

Treated with Nitric Oxide Pepper Plant under Drought Stress Proline, Protein Determination of Relative Water Content and Chlorophyll amount

Fikret Yasar (Corresponding author)
Van Yuzuncu Yil University, Faculty of Agriculture,
Department of Horticulture, Van, Turkey
e-mail:fyasar@yyu.edu.tr

Ahmet Cengiz
Ministry of Agriculture, Food and Livestock,
Van Provincial Directorate, Van, Turkey

Abstract

The aim of this study was to determine the possible roles of NO (Nitric Oxide) which has the characteristic of messenger molecule in some metabolic changes under the effect of drought stress in plants and to determine the relationship between proline, protein, proportional water content and chlorophyll amounts. The study was carried out under controlled conditions in 16/8 hour light / dark photoperiod, 25 °C and 70% humid climate room. The plants were cultured in containers containing Hoagland nutrient solution. For application of drought stress, 10% Polyethylene Glycol (PEG 6000) was added to the nutrient solution which corresponds to the osmotic potential of -0.40 MPa. Before applying drought stress, different doses of pepper seedlings sodium nitroprusside (SNP) and potassium salt (carboxy-PTIO) were applied externally after SNP 0.01, SNP 1, SNP 100 and SNP 0.01 + cPTIO, SNP 1 + cPTIO, SNP. 100 + cPTIO. Sampling was performed on the 10th day of drought. After the total plant weights were measured, Proline, Protein, Proportional Water Content (OSI), and Chlorophyll content of the leaves of pepper plants were examined in order to clarify the damage mechanism of drought stress and the effect of stress on applications.

In terms of total plant weight, it was observed that the growth and growth of pretreated plants were better with 0.01 and 1 doses of SNP and an increase in Proline, Protein, OSI and Chlorophyll amounts.

Keywords: Pepper, *Capsicum annum*, carboxy-PTIO, Drought stress, Nitric oxide, Proline, Protein, Chlorophyll, SNP

DOI: 10.7176/JSTR/5-10-06

Not: Bu çalışma Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenen 2014-FBE-YL035 nolu projeden üretilmiştir.

Nitrik Oksit Uygulanmış Biber (*Capsicum annum*) Bitkisinin Kuraklık Stresi Altında Prolin, Protein, Oransal Su İçeriği ve Klorofil Miktarlarının Belirlenmesi

Özet

Deneme materyali olarak Demre sivri biber çeşidinin kullanıldığı çalışmanın amacı bitkilerde kuraklık stresi etkisi altında meydana gelen bazı metabolik değişikliklerde haberci molekül özelliğine sahip NO (Nitrik oksit) in muhtemel rollerini saptamak ve prolin, protein, oransal su içeriği ve klorofil miktarlarıyla arasındaki ilişkiyi tespit etmektir. Çalışma kontrollü şartlardaki 16/8 saatlik aydınlık/karanlık fotoperiyotta, 25 °C de ve % 70 nemli iklim odasında yürütülmüştür. Bitkiler, Hoagland besin çözeltisi içeren kaplarda kültüre alınmıştır. Kuraklık stresi uygulaması için besin çözeltisine -0,40 MPa ozmotik potansiyele denk olan %10 oranında Polietilen Glikol (PEG 6000) eklenmiştir. Kuraklık stresi uygulanmadan önce biber fideleri sodyum nitroprussid (SNP) ve potassium salt (carboxy-PTIO)'nun farklı dozları dışsal uygulandıktan sonra SNP 0,01, SNP 1, SNP 100 ve SNP 0,01+cPTIO, SNP 1+cPTIO,

SNP 100+cPTIO ile ön muameleye tabi tutulmuştur. Kuraklık uygulamasının 10. gününde örnek alma işlemi yapılmıştır. Toplam bitki ağırlıkları ölçüldükten sonra, alınan örneklerden, kuraklık stresinin zarar mekanizmasını ve uygulamaların strese olan etkisini aydınlatılabilmek için, biber bitkilerinin yapraklarında Prolin, Protein, Oransal Su İçeriği (OSİ), ve klorofil miktarları incelenmiştir. Toplam bitki ağırlığı bakımından SNP nin 0,01 ve 1 dozları ile ön muamele görmüş bitkilerin gelişimi ve büyümesi daha iyi gerçekleştiği, Prolin, Protein, OSİ ve Klorofil miktarlarında artış görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Biber, *Capsicum annum*, carboxy-PTIO, Kuraklık stresi, Nitrik oksit, Prolin, Protein, Klorofil, SNP

1. Giriş

Dünya bitkisel üretimini sınırlandıran başlıca çevresel stres faktörlerinden dolayı, yetiştiricilikte bitkinin normal ürün potansiyeline ulaşabilecek uygun alanların bulunması oldukça zordur. Bitkiler, hareket edemediklerinden dolayı çevresel koşullardaki değişikliklere ve olumsuz koşullara en fazla maruz kalan canlılardır. Yaşam döngüleri boyunca gerçekleşen kuraklık, tuzluluk, aşırı yağış, sıcaklık veya soğuk gibi iklimsel değişikliklere bağlı abiyotik stres koşulları bitki büyüme ve gelişmesini doğrudan etkilemektedir (Taiz ve Zeiger, 2010).

