

Su Stresi Koşullarında Hıyar Bitkisinde Antioksidatif Enzim Aktivitelerinde  
Meydana Gelen Değişimler

Kübra Elgün

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Ocak 2021

Changes in Antioxidative Enzyme Activities in Cucumber  
Under Water Stress Conditions

Kübra Elgün

**MASTER OF SCIENCE THESIS**

Department of Agricultural Biotechnology

Jan 2021

Su Stresi Koşullarında Hıyar Bitkisinde Antioksidatif Enzim Aktivitelerinde  
Meydana Gelen Değişimler

Kübra Elgün

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca  
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı  
Bitkisel Biyoteknoloji Bilim Dalında  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Sergül Ergin

Ocak 2021

## ETİK BEYAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Dr. Öğr. Üyesi Sergül Ergin danışmanlığında hazırlamış olduğum “Su Stresi Koşullarında Hıyar Bitkisinde Antioksidatif Enzim Aktivitelerinde Meydana Gelen Değişimler” başlıklı YÜKSEK LİSANS tezimin özgün bir çalışma olduğunu; tez çalışmamın tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; tezimde verdiğim bilgileri, verileri akademik ve bilimsel etik ilke ve kurallara uygun 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. 11/01/2021

Kübra ELGÜN

## ÖZET

Hıyar (*Cucumis sativus* L.) bitkisinde su stresinin moleküler etkilerinin incelendiği bu çalışmada, 'Beit alpha' hıyar çeşidi fideleri kullanılmıştır. Sera ortamında, saksıda yetiştirilen hıyar bitkilerine, fideler 5–6 yapraklı döneme gelince su stresi oluşturmak amacıyla %10'luk PEG 6000 çözeltisi 15 gün boyunca uygulanmıştır. Kontrol bitkileri ise çeşme suyu ile sulanmıştır. Uygulamanın beşinci ve onbeşinci günlerinde alınan yaprak örneklerinde lipid peroksidasyonu (MDA), yaprak oransal su kapsamı (YOSK), turgor kaybı (TK), prolin miktarı, askorbat peroksidaz (APX), katalaz (CAT) ve peroksidaz (PRX) enzim aktivitelerindeki değişimler incelenmiştir.

Araştırma sonucunda, hücresel zararlanmanın göstergesi olan MDA miktarı PEG uygulamasının özellikle 15. gününde belirgin bir artış göstermiştir. Su stres süresi uzadıkça YOSK'un azaldığı, buna karşılık TK'nın arttığı gözlemlenmiştir. Prolin miktarında PEG uygulama süresine bağlı olarak önemli düzeyde artış belirlenmiştir. APX aktivitesi PEG uygulamasının 5. gününde çok fazla değişmezken, 15. günde çok belirgin bir artış göstermiştir. CAT aktivitesinin PEG uygulamalarının 5. gününde kontrolden daha düşük olduğu, ancak 15. günde belirgin bir artış göstererek kontrol bitkilerinden daha yüksek bir düzeye ulaştığı belirlenmiştir. Belirlenen birçok asidik ve bazik PRX'lerden yalnızca Rf değeri 0,28 olarak belirlenen bazik PRX'in hıyarda su stresine toleransla ilişkili olabileceği sonucuna varılmıştır. Çalışmadan elde edilen tüm sonuçlar değerlendirildiğinde, hıyarda su stresi koşullarında oluşan oksidatif hasara karşı antioksidan enzimlerin etkili olduğu tespit edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Su stresi, PEG 6000, hıyar, antioksidatif enzim

## SUMMARY

In this study, in which the molecular effects of water stress on cucumber (*Cucumis sativus* L.) plant were investigated by using seed of varieties 'Beit alpha'. In the greenhouse environment, 10% PEG 6000 solution was applied to cucumber plants grown in pots for 15 days in order to create water stress when the seedlings reach the period of 5-6 leaves. On the other hand, control plants. The differences of lipid peroxidation (MDA), relative water content (RCW), turgor loss (TL), proline amount, peroxidase (PRX), ascorbate peroxidase (APX) and catalase (CAT) between the control and treatment groups were evaluated in leaves that taken the fifth and fifteenth days of water stress.

As a result of the research, the amount of MDA, which is an indicator of cellular damage, increased significantly especially on the 15th day of PEG application. It has been observed that as the water stress duration increases, the RCW decreases, whereas the TL increases. A significant increase was determined in the amount of proline depending on the PEG application time. APX activity did not change much on the 5th day of PEG administration, but showed a significant increase on the 15th day. It was determined that CAT activity was lower than the control on the 5th day of PEG applications, but reached a higher level than the control plants by showing a significant increase on the 15th day. It has been concluded that among many acidic and basic PRXs, only basic PRX, whose Rf value is determined as 0.28, may be related to tolerance to water stress in cucumber. When all the results obtained from the study were evaluated, it was found that antioxidant enzymes were effective against oxidative damage in cucumber under water stress conditions.

**Key words:** Water stress, PEG 6000, *cucumis sativus*, antioxidative enzyme

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
<b>ÖZET .....</b>	<b>vi</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>vii</b>
<b>İÇİNDEKİLER.....</b>	<b>viii</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ.....</b>	<b>x</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....</b>	<b>xii</b>
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI .....</b>	<b>6</b>
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM .....</b>	<b>15</b>
3.1. Materyal .....	15
3.2. Yöntem.....	16
3.2.1. Lipid peroksidasyonunun (MDA miktarı) belirlenmesi .....	16
3.2.2. Yaprak oransal su kapsamı (YOSK) ve turgor kaybı (TK) .....	17
3.2.3. Prolin miktarının belirlenmesi .....	17
3.2.4. Askorbatperoksidaz (APX, EC.1.11.1.11) analizi .....	18
3.2.5. Katalaz (CAT, EC 1.11.1.6) analizi.....	20
3.2.6. Enzimlerde toplam protein miktarının tespiti .....	23
3.2.7. Peroksidaz (PRX, EC 1.11.1.7) izoenzim analizi .....	23
3.2.8. İstatistiksel analizler .....	25
<b>4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....</b>	<b>26</b>
4.1. Lipid Peroksidasyonu (MDA).....	27
4.2. Yaprak Oransal Su Kapsamı (YOSK) ve Turgor Kaybı (TK).....	28
4.3. Prolin Miktarı .....	31

**İÇİNDEKİLER (devam)**

	<b><u>Sayfa</u></b>
4.4. Askorbat Peroksidaz (APX) Enzim Aktivitesi.....	32
4.5. Katalaz Enzim (CAT) Aktivitesi.....	34
4.6. Peroksidaz (PRX) İzoenzim Aktivitesi .....	35
<b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>	<b>42</b>
<b>KAYNAKLAR DİZİNİ.....</b>	<b>44</b>
<b>EK AÇIKLAMALAR .....</b>	<b>55</b>
Ek Açıklamalar-A: Lipid Peroksidasyonu ( $\mu\text{M/gTA}$ ) İnteraksiyon Tablosu .....	56
Ek Açıklamalar-B: Yaprak Oransal Su Kapsamı (%) İnteraksiyon Tablosu.....	57
Ek Açıklamalar-C: Turgor Kaybı (%) İnteraksiyon Tablosu .....	58
Ek Açıklamalar-D: Prolin ( $\mu\text{M/gTA}$ ) İnteraksiyon Tablosu .....	59
Ek Açıklamalar-E: Askorbat Peroksidaz Enzim Aktivitesi ( $\mu\text{M/mgprot.}$ ) İnteraksiyon Tablosu .....	60
Ek Açıklamalar-F: Katalaz Enzim Aktivitesi ( $\mu\text{M/mgprot.}$ ) İnteraksiyon Tablosu .....	61



## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.1. Serada yetiştirilen viyollerdeki (a) ve saksıya alınmış (b) hıyar fidelerinin genel görünümü. ....	15
4.1. Hıyar bitkisinde PEG uygulamasına bağlı olarak 15. günde yapraklarda meydana gelen değişimler. ....	26
4.2. Hıyar bitkisinde PEG uygulamasına bağlı olarak 15. günde bitkilerde meydana gelen değişimler. ....	26
4.3. PEG uygulamasının günlere bağlı olarak hıyar bitkisinde MDA miktarı ( $\mu\text{mol/gTA}$ ) üzerine etkisi. Dikey barlar tekerrürlerin $\pm$ standart sapmalarını göstermektedir. ....	27
4.4. PEG uygulamasının günlere bağlı olarak hıyar bitkisinde YOSK (%) üzerine etkisi. Dikey barlar tekerrürlerin $\pm$ standart sapmalarını göstermektedir. ....	29
4.5. PEG uygulamasının günlere bağlı olarak hıyar bitkisinde TK (%) üzerine etkisi. Dikey barlar tekerrürlerin $\pm$ standart sapmalarını göstermektedir. ....	30
4.6. PEG uygulamasının günlere bağlı olarak hıyar bitkisinde prolin miktarı ( $\mu\text{mol/gTA}$ ) üzerine etkisi. Dikey barlar tekerrürlerin $\pm$ standart sapmalarını göstermektedir. ....	31
4.7. PEG uygulamasının günlere bağlı olarak hıyar bitkisinde APX enzim aktivitesi ( $\mu\text{mol/gTA}$ ) üzerine etkisi. Dikey barlar tekerrürlerin $\pm$ standart sapmalarını göstermektedir. ....	33
4.8. PEG uygulamasının günlere bağlı olarak hıyar bitkisinde CAT enzim aktivitesi ( $\mu\text{mol/gTA}$ ) üzerine etkisi. Dikey barlar tekerrürlerin $\pm$ standart sapmalarını göstermektedir. ....	34
4.9. PEG uygulamasının günlere bağlı olarak hıyar bitkisinde $R_f=0,09$ olarak belirlenen asidik PRX 1 bandının aktivite yoğunluğu. ....	36
4.10. PEG uygulamasının günlere bağlı olarak hıyar bitkisinde $R_f=0,19$ olarak belirlenen asidik PRX 2 bandının aktivite yoğunluğu. ....	37
4.11. PEG uygulamasının günlere bağlı olarak hıyar bitkisinde $R_f=0,50$ olarak belirlenen asidik PRX 3 bandının aktivite yoğunluğu. ....	38

**ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)**

<b><u>Şekil</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
4.12. PEG uygulamasının günlere bağlı olarak hıyar bitkisinde $R_f=0.54$ olarak belirlenen asidik PRX 4 bandının aktivite yoğunluğu. ....	39
4.13. PEG uygulamasının günlere bağlı olarak hıyar bitkisinde $R_f=0,28$ olarak belirlenen bazik PRX 1 bandının aktivite yoğunluğu. ....	40
4.14. PEG uygulamasının günlere bağlı olarak hıyar bitkisinde $R_f=0,35$ olarak belirlenen bazik PRX 2 bandının aktivite yoğunluğu. ....	41

**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**

<b><u>Simgeler</u></b>	<b><u>Açıklama</u></b>
%	Yüzde işareti
°C	Sıcaklık birimi
0	Derece (küresel konumlama ölçüsü için)
Ca	Kalsiyum
CO <sub>2</sub>	Karbondioksit
Kg	Kilogram
M	Metre
m <sup>2</sup>	Metrekare
P	İstatistiksel olasılık değeri
PH	Çözeltilerin asitlik/bazlık ölçü birimi
t	ton (1000 kg)
Cm	Santimetre
PPO	Polifenol oksidaz
APX	Askorbat peroksidaz
AsA	Askorbik asit
BSA	Bovine serum albumin
CAT	Katalaz
DTNB	Dithio nitro benzoik asit
DTT	1,4 dithiothreitol
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
GR	Glutatifon redüktaz
OD	Absorbans değeri (Optical density)
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi (Polyacrylamide gel electrophoresis)

**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)****Simgeler**

PRX

PVPP

ROS

Rf

rpm

SD

SDS

SDS-PAGE

SOD

TA

**Açıklama**

Peroksidaz

Polivinilpolipirrolidon

Reaktif oksijen türevleri (Reactive oxygen species)

Oransal ilerleme (Relative mobility)

Dakikadaki dönme sayısı (Revolution per minute)

Serbestlik derecesi

Sodyum dodesil sülfat

Sodyum dodesil sülfat- Poliakrilamid jel elektroforezi

Superoksit dismütaz

Taze ağırlık

**Kısaltmalar**

FAO

OSİBMGM

**Açıklama**

Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü

Orman ve Su İşleri Bakanlığı Meteoroloji  
GenelMüdürlüğü

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Bitkiler, sıklıkla biyotik ve abiyotik stresler dahil olmak üzere çeşitli çevresel streslere maruz kalan sabit organizmalardır (Keyvan, 2010; Rahdari ve Hoseini, 2012; Zlatev ve Lidon, 2012; Rana vd, 2013). Dünyanın pek çok yerinde, özellikle kurak ve yarı kurak alanlarda bitkiler için en önemli ve yaygın abiyotik stres faktörlerinden biri kuraklık stresidir. Kuraklık, atmosferik veya hava olaylarının tanımı için genel bir terimdir ve genellikle yağışsız bir dönem olarak açıklanır (Jaleel vd., 2009; Dai, 2012). Kuraklığın tanımını yapmak oldukça zordur; meteorolojik, tarımsal, hidrolojik ve sosyoekonomik bakış açıları gibi çeşitli bakış açılarından tanımlanabilir (Barriopedro vd., 2012; Rahdari ve Hoseini, 2012).

Günümüzde hava sıcaklıklarının ve atmosferik CO<sub>2</sub>'nin artmasına sebep olan küresel iklim değişikliği, yağış rejiminin birçok bölgede değişmesine sebep olmaktadır (Arbona vd., 2013). Küresel iklim değişiklikleri, dünya çapında kuraklık stresini tetikleyen ana faktördür ve bu nedenle ürün verimini sınırlamaktadır. Kuraklığın; küresel iklim değişikliği ile beraber yüksek sıcaklık, yüksek ışık yoğunluğu ve kuru rüzgar gibi topraktan suyun buharlaşmasını artıran birçok başka nedeni vardır. Bu faktörler bitkilerden su kayıplarını artırır ve ardından bitkinin su stresine maruz kalmasını kolaylaştırmaktadırlar (Mafakheri vd., 2010; Dai 2012).

Dünya üzerinde bulunan kara parçalarının yaklaşık %45'lik kısmını kurak alanlar oluşturmaktadır ve bu alanlarda dünya nüfusunun %34'lük kısmının bulunduğu 2 milyardan fazla insan yaşamaktadır. Bununla birlikte dünya üzerindeki kurak alanların %90'lık kısmı gelişmekte olan ülkelerde görülmektedir (FAO, 2019). Türkiye'nin büyük çoğunluğu ise yarı kurak iklim şartlarının etkisi altındadır. Ülkemizde bu alan 51 milyon hektardır ve bu Türkiye topraklarının yaklaşık %37'sine denk gelmektedir. Bu nedenle, yağış miktarında ve dağılımında meydana gelebilecek değişiklikler ülkemizdeki sonuçlarını çok daha ciddi şekilde etkileyebilecektir (OSİBMGM, 2014).

Tipik olarak, tarımsal ve fizyolojik bir bakış açısından, kuraklık stresi, belirli bir zamanda düşük toprak nemi nedeniyle topraktaki bitkiler için mevcut olan su miktarı azaldığında meydana gelmektedir (Keyvan, 2010; Dai, 2012).

Bitkilerde su stresi, yaprak yüzeyinden terleme oranı köklerin su emme oranından daha yüksek olduğunda ortaya çıkmaktadır (Lisar vd., 2012). Bitkilerin su tüketiminde ve su kaybında meydana gelen bu dengesizlik, esas olarak toprağın su potansiyeli bitki köklerinin su potansiyelinden düşük olduğunda ortaya çıkar. Terleme ve buharlaşma yoluyla sürekli su kaybına genellikle atmosferik koşullar neden olmaktadır (Shao vd., 2008; Mafakheri vd., 2010; Dai, 2012; Trenberth vd., 2014). Sonuç olarak, tarımsal kuraklık meteorolojik kuraklıktan sonra meydana gelmektedir (Jaleel vd., 2009; Barriopedro vd., 2012; Dai, 2012).

Odunsu olmayan bitkilerin taze biyokütlesinin %80-95'ini su oluşturur. Bitkilerde su eksikliğinin birkaç nedeni vardır. Bunlar; düşük yağış, tuzluluk, aşırı sıcaklık dalgalanmaları ve yüksek ışık yoğunluğunu içermektedir. Su eksikliğine karşı bitki tepkileri, su eksikliğinin süresine ve şiddetine olduğu kadar bitki türüne, yaşına ve gelişim aşamasına da bağlı olmaktadır (Madhava vd., 2006). Yüksek toprak tuzluluğu durumunda, su baskını ve düşük toprak sıcaklığı gibi diğer koşullarda, toprakta su bulunmakta, ancak bitkiler onu alamamaktadır. Bu olay genellikle 'fizyolojik kuraklık' olarak bilinen bir durumdur (Lisar vd., 2012).

Kuraklık stresi çok boyutlu bir stres olmakla beraber genellikle bitkilerin fizyolojik, morfolojik, ekolojik, biyokimyasal ve moleküler özelliklerinde değişikliklere yol açmaktadır (Shao vd., 2008; Farooq vd., 2009; Bhargava ve Sawant, 2013). Ayrıca bitki büyümesi ve veriminin; niceliğini ve kalitesini olumsuz yönde etkileyebilmektedir (Jaleel vd., 2009; Zlatev ve Lidon, 2012; Nezhadahmadi vd., 2013).

Kuraklık belirtileri bitki türüne, gelişim aşamasına, büyüme koşullarına ve diğer çevresel faktörlere bağlı olarak değişmektedir (Arbona vd., 2013; Bhargava ve Sawant, 2013; Nezhadahmadi vd., 2013). Kuraklık şiddeti, kuraklık süresi, toprak fizikokimyasal koşulları ve bitki gücü, bitkilerde kuraklık semptomlarını tetikleyen diğer faktörlerdir. Genel olarak, kuraklık semptomları yaprak turgor kaybı, sarkma, solma, etiyolasyon, sararma ve erken yaprak dökümünü içermektedir (Bernacchia ve Furini, 2004; Farooq vd., 2009; Jaleel vd., 2009; Zare vd., 2011; Bhargava ve Sawant, 2013; Sapeta vd., 2013; Akhtar ve Nazir, 2013).

Kuraklık, bitkilerin morfolojik ve anatomik özelliklerinin birçok yönünü etkileyebilmektedir. Bir yaprağın anatomisi ve yapısı su stresi tarafından değiştirilmektedir (Rollins vd., 2013). Genel olarak değişiklikler, yaprakların boyutunda küçülme, stoma sayısında azalma, etli bitkilerde ve kserofitlerde stomaların batması, yaprak hücre duvarlarının kalınlaşması, iletim sisteminin az gelişmesi, büyük ksilem damarlarının sayısında artış, tahıllarda yaprak yuvarlanması ve erken yaşlanmanın indüksiyonu şeklinde ortaya çıkmaktadır (Farooq vd., 2009; Anjum vd., 2011). Ayrıca, bazı olağandışı semptomlar arasında ağaç kabuğu ve dal çatlağı, dalın ölmesi, incelen ağaç, nekroz, zayıf ve bodur büyüme bulunmaktadır. Son olarak, aşırı kuraklık koşulları altında bitki ölümü meydana gelmektedir (Farooq vd., 2009; Arbona vd., 2013; Sapeta vd., 2013).

Kuraklık stresi, bitkide klorofil içeriği ve bileşenlerinde değişikliklere neden olarak fotosentetik yolakta hasara neden olmaktadır (Nayyar ve Gupta 2006). Ek olarak, fotosentez sırasında fotokimyasal aktiviteyi baskılamakta ve Calvin döngüsünün enzimlerinin aktivitesini azaltmaktadır (Monakhova ve Chernyadev, 2002).

