulamasının ise bu artışı tetiklediği tespit edilmiştir. Özellikle 50 mM NaCl stresindeki bitkilerde prolin uygulamasının daha etkili olduğu ortaya konmuştur. Bu durumun, bitkilerin 50 mM tuza kadar daha iyi tolerans gösterebildiği daha yüksek konsantrasyonlarda ise toleranslarının azalmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Katalaz enzim aktivitesi kontrol, stressiz prolin uygulaması, 100 mM NaCl ve 100 mM NaCl+Pro uygulamasında önemli bir değişiklik göstermemiştir. Ancak, 50 mM NaCl stresinde en yüksek seviyede olduğu, prolin uygulamasının ise bu koşullarda aktiviteyi azaltıcı yönde bir etkisi olduğu görülmüştür. Bu durumun da yine bitkilerin 50 mM’den daha yüksek tuz konsantrasyonlarında tolerans gösterememesinden kaynaklanabileceği ile açıklanabilir. Askorbat peroksidaz enzim aktivitesinin tuz stresine bağlı olarak arttığı, prolin uygulamasının bu artışı desteklediği görülmüştür.

Tuz stresinin TÇP miktarı üzerinde istatistiksel olarak önemli bir etkisi olmazken, 50 mM tuz uygulamasında miktarı arttırdığı, 100 mM'da ise azalttığı bulunmuştur. Prolin uygulamasıyla 50 mM tuz konsantrasyonunda çözünebilir proteindeki artış ve 100 mM tuz konsantrasyonundaki düşüş, değişen tuz stresi seviyelerine ve prolinin strese karşı koyma kabiliyeti düşük tuz konsantrasyonlarında daha fazla olduğu için bu stresi hafifletmedeki etkinliğine veya prolinin ozmoproteksiyon, antioksidan savunma ve stres sinyalindeki rolleri arasındaki denge nedeniyle değişen tuz konsantrasyonlarında çözünebilir protein içeriği üzerindeki farklı etkisine bağlanabilir. Orta dereceli stres seviyelerinde (50 mM NaCl), prolinin koruyucu işlevleri protein stabilizasyonunu ve sentezini teşvik eder. Bununla birlikte, şiddetli stres seviyelerinde (100 mM NaCl), prolinin koruyucu kapasitesi tükenir, bu da protein yıkımının artmasına ve çözünür protein içeriğinin azalmasına neden olur.

Sodyum dodesilsülfat- poliakrilamid jel elektroforez analizi sonucunda, uygulanan NaCl ve proline bağlı olarak 256,9 kDa, 59 kDa, 31,3 kDa, 29,1 kDa, 28,3 kDa, 26,4 kDa ve 25,6 kDa büyüklüğündeki protein bantlarında değişiklikler tespit edilmiştir. Kontrolde bazı bantların yoğunluğu azalırken, diğer uygulamalarda artış gözlemlenmiştir. Özellikle 50 mM NaCl+5 mM Pro uygulamasında 31,3 kDa büyüklüğündeki protein bandının yoğunluğu artmıştır. Ayrıca, sadece 100 mM NaCl uygulamasında 29,1 kDa büyüklüğünde bir protein bandı tespit edilmiştir. Tüm uygulamalarda görülen 28,3 kDa ve 26,4 kDa büyüklüğündeki protein bantlarının tuz stresi ve prolin uygulanan bitkilerde yoğunluklarının arttığı görülmüştür. Kontrol ve prolin uygulamasında görülmeyen 25,6 kDa protein bandının yoğunluğunun stres koşullarında arttığı gözlemlenmiştir.

