

**BAKIR STRESİNE MARUZ KALMIŞ İKİ FARKLI DOMATES ÇEŞİDİNDE
PROLİNİN ÇİMLENME ÜZERİNE İYİLEŞTİRİCİ ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Fatih COŞKUN

**Yüksek Lisans Tezi
Biyoloji Anabilim Dalı**

**Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Mehmet DEMİRALAY**

2020

Artvin

**T.C.
ARTVİN ÇORUH ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**BAKIR STRESİNE MARUZ KALMIŞ İKİ FARKLI DOMATES ÇEŞİDİNDE
PROLİNİN ÇİMLENME ÜZERİNE İYİLEŞTİRİCİ ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Fatih COŞKUN

**Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Mehmet DEMİRALAY**

Artvin-2020

TEZ BEYANNAMESİ

Artvin oruh Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsüne Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum ‘‘Bakır Stresine Maruz Kalmış İki Farklı Domates eşidinde Prolinin Bakır Stesine Karşı İyileştirici Etkilerinin Araştırılması’’ başlıklı bu çalışmayı başından sonuna kadar danışmanım Dr. Öğretim Üyesi Mehmet DEMİRALAY‘ın sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı/yaptırıldığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.
15/01/2020

Fatih COŞKUN

İmza

T.C.
ARTVİN ÇORUH ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**BAKIR STRESİNE MARUZ KALMIŞ İKİ FARKLI DOMATES ÇEŞİDİNDE
PROLİNİN BAKIR STRESİNE KARŞI İYİLEŞTİRİCİ ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Fatih COŞKUN

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih :15/01/2020

Tezin Sözlü Savunma Tarihi :24/01/2020

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Mehmet DEMİRALAY.....

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Melahat ÖZCAN

Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üyesi Fuat YETİŞSİN

ONAY:

Bu Yüksek Lisans / Doktora Tezi, Artvin Çoruh Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından .../.../..... tarihinde uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun .../.../..... tarih ve sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

.../.../.....

Doç. Dr. Hilal TURGUT
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

“Bakır Stresine Maruz Kalmış İki Farklı Domates Çeşidinde Prolinin Çimlenme Üzerine İyileştirici Etkilerinin Araştırılması” isimli araştırma; Artvin Çoruh Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans tezi olarak hazırlanmıştır.

Tez çalışması süresince tecrübesini ve bilgisi ile araştırmalarımnda bana yol gösterici olan danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Mehmet DEMİRALAY’a teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarında ve elde edilen verilerinin analiz edilmesinde yardımlarını esirgemeyen Öğr. Gör. Kamil ÖZTÜRK, Öğr. Gör. Kemal Vehbi İMAMOĞLU ve Arş. Gör. Burak KILIÇ’a, arazi çalışmalarımnda deney materyali tedarik edilmesinde önemli katkıları olan annem Perihan COŞKUN’a ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen eşim Yağmur COŞKUN’a teşekkür ederim.

Ayrıca tez çalışmam için gerekli teknik donanım ve sarf malzemenin temini konusunda 2017.F10.02.07 nolu proje ile destek sunan Artvin Çoruh Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne teşekkürlerimi sunmak isterim.

Bu çalışmanın bilim dünyasına, araştırmacılara ve uygulayıcılara yardımcı olmasını dilerim.

Fatih COŞKUN
Artvin 2020

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
TEZ BEYANNAMESİ	I
ÖNSÖZ	I
İÇİNDEKİLER	II
ÖZET	IV
SUMMARY	V
ŞEKİLLER DİZİNİ	VI
TABLolar DİZİNİ	VII
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş	1
1.2. Domates	2
1.3. Bitkilerde Stres	4
1.3.1. Stres Çeşitleri	4
1.3.2. Bitkilerde Ağır Metal Stresi	5
1.3.3. Bakır ve Fazlalığı.....	8
1.3.4. Bitki Büyümesi Üzerine Bakır Stresinin Etkisi.....	9
1.4. Prolin.....	10
2. MATERYAL METOD	13
2.1. Bitki Materyalinin Hazırlanması	13
2.2. Etkin Bakır Stresi, İyileştirici Prolin Konsantrasyonlarının Belirlenmesi ve Deney Tasarımı	13
2.3. Çimlenme Sayılarının ve Ortalama Kök Boylarının Belirlenmesi	15
2.4. Temel Stres Parametrelerinin Ölçümü.....	15
2.4.1. Nisbi Su İçeriği.....	15
2.4.2. Klorofil ve Karotenoid İçeriği.....	16
2.4.3. Lipit Peroksidasyonu Tayini	16
2.4.4. Hidrojen Peroksit İçeriği.....	17
2.4.5. Prolin İçeriği.....	17
2.5. Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi	18
2.5.1. Çimlenen Tohumlarda Toplam Protein Miktarı Tayini	18

2.5.2.	Katalaz Aktivitesi	18
2.5.3.	Süperoksit Dismutaz Aktivitesi.....	19
2.5.4.	Guaikol Peroksidaz Aktivitesi.....	19
2.5.5.	Askorbat Peroksidaz Aktivitesi	19
2.6.	İstatistiksel Analizler	20
3.	BULGULAR	21
3.1.	Etkin Bakır Konsantrasyonlarının Belirlenmesi.....	21
3.1.1.	Çimlenme Oranı ve Kök Gelişimi	21
3.2.	Etkin Prolin Konsantrasyonunun Belirlenmesi	23
3.2.1.	Çimlenme Oranı ve Kök Gelişimi	23
3.2.2.	Nisbi Su İçeriği.....	24
3.2.3.	Toplam Klorofil İçeriği.....	25
3.2.4.	Toplam Karotenoid İçeriği.....	26
3.2.5.	Lipit Peroksidasyonu Tayini	26
3.2.6.	İçsel Hidrojen Peroksit Miktarı	27
3.2.7.	Prolin İçeriği.....	28
3.2.8.	Katalaz Aktivitesi	29
3.2.9.	Süperoksit Dismutaz Aktivitesi.....	29
3.2.10.	Guaikol Peroksidaz Aktivitesi.....	30
3.2.11.	Askorbat Peroksidaz Aktivitesi	31
4.	TARTIŞMA	32
5.	SONUÇ.....	39
6.	ÖNERİLER.....	40
	KAYNAKLAR.....	41
	ÖZGEÇMİŞ.....	51

ÖZET

BAKIR STRESİNE MARUZ KALMIŞ İKİ FARKLI DOMATES ÇEŞİDİNDE PROLINİN ÇİMLENME ÜZERİNE İYİLEŞTİRİCİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Bitkiler yaşadıkları çevre ile sürekli etkileşim halindedirler ve içinde buldukları çevre şartları zorlaştığında bitkiler strese maruz kalırlar. Bakır fazlalığı bitkilerde toksik etkilere sebep olan bir çeşit ağır metal stresi etkisi oluşturur. Prolin canlılarda strese karşı tolerans oluşumunda oldukça önemli rollere sahip hem antioksidan hem de ozmolit olan bir bileşiktir. Domates ülkemiz için hem önemli bir tarım ürünü hem de ekonomik olarak değerli bir ihraç kalemidir. Mevcut çalışmada bakır fazlalığının birisi yerel diğeri tescilli olmak üzere iki farklı domates çeşidinde çimlenme üzerine etkileri araştırılmıştır. Ayrıca dışarıdan uygulanan prolinin çimlenme sürecinde bakır stresine karşı iyileştirici etkileri de çalışmada incelenmiştir. Bu amaçla mevcut çalışmada çimlenme sayısı, kök boyu uzunluğu, nisbi su içeriği, lipid peroksidasyonu seviyeleri ve hidrojen peroksit içeriği gibi temel stres parametreleri ile katalaz, süperoksit dismutaz, askorbat peroksidaz ve guaikol peroksidaz gibi antioksidan enzim aktiviteleri incelenmiştir. Bulgulara bakıldığında, belirli konsantrasyonlarda uygulanan prolinin bakır fazlalığına karşı yatıştırıcı etkiler gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Prolin, çimlenme, domates, *Solanum lycopersicum*, bakır stresi

SUMMARY

INVESTIGATION OF THE STIMULATING EFFECTS OF PROLINE ON GERMINATION IN TWO DIFFERENT TOMATO CULTIVARS EXPOSED TO COPPER STRESS

Plants are always interacting with their environment in which they live, and they exposed to stress when the environmental conditions become severe. Excess copper creates a kind of heavy metal stress effect that causes toxic effects on plants. Proline is an antioxidant and osmolyte compound, which plays an essential role in stress tolerance in living organisms. Tomato is both an important agricultural product and an economically valuable export item for our country. In the present study, the effects of copper excess on germination of two different tomato varieties, local and certified, were investigated. Also, the mitigating effects of exogenously applied proline against copper stress during germination were investigated in the study. For this purpose, antioxidant enzyme activities such as catalase, superoxide dismutase, ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase were analysed in addition to basic stress parameters such as germination number, root length, relative water content, lipid peroxidation levels and hydrogen peroxide content. When the results are examined, it is concluded that proline applied at particular concentrations has a mitigating effect against copper excess.

Keywords: Proline, germination, tomato, *Solanum lycopersicum*, copper stress

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Başlıca stres çeşitleri.....	5
Şekil 2. Petri içine ekilmiş yerel (solda) ve tescilli (sağda) domates tohumları.....	15
Şekil 3. Bakır konsantrasyonu uygulamalarına göre çimlenme sayıları	21
Şekil 4. Bakır konsantrasyonu uygulamalarına göre çimlenme sayıları	22
Şekil 5. Yerel ve tescilli domates çeşitleri 500 µM bakır stresi uygulaması.....	22
Şekil 6. Yerel ve tescilli domates tohumunda çimlenme oranları.....	23
Şekil 7. Yerel ve tescilli domates çeşitlerinde kök gelişimi	24
Şekil 8. Nisbi su içeriği.....	25
Şekil 9. Toplam klorofil içeriği.....	25
Şekil 10. Toplam karotenoid içeriği.....	26
Şekil 11. Lipit peroksidasyonu seviyesi	27
Şekil 12. Hidrojen peroksit İçeriği.....	28
Şekil 13. Prolin içeriği.....	28
Şekil 14. Katalaz aktivitesi	29
Şekil 15. Süperoksit dismutaz enzim aktivitesi	30
Şekil 16. Guaikol peroksidaz enzim aktivitesi.....	30
Şekil 17. Askorbat peroksidaz enzim aktivitesi.....	31

TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Etkin bakır konsantrasyonunun belirlenmesi	14
Tablo 2. İyileştirici prolin konsantrasyonunun belirlenmesi	14



1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Birleşmiş Milletler 2017 yılı dünya nüfus tahmin verilerine göre 2017 yılında 7,5 milyar olan nüfusun 2030 yılında 8,6 milyarı, 2050 yılında 9,8 milyarı, 2100 yılında ise 11,2 milyarı geçmesi öngörülmektedir. Bu durum önümüzdeki yıllarda dünya nüfusunun besin ihtiyacını karşılamak için daha fazla sürdürülebilir tarımsal üretim yapılması gerektiğini gözler önüne sermektedir. Dünya nüfusu arttıkça ve kaynakların mevcudiyeti azaldıkça, verimli gıda üretimine duyulan ihtiyaç olağanüstü hale gelmiştir. Artan nüfus ve buna bağlı olarak gıda talebi ile birlikte, insan kaynakları ve çevresel sürdürülebilirlik arasında bir denge oluşturmak için uygun kaynak yönetimi gerekli olacaktır. Artan nüfus için yeterli gıda üretme kabiliyeti ile ilgili küresel kaygılardan biri, ekilebilir tarım alanlarının mevcudiyetidir. FAO'ya göre, gelecekteki küresel nüfusu beslemek için yeterli alan bulunmaktadır (FAO, 2018).

Tarımsal ve endüstriyel faaliyetler nedeniyle ağır metallerin neden olduğu artan toprak kirliliği, günümüz dünyası için ciddi bir çevresel sorun haline gelmektedir (Li ve ark., 2013; Imran ve ark., 2015). Endüstriyel ve kentsel atıkların doğrudan ve dolaylı olarak deşarjı, toprağın organik kirleticiler ve ağır metaller tarafından kimyasal kirlenmesine yol açmıştır (Sun ve ark., 2012; Elloumi ve ark., 2016). Ağır metal ile kirlenmiş topraklarda yetiştirilen sebzeler genellikle tüm dünyada artan ağır metal alım eğilimi göstermiştir. Böylece, kirlenmiş topraklarda yetiştirilen mahsuller ve sebzeler, büyük miktarlarda ağır metaller biriktiriler ve tüketiciler için çeşitli sağlık risklerine neden olur (Khan ve ark., 2008). Bitkilerin hayatta kalmak için topraktan almaları gereken elementler vardır ki bu elementlere “bitki besin elementleri” denir. Bitkiler ihtiyaç duydukları besinsel elementlerini topraktan alırken oldukça seçici davranmalarına olanak sağlayan mekanizmalara sahiptir. Bütün bu seçiciliğe rağmen toprakta miktarca fazla bulunan ağır metaller bitki bünyesine girer ve toksik etkilere neden olabilirler. Bitkiler, aralarında ağır metallerin de bulunduğu bazı temel elementlere hayati derecede ve belli miktarlarda ihtiyaç duyarlar. Bu elementler bitkinin hayatsal

faaliyetlerinin devam edebilmesi için gereklidir. Bunlar; C, H, O, N, P, K, S, Ca, Mg, Fe, Zn, Mn, Cu, B, Cl ve Mo elementleridir (Yıldız, 2003).

Ağır metal birikimiyle oluşan kirlilik dünyada çoğu yerde yaşam ortamlarını olumsuz etkiler (Cunnigham ve ark., 1997). Bazı ağır metallerin (Cd, Cr, Cu, Ni ve Zn gibi) topraktaki konsantrasyonlarının artması temiz su ve kara ekosistemlerinin bozulmasına neden olabilir (Gardea-Torresday ve ark., 1996; Meagher, 2000). Bazı raporlar, ağır metal yönünden zengin topraklarda yetişen çeşitli endemik bitkilerin bu habitata özgün bir şekilde uyum sağladığını ve normal koşulların çok daha yukarısındaki ağır metal birikimlerine dayanabildiklerini bildirmektedir (Banuelos ve ark., 1997).

Bitkiler, çevresel stres etkilerini tolere edebilen birçok hücrel mekanizmaya sahiptir. Örnek vermek gerekirse bitkiler, uyumlu ozmolitler, özellikle prolin gibi aminoasitler de dahil olmak üzere bir dizi metabolit biriktirir. Genellikle stresi takiben prolin içeriğindeki artışın bitki için faydalı olduğuna inanılmaktadır (Verbruggen ve Hermans, 2008).

Bu çalışmada bakır stresine maruz kalmış iki farklı domates çeşidinde prolinin bakır stresine karşı iyileştirici etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla mevcut çalışmada çimlenme sayısı, kök boyu uzunluğu, nisbi su içeriği, lipid peroksidasyonu seviyeleri ve hidrojen peroksit içeriği gibi temel stres parametreleri ile katalaz, süperoksit dismutaz, askorbat peroksidaz ve guaikol peroksidaz gibi antioksidan enzim aktivitesi incelenmiştir.

1.2. Domates

Domates (*Solanum lycopersicum* L.) ilk olarak Orta ve Güney Amerikada tüketilmeye başlanmıştır. Domates kelimesi xitomate/zitotomate sözcüğünden türemiştir. Domates tüketiminin ve yaygınlaşmasının gecikmesi renginden ve zehirli olduğu kanısından kaynaklanmaktadır. ABD’de 1800 yıllarından itibaren pişirilerek yemek olarak tüketilmeye başlanan domates, Anadolu coğrafyasında ise 150 yıldır sofralarımızda yer edinmiştir. Domates hemen hemen ülkemizin tüm bölgelerinde yetiştirilmektedir (Güvenç, 2017).

Domates, dünyadaki hemen hemen tüm iklim bölgelerine iyi adapte olmuş tropikal bir bitkidir. Bununla birlikte çevresel stres faktörleri, bu ekonomik bitkinin potansiyel verimini doğrudan kısıtlayan önemli etkenlerin başında gelmektedir (Jangid, 2016; Gerszberg, 2017).