Bitkiler kurak koşullarla karşılaştıklarında, oluşan stresin süresine ve şiddetine bağlı olarak genetik yapıları gereği hayatta kalma ve nesillerini devam ettirme isteklerinden dolayı metabolik yapılarında köklü ve çarpıcı değişiklikler yapacak şekilde metabolizmalarını yeniden yapılandırabilirler (Yaşar ve ark., 2014).

Bitkilerde kuraklık stresi etkisi altında meydana gelen bazı metabolik değişikliklerden bir diğeri de, haberci molekül özelliğine sahip nitrik oksit (NO) dir. NO, bir nitrojen ve bir oksijen atomundan oluşan, lipofilik, gaz halinde bulunan, reseptöre bağımlı olmadan kolayca difüze olabilen, çok kısa yarı ömürlü, eşleşmemiş elektron içeren, serbest radikal olarak da nitelendirilen, renksiz, inorganik bir moleküldür (Olson ve Garban, 2008).

Nitrik oksit bitkilerde çeşitli fizyolojik fonksiyonları ile önemli bir sinyal molekülüdür. Bitkilerin tohumdan çiçeklenme evresine kadar büyüme ve gelişmesinde, meyvelerin olgunlaşmasında önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Ayrıca abiyotik ve biyotik faktörlerden kaynaklanan çevresel stresin oluşturduğu tehlike durumunda, NO farklı bitki türlerinde ve organlarında üretilebilmektedir. Nitrik oksit, oksidatif stres koşullarının verdiği zarara karşı çeşitli biyolojik yollarla bitkileri koruduğu kanıtlanan çok aktif bir moleküldür (Carlos ve Lorenzo, 2001). Nitrik oksit bitki hücrelerinde yararlı olduğu kadar zararlı etkiler de yaratabilir. Bu durum nitrik oksidin miktarına bağlıdır. Nitrik oksit hücrelerdeki iyon regülasyonu (Garcia-Mata ve ark., 2003), hücre duvarı ligninleşmesi (Ferrer ve RosBarcelo, 1999), yaşlı hücrelerdeki mitokondriyal ve kloroplastik işlevlerde (Leshem, 1996; Hung ve Kao, 2003), demir birikimi (Murgfa ve ark., 2002), gibi süreçlerde rol oynamaktadır. Nitrik oksit, H₂O₂ gibi sinyal moleküllerinin biyolojik etkilerine de aracılık edebilmektedir.

Kurak koşullar, aynı zamanda bitki hücre turgor basıncını yani su potansiyeli miktarını değiştirmektedir. Bitki hücrelerinin su stresinden en az etkilenmelerini sağlamak için ozmotik dengeleme çok önemlidir. Bu amaçla bitkiler kuraklık stresini algıladıklarında hücrelerinde “ozmolit” olarak isimlendirilen ve hücre turgor dengesinin korunmasında rol oynayan bir grup çözünür madde sentezler ve biriktirirler. Bu maddeler asparajin, prolin ve glisin gibi serbest amino asitler, betain, organik asitler ve karbonhidratlar gibi farklı gruplardan olabilmektedir. Su dengesini korumakla görevli olan ozmolitler bitkinin kuraklık stresine toleransını doğrudan arttırmazlar. Ancak, yaprak su basıncını dengeledikleri için stoma iletkenliğini artırır, fotosentezin devamlılığını sağlar ve böylece büyümeye yardımcı olurlar. Kurak koşullar oluştuğunda ilk biriken serbest amino asit prolin olduğu için bu molekülün hücre içi konsantrasyonu araştırmalarda gerçekleştirilen deneysel koşullarda bitkilerin su sıkıntısına girdiğini göstermek için sıklıkla kullanılan bir ölçüm değeridir. Prolinin hücre içi temel görevi, lipid oksidasyonunu engelleyerek membran sistemlerini ve oluşturdukları bileşikler aracılığıyla da protein yapılarını korumaktır. Ancak son yıllarda gerçekleştirilen çalışmalar, prolinin aynı zamanda sinyal iletiminde de görevli olabileceğini ve mitokondri fonksiyonlarının düzenlenmesi, hücre bölünmesi veya ölümü ve hatta gen anlatım seviyelerinin düzenlenmesinde de rol oynayan önemli bir serbest amino asit olabileceğini ortaya koymaktadır (Anjum ve ark., 2011; Liang ve ark., 2013; Kishor ve Sreenivasulu, 2014).

Bu çalışmanın amacı, bitkilerde kuraklık stresi etkisi altında meydana gelen bazı metabolik değişikliklerde haberci molekül özelliğine sahip NO (Nitrik oksit) in muhtemel rollerini saptamak ve

prolin, protein, oransal su içeriği ve klorofil miktarlarıyla arasındaki ilişkiyi tespit etmektedir.