Bu araştırma, çeşitli tuz konsantrasyonları altında yetiştirilen biber bitkisine 5 mM prolin uygulamanın, tuzluluğun zararlı etkilerini azaltabileceğini göstermektedir. Özellikle 50 mM tuz stresi altında prolinin olumlu yönde etkisi olduğu, daha yüksek konsantrasyonlarda ise olumlu etkinin ortadan kaybolduğu görülmüştür. Bulgularımız, prolin uygulamasının biber üretiminde tuz stresini azaltmak için değerli bir strateji olma potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir. Buna ek olarak, prolin uygulamasının uzun vadeli etkilerini ve farklı biber çeşitleri ve diğer ürünlerdeki etkinliğini araştırmak için daha fazla araştırma yapılmalıdır. Bu yaklaşım, toprak tuzluluğundan etkilenen bölgelerde sürdürülebilir tarım uygulamalarının geliştirilmesine katkıda bulunabilir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abdelhamid, M. T., Rady, M. M., Osman, A. S., & Abdalla, M. A. (2013). Exogenous application of proline alleviates salt-induced oxidative stress in *Phaseolus vulgaris* L. plants. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 88(4), 439-446.
- Agami, R. (2014). Applications of ascorbic acid or proline increase resistance to salt stress in barley seedlings. *Biologia plantarum*, 58, 341-347.
- Ali, Q., Ashraf, M., & Athar, H. U. R. (2007). Exogenously applied proline at different growth stages enhances growth of two maize cultivars grown under water deficit conditions. *Pakistan Journal of Botany*, 39(4), 1133-1144.
- Armengaud, P., Thiery, L., Buhot, N., Grenier-de March, G., & Saviouré, A. (2004). Transcriptional regulation of proline biosynthesis in *Medicago truncatula* reveals developmental and environmental specific features. *Physiologia plantarum*, 120(3), 442-450.
- Arora, R., Pitchay D. S., Bearce, B. C. (1998). Water-stress induced heat tolerance in geranium leaf tissues: A possible linkage through stress proteins? . *Physiology Plant*, 103(1), 24-34.
- Ashraf, M. F. M. R., & Foolad, M. R. (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and experimental botany*, 59(2), 206-216.
- Ashraf, M., & Ali, Q. (2008). Relative membrane permeability and activities of some antioxidant enzymes as the key determinants of salt tolerance in canola (*Brassica napus* L.). *Environmental and experimental Botany*, 63(1-3), 266-273.
- Asmaa, R. A. E. H., Ahmed, M. A., Karima, M. G. E. D., Magda, A. S., & Hoda, M. E. (2017). Role of salicylic acid to improve physiological characters and bio-chemical markers of soybean (*Glycine max* L.) under sea salt stress. *International Journal of Environmental Research*, 11, 547-556.
- Bartels, D., & Sunkar, R. (2005). Drought and salt tolerance in plants. *Critical reviews in plant sciences*, 24(1), 23-58.
- Bates, L. S., Waldren, R. P., Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water stress studies, *Plant and Soil*. 39(1), 205-207.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Ben Ahmed, C., Ben Rouina, B., Sensoy, S., Boukhriess, M., & Ben Abdullah, F. (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.
- Butt, M., Ayyub, C. M., Amjad, M., & Ahmad, R. (2016). Proline application enhances growth of chilli by improving physiological and biochemical attributes under salt stress. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 53(1).
- Butt, M., Sattar, A., Abbas, T., Sher, A., Ijaz, M., Ul-Allah, S., ... & Kaleem, F. (2020). Foliage applied proline induces salt tolerance in chili genotypes by regulating photosynthetic attributes, ionic homeostasis, and antioxidant defense mechanisms. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 61, 693-702.