Kuraklığa karşı bitki tepkileri, kuraklığın süresine ve şiddetine olduğu kadar bitki türüne, yaşına ve gelişim aşamasına da bağlı olmaktadır. Birçok bitki kuraklık stresini tolere etmek için direnç mekanizmaları geliştirmiştir, ancak bu mekanizmalar çeşitlidir ve bitki türlerine bağlı olmaktadır (Madhava vd., 2006).

Genellikle bitkinin kuraklığa direnciyle ilişkili mekanizmalar ortak bir yol izler; kuraklık koşulları altında hücre suyu homeostazının sürdürülmesi. Bu durum, esas olarak su kaybının önlenmesi ve suyun hücrelere nüfuz etmesini artırmakla mümkündür, bu da sonuçta normal hücre işlevine yol açmaktadır. Kuraklık toleransının yanı sıra, kuraklıktan kaçınma, yıllık bitkilerde kuraklık toleransı için başka bir yaygın mekanizmadır, ancak her mekanizmanın, bitkiler üzerindeki etkilerinin karmaşıklığı ve kuraklığa tepkileri nedeniyle bazı sorunları ve sınırlamaları vardır (Lisar vd., 2012).

Absisik asit (ABA), stomaların kapanmasını uyardığı için kuraklık stresine yanıtta merkezi bir rol oynar ve böylece su kaybını azaltır, bu da CO<sub>2</sub> fiksasyonunu sınırlar ve Calvin döngüsü boyunca NADP<sup>+</sup> yenilenmesini azaltmaktadır. Bu olumsuz koşullar, elektronların moleküler oksijene sızmasının artmasıyla H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (hidrojen peroksit), O<sub>2</sub><sup>-</sup>

(süperoksit) ve OH<sup>-</sup> (hidroksil) radikalleri gibi reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumunu arttırmaktadır (Arora vd., 2002). ROS, stres sinyali yolunda ikincil haberciler olarak hareket edebilir (Chamnongpol vd., 1998), ancak aşırı ROS üretimi fotosentetik pigmentleri, membran lipidlerini, proteinleri ve nükleik asitleri oksitleyerek bitkilere zarar veren oksidatif strese neden olabilir (Yordanov vd., 2000).

Bitkiler, ROS seviyelerini kontrol etmek ve hücreleri oksidatif hasardan korumak için; karotenler, askorbik asit (AA),  $\alpha$ -tokoferol ( $\alpha$ -toc) ve indirgenmiş glutatyon (GSH) gibi enzimatik olmayan sistemlere ve süperoksit dismutaz (SOD), peroksidaz (PRX), askorbat peroksidaz (APX), katalaz (CAT), polifenol oksidaz (PPO), glutatyon redüktaz (GR) gibi enzimatik antioksidan sistemlere sahiptir (Mittler, 2002).

ROS üretimi ve antioksidan enzim aktivitesi arasındaki denge, oksidatif sinyal ve/veya hasarın meydana gelip gelmeyeceğini belirlemektedir (Moller vd., 2007). ROS'u yakalama ve zararlı etkilerini azaltma yeteneği, bitkilerin kuraklığa dayanıklılığı ile ilişkili olabilmektedir (Tsugane vd., 1999). SOD, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve O<sub>2</sub>'nin parçalanmasından sorumlu ROS'a karşı ilk savunma olarak kabul edilmektedir. CAT, APX, PRX, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin H<sub>2</sub>O'ya ve O<sub>2</sub>'ye dönüşümünü katalize eden enzimlerdir (Gratao vd., 2005).

Polietilen glikol 6000 (PEG 6000),  $\geq 6000$  moleküler ağırlığa sahip olup toksik olmayan ve geçirimsiz bir ozmotik madde olduğundan genellikle kuraklık stresini indüklemek için kullanılmaktadır. Önceki çalışmalar, PEG modelli kuraklık stresinin çeşitli bitkilerin morfolojik, fiziko-biyokimyasal ve moleküler tepkileri üzerindeki etkilerini incelemiştir ve ayrıca PEG 6000'e maruz kalmanın kuraklığı etkili bir şekilde simüle edebileceğini ve deney dönemi boyunca tek tip bir su potansiyelini koruyabileceğini doğrulamışlardır (Wang vd., 2009).

Dünya'da ve ülkemizde en fazla yetiştiriciliği yapılan sebze türlerinden biri olan hıyar (*Cucumis sativus* L.), ülkemizde hem örtü altı, hem de açıkta yoğun bir şekilde yetiştirilmektedir (FAO, 2019). Cucurbitales takımında yer alan ve kabakgiller (Cucurbitaceae) familyasından tek yıllık bitki olan hıyar 2n=14 kromozomludur. Anavatanı Hindistan olan hıyar, Asya'nın batısından Çin'in doğusuna, Kuzey Afrika'dan Güney Avrupa'ya kadar olan geniş bölgelerde kültüre alınarak yayılmıştır.



5000 yıldan fazladır kültürü yapıldığı tahmin edilen hıyar, olgunlaşmamış meyvesi tüketilen sebzeler arasındadır ve hem sofralık taze tüketilerek, hem de işlenmiş gıda endüstrisi ve kimya (kozmetik) endüstrisinde kullanılmaktadır. Hıyar, en iyi 18°C ile 24° C arasında büyüyen ılık mevsim bitkilerindedir. En popüler sebzelerden biri olan hıyar, yüzlek köklü bir bitki olduğundan su stresine karşı oldukça hassastır, özellikle çiçeklenme ve meyve bağlama döneminde maksimum miktarda suya ihtiyaç duymaktadır (Ertek vd., 2006; Wang vd., 2010). Bu da onu kuraklığa toleransla ilgili çalışmalar için ideal bir tür haline getirmektedir. Antioksidan savunma sistemi, bitkilerdeki temel kuraklık savunması ve adaptif mekanizmalardan biridir (An ve Liang 2013). Bununla birlikte, bildiğimiz kadarıyla, hıyarın su açığına tepkilerinde antioksidan savunma mekanizması ile ilgili nispeten az veri mevcuttur.

Küresel ısınma ile birlikte artan kuraklık stresi tarımsal üretimi etkileyen en önemli çevresel streslerden biridir. Dünyada verim kayıplarının en önemli nedenleri arasında abiyotik stres faktörleri bulunmaktadır (Levitt 1980; Wahid vd., 2007). 2050 yılına gelindiğinde dünya nüfusunun yaklaşık 10 milyar olacağı tahmin edilmektedir. Bu durum, artan nüfusun besleme ihtiyaçlarını karşılayabilmek için, mevcut imkanlardan en iyi şekilde yararlanarak gıda kayıplarını en aza indirmek gerektiğini göstermektedir (FAO, 2019). Dünya üzerinde insan beslenmesinde önemli yeri olan bitki türlerinin kuraklık stresi koşullarına verdiği yanıtları anlamak ve kuraklık stresine toleranslı çeşitlerin geliştirilmesi bu anlamda önem arz etmektedir. Yapılan bu tez çalışmasında üretimi ve tüketimi açısından ülkemizde önemli sebze türleri arasında yer alan hıyar (*Cucumis sativus* L.) bitkisinde kuraklık stresinin neden olduğu fizyolojik, moleküler ve biyolojik değişimlerin belirlenebilmesi amacıyla %10'luk PEG uygulamasıyla oluşturulan yapay kuraklık koşullarında bitkilerde meydana gelen bazı antioksidan enzim aktiviteleri ve ozmoregülantların etkinliği incelenmiştir.

## 2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

Abiyotik bir stres olarak kuraklık, doğası gereği çok boyutludur ve organizasyonlarının çeşitli düzeylerinde bitkileri etkilemektedir. Su, bitki ve hayvan hücrelerinin büyük bir bölümünü oluşturduğundan yaşam için gerekli bir metadır. Suyun yokluğunda, tüm büyüme faaliyetleri yavaşlar, ilerleyen dönemlerde fotosentez gibi yaşamı sürdürme süreçleri durdulur ve sonuçta hücre ölümleri gerçekleşmektedir. Kuraklık, tohum çimlenmesini, bitki büyümesini, besin maddelerinin mevcudiyetini, fenolojiyi, fotosentezi ve solunumu etkilediği için çevre ve bitki yaşamı üzerinde ciddi etkilere sahiptir. Tüm bu işlemler bitki yaşam döngüsünde çok önem arz etmektedir, tek bir işlemin kaçırılması durumunda tüm bitki etkilenecek ve bu etkinin belirtilerini gösterecektir. Kuraklık stresi, yaprak boyutunu, gövde uzamasını, kök çoğalmasını azaltabilmektedir. ve bitkilerin çeşitli biyokimyasal ve fizyolojik tepkiler göstermesi nedeniyle bitki su ilişkilerini/su kullanım verimliliğini olumsuz yönde bozabilmektedir (Farooq vd., 2009). Ortamdaki su, ışık yoğunluğu sıcaklık artışı, daha az bağıl nem ve yüksek rüzgar hızı nedeniyle kaybolmaktadır (Yamaguchi vd., 2011; Masaki vd., 2015; Schymanski ve Or, 2015; Da Silva Branco vd., 2017).

Bir bitki gövdesinin sıcaklığını kontrol etmek için su şarttır. Suyun çoğu, bitki hücrelerinde depolanan miktardan daha büyük olan stomatal terleme yoluyla kaybedilmektedir. Bu su kaybı yaprakları soğutur. Bitkiler su kıtlığı ile karşı karşıya kaldıklarında vücut sıcaklıklarını koruyamazlar (Adams vd., 2009). Su stresi koşulları altında, bitkinin bağıl büyüme oranı düşer ve bitki boyu da azalmaktadır (Lipiec vd., 2013). Su eksikliği bitkilerin büyümesini, yaprakların yüzey alanını, kuru maddeyi azaltır; ayrıca hücre zarının bozulmasına, pigmentlerin hasar görmesine, klorofil içeriğinin azalmasına ve kök büyümesinin zarar görmesine neden olur Kuraklık stresinde bitkisel dokular da zarar görür ve uzun süreli kuraklık altında ölür (Farooq vd., 2009).

Bitkilerdeki su stresi, bitki hücresinin su potansiyelini ve turgorunu azaltır, bu da sitozol ve hücre dışı matrislerdeki çözünen madde konsantrasyonlarını artırır. Sonuç olarak, hücre büyümesi azalır, bu da büyümenin engellenmesine ve üreme yetmezliğine yol açmaktadır.

Bunu solmaya neden olan absisik asit (ABA) ve prolin gibi uyumlu osmolitlerin birikimi izler. Bu aşamada, ROS'ların aşırı üretimi, askorbat ve glutatyon gibi radikal süpürücü bileşiklerin oluşumu gerçekleşmektedir. Kuraklık sadece su içeriğini, turgoru ve toplam suyu azaltarak bitki su ilişkilerini etkilemekle kalmaz, aynı zamanda stomaların kapanmasını etkiler, gaz değişimini ve terlemeyi azaltır ve karbon asimilasyon (fotosentez) oranlarını durdurur (Lisar vd., 2012).

Fotosentez bitkiler için en önemli süreçtir. Fotosentez sürecindeki azalma nedeniyle bitki verimliliği de azalmaktadır (Zargar vd., 2017). Su eksikliğinden dolayı bazı türlerin yaprakları mavi-yeşile döner (Saleska vd., 2007). Bitkiler için uzun bir süre su yoksa yaprak döken bitkiler solar ve önemli ölçüde yapraklarını kaybeder ve bunun sonucunda bitkiler ölür. Yaprakların içindeki su basıncı azaldığı ve bitkiler solmaya maruz kaldığı için su stresinin başlangıçta fark edilen belirtisi solmadır (Zeppel vd., 2015).

Sorgumda yapılan bir çalışmada, kuraklık stresinin klorofil miktarını olumsuz etkilediği, bitkinin vegetatif döneminde kontrol bitkilerine oranla %38 oranında azalma olduğu, bitkinin yaşlı döneminde bu oranın %62'yi bulduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar, fotosentetik pigmentlerin kuraklık stresinden olumsuz etkilenmesi sonucu klorofilin tüm bitki aşamasında azaldığını ifade etmişlerdir (Oliveira Neto vd., 2009).

Aydın vd. (2016), buğdayda (*Triticum aestivum* L.) PEG 6000 konsantrasyonu, diğer bir ifadeyle kuraklığın şiddeti artıkça kök sayısı, kök uzunluğu, koleoptil uzunluğu, sürgün uzunluğu ve hücre bölünmesinin önemli derecede azaldığını bildirmiştir.

Farklı PEG (0, 30 ve 60 g/L) konsantrasyonlarında yetiştirilen pamuk bitkisinde artan PEG konsantrasyonu ile sağlanan kuraklık stresinin bitki gelişimi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bitkiler yaş ağırlık bakımından kontrol bitkilerine oranla %27-42 oranlarında kayıplar gösterirken, kuru ağırlık bakımından %11-20 oranında bir azalma belirlenmiştir. Ayrıca nispi büyüme oranı, stoma geçirgenliğinde ve net fotosentez oranında da kontrol bitkilerine oranla kayıplar ortaya çıkmıştır (Fernández-Conde vd., 1998).

Buğdayda 7 gün, bezelyede ise 10 gün süresince %10 PEG 6000 uygulamasıyla oluşturulan kuraklık stresinde her iki türde de yaş ve kuru ağırlıkta kontrol bitkilerine göre kayıplar gözlenirken, yaprak su içeriğinde de azalma meydana gelmiştir (Alexieva vd., 2001).

Serada yapılan bir kuraklık çalışmasında, *Phaseolus vulgaris* ve *Sesbania aculeata* türleri kullanılmıştır. Kuraklık uygulamasında %60 kısıtlı sulama, kontrol bitkilerinde ise %100 tarla kapasitesinde sulama gerçekleştirilmiştir. Stres uygulamasından 45 gün sonra hasat edilen bitkilerde her iki türde de gövde yaş ve kuru ağırlıkları, kök yaş ve kuru ağırlıkları, yaprak alanı ve gövde boyu kuraklık stresi sonucu kontrol bitkilerine oranla azalma göstermiştir. Araştırmacılar yapraklarda klorofil a ve b ile a/b oranlarının stres koşullarında kontrol bitkilerine göre önemli bir fark oluşturmadığını bildirmişlerdir (Ashraf ve Iram, 2005).

Artan PEG konsantrasyonları ile iyon sızıntısı oranındaki artış, bitki hücre zarındaki hasarın bir göstergesidir. Su stresi iyonların ortamdaki kaçmasına neden olarak hücre zarlarına zarar vermektedir. Hücre zarının sağlamlığının ve bütünlüğünün bir göstergesi olan iyon sızıntısı, bitkinin kuraklığa karşı direncinin gösterilmesinde de önemli bir parametre olarak kullanılmaktadır. İyon sızıntısı miktarının belirlenmesi doku hasarını ortaya çıkarmaktadır. Maldonado vd. (1997), şiddetli su stresinin (-2.0 MPa), kuraklığa orta derecede dirençli olduğu bilinen yulaf bitkisinin (*Avena sativa*) yaprak hücrelerinde iyon sızıntısını önemli ölçüde artırdığını bildirmişlerdir. Liu vd. (2011) kuraklık sırasında aspire edilen iyon kaybı oranının kontrole kıyasla önemli ölçüde arttığını tespit etmişlerdir.

Hücre zarındaki fosfolipitler, hücre zarında bulunan doymamış yağ asitlerinin oksijen ile oksidasyonu ile parçalanmaktadır. Lipid peroksidasyonu olarak bilinen bu fenomenin bir sonucu olarak hücre zarlarının bütünlüğü bozulur. Lipid peroksidasyonu, hücre zarındaki fosfolipidlerin parçalanmasıyla üretilen malondialdehit miktarı ölçülerek hesaplanır ve büyük miktarlarda malondialdehit (MDA) tespiti, hücre zarına verilen hasarın da büyük olduğu anlamına gelir (Dhindsa ve Mathowe, 1981). Bu nedenle MDA değişikliği, kuraklık gibi abiyotik stres olaylarının önemli bir göstergesidir (Moller vd., 2007). Kuraklık stresi, membran lipidleri ve proteinler arasındaki ilişkinin yanı sıra enzimlerin aktivitesini ve membranların taşıma kapasitesini de bozabilmektedir.

Kuraklık, yağ asidi bileşiminin değişmesine, örneğin kloroplastlarda 16'dan daha az karbona sahip yağ asitlerinde bir artışa neden olmaktadır. Lipid peroksidasyonu, kuraklığın ve diğer birçok çevresel stresin oksidatif hasar yoluyla iyi bilinen etkisidir (Lisar vd., 2012).

11 nohut ve 6 mercimek çeşidinin kuraklığa tolerans mekanizmasının araştırıldığı çalışmada, bitkilerin kuraklık stabilite indeksleri (KHI) belirlenmiş ve KHI ile oksidatif strese göstermiş oldukları tepkiler veya tolerans mekanizmaları, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oluşumu, lipid peroksidasyonu ve buna bağlı olarak membranlarında oluşan zararlanmalar protein ve askorbik asit akümüasyonu ile açıklanmıştır (Gunes vd., 2006).

Üzümlerde kuraklık stresi altında MDA içeriğinde bir artış olduğu birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Gunes vd., 2006; Catola vd., 2016; Yuan vd., 2017; Topcu ve Altıncı, 2019).

Karbonhidrat, su, protein, yağlar ve vitaminler, bitkinin daha iyi büyümesinden sorumlu olan bileşenlerdir. Birbirleriyle bağlantılıdır ve bu yüzden herhangi birindeki eksiklikler bitki mekanizmasını etkilemektedir (Fang ve Xiong, 2015). Kuraklık stresi, bitkilerin metabolik sürecini etkiler ve kuraklık stresine karşı koruyucu olan ikincil metabolitleri arttırmaktadır (Walter vd., 2012). Toleranslı bitki türlerinde artan kuraklık stresi ile çözünebilir protein miktarının arttığı, buna karşılık hassas bitkilerde ise azaldığı, çözünebilir protein miktarındaki azalmanın bitki yapısını değiştirdiği bildirilmiştir (Wehner vd., 2015).

Prolin, membran stabilizasyonu için bir ozmoprotektan olarak hareket ederek stresli koşullar altında su içeriğini korumak için bitkilerde bildirilen başlıca organik çözünen maddelerden biridir (Kishor vd., 2005). Bitkilerin dengeli çalışması için su dengesi ve prolin sentezi çok önemlidir. Su eksikliği nedeniyle suda çözünürlüğün azalması için prolin konsantrasyonu artmaktadır (You vd., 2012). Sitoplazmada prolin birikimi, bitkilerin kuraklık stresiyle karşı karşıya olduğunu göstermektedir. Protein, bitki yapıları kadar hücre için de önemlidir ve bitkilerde protein sentezi için prolin gereklidir. Toleranslı bitkilerde kuraklık stresi arttıkça prolin sentezi artmakta ve kuraklık stresinin neden olduğu yapı denatürasyonuna karşı direnç sağlamak ve bitki hücre yapıları, protein sentezinden sorumlu olan prolin tarafından korunmaktadır (Xoconostle-Ca'zares vd., 2010).

Türkiye'de yetişen önemli şaraplık üzüm çeşitleri (Narince, Sultani çekirdeksiz, Öküzgözü, Boğazkere, Çalkarası ve Emir) üzerinde yüksek sıcaklık ve kuraklık stresine maruz kalan bitkilerde prolin, MDA, hücre zarı zararlanma oranı incelenmiştir. Yüksek sıcaklıklarda ve PEG uygulanarak oluşturulan kuraklık stresinde prolin ve MDA'da artışlar bulunmuştur (Altıncı, 2016).