2. Materyal ve Yöntem

2.1. Materyal

2.1.1. Bitki materyali

Biber (*Capsicum annuum*) bitkisinde kuraklık stresi ile nitrik oksit (NO, azot monoksit) arasındaki ilişkinin incelenmesini amaçlayan bu deneme, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bahçe Bitkileri Fizyoloji Laboratuvarında yürütülmüştür. SNP ve cPTIO'nun biber bitkisi üzerine etkileri araştırılmıştır. Çalışmada güçlü kök yapısına sahip, hastalıklara dayanıklı, yüksek verimi sahip olan Demre sivri biber çeşidi kullanılmıştır.

2.2. Yöntem

Biber tohumları ponza doldurulmuş plastik çimlendirme kaplarına yaklaşık 100 adet tohum ekildikten sonra sulanıp çimlendirmeye bırakılmıştır.

2.2.1. Biber (*Capsicum annuum*) Fidelerinin Yetiştirilmesi

Biber tohumları, ponza doldurulmuş 40x25x5 cm boyutlarındaki plastik çimlendirme kaplarına ekilerek, 16/8 saatlik aydınlık/karanlık fotoperiyotta, 25±2°C sıcaklık %70 nemde 500 µmol m⁻¹ s⁻¹ ışık yoğunluğuna sahip iklim odasına yerleştirilmiştir. İlk gerçek yaprakları görülmeye başlayan fidelerde sulama Hoagland besin çözeltisiyle (Hoagland ve Arnon, 1938) yapılmaya başlanmıştır. Ponza ortamında 2. gerçek yaprakları da oluşan fidelerin ön muamele işlemi kahverengi şişelerde 2 gün boyunca, ½ Hoagland çözeltisi içinde hazırlanan 0.01, 1, 100 µM konsantrasyonlardaki Nitrik oksit (NO) vericisi sodyum nitroprussid (SNP) ve Nitrik oksit (NO) yakalayıcısı 1µM cPTIO (potassium salt) [2-(4-karboksi-fenil)-4,5-dihidro-4,4,5,5-tetrametil-1H-imidazol-1-oksi-3-oksit] ile yapılmıştır. Daha sonra ön muamele görmüş ve ön muamele görmemiş fideler su kültürü ortamına alınmışlardır. Su kültürü için, Hoagland besin çözeltisi doldurulmuş 25x25x18 cm boyutlarındaki plastik küvetler kullanılmıştır. Birer haftalık aralarla besin çözeltileri tazelenmiş, bu sırada küvetlerin yerleri de değiştirilerek ışıklandırma koşullarından tüm bitkilerin eşit biçimde yararlanması sağlanmıştır.

2.2.2. Kuraklık stresinin Uygulanması

Kuraklık stresi uygulanmadan önce 3-4 gerçek yaprağa sahip olan 6 günlük fidelere 2 gün boyunca, ½ Hoagland çözeltisi içinde hazırlanan 0.01, 1, 100 µM konsantrasyonlardaki Nitrik oksit (NO) vericisi sodyum nitroprussid (SNP) ve Nitrik oksit (NO) süpürücüsü 1 µM c-PTIO (potassium salt) [2-(4-karboksi-fenil)-4,5-dihidro-4,4,5,5-tetrametil-1H-imidazol-1-oksi-3-oksit] ile ön muamele yapıldıktan sonra ½ Hoagland çözeltisine % 10 oranında Poli Etilen Glikol (PEG 6000) eklenerek oluşturulan PEG grubuna ve diğer uygulamalara (Kontrol hariç) % 10 oranında Poli Etilen Glikol (PEG 6000) eklenerek kuraklık stresi uygulanmıştır. Kuraklık uygulamasından sonra 10. günde hasat edilen bitkilerden örnekler alınmıştır.

2.2.3. Oransal su içeriği (OSİ) tayini

Her bir stres uygulamasının sonunda çeşit ve hattın 5 farklı yaprağından alınan 1 cm'lik yaprak disklerinde oransal su içeriği Farrant (2000)'e göre belirlenmiştir. Çeşitten 3 tekerrürün aynı seviyedeki yaprağı alınıp tartıldıktan sonra saf suyun içinde 5 saat bekletilmiştir. Daha sonra örnekler saf sudan çıkartılıp tekrar tartım yapılmıştır. Numaralandırılan kese kâğıtlarına konulan örnekler 72 saat 70 °C deki etüve yerleştirilerek kurutulmaya bırakılmış. Üç gün sonra etüvden çıkarılan kuru örnek ağırlıkları bir kez daha tartılmıştır. Bu değerler kullanılarak aşağıdaki formüle göre OSİ hesaplanmıştır.

$$OSİ = \left(\frac{\text{Taze ağı.} - \text{Kuru ağı.}}{\text{Tam Turgor ağı.} - \text{Kuru ağı.}} \right) \times 100.$$

2.2.4. Klorofil Tayini

Bitkiden ilk üç yaprak alınarak bu analizler yapılana kadar -84 °C deki derin dondurucuda saklanmıştır. -84 °C donmuş olan yaprak örneklerinde 200 mg alınarak %80'lik etanol içerisine konularak 80 °C su banyosunda 20 dakika süreyle bekletildikten sonra 654 nm absorbans değerleri spektrofotometrik olarak okundu, (Luna ve ark., 2000). Bu ölçümler sonunda yaş yaprak örneğindeki toplam klorofil miktarı aşağıdaki formül kullanılarak µg/mg taze ağırlık olarak belirlendi.