- conditions. *Pakistan Journal of Botany*, 39(4), 1133-1144.
- Çulha, Ş., & Çakırlar, H. (2011). Tuzluluğun bitkiler üzerine etkileri ve tuz tolerans mekanizmaları. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 11(2), 11-34.
- Coşkun, E., & Aksu, G. (2024). Kuraklık ve tuz stresi altında yeşil ceviz kabuğu kompostu uygulanan mısır bitkisinin fizyolojisi. *ÇOMÜ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 12(1), 78-88.
- Da Rocha, I. M. A., Vitorello, V. A., Silva, J. S., Ferreira-Silva, S. L., Viégas, R. A., Silva, E. N., & Silveira, J. A. G. (2012). Exogenous ornithine is an effective precursor and the δ -ornithine amino transferase pathway contributes to proline accumulation under high N recycling in salt-stressed cashew leaves. *Journal of plant physiology*, 169(1), 41-49.
- Dawood, M. G., Taie, H. A. A., Nassar, R. M. A., Abdelhamid, M. T., & Schmidhalter, U. (2014). The changes induced in the physiological, biochemical and anatomical characteristics of *Vicia faba* by the exogenous application of proline under seawater stress. *South African Journal of Botany*, 93, 54-63.
- De Freitas, P. A. F., de Souza Miranda, R., Marques, E. C., Prisco, J. T., & Gomes-Filho, E. (2018). Salt tolerance induced by exogenous proline in maize is related to low oxidative damage and favorable ionic homeostasis. *Journal of Plant Growth Regulation*, 37, 911-924.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Delauney, A. J., & Verma, D. P. S. (1993). Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *The plant journal*, 4(2), 215-223.
- El-Banna, M. F., & Mosa, A. (2024). Exogenous application of proline mitigates deteriorative effects of salinity stress in NFT closed-loop system: An ultrastructural and physio-biochemical investigation on hydroponically grown tomato (*Solanum lycopersicon* L.). *Scientia Horticulturae*, 330, 113061.
- Epstein, E., Norlyn, J. D., Rush, D. W., Kingsbury, R. W., Kelley, D. B., Cunningham, G. A., & Wrona, A. F. (1980). Saline culture of crops: a genetic approach. *Science*, 210(4468), 399-404.
- Fedoroff, N. V., Battisti, D. S., Beachy, R. N., Cooper, P. J., Fischhoff, D. A., Hodges, C. N., ... & Zhu, J. K. (2010). Radically rethinking agriculture for the 21st century. *science*, 327(5967), 833-834.
- Flowers, T. J. (1999). Salinisation and horticultural production. *Scientia Horticulturae*, 78(1).
- Gad, A. (2020). Qualitative and quantitative assessment of land degradation and desertification in egypt based on satellite remote sensing: urbanization, salinization and wind erosion. *Environmental Remote Sensing in Egypt*, 443-497.
- Gupta, K. J., Stoimenova, M., & Kaiser, W. M. (2005). In higher plants, only root mitochondria, but not leaf mitochondria reduce nitrite to NO, in vitro and in situ. *Journal of Experimental Botany*, 56(420), 2601-2609.
- Gülen, H., Eriş, A., (2003). Some physiological changes in strawberry (*Fragaria x ananassa* ‘Camarosa’) plants under heat stress. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 78(6), 894-898.
- Hamouda, M. M., Badr, A., Ali, S. S., Adham, A. M., Ahmed, H. I. S., & Saad-Allah, K. M. (2023). Growth, physiological, and molecular responses of three phaeophyte extracts on salt-stressed pea (*Pisum sativum* L.) seedlings. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 21(1), 32.