Antioksidan enzimler, bitkileri aktif oksijen kaynaklı hasarlardan koruyan (Anjum vd., 2011) ve bitki hücrelerinin normal işlevini sağlayan bir savunma sistemidir (Horvath vd., 2007). Temel olarak, kuraklık stresi altında, bitkilerde ROS üretimi ile antioksidan enzimlerin aktivitesi arasındaki denge, bitki hasarının boyutunu belirlemektedir (Moller vd., 2007). Bitkiler ayrıca, bitkinin fotosentetik membranlarının oksidatif stresle savaşma yeteneğini düzenleyen enzimatik olmayan bir antioksidan savunma sistemine sahiptir (Anjum vd., 2011). Bitkilerde ROS türlerini nötralize etme etkisine sahip en yaygın enzimatik antioksidanlar süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve peroksidazdır (PRX) (Apel ve Hirt, 2004). Bu antioksidanların, oluşan oksijen ve peroksitlerin tamamen yok edilmesinde rol oynadıkları bilinmektedir (Apel ve Hirt, 2004; Anjum vd., 2011). SOD,  $O_2^-$ 'yi katalize etme, indirgeme ve ardından onu PRX yoluyla atılan  $H_2O_2$ 'ye dönüştürme yeteneğine sahiptir. Bu durum, antioksidanların bitkilerde oksidatif kuraklık stresine karşı direnci nasıl uyardığını gösterir (Anjum vd., 2011).

Fu-Fan vd. (2014), hıyar fidelerinin (*Cucumis sativus* L.) köklerinde kısa süreli su stresinin neden olduğu değişiklikleri inceledikleri çalışmalarında stres grubu bitkilere %5 ve %10 PEG uygulamışlardır. Uygulamadan 0, 12, 24 ve 36 saat sonra bitkilerden alınan kök örneklerinde yapılan analizlerde özellikle 36 saat sonunda her iki kuraklık stresinde de  $O_2^-$  ve  $H_2O_2$  içeriğinin ve MDA miktarının önemli ölçüde arttığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar, SOD, PRX, CAT ve APX aktivitelerinin kuraklık stresinde bir artış gösterdiğini ve bu antioksidan enzimlerin, kısa süreli su kıtlığının neden olduğu oksidatif hasara karşı korunmada önemli bir rol oynadığını belirtmişlerdir.

Çeltik bitkisinde yapılan bir çalışmada, PEG 6000 koşullarında yetiştirilen bitkilerde stres uygulamasından 24 saat sonra yapraklarda APX enzim aktivitesinin arttığı, APX'in  $H_2O_2$ 'nin zararlı etkilerinin engellenmesinde önemli olduğu bildirilmiştir (Sharma ve Dubey 2005).

Çilekte yapılan bir çalışmada yüksek sıcaklığa hassas (Festival ve CG3) ve tolerant (Redlands Hope ve Camarosa) çeşitlere ait sekiz haftalık bitkilere 15 gün boyunca %10'luk PEG uygulanmıştır. Çalışmanın sonucunda yüksek sıcaklığa toleranslı olan çeşitlerin aynı zamanda kuraklığa da toleranslı olduğu ve çeşitlerin kuraklığa toleransında APX ve glutatyon redüktaz (GR) enzimlerinin önemli rol oynadığı bildirilmiştir (Gulen vd., 2018).

Beş farklı dut çeşidi üzerinde yapılan bir çalışmada, kontrol bitkileri tam olarak sulanmış, stres bitkileri ise -2,5 MPa'ya kadar kuraklık stresine maruz bırakılmıştır. Stresin SOD, CAT, APX, PRX ve monodehidroaskorbat redüktaz (MDAR) enzimlerinin aktivitesini tüm çeşitlerde farklı oranlarda artırdığı bildirilmiştir. Toleranslı olduğu düşünülen çeşitlerde lipid peroksidasyon oranları azalırken, glisinbetain (GB), ABA ve prolin miktarının arttığı, çeşitlerin kuraklık toleransının belirlenmesinde enzim aktivitesindeki değişim oranının önemli bir seçim kriteri olabileceği belirtilmiştir (Reddy vd., 2004).

Kuraklık stresinin iki nohut (*Cicer arietinum* L.) çeşidinde kuraklık stresinden kaynaklanan oksidatif hasarın giderilmesinde antioksidan enzim aktivitelerinin rolünü belirlemek amacıyla yapılan çalışmada, toprak kültüründe yetiştirilen 20 günlük 2 nohut çeşidine ait bitkiler sulama yapılmaksızın 0 (kontrol), 3, 5 ve 7 günlük kuraklık periyoduna maruz bırakılmıştır. Kuraklık uygulamaları sonunda, artan kuraklık stresine bağlı olarak her iki çeşidin membranlarında oluşan MDA içeriğinin arttığı ve bu artışın oksidatif hasarın bir göstergesi olduğu bildirilmiştir. Bitkilerde oksidatif hasara karşı oluşturulan savunma sistemlerinden biri olan antioksidan enzim (SOD, PRX, APX ve GR) aktiviteleri nohut çeşitlerinde kuraklık uygulamaları ile genel olarak artış göstermiş, ancak çeşitler arasında enzim davranışları bakımından belirgin farklılıklar ortaya çıkmadığı belirlenmiştir (Kalefetoğlu ve Ekmekçi, 2005).

Kuraklığa duyarlı *Phaseolus vulgaris* L. ile kuraklığa toleranslı *P. acutifolius* fidelerine 14 gün boyunca 0.40 MPa ozmotik potansiyel altında PEG 6000 uygulanmıştır. *P. vulgaris*'te *P. acutifolius*'a göre vegetatif gelişmenin daha az olduğu, kök ve gövde kuru ağırlığında azalma olduğu saptanmıştır. *P. acutifolius* bitkisindeki oransal su içeriğinde herhangi bir değişiklik olmazken *P. vulgaris*'te azalma olduğu görülmüştür. Yine *P. acutifolius*'taki lipid peroksidasyon miktarı *P. vulgaris*'ten düşük bulunmuştur.

SOD, CAT, APX ve PRX gibi enzimlerin aktivitelerinin *P. acutifolius*'ta *P. vulgaris*'ten daha yüksek olduğu; SOD, APX ve GR aktivitesinin ise su stresi şartlarında arttığı saptanmıştır (Türkan vd., 2005).

Kuraklık stresine karşı toleranslı *Lycopersicon chilense* ve duyarlı olduğu bilinen *L. esculentum* Mill. domates türlerinde 5 günlük kuraklık stresi uygulaması sonrasında kök, gövde uzunluğu, yaprak oransal su içeriği, lipid peroksidasyon miktarı ve antioksidan enzim aktivitelerinde meydana gelen değişimler incelenmiştir. Yapılan analizler sonucunda kuraklığa toleranslı olarak bilinen türde stres sonunda yaprak oransal su içeriğinin ve MDA miktarının azalmasına karşın ASA miktarında, SOD ve APX enzim aktivitelerinde artışlar olduğu belirlenmiştir (Güzel, 2006).

Yonca (*Medicago sativa* L.) bitkisinde kuraklık ve tuz stresi ile ilgili yapılan çalışmada, yonca bitkisinin kurağa (%35 PEG) ve tuza (200 mM) maruz bırakılmış kök ve sürgünlerinde SOD, PRX, APX ve CAT gibi çeşitli antioksidan enzimlerin aktiviteleri araştırılmıştır. Strese tolerant olan Xinmu No.1 çeşidinde, hassas olan Northstar'a göre daha düşük seviyede H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üretimi ve lipid peroksidasyonu, köklerde ve sürgünlerde ise daha yüksek enzim aktivitesi (SOD, APX, CAT ve PRX) görülmüştür. Xinmu No.1 çeşidinin gösterdiği kuraklık ya da tuza toleransın, antioksidan enzimlerin aktivitesi ile ilişkilendirilebileceği belirtilmiştir (Wang vd., 2009).

Hint fıstığı (*Jatropha curcas*) bitkilerinde yapılan bir çalışmada bitkilerin kuraklık stresinde gösterdikleri bazı fizyolojik, biyokimyasal ve antioksidan enzim aktivitesi değişimleri incelenmiştir. Sonuç olarak kuraklık stresinde net fotosentez ve stoma iletkenliğinin azaldığı, stresteki bitkilerde SOD, CAT, APX aktiviteleri ile glutatyon (GSH) ve MDA miktarlarının önemli ölçüde arttığı bulunmuştur (Pompelli vd., 2010).

Babalık vd., (2015), Kober 5 BB Amerikan asma anacının su stresi altında bazı fiziksel ve biyokimyasal özelliklerini incelemişlerdir. *In vitro* bitkiciklerde kuraklık stresi oluşturmak için besin ortamına %0, -1,2 -2,4 -3,6 ve -4,8 olmak üzere 5 farklı konsantrasyonda PEG ilave edilmiştir. Farklı oranlarda PEG içeren ortamlarda yetiştirilen *in vitro* sürgünlerde artan kuraklıkla birlikte CAT ve APX gibi antioksidan enzim aktivitelerinin arttığı tespit edilmiştir.



Perez-Clemente vd.'nin (2012) yapmış oldukları çalışmada, Carrizo portakal anacına 10, 20 ve 30 gün boyunca %20 ve %40 PEG uygulanarak bitkiler üzerinde kuraklık stresi oluşturulmuş ve strese bağlı olarak meydana gelen prolin, jasmonik asit, salisilik asit, absisik asit düzeyleri ile MDA, SOD, CAT ve APX enzim aktivitelerindeki değişimler incelenmiştir. Analiz sonucunda, CAT dışındaki tüm parametrelerde, stres şiddeti ve süresi arttıkça düzenli bir artış olduğu ve bu artışın 30. günde maksimum seviyeye ulaştığı tespit edilmiştir. Öte yandan stresin 20. gününde CAT enziminin aktivitesinde hafif bir artış olduğu, ilerleyen günlerde ise azaldığı tespit edilmiştir.

Beş farklı fıstık (*Pistacia vera*) çeşidinde bazı organik metabolitlerin ve antioksidan savunma sistemlerinin kuraklık stresine tepkisininin araştırıldığı çalışmada sera koşullarında yetiştirilen fidanlar, 3, 6 ve 9 gün boyunca su stresine maruz bırakılmıştır. En yüksek prolin, GB ve antosiyanin birikimi Sarakh'ta bulunmuştur. Tüm çeşitlerde, SOD ve CAT aktivitesi önce artmış, sonra uzayan su stresi ile azalmıştır. Polifenol oksidaz (PPO) aktivitesi 6 gün boyunca sabit kaldıktan sonra 9. günde yükselmiştir. Sarakhs ve Badami çeşitlerinde yüksek düzeyde antioksidan enzim aktivitesi bulunmuştur. Sonuç olarak, Badami ve Sarakhs çeşitlerinin, ozmotik adaptasyonları ve antioksidan savunmaları nedeniyle diğer çeşitlere göre kuraklık stresine daha dirençli oldukları görülmüştür. Ayrıca toleranslı çeşitlerin tanımlanmasında prolin, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, CAT ve PPO gibi fizyolojik parametrelerin markör olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (Lotfi vd., 2015).

İki farklı ticari domates çeşidinde (*Lycopersicon esculentum*) yapılan çalışmada 7 günlük kuraklık stresinin oksidatif stresi indükleyerek birçok metabolik yolu etkilediği ve dolayısıyla MDA, SOD, CAT ve APX gibi antioksidan enzimlerin aktivitesini arttırdığı belirtilmiştir (Çelik vd., 2017).

Kutlu, vd. (2017), kuraklık stresi altında ekmeklik buğday genotiplerinin verim bileşenleri ve enzim aktivitelerini araştırmışlardır. Deneme 9 ekmeklik buğday çeşidi ve 7 double haploid buğday genotipi ile yürütülmüştür. Stres duyarlılık indeksi (SSI) hesaplanarak enzim aktiviteleri ile verim bileşenleri arasındaki ikili ilişkiler belirlenmiştir. Kuraklık stresine maruz kalan bitkilerde ortalama CAT aktivitesi önemli ölçüde artarken, GR aktivitesinin etkilenmediği bildirilmiştir.

Zhang ve Shi (2018), yapmış oldukları bir çalışmada kuraklığa toleranslı (Longzhong) ve duyarlı (Gannong No. 3) iki yonca (*Medicago sativa* L.) genotipine 15 gün boyunca PEG aracılığıyla kuraklık stresi uygulaması gerçekleştirerek bitkilerin strese karşı gösterdikleri tepkileri fizyolojik olarak ve protein düzeyinde incelemişlerdir. Kuraklık stresinin 0, 3, 6, 9, 12 ve 15. günlerinde alınan kök örneklerinde yapılan analizler sonucunda, her iki genotipte de prolin, MDA, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, OH<sup>-</sup> ve O<sub>2</sub><sup>-</sup> seviyelerinin artış gösterdiğini; çözünebilir protein, PRX, CAT ve APX enzimlerinin aktivitelerinin ise stres uygulamasının ilk günlerinde arttığını ancak daha sonra azaldığını gözlemlemişlerdir. Ayrıca, ozmotik stres altında, Longzhong genotipinde Gannong No.3 genotipine kıyasla daha düşük düzeyde MDA, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, OH<sup>-</sup> ve O<sub>2</sub><sup>-</sup> birikimi olduğunu, SOD, CAT, APX enzim aktivitelerinin ise daha yüksek seviyelerde olduğunu belirtmişlerdir.

Datir ve Inamdar (2019), yapmış oldukları çalışmada PEG 6000 ile oluşturulan kuraklık stresi sırasında buğday çeşitlerinin biyokimyasal parametrelerini incelemişlerdir. Araştırma sonucunda prolin ve MDA miktarı ile CAT, SOD ve PRX enzim aktivitelerinde kontrole oranla artış olduğunu, fakat APX aktivitesinde düzenli bir eğilim olmadığını belirlemişlerdir.

Aljema (2020), kontrolsüz sera koşullarında kuraklık stresi ve iyileşme uygulamalarının bazı *Pistacia* genotiplerindeki morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal özellikler ve bazı antioksidan enzim aktiviteleri üzerine etkilerini incelemiştir. Uygulamada bitkiler kuraklığa maruz bırakılıp yapraklarda solma belirtisi olana kadar sulama kesilmiş, daha sonra iyileşme uygulaması için bitkilere 1 hafta boyunca düzenli olarak sulama yapılmıştır. Kuraklık stresi kontrol bitkilerine göre yaprak oransal su içeriğinin azalmasına, membran geçirgenliğinin, prolin ve MDA miktarının artmasına neden olmuştur. Antioksidan enzim aktivitelerinden SOD, PRX ve CAT aktivitelerinin arttığı bildirilmiştir.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

Yapılan çalışma, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü serasında ve bölüm laboratuvarlarında yürütülmüştür.

#### Bitki materyali

Çalışmada *Cucumis sativus* L. Beit alpha hıyar çeşidi tohumları kullanılmıştır. Beit alpha hıyar çeşidinin meyveleri koyu yeşil ve silindirik yapıdadır. Meyve uzunluğu 15-17 cm olup çok lezzetli, hoş kokulu ve az çekirdeklidir. Sürgün verme kabiliyeti yüksektir. Ekimden itibaren 60-70 günde hasada gelir (Guan vd., 2019).

Torf ile doldurulmuş 45'lik (52x32cm) viyollere tohum ekimi yapılmıştır ve fideler yaklaşık 3 yapraklı aşamaya gelene kadar viyollerde büyütülmüştür. Daha sonra bu fideler perlit, torf ve elenmiş bahçe toprağı karışımı içeren (1:1:1) 14x12 cm büyüklüğündeki saksılara dikilmiştir (Şekil 3.1). Fideler 5-6 yapraklı döneme gelinceye kadar ortalama 6-8 hafta boyunca, ~%65 oransal nemde, 18-30°C (gece-gündüz) sıcaklıkta serada yetiştirilmiştir (Anonim, 2015) ve her hafta düzenli olarak NPK (5:5:5) gübre çözeltisi ile gübrenilmiştir.



Şekil 3.1. Serada yetiştirilen viyollerdeki (a) ve saksıya alınmış (b) hıyar fidelerinin genel görünümü.

### 3.2. Yöntem

Sera ortamında, saksıda yetiştirilen hıyar bitkilerinde yapay kuraklık oluşturmak amacıyla PEG 6000 kullanılmıştır. Bu amaçla, bitkilere 15 gün boyunca %10'luk (0,40 MPa) PEG 6000 çözeltisi sulama suyu uygulaması şeklinde verilmiştir (Türkan vd., 2005). Kontrol bitkileri ise çeşme suyu ile sulanmıştır. Tüm bitkilere eşit oranda uygulama yapılarak, bitkiler saksı kapasitesinde tutulmaya çalışılmıştır. Uygulamanın beşinci ve onbeşinci günlerinin sonunda, uygulama yapılan bitkilerden ve kontrol grubundan yaprak örnekleri alınmış örneklerin bir kısmı MDA, YOSK ve TK analizleri için kullanılmıştır. Geri kalan yaprak örnekleri ise sonraki analizler için -80°C'de saklanmıştır.

#### 3.2.1 Lipid peroksidasyonunun (MDA miktarı) belirlenmesi

Hücrelerde lipid peroksidasyonu sonucu oluşan MDA (Malondialdehyde) miktarı Rajinder vd.'nin (1981) yöntemi esas alınarak belirlenmiştir. Ekstraksiyon işlemi için, porselen havanlara kum ve polivinilpoliprolidon (PVPP) eklenmiştir ardından ~100 mg yaprak örneği üzerine %0,1'lik 5 ml triklorasetikasit (TCA) çözeltisi ilave edilerek homojenizasyon yapılmıştır. Meydana gelen homojenatlar, 4°C'de 10000 g'de 5 dakika santrifüj (Beckman Coulter Allegra 64R and Avanti 30 Compact Centrifuges, ABD) edilmiştir. Santrifüjden sonra üst fazdan 300 µl alınarak 1,5 ml'lik mikro santrifüj tüplerine aktarılmıştır ve üzerine 1200 µl ekstraksiyon çözeltisi [Thiobarbutrik asit (TBA) + %100 TCA+ dH<sub>2</sub>O] eklenmiştir. Kör örneğin (blank-şahit) hazırlanması için, 300 µl %0,1 TCA ve 1,2 ml'lik ekstraksiyon çözeltisi kullanılmıştır. Örnekler 95°C'de ısıtıcı bloğa (MBT 250, ETG, Almanya) yerleştirilerek 30 dakika bekletilmiştir. Isıtıcı bloktan çıkarılan tüpler 5 dakika boyunca oda sıcaklığına gelmesi için buz içerisinde bekletildikten sonra 25°C'de 10 dakika 10000 g'de santrifüj edilmiştir. Santrifüjden çıkarılan örnekler, spektrofotometrede (Perkin Elmer Lambda 25 UV/VIS, ABD) 532 ve 600 nm dalga boylarında okunmuştur. Yapılan analizle belirlenen MDA miktarı aşağıdaki formülle hesaplanmıştır:

$$\text{MDA (nmol/g T.A)} = \text{O.D farkı} \times 32,2 \times \text{seyreltme faktörü} / \text{g T.A}$$

O.D farkı = 532 ve 600 nm dalga boyunda okunan değerlerin farkı

T.A = Taze ağırlık

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

Kuraklık stresine maruz bırakılan hıyar bitkilerinde, YOSK ve TK, Gülen ve Eriş'in (2003) yöntemiyle belirlenmiştir. Alınan yaprak örneklerinden 1,5 cm çaplı diskler çıkartılarak öncelikle taze ağırlıkları, 4 saat saf suda bekletildikten sonra turgor ağırlıkları ve 70°C'deki etüvde 48 saat tutulduktan sonra kuru ağırlıkları kaydedilmiştir. Elde edilen verilere bağlı olarak YOSK ve TK hesaplanarak değerler % olarak ifade edilmiştir. Yaprak oransal su kapsamı ve turgor kaybı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\text{YOSK} = ( \text{Y.A} - \text{K.A} ) / ( \text{T.A} - \text{K.A} ) * 100$$

$$\text{TK} = ( \text{T.A} - \text{Y.A} ) / \text{T.A} * 100$$

YOSK = Yaprak oransal su kapsamı

Y.A = Yaş Ağırlık

TK = Turgor kaybı

K.A = Kuru Ağırlık

T.A = Turgor Ağırlığı

### 3.2.3. Prolin miktarının belirlenmesi

Prolin ekstraksiyonu ve prolin miktarı Bates vd.'nin (1973) geliştirdiği yöntem ile belirlenmiştir. Reaksiyon, prolin aminoasidinin ninhidrinle renk tepkimesi vermesi sonucu pembe renkli bileşik oluşturması esasına dayanır. Ekstraksiyonda %3'lük sülfosalisilik asit kullanılmıştır, prolin miktarının belirlenmesi için kullanılan ninhidrin reaktifi aşağıda verildiği gibi bir gece önceden hazırlanmış ve 4 °C'de dinlenmeye bırakılmıştır.