Klorofil= Absorbans değerleri x 1000/39.8 x Örnek miktarı

2.2.5. Total Çözünabilir Protein Miktarının Tayini

Taze ağırlığı alınan materyal pH 7 fosfat tamponu içinde soğuk havanlarda homojen hale gelene kadar ekstre edildi. Bu yöntemde bir organik boyar madde olan Commassie brillant blue G-250'nin proteindeki renklendirme özelliğinden yararlanır. Commassie brillant blue G-250, negatif yüklü olan ve proteindeki (+) yüklü gruplara bağlanan bir boyadır. Boya, kırmızı ($A_{max}=465$ nm) ve mavi ($A_{max}=595$ nm) formlarda bulunur. Kırmızı form çözültideki halidir, boya proteine bağlanınca mavi renk oluşur. Reaksiyon oldukça tekrarlanabilir ve hızlıdır. İki dakika içinde renk oluşur ve bir saat kadar stabil kalır (Robyt and White, 1987). Bradford yöntemi ile protein tayini yapılırken aşağıdaki işlemler uygulanmıştır.

2.2.5.1. Commassie Brilant Blue G-250 çözültisinin hazırlanması: 100 mg Commassie Brilant Blue G-250, 50 mL %95'lik etanolda çözüldükten sonra üzerine 100 ml %85'lik fosforik asit ilave edilmiştir, saf su ile 1L'ye tamamlanmıştır. Karanlıkta 1 gece karıştırılarak beklendikten sonra filtre kağıdı ile süzülerek hazır hale getirilmiştir.

2.2.5.2. BSA (bovine serum albumin): Stok çözültiden BSA standart eğrisini oluşturmak için tüplere örnek yerine konsantrasyonları belli olan standart çözültiden (BSA) 1'er ml eklenerek hazırlanmış ve aynen uygulanmıştır. 595 nm'de absorbans okutulur konsantrasyona karşı absorbans grafiği çizilir. Şahit çözülti için ise yine örnek yerine 1 mL saf su koyularak örnek için uygulanan prosedürün aynısı uygulanmıştır. Deney tüpüne analizi yapılacak örnekten 100 µL örnek konulur. Üzerine hazırlanan Bradford çözültisinden 5 mL eklenerek 5 dakika beklenir. Belirlenen absorbans değerlerinden standart ölçümler kullanılarak toplam çözünabilir protein miktarı belirlenmiştir.

2.2.6. Prolin Tayini

Bates ve ark. (1973), göre taze ağırlıkları alınan yaprak örnekleri 10 ml %3 sülfosalisilik asit içinde homojenize edilmiştir.

2.2.6.1. %3'lük sülfosalisik hazırlanması: 100 ml 3 gr tartılıp hazırlanınca %3 sülfosalisilik asit hazırlanmış olur.

2.2.6.2. Asit-ninhidrin hazırlanışı: 30 ml glasiyal asetik asit içine 1.25 g ninhidrin'in tartılıp konulur ve üzerine 20 ml 6M Fosforik asit eklenir, çalkalanarak çözüne kadar serin (4°C'de 24 saat kalır. Dondurulmuş bitki materyali, %3 sulu sülfosalisilik asit (0.01g / 0.5ml) ilave edildi ve tortu 12 000 g'de santrifüjle 10 °C'de 20 dakika kalır. Homojenleştirilmiş dokunun 1 ml'si 1 ml asit-ninhdin ve 1 ml glasiyal Asetik asit ile bir test tüpünde 100 °C'de 1 saat süreyle reaksiyona sokulur ve reaksiyon bir buz banyosu ile sona erdirilir. Reaksiyon karışımı, 2 ml toluen ile özütlenir, kuvvetli bir şekilde karıştırılır ve oda sıcaklığında iki faz ayrılınca kadar 30 dakika karıştırılır. Prolin konsantrasyonu, L-Prolin kullanılarak standart bir eğriden belirlenir. Reaksiyon ortamına 1 ml toluen ilave edilerek karıştırıldıktan sonra Toluen kör olarak kullanır ve üst sıvı alınarak küvetlerde 520 nm de ölçülmüştür. Standart olarak L-prolin kullanılıp sonuçlar µmol prolin/g.T.A. olarak hesaplanmıştır.

2.3. Değerlendirmenin Yapılması

Deneme, tesadüf parselleri deneme desenine göre 3 tekerrürlü ve her bir parselde 15 bitki olacak şekilde kurulmuştur. Denemede elde edilen veriler Duncan çoklu karşılaştırma testine tabi tutulmuş, uygulamalar arasındaki farklılıkların istatistiksel açıdan önemlilik derecesi ortaya konulmuştur. Bunun için, SAS (1985) paket programından yararlanılarak Duncan çoklu karşılaştırma testi yapılmış ve farklılık dereceleri, %0.5 düzeyinde harflendirme yoluyla gösterilmiştir.

3. Bulgular

PEG 6000 uygulanarak kuraklık stresi uygulanan biber bitkilerine ayrıca SNP ve SNP ile birlikte c PTIO ile ön uygulama yapıldığında biber bitkilerindeki kuraklık stresine olan tepkiler incelenmiştir (Çizelge 1).