Domatesin biyokimyasal içeriği; yetiştirilmesinde kullanılan yöntemlere, yetiştiği toprağın bileşimine, iklimsel koşullara ve yetiştirilme amaçları gibi birçok etkene bağlıdır (Barrett ve ark., 2007; Qaryouti ve ark., 2007; Garg ve ark., 2008; Favati ve ark., 2009; Erba ve ark., 2013). Domatesin kuru madde olarak içeriğinde glukoz ve fruktoz gibi karbonhidratlar oldukça fazla bulunmaktadır. Bununla birlikte domates, yağ ve protein içeriği yönünden oldukça düşük (%1'in altında) içeriğe sahiptir. Domates sağlıklı beslenme açısından önemli olan aktif moleküllere, C ve A vitaminleri öncü maddesi olan karotenoidlere (β -karoten ve likopen) ve mineral maddelere sahiptir (Shi ve Maguer, 2000; Sekin ve ark., 2005; Bergougnoux, 2014; Gölükcü ve ark., 2016). Örnek vermek gerekirse günlük diyet ile alınan likopenin %85'nin kaynağı domates ve ürünleri oluşturmaktadır.

Dünya domates rekoltesi yıllık olarak 177 milyon ton kadardır (FAO, 2018). Türkiye yıllık domates üretimi ile dünyada dördüncü sırada yer almaktadır ve yıllık üretimin %7,2'sini karşılamaktadır. Ülkemiz şu anki domates üretimi kapasitesiyle dünyada söz sahibi olmakla beraber önümüzdeki yıllarda üretim kapasitesinin daha da artacağı ön görülmektedir.

Domates nispeten sıcak havaya ve fazla miktarda güneş ışığına ihtiyaç duyar. Soğuk iklimlerde genel olarak seralarda yetiştirilir. Domatesler, sapsarı ve meyveleri zeminden uzak tutmak için genellikle istiflenir, bağlanır veya kafeslenir. Domates çiçeklerinin çürümesini ve meyvelerinin çatlamasını önlemek için istikrarlı bir sulama gereklidir. Domates bakteriyel solgunluk, erken yanıklık, mozaik virüsü, *Fusarium* solgunluğu, nematodlar ve domates boynuzları dahil olmak üzere bir dizi parazit ve hastalığa karşı hassastır. Bu sorunların birçoğu, mahsul rotasyonu, mantar ilacı, böcek ilacı ve dayanıklı çeşitlerin ekimi ile kontrol edilebilir.

Likopen; domates meyvelerinde, işlenmiş domates ürünlerinde ve diğer meyvelerde mevcut olan bir karotenoiddir. Diyetle alınan karotenoidler arasında en güçlü antioksidanlardan birisidir. Domatesin ve likopen içeren domates ürünlerinin diyet

alımının, kanser ve kardiyovasküler hastalık gibi kronik hastalık riskinin azalması ile ilişkili olduğu öne sürülmüştür. Serum ve doku likopen düzeylerinin, meme kanseri ve prostat kanseri de dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerinin görülme sıklığı ile ters ilişkili olduğu bulunmuştur.

1.3. Bitkilerde Stres

Bitkiler sabit yaşamlarının gereği olarak sürekli dış ortamla etkileşim halindedir. Bitkinin olumsuz çevre koşullarına maruz kalması durumuna stres denir. Bitkiler yaşamları sürecinde birçok stres faktörü ile karşılaşmaktadırlar.

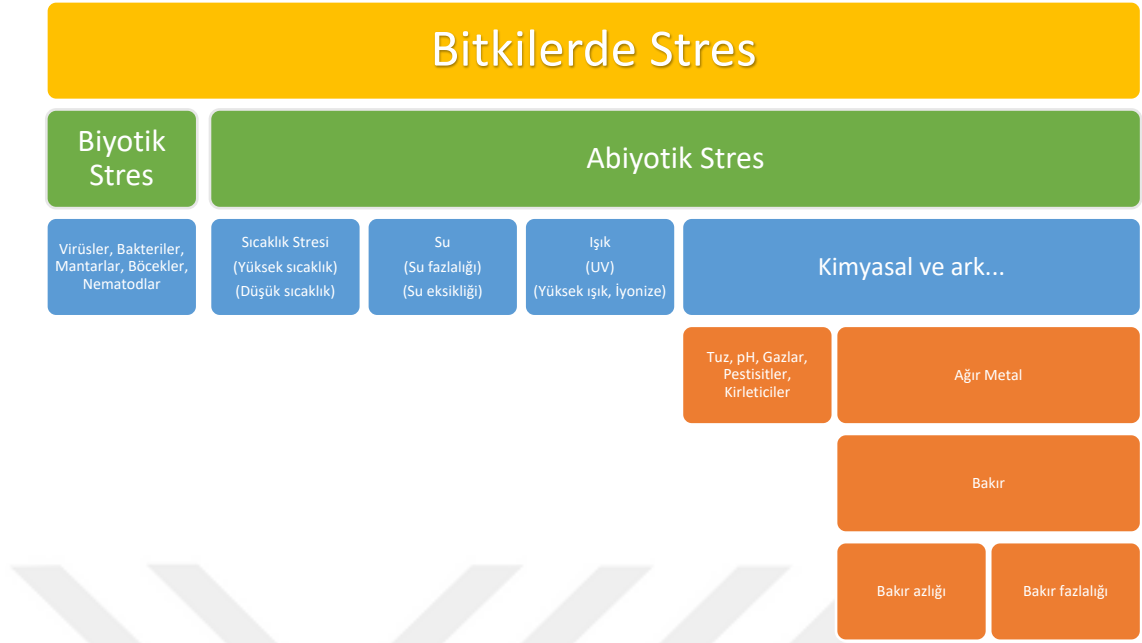
Çeşitli biyotik ve abiyotik streslerin zararlı etkileri nedeniyle gıda verimliliği düşer. Bu nedenle, bu kayıpların en aza indirilmesi ve değişen iklim koşullarında gıda güvenliğinin sağlanması önemli bir endişe konusudur. Kuraklık, aşırı sıcaklık, soğuk, ağır metaller veya yüksek tuzluluk gibi çevresel abiyotik stresleri, dünya genelinde bitki büyümesinin ve üretkenliğinin ciddi şekilde bozulmasına neden olmaktadır.

Temel olarak, bitkiler büyümek için enerji (ışık), su, karbon ve mineral besinlere gereksinim duyarlar. Abiyotik stres, büyümeyi azaltan ve optimum seviyelerin altında verimi sağlayan çevresel koşullar olarak tanımlanabilir. Bitkilerin abiyotik streslere verdikleri yanıtlar hemen her zaman dinamik ve karmaşıktır (Skirycz ve Inze 2010; Cramer, 2010).

Strese verilen bitki yanıtları, stresten etkilenen dokuya veya organa göre değişim gösterebilir. Örneğin, strese karşı oluşturulan transkripsiyonel tepkiler, köklerde doku veya hücreye özgüdür ve ilgili strese bağlı olarak oldukça değişkenlik gösterir (Dinneny ve ark., 2008). Ek olarak, stresin seviyesi ve maruz kalma süresi (kısa ya da uzun süreli), oluşan yanıtın karmaşıklığı üzerinde önemli bir etkiye sahip olur (Tattersall ve ark., 2007; Pinheiro ve Chaves, 2011). Bu durum bitkilerde stres etkileri ve strese karşı verilen yanıtların ne kadar karmaşık olduğunu gösterir.

1.3.1. Stres Çeşitleri

Stres faktörleri çeşitli araştırmacılar tarafından farklı şekillerde sınıflandırılmışlardır. Yaygın olarak kabul gören sınıflandırmalar aşağıdaki gibidir.



Şekil 1. Başlıca stres çeşitleri (Yılmaz ve ark., 2011).

1.3.2. Bitkilerde Ağır Metal Stresi

Doğal yaşamlarında bitkiler, biyotik ve abiyotik stres gibi birçok olumsuz çevresel koşullara maruz kalır. Diğer tüm stres çeşitleri ile birlikte ağır metal stresi, mahsulün verimliliği ve büyümesi üzerinde olumsuz etkileri olması nedeniyle büyük öneme sahiptir. Ağır metal stresi, bitki metabolizmasından mahsul verimine kadar bitkilerde farklı süreçleri tetikler. "Ağır metal" terimi, göreceli olarak yüksek yoğunluğa sahip ve düşük konsantrasyonda bile toksik veya zehirli etkileri olan herhangi bir metalik elementi ifade eder (Lenntech, 2004).

Genel bir ortak terim olan "ağır metaller", 4 g/cm^3 'ten daha büyük atom yoğunluğuna sahip metal ve metaloid grubu için geçerlidir.

Ağır metaller arasında kurşun (Pb), kadmiyum (Cd), nikel (Ni), kobalt (Co), demir (Fe), çinko (Zn), krom (Cr), demir (Fe), bakır (Cu), arsenik (As), gümüş (Ag) ve platin (Pt) gibi elementler sayılabilir. Ağır metaller büyük oranda yer kabuğunda dağılmış halde kaya oluşumlarında bulunur. Sanayileşme ve kentleşme ağır metallerin biyosferdeki antropojenik katkısını arttırmaktadır. Ağır metaller, toprak ve su ekosistemlerinde fazla bulunabilirliğe sahipken atmosferde partikül veya buhar olarak nispeten daha küçük bir orana sahiptir. Bitkilerde ağır metal toksisitesi, bitki türlerine, spesifik metallere, konsantrasyonlara, kimyasal formlara ve toprak

yapılarına ve pH değerlerine göre değişir, çünkü birçok ağır metalin bitki büyümesi için gerekli olduğu düşünülmektedir. Cu ve Zn gibi bu ağır metallerin bazıları, örneğin enzimler/substrat metal kompleksi oluşturmada enzim reaksiyonlarının kofaktörü ve aktivatörleri olarak işlev görür veya metaloproteinlerde prostetik grup gibi bir katalitik özellik gösterir (Mildvan, 1970). Bu önemli metal iz elementler, redoks reaksiyonlarında, elektron transferinde ve nükleik asit metabolizmasında yapısal fonksiyonlarda rol alır. Cd, Hg ve As gibi ağır metallerin bir kısmı, metale duyarlı enzimler için kuvvetli bir şekilde zehirlidir, bu da büyüme inhibisyonu ve hatta organizmaların ölümü ile sonuçlanabilir.

Toksik konsantrasyonlarda ağır metaller, bitki ve organizmalara zarar verir, organlarını etkiler, biyokimyasal süreçlerini, organellerini, hücre zarlarını değiştirir ve sağlık sorunlarına neden olur (DalCorso ve ark., 2010). Ağır metallerin çoğu, hareketsiz doğaları nedeniyle toprakta kalıcıdır, toprak ve organik kolloidlerle yakından ilişkilidir.

Ağır metaller yer kabuğunda lokalize olmuştur; bu nedenle topraktaki doğal oluşumları, yalnızca ayrışma sürecinin bir ürünüdür. Ağır metallerin bileşimi ve konsantrasyonu, ayrışma sürecini harekete geçirerek kaya türüne ve çevresel koşullara bağlıdır. Jeolojik bitki materyalleri genellikle yüksek konsantrasyonlarda Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, Cd, Sn, Hg ve Pb'ye sahiptir. Bununla birlikte, sınıf bazında ağır metal konsantrasyonları kayalarda farklılık gösterir. Toprak oluşumu çoğunlukla tortul kayalardan meydana gelir, ancak genellikle veya kolayca havalandırılmadığından, küçük bir ağır metal kaynağıdır. Bununla birlikte, olivin, ojit ve hornblend gibi pek çok magmatik kayalar da toprağa önemli miktarda Mn, Co, Ni, Cu ve Zn katkıda bulunur. Sedimanter kayalar sınıfında en çok Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, Cd, Sn, Hg ve Pb konsantrasyonlarına ve ardından kireçtaşı ve kum taşına sahiptir. Volkanların toksik ve zararlı gazlarla birlikte yüksek seviyede Al, Zn, Mn, Pb, Ni, Cu ve Hg yaydığı bildirilmiştir (Seaward ve Richardson, 1990). Sahra gibi çöl bölgelerinden kaynaklanan rüzgar tozu yüksek oranda Fe ve daha az miktarda Mn, Zn, Cr, Ni ve Pb'ye sahiptir (Ross, 1994). Deniz aerosolleri ve orman yangınları, bazı ortamlarda bazı ağır metallerin taşınmasında önemli bir etkiye sahiptir. Özellikle Sahra çölünden gelen tozların uzun menzilli taşınması son zamanlarda büyük ilgi görmüştür. Hg ve Se gibi uçucu ağır metaller yangın sırasında üretilen karbonlu maddenin bir parçasıdır.

İnorganik ve organik gübreler tarım toprağına en önemli ağır metal kaynaklarıdır. Ek olarak kireçlendirme, lağım çamuru, sulama suları ve böcek ilaçları gibi uygulamalar da tarımdaki diğer ağır metal kaynaklarıdır. Özellikle mantar öldürücüler, inorganik gübreler ve fosfatlı gübreler, kaynaklarına bağılı olarak değışken Cd, Cr, Ni, Pb ve Zn seviyelerine sahiptir. Kadmiyum, çok yüksek seviyelerde yapraklarda birikir ki, yapraklar büyük oranda hayvanlar ve insanlar tarafından tüketilmektedir. Kadmiyum fazlalığı, lağım çamuru, gübre ve kireç uygulamasından da kaynaklanmaktadır (Yanqun ve ark., 2005). Tarımda fosfatlı gübrenin tekrar tekrar ve uzun süre kullanılması sonucu bazı ağır metallerin tehlikeli derecede yüksek birikimler oluşturabileceğini düşünölmektedir.

Tarım topraklarının ağır metal ile kirlenme seviyesi; toprağıın özelliğine, ağır metal kaynağıının yoğunluğına, yapılan zirai uygulamanın şekline ve sıklığına göre değışiklik göstermektedir. Toprakta ağır metal birikimi, kompost reddetme ve nitrat gübreleri gibi toprak değışikliklerine sebep olan uygulamalardan da kaynaklanmaktadır. Kireç, topraktaki ağır metal seviyelerini nitratlı gübrelerden daha fazla arttırır ve kompostu reddeder. Atık su çamuru, toprağı etkileyen en önemli ağır metal kaynaklarından biridir. Bu bileşiklerin sık kullanıldığı meyve bahçeleri, Cu, As, Pb, Zn, Fe, Mn ve Hg gibi yüksek seviyelerde ağır metallerle toprağıın kirlenmesine neden olmuştur (Ross, 1994). Ağır metallerin topraktan bitkiye taşınmasını, yağış miktarı ile topraktaki çözünmüşlük seviyesinin artması etkilemektedir.

Bitkilerin toksik ağır metal seviyelerine maruz kalması çok çeşitli fizyolojik ve metabolik değışikliklere neden olur (Dubey, 2011; Villiers ve ark., 2011). Bununla birlikte, farklı ağır metaller bitki içinde farklı etki alanlarına sahip olduklarından, toksik tepki ağır metaller arasında farklılık gösterir. Bitki ölümü ile birlikte (Dalcarso ve ark., 2010; Carrier ve ark., 2003) ağır metal toksisitesinin en yaygın kanıtları, yaprak klorozu, nekroz, turgor kaybı, tohum çimlenme oranındaki düşüş ve çoğunlukla fotosentetik mekanizmadaki hasarın neden olduğu bitki büyümesinde bir azalmadır (Sharma ve Dubey, 2007). Tüm bu etkiler, bitki dokularında ve ağır metallerin varlığında meydana gelen hücrelerde, biyokimyasal ve moleküler değışikliklerle ilgilidir (Gamalero ve ark., 2009). Tarımsal toprağıın ağır metallerle kirlenmesi, potansiyel olumsuz ekolojik etkileri nedeniyle kritik bir çevresel sorun haline gelmiştir.

Toksik metal kontaminasyonundan gıda güvenliğini artırmak için, toprağın toksikolojisini bilmek ve bu bilgileri kullanarak yeni stratejiler geliştirmek gerekmektedir.

1.3.3. Bakır ve Fazlalığı

Bakır (Cu), çeşitli kayalarda ve minerallerde bol miktarda bulunan temel bir mikro elementtir. Bakır hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda çeşitli metabolik süreçler için gereklidir (Sun ve ark., 2014). Bakırın çoğu, oksijen taşıyıcısı (hemosianin) veya redoks katalizörü (sitokrom oksidaz, nitrat redüktaz) olarak görev yapan enzimlerde bulunur (Whitacre, 2011; Ferreira ve ark., 2015). Bakır, Cu, Cu¹⁺ ve Cu²⁺ olmak üzere üç değerlikli bir geçiş metalidir. Ek olarak, yoğun olması nedeniyle (5 g/cm³) ağır bir metal olarak sınıflandırılmaktadır (Singh ve ark., 2011). Bununla birlikte Cu, normal bitki metabolizması için temel bir mikro besin maddesidir ve fotosentez, solunum, karbonhidrat dağılımı ve protein metabolizması gibi çeşitli fizyolojik süreçlerde rol oynar. Bununla birlikte, aşırı Cu, bitkilerde biyokimyasal reaksiyonları ve fizyolojik süreçleri olumsuz yönde etkileyerek normal gelişimi bozabilir (Güzel ve Terzi, 2013).