1,25 g ninhidrin + 30 ml glasiyel asetik asit + 6 M 20 ml fosforik asit

Bitki örneklerinden 200 mg alınarak 1 ml % 3'lük sülfosalisilik asit ile havanda ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. Homojenize edilen örnekler 1,5 ml'lik santrifüj tüplerine alınarak 5000 g'de 4 °C'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra üstteki sıvı fazdan 100 µl alınarak 2 ml'lik santrifüj tüplerine aktarılmıştır.

Örneklerin üzerine 200 µl ninhidrin reaktifi, 200 µl glasiyel asetik asit ve 100 µl %3'lük sülfosalisilik asit ilave edilerek örnekler iyice karıştırılmıştır. Hazırlanan örnekler 100 °C'de 1 saat boyunca tepkimenin gerçekleşmesi için inkübe edilmiştir ve inkübasyondan çıkarılan örnekler reaksiyonun sonlandırılması için hemen buz banyosuna alınmıştır. 5 dakika buz banyosunda soğutulan örnekler buz içerisinden alınıp oda sıcaklığına geldikten sonra üzerlerine 1 ml toluen ilave edilmiş ve iyice karıştırılıp 4000 g'de 20 saniye santrifüjlenmiştir. Santrifüjden sonra üstteki sıvı fazın tamamı alınarak okumalar cam küvetler kullanılarak spektrofotometrede 520 nm'de gerçekleştirilmiştir. Kör örnek olarak 1 ml toluen kullanılmıştır. Prolin miktarının hesaplanmasında 0-800 µM prolin içeren standartlar hazırlanmıştır ve çizilen standart eğrisinden prolin miktarları hesaplanmıştır.

$$\text{Prolin miktarı (}\mu\text{M / g TA)} = [(A - 0,046 \mu\text{M}) / 0,00069] / \text{g TA}$$

TA: Taze ağırlık

A: 520 nm dalga boyundaki absorbans değeri

### 3.2.4 Askorbatperoksidaz (APX, EC.1.11.1.11) analizi

#### Askorbatperoksidaz (APX) ekstraksiyonu

APX ekstraksiyon işleminde Nakano ve Asada'nın (1980) yöntemi esas alınarak, bazı değişikliklerle hıyar yaprak örneklerine adapte edilmiştir. Yaprak örneklerinden 1 g alınarak havanlara konmuştur ve üzerlerine ekstraksiyon için aşağıdaki şekilde hazırlanmış ekstraksiyon çözeltisinden 5 ml ve eser miktarda PVPP ile kuvars kum ilave edilerek homojenize edilmiştir. Tüm aşamalar 4°C'de gerçekleştirilmiştir. Homojenize edilen örnekler, 1,5 ml'lik santrifüj tüplerine alınarak 10000 g'de 4°C'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra üstteki sıvı faz 1,5 ml'lik santrifüj tüplerine aktarılarak aktivite belirlenmesinde kullanılmıştır.

APX ekstraksiyon çözeltisi için kullanılan çözeltiler:

- 50 mM K-PO<sub>4</sub> çözeltisi, pH 7,8    100 ml
- 50 mM askorbik asit çözeltisi    2 ml

### Askorbatperoksidaz (APX) enzim aktivitesinin belirlenmesi

APX enzim aktivitesinin belirlenmesinde aşağıdaki stok çözeltiler kullanılmıştır. Askorbat ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltileri analiz esnasında taze olarak aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır.

- 50 mM reaksiyon çözeltisi K-PO<sub>4</sub>, pH 7,0
- 5 mM askorbat çözeltisi
- 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisi

Enzim aktivite ölçümleri, spektrofotometrede 290 nm dalga boyunda kuvars küvet kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Aktivite ölçümleri 90 saniye süreyle 10 saniye aralıklarla gerçekleştirilmiş ve 10. ve 90. saniyedeki okuma değerleri kullanılmıştır.

Kör örneklerin okumasında kullanılan çözelti aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır.

950 µl reaksiyon çözeltisi + 75 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 100 µl askorbat çözeltisi

Örneklerin enzim aktivitesinin belirlenmesi için kullanılan çözelti aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır.

900 µl reaksiyon çözeltisi + 75 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 100 µl askorbat çözeltisi + 50 µl örnek

### Askorbatperoksidaz (APX) enzim aktivitesi hesaplanması

APX enzim aktivitesinin hesaplanmasında enzim aktivite değeri belirlenmiş ve toplam protein miktarı ile oranlanarak µmol/mg protein olarak ifade edilmiştir. Enzim aktivite miktarının hesaplanmasında spektrofotometre okumaları sırasında belirlenen aktivite değerlerinde öncelikle aktivite ve net aktivite değerleri belirlenmiştir.

Aktivite: 2. OD- 1.OD

1. OD: 10. Sn absorbans

2. OD: 90. Sn absorbans

Net Aktivite Değeri: Aktivite- kör okuma (blank)

Bu şekilde belirlenmiş olan net aktivite değerleri kullanılarak enzim aktivite değeri aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$AD (\mu\text{mol/gTA}) = [NA \times SD \times (SF / \ddot{O}M)] / 1000$$

AD: Aktivite değeri ( $\mu\text{mol/gTA}$ )

TA: Taze ağırlık NA: Net aktivite değeri

SD: Standart değer (803,25)

SF: Örnek seyreltme faktörü

ÖM: Örnek miktarı (mg)

Bu formüle göre hesaplanan aktivite değerleri, toplam protein miktarı ile oranlanarak spesifik enzim aktivitesi belirlenmiştir.

$$APX (\mu\text{mol/mg protein}) = AD (\mu\text{mol/gTA}) / \text{TPM}$$

APX: Askorbatperoksidaz

AD: Aktivite değeri ( $\mu\text{mol/gTA}$ )

TA: Taze ağırlık

TPM: Toplam protein miktarı (mg protein/gTA)

### 3.2.5. Katalaz (CAT, EC 1.11.1.6) analizi

#### Katalaz (CAT) ekstraksiyonu

Nakano ve Asada'nın (1980) yöntemine göre CAT ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon için  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan yaprak örneklerinden 0,5 g alınarak havanlara konulmuştur, aşağıdaki şekilde hazırlanan ekstraksiyon çözeltisinden 5 ml ve çok az miktarda PVPP ile kuvars kum eklenerek örnekler homojenize edilmiştir. Tüm aşamalar  $4^{\circ}\text{C}$ 'de gerçekleştirilmiştir.



Homojenize edilen örnekler, 15 ml'lik santrifüj tüplerine alınarak 760 g'de 4°C'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra üstteki sıvı faz 1,5 ml'lik santrifüj tüplerine aktarılarak aktivite belirlenmesinde kullanılmıştır.

CAT ekstraksiyon çözeltisi için kullanılan çözeltiler aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır.

- 0,1 M K-PO<sub>4</sub> çözeltisi, pH 7,0 200 ml
- Triton 200 µl (Toplam hacimde %0,1 oranında)

### **Katalaz (CAT) enzim aktivitesinin belirlenmesi**

CAT aktivitesi 260 nm'de ( $E = 39,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin parçalanma oranı esas alınarak belirlenmiştir. CAT enzim aktivitesinin belirlenmesinde aşağıdaki stok çözeltiler kullanılmıştır. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisi okuma sırasında taze olarak aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır.

- 0,1 M K-PO<sub>4</sub> çözeltisi, pH 7,0 200 ml
- 0,1 M EDTA 200 µl (toplamda hacimde 0,1 mM)
- 150 mM 330 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisi

Enzim aktivite ölçümleri, spektrofotometrede 260 nm dalga boyunda kuvars küvet kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Aktivite ölçümleri 60 saniye süreyle 10 saniye aralıklarla gerçekleştirilmiş ve 10. ve 50. saniyedeki okuma değerleri kullanılmıştır. Kör örneklerin okumasında kullanılan çözelti aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır.

600 µl reaksiyon çözeltisi + 500 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Örneklerin enzim aktivitesinin belirlenmesi için kullanılan çözelti miktarları aşağıda verilmiştir.

500 µl reaksiyon çözeltisi + 500 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 100 µl örnek

### Katalaz (CAT) enzim aktivitesi hesaplaması

CAT enzim aktivitesinin hesaplanmasında enzimin aktivite değeri belirlenmiş ve toplam protein miktarı ile oranlanarak  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  protein olarak ifade edilmiştir. Enzim aktivite miktarının hesaplanmasında spektrofotometre okumaları sırasında belirlenen aktivite değerlerinde öncelikle aktivite ve net aktivite değerleri belirlenmiştir.

$$\text{Aktivite} = 2. \text{OD} - 1. \text{OD}$$

1. OD: 10. sn absorbans

2. OD: 50. sn absorbans

$$\text{Net Aktivite Değeri: Aktivite} - \text{kör okuma (blank)}$$

Bu şekilde belirlenmiş olan net aktivite değerleri kullanılarak enzim aktivite değeri aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{AD } (\mu\text{mol}/\text{gTA}) = [\text{NA} \times \text{SD} \times (\text{SF} / \text{ÖM})] / 1000$$

AD: Aktivite değeri ( $\mu\text{mol}/\text{gTA}$ )

TA: Taze ağırlık

NA: Net aktivite değeri

SD: Standart değer (41,91)

SF: Örnek seyreltme faktörü

ÖM: Örnek miktarı (mg)

Bu formüle göre hesaplanan aktivite değerleri, toplam protein miktarı ile oranlanarak spesifik enzim aktivitesi belirlenmiştir.

$$\text{CAT } (\mu\text{mol}/\text{mg protein}) = \text{AD}(\mu\text{mol}/\text{gTA}) / \text{TPM}$$

CAT: Katalaz

TA: Taze Ağırlık

AD: Aktivite değeri ( $\mu\text{mol}/\text{gTA}$ )

TPM: Toplam protein miktarı (mg protein/gTA)

### 3.2.6. Enzimlerde toplam protein miktarının tespiti

Spesifik enzim aktivitesini belirlemek için örneklerdeki toplam protein miktarı Bradford'a (1976) göre belirlenmiştir. Bu amaçla, 0, 10, 20, 40 ve 60  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 'lik BSA (Bovine serum albumin) içeren standart çözeltiler hazırlanmıştır. Hazırlanan standart çözeltilerin üzerlerine saf su eklenerek 100  $\mu\text{L}$ 'ye tamamlandıktan sonra 2 ml Bradford çözeltisi eklenmiştir. Örnekler de supernatanttan 50  $\mu\text{L}$  alınıp 950  $\mu\text{l}$  saf su ve 2 mL Bradford çözeltisi eklenerek hazırlanmıştır. Standartlar ve örnekler renk reaksiyonu oluşması için 15 dakika bekletildikten sonra, toplam protein miktarını belirlemek için spektrofotometrede 595 nm'de absorban okumaları yapılarak aşağıdaki formülle hesaplanmıştır:

O. D  $_{595\text{ nm}} = 595\text{ nm}$ 'deki okuma değeri

Sabit: KESME NOKTASI (Standart çözelti; O. D  $_{595\text{ nm}}$ )

X katsayısı: EĞİM (Standart çözelti; O. D  $_{595\text{ nm}}$ )

T.A: Taze ağırlık

Seyreltme faktörü: Çözelti miktarı/Alınan örnek miktarı

### 3.2.7. Peroksidaz (PRX, EC 1.11.1.7) izoenzim analizi

#### Peroksidaz (PRX) ekstraksiyonu

PRX enzim ekstraksiyonu için,  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan yaprak örneklerinden 0,1 g alınarak, 1 ml ekstraksiyon çözeltisi ile homojenize edilmiştir (Gülen, 2000; Gülen vd., 2002).

Ekstraksiyon çözeltisi bileşenleri (50 ml için):

- 0,1 M potasyum fosfat çözeltisi pH 7,5      50 ml
- 30 mM borik asit                                      0,09 g
- 50 mM askorbik asit                                0,44 g
- 17 mM sodyum metabisülfid                    0,16 g
- 16 mM dietil ditiyokarbamik asit            0,14 g
- 1 mM EDTA    18 mg
- %4 PVP-40    2 g

Kimyasallar çözüldürüldükten sonra tekrar pH 7,5 olması için NaOH ile pH ayarlanmıştır (Gülen vd., 2002). Homojenizatlar 1,5 ml'lik santrifüj tüplerine alınmış ve vorteks yapıldıktan sonra 15 dakika boyunca +4 °C'de çalkalanmaya bırakılmıştır. Daha sonra örnekler 16 000 g'de, +4°C'de 30 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüjden çıkan örneklerin üstteki sıvı kısmı alınarak temiz tüplere aktarılıp üzerlerine 1'er damla %10'luk gliserol ve eser miktarda brom fenol mavisi eklenerek jele yüklemeye hazır hale getirilmiştir.

### **Peroksidaz izoenzim aktivitesinin belirlenmesi**

PRX enzim aktivitesi, Native-PAGE yöntemine göre belirlenmiştir. Elektroforez işlemi, mini PROTEAN III elektroforez ünitesi (Bio-Rad) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Davis'in (1964) yöntemine göre asidik peroksidaz jel profilleri, Reisfeld'e (1962) göre bazik peroksidaz jel profilleri için ayrı ayrı jeller hazırlanmış ve örneklerin 20 µl'si alınarak kuyucuklara yüklenmiştir.

#### Asidik PRX Ayırma Jeli Çözeltisi Bileşenleri

- 3 M Tris-HCl pH 8,9
- %30 Akrilamid / %0,8 Bis
- %10 Amonyum persülfat

#### Asidik PRX Yükleme Jeli Çözeltisi Bileşenleri

- 0,5 M Tris-HCl pH 6,7
- %10 Akrilamid / %1,25 Bis
- %10 Amonyum persülfat

#### Asidik PRX Yürütme Tamponu Çözeltisi Bileşenleri (1 L için)

- Glisin 28,8 g
- Tris-HCl 6 g

#### Bazik PRX Ayırma Jeli Çözeltisi Bileşenleri

- %30 Akrilamid / %0,8 Bis
- %60 Sükroz
- Potasyum asetat çözeltisi pH 4,6
- %10 Amonyum persülfat

#### Bazik PRX Yükleme Jeli Çözeltisi Bileşenleri

- %10 Akrilamid / %1,25 Bis
- Potasyum asetat çözeltisi pH 5,0
- %10 Amonyum persülfat

#### Bazik PRX Yürütme Tamponu Çözeltisi Bileşenleri (1 L için)

- $\beta$ - Alanin 31,2 g
- Asetik asit 8 ml

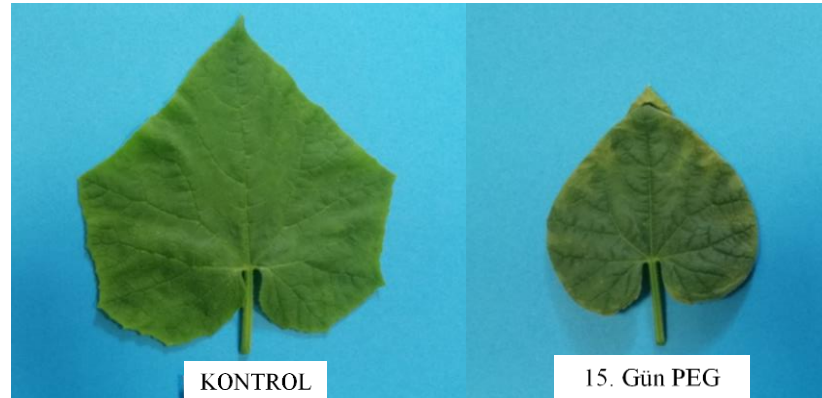
Yüklemeden sonra, jeller tank içerisine yerleştirilmiş ve yürütme tamponu çözeltisi ilave edilmiştir. Jele önce 20 dakika 10 mA, sonra 20 dakika 20 mA ve son olarak da 3 saat 15 dakika boyunca 40 mA'lık akım verilmiştir. Reisfeld sistemde ters akım uygulanmıştır. Yürütme işlemi +4°C'de gerçekleştirilmiştir. Elektroforez sonrası PRX aktivitesinin belirlenmesi için jeller Wendel ve Weeden (1989) yöntemine göre boyanmıştır. Boyanan jeller, florasan ışık altında fotoğraflanmıştır.

#### 3.2.8. İstatistiksel analizler

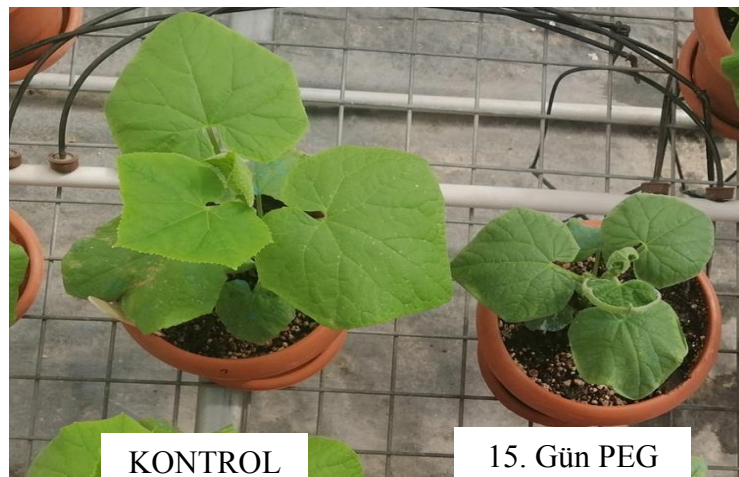
Deneme "Tesadüf Parselleri Deneme Deseni"ne göre kurulmuştur. Araştırmadan elde edilen tüm sonuçlar "SPSS 20.0 Windows" paket programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Uygulama ortalamalarının farklılıkları, "Duncan" testi ile 0,05 önem düzeyinde ortaya konmuştur.