- Hasanuzzaman, M., Alam, M. M., Rahman, A., Hasanuzzaman, M., Nahar, K., & Fujita, M. (2014). Exogenous proline and glycine betaine mediated upregulation of antioxidant defense and glyoxalase systems provides better protection against salt-induced oxidative stress in two rice (*Oryza sativa* L.) varieties. *BioMed Research International*, 2014.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Hasanuzzaman, M., Hossain, M. A., da Silva, J. A. T., & Fujita, M. (2012). Plant response and tolerance to abiotic oxidative stress: antioxidant defense is a key factor. *Crop stress and its management: perspectives and strategies*, 261-315.
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Fujita, M., Ahmad, P., Chandna, R., Prasad, M. N. V., & Ozturk, M. (2013). Enhancing plant productivity under salt stress: relevance of poly-omics. *Salt stress in plants: signalling, omics and adaptations*, 113-156.
- Hayat, K., Bundschuh, J., Jan, F., Menhas, S., Hayat, S., Haq, F., ... & Zhou, P. (2020). Combating soil salinity with combining saline agriculture and phytomanagement with salt-accumulating plants. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 50(11), 1085-1115.
- Hirayama, T., & Shinozaki, K. (2010). Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future. *The plant journal*, 61(6), 1041-1052.
- Hoque, M. A., Banu, M. N. A., Okuma, E., Amako, K., Nakamura, Y., Shimoishi, Y., & Murata, Y. (2007). Exogenous proline and glycinebetaine increase NaCl-induced ascorbate–glutathione cycle enzyme activities, and proline improves salt tolerance more than glycinebetaine in tobacco Bright Yellow-2 suspension-cultured cells. *Journal of plant physiology*, 164(11), 1457-1468.
- 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(5), 553-561.
- Horchani, F., Bouallegue, A., Namsi, A., & Abbes, Z. (2024). Simultaneous Application of Ascorbic Acid and Proline as a Smart Approach to Mitigate the Adverse Effects of Salt Stress in Wheat (*Triticum aestivum*). *Biology Bulletin*, 1-18.
- Hossain, M. A., Hasanuzzaman, M., & Fujita, M. (2011). Coordinate induction of antioxidant defense and glyoxalase system by exogenous proline and glycinebetaine is correlated with salt tolerance in mung bean. *Frontiers of Agriculture in China*, 5, 1-14.
- Hossain, M. A., Kumar, V., Burritt, D. J., Fujita, M., & Mäkelä, P. (2019). Osmoprotectant-mediated abiotic stress tolerance in plants. *Proline Metabolism and Its Functions in Development and Stress Tolerance*; Springer Nature: Cham, Switzerland, 41-72.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Hosseini-fard, M., Stefaniak, S., Ghorbani Javid, M., Soltani, E., Wojtyła, Ł., & Garneczarska, M. (2022). Contribution of exogenous proline to abiotic stresses tolerance in plants: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(9), 5186.
- Huang, Y., Bie, Z., Liu, Z., Zhen, A., & Wang, W. (2009). Protective role of proline against salt stress is partially related to the improvement of water status and peroxidase enzyme activity in cucumber. *Soil Science and Plant Nutrition*, 55(5), 698-704.
- Jamei, R., Heidari, R., Khara, J., & Zare, S. (2009). Hypoxia induced changes in the lipid peroxidation, membrane permeability, reactive oxygen species generation, and antioxidative response systems in *Zea mays* leaves. *Turkish Journal of Biology*, 33(1), 45-52.
- Jamil, M., Kharal, M. A., Ahmad, M., Abbasi, G. H., Nazli, F., Hussain, A., & Akhtar, M. F. U. Z. (2018). Inducing salinity tolerance in red pepper (*Capsicum annuum* L.) through exogenous application of proline and L-tryptophan.