Endüstriyel ilerleme toksik bileşiklerin oluşumuna ve özellikle ağır metallerle çevre kirliliğine yol açar. Madencilik faaliyetleri ve cevher işlenmesi, evsel ve endüstriyel atık artışı (piller gibi), gübre ve böcek ilacı üretimi ve uygulaması, sulama için kanalizasyon kullanımı ve araba egzozu toprak ve havanın kirlenmesine katkıda bulunur. Toprakta patojenlerle mücadele için tarımda bakır (Cu) içeren bileşiklerin kullanılması, toprakta ve bitkilerde ağır metal birikimine neden olur (Saha ve ark., 2012; Shahid ve ark., 2014). Normal büyüme koşulları altında, bitki dokularındaki ortalama Cu konsantrasyonu 5 ila 20 µg/g kuru ağırlık arasında değişir; bu aralıktaki farklılıklar bitkinin türüne, gelişme evresine, topraktaki metal içeriğine ve asitlik gibi toprak özelliklerine bağlıdır (Ravet ve Pilon, 2013). Yapraklardaki Cu konsantrasyonu 5 µg/g kuru ağırlığın altında olduğunda, Cu kıtlığı belirtileri belirginleşir; 20 µg/g'dan büyük konsantrasyonlarda metalin toksik belirtileri gözlenir (Droppa ve ark., 1987; Cohu ve Pilon, 2010). Fizyolojik süreçler ortamdaki Cu konsantrasyonundaki değişikliklere farklı tepki verir. Örnek vermek gerekirse, Cu konsantrasyonundaki artış ile birlikte kökte Cu yoğunluğu artar ve devamında daha fazla artış büyümenin yavaşlamasına neden olur. Bununla birlikte, tohum çimlenme yüzdesi, Cu

konsantrasyonunun çok daha zayıf olmasına bağlıdır (Elleuch ve ark., 2013). Bakır, çinko, molibden, demir ve diğerleri gibi çok sayıda ağır metal, vazgeçilmez mikro elementlerdir. Bunlar düşük konsantrasyonlarda organizmanın normal büyümesini ve gelişmesini yöneten temel unsurlardır (Kholodova ve ark., 2011; Ravet ve Pilon, 2013; Jung ve ark., 2014). Bununla birlikte, yüksek konsantrasyonlarda biriktiklerinde bitki yaşamını ve insan sağlığını olumsuz yönde etkilerler.

Bakır, bitkiler için bir mikro besin maddesi olarak kabul edilir (Gang ve ark., 2013) ve CO₂ asimilasyonu ve ATP sentezinde önemli rol oynar. Aynı zamanda Cu, fotosentetik sistemin plastosiyanini ve solunum elektron taşıma zincirinin sitokrom oksidazı gibi çeşitli proteinlerin temel bir bileşenidir (Demirevska-Kepova ve ark., 2004). Bununla birlikte sanayi devrimi ile birlikte, gelişmiş sanayi ve madencilik faaliyetleri, ekosistemde Cu oluşumunun artmasına neden olmuştur. Madencilik faaliyetleri, yüzeyde biriken çok miktarda atık kaya ve tortu oluşturur. Toprakta Cu fazlalığı sitotoksik bir rol oynar, strese neden olur ve bitkilerde hasara neden olur. Bu birikim, bitki büyüme geriliği ve yaprak klorozuna yol açar (Lewis ve ark., 2001). Bitkilerin bakıra aşırı maruz kalması oksidatif stresi tetikler ve reaktif oksijen türlerinin aşırı miktarda üretilmesine neden olur (Stadtman ve Oliver, 1991). Oksidatif stres, metabolik yolların bozulmasına ve makromoleküllerin hasar görmesine neden olur (Hegedus ve ark., 2001). Yapılan bir çalışmaya göre Cu ve Cd kombinasyonları, *Solanum melongena*'daki çimlenmeyi, fide uzunluğunu ve yan kök sayısını olumsuz yönde etkilemiştir (Neelima ve Reddy, 2002).

1.3.4. Bitki Büyümesi Üzerine Bakır Stresinin Etkisi

Bakır fazlalığı bitkilerde önemli fizyolojik süreçleri etkileyebilir. Bitki büyümesinde ve gelişiminde sorunlara neden olabilir. Topraktan alınan bakır, sağlıklı bitki gelişimi için farklı dokular ve organeller içerisinde taşınır, dağıtılır ve bölümlendirilir (Habiba ve ark., 2015). Diğer yandan aşırı bakır, azaltılmış bir bitki biyokütlesi, yaprak klorozu, inhibe edilmiş kök büyümesi, bronzlaşma ve nekroz ile karakterize edilir. Cu toksisitesinin etkisi, büyük ölçüde, tüm bitki için özel öneme sahip olan kök büyümesi ve morfolojisi üzerinedir. Bakır, sürgünlerde çok az yer değiştirerek kök dokusunda birikme eğilimindedir (Marschner, 2011). Zhao ve ark. (2010) *Festuca arudinacea* ve *Lolium perenne* bitkilerinin gecikmiş kök büyümesini 7 günlük bakır uygulamasından

sonra gözlemlenmiştir. Kolbert ve ark. (2012), uzun süreli aşırı bakırın, *Arabidopsis thaliana*'nın kök ve kök gelişiminin inhibe edilmesine yol açtığını bildirmiştir. Hücre uzaması, bölünmesi ve genişlemesi de etkilenmiştir. Aşırı bakır, yaprak büyümesini, hücre uzamasını ve hücre bölünmesini inhibe eder (Maksymiec, 1997; Panou Filotheou ve Bosabalidis, 2004). Bakır stresine uzun süre maruz kalmak, yaprak kenarının katlanmasına, artan stoma sayıları ve azalan stoma boyutlarına ve düşük mezofil hücre içi boşluk hacimlerine neden olur. Yaprak anatomisinde ve morfolojisindeki tüm bu değişikliklerin köklerin bakır stresine maruz kalmasından ve bu nedenle terlemenin azalmasına neden olan bozukluklar olduğu düşünülmektedir (Panou-Filotheou ve ark., 2001).

Bakır konsantrasyonundaki artış ile buğday bitkisinde çimlenme yüzdesinin, toplam klorofil içeriğinin ve yan kök sayısının büyük ölçüde etkilendiği bildirilmiştir (Singh, 2007). Lahana bitkisi yüksek bakır konsantrasyonlarına maruz kaldığında, meydana gelen bakır toksisitesi yapraklarının klorozuna yol açar ve daha sonra hem sürgünlerde hem de köklerde biyokütleyi azaltır (Ali ve ark., 2015). Meyve ve sebzelerdeki toksik metallerin değerlendirilmesi ve miktarının belirlenmesi son on yılda oldukça fazla bir şekilde çalışılmıştır. Madencilik alanlarında veya endüstriyel kirli alanlarda yetiştirilen temel gıdalarda, meyve ve sebzelerde biriken ana unsurlar; kadmiyum, çinko, kurşun ve bakırdır (Oteef ve ark., 2015).

1.4. Prolin

Stres toleransını artırmak için bitkilere uygulanan koruyucu bileşiklerden biri prolindir. Prolin sadece bir ozmolit değil, aynı zamanda bir metal şelatörü, bir antioksidan bileşiği ve stres sırasında bir sinyal molekülüdür (Hayat ve ark., 2012). Bunun yanı sıra, mitokondri fonksiyonlarını değiştirebilir, bitki büyümesini etkileyebilir ve abiyotik stres toleransında rol oynayan bazı genlerin ekspresyonunu indükleyebilir (Szabados ve Savaure, 2010). Ana rollerine ek olarak prolin, abiyotik stres koşulları altında hücrel redoks potansiyelinin tamponlanmasında da son derece önemli bir rol oynar (Ali ve ark., 2013). Çeşitli abiyotik stres koşulları altında prolin birikimi bitkilerde stres toleransı ile bağlantılıdır (Nanjo ve ark., 1999) ve konsantrasyonu toleranslı genotiplerde genellikle strese duyarlı olanlardan daha yüksektir (Ashraf ve Foolad, 2007). Abiyotik stres altındaki bitkilere prolin

uygulaması stresin olumsuz etkilerini azaltmak için önemli bir yaklaşımdır. Birçok rapor dışarıdan uygulanan prolinin abiyotik stres faktörlerine karşı bitki toleransının artırılmasında önemli bir rol oynayabileceğini ortaya koymuştur (Ali ve ark., 2013; Ashraf ve Foolad, 2007; Athar ve ark., 2008; Shahbaz ve ark., 2013).

Bitkilerde stres toleransı, prolinin belirli bir konsantrasyonda dışarıdan olarak sağlandığı durumlarda gelişebilir, ancak daha yüksek bir konsantrasyonda dışarıdan uygulanmışsa toksik olabilir (Hayat ve ark., 2012). Örneğin, Torun ve ark. (2016), 30 mM prolinin, su eksikliği koşullarına maruz kalan mısır fidelerinin büyümesindeki gelişme için en etkili konsantrasyon olduğunu, daha yüksek harici prolin (40 veya 50 mM) konsantrasyonlarının fidelerin büyümesini baskıladığını kaydetmiştir. Bu nedenle, farklı stres koşulları altında en etkili prolin konsantrasyonunu ve uygulama yöntemini tespit etmek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

Cd, Cu, Pb, Ni ve Zn gibi ağır metaller bitkiler için yıkıcı çevresel tehditlerdir. Aşırı ağır metal konsantrasyonlarının bitki tarafından alınması, ciddi fizyolojik ve yapısal bozukluklara neden olan stres yaratır. Ağır metal stresine cevaben bitkiler, çok miktarda prolin biriktirir. Birçok bitkinin ağır metal stresine maruz kaldığında prolin biriktirdiği gösterilmiştir (Bassi ve Sharma, 1993; Costa ve Morel, 1994; Talanova ve ark., 2000). Osmoprotektan ve reaktif oksijen türleri söndürücüsü olarak işlev görmesinin yanı sıra prolin ayrıca ağır metal şelatörü gibi davranır, böylece ağır metal stresini hafifletir (Farago, 1979). *Deschampsia* ve *Silene* gibi ağır metal toleranslı bitkilerin toleranslı olmayan bitkilere kıyasla daha yüksek bir prolin içeriğine sahip olduğu gösterilmiştir (Smirnoff ve ark., 1987; Schat ve ark., 1997). Sharma ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, eksojen prolin, glikoz-6-fosfat dehidrojenaz ve nitrat redüktazın aktivitesini in vitro olarak Cd ve Zn tarafından inhibe edilmesine karşı korumuştur. Bu korumanın, bir prolin-metal kompleksinin oluşumundan kaynaklandığı öne sürülmüştür (Sharma ve ark., 1998).

Bakır fazlalığına maruz kalan bitkilerin, dokularında prolin biriktirdiği rapor edilmiştir (Ku ve ark., 2012). Prolin birikimi, bitkilerin strese karşı adaptasyonudur. Prolinin bazı fizyolojik ve moleküler yanıtları aktive eden düzenleyici veya sinyal molekülü olduğuna inanılmaktadır (Szabados ve Savoure, 2010). Prolin birikme mekanizması; artan sentez, azalan katabolizma veya proteinlerin artan parçalanması ile ilişkilidir

(Kavi Kishor ve ark., 2005). Prolin, yüksek bitkilerde prolin-5-karboksilat sentetaz (P5CS) ve prolin-5-karboksilat redüktaz tarafından katalize edilen reaksiyonlarla glutamattan sentezlenir. Prolin, ornitinin, ornitin amino transferazı ile prolin-5-karboksilat içine transaminasyonu ile de oluşturulabilir. Bitki hücrelerinde prolin katabolizması prolin dehidrojenaz (PDH) ve prolin-5-karboksilat dehidrojenaz tarafından meydana geldi (Monteoliva ve ark., 2014).



2. MATERYAL METOD

2.1. Bitki Materyalinin Hazırlanması

Mevcut çalışmada bitki materyali olarak ekonomik değeri yüksek bir bitki olan domates çeşitleri (kültivar) kullanıldı. Çeşitlerden birisi Artvin Tütüncüler köyünde yıllardır yetiştirilen ve tüketilen çeşittir. Diğeri ise yurt dışından ithal edilen ve ülkemizde tohum satışı yapılan yerlerde bulunan tescilli bir çeşittir. Çimlendirme çalışmaları laboratuvar ortamında steril edilmiş petrilerde filtre kağıtları üzerinde gerçekleştirildi. Çimlenme ortamı ise soğutmalı inkübatör kullanılarak 21 °C'de gerçekleştirildi. Tohumlar için çimlenme süresi ortalama 8 gün olarak belirlendi ve bu sürenin sonunda planlanan analizlere geçildi.

2.2. Etkin Bakır Stresi, İyileştirici Prolin Konsantrasyonlarının Belirlenmesi ve Deney Tasarımı

Çalışmada öncelikli olarak gerçekleştirilen aşama, çeşitlerin çimlenmesini önemli ölçüde engelleyen bakır konsantrasyonunu tespit etmek oldu. Bu amaçla her iki çeşide ait tohumlar 0 (kontrol), 25 µM, 100 µM, 500 µM, 1000 µM, 2500 µM ve 5000 µM bakır konsantrasyonlarında çimlendirildi (Tablo 1). Çimlenme sayısı ve ortalama kök uzunlukları dijital kumpas kullanılarak ölçüldü ve etkin bakır konsantrasyonu belirlendi. Bakır stresini simule etmek için bakır sülfat (CuSO₄) ile hazırlanan çözeltiler kullanıldı. Kontrol grubu ise sadece saf su ile çimlendirildi. Her grup için en az 3 tekerrürlü petri ve her petri için 50 adet tohum kullanıldı. Bu şekilde her deney setinde her grup için en az 150 tohum değerlendirilmiş oldu. Her deney seti 6 defa tekrarlandı.

Tablo 1. Etkin bakır konsantrasyonunun belirlenmesi

Gruplar	Domates Çeşitleri	
	Yerel	Tescilli
Kontrol (saf su)	✓	✓
25 µM CuSO ₄	✓	✓
100 µM CuSO ₄	✓	✓
500 µM CuSO ₄	✓	✓
1000 µM CuSO ₄	✓	✓
2500 µM CuSO ₄	✓	✓
5000 µM CuSO ₄	✓	✓

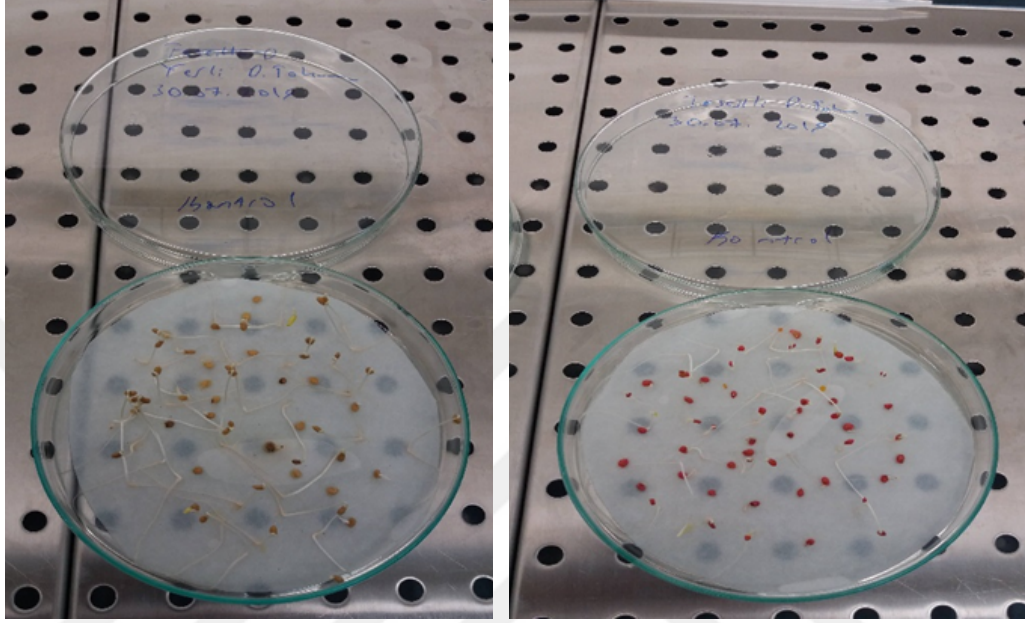
Etkin bakır konsantrasyonunun belirlenmesi aşamasından sonra iyileştirici prolin konsantrasyonunun tespit edileceği aşamaya geçildi. Bu amaçla etkin bakır konsantrasyonunda (çimlenmeyi önemli derecede engelleyen bakır konsantrasyonu) çimlendirilecek tohumlar 16 saat süre ile ayrı ayrı olacak şekilde 0 (sadece etkin bakır konsantrasyonu), 0,5 mM, 1 mM ve 10 mM prolin konsantrasyonlarında inkübe edildi. Tohumlar tablo 2’de verilen prolin konsantrasyonlarında 16 saat inkübe edildikten sonra etkin bakır konsantrasyonunda çimlenmeye bırakıldı. Kontrol grubuna ise çimlenme öncesi prolin uygulaması yapılmadı ve 16 saat süre ile saf suda bekletildi. Bu şekilde çimlenen tohumlarda çimlenme sayısı, ortalama kök boyu uzunlukları ve diğer temel stres parametreleri ölçülerek en uygun prolin konsantrasyonu değeri tespit edildi. Hem etkin bakır konsantrasyonu hem de iyileştirici prolin konsantrasyonu belirlenirken gerçekleştirilen kök boyu ölçümlerinde radikula boyunun 2 mm altında geliştiği tohumlar çimlenme sayısına ve kök boyu ortalamasına dahil edilmedi. Ayrıca bulgular analiz edilirken tescilli ve yerel tohumlar arasındaki bakır stresine karşı tolerans yetenekleri de karşılaştırılmış oldu. Tüm deney setlerinin aseptik koşullarda yürütülmesine özen gösterildi.