#### 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Su stresi sırasında, genel olarak yaprak boyutunda küçülme, yaprak hücre duvarlarının kalınlaşması, yaprak turgor kaybı, sarkma, solma, yaprak yuvarlanması, büyük ksilem damarlarının sayısında artış gibi belirtiler görüldüğü bildirilmiştir (Arbona vd., 2013; Sapeta vd., 2013). Yapılan çalışmada da PEG uygulamasının 15. gününde yaprak boyutlarının küçüldüğü, yaprak damarlarının belirginleştiği, yaprak renginin koyulaştığı yaprak kenarlarında kıvrılma ve kurumalar olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.1). Ayrıca, PEG uygulamasının 15. gününde bitkilerin büyüme ve gelişmesinde belirgin bir gerileme olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.2)



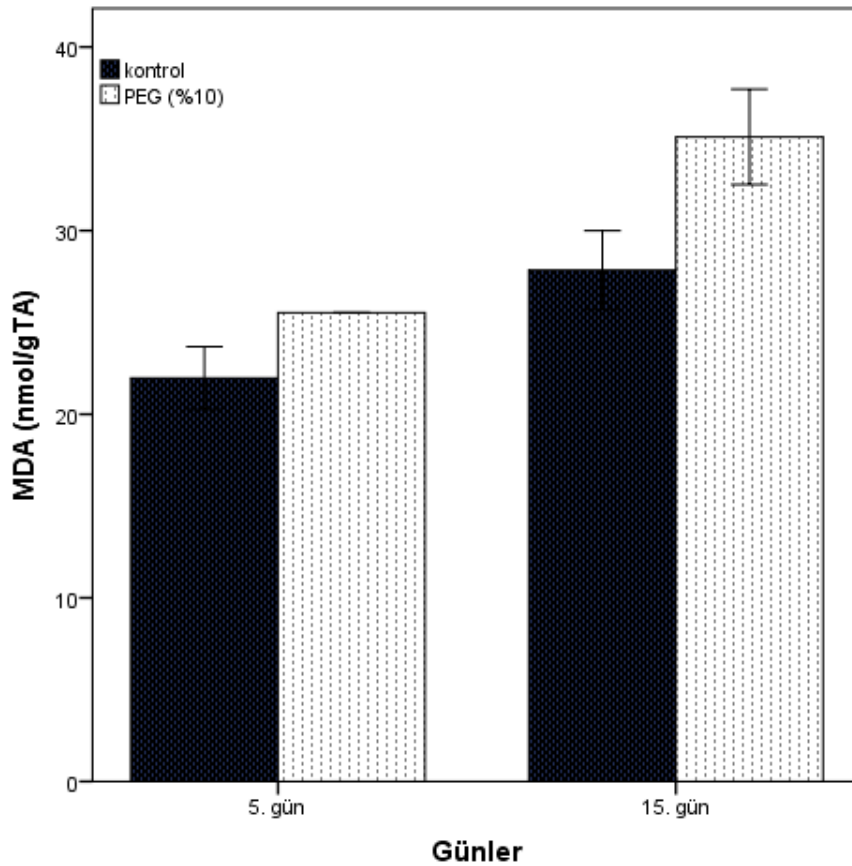
Şekil 4.1. Hıyar bitkisinde PEG uygulamasına bağlı olarak 15. günde yapraklarda meydana gelen değişimler.



Şekil 4.2. Hıyar bitkisinde PEG uygulamasına bağlı olarak 15. günde bitkilerde meydana gelen değişimler.

#### 4.1. Lipid Peroksidasyonu (MDA)

PEG uygulamalarına bağı olarak bitkilerdeki MDA miktarında görülen değişim Şekil 4.3'te verilmiştir. MDA miktarının, 5. ve 15. günlerde kontrol bitkilerine göre PEG uygulanan bitkilerde arttığı belirlenmiştir. En yüksek MDA miktarı 15. gün PEG uygulamasında tespit edilmiştir (35,10 nmol/gTA). İstatistiksel açıdan uygulamalar ve günler arasındaki fark önemli bulunurken, uygulama\*gün interaksyonu önemsiz bulunmuştur (Ek Açıklamalar-A).



Şekil 4.3. PEG uygulamasının günlere bağı olarak hıyar bitkisinde MDA miktarı ( $\mu\text{mol/gTA}$ ) üzerine etkisi. Dikey barlar tekerrürlerin  $\pm$  standart sapmalarını göstermektedir.

Lipid peroksidasyonu, hücre zarındaki fosfolipidlerin parçalanmasıyla üretilen malondialdehit miktarı ölçülerek hesaplanır ve malondialdehid (MDA) miktarı, abiyotik stres koşulları altında hücre zarı hasarının bir göstergesi olarak kullanılmaktadır (Fayez ve Bazaid 2014; Jungklang vd., 2017). Hücre zarındaki fosfolipidler, hücre zarının yapısındaki doymamış yağ asitlerinin oksijenlenmesiyle yok edilir.

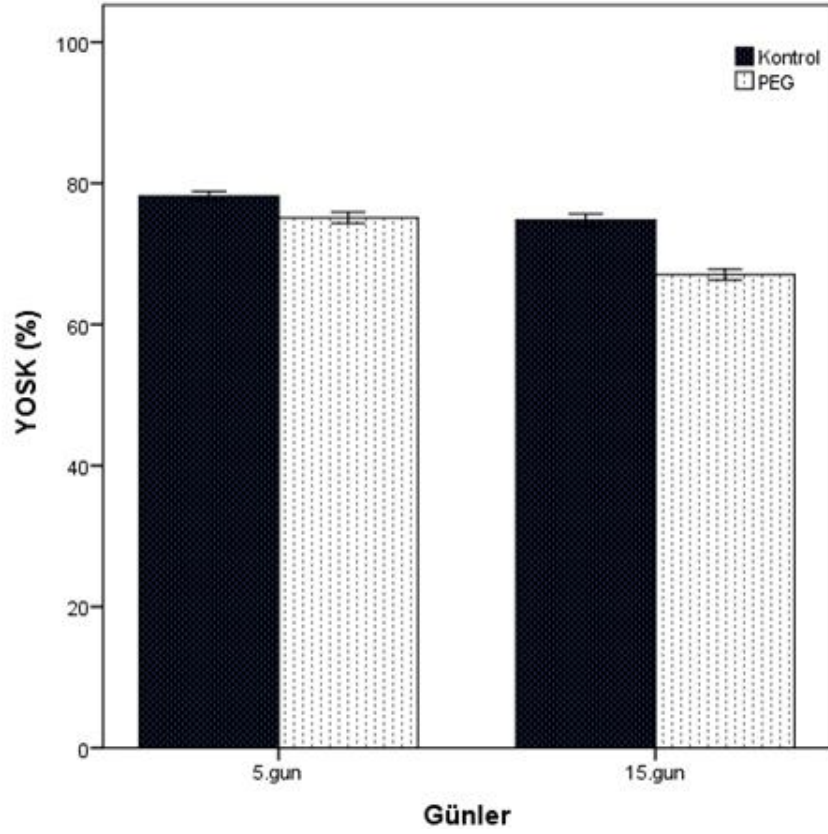
Lipid peroksidasyonu olarak bilinen bu olayın bir sonucu olarak hücre zarının bütünlüğü bozulmaktadır. Bu nedenle malondialdehit miktarının artması, hücre zarına verilen zararın da büyük olduğu anlamına gelmektedir ve MDA miktarı kuraklık gibi stres olaylarında önemli bir gösterge olarak kullanılmaktadır (Dhindsa ve Mathowe, 1981; Moller vd., 2007).

Sivritepe vd. (2008) kirazda, Sanchez-Rodriguez vd. (2010) domateste, Nikolaeva, vd. (2010), buğdayda, Hameed, vd. (2011) arpada, Khoyerdı vd. (2016) antep fıstığında yaptıkları çalışmalarla kuraklık stresi koşullarında MDA miktarında artış olduğunu belirlemişlerdir. Bu çalışmadan elde edilen benzer sonuçlar, hıyar bitkisinde su stresine bağlı olarak hücresel zararlanmanın bir belirtisi olan malondialdehid (MDA) miktarının arttığını göstermiştir.

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

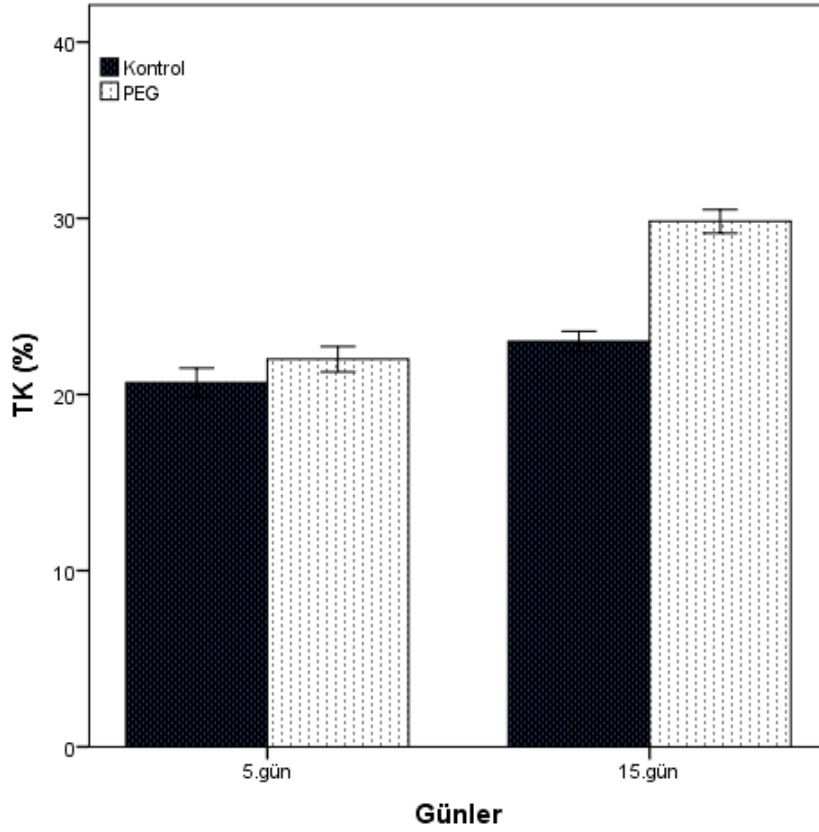
Su stresine maruz bırakılan bitkilerde stres süresi uzadıkça YOSK'un giderek azaldığı, 5. günde %75,12 iken, 15. günde %67,05'e düştüğü belirlenmiştir (Şekil 4.4). YOSK bakımından uygulamalar, günler ve uygulama\*gün interaksyonu istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur (Ek Açıklamalar-B).





Şekil 4.4. PEG uygulamasının günlere bağlı olarak hıyar bitkisinde YOSK (%) üzerine etkisi. Dikey barlar tekerrürlerin  $\pm$  standart sapmalarını göstermektedir.

PEG uygulaması ile TK günlere bağlı olarak artış göstererek 5. günde %22,0'ye ulaşırken, 15. günde ise daha da artarak %29,8 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.5). İstatistiksel açıdan uygulamalar, günler ve uygulama\*gün interaksyonu önemli bulunmuştur (Ek Açıklamalar-C).

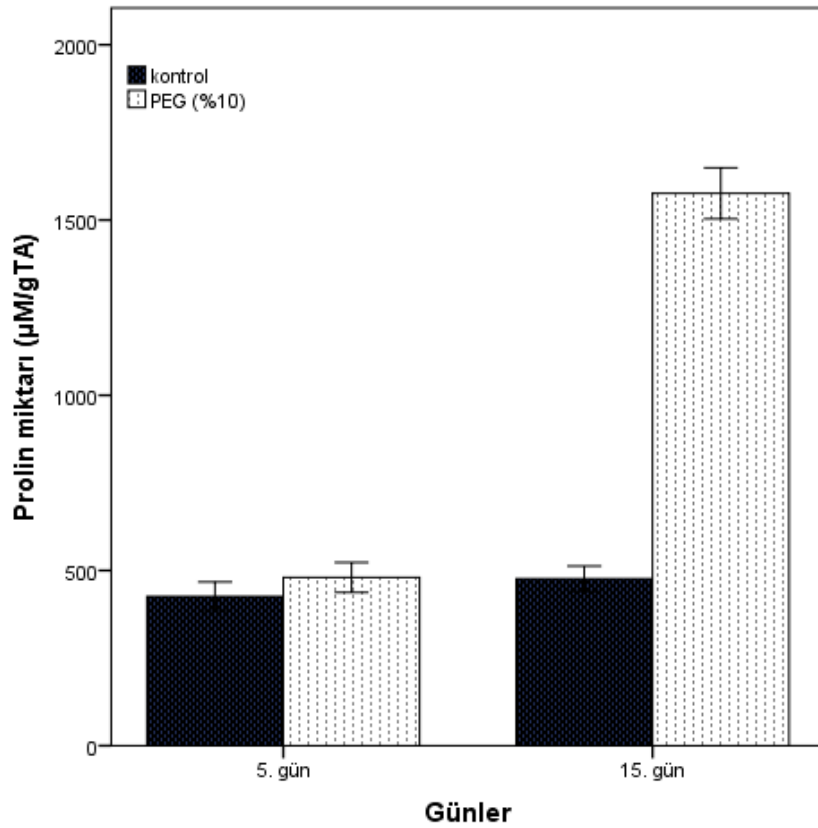


Şekil 4.5. PEG uygulamasının günlere bağlı olarak hıyar bitkisinde TK (%) üzerine etkisi. Dikey barlar tekrerrlerin  $\pm$  standart sapmalarını göstermektedir.

YOSK ve TK, bitkinin su dengesinin belirlenmesinde önemli bir göstergedir ve stres faktörlerinin etkilerinin araştırılmasında önemli bir parametredir. Kuraklık stresinin, çeşitli bitkilerin YOSK'unda önemli bir düşüşe neden olduğu birçok araştırmacı tarafından vurgulanmıştır (Türkan vd. 2005; Romanello, vd. 2008; Sanchez-Rodriguez vd. 2010; Asgharipour ve Heidari 2011; Lv vd., 2012). Kuraklık, turgoru azaltmakta, TK hücre genişlemesi ve büyümesi üzerinde olumsuz etkilere yol açmakta ve bitki hücreleri normal işlevlerini yerine getiremez hale gelmektedir (Keyvan, 2010; Rahdari ve Hoseini, 2012). Kuraklık stresinin uygulandığı bir çalışmada hıyar bitkilerinin kontrol grubunda YOSK'un azaldığı bildirilmiştir (Kim vd., 2019). Yapılan bu çalışmada da hıyar bitkisinde su stresinin süresi arttıkça YOSK'un azaldığı ve TK'nın arttığı tespit edilmiştir.

### 4.3. Prolin Miktarı

PEG uygulamalarının prolin miktarı üzerinde etkisi Şekil 4.6’da verilmiştir. Prolin miktarının, bitkilerin su stresinde kalma süresi uzadıkça arttığı belirlenmiştir. Uygulamanın 15. gününde kontrol bitkilerinde 476,2  $\mu\text{mol/gTA}$  olarak belirlenen prolin miktarının, PEG uygulaması yapılmış bitkilerde bunun yaklaşık üç katı seviyeye ulaştığı tespit edilmiştir (1576,4  $\mu\text{mol/gTA}$ ). Prolin miktarı bakımından uygulamalar ve günler arasındaki fark ve uygulama\*gün interaksiyonu istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (Ek Açıklamalar-D).



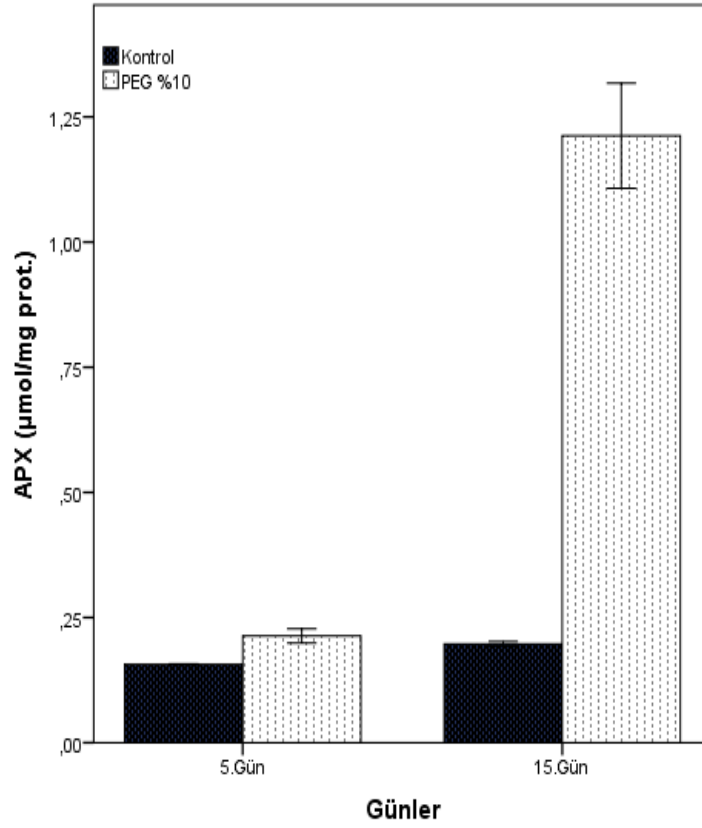
Şekil 4.6. PEG uygulamasının günlere bağlı olarak hıyar bitkisinde prolin miktarı ( $\mu\text{mol/gTA}$ ) üzerine etkisi. Dikey barlar tekerrürlerin  $\pm$  standart sapmalarını göstermektedir.

Prolin, kuraklık gibi abiyotik stres faktörlerine karşı hücre içi osmoprotektan olarak bu stresin üstesinden gelmek için uyarlanabilir mekanizmada rol oynamaktadır (Shabnam vd., 2016) ve stres altındaki bitkilerin biyokimyasal bir belirteci olarak kullanılabilir, aynı zamanda ikincil bir metabolit olarak da kabul edilmektedir (Shahid vd., 2017). Prolin, hücrel osmotik basıncın düzenlenmesinde, hücre turgorunun korunmasında ve membran

hasarının azaltılmasına yardımcı olan ROS aktivitesinin ortadan kaldırılmasında önemlidir (Ashraf vd., 2009). Sitoplazmada prolin birikimi, bitkilerin kuraklık stresiyle karşı karşıya olduğunu göstermektedir (You vd., 2012). YOSK'da önemli bir azalma meydana geldiğinde prolin birikimi artabilir ve bu birikim membran bütünlüğünün korunmasını sağlayabilir. Kuraklık stresi ile ilgili yapılmış çalışmalarda birçok bitkide prolin miktarının arttığı bildirilmiştir (Sanchez vd., 2004; Ashraf ve Iram 2005; Cechin, vd.2006; Sankar vd., 2007; Simova-Stoilova, vd.2008). Yapılan çalışmada da hıyar bitkisinde su stresinin süresinin artmasıyla prolin miktarının arttığı ve sonuçların daha önce yapılan çalışmalarla paralellik gösterdiği belirlenmiştir. Prolin birikiminin artmasının sebebi, YOSK azaldığında zarları ve proteinleri koruyarak fayda sağlaması olarak açıklanmıştır (Reddy vd., 2004).

#### **4.4. Askorbat Peroksidaz (APX) Enzim Aktivitesi**

PEG uygulamasının günlere bağlı olarak hıyar bitkisinde APX enzim aktivitesi üzerine etkisi Şekil 4.7'de verilmiştir. PEG uygulamasına bağlı olarak stres süresi uzadıkça APX aktivitesinin belirgin bir şekilde arttığı belirlenmiştir. PEG uygulamasının 5. gününde 0,21  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  prot. olarak belirlenen APX aktivitesi 15. günde yaklaşık 6 kat artarak 1,21  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  prot.'e ulaşmıştır. Kuraklık stresine bağlı olarak uygulamalar ve günler arasındaki fark ve uygulama\*gün interaksyonu önemli bulunmuştur (Ek Açıklamalar-E).