- Janská, A., Maršík, P., Zelenková, S., & Ovesná, J. (2010). Cold stress and acclimation—what is important for metabolic adjustment?. *Plant Biology*, 12(3), 395-405.
- Jithesh, M. N., Prashanth, S. R., Sivaprakash, K. R., & Parida, A. K. (2006). Antioxidative response mechanisms in halophytes: their role in stress defence. *Journal of Genetics*, 85, 237-254.
- Kahlaoui, B., Hachicha, M., Misle, E., Fidalgo, F., & Teixeira, J. (2018). Physiological and biochemical responses to the exogenous application of proline of tomato plants irrigated with saline water. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 17(1), 17-23.
- Katerji, N., Van Hoorn, J. W., Hamdy, A., & Mastrorilli, M. (2003). Salinity effect on crop development and yield, analysis of salt tolerance according to several classification methods. *Agricultural water management*, 62(1), 37-66.
- Kaya, C., Higgs, D., Kirnak, H., & Tas, I. (2003). Ameliorative effect of calcium nitrate on cucumber and melon plants drip irrigated with saline water. *Journal of plant nutrition*, 26(8), 1665-1681.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- 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(3), 397-403.
- Kaynaş, K., Kaynaş, K., Öz, F., & Burak, M. (1995). Değişik anaçlar üzerine aşılı bazı elma çeşitlerinin kurağa dayanımları. *Türkiye II. Ulusal bahçe bitkileri kongresi*, 1, 1-6.
- Kaynaş, N. (1994). Bazı şeftali ve nektarin çeşitlerinde kurağa mukavemetin fizyolojisi üzerinde araştırmalar. *Atatürk bahçe kültürleri merkez araştırma enstitüsü, Yalova*.
- Light, G. G., Mahan, J. R., Roxas, V. P., & Allen, R. D. (2005). Transgenic cotton (*Gossypium hirsutum* L.) seedlings expressing a tobacco glutathione S-transferase fail to provide improved stress tolerance. *Planta*, 222, 346-354.
- Lim, C. C., Krebs, S. L., Arora, R. (1999). A 25-kDa dehydrin associated with genotype and age-dependent leaf freezing-tolerance in *Rhododendron*: A genetic marker for cold hardiness? *Theoretical and Applied Genetics*, 99(5), 912-920.
- Liu, J., & Wang, Y. S. (2020). Proline metabolism and molecular cloning of Amp5CS in the mangrove *Avicennia marina* under heat stress. *Ecotoxicology*, 29, 698-706.
- Mahajan, S., & Tuteja, N. (2005). Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of biochemistry and biophysics*, 444(2), 139-158.
- Maizel Jr, J. V. (2000). SDS polyacrylamide gel electrophoresis. *Trends in biochemical sciences*, 25(12), 590-592.
- Manchanda, G., & Garg, N. (2008). Salinity and its effects on the functional biology of legumes. *Acta Physiologiae Plantarum*, 30, 595-618.
- Mansour, M. M. F., & Salama, K. H. (2004). Cellular basis of salinity tolerance in plants. *Environmental and Experimental Botany*, 52(2), 113-122.
- Martinez-Rodriguez, M. M., Santa-Cruz, A., Estan, M. T., Caro, M., & Bolarin, M. C. (2002). Influence of rootstock in the tomato response to salinity.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Meena, M., Divyanshu, K., Kumar, S., Swapnil, P., Zehra, A., Shukla, V., ... & Upadhyay, R. S. (2019). Regulation of L-proline biosynthesis, signal transduction, transport, accumulation and its vital role in plants during variable environmental conditions. *Heliyon*, 5(12).
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in plant science*, 7(9), 405-410.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., & Van Breusegem, F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in plant science*, 9(10), 490-498.