Tablo 2. İyileştirici prolin konsantrasyonunun belirlenmesi.

Etkin Bakır Konsantrasyonu Ortamında Çimlenen Domates Çeşitleri		
Etkin Bakır Konsantrasyonu Ortamı		
Gruplar	Yerel	Tescilli
Kontrol (Prolin uygulaması yok)	✓	✓
0,5 mM Prolin	✓	✓
1 mM Prolin	✓	✓
5 mM Prolin	✓	✓
10 mM Prolin	✓	✓

2.3. Çimlenme Sayılarının ve Ortalama Kök Boylarının Belirlenmesi

Çimlenmenin 8. gününde tohumlarda çimlenme sayıları belirlendi ve kök boyları ölçüldü. Kök boyları dijital kumpas ile ölçüldü ve radikula boyunun 2 mm altında olan kök gelişimleri analize dahil edilmedi.



Şekil 2. Petri içine ekilmiş yerel (solda) ve tescilli (sağda) domates tohumları

2.4. Temel Stres Parametrelerinin Ölçümü

Çalışmada çimlenmeyi önemli derecede etkileyen bakır konsantrasyonunun ve iyileştirici prolin konsantrasyonunun belirlenmesinden sonra, prolinin çimlenme üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla temel stres parametreleri ölçüldü. Bu amaçla çimlenen tohumlarda nisbi su içeriği (RWC), lipid peroksidasyonu (MDA) seviyesi, hidrojen peroksit içeriği, pigment tayinleri, prolin içeriği, katalaz, süper oksit dismutaz, askorbat peroksidaz ve guaikol peroksidaz analizleri gerçekleştirildi.

2.4.1. Nisbi Su İçeriği (RWC)

Çalışmada bakır stresinin yerel ve tescilli domates çeşitlerinde içsel su durumunu nasıl etkilediğini ve prolin uygulamasının olası iyileştirici etkilerini belirlemek için nisbi su içeriği ölçüldü. Bu amaçla hasat edilen örneklerin taze ağırlıkları belirlendi ve not edildi (*Yaş Ağırlık*). Sonrasında örnekler 16 saat süre ile saf suda ve 4 °C'de bekletildi ve sonrasında ağırlıkları tekrar tartıldı (*Turgit Ağırlık*). Örneklerin fazla suyu alınarak

etüve alındı ve 65 °C 72 saat süre ile tüm su içeriklerinin uzaklaşması sağlandı (*Kuru Ağırlık*). Elde edilen sonuçlar Smart ve Bingham (1974) denkleminde yerine konularak nisbi su içerikleri belirlenmiş oldu. Denklem formülü aşağıda verildi.

$$\text{Nisbi Su İçeriği (RWC \%): } [(YA-KA) / (TA-KA)] \times 100$$

YA: Yaş ağırlık

KA: Kuru ağırlık

TA: Turgit Ağırlık

2.4.2. Klorofil ve Karotenoid İçeriği

Çalışmada bakır stresinin çimlenen domates tohumlarındaki pigment oluşumuna etkilerini gözlemlemek amacıyla toplam klorofil ve karotenoid miktar tayini yapıldı. Klorofil ve karotenoid içeriklerinin belirlenmesi için 0,1 g örnek sıvıt azot kullanılarak homojenizatörde öğütüldü. Toz haline gelen örneklere 2 ml %80 soğuk aseton eklendi ve örnekler tekrar homojenize edildi. Homojenize edilmiş örnekler 4 °C’de 10 dakika süre ile 3000 rpm’de santrifüj edildi. Örneklerin süpernatantları spektrofotometrede 450, 645 ve 663 nm dalga boylarında ölçüldü. Klorofil hesaplanması için Arnon (1949) denklemi kullanıldı.

$$\text{Klorofil a (gL}^{-1}\text{)} = 12,7 \times A_{663} - 2,69 \times A_{645}$$

$$\text{Klorofil b (gL}^{-1}\text{)} = 22,9 \times A_{645} - 4,68 \times A_{663}$$

$$\text{Toplam Klorofil (gL}^{-1}\text{)} = 20,2 \times A_{645} + 8,02 \times A_{663}$$

Örneklerdeki karotenoid miktarını belirlemek için Jaspars formülü kullanılarak yapıldı (Witham ve ark., 1971).

$$\text{Toplam Karoteonid (gL}^{-1}\text{)} = 4,07 \times A_{450} - (0,0435 \times Kl_a + 0,3367 \times Kl_b)$$

2.4.3. Lipit Peroksidasyonu Tayini (MDA)

Çalışmanın bu kısmında bakır stresinin her iki domates çeşidinde hücre zarında oluşturduğu hasarı belirlemek ve prolin uygulamasının oluşan bu hasarı

iyileştirmedeki katkısını gözlemek amacıyla çimlenen tohumlarda lipit peroksidasyonu tayini gerçekleştirildi. Lipit peroksidasyonu hücre zarındaki çift bağ fosfolipitlerin peroksidasyona uğramasıdır ve ürün olarak malondialdehit (MDA) ortaya çıkar ve bu nedenle hücre zarındaki hasarın belirlenmesinde önemli bir parametredir (Heath ve Packer, 1968). Bu amaçla çimlenen domates tohumlarından alınan 0,1 g örnekler sıvı azot ile dondurularak doku parçalayıcıda toz haline getirildi. Toz halindeki örneklere 1,8 ml %0,1 trikloro asetik asit (TCA) eklendi ve doku parçalayıcıda homojenize edildi. Homojenize edilmiş örnekler 10 dakika süre ile 4 °C'de ve 15000 g'de santrifüj edildi. Süpernatantın 1 ml'lik kısmı alındı ve %0,5 tiobarbiturik asit içeren %20 TCA 4 ml solüsyon ile karıştırıldı. Elde edilen karışım vorteks ile iyice karıştırıldı ve hemen sonrasında 95 °C sıcaklıkta 30 dakika süre ile inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında reaksiyonun devam etmemesi için örnekler hızlı bir şekilde buz banyosuna alındı. Örneklerin spektrofotometre ile spesifik (532 nm) ve spesifik olmayan (600 nm) dalga boylarında absorbans okumaları yapıldı. Delta absorbans (spesifik–spesifik olmayan absorbans) değerleri, $\Delta = \epsilon \cdot c \cdot l$ formülünde yerine konularak TBARS konsantrasyonu yani MDA değerleri hesaplandı ($\Delta = A_{532} - A_{600}$, ϵ : Absorbsiyon katsayısı, $155 \text{ mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, c : konsantrasyon).

2.4.4. Hidrojen Peroksit (H₂O₂) İçeriği

Domates çeşitlerinde bakır fazlalığının neden olduğu stresi ve prolin uygulamasının strese karşı gösterdiği iyileştirici etkiyi gözlemek için çimlenen tohumlarda içsel hidrojen peroksit seviyeleri incelendi. Bu amaçla 0,1 g taze bitki numunesi sıvı azot ile homojenize edildi. Sonrasında numunelere %0,1 TCA eklendi ve tekrar homojenize edildi. Homojenat 4 °C'de, 15000 g'de 10 dakika süre ile santrifüj edildi. Süpernatanttan 1 ml alınarak üzerine 1 ml 10 mM potasyum fosfat tamponu ve 1,5 ml 1 M potasyum iyodür (KI) ilave edildi. Elde edilen karışımın spektrofotometrede 390 nm'de absorbansları okundu. Absorbans okumaları, μmolg^{-1} olarak ifade edilerek, Velikova ve ark. (2000) tarafından geliştirilen metoda göre belirlendi.

2.4.5. Prolin İçeriği

Domates çeşitlerinde bakır stresinin çimlenme üzerine etkilerini ve prolin uygulamasının iyileştirici etkilerini incelemek için çalışmada prolin içeriğine bakıldı.

Bu amaçla çimlenen örneklerden 0,1 g taze numune alındı ve sıvı azot ile homojenize edildi. Toz haline gelen örneklere 1,8 ml %3 sülfosalisilik asit eklendi ve tekrar homojenize edildi. Homojenat 15000 g'de 10 dakika süre +4 °C'de santrifüj edildi. Örneklerden 1 ml süpernatant alındı ve üzerine asit ninhidrin çözeltisinden 1 ml eklendi. Elde edilen karışım 100 °C'de inkübe edildi ve sonrasında reaksiyonun durması için buz banyosuna alındı. Örnekler 3'er ml toluen eklendi ve vorteks edildi. Toluene fazı spektrofotometrede 520 nm dalga boyunda absorbans olarak okutuldu. Sonuçlar önceden okutulmuş standartlara göre göre hesaplanarak mgml⁻¹ olarak verildi (Bates ve ark., 1973).

2.5. Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

Mevcut çalışmada çimlenen domates çeşitlerinin bakır stresine karşı verdikleri yanıtın incelenmesi ve prolinin iyileştirici etki yapıp yapmadığının belirlenmesi amacıyla yaygın antioksidan enzim aktiviteleri belirlenmiştir. Çimlenen tohumlardan alınan 0,1 g örnekler sıvı azot ile homojenize edildi ve sonrasında 1,8 ml ekstraksiyon tamponu (100 mM potasyum fosfat, 0,1 mM EDTA, pH 7,0 ve %0,1 Triton) eklendi. Homojenat +4 °C'de 15000 g'de 20 dakika süre ile santrifüj edildi. Süpernatant enzim aktivitesi analizlerinde kullanılmak üzere -20 °C de saklandı.

2.5.1. Çimlenen Tohumlarda Toplam Protein Miktarı Tayini

Bakır stresinin domates tohumlarında çimlenme sürecinde antioksidan enzim aktiviteleri üzerine etkilerini incelemek için öncelikli olarak toplam protein tayini yapıldı (Bradford, 1976). Enzim analizleri için gerçekleştirilen örnek ekstraksiyonlarından alınan 30 µl örneklere 170 µl distile su eklendi ve üzerlerine 1000 µl G250 protein boyası eklendi. Vorteks ile karıştırılan örnekler 595 nm dalga boyunda önceden hazırlanmış standartla göre absorbans değerleri okutuldu. Sonuçlar mgml⁻¹ olarak enzim aktivitelerinin hesaplanmasında kullanıldı.

2.5.2. Katalaz Aktivitesi

Mevcut çalışmada prolin uygulamasının bakır stresi koşullarında çimlenen domates tohumları üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla katalaz enzim (EC 1.11.1.6) aktivitesi ölçüldü. Bu amaçla katalaz aktivitesi, Aebi'nin (1983) metoduna göre

belirlendi. Enzim analizleri için hazırlanan ekstraktan 20 µl örnek, 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7,0), 30 mM H₂O₂ içeren 1 ml'lik reaksiyon ortamı 240 nm'de 3 dakika süre ile ölçüldü. Katalaz aktivitesi H₂O₂ için $\epsilon=39,4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ tükeniş katsayısı kullanılarak hesaplandı.

2.5.3. Süperoksit Dismutaz Aktivitesi

Mevcut çalışmada bakır stresinin domates çeşitlerindeki antioksidan enzim aktivitesi üzerindeki etkilerini incelemek için süperoksit dismutaz (EC 1.15.1.1) enzim aktivitesi ölçüldü (Beauchamp ve Fridovich, 1971). Daha önce antioksidan enzim analizleri için hazırlanmış örnek ekstraktlarından 50 µl numune, pH 7,8, 50 mM potasyum fosfat tamponu, 13 mM L-metiyonin, 0,1 mM EDTA, 75 µM nitro blue tetrazolyum içeren toplam 1 ml reaksiyon ortamı hazırlandı. Son olarak reaksiyon ortamına 2 µM riboflavin eklendi ve karışım $375 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ beyaz ışık şiddetine 10 dakika maruz bırakıldı. Oluşan renkli ürün 560 nm'de absorbans olarak okutuldu.

2.5.4. Guaikol Peroksidaz Aktivitesi

Domates tohumlarında bakır stresinin etkilerini ve oluşan yanıtları incelemek için Guaikol peroksidaz (EC 1.11.1.7) aktivitesi ölçüldü (Urbanek ve ark., 1991). Bu amaçla enzim aktivitesi için hazırlanan örneklerden 50 µl ekstrakt alındı ve 100 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7), 0,1 mM EDTA, 5mM guaiakol ve 15 mM H₂O₂ içeren reaksiyon ortamına eklendi. Son hacmin 1 ml olmasına dikkat edilerek elde edilen reaksiyon ortamı spektrofotometrede 470 nm dalga boyunda bir dakika süreyle takip edildi. Başlangıç ve bitiş absorbans değerleri kaydedildi ve enzim aktivitesi $\epsilon=26,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ tükeniş katsayısı kullanılarak hesaplandı.

2.5.5. Askorbat Peroksidaz Aktivitesi

Mevcut çalışmada, bakır stresi koşullarında çimlenen domates çeşitlerinde prolin uygulamasının iyileştirici etkilerini gözlemlemek amacıyla askorbat peroksidaz (EC 1.11.1.11) aktivitesi ölçüldü. Bu amaçla 20 µl enzim örneği, 25 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7,0), 0,25 mM askorbat, 0,4 mM EDTA ve 0,1 mM H₂O₂ içeren reaksiyon ortamı spektrofotometrede 290 nm dalga boyunda 3 dakika boyunca izlendi

(Nakano ve Asada, 1981). Askorbat peroksidaz aktivitesi $\epsilon=2,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ tüketiş katsayısı kullanılarak hesaplandı.

2.6. İstatistiksel Analizler

Üç tekrarlı olarak oluşturulan analizler sonucunda elde edilen veriler SPSS 22.0 paket istatistik programı ile OneWayAnova testi ve gruplar arasındaki farkı belirleyebilmek için Duncan testi kullanılarak hesaplandı ($p<0.05$).



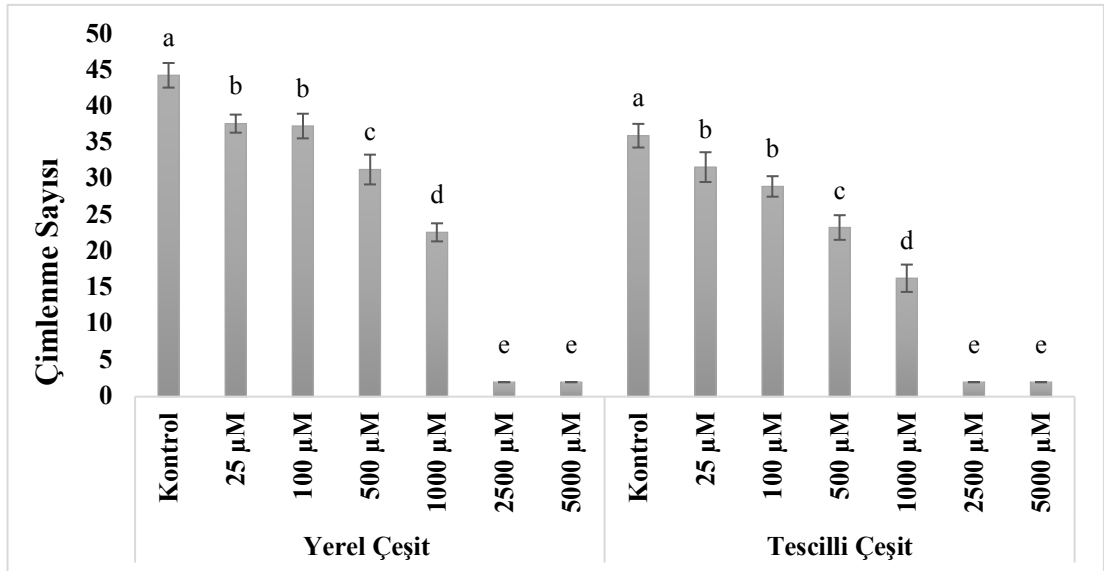
3. BULGULAR

3.1. Etkin Bakır Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Mevcut çalışmanın ilk aşaması domates çeşitlerine ait tohumlarda çimlenme üzerine stres baskısı oluşturacak etkin bakır konsantrasyonunun belirlenmesi oldu. Yöntem kısmında anlatıldığı gibi tasarlanan deney düzeneğinde çimlenme sayıları ve kök gelişimi gözlemlendi ve bulgulara göre çeşitlerde çimlenmeyi önemli derecede indirgeyen bakır konsantrasyonu seçildi.