Çizelge 1. Uygulamaların toplam bitki ağırlığı (g) ile yapraklarındaki Protein ($\mu\text{g/ml}$), Prolin ($\mu\text{mol/g YA}$), Klorofil ($\mu\text{g/g YA}$) ve Oransal su içeriği (%).

| Uygulama | Topl.Bit.Ağ. | Protein | Prolin | Klorofil | OSİ (%) |
|---------------------|--------------|----------|---------|----------|----------|
| KONTROL | 23,88 A | 0,188 BC | 0,005 B | 66,87 C | 79,34 A |
| PEG | 16,98 C | 0,295 A | 0,0043B | 60,51 C | 59,58 D |
| SNP 0,01+ PEG | 23,79 A | 0,184 BC | 0,0062A | 65,35 C | 66,11 C |
| SNP 1+ PEG | 23,09 A | 0,115 D | 0,0063A | 89,30 B | 74,43 AB |
| SNP 100+ PEG | 15,98 D | 0,138 CD | 0,002C | 82,40 B | 71,89 B |
| C.PTIO+SNP0,01+ PEG | 18,91 B | 0,143 CD | 0,0063A | 98,82 A | 75,19 AB |
| C.PTIO+SNP 1+ PEG | 15,48 D | 0,180 BC | 0,0023C | 85,78 B | 53,81 E |
| C.PTIO+SNP 100+ PEG | 9,77 E | 0,211 B | 0,002C | 81,84 B | 46,04 F |

Aynı sütunda aynı büyük harfi alan ortalamalar arasındaki fark $P \leq 0.05$ e göre önemsizdir.

Çizelge 1' de kuraklık stresi sonrası bitkilerde yapılan bazı fizyolojik ölçümler verilmiştir. Çizelgeye göre ele alınan bu kriterler istatistik olarak %5 hata sınırları içerisinde kalarak önemli oldukları saptanmış ve LSD testi sonuçları verilmiştir.

Biber bitkilerine PEG 6000 uygulaması sonucunda bitkilerin toplam bitki ağırlıklarını incelediğimizde uygulamalar arasında farklılıklar olduğu görülmüş, toplam bitki ağırlığı kontrole göre artış gösteren uygulamanın olmadığı, ancak kontrole aynı istatistik aralığında olan SNP 0,01+PEG ve SNP 1+PEG uygulamaları olmuştur. Diğerleri kontrole göre azalmıştır. En fazla azalma ise C.PTIO+SNP100 +PEG de görülmüştür (Çizelge 1).

Bitkilerin protein aktivitesini incelediğimizde uygulamalar arasında farklılıklar olduğu görülmüş, PEG ve C.PTIO+SNP100 uygulamalarında protein aktiviteyi kontrole göre artış gösterirken, SNP1, SNP 100 ve C.PTIO+SNP0,01 de uygulamalarda ise kontrole göre azalmışlardır. SNP 0,01 ve C.PTIO+SNP 1 ise kontrole aynı istatistikî grup aralığında bulunmuştur (Çizelge 1).

Biber bitkilerine PEG 6000 uygulaması sonucunda bitkilerin prolin aktivitesini incelediğimizde uygulamalar arasında farklılıklar olduğu görülmüş, C.PTIO+SNP0,01, SNP1 ve SNP 0,01 uygulamalarında prolin aktiviteyi kontrole göre artış gösterirken, C.PTIO+SNP 100, SNP 100 ve C.PTIO+SNP 1 de uygulamalarda ise kontrole göre azalmışlardır. PEG uygulaması ise kontrole aynı istatistikî grup aralığında bulunmuştur (Çizelge 1).

Biber bitkilerine PEG 6000 uygulaması sonucunda bitkilerin klorofil değerleri incelediğimizde uygulamalar arasında farklılıklar olduğu görülmüş, C.PTIO+SNP0,01, SNP 1, C.PTIO+SNP 1, SNP 100 ve C.PTIO+SNP 100 uygulamalarında klorofil değerleri kontrole göre artış gösterirken, SNP 0,01 ve PEG de uygulamalarda ise kontrole göre azalmışlardır. SNP 0,01 ve PEG uygulamaları ise kontrole aynı istatistikî grup aralığında bulunmuştur (Çizelge 1).