- Morgan, J. M. (1984). Osmoregulation and water stress in higher plants. *Annual review of plant physiology*, 35(1), 299-319.
- Munns, R. (2005). Genes and salt tolerance: bringing them together. *New phytologist*, 167(3), 645-663.
- Munns, R., & Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59, 651-681.
- Nakano, Y., Asada, K. 1980. Spinach chloroplasts scavenge hydrogen peroxide on illumination. *Plant Cell Physiol.*, 21: 1295-1307.
- Nounjan, N., Nghia, P. T., & Theerakulpisut, P. (2012). Exogenous proline and trehalose promote recovery of rice seedlings from salt-stress and differentially modulate antioxidant enzymes and expression of related genes. *Journal of plant physiology*, 169(6), 596-604.
- Özdemir, B., Tanyolaç, Z. Ö., Ulukapı, K., & Onus, A. N. (2016). Evaluation of salinity tolerance level of some pepper (*Capsicum annuum* L.) cultivars. *Int J Agric Innov Res*, 5(2), 247-251.
- Paparella, S., Araújo, S. S., Rossi, G., Wijayasinghe, M. A. L. A. K. A., Carbonera, D., & Balestrazzi, A. (2015). Seed priming: state of the art and new perspectives. *Plant cell reports*, 34, 1281-1293.
- Parida, A. K., & Das, A. B. (2005). Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and environmental safety*, 60(3), 324-349.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Patade, V. Y., Lokhande, V. H., & Suprasanna, P. (2014). Exogenous application of proline alleviates salt induced oxidative stress more efficiently than glycine betaine in sugarcane cultured cells. *Sugar Tech*, 16, 22-29.
- Qirat, M., Shahbaz, M., & Perveen, S. H. A. G. U. F. T. A. (2018). Beneficial role of foliar-applied proline on carrot (*Daucus carota* L.) under saline conditions. *Pak. J. Bot*, 50(5), 1735-1744.
- Quamme, H.A., Stushnoff, C., & Weiser, C.J. (1972). Winter Hardiness of Several Blueberry Species and Cultivars in Minnesota¹. *HortScience*.
- Raymond, S., & Weintraub, L. (1959). Acrylamide gel as a supporting medium for zone electrophoresis. *Science*, 130(3377), 711-711.
- Schonfeld, M. A., Johnson, R. C., Carver, B. F., & Mornhinweg, D. W. (1988). Water relations in winter wheat as drought resistance indicators. *Crop Science*, 28(3), 526-531.
- Serraj, R. A. C. H. I. D., & Sinclair, T. R. (2002). Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions?. *Plant, cell & environment*, 25(2), 333-341.
- Shafiq, F., Raza, S. H., Bibi, A., Khan, I., & Iqbal, M. (2018). Influence of proline priming on antioxidative potential and ionic distribution and its relationship with salt tolerance of wheat. *Cereal Research Communications*, 46(2), 287-300.
- Shavrukov, Y. (2013). Salt stress or salt shock: which genes are we studying?. *Journal of Experimental Botany*, 64(1), 119-127.
- Shen, S., Jing, Y., Kuang, T. (2003). Proteomics approach to identify wound-response related proteins from rice leaf sheath, *Proteomics*, 3 (4), 527-535.
- Silva, S. T. D. A., Lima, G. S. D., Lima, V. L. A. D., Nóbrega, J. S., da Silva, S. S., Ferreira, J. T. A., ... & Sousa, V. F. D. O. (2024). Use of Proline to Induce Salt Stress Tolerance in Guava. *Plants*, 13(14), 1887.
- Singh, M., Kumar, J., Singh, S., Singh, V. P., & Prasad, S. M. (2015). Roles of osmoprotectants in improving salinity and drought tolerance in plants: a review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 14, 407-426.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Sobahan, M. A., Akter, N., Murata, Y., & Munemasa, S. (2016). Exogenous proline and glycinebetaine mitigate the detrimental effect of salt stress on rice plants. *Science, Engineering and Health Studies*, 38-43.