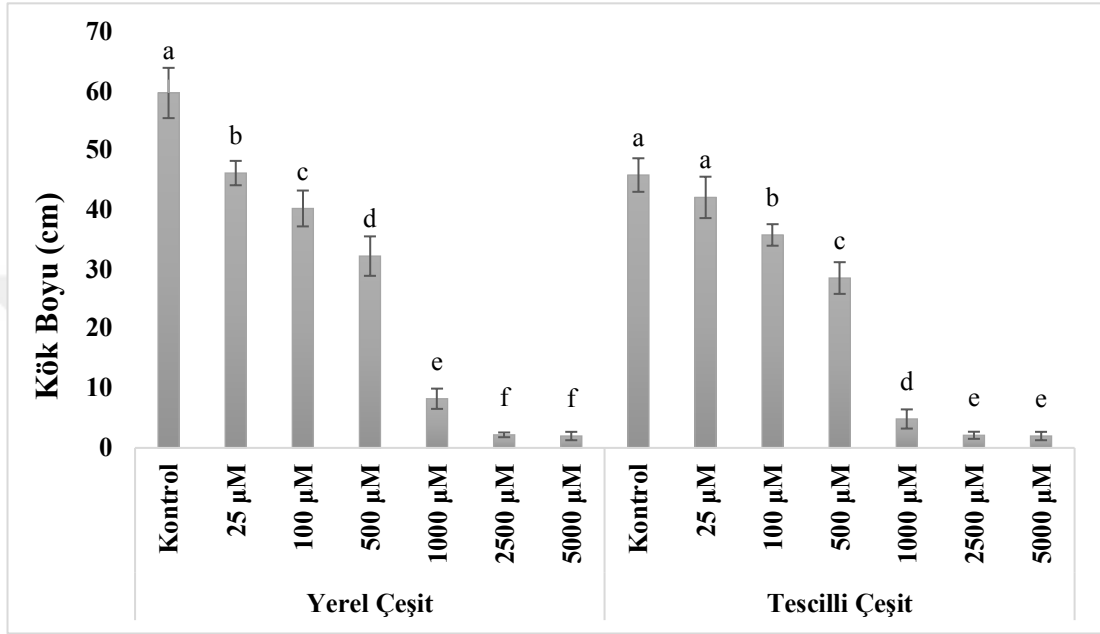
3.1.1. Çimlenme Oranı ve Kök Gelişimi

Mevcut çalışmada tohum çeşitleri üzerinde çimlenme üzerine stres etkisi oluşturacak etkin bakır konsantrasyonunu belirlemek için çalışmalar yapıldı. Bulgulara bakıldığında her iki çeşitte de artan bakır konsantrasyonuna bağlı olarak çimlenme oranlarında azalma gözlemlendi. Bununla birlikte özellikle 500 μM bakır konsantrasyonundan daha yüksek uygulamalarda çimlenme sayılarında dramatik düşüşler tespit edildi (Şekil 3).



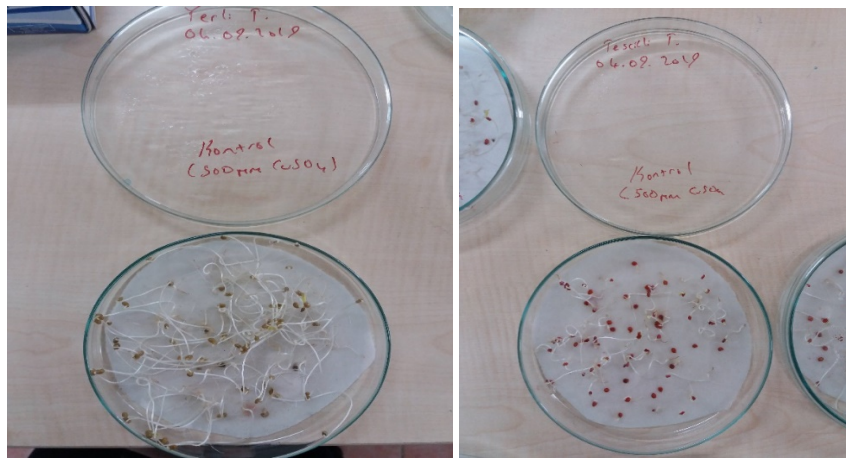
Şekil 3. Bakır konsantrasyonu uygulamalarına göre çimlenme sayıları

Artan bakır konsantrasyonunun diğerk bir olumsuz etkisinin de kök gelişimi üzerinde olduğu tespit edildi (Şekil 4). Yine 500 μM 'ın üzerindeki bakır konsantrasyonlarında kök gelişimin ciddi oranda azaldığı ve hatta 2500 μM ve 5000 μM bakır konsantrasyonlarında radikula gelişiminin başladıktan kısa bir süre sonra inhibe olduğu (yaklaşık 2-5 mm) ve uç kısımlarında nekroz oluştuğu gözlemlendi.



Şekil 4. Bakır konsantrasyonu uygulamalarına göre çimlenme sayıları

Çimlenme sayıları ve kök gelişimleri incelendiğinde mevcut çalışmada etkin bakır konsantrasyonunun 500 μM olmasına karar verildi (Şekil 5). Çalışmanın sonraki aşamalarında bakır stresi simülasyonu için 500 μM bakır konsantrasyonu kullanıldı.



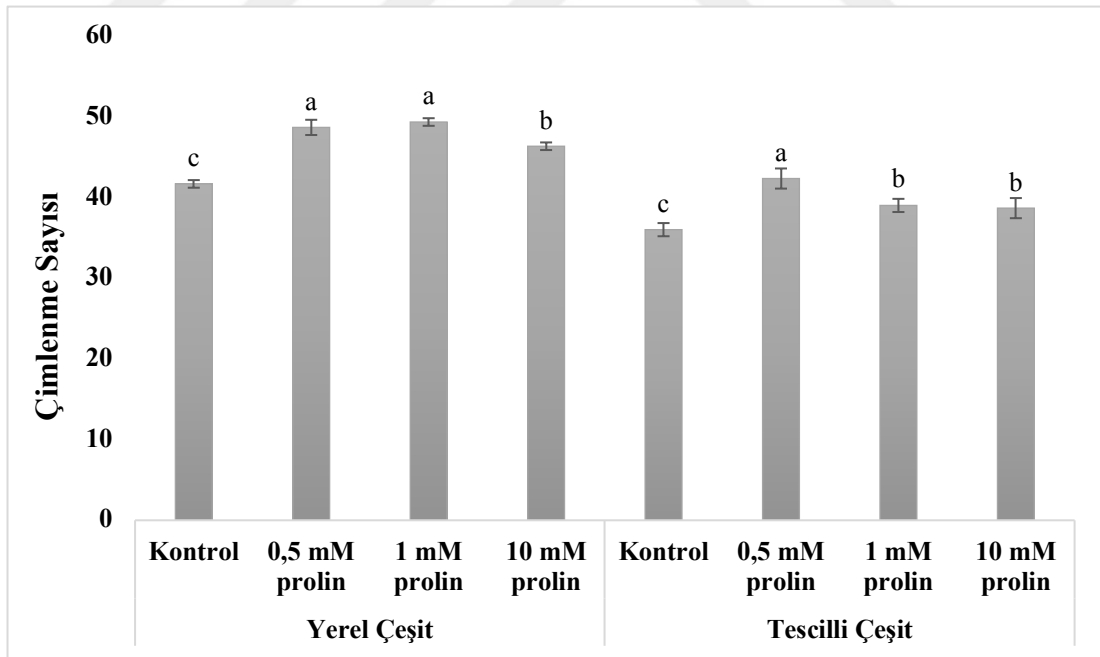
Şekil 5. Yerel ve tescilli domates çeşitleri 500 μM bakır stresi uygulaması

3.2. Etkin Prolin Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Mevcut çalışmada bakır stresi koşullarında iyileştirici etki gösteren prolin konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla deney düzeneği tasarlandı. Bu aşamada tohumlar öncelikli olarak 0,5 mM, 1 mM ve 10 mM prolin konsantrasyonlarında 24 saat süre ile inkübe edildi. Sonrasında ise 500 µM bakır konsantrasyonu ortamında çimlendirildi. Kontrol grubuna herhangi bir prolin ön uygulaması yapılmadı ve 24 saatlik inkübasyon süresi boyunca saf suda bekletildi.

3.2.1. Çimlenme Oranı ve Kök Gelişimi

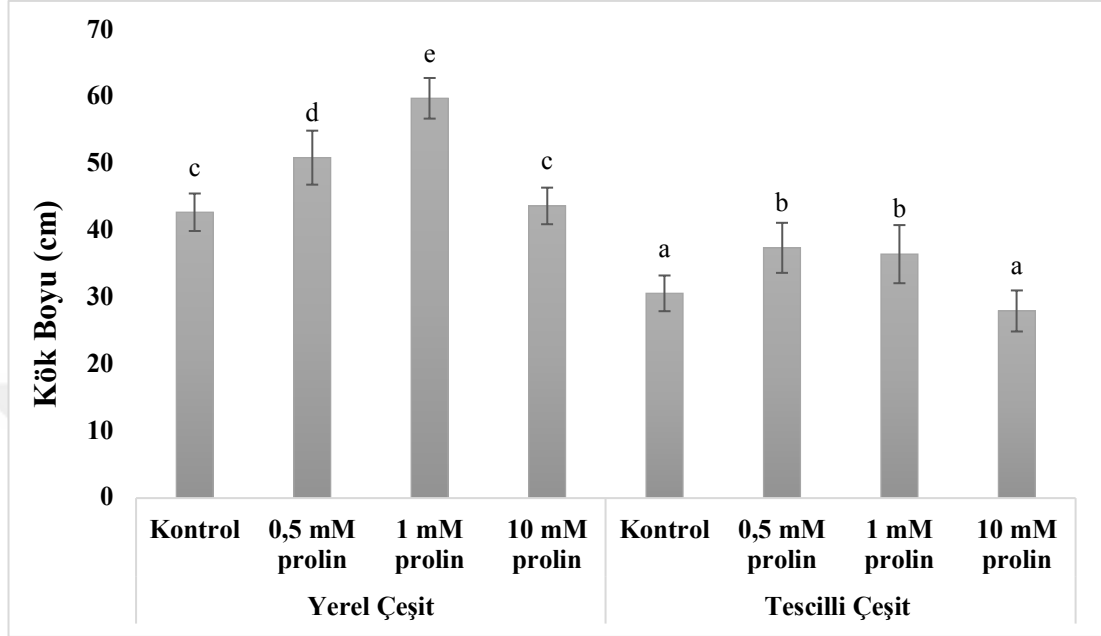
Çimlenme süreci tamamlandığında, çimlenme oranları ve kök gelişimleri tespit edildi. Bulgular incelendiğinde hem yerel hem de tescilli çeşitte tüm prolin ön uygulamalarının, çimlenme sayısının kontrol grubuna göre arttırdığı tespit edildi (Şekil 6). Yerel çeşitte en fazla çimlenme sayısı, 0,5 mM ve 1 mM prolin ön uygulamalarında tespit edildi. Bununla birlikte tescilli çeşitte de aynı konsantrasyonların etkili olduğu gözlemlendi.



Şekil 6. Yerel ve tescilli domates tohumunda çimlenme oranları

Çalışma bulgularında, kök gelişimi incelendiğinde prolin ön uygulamalarının kontrol grubuna göre belirgin bir iyileştirme gösterdiği tespit edildi (Şekil 7). Yerel çeşit kök boyları incelendiğinde en belirgin artış/iyileşmenin 1 mM ve 0,5 mM prolin ön

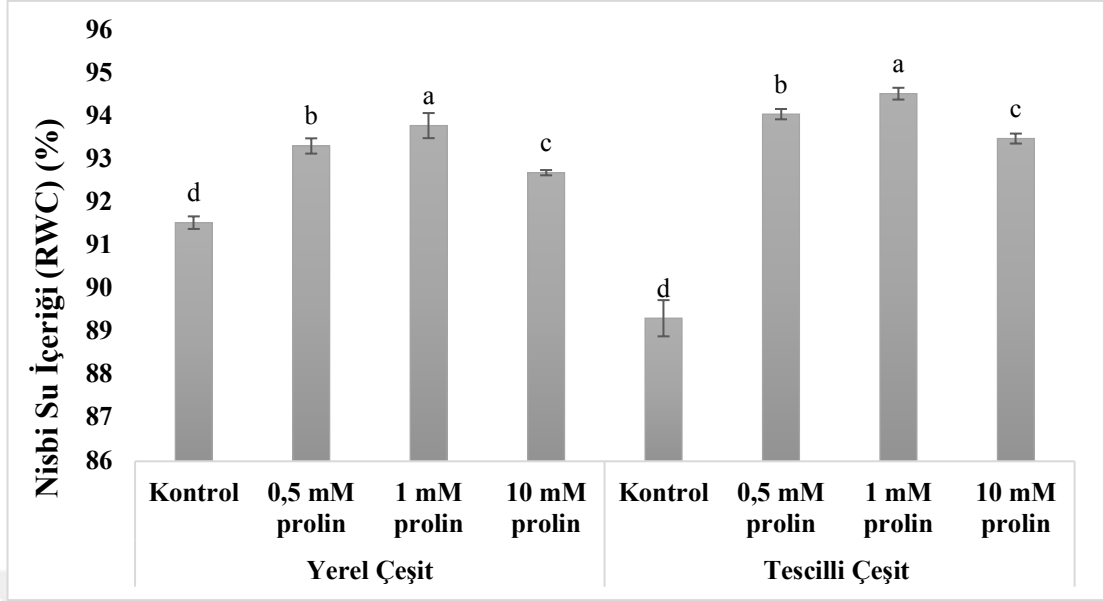
uygulamasında olduğu kaydedildi. Bununla birlikte tescilli çeşit incelendiğinde ise benzer sonuçlar gözlemlendi. Yine 1 mM ve 0,5 mM ön uygulamaları en iyi kök gelişimi sonuçlarını gösterdi.



Şekil 7. Yerel ve tescilli domates çeşitlerinde kök gelişimi

3.2.2. Nisbi Su İçeriği (RWC)

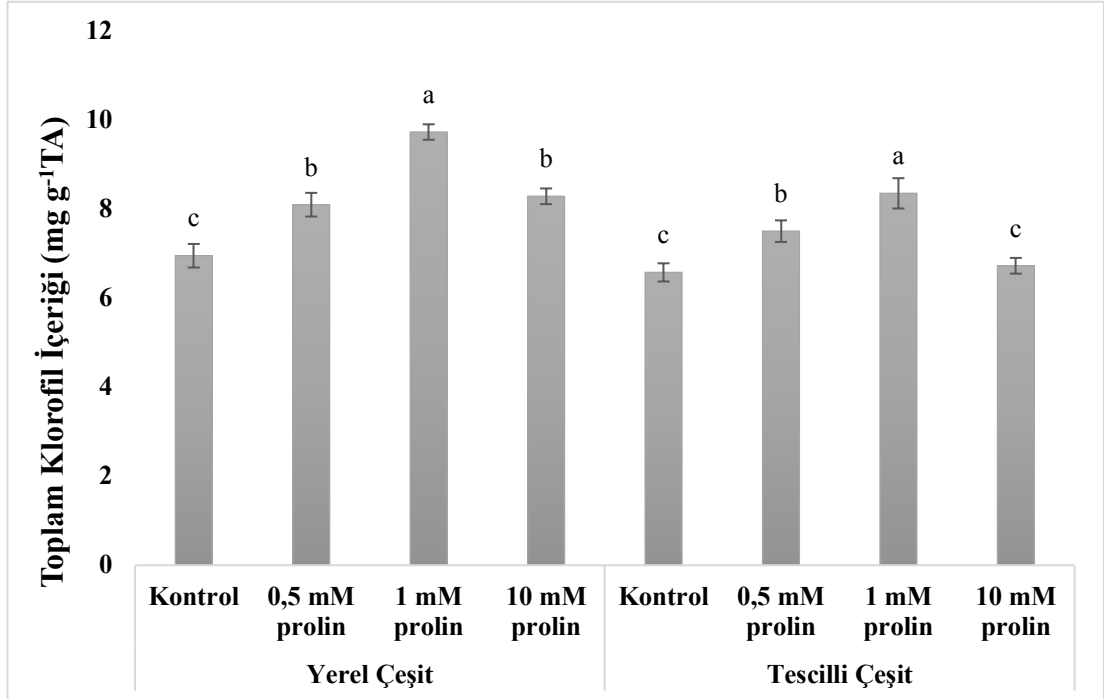
Çalışmada prolin ön uygulamalarının çimlenen tohumlarda bakır stresine karşı bitki su durumunu nasıl etkilediğini gözlemlemek için nisbi su içeriği ölçüldü (Şekil 8). Buna göre yerel çeşitte 1 mM prolin ön uygulamasının her iki çeşitte de bitki durumunu diğer ön uygulamalara daha iyi düzenlediği görüldü. Bununla beraber 0,5 mM prolin ön uygulamasının, deneyin en yüksek ikinci su içeriğine sahip grubu olduğu belirlendi.