4. Tartışma ve Sonuç

Farklı dozlarda ön muameleye tabi tutulmuş biber bitkilerinin büyüme ve gelişme parametrelerinden kök, gövde ve yaprak ağırlığı bakımından SNP ve c.PTIO+SNP ile yapılan ön uygulamalarının 0,01 ve 1 μM luk dozları kuraklık uygulanmamış kontrol bitkileriyle aynı aralıkta oldukları, ön muamelesiz PEG uygulamasına göre çok daha iyi geliştikleri görülmüştür. SNP ve cPTIO+SNP nin 100 μM luk dozu olumlu etki yapmadığı gibi bitkilerin gelişmesi üzerine ön muamelesiz PEG' e göre bitkileri daha fazla strese soktuğu görülmüştür. Aynı durumlar yaprak sayısı, bitki boyu ve boğum arası bakımından da gözlemlenmiştir. Sekmen ve ark. (2005), de domates bitkisinde tuz stresi uygulayarak yaptıkları çalışmada ön muameleye tabi tutulmuş bitkilerin 28. gündeki kök ve gövde ağırlıkları ile uzunlukları ön muamelesiz tuz stresi uygulanmış bitkilere göre artış gösterdiğini bulmuşlardır. Aynı şekilde Tuna ve Eroğlu (2017), tuz stresi altındaki biber bitkilerine NO ön muamelesi uygulayarak bitkilerin stres altındaki kök gövde ve yaprak ağırlıklarına bakmışlardır. Bitkilerin kök, gövde ve yaprak gelişimleri kontrole göre azalırken ön muamelesiz tuz uygulamasına göre daha iyi geliştikleri tespit edilmiştir.

Yüzde 10 luk PEG 6000 ile kuraklık stresi uygulanmış biber bitkilerinin protein birikimleri bakımından PEG ile kuraklık stresine maruz bırakılmış biber bitkileri SNP ile ön muameleye tabi tutulduklarında kontrole göre azalma olsa bile SNP muamelesine tabi tutulmayan PEG uygulamasından daha yüksek

proteine sahip olmuşlardır. Fakat PEG ile birlikte SNP 100 ve cPTIO+SNP 100 dozlarının protein birikimine olumlu etkisi olmamıştır. Buradan da görülmüyor ki SNP dozları önemli bulunmuştur. En etkili doz SNP 0,01 dozu olmuştur. Sekmen ve ark. (2005), domatese tuz stresi ve ön uygulama yaparak yaptıkları çalışmada, stresin 0. gününde Stubble-Aid aktivatörünün uygulandığı bitkilerin protein miktarı kontrol bitkilerine göre %21'lik bir artış olduğu görülmüştür. Kireççi (2012), hassas ve tolerant buğday çeşidine kuraklık ile birlikte farklı dozlarda SNP uygulayarak yapmış olduğu çalışmada PEG ile birlikte SNP nin en düşük dozu olan 10 µM da protein birikimi en yüksek düzeyde bulunmuş, SNP nin dozu arttıkça 100 µM da protein birikiminde düşüş olmuş, en düşük protein birikimi 1000 µM SNP dozunda olmuştur. Benzer şekilde Mohammadkhan ve Heidari (2008), kuraklık stresi uyguladıkları mısır bitkisinde, Liu ve ark. (2011), soğuk stresi uyguladıkları hıyar (*Cucumis sativus* L.) bitkisine dışsal olarak uyguladıkları SNP'nin düşük konsantrasyonlarda toplam çözünebilir protein miktarında artış, yüksek konsantrasyonda ise azalış meydana getirdiğini bildirdikleri çalışmalar da bizim yaptığımız çalışmadan elde ettiğimiz sonuçlarla uyum göstermiştir. Diğer parametrelerde olduğu gibi c.PTIO nun SNP ile birlikte bitkilerin ön muamelesinde kullanılmasının olumlu etkisi olmadığı gibi olumsuz etkisinin olduğunu söylemek mümkündür. Çünkü SNP 0,01 dozu ile SNP 1µM dozları tüm parametrelerde kuraklık zararını önleyici etkisinin olduğu görülürken, c.PTIO+SNP1+PEG uygulamasında kuraklık zararını önlemediğini görmekteyiz.

Kuraklık uygulaması ile bitkilerin oransal su içerikleri bakımından kontrol uygulaması en yüksek değerde bulunmuş, onu c.PTIO + SNP 0,01+PEG uygulaması ile SNP 1 + PEG uygulaması almıştır. En düşük değerler ön muamelesiz PEG den sonra c.PTIO + SNP 1+PEG ve c.PTIO + SNP 100+PEG olmuştur. Burada da c.PTIO ların pozitif etkisinden ziyade negatif etkilerinin olduğu görülmektedir. SNP nin 0,01 ve 1 µM luk dozlarının pozitif etki ettiği 100 µM luk dozunun pekçok parametrede negatif etki yaptığı görülmesine karşın OSİ de kontrole göre az olmasının yanında orta düzeyde bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda benzer sonuçlar elde edilmiştir (Kireççi, 2011). Kuraklığa hassas ve tolerant iki çeşitle yaptığı çalışmada kuraklığa dayanıklı çeşidin yüksek seviyede OSİ ne sahip olduğunu ve SNP'nin bunda etkili olduğunu, SNP nin de dozlarının önemli olduğunu yüksek dozlarının olumlu etkiye sahip olmadığını belirtmiştir. Kurağa tolerant olan bitkinin kuraklık stresi koşullarında aşırı su kaybından kaçınmak amacıyla transpirasyon oranını kontrol altında tuttukları ve hücre içinde prolin gibi organik asitlerin birikimin artırdıkları düşünülmektedir. Sairam ve ark. (2000), farklı buğday genotiplerine uyguladıkları tuz stresinden, Kulkarni ve ark. (2010), *Ziziphus mauritiana* ya kuraklık stresi uygulanarak yaptığı çalışmada benzer sonuçlar elde etmişlerdir. Tian ve Lei. (2006), yaptıkları çalışmada; SNP ve cPTIO kullanarak dışsal NO'nun ozmotik stres uygulanmıştır. Bitkilere uygulanan SNP yapraklardaki su kaybının azalmasını engellemiş ve dolayısıyla oransal su içeriğinin yüksek olmasını sağlamış ve bu durumun yüksek prolin içeriğine neden olduğunu belirtmişlerdir. Bunun yanında SNP'nin bu etkilerinin cPTIO ile tersine çevrildiği sonucuna varılmıştır. Sonuçlardan NO'nun buğday yapraklarında ozmotik stresin neden olduğu spesifik hasarları engellediği rapor edilmiştir. Zhao ve ark. (2008), yaptıkları çalışmada NO, oksit süpürücüsü olan cPTIO'nun, SNP'nin aracılık ettiği korunmayı bloke ettiği belirtilmiştir. Ön muamelesiz PEG uygulaması ile kıyaslandığında cPTIO tarafından içsel NO'nun tüketildiğinden ve oksidatif strese neden olduğundan bahsedilmiştir.