- Srivatsava, J. P., Gupta, S. C., Lal, P., Muralia, R. N., & Kumar, A. R. V. I. N. D. (1988). Effect of salt stress on physiological and biochemical parameters of wheat.
- Subramanyam, K., Sailaja, K. V., Subramanyam, K., Muralidhara Rao, D., & Lakshmidhevi, K. (2011). Ectopic expression of an osmotin gene leads to enhanced salt tolerance in transgenic chilli pepper (*Capsicum annum* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 105, 181-192.
- Szepesi, Á., & Szöllösi, R. (2018). Mechanism of proline biosynthesis and role of proline metabolism enzymes under environmental stress in plants. In *Plant metabolites and regulation under environmental stress* (pp. 337-353). Academic Press.
- Şevgin Zirek, N. (2017). Biber Bitkisinde Tuz Stresi Üzerine Magnezyumun Etkileri [Yüksek Lisans Tezi, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü]. YÖK Ulusal Tez Merkezi. https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/tezDetay.jsp?id=5aQCMxRx_Y_5yM50_nhGaw&no=3HANJiNtHUdlzy5S6SGXdQ
- Turhan, E. (2002). Farklı Ortamlarda Yetiştirilen Cileklerin Tuza Dayanıklılık Fizyolojileri Üzerine Araştırmalar (Doctoral dissertation, Bursa Uludag University (Turkey)).
- Ünlükara, A., & KARADAVUT, B. C. S. (2006). Farklı çevre koşulları ile sulama suyu tuzluluğu ilişkilerinin domatesin büyüme, gelişme, verim ve kalitesi üzerindeki etkileri. *Journal of Agricultural Faculty of Gaziosmanpaşa University (JAFAG)*, 2006(1).
- Valliyodan, B., & Nguyen, H. T. (2006). Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance in plants. *Current opinion in plant biology*, 9(2), 189-195.
- Vural, H., Eşiyok, D., Duman, İ. (2000). Kültür sebzeleri (sebze yetiştirme), Ege Üniversitesi Basımevi.
- Wahid, A. B. D. U. L., & Jamil, A. M. E. R. (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.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Wang, W. X., Vinocur, B., Shoseyov, O., & Altman, A. (2000, July). Biotechnology of plant osmotic stress tolerance physiological and molecular considerations. In IV International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding 560 (pp. 285-292).
- Wani, A. S., Ahmad, A., Hayat, S., & Tahir, I. (2016). Is foliar spray of proline sufficient for mitigation of salt stress in *Brassica juncea* cultivars?. Environmental Science and Pollution Research, 23, 13413-13423.
- Wani, A. S., Ahmad, A., Hayat, S., & Tahir, I. (2019). Epibrassinolide and proline alleviate the photosynthetic and yield inhibition under salt stress by acting on antioxidant system in mustard. Plant physiology and biochemistry, 135, 385-394
- Wu, G. Q., Feng, R. J., Li, S. J., & Du, Y. Y. (2017). Exogenous application of proline alleviates salt-induced toxicity in sainfoin seedlings. J. Anim. Plant Sci, 27(1).
- Wutipraditkul, N., Wongwean, P., & Buaboocha, T. (2015). Alleviation of salt-induced oxidative stress in rice seedlings by proline and/or glycinebetaine. Biologia plantarum, 59, 547-553.
- 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.
- Yang, S. L., Lan, S. S., & Gong, M. (2009). Hydrogen peroxide-induced proline and metabolic pathway of its accumulation in maize seedlings. Journal of plant physiology, 166(15), 1694-1699.
- Zhu, J. K. (2016). Abiotic stress signaling and responses in plants. Cell, 167(2), 313-324.