Şekil 8. Nisbi su içeriği (RWC)

3.2.3. Toplam Klorofil İçeriği

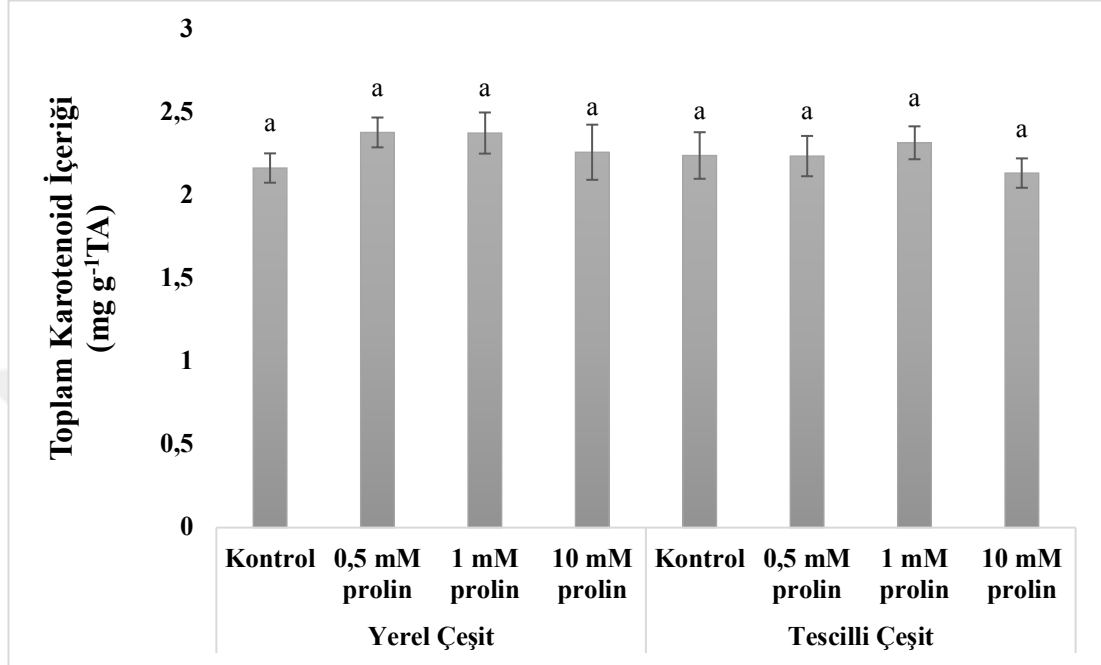
Çalışma bulgularına bakıldığında, yerel çeşitte en yüksek toplam klorofil içeriği 1 mM prolin ön uygulamasında görüldü. Benzer şekilde tescilli çeşitte de 1 mM prolin ön uygulama grubunda da en yüksek prolin içeriğine rastlandı (Şekil 9).



Şekil 9. Toplam klorofil içeriği

3.2.4. Toplam Karotenoid İçeriği

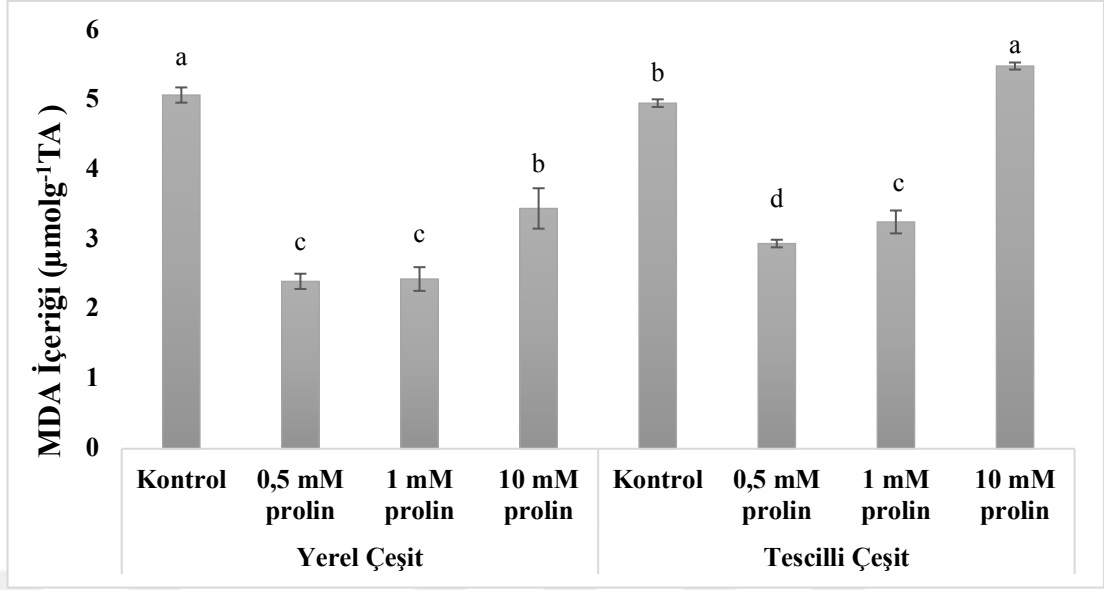
Çalışmada ölçülen karotenoid içerikleri analiz edildiğinde, her iki çeşitte de prolin ön uygulamaları arasında istatistiki açıdan anlamlı bir fark gözlenmedi (Şekil 10).



Şekil 10. Toplam karotenoid içeriği

3.2.5. Lipit Peroksidasyonu Tayini (MDA)

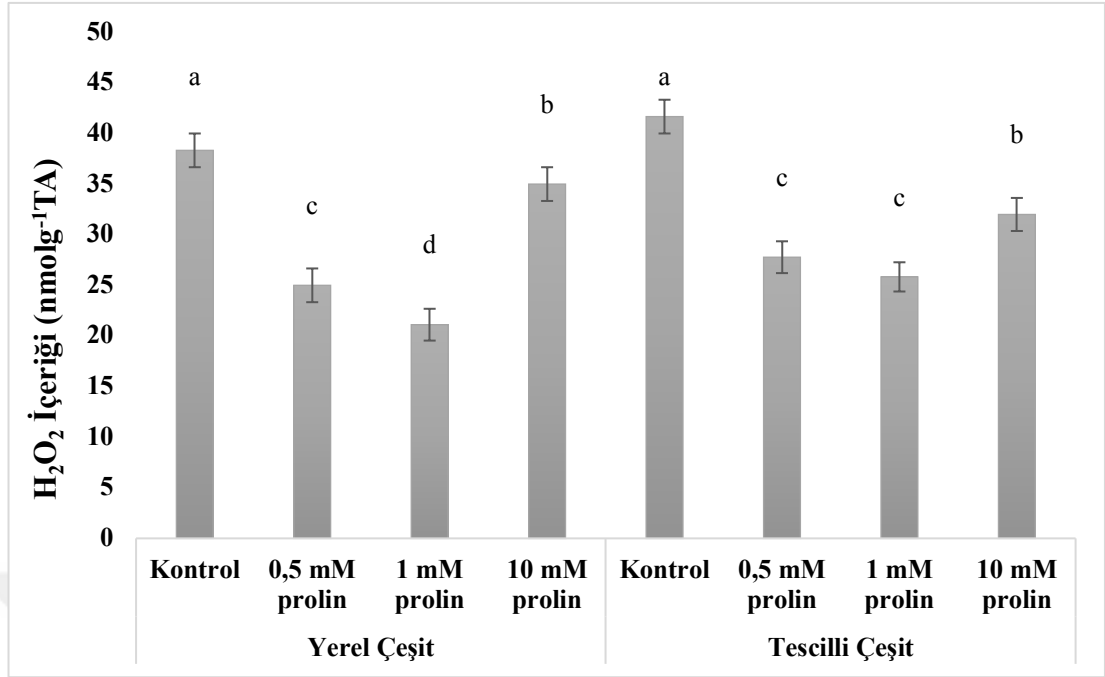
Mevcut çalışmada bakır stresi koşullarında çimlenen yerel ve tescilli domates çeşitlerinde prolin ön uygulamasının iyileştirici etkilerini gözlemlemek için lipit peroksidasyonu tayini gerçekleştirildi (Şekil 11). Bulgular incelendiğinde yerel çeşitte 0,5 mM ve 1mM prolin ön uygulamasının lipit peroksidasyonunu anlamlı bir şekilde azalttığı gözlemlendi. Yerel çeşitte 0,5 mM ve 1 mM prolin ön uygulaması arasında anlamlı bir fark bulunmadığı görüldü. Bunun yanında tescilli çeşitte ise yerel çeşide benzer şekilde en düşük lipit peroksidasyon seviyeleri sırasıyla 0,5 mM ve 1 mM prolin ön uygulamalarında tespit edildi.



Şekil 11. Lipit peroksidasyonu seviyesi (MDA içeriği)

3.2.6. İçsel Hidrojen Peroksit (H₂O₂) Miktarı

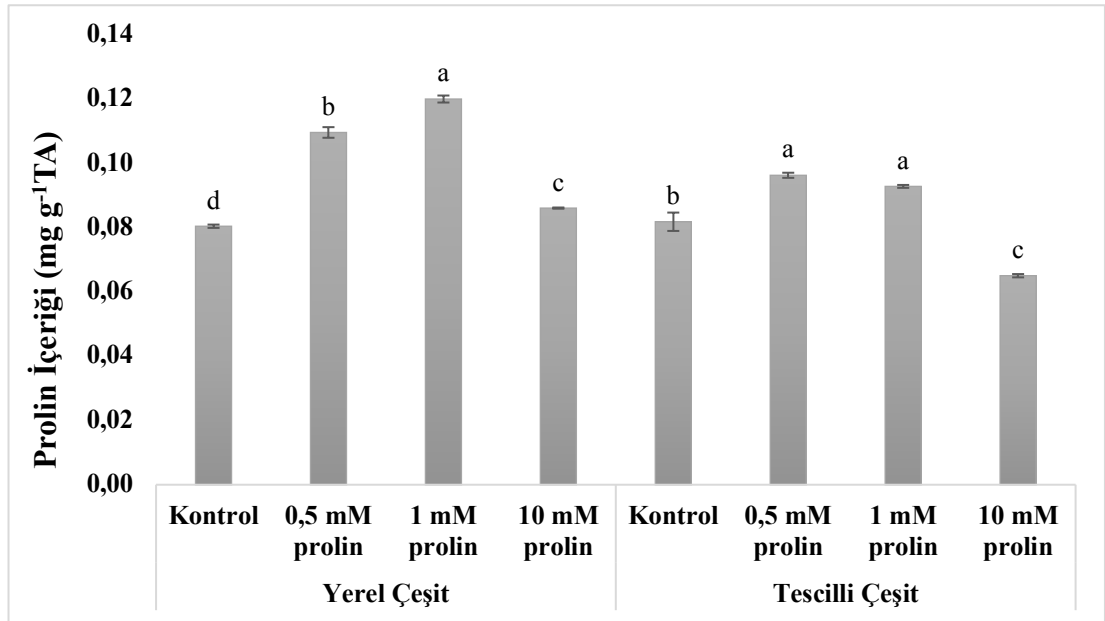
Çalışmanın bu aşamasında bakır stresi koşullarında çimlenen tohumlarda içsel H₂O₂ miktarı ölçüldü. Bulgular incelendiğinde, yerel domates çeşidindeki en düşük H₂O₂ seviyesinin 1 mM prolin ön uygulama grubunda olduğu saptandı. Ek olarak ikinci en düşük H₂O₂ seviyesinin 0,5 mM prolin ön uygulama grubunda olduğu gözlemlendi. Tescilli çeşitte ise 0,5 mM ve 1 mM prolin ön uygulama grubundaki H₂O₂ seviyesinin diğer gruplara göre önemli oranda daha düşük olduğu belirlendi. Bununla beraber 0,5 mM ve 1 mM prolin grupları arasında içsel H₂O₂ seviyesi bakımından anlamlı bir fark olmadığı tespit edildi. Her iki çeşitte de kontrol grubunda prolin ön uygulaması yapılan diğer gruplara göre içsel H₂O₂ seviyesinin daha yüksek olduğu belirlendi.



Şekil 12. Hidrojen peroksit (H₂O₂) İçeriği

3.2.7. Prolin İçeriği

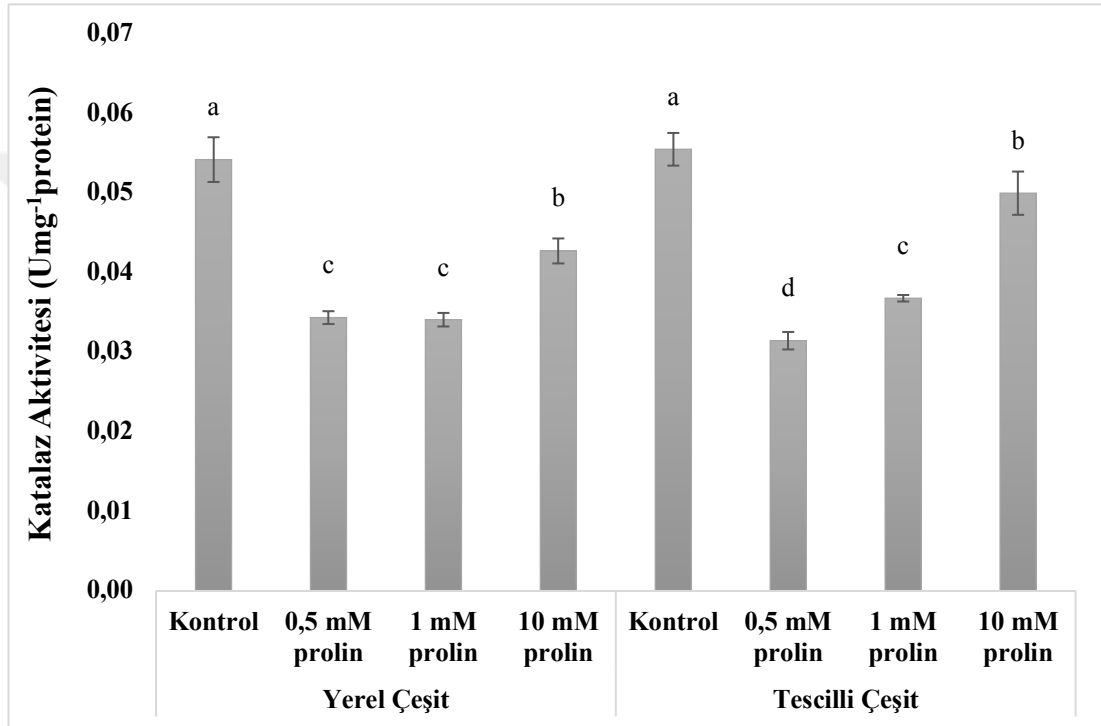
Çalışma bulguları incelendiğinde yerel çeşitte en yüksek prolin içeriğine sırasıyla 1 mM ve 0,5 mM ön uygulama gruplarında olduğu tespit edildi. Bununla birlikte tescilli çeşitte ise en yüksek prolin içeriği 0,5 ve 1 mM ön uygulama gruplarında (aralarında istatistiki bir fark bulunamadı) gözlemlendi (Şekil 13).