Biber bitkilerine PEG 6000 ile uygulanan kuraklık stresinin etkisinin azalıp azalmayacağını anlamak için kuraklık uygulanmadan önce NO vericisi olan SNP ve cPTIO uygulanmıştır. Bu uygulamalar sonucunda SNP 0,01 + PEG, SNP 1 + PEG ve SNP 0,01 +cPTIO + PEG uygulamalarında kontrole göre daha yüksek klorofil birikimine sahip olmuşlardır. SNP nin yüksek dozu kontrolden daha düşük klorofil miktarına sahip olmuştur. Diğer parametrelerde olduğu gibi klorofil miktarının artışına cPTIO nun olumlu etkisinin olmadığı görülmüştür. Farklı araştırmacıların farklı bitkilerde yapmış oldukları çalışmalarda benzer sonuçlar elde etmişlerdir. Lei ve ark. (2007), yaptıkları çalışmada, 0,2 mM SNP ön uygulamasının buğday filizlerinin büyümesini geliştirdiğinin yanında, bitki yapraklarındaki toplam klorofil miktarını artırdığını ve NO'nun ozmotik stresin azaltılıp azaltılmamasının uygulanan SNP konsantrasyona bağlı olduğunu belirtmişlerdir. Tuna ve ark. (2017), biberde yaptıkları tuz stres uygulamasında, NaCl+NO uygulamasını ön uygulamasız NaCl uygulaması ile kıyaslandığında toplam klorofil içeriğinde %34 civarında bir artışın olduğu görülmüştür. Kuraklığa bağlı olarak bitkilerin fotosentetik elektron transferi ve klorofil miktarlarında azalmaların olduğu daha önceki yapılan çalışmalarda da belirtilmiştir (Fu ve Huang, 2001; Türkan ve ark., 2005; Yaşar ve ark., 2008a; Yaşar ve ark., 2010).

Sonuç olarak, SNP uygulamasının bitki gelişimini artırdığı ve yüksek oranda su içeriğinde artışa sebep olması demek hücre içindeki organik asitlerin oranında artışların olduğunu ve bitkinin normal gelişim metabolizmasını devam ettirdiğinin göstergesi olabileceği kanısındayız.