EK AÇIKLAMALAR

Ek Açıklamalar: Tuz Stresi Koşullarında Biber Bitkisine Prolin Uygulamalarının Etkilerinin Belirlenmesine Yönelik Yapılan İstatistik Analizlerin Sonuçları

	<u>Sayfa</u>
A: Hücre Membran Zararlanması (%) İnteraksiyon Tablosu	52
B: Yaprak Oransal Su Kapsamı (%) İnteraksiyon Tablosu	53
C: Turgor Kaybı (%) İnteraksiyon Tablosu	54
D: Prolin Miktarı ($\mu\text{M/gTA}$) İnteraksiyon Tablosu	55
E: Katalaz (CAT) Aktivitesi ($\mu\text{M/mg.protein}$) İnteraksiyon Tablosu	56
F: Askorbat Peroksidaz (APX) Aktivitesi ($\mu\text{M/mg.protein}$) İnteraksiyon Tablosu	57
G: Toplam Çözünebilir Protein Miktarı (mg protein/gTA) İnteraksiyon Tablosu	58

Ek Açıklamalar-A: Hücre Membran Zararlanması (%) İnteraksiyon Tablosu

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kareler Toplamı	F	Ö.D.
Düzeltilmiş Model	1220,178 ^a	4	305,044	227,743	,000
Kesişme	2639,019	1	2639,019	1970,265	,000
Uygulama	1220,178	4	305,044	227,743	,000
Hata	13,394	10	1,339		
Toplam	3287,273	15			
Düzeltilmiş Toplam	1233,572	14			

Ö.D: Önem Derecesi (%5)

Ek Açıklamalar-B: Yaprak Oransal Su Kapsamı (%) İnteraksiyon Tablosu

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kareler Toplamı	F	Ö.D.
Düzeltilmiş Model	200,008 ^a	5	40,002	18,377	,000
Kesişme	88364,893	1	88364,893	40595,820	,000
Uygulama	200,008	5	40,002	18,377	,000
Hata	17,414	8	2,177		
Toplam	91535,037	14			
Düzeltilmiş Toplam	217,421	13			

Ö.D: Önem Derecesi (%5)

Ek Açıklamalar-C: Turgor Kaybı (%) İnteraksiyon Tablosu

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kareler Toplamı	F	Ö.D.
Düzeltilmiş Model	197,427 ^a	5	39,485	25,239	,000
Kesişme	4121,096	1	4121,096	2634,224	,000
Uygulama	197,427	5	39,485	25,239	,000
Hata	14,080	9	1,564		
Toplam	4353,799	15			
Düzeltilmiş Toplam	211,507	14			

Ö.D: Önem Derecesi (%5)

Ek Açıklamalar-D: Prolin Miktarı ($\mu\text{M/gTA}$) İnteraksiyon Tablosu

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kareler Toplamı	F	Ö.D.
Düzeltilmiş Model	74168035,428 ^a	5	14833607,086	98,158	,000
Kesişme	518016062,159	1	518016062,159	3427,858	,000
Uygulama	74168035,428	5	14833607,086	98,158	,000
Hata	1511194,692	10	151119,469		
Toplam	590275037,030	16			
Düzeltilmiş Toplam	75679230,120	15			

Ö.D: Önem Derecesi (%5)

Ek Açıklamalar-E: Katalaz (CAT) Aktivitesi ($\mu\text{M}/\text{mg}.\text{protein}$) İnteraksiyon Tablosu

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kareler Toplamı	F	Ö.D.
Düzeltilmiş Model	124,825 ^a	5	24,965	70,958	,000
Kesişme	391,404	1	391,404	1112,489	,000
Uygulama	124,825	5	24,965	70,958	,000
Hata	8,092	23	,352		
Toplam	526,129	29			
Düzeltilmiş Toplam	132,917	28			

Ö.D: Önem Derecesi (%5)

Ek Açıklamalar-F: Askorbat Peroksidaz (APX) Aktivitesi ($\mu\text{M}/\text{mg.protein}$) İnteraksiyon Tablosu

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kareler Toplamı	F	Ö.D.
Düzeltilmiş Model	,457 ^a	5	,091	7,907	,000
Kesişme	13,985	1	13,985	1210,485	,000
Uygulama	,457	5	,091	7,907	,000
Hata	,254	22	,012		
Toplam	14,991	28			
Düzeltilmiş Toplam	,711	27			

Ö.D: Önem Derecesi (%5)

Ek Açıklamalar-G: Toplam Çözünebilir Protein Miktarı (mg protein/gTA) İnteraksiyon Tablosu

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kareler Toplamı	F	Ö.D.
Düzeltilmiş Model	3,223 ^a	5	,645	,827	,537
Kesişme	7529,828	1	7529,828	9656,774	,000
Uygulama	3,223	5	,645	,827	,537
Hata	36,648	47	,780		
Toplam	7586,474	53			
Düzeltilmiş Toplam	39,871	52			

Ö.D: Önem Derecesi (%5)