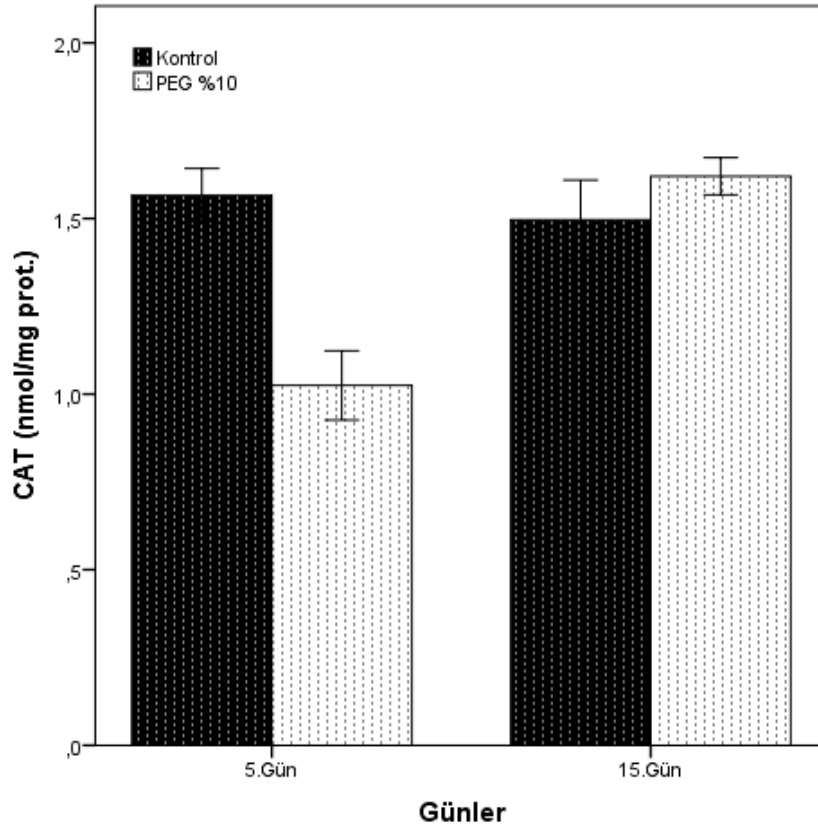
Şekil 4.7. PEG uygulamasının günlere bağlı olarak hıyar bitkisinde APX enzim aktivitesi ( $\mu\text{mol/gTA}$ ) üzerine etkisi. Dikey barlar tekrürlerin  $\pm$  standart sapmalarını göstermektedir.

Askorbat peroksidaz enzimi, askorbat-glutasyon (AsA-GS) döngüsünün temel bileşeni olarak bilinen ilk enzimdir ve oksidatif stresler sırasında salınan ROS miktarlarının azaltılmasında rol oynamaktadır (El-Beltagi ve Mohamed, 2013). Yapraklardaki APX aktivitesindeki değişiklik, lifli köklü bitkilere göre daha yaygındır çünkü APX esas olarak kloroplast ve sitoplazmada meydana gelir ve kloroplastlarda  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'yi temizlemek için çok önemli bir enzimdir (Wang vd., 2019). Bitkilerin kuraklığa antioksidan enzimlerle tepkisi, bitkileri aktif oksijenin neden olduğu hasardan koruyan ve bitki hücrelerinin normal çalışmasını sağlayan bir savunma sistemidir (Anjum vd., 2011; Horvath vd., 2007). Kuraklık stresinin antioksidant savunma sisteminin etkinliğini ortadan kaldırdığı ve oluşan oksidatif stres sonucunda bitkide gözle görülür zararların ortaya çıktığı da belirtilmiştir (Kalefetoğlu ve Ekmekçi, 2005). Hıyar bitkilerinde daha önceden yapılan bir çalışmada da PEG uygulamasının APX aktivitesinde önemli artışa neden olduğu bildirilmiştir (Sun vd., 2011). Çeltik, nohut, asma gibi birçok bitkide yapılan çalışmada ise, bu çalışmadakine benzer şekilde, kuraklık stresi sırasında APX enzim aktivitesindeki artışın önemli olduğu bildirilmiştir (Sharma ve Dubey, 2005; Kalefetoğlu ve Ekmekçi, 2005; Babalık vd., 2015).

Yüksek APX aktivitesinin, kloroplastlarda  $H_2O_2$  alımını arttırarak ve  $H_2O_2$  birikimini azalttığı bildirilmiştir (Chaitanya vd., 2002). Yapılan bu çalışmada da APX aktivitesinde meydana gelen bu belirgin artışın muhtemelen ROS'lara karşı geliştirilen bir savunmadan kaynaklı olabileceği düşünülmektedir.

#### 4.5. Katalaz Enzim (CAT) Aktivitesi

Kontrol bitkilerinin 5. ve 15. günlerinde CAT enzim aktivitesinde belirgin bir değişiklik olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.8). Ancak, PEG uygulamalarının 5. gününde 1,02 nmol/mg prot. olan CAT enzim aktivitesinin 15. günde giderek artarak 1,62 nmol/mg prot.'e ulaştığı görülmüştür. İstatistiki olarak günler ve uygulamalar arasındaki fark ve uygulama\*gün interaksyonu önemli bulunmuştur (Ek Açıklamalar-F).



Şekil 4.8. PEG uygulamasının günlere bağlı olarak hıyar bitkisinde CAT enzim aktivitesi ( $\mu\text{mol/gTA}$ ) üzerine etkisi. Dikey barlar tekrürlerin  $\pm$  standart sapmalarını göstermektedir.

CAT enzimi, bir substrat olarak  $H_2O_2$ 'yi kullanan ve bunu  $H_2O$  ve  $O_2$ 'ye dönüştüren ve böylece hücrelerin oksidatif hasardan korunmasını sağlayan enzimlerdir (Sanchez-Casas ve Klesseg 1994). CAT'lar,  $H_2O_2$  üreten enzimlerin bulunduğu peroksizomlarda, glioksizomlarda ve ilgili organellerde bulunmaktadır (Agarwal vd., 2009). CAT'ın  $H_2O_2$  ile reaksiyonunun yanı sıra bazı hidroperoksitler ile de reaksiyona girdiği bildirilmiştir (Ali ve Alqurainy 2006). CAT aktivitesi, farklı abiyotik stresler altında değişken eğilimler göstermektedir (Singh vd., 2008; Hasanuzzaman ve Fujita 2011).

Hıyar bitkilerinde cinnamic asit ve PEG uygulamalarının beraber incelendiği bir çalışmada PEG uygulamasının CAT aktivitesini kontrol bitkilerine göre arttırdığı bildirilmiştir (Sun vd., 2011). Fasulye çeşitlerinde yapılan kuraklık çalışmalarında CAT aktivitesindeki artışın kuraklık toleransı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Terzi vd. 2010). İpek (2015) *in vitro* koşullarda Garnem ve Myrobolan 29C anaçlarında yapmış olduğu çalışmada farklı kuraklık stresinde (-0.5MPa, -1.0MPa ve -1.5MPa) Garnem anacında CAT aktivitesinde artış olduğunu, Myrobolan 29C anacında ise başlarda artış olurken, kuraklık stresi arttıkça azalışlar olduğunu ve sonuç olarak, Garnem anacının Myrobolan 29C anacına göre kuraklık stresine daha toleranslı olduğunu belirlemiştir. Yapılan bu çalışmada kontrol bitkilerinde 5. ve 15. günlerde CAT enzim aktivitesinde bir farklılık olmazken, PEG uygulamalarında ise stres süresi uzadıkça artan CAT aktivitesi, muhtemelen bitkilerin artan su stresinden kaynaklanan  $H_2O_2$  birikimini bertaraf etmek amacıyla geliştirdikleri bir savunma olarak açıklanabilir.

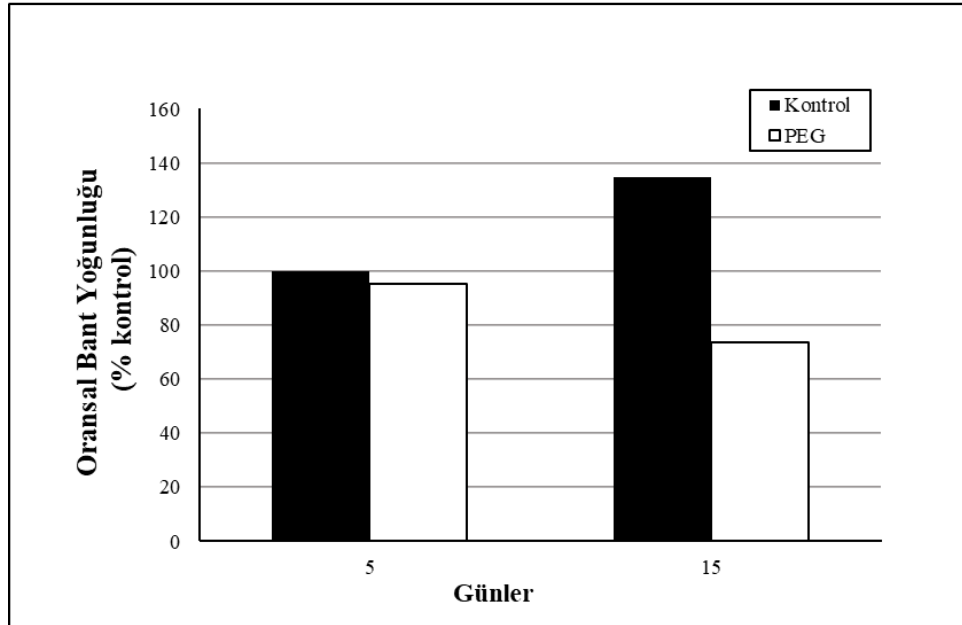
#### **4.6. Peroksidaz (PRX) İzoenzim Aktivitesi**

Kuraklık uygulamasına bağlı olarak hıyar bitkisinin yaprak dokularında asidik PRX'lere ait Rf değeri 0,09 - 0,19 - 0,50 ve -0,54 olan 4 bant belirlenirken, bazik PRX'lere ait Rf değeri 0,28 ve 0,35 olan 2 bant belirlenmiştir.

## Asidik peroksidazlar

PEG uygulamalarına bağlı olarak hıyar bitkisinde Rf değeri 0,09 olarak belirlenen asidik PRX jel profili ve kontrol bitkileri baz alınarak hesaplanan bant yoğunluğu %'si Şekil 4.9'da görülmektedir. Rf değeri 0,09 olarak belirlenen asidik PRX bant yoğunluğunun PEG uygulaması yapılan bitkilerde kontrole göre daha düşük olduğu, ayrıca PEG uygulamalarında stres suresine bağlı olarak giderek azaldığı belirlenmiştir.

### PRX 1

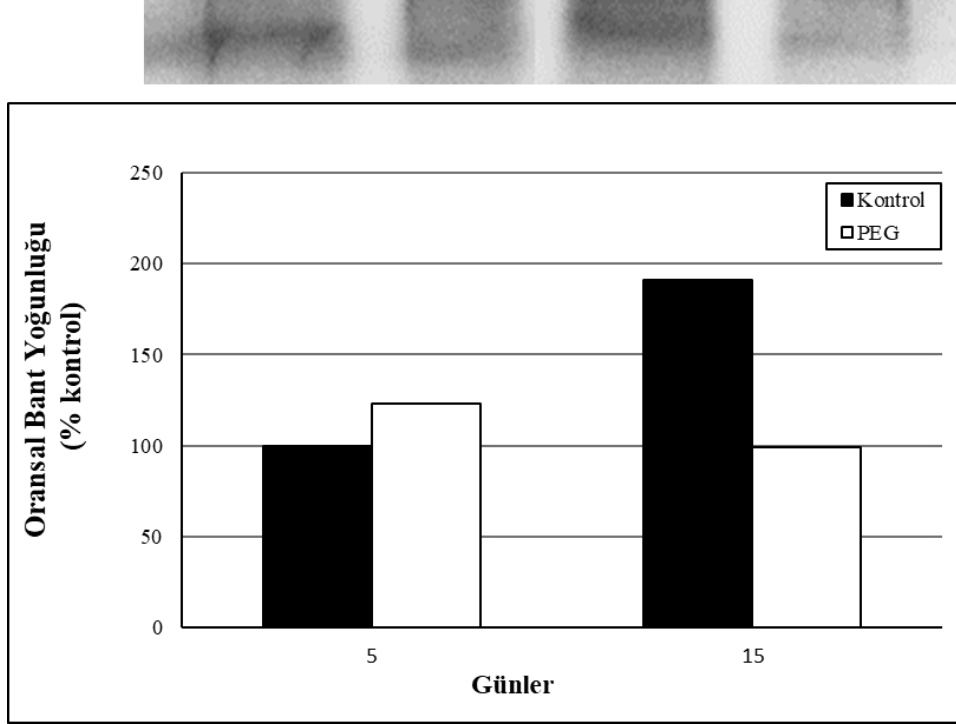


Şekil 4.9. PEG uygulamasının günlere bağlı olarak hıyar bitkisinde Rf=0,09 olarak belirlenen asidik PRX 1 bandının aktivite yoğunluğu.



Rf değeri 0,19 olarak belirlenen asidik PRX aktivitesine bakıldığında, PEG uygulamalarının 5. gününde aktivite yoğunluğunun kontrolden daha yüksek olduğu, ancak 15. günde ise kontrole göre daha düşük olduğu saptanmıştır (Şekil 4.10). Ayrıca, PEG uygulanan bitkilerde stres süresi uzadıkça bu bandın yoğunluğunun azaldığı tespit edilmiştir.

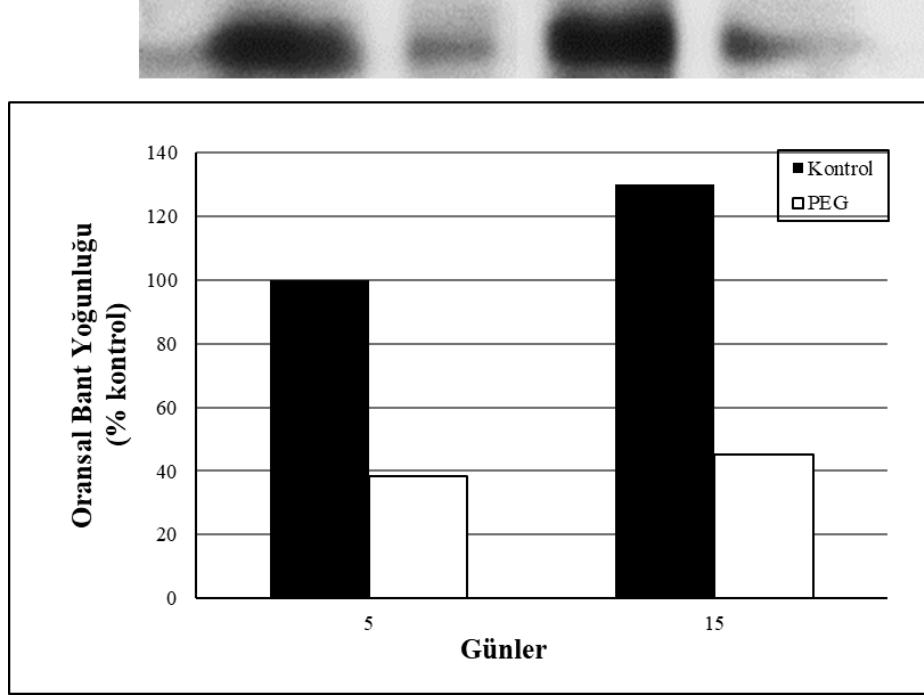
## PRX 2



Şekil 4.10. PEG uygulamasının günlere bağlı olarak hıyar bitkisinde Rf=0,19 olarak belirlenen asidik PRX 2 bandının aktivite yoğunluğu.

Rf değeri 0,50 olarak belirlenen asidik PRX'in, PEG uygulanan bitkilerde kontrolden daha düşük seviyede olduğu ve aktivitesinin PEG uygulamalarında günlere bağlı olarak önemli bir değişim göstermediği tespit edilmiştir (Şekil 4.11).

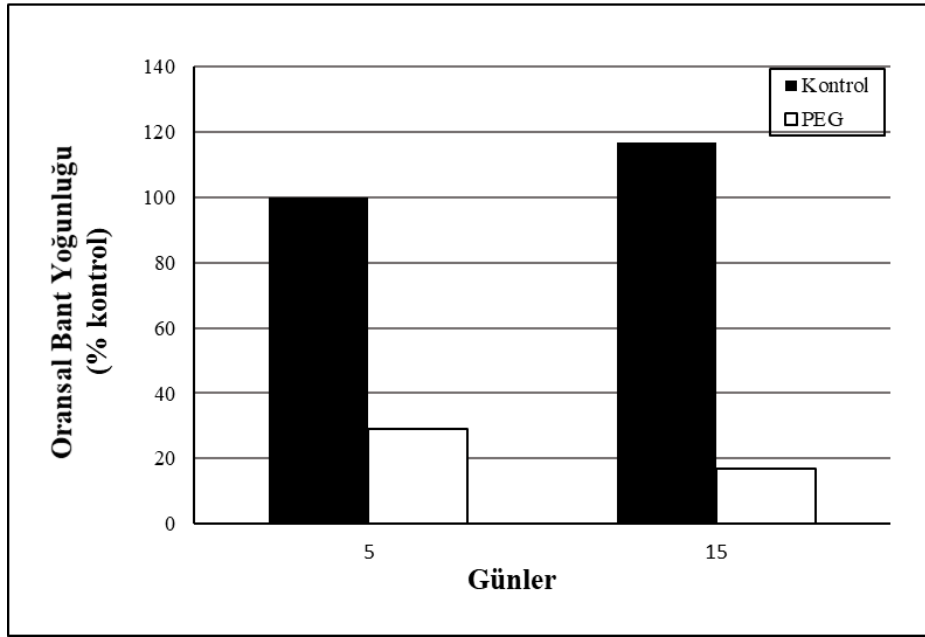
### PRX 3



Şekil 4.11. PEG uygulamasının günlere bağlı olarak hıyar bitkisinde Rf=0,50 olarak belirlenen asidik PRX 3 bandının aktivite yoğunluğu.

Asidik PRX'lerden  $R_f=0,54$  olarak belirlenen bir bandın jel profili ve oransal bant yoğunluğu Şekil 4.12'de verilmiştir. Buna göre, kontrol bitkilerinde aktivitenin PEG uygulanan bitkilerden daha fazla olduğu, PEG uygulamalarında ise uygulama süresi uzadıkça aktivitenin azaldığı tespit edilmiştir.

## PRX 4

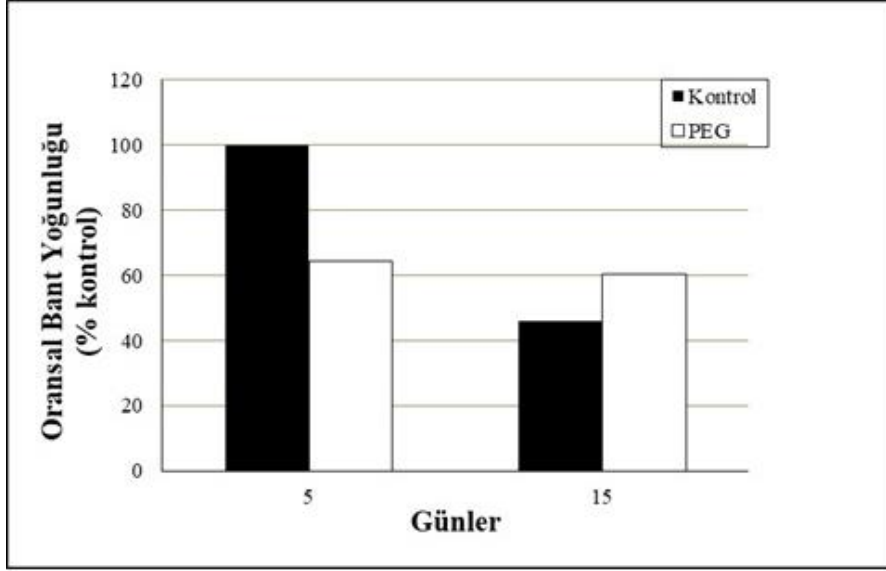


Şekil 4.12. PEG uygulamasının günlere bağlı olarak hıyar bitkisinde  $R_f=0.54$  olarak belirlenen asidik PRX 4 bandının aktivite yoğunluğu.