Şekil 13. Prolin içeriği

3.2.8. Katalaz Aktivitesi

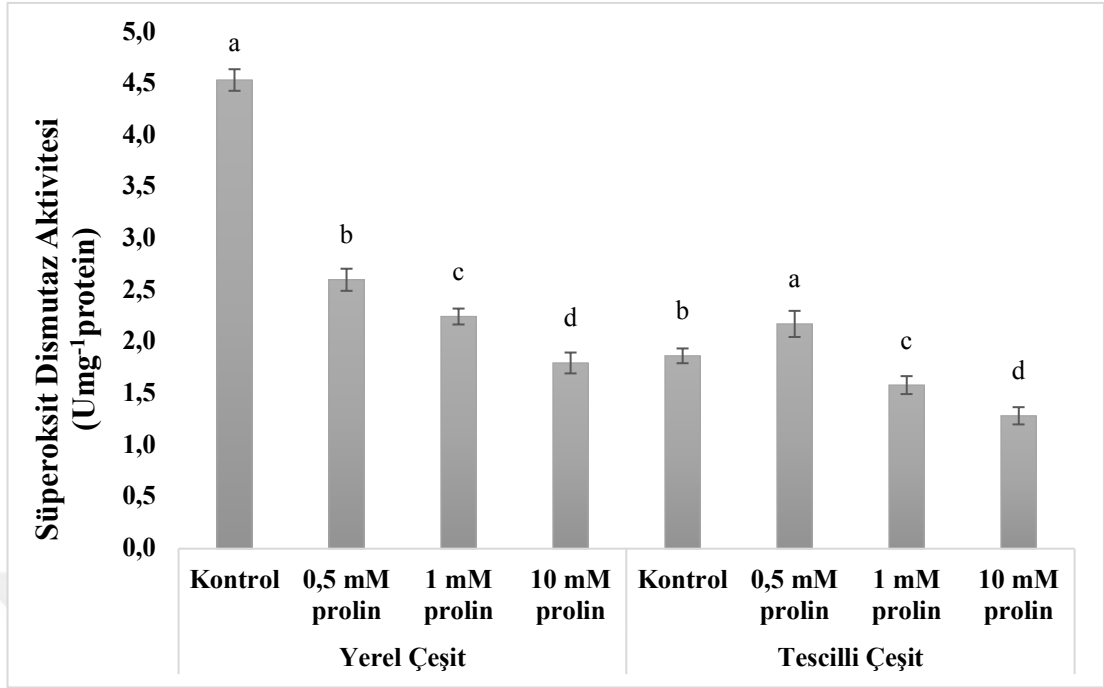
Mevcut çalışmada yerel ve tescilli domates çeşitlerinde katalaz aktivitesi belirlendi (Şekil 14). Buna göre hem yerel hem de tescilli domates çeşidinde en yüksek katalaz aktivitesi, kontrol grubunda tespit edildi. Buna karşın yerel çeşitte en düşük katalaz aktivitesi, aralarında anlamlı bir fark gözlenmeyen 0,5 ve 1 mM ön uygulama gruplarında gözlemlendi. Tescilli çeşitte ise en düşük aktivitesi sırasıyla 0,5 ve 1 mM uygulama gruplarında olduğu tespit edildi.



Şekil 14. Katalaz aktivitesi

3.2.9. Süperoksit Dismutaz Aktivitesi

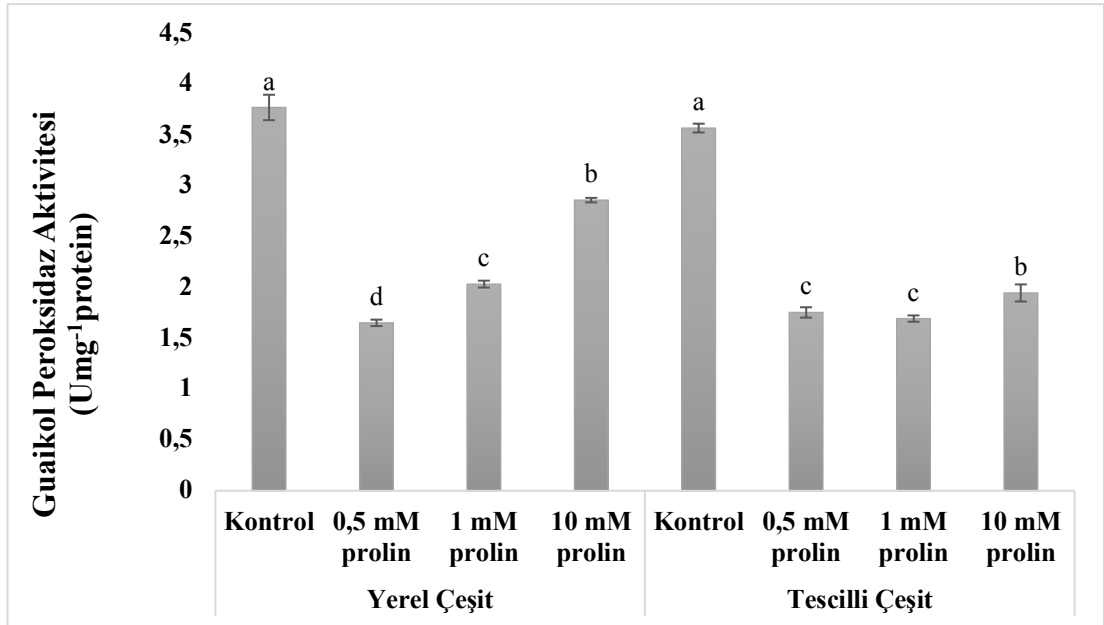
Çalışmada en yüksek süperoksit dismutaz aktivitesi yerel çeşitte kontrol grubunda görüldü. Tescilli çeşitte ise en yüksek süperoksit dismutaz aktivitesi 0,5 mM uygulama grubunda gözlemlendi (Şekil 15). Bununla birlikte her iki çeşitte de en düşük enzim aktivitesinin 10 mM ön uygulama gruplarında olduğu gözlemlendi.



Şekil 15. Süperoksit dismutaz enzim aktivitesi

3.2.10. Guaikol Peroksidaz Aktivitesi

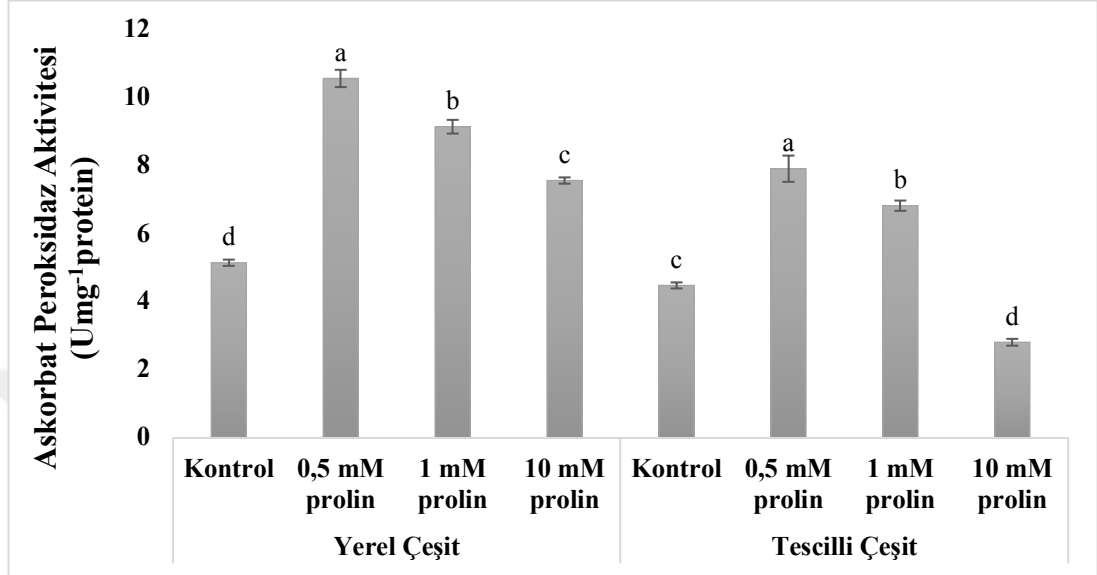
Çalışma bulgularına göre, yerel çeşitte kontrol grubu en yüksek guaikol peroksidaz aktivitesinin gözleendiği grup oldu (Şekil 16). Tescilli grupta da aynı durum söz konusu olarak gözleendi.



Şekil 16. Guaikol peroksidaz enzim aktivitesi

3.2.11. Askorbat Peroksidaz Aktivitesi

Çalışma bulguları analiz edildiğinde her iki çeşitte de en yüksek enzim aktivitesinin sırasıyla 0,5 ve 1 mM ön uygulama gruplarında olduğu tespit edildi (Şekil 17).



Şekil 17. Askorbat peroksidaz enzim aktivitesi

4. TARTIŞMA

Mevcut çalışmada bakır stresine maruz kalmış biri yerel biri tescilli olmak üzere iki farklı domates çeşidinde prolin ön uygulamasının çimlenme üzerine iyileştirici etkileri araştırıldı. Bu amaçla söz konusu tohumlar laboratuvar ortamında çimlendirildi ve prolin ön uygulamasının olası iyileştirici etkilerini incelemek için çeşitli analizler gerçekleştirildi. Bu amaçla yerel ve tescilli domates çeşitlerine ait tohumlar öncelikle hiçbir uygulama yapılmadan laboratuvar ortamında petri kaplarında çimlendirildi. Böylelikle hem tohumların çimlenme açısından tohum kaliteleri belirlendi hem de laboratuvar ortamında çimlendirilebildikleri tespit edildi. Sonraki aşamalar ise aşağıda tartışıldı.

Çalışmada öncelikli olarak çimlenmeyi ve kök gelişimini önemli ölçüde azaltan bakır konsantrasyonu tespit edildi. Her iki çeşide ait tohumlar farklı konsantrasyonlarda bakır sülfat çözeltisinde çimlendirildi. Sonuçlar, artan bakır stresi konsantrasyonlarına bağlı olarak çimlenme sayısının ve kök gelişimin azaldığını gösterdi. Bununla birlikte, bulgulara bakıldığında her iki çeşitte de çimlenmeyi önemli derecede indirgeyen konsantrasyonun 500 μM bakır ortamı olmasına karar verildi. Seçilen 500 μM 'dan daha düşük konsantrasyonların çimlenmeyi ve kök gelişimini yeterince engelleyemediği gözlemlendi. Bununla birlikte 500 μM 'dan daha yüksek konsantrasyonlarda ise çimlenme sayısının çok fazla indirildiği ve kök uçlarının kısa zamanda karardığı gözlemlendi. Kararma ile kök gelişimi de durdu ve tohumlar çimlenme yeteneğini kaybetti. Bu nedenle çalışmada etkin bakır konsantrasyonunun 500 μM olmasına karar verildi. Çimlenme sayılarına ve kök gelişimlerine bakılarak 500 μM bakır konsantrasyonundan daha yüksek uygulamaların toksik etki yaptığı ve çimlenen sürecindeki tohumların canlılıklarını kaybetmelerine neden olduğu söylenebilir. Bulgularımızı destekler nitelikte, bir çalışmada artan konsantrasyonlarda bakırın mısır köklerinde çeşitli aktivitelerin azalmasına ve kök hücrelerinde fizyolojik hasarlara neden olduğu bildirilmiştir (Liu ve ark., 2014). Bu bilgiler ışığında çalışmanın sonraki aşamalarında tohumlar için çimlenme ortamı, 500 μM bakır kullanılarak oluşturuldu.

Ayrıca tescilli ve yerel çeşit vakır stresine karşı verdikleri çimlenme yanıtları açısından değerlendirildiğinde yerel çeşidin daha iyi bir tolerans gösterdiği tesbit edildi.

Mevcut çalışmada etkin bakır stresi konsantrasyonu belirlendikten sonra prolinin iyileştirici etkileri ve etkin konsantrasyonunun belirlenmesi aşamasına geçildi. Bu amaçla 500 µM bakır stresi ortamında çimlendirilecek tohumlar önce 24 saat boyunca farklı prolin konsantrasyonlarında (0,5 mM, 1 mM, 10 mM) inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında tohumlar etkin bakır stresi ortamında çimlendirildi ve planlanan analizler gerçekleştirildi. Öncelikli olarak çimlenen tohumlarda etkin bakır konsantrasyonlarının belirlenmesi sürecinde olduğu gibi, çimlenme sayısı (oranı) ve kök gelişimi incelendi. Çimlenme sayısı incelendiğinde hem yerel çeşitte hem de tescilli çeşitte 0,5 ve 1 mM prolin ön uygulama gruplarında kontrol grubuna (sadece 500 µM bakır stresi çimlenme ortamı) göre daha yüksek çimlenme sayısı tespit edildi. Literatürde yapılan araştırmalarda domates tohumlarının bakır stresi koşullarında çimlendirildiği ve prolin ön uygulaması ile birlikte çalışıldığı bir çalışmaya rastlanamaması mevcut çalışmanın özgün yönünü vurgulamaktadır.

Çoğu zaman bitki su durumu, bitkinin maruz kaldığı stresli koşullardan ne seviyede etkilendiğine dair aydınlatıcı bilgiler sunar. Mevcut çalışmada da bu amaçla bitki su durumu belirteçlerinden birisi olan nisbi su içeriği (RWC) ölçüldü. Bulgular incelendiğinde, yerel çeşitte sırasıyla 0,5 ve 1 mM prolin ön uygulamalarının bitki su içeriğini anlamlı seviyede arttırdığı gözlemlendi. Aynı durum benzer olarak tescilli çeşitte de gözlemlendi. Bu durum; 0,5 ve 1 mM prolin ön uygulamalarındaki çimlenme yanıtları ve kök gelişimi bulguları tarafından da desteklenmektedir. Aynı zamanda bitkideki kuru madde miktarındaki artışın RWC miktarını olumlu yönde etkilediği düşünülürse, daha iyi çimlenen ve kök gelişimi daha fazla olan 1 mM prolin ön uygulamasının bitki su durumunu nasıl etkilediği daha iyi anlaşılabilir. Bu düşüncüyü destekler biçimde, pirinç (Wu ve ark., 2003) ve *Arabidopsis* (Roosens ve ark., 2002) bitkilerinde prolin miktarı ile biyokütle arasındaki korelasyondan bahsedilen raporlar mevcuttur. Kısaca, RWC içeriği bilgileri ışığında 1 mM ve sonrasında 0,5 mM prolin ön uygulamalarının kontrol ve diğer ön uygulama gruplarına kıyasla bitki su durumunu daha iyi koruduğunu söylemek mümkündür. Literatür bilgilerine bakıldığında ise çalışmamızı destekler nitelikte raporlar mevcuttur. Örnek vermek gerekirse, zeytin bitkisi ile yapılan bir çalışmada dışarıdan uygulanan prolinin tuz stresi koşullarında bitki su

potansiyeli üzerinde olumlu etkilerinin gözlemlendiği rapor edilmiştir (Al-Absi ve ark., 2002). Ek olarak, Costa ve Morel (1994) *Lectuca sativa* L. bitkisi ile gerçekleştirdikleri çalışmalarında, prolinin Cd stresine karşı bitki su içeriğini iyileştirdiğini tespit etmişler ve bu durumu prolinin ozmotik düzenleyici özelliğine bağlamışlardır.

Genellikle bitkiler abiyotik strese maruz kaldığında, stresin çeşidine ve şiddetine bağlı olarak klorofil ve karotenoid içeriklerinde azalmalar meydana gelir (Li ve ark., 2018; Nazir ve ark., 2019). Mevcut çalışmada klorofil içerikleri analiz edildiğinde, her iki çeşitte de 1 mM prolin uygulamasının klorofil içeriğini anlamlı bir şekilde arttırdığı tespit edildi. Ek olarak RWC, kök gelişimi ve çimlenme sayıları dikkate alındığında klorofil içeriğindeki artışın görülmesi, mevcut çalışmanın hipotezini destekler gibi görülmektedir (Mafakheri ve ark., 2010; Darvizheh ve ark., 2017). Bununla birlikte prolin ön uygulama gruplarında karotenoid miktarı açısından herhangi bir fark gözlenemedi.

Lipit peroksidasyonu sonrasında meydana gelen MDA, hemen hemen tüm abiyotik stres çeşitlerinde ortaya çıkan ve hücre zarındaki hasarın sonucunda oluşan önemli bir göstergedir (Kaya ve İnan, 2017). Bu nedenle mevcut çalışmada MDA seviyeleri ölçüldü. Bulgular analiz edildiğinde yerel çeşitte 0,5 ve 1 mM prolin ön uygulamasının lipit peroksidasyonunu diğer gruplara göre önemli seviyede azalttığı tespit edildi. Bununla birlikte tescilli çeşitte en düşük MDA seviyesi 0,5 mM prolin ön uygulamasında görüldü. Yine tescilli çeşitte ikinci en düşük MDA seviyesi 1 mM grubunda görüldü. Yerel çeşitte ise 0,5 ve 1 mM prolin ön uygulamaları arasında istatistiksel anlamda bir fark gözlenemedi. MDA verileri ışığında, mevcut çalışma için prolin ön uygulamasının 0,5 ve 1 mM prolin konsantrasyonlarında hücre zarındaki hasarı azalttığı ve bu nedenle MDA seviyelerinin de düştüğü söylenebilir. Çünkü prolinin hidroksil radikalini süpürdüğü literatürde bilinmektedir (Smirnoff ve Cumbes 1989; Brands ve ark., 2019). Böylece prolin ön uygulamasının belirli konsantrasyonlarda ön uygulama yapıldığında bakır stresine karşı koruyucu etki gösterdiğini söylemek mümkündür. Çalışmamızı destekler biçimde (Khator ve Shekhawat (2018) yaptığı çalışmada *Cyamopsis tetragonoloba* tohumlarında prolinin bakır miktarında arttırıcı etkisi olduğunu belirtmişlerdir.

Hidrojen peroksit, oldukça yaygın olarak bilinen bir reaktif oksijen türüdür ve bitkiler ağır metal stresi dahil hemen hemen tüm abiyotik stres koşullarına maruz kaldığında

hücrede miktarı artar. Bu nedenle mevcut çalışmada bakır stresi koşullarında çimlenen tohumların maruz kaldığı stres şiddetini gözlemlemek ve prolin ön uygulamalarının yatıştırıcı etkilerini belirlemek için hidrojen peroksit içeriği tayin edildi. Bulgular analiz edildiğinde Yerel çeşit için en düşük hidrojen peroksit içeriklerinin sırasıyla 1 ve 0,5 mM ön uygulama gruplarında olduğu görüldü. Tescilli çeşit için ise 0,5 ve 1 mM prolin ön uygulama grupları arasında anlamlı bir fark olmadığı ve en düşük hidrojen peroksit içeriklerine sahip oldukları gözlemlendi. Artan stres etkisine bağlı olarak içsel hidrojen peroksit miktarının da arttığı bilinmektedir (Singh ve ark., 2010; Hayat ve ark., 2012; Hossain ve ark., 2014). Bununla birlikte stres etkilerinin yatışması ya da hafiflemesi durumunda hidrojen peroksit içeriğinin de azalması beklenen bir durumdur (Maiti ve ark., 2017). Çalışma bulguları bu yönüyle literatür bilgisiyle uyumludur. Mevcut çalışmadaki hidrojen peroksi içerikleri ve literatür bilgisi ışığında 0,5 ve 1 mM prolin ön uygulamalarının bakır stresi etkilerini hafiflettiği/yatıştırdığı ve bu nedenle içsel hidrojen peroksit seviyesinin düştüğünü söylemek mümkündür. Dahası bu iddayı çalışmanın diğer bulguları da desteklemektedir. Söz konusu 0,5 ve 1 mM prolin ön uygulamalarında çimlenme oranları, kök gelişimi RWC değerleri ve MDA seviyeleri hem kontrol grubuna hem de diğer gruplara göre daha olumlu sonuçlar göstermiştir. Özellikle MDA seviyelerinin hidrojen peroksit seviyeleri ile korelasyon göstermesi önerilen konsantrasyonlarda prolin ön uygulamasının bakır stresinin oluşturduğu hücrel hasarı azalttığını göstermektedir.

Prolin, bitkilerde bulunan hem antioksidan olarak hem de osmolit olarak görev yapan bir bileşiktir. Prolin, bitki strese maruz kaldığında sentezi artar ve maruz kalınan stresin çeşidine ve şiddetine bağlı olarak antioksidan, osmolit ya da hem osmolit hem de antioksidan olarak görev yapar (Seki, 2007; Zouari ve ark., 2019). Aynı zamanda stres maruz kalma sürecinde hücrel sinyalizasyondan da rol aldığı bilinmektedir (El-Enany ve Issa, 2001; Hossain ve ark., 2019). Prolinin çok fonksiyonlu özelliklerinin olması ve iyi bir stres parametresi olması sebebiyle mevcut çalışmada dışarıdan uygulanacak bileşik olarak seçildi. Aynı zamanda dışarıdan uygulanacak prolinin bakır stresi koşullarındaki çimlenme davranışlarına olan etkilerini izlemek amacıyla da içsel prolin seviyesi ölçüldü. İçsel prolin seviyeleri analiz edildiğinde, ön uygulama gruplarında en fazla prolin içeriğinin yerel çeşitte 1 mM ve sonrasında 0,5 mM gruplarında olduğu belirlendi. Ek olarak tescilli çeşitte ise aralarında anlamlı bir fark olmayacak şekilde en yüksek prolin içeriğine 0,5 ve 1 mM gruplarında rastlandı. Bu

bulgular, prolin ön uygulamasının ancak belirli konsantrasyonlarda daha iyi yatıştırıcı etki yaptığını göstermektedir. Bu düşünce, 10 mM prolin ön uygulama grubunda tespit edilen prolin içeriğinin diğer gruplara göre daha yüksek olmamasının nedenini açıklayabilir. Bunun yanında diğer uygulama sonuçları, iyileştirici/yatıştırıcı etki yaptığı önerilen 0,5 ve 1 mM prolin ön uygulamalarının hidrojen peroksit seviyesi ve MDA miktarını azaltırken bitki su durumunu arttırması içsel prolin miktarıyla uyumluluk göstermektedir. Çalışmamızı destekler biçimde yapılan bir çalışmada zeytin fidanları üzerine kadmiyum stresi uygulanmış iyileştirici olarak da prolin verilmiştir ve MDA miktarına bakıldığında prolinin iyileştirici etkisi çalışmamıza benzer şekilde gözükmektedir. (Zouari ve ark., 2016b).

Bitkiler maruz kaldıkları stresli koşullarla mücadele etmek ve hayatta kalabilmek için birçok sisteme sahiptirler. Bu sistemlerden en önemlilerden birisi de enzimatik ve enzimatik olmayan bileşenlerden oluşan antioksidan sistemdir. Antioksidan sistem stresli koşullarda devreye girer ya da aktiviteleri artar (Fu ve Huang, 2001; Zhao ve ark., 2010). Bu da bitkinin stresin olumsuz etkilerini yatıştırmada oldukça etkili bir mekanizmadır. Bu amaçla mevcut çalışmada bitkilerde katalaz, süperoksit dismutaz, guaikol peroksidaz ve askorbat peroksidaz gibi yaygın olarak bilinen antioksidan enzim aktiviteleri ölçüldü.

Katalaz aktivitesi incelendiğinde, her iki çeşitte de iyileştirici/yatıştırıcı etkisi olduğu önerilen 0,5 ve 1 mM prolin konsantrasyonlarının söz konusu enzim aktivitesinin diğer gruplara göre daha düşük çıktığı gözlemlendi. Bunun nedeni 0,5 ve 1 mM gruplarında stresin olumsuz etkileri yatıştırıldığı için katalaz aktivitesinin de azalması olabilir. Çalışmada ölçülen hidrojen peroksit ve MDA miktarlarının da söz konusu bu konsantrasyonlarda düşük çıkması bu önermeyi desteklemektedir. Çünkü katalaz enzimi hidrojen peroksitin temizlenmesinde görev almaktadır (Zouari ve ark., 2016a). Hücresel düzeyde iyileşmeye bağlı olarak katalaz aktivitesinin de azaldığı düşünülebilir. Literatürde bulunan birçok rapor mevcut çalışmanın önermesini desteklemektedir. Örnek vermek gerekirse kadmiyum stresi maruz kalan zeytin (*Olea europaea* L.) fidanları üzerine prolin uygulaması yapılmış ve sonucunda oluşan enzimatik antioksidan savunma sistemi üzerindeki etkisine bakılmış bizim çalışmamıza benzer olarak katalaz aktivitesinin azaldığı görülmüştür. (Zouari ve ark., 2016b).

Süperoksit dismutaz aktivitesi, en fazla olarak yerel çeşitte kontrol grubunda; tescilli çeşitte ise 0,5 mM prolin ön uygulama grubunda tespit edildi. Literatürde prolin uygulamasının söz konusu enzim aktivitesini arttırdığı bildirilmektedir (Shetty, 1997; Osman, 2015; Ghaffari ve ark., 2019). Bu açıdan çalışma bulguları ile literatür bilgileri uyuşmamaktadır. Bu durumu aydınlatmak için ileride daha fazla araştırma yapılması önerilebilir.

Guaikol peroksidaz aktivitesine bağlı bulgular incelendiğinde, en yüksek aktivitenin her iki çeşitte de kontrol grubunda olduğu görüldü. Mevcut çalışmada iyileştirici/yatıştırıcı etki yaptığı önerilen 0,5 ve 1 mM prolin ön uygulamaları söz konusu enzim aktivitesinde azalmaya neden oldu. Bunun nedeni 0,5 ve 1 mM prolin konsantrasyonlarının her iki çeşitte de bakır stresinin olumsuz etkilerini azaltması olabilir. Nitekim bu konsantrasyonlarda hidrojen peroksit miktarının diğer gruplara göre daha düşük çıkması ve buna bağlı olarak MDA seviyesinin de azalması bu iddiamızı desteklemektedir. Guaikol peroksidaz bitki hücrede hidrojen peroksidin temizlenmesinden sorumlu bir enzimdir (Gill ve Tuteja 2010; De Freitas ve ark., 2018). Ayrıca 0,5 ve 1 mM prolin ön uygulamalarında içsel prolin miktarının da arttığı çalışmada görüldü. Prolinin hücrede antioksidan olarak görev yaptığı da bilinmektedir (Ashraf ve Foolad 2007; Kováčik ve ark. 2011; Hayat ve ark., 2012; Kasote ve ark. 2015; De Freitas ve ark., 2019, Forlani ve ark. 2019). Bu bilgiler ışığında mevcut çalışma için söz konusu enzim aktivitesindeki azalışı, bitkinin dışarıdan prolin ön uygulamasıyla artan savunma kapasitesiyle açıklamak mümkündür.

Askorbat peroksidaz, hücrede hidrojen peroksidin temizlenmesinden sorumlu oldukça önemli bir başka antioksidan enzimdir (Asada, 1992). Çalışma bulguları incelendiğinde en yüksek enzim aktivitesinin her iki çeşitte de 0,5 ve 1 mM prolin ön uygulamalarında olduğu görüldü. Bununla birlikte katalaz ve guaikol peroksidaz aktivitelerindeki azalış çalışma bulgularındaki düşük hidrojen peroksit seviyesi ile açıklandı. Mevcut çalışmada içsel hidrojen peroksit seviyesinin az olmasına karşın askorbat peroksidaz aktivitesinin yüksek çıkması açıklanması gereken bir durumdur. Bu durum çelişki gibi görünmesine rağmen, antioksidan enzimlerin hidrojen peroksitide olan farklı affinite seviyelerine ve hücre içi lokasyonlarının değişiklik göstermesiyle açıklanabilir. Çünkü askorbat peroksidaz katalaza göre hidrojen peroksitide karşı daha yüksek bir affinite göstermektedir (Noctor ve Foyer, 1998). Aynı zamanda askorbat

peroksidaz hücrede stoplazma dahil birçok organelde bulunurken katalaz ise yaygın olarak peroksizomlarda bulunur (Büyük ve ark., 2012). Bu bilgiler ışığında askorbat peroksidazın çok daha hızlı aktivite göstererek hidrojen peroksidi temizlediği ve böylece hem hidrojen peroksit seviyesinin azalmasına hem de katalaz ve guaikol peroksidaz gibi antioksidan enzim aktivitelerini “negatif feedback” yoluyla azalmasına neden olduğunu söylemek mümkündür. Dahası çeşitli stres koşullarında askorbat peroksidaz aktivitesinin arttığını gösteren raporlar mevcuttur. Rady ve ark. (2019) tuz stresi altındaki buğday tohumlarına uygulanan prolinin, askorbat peroksidaz aktivitesini yaklaşık %25 arttırdığını raporlamıştır. Ayrıca, Li ve ark. (2015) düşük sıcaklık ve ışık altındaki salatalık fidanlarında askorbat peroksidaz enziminin arttığını belirlemişlerdir.

Özetle çalışma sonuçları bir bütün olarak incelendiğinde, dışarıdan uygulanan prolinin domates tohumları çimlenmesini bakır stresi koşullarında önemli derecede arttırdığı belirlendi. Ek olarak prolin ön uygulamalarının sadece belirli konsantrasyonlarda (0,5 ve 1 mM) optimum etki gösterdiği tespit edildi. Mevcut çalışmada, prolin uygulaması osmolit rolü ile bitki içsel durumunu düzenlediği ve antioksidan rolü ile de strese bağlı olarak artan hidrojen peroksidi temizlediği ve böylece tohumları bakır stresinin olumsuz etkilerine karşı koruduğu kaydedildi. Ayrıca mevcut çalışma ile Artvin ili Tütüncüler köyünde yıllardır yetiştiriciliği yapılan ve yetiştiği coğrafyanın hem toprak hem de iklimsel özelliklerine doğal bir şekilde uyum sağlayan domates çeşidinin bakır stresine olan toleransının oldukça yüksek olduğu gözlemlendi. Çünkü söz konusu bu domates çeşidinin yetiştiği lokalite bakır gibi yeraltı kaynakları yönünden oldukça zengindir. Bu sebeple mevcut çalışma söz konusu domates çeşidinin sahip olduğu genetik potansiyelin değerlendirilmesi ve gelecek kuşaklar için koruma altına alınması açısından önemli bilgiler sunmaktadır.

5. SONUÇ

1. Bulgular incelendiğinde hem yerel hem de tescilli çeşitler için etkili bakır stresi konsantrasyonunun 500 μM 'dan itibaren başladığı tespit edildi.
2. Mevcut çalışmada dışarıdan tatbik edilen prolinin ön uygulama şeklinde gerçekleştirildiği takdirde 0,5 ve 1 mM konsantrasyonlarda oldukça etkili sonuçlar verdiği ve bakır stresine karşı tolerans artışı sergilediği gözlemlendi.
3. Çalışma ile yerel domates çeşidinin tescilli domates çeşidine göre bakır stresine karşı daha toleranslı olduğu belirlenmiştir.
4. Mevcut çalışma verileri bir bütün olarak ele alındığında prolinin iyileştirici/yatıştırıcı etkisini temel olarak osmolit ve antioksidan rolü gösterdiği kabul edilmiştir. Ayrıca askorbat peroksidaz haricindeki diğer ölçülen antioksidan enzim aktivitelerinin düşük çıkması, söz konusu iyileşmenin idda edildiği gibi prolinin osmolit ve antioksidan olarak oldukça etkili bir rol aldığını göstermektedir.

6. ÖNERİLER

Mevcut çalışmada prolin domates çeşitlerine tohumdan ön uygulama şeklinde tatbik edildi. Bu nedenle elde edilen bulgular bu uygulama yönteminin sonuçları olarak kabul edilmelidir. Bununla birlikte prolinin çimlenmeden itibaren büyüme ortamına doğrudan bakır ile birlikte verilmesi de denenmesi gereken başka bir yöntemdir. Ayrıca literatürde farklı bitkilerde, farklı bileşiklerle yapraktan uygulama yönteminin de çalışıldığı bilinmektedir. Bu gibi farklı yöntemlerin denenmesi prolinin etki mekanizmasının daha da iyi aydınlatılmasına ve hangi yöntemin en iyi sonuç vereceğine karar verilebilmesi açısından ileride çalışılabilir.

Bulgular incelendiğinde temel stres parametrelerinde prolin ön uygulamasının oldukça etkili sonuçlar verdiği görülmektedir. Ek olarak ileriki çalışmalarda prolin metabolizmasında rol alan sentez ve yıkım genlerinin ifade düzeyleri incelenebilir ve daha aydınlatıcı bilgilere ulaşılabilir. Antioksidan enzimleri kodlayan genler için de benzer ifade düzeylerinin araştırılması; çalışmada düşük aktivite gösteren bu enzimlerin etki mekanizmasının daha detaylı açıklanmasına yardımcı olabilir.

Mevcut çalışma bulgularından yola çıkılarak, çimlenen tohumlarının erişkin bitki olana kadar büyütülmesi ve daha fazla parametre ile bakır stresine karşı prolinin farklı uygulama yöntemlerinin çalışılması ile bilimsel literatüre daha fazla katkıda bulunulabilir.

KAYNAKLAR

- Aebi, H.E., Catalase, 1983. Methods of Enzymatic Analysis, In: Bergmeyer, H.U. (Ed.), Weinheim: Verlag, Chemie, 273-286 s.
- Al-Absi, K., Qrunfleh, M., Abu-Sharar, T., 2002. Mechanism of salt tolerance of two olive *Olea europaea* L. cultivars as related to electrolyte concentration and toxicity. In XXVI International Horticultural Congress, *Environmental Stress and Horticulture Crops*, 618, 281-290 s.
- Ali, Q, Anwar, F., Ashraf, M., Saari, N., Perveen, R., 2013. Ameliorating effects of exogenously applied proline on seed composition, seed oil quality and oil antioxidant activity of maize (*Zea mays* L.) under drought stress, *Int J Mol Sci*