5. Kaynaklar

- Anjum, S.A., Xie, X., Wang, L., Saleem, M.F., Man, C., Lei, W., 2011. Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. *African Journal of Agricultural Research*, 6: 2026-2032.
- Bates, L.S., Waldren, R.P., Teare, I.D., 1973, Rapid Determination of Free Proline for Water-Stress Studies, *Plant Soil*, 39, 205-207.
- Carlos, G.M., Lorenzo, L., 2001. Nitric Oxide Induces Stomatal Closure and Enhances the Adaptive Plant Responses against Drought Stress. *Plant Physiology*, 104, 1015-1025.
- Farrant J. M., 2000. A comparison of mechanisms of desiccation tolerance among three angiosperm resurrection plant species, *Plant Ecology*, 151: 29-39.
- Ferrer, M.A., Ros-Barcelo, A., 1999. Differential Effects of Nitric Oxide on Peroxidase and H₂O₂ Production by The Xylem of Zinnia Elegans. *Plant Cell Environ Journal*, 22, 891-897.
- Fu, J., Huang, B., 2001. Involvement of antioxidants and lipid peroxidation in the adaptation of two cool-season grasses to localized drought stress. *Environmental and Experimental Botany*, 45: 105-114.
- Garcia-Mata, C., Lamattina, L., 2001. Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress. *Plant Physiology*, 126, 1196-1204.
- Hung, K.T., Kao, C.H., 2003. Nitric Oxide Counteracts the Senescence of Rice Leaves Induced by Abscisic Acid. *Journal of Plant Physiology*, 160 (8),871-879.
- Kireççi O.A., ve Yürekli F., 2011. The relationship between nitric oxide and plant. *Acephala Dc, Acta Biologica Hungarica*, vol.62, pp.463-476.
- Kireççi, O.A., 2012. *Kuraklık Stresine Maruz Birakılan Triticum aestivum L. (Buğday) Çeşitlerinde Sinyal İletiminde Rol Oynayan Bazı Biyomoleküllerin Araştırılması*, İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü doktora tezi.
- Kishor, P.B., Sreenivasulu, N., 2014. Is proline accumulation *per se* correlated with stress tolerance or is proline homeostasis a more critical issue? *Plant Cell Environ.*, 37: 300-311.
- Kulkarni, M., Schneider, B., Raveh, E., Tel-Zur, N., 2010. Leaf anatomical characteristics and physiological responses to short-term drought in *Ziziphus mauritiana* (Lamk.) *Scientia Horticulturae, Article in press*, 124: 316-322
- Lei, Y., Yin, J., Li, C., 2007. Effects of osmotic stress and sodium nitroprusside pretreatment on proline metabolism of wheat seedlings. *Biologia Plantarum* 51 (2):386-390.
- Leshem, Y.Y., Haramaty, E., 1996. The characterization and contrasting effects of the nitric oxide free radical in vegetative stress and senescence of *Pisum sativum* Linn. foliage. *Journal Plant Physiology*, 148, 258-263.
- Liang, X., Zhang, L., Natarajan, S.K., Becker, D.F., 2013. Proline mechanism of stress survival. *Antioxidants Redox Signaling*, 19: 998-1011.
- Liu, X., Wang, L., Liu, L., Guo, Y.g., and Ren, H., 2011. Alleviating effect of exogenous nitric oxide in cucumber seedling against chilling stress. *African Journal of Biotechnology Vol. 10* (21), pp. 4380-4386.
- Luna, C., Seffino, L. G., Arias, C., ve Taleisnik, E., 2000. Oxidative Stress Indicators as Selection Tools for Salt Tolerance in *Chloris gayana*.. *Plant Breeding*. 119: 341-345.

- Mohammadkhani, N., Heidari, R., 2008. Effects of drought stress on soluble proteins in two maize varieties *Turkish Journal of Biology*, 32, 23-30.
- Murgfa, L., Delledorme, M., Soave, C., 2002. Nitric Oxide Mediates Iron-Induced Ferritin Accumulation in Arabidopsis. *Plant Journal*, 30, 521-528.
- Olson, SY., Garban, HJ., 2008. Regulation of apoptosis-related genes by nitric oxide in cancer. *Nitric Oxide* 19: 170-176.
- Robyt, J. F., White, B. J. 1987. *Biochemical Techniques: Theory and Practice*. Brooks/Cole, Monterey, CA.
- Sairam, R.K., Rao, K.V., Srivastava, G.C., 2002. Differential response of wheat genotypes to term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. *Plant Science*, 163:1037– 46.
- SAS., 1985. *Sas/State User's Guide 6.03 ed.* SAS. Ins. Cary. N.C.
- Sekmen, H., Demiral, T., Tosun, N., Türküsay, H., Türkan, İ., 2005. Tuz Stresi Uygulanan Domates Bitkilerinin Bazı Fizyolojik Özellikleri ve Toplam Protein Miktarı Üzerine Bitki Aktivatörünün Etkisi. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 42(1):85-95
- Taiz L, Zeiger E., 2010. Responses and adaptations to abiotic stress. In: *Plant Physiology*, Fifth Edition. Sunderland, MA: *Sinauer Associates, Inc.* pp. 755-778. ISBN 978-0-87893- 866-7928
- Tian, X., Lei, Y., 2006. Nitric oxide treatment alleviates drought stress in wheat seedlings. *Biologia Plantarum* 50 (4):775-778.
- Tuna, A. L., Eroğlu, B., 2017. Tuz stresi altındaki biber (*Capsicum annuum* L.) bitkisinde bazı organik ve inorganik bileşiklerin antioksidatif sisteme etkileri. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi/Anadolu Journal of Agricultural Sciences*, 32 (2017) 121-131.
- Türkan, İ., Bor, M., Özdemir, 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 Sciences*, 168: 223-231.
- Yaşar, F., Ellialtıoğlu, Ş., Yıldız, K., 2008a., "Effect of salt stress on antioxidant defense systems, lipid peroxidation and chlorophyll content in green bean (*Phaseolous vulgaris* L.), *Russian Journal of Plant Physiology*, 55 (6): 1-5.
- Yaşar, F., Uzal, Ö., Özpınar, T., 2010. Changes of the lipid peroxidation and chlorophyll amount of green bean genotypes under drought stress, *African Journal of Agricultural Research* Vol. 5(19), pp. 2705-2709.
- Yaşar, F., Üzal, Ö., Köse Ş., Yaşar, Ö., Ellialtıoğlu, S., 2014. Enzyme activities of certain pumpkin (*Cucurbita* spp) species under drought stress, *Fresenius Environmental Bulletin*, vol.23, pp.1093-1099.
- Zhao, H., Tan, J., Hong, J., Han, Y., Li, H., Zhao, W., 2008. Effects of exogenous nitric oxide on photosynthesis, antioxidant capacity and proline accumulation in wheat seedlings subjected to osmotic stress. *World Journal of Agricultural Sciences*, 4 (3):307-313.