## Bazik peroksidazlar

PEG uygulamalarına bağlı olarak hıyar bitkisinde  $R_f$  değeri 0,28 olarak belirlenen bazik PRX bandına ait jel profili ve bant yoğunluğu Şekil 4.13'te verilmiştir. Sonuçlara bakıldığında, PEG uygulamasının 5. gününde PRX aktivitesinin kontrol bitkilerinden daha düşük yoğunlukta olduğu, ancak 15. günde ise, PEG uygulanan bitkilerde yoğunluğun kontrolden daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

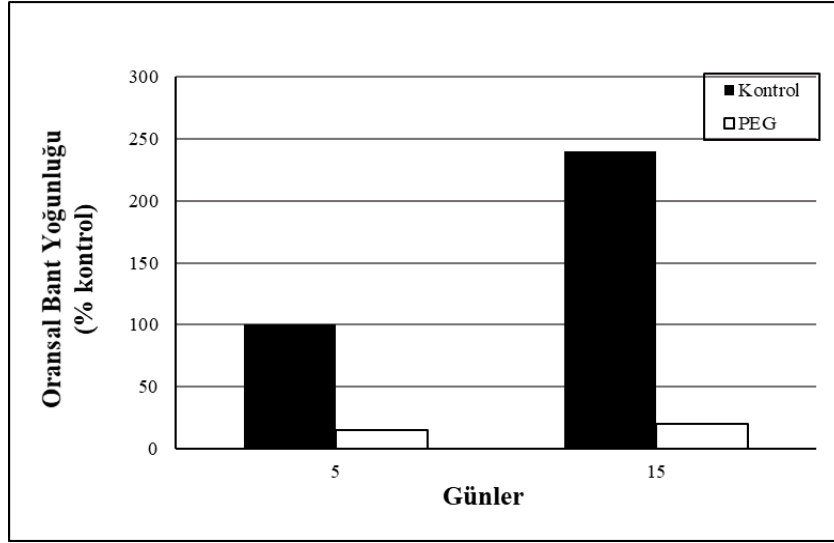
## PRX 1



Şekil 4.13. PEG uygulamasının günlere bağlı olarak hıyar bitkisinde  $R_f=0,28$  olarak belirlenen bazik PRX 1 bandının aktivite yoğunluğu.

$R_f$  değeri 0,35 olarak belirlenen bir başka bazik PRX aktivitesinin PEG uygulamalarında kontrol bitkilerine oranla daha düşük seviyelerde olduğu, PEG uygulama süresinin aktivite üzerinde önemli bir etkisinin bulunmadığı görülmüştür (Şekil 4.14).

## PRX 2



Şekil 4.14. PEG uygulamasının günlere bağlı olarak hıyar bitkisinde  $R_f=0,35$  olarak belirlenen bazik PRX 2 bandının aktivite yoğunluğu.

Peroksidazlar, hücre için toksik olan  $H_2O_2$ 'nin hücre duvarının yapısına katılmasına ve onu kontrol etmesine izin vermektedir. Asidik PRX'lerin hücre duvarı ve lignin oluşumundan sorumlu olduğu, bazik PRX'lerin ise  $H_2O_2$  oluşumundan temel PRX'lerin sorumlu olduğu düşünülmektedir (Walter 1992). PRX'ler, farklı izoelektrik noktalara ve spesifik aktivite, substrat afinitesi, kofaktörler, inhibitör duyarlılığı ve optimal pH gibi farklı biyokimyasal özelliklere sahip çok sayıda izoenzime sahiptir (Huystee 1987; Odabaşoğlu 1998).

Çeşitli bitkilerde yapılan çalışmalarda, kuraklık stresinin PRX enzim aktivitesini arttırdığı bildirilmiştir (Reddy vd., 2004; Türkan vd., 2005; Kalefetoğlu ve Ekmekçi 2005; Datir ve Inamdar, 2019; Aljema, 2020). Yoncada yapılan bir çalışmada ise, kuraklık stresinin ilk günlerinde PRX enzim aktivitesinin arttığı, ancak daha sonra azaldığı belirlenmiştir (Zhang ve Shi, 2018). Fu-Fan vd. (2014), hıyar fidelerinin (*Cucumis sativus* L.) köklerinde kuraklık stresi sırasında PRX aktivitesinin artış gösterdiğini bildirmişlerdir. Yapılan bu çalışmada ise, hıyar bitkilerinin yaprak dokularında asidik ve bazik birçok PRX belirlenmiş olup, belirlenen bu PRX'lerden yalnızca  $R_f$  değeri 0,28 olarak belirlenen bazik PRX'in hıyarda su stresine karşı toleransta rolünün olabileceği, diğer PRX'lerin ise etkin bir rolünün bulunmadığı sonucuna varılmıştır.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Küresel iklim değışiklikleri ve küresel ısınma günümüzde birçok bölgede yağış rejiminin değışmesine sebep olmakta ve artan kuraklık tarımsal üretimde önemli verim kayıplarına neden olmaktadır. Kuraklık stresi, bitkilerde birçok fizyolojik, morfolojik, biyokimyasal ve moleküler düzeyde değışikliklere neden olmaktadır. Kuraklığa karşı bitki tepkileri, kuraklığın süresine ve şiddetine, bitki türüne, yaşına ve gelişim aşamasına bağlı olarak değışebilmektedir. Birçok bitki kuraklık stresi ile başa çıkabilmek için direnç mekanizmaları geliştirmiştir, ancak bu mekanizmalar çeşitlidir ve bitki türlerine göre değışmektedir.

Dünya nüfusunun geometrik bir şekilde hızla arttığını düşünecek olursak, artan nüfusun beslenme ihtiyaçlarını karşılayabilmek için, verim kayıplarını en aza indirmek gerektiği açıktır. Bu da, değışen çevre koşullarına daha iyi adapte olabilen tolerans düzeyi yüksek bitkilerin geliştirilmesi ile mümkün olacaktır. Bu anlamda, dünya üzerinde insan beslenmesinde önemli yeri olan bitki türlerinin kuraklık stresi koşullarına verdiği yanıtları anlamak ve kuraklık stresine toleranslı çeşitlerin geliştirilmesi önem arz etmektedir. Yapılan tez çalışmasında dünyada ve ülkemizde en fazla yetiştirilen sebzeler arasında yer alan hıyar (*Cucumis sativus L.*) bitkisinde su stresinin neden olduğu fizyolojik ve moleküler biyolojik değışimlerin belirlenebilmesi amacıyla, bitkilerde meydana gelen bazı antioksidan enzim aktiviteleri ve ozmoregülantların etkinliği araştırılmıştır.

Hıyar bitkisinde su stresinin süresine bağlı olarak elde edilen bulgular özetle şöyledir;

- ✓ Yapılan çalışmada su stres süresi arttıkça hücrelerde zararlanmanın bir göstergesi olan MDA miktarının arttığı,
- ✓ Su stresinin süresi arttıkça YOSK'un azaldığı ve TK'nın arttığı,
- ✓ Su stresinin süresinin arttıkça prolin miktarının, bozulan membran bütünlüğünün korunmasına yönelik arttığı,
- ✓ Su stresinin süresi arttıkça APX aktivitesinin arttığı ve 15. günde maksimum düzeye ulaştığı,
- ✓ Su stres süresi arttıkça CAT aktivitesinin arttığı belirlenmiştir.

✓ Belirlenen birçok asidik ve bazik PRX'lerden yalnızca Rf değeri 0,28 olarak belirlenen bazik PRX'ın hıyarda su stresine toleransla ilişkili olabileceği sonucuna varılmıştır.

Araştırma sonucunda yukarıda özetlendiği şekilde elde edilen orijinal veriler hıyar bitkisinde su stresinin metabolik ve fizyolojik etkilerini ortaya koymuştur. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, hıyar bitkisinde antioksidatif enzimlerden APX, CAT ve PRX'lerin hıyarda su stresine toleransla ilişkili olabileceğini göstermiştir. Elde edilen veriler bitkilerin kuraklık stresine tolerans mekanizmasının aydınlatılmasında kullanılabilir.

## KAYNAKLAR DİZİNİ

- Adams, H.D., Guardiola- Claramonte, M., Barro Gafford, G.A., Villagas, J.C., Breshears, D.D., Zou, C.B., et al., 2009, Temperature sensitivity of drought-induced tree mortality portends increased regional dieoff under global-change-type drought, *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* 106: 7063-7066.
- Akhtar I, Nazir N., 2013, Effect of waterlogging and drought stress in plants. *International Journal Water Resources And Environmental Science*, 2,34–40.
- Alexieva V., Sergiev I., Mapelli S., Karanov E., 2001, Kuraklık ve ultraviyole radyasyonun bezelye ve buğdayda büyüme ve stres belirteçleri üzerindeki etkisi, *Plant Cell Environment* 24, 1337–1344.
- Aljemaa, B.A., 2020, Bazı *pistacia* genotiplerinin kuraklık stresinde morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal tepkilerinin belirlenmesi, Doktora Tezi, Konya Selçuklu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 122 s.
- Altıncı, N. T. 2016. Bazı Önemli Üzüm Çeşitlerinin In Vitro Şartlarında Kuraklık ve Sıcaklık Stresine Toleranslarının Belirlenmesi. Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- An YY., Liang ZS., 2013, Drought tolerance of *Periploca sepium* during seed germination: antioxidant defense and compatible solutes accumulation, *Acta Physiology Plant*, 35: 959–967.
- Anjum, S.A., Xie, X., Wang, L., 2011, Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress, *African Journal of Agricultural Research*, 6, 2026-2032.
- Anonim, 2015, Örtüaltı hıyar yetiştiriciliği, T.C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü Alata Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü Erdemli-Mersin erişim tarihi: 28.02.2021 <http://arastirma.tarim.gov.tr/alata>.
- Apel, K., Hirt, H., 2004, Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction, *Annual Review of Plant Biology*, 55:373-399.
- Arbona V., Manzi M., de Ollas C., Gómez-Cadenas A., 2013, Metabolomics as a tool to investigate abiotic stress tolerance in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 4885–911.
- Arora A., Sairam R.K., Sriuastava G.C., 2002, Oxidative stress and antioxidative system in plants, *Current Science*, 82, 1227–1238.
- 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, 24-34.



### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Arslan, M., Aksu, E. ve Doğan E., 2018, Kuraklık stresine tolerans bakımından iki mürdümük genotipinin değerlendirilmesi. Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi, 5(3), 261-267.
- Asgharipour, M. R. ve Heidari M., 2011, Effect of potassium supply on drought resistance in sorghum: plant growth and macronutrient content, Pakistan Journal of Agricultural Sciences, 4893, 197–204.
- Ashraf M., Ozturk M., Athar H.R., 2009, Salinity and water stress, improving crop efficiency. The Netherlands, Springer.
- Ashraf, M. ve Iram A., 2005, Drought stress induced changes in some organic substances in nodules and other plant parts of two potential legumes differing in salt tolerance. Flora, 200 (6): 535–546.
- Aydın, M., Hossein Pour, A., Tosun, M., Haliloğlu, K., 2016, Effect of Application of Putrescine on Seedling Growth and Cell Division of Wheat (*Triticum aestivum* L.) under Drought Stress. Yuzuncu Yıl University Journal of Agricultural Sciences, 26(3), 319-332.
- Babalık, Z., Türk, F.H. & Baydar, N.G., 2015, In vitro koşullarda su stresi altındaki Kober 5 BB asma anacında bazı fiziksel ve biyokimyasal değişimlerin belirlenmesi. Selçuk Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi-A. 27, 552-561.
- Barriopedro D., Gouveia, C., Trigo, R.M., Wang L., 2012, The 2009/10 drought in China: possible causes and impacts on vegetation, American Meteorological Society, 13, 1251–67.
- Bates, L.S., Walden, R.P., Teare, ID., 1973, Rapid determination of free proline for water stress studies, Plant Soil 39, 205-207.
- Bernacchia, G., Furini, A., 2004, Biochemical and molecular responses to water stress in resurrection plants, Physiology Plant, 121,175–81.
- Bhargava, S., Sawant, K., 2013, Drought stress adaptation: metabolic adjustment and regulation of gene expression, Plant Breeding, 132, 21–32.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72: 248–254.
- Catola, S., Marino, G., Emiliani, G., Huseynova, T., Musayev, M., Akparov, Z., Maserti, B.E., 2016, Physiological and metabolomic analysis of punica granatum (l.) under drought stress, Planta 243 (2), 441–449.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Cechin, I., Corniani, N., Terezinha, D. F. F., ve Cataneo, A.C., 2006, Ultraviolet-B and water stress effects on growth, gas exchange and oxidative stress in sunflower plants. *Radiation and Environmental Biophysics*, 47,405–13.
- Chamnonpol S., Willekens H., Moeder W., Langebartels C., Sandermann H., Van M.M., Inze D., Van C.W. 1998, Defense activation and enhanced pathogen tolerance induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in transgenic tobacco, *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 95, 5818–5823.
- Çelik, Ö., Atak, Ç., Ayan, A., 2017, Enzymatic and Non-Enzymatic Comparison of Two Different Industrial Tomato (*Solanum lycopersicum*) Varieties Against Drought Stress, *Botanical Studies*, 58, 32–45.
- Da Silva Branco, M.C., de Almeida, A.A.F., Dalmolin, Ahnert A.C., Baligar, V.C., 2017, Influence of low light intensity and soil flooding on cacao physiology, *Scientia Horticulturae (Amsterdam)*, 217: 243-257.
- Dai, A., 2012, Drought under global warming: a review. *Wires Climate Change*, 2, 45–65.
- Datir, S., Inamdar, A., 2019, Biochemical responses of wheat cultivars to peg-induced drought stress, *Russian Agricultural Sciences*, 45, 5-12.
- Davis, B.J. 1964. Disc electrophoresis, method and application to human serum proteins. *Ann. NY. Acad. Sci.* 121: 404-427.
- Dhindsa, R.S, Mathowe, W., 1981, Drought tolerance in two mosses: correlated with enzymatic defence against lipid peroxidation, *Journal of Experimental Botany*, 32 (126), 79-91.
- Ertek, A., Şensoy, S., Küçükyumuk, C., and I. Gedik., 2006, Determination of plant-pan coefficients for field-grown eggplant (*Solanum melongena* L.) using class A pan evaporation values, *Agricultural Water Management*, 85, 58-66.
- El-Baltagi, Hossam S., and HebaI. Mohamed., 2013, ‘Reactive oxygen species, lipid peroxidation and antioxidative defense mechanism. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici*, 41.1: 44-57
- Fang, Y., Xiong, L., 2015, General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72:673–689.
- FAO, 2019. The State of Food and Agriculture, Erişim Tarihi, 06.01.2021. <http://www.fao.org/3/ca6030en/ca6030en.pdf>.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Farooq, M., Wahid A., Kobayashi, N., Fujita, D., Basra, SMA., 2009, Plant drought stress: effects, mechanisms and management, *Agronomy for Sustainable Development*, 29, 185–212.
- Fayez, A. K., Bazaid, A. S., 2014, Improving drought and salinity tolerance in barley by application of salicylic acid and potassium nitrate, *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 13,45–55.
- Fernandez- Conde, M.E., De La Haba, P., Gonzalez- Fontes, A.,& Maldonado, J.M., 1998, Effect of drought (water stress) on growth and photosynthetic capacity of cotton (*Gossypium hirsutum* L.), In %th Internet World Congress for Biomedical Sciences, 7-16.
- Fu-Fan, H., Ding, L., Xia Du, C., and Wu, X., 2014, Effect of short-term water deficit stress on antioxidative systems in cucumber seedling roots, *Annual et al. Botanical Studies*, 55, 46-53.
- Gratao, P.L., Polle, A., Lea P.J., Azevedo, R.A. 2005, Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier, *Functional Plant Biology*, 32, 481–494.
- Guan, W., Maynard, E. T., Aly, B., Zakes, J., Egel, D. S., Ingwell, L.L., 2019, parthenocarpic cucumber cultivar evaluation in high-tunnel production, *Horticultural Technology*, 29(5), 634-642.
- Gulen, H., Kesici, M., Cetinkaya, C., & Ergin, S., 2018, Proline and antioxidant enzyme activities in some strawberry cultivars under drought and recovery, *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*,46(2), 570-578.
- Gunes, A., Soylemezoglu, G., Inal, A., Bagci, E. G., Coban, S., & Sahin, O., 2006, Antioxidant and stomatal responses of grapevine (*Vitis Vinifera* L.) to Boron Toxicity, *Scientia Horticulturae*, 110(3), 279-284.
- Gülen, H., 2000, Ayva ve armutlarda anaç/kalem ilişkilerinin izoenzim analizleriyle araştırılması, Doktora tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 136 s.
- Gülen, H., Arora, R., Küden, A., Krebs, S.L., Postman, J., 2002, Peroxidase isozyme profiles in compatible and incompatible pear/quince graft combinations, *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 127(2): 152-157.
- Gülen, H., Eriş, A., 2003, Some physiological changes in strawberry (*Fragaria x ananassa* cv. *Camarosa*) plants under heat stress, *Journal of Horticultural Scienc and Biotechnology*, 78, 894-898.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Güzel, A., 2006, Kuraklık stresine maruz bırakılan domates bitkilerinde bazı fizyolojik büyüme parametreleri üzerine absisik asit (ABA) ve kalsiyum (Ca) etkisinin incelenmesi, Yüksek lisans tezi, Mersin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 104 s.
- Hameed A., Bibi, N., Akhter, J., Iqbal, N., 2011, Differential changes in antioxidants, proteases, and lipid peroxidation in flag leaves of wheat genotypes under different levels of water deficit conditions, *Plant Physiology Biochemistry*, 49, 178-185.
- Horvath, E., Pál, M., Szalai, G., Páldi, E., & Janda, T., 2007, Exogenous 4-hydroxybenzoic acid and salicylic acid modulate the effect of short-term drought and freezing stress on wheat plants, *Biologia plantarum*, 51(3), 480-487.
- Huystee, R.B.V. 1987, Some molecular aspects of plant peroxidase biosynthetic studies, *Annual Review of Plant Physiology*, 38: 205-219.
- İpek, M., 2015. In vitro şartlarda Garnem ve Myrobolan 29C anaçlarının kurak stresine karşı tepkilerinin belirlenmesi. Doktora tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 142 s.
- Jaleel, C.A., Manivannan, P., Wahid, A., Farooq, M., Somasundaram, R., Panneerselvam R., 2009, Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition, *International Journal of Agriculture Biology*, 11, 100–5.
- Jungklang, J., Saengnil, K., Uthaibutra, J., 2017, Effects of water-deficit stress and paclobutrazol on growth, relative water content, electrolyte leakage, proline content and some antioxidant changes in *Curcuma alismatifolia* Gagnep cv. Chiang Mai Pink, *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24, 1505–1512.
- Kalefetoğlu, T., Ekmekçi Y., 2005, The effects on drought on plants and tolerance mechanisms, *Gazi Üniversitesi Journal of Science*, 18, 723-740.
- Keyvan, S., 2010, The effects of drought stress on yield, relative water content, proline, soluble carbohydrates and chlorophyll of bread wheat cultivars, *Journal Animal and Plant Sciences*, 8, 1051–60
- Khoyerdı, F.F., Shamshiri, M.H. and Estaji, A., 2016, Changes in some physiological and osmotic parameters of several pistachio genotypes under drought stress, *Scientia Horticulturae*, 198, 44–51.
- Kim TY., Lee SH., Ku H., Lee SY., 2019, Enhancement of drought tolerance in cucumber, *Plants by Natural Carbon Materials*. *Plants (Basel)*. Oct 24;8(11):446.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kishor, PBK., Sangam, S., Amrutha R.N., Laxmi, P.S., Naidu, K.R., et al., 2005, Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance, *Current Science*, 88:424–438.
- Kutlu, İ., Turhan, E., Yorgancılar, Ö., Yorgancılar, A., 2017, Kuraklık stresinde buğday genotiplerinde verim komponentleri ve antioksidan enzim metabolizmasında değişimler, *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Doğa Bilimleri Dergisi*, 20 (Özel Sayı), 273-277
- Levitt, J., 1980, Responses of plants to environmental stresses, Vol. I, Academic Pres, New York, pp: 347-370.
- Lipiec, J., Doussan, C., Nosalewicz, A., Kondracka, K., 2013, Effect of drought an heat stresses on plant growth and yield: a review, *International Agrophysics*, 27(4): 463-477.
- Lisar, S. Y., Motafakkerazad, R., Hossain, M. M., Rahman, I. M., 2012, Water stress in plants: causes, effects and responses, water stress, InTech, Croatia, 1-14,
- Liu, B., Li, M., Cheng, L., Liang, D., Zou, Y. ve Ma, F., 2012, Influence of rootstock on antioxidant system in leaves and roots of young apple trees in response to drought stress, *Plant Growth Regulation*, 67 (3), 247-256.
- Liu, C., Liu, Y., Guo, K., Fan, D., Li, G., Zheng, Y., Yu, L., Yang, R., 2011, Effect of drought on pigments, osmotic adjustment and antioxidant enzymes in six woody plant species in karst habitats of southwestern China, *Environmental and Experimental Botany*, 71, 2, 174-183.
- Lotfi, A., Zahra, J., Jinggui, F., Faezeh, F. ve Seyed, S., 2015, Differential response of organic metabolites and antioxidant defense systems to drought stress in five 101 varieties of pistachio (*Pistacia vera* L.), *International Journal Of Current Life Sciences*, 5 (2), 287-295.
- Lv, J., Qi, J., Shi, Q., Shen, D, Zhang, S., Shao, G., et al., 2012, Genetic diversity and population structure of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plos One* 7(10): e46919
- Madhava Rao, KV, Raghavendra, AS, Janardhan Reddy, K., 2006, Physiology and molecular biology of stress tolerance in plants, The Netherlands, Springer.
- Mafakheri A, Siosemardeh, A., Bahramnejad, B., Struik, PC., Sohrabi, E., 2010, Effect of drought stress on yield, proline and chlorophyll contents in three chickpea cultivars. *Amer J Chin Study*, 4, 580–5.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Maldonado, CA., Zungga, GE., Corcuera, LJ., Alberdg, M., 1997. Effect of water stres on frost resistance of oat leaves. *Enviromental and Experimental Botany*,38: 99- 107.
- Masaki, Y., Hanasaki, N., Takahashi, K., Hijioka, Y., 2015, Propagation of biases in humidity in the estimation of global irrigation water, *Earth Systems and Environment*, 6: 461-484.
- Mittler, R., 2002, Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance, *Trends in Plant Science*, 7, 405–410.
- Moller, I.M., Jensen, P.E., Hansson, A., 2007, Oxidative modifications to cellular components in plants, *Annual Review of Plant Biology*, 58: 459-481.
- Monakhova, O.F., Chernyadev, I.I., 2002, Protective role of kartolin-4 in wheat plants exposed to soil drought, *Applied and Environmental Microbiology*, 38: 373–380.
- Nakano, Y., Asada, K., 1980, Spinach chloroplasts scavenge hydrogen peroxide on illumination. *Plant Cell Physiology*, 21: 1295-1307.
- Nayyar, H., Gupta, D., 2006, Differential sensitivity of C3 and C4 plants to water deficit stress: Association with oxidative stress and antioxidants, *Environmental and Experimental Botany*, 58: 106–113.
- Nezhadahmadi, A., Hossain Prodhan, Z., Faruq, G., 2013, Drought tolerance in wheat, *The Scientific World Journal*, 1–12.
- Nikolaeva, M.K., Maevskaya, S.N., Shugaev, A.G., et al., 2010, Effect of drought on chlorophyll content and antioxidant enzyme activities in leaves of three wheat cultivars varying in productivity, *Russion Journal of Plant Phsiology* 57,87–95.
- Odabaşoğlu, F., 1998, Ispanak bitkisinde pestisitler ve bitkisel hormonlar ile muamelenin bazı enzim aktiviteleri üzerine etkileri, Doktora Tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Van
- Oliveira Neto, C. F., Lobato, A. K. S., Gonçalves-Vidigal, M. C., Costa, R. C. L., Santos Filho, B. G., et al., 2009, Carbon compounds and chlorophyll contents in sorghum submitted to water deficit during three growth stages. *Journal Food Agricultural Environment*, 7, 588–593.
- Perez-Clemente, R.M., Montoliu, A., Zandalinas, S.I., de Ollas, C., GómezCadenas, A. 2012, Carrizo citrange plants do not require the presence of roots to modulate the response to osmotic stress, *Scientific World Journal*, 795396, 1-13.
- Rahdari, P., Hoseini, S.M., 2012, Drought stress: a review, *International Journal of Plant Production*, 3: 443–6.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Rajinder, S.D., Dhindsa, R.S., Plumb-Dhindsa, P., Thorpe, T.A., 1981, Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase, *Journal of Experimental Botany*, 32(1), 93-101
- Rana, R.M., Rehman, S.U., Ahmed, J., Bilal, M., 2013, A comprehensive overview of recent advances in drought stress tolerance research in wheat (*Triticum aestivum* L.), *Asian Journal of Agriculture and Biology*, 1:29–37.
- Reddy, A.R., Chaitanya, K.V. Vivekanandan, M., 2004, Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants, *Journal of Plant Physiology* 161(11), 1189-1202.
- Reisfeld, R.A., Lewis, U.J., Williams, D.E. 1962, Disc electrophoresis of basic proteins and polyacrylamide gels, *Nature*, 195: 281-283.
- Rollins, J.A., Habte, E., Templer, S.E., Colby, T., Schmidt, J., Von Korff, M., 2013, Leaf proteome alterations in the context of physiological and morphological responses to drought and heat stress in barley (*Hordeum vulgare* L.), *Journal of Experimental Botany*, 64: 3201-3212.
- Romanello, G.A., Chuchra-Zbytniuk, K.L., Vandermer, J.L., Touchette, B.W., 2008, Morphological adjustments promote drought avoidance in the wetland plant *Acorus Americanus*, *Aquatic Botany* 89: 390–396
- Saleska, S.R., Didan, K., Huete, A.R., Da Rocha, H.R., 2007, Amazon forests green-up during 2005 drought, *Science* (80) 318-612.
- Sanchez-Rodriguez, E., Rubio-Wilhelmi, M.M., Cervilla, L.M., Blasco, B., Rios, J., et al., 2010, Genotypic differences in some physiological parameters symptomatic for oxidative stress under moderate drought in tomato plants, *Plant Science*, 178: 30–40.
- Sankar, B., Abdul Jaleel, C., Manivannan, P., Kishorekumar, A., Somasundaram, R. And Panneerselvan, R., 2007, Drought-Induced biochemical modifications and proline metabolism in *Abelmoschus Esculentus* L. *Mönchengladbach Acta Botanica Croatica*, 66 (1):43-56.
- Sapeta, H., Costa, M., Lourenc, T., Marocod, J., Van der Linde, P., Oliveiraa, MM., 2013, Drought stress response in *Jatropha curcas*: growth and physiology, *Environmental and Experimental Botany*, 85:76–84.
- Schymanski, S.J., Or, D., 2015, Wind increases leaf water use efficiency, *Plant, Cell and Environment*, 39: 1448-1459.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Shabnam, N., Tripathi, I., Sharmila, P. and Pardha-Saradhi, P., 2016, A rapid, ideal, and eco-friendlier protocol for quantifying proline, *Protoplasma* 253, 1577–1582. <https://doi.org/10.1007/s00709-015-0910-6>.
- Shahid, M., Saleem, M.F., Anjum, S.A., Shahid, M. and Afzal, I., 2017, Effect of terminal heat stress on proline, secondary metabolites and yield components of wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes, *Philippine Agricultural Scientist*, 100, 278–286.
- Shao, H.B., Chu, L.Y., Jaleel, C.A., Zhao, C.X., 2008, Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants, *Comptes Rendus Biologies*, 331:215–25.
- Sharma, P., Dubey, R. S., 2005, Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings, *Plant Growth Regulation*, 46: 209-21.
- Simova-Stoilova, L., Demirevska, K., Petrova, T., Tsenov, N. and Feller, U., 2008, Antioxidative protection in wheat varieties under severe recoverable drought at seedling stage, *Plant Soil and Environment*, 54:529–36.
- Sanchez, F. J., Andres, E. F., Tenorio, J. L. ve Ayerbe, L. 2004. Growth of epicotyls, turgor maintenance and osmotic adjustment in pea plants (*Pisum sativum* L.) subjected to water stress. *Field Crops Research*, 86: 81-90.
- Sivritepe, N., Erturk, U., Yerlikaya, C., Türkan, İ., Bor, M. ve Özdemir, F., 2008, Response of the cherry rootstock to water stress induced in vitro, *Biologia Plantarum*, 52 (3): 573-576.
- Terzi, A., Tezci, E., & Terzi, A.R., 2010, In examination on the attitudes towards teaching profession of the students of secondary school branch teacher training programs, *e-Journal of New World Sciences Academy*, 5(2) 367-388.. *e-Journal of New World Sciences Academy*. 5. 367-388.
- Topçu, N., & Altıncı, R. C., 2019, Drought tolerance of some wine grape cultivars under in vitro conditions, *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 36 (2), 145-152.
- Trenberth, K.E., Dai, A., Van Der Schrier, G., Jones PD, Barichivich, J., Briffa, K.R., Sheffield, J., 2014, Global warming and changes in drought, *Nature Climate Change*, 4:17–22.
- Tsugane, K., Kobayashi, K., Niwa, Y., Ohba, Y., Wada K., Kobayashi H., 1999, A recessive Arabidopsis mutant that grows photoautotrophically under salt stress shows enhanced active oxygen detoxification, *Plant Cell*, 11: 1195–1206.



**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Trenberth, K.E., Dai, A., Van Der Schrier, G., Jones PD, Barichivich, J., Briffa, K.R., Sheffield, J., 2014, Global warming and changes in drought, *Nature Climate Change*, 4:17–22.
- Tsugane, K., Kobayashi, K., Niwa, Y., Ohba, Y., Wada K., Kobayashi H., 1999, A recessive *Arabidopsis* mutant that grows photoautotrophically under salt stress shows enhanced active oxygen detoxification, *Plant Cell*, 11: 1195–1206.
- Türkan, I., Bor, M., Ozdemir, F., Koca, H., 2005, Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought-tolerant *P. acutifolius* Gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress, *Plant Science*, 168: 223–231.
- Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M., Foolad, M.R., 2007, Heat tolerance in plants: an overview, *Environmental and Experimental Botany*, 61: 199-223.
- Walter, M.H., 1992, Regulation of lignification in defense: plant gene research: genes involved in plant defense, Eds: Boller, T., Meins, F., Springer, Vienna, 327-352.
- Walter, J., Hein, R., Auge, H., *et al.*, 2012, How do extreme drought and plant community composition affect host plant metabolites and herbivore performance?, *Arthropod-Plant Interactions*, 6:15–25.
- Wang, Q.; Zhao, R.; Chen, Q.; da Silva, J.A.T.; Chen, L.; Yu, X., 2019, Physiological and biochemical responses of two herbaceous peony cultivars to drought stress. *Horticultural Science*, 54, 492–498.
- Wang, W.B., Kim, Y.H., Lee, H.S., Kim, K.Y., Deng, X.P., Kwak, S.S., 2009, Analysis of antioxidant enzyme activity during germination of alfalfa under salt and drought stresses, *Plant Physiol Biochemical* 47:570–577.
- Wang, Y., J.L. Li., Wang, J.Z. and Li, Z.K., 2010, Exogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> improves the chilling tolerance of manila grass and mascarene grass by activating the antioxidative system, *Plant Growth Regulation*, 61: 195-204.
- Wehner, G.G., Balko, C.C., Enders, M.M., Humbeck, K.K., Ordon, F.F., 2015, Identification of genomic regions involved in tolerance to drought stress and drought stress induced leaf senescence in juvenile barley, *BMC Plant Biology*, 15, 125.
- Wendel, J.F., and Weeden, N.F., 1989, Visualization and interpretation of plant isozymes. *Isozymes: Plant Biology, Education*, 5, 44.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Xoconostle- Ca'zares B., Ramirez- Ortega, F.A., Flores-Elenes, L., Ruiz- Medrano,R., 2010, Drought tolerance in crop plants, *Amerikan Journal of Plant Sciences*, 5: 241-256
- Yamaguchi, A., Hiyoshi, N., Sato, O., Shirai, M., 2011, Sorbitol dehydration in high temperature liquid water, *Green Chemistry*, 13,873
- Yordanov, I., Velikova, V., Tsonev, T. 2000, Plant responses to drought, acclimation, and stress tolerance, *Photosynthetica*, 38: 171–186.
- You J, Hu H, Xiong L., 2012 , An ornithine  $\delta$ -aminotransferase gene OsOAT confers drought and oxidative stress tolerance in rice, *Plant Science*, 12;197:59-69.
- Yuan, C., Luo, Q., Yan, T., Meng, F. 2017, Physiological and proteomic analyses of the drought stress response in *amygdalus mira (koehne)* yü et lu roots, *BMC Plant Biology*, 17 (1), 53.
- Zare, M., Azizi, M.H., Bazrafshan, F., 2011, Effect of drought stress on some agronomic traits in ten barley (*Hordeum vulgare*) cultivars, *Technical Journal of Engineering and Applied Sciences*, 1:57–62.
- Zargar, S.M., Gupta, N., Nazir, M., Mahajan, R., Malik, F.A., Sofi, N.R., et al., 2017, Impact of drought on photosynthesis: molecular perspective, *Plant Gene*, 11: 154-159.
- Zeppel, M.J.B., Harrison, S.P., Adams, H.D., Kelley, D.I., Li, G., Tissue, D.T., et al., 2015, Drought and resprouting plants, *New Phytologist*, 206: 583-589.
- Zhang, C., Shi, S., 2018, Physiological and proteomic responses of contrasting alfalfa (*Medicago sativa* L.) varieties to peg-induced osmotic stress. *Frontiers in Plant Science*, 9:242.
- Zlatev, Z., Lidon, F.C., 2012, An overview on drought induced changes in plant growth, water relation and photosynthesis, *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 24:57–72.
- Zwiazek, J.J., Blake, T.J., 1990., Effects of preconditioning on electrolyte leakage and lipid-composition in black spruce (*Picea mariana*) stressed with polyethylene-glycol, *Physiol Plant* 79:71–77.

**EK AÇIKLAMALAR**

**Ek Açıklamalar:** Su Stresinin Hıyar Bitkisinde Antioksidatif Etkilerinin Belirlenmesi İçin Yapılan Analizlerin İstatistik Sonuçları

A: Lipid Peroksidasyonu ( $\mu\text{M/gTA}$ ) İnteraksiyon Tablosu .....	59
B: Yaprak Oransal Su Kapsamı (%) İnteraksiyon Tablosu .....	60
C: Turgor Kaybı (%) İnteraksiyon Tablosu .....	61
D: Prolin ( $\mu\text{M/gTA}$ ) İnteraksiyon Tablosu .....	62
E: Askorbat Peroksidaz Enzim Aktivitesi ( $\mu\text{M/mgprot.}$ ) İnteraksiyon Tablosu .....	63
F: Katalaz Enzim Aktivitesi ( $\mu\text{M/mgprot.}$ ) İnteraksiyon Tablosu .....	64

**Ek Açıklamalar-A: Lipid Peroksidasyonu ( $\mu\text{M/gTA}$ ) İnteraksiyon Tablosu**

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kareler Toplamı	F	Ö.D
Düzeltilmiş Model	184,706 <sup>a</sup>	3	61,569	8,643	,032
Kesişme	6099,419	1	6099,419	856,247	,000
Uygulama	58,545	1	58,545	8,219	,046
Günler	119,329	1	119,329	16,752	,015
Uygulama * Günler	6,833	1	6,833	,959	,383
Hata	28,494	4	7,123		
Toplam	6312,619	8			
Düzeltilmiş Toplam	213,200	7			

Ö.D: Önem Derecesi (%5)

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

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kareler Toplamı	F	O.D
Düzeltilmiş Model	175,327 <sup>a</sup>	3	58,442	40,796	,001
Kesişme	47514,623	1	47514,623	33167,563	,000
Uygulama	63,533	1	63,533	44,349	,001
Günler	71,880	1	71,880	50,176	,001
Uygulama * Günler	11,874	1	11,874	8,289	,035
Hata	7,163	5	1,433		
Toplam	48193,167	9			
Düzeltilmiş Toplam	182,490	8			

Ö.D: Önem Derecesi (%5)

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

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kareler Toplamı	F	O.D
Düzeltilmiş Model	131,170 <sup>a</sup>	3	43,723	37,695	,001
Kesişme	4976,499	1	4976,499	4290,366	,000
Uygulama	36,122	1	36,122	31,141	,003
Günler	56,384	1	56,384	48,610	,001
Uygulama * Günler	16,328	1	16,328	14,077	,013
Hata	5,800	5	1,160		
Toplam	5556,789	9			
Düzeltilmiş Toplam	136,970	8			

Ö.D: Önem Derecesi (%5)

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

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kareler Toplamı	F	Ö.D
Düzeltilmiş Model	2922681,287 <sup>a</sup>	3	974227,096	121,968	,000
Kesişme	7503951,281	1	7503951,281	939,454	,000
Uygulama	1142226,587	1	1142226,587	143,001	,000
Günler	1126417,063	1	1126417,063	141,021	,000
Uygulama * Günler	937610,060	1	937610,060	117,384	,000
Hata	79875,652	10	7987,565		
Toplam	9908726,931	14			
Düzeltilmiş Toplam	3002556,940	13			

Ö.D: Önem Derecesi (%5)

**Ek Açıklamalar-E: Askorbat Peroksidaz Enzim Aktivitesi ( $\mu\text{M}/\text{mgprot.}$ )  
İnteraksiyon Tablosu**

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kareler Toplamı	F	Ö.D
Düzeltilmiş Model	2,198 <sup>a</sup>	3	,733	66,009	,000
Kesişme	1,900	1	1,900	171,204	,000
Uygulama	,690	1	,690	62,131	,000
Günler	,649	1	,649	58,447	,000
Uygulama * Günler	,551	1	,551	49,649	,000
Hata	,067	6	,011		
Toplam	4,733	10			
Düzeltilmiş Toplam	2,264	9			

Ö.D: Önem Derecesi (%5)



**Ek Açıklamalar-F: Katalaz Enzim Aktivitesi ( $\mu\text{M}/\text{mgprot.}$ ) İnteraksiyon Tablosu**

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kareler Toplamı	F	Ö.D
Düzeltilmiş Model	,6704 <sup>a</sup>	3	,223	9,547	,005
Kesişme	24,436	1	24,436	1044,923	,000
Uygulama	,131	1	,131	5,590	,046
Günler	,207	1	,207	8,868	,018
Uygulama * Günler	,332	1	,332	14,182	,005
Hata	,1875	8	,023		
Toplam	25,293	12			
Düzeltilmiş Toplam	,857	11			

Ö.D: Önem Derecesi (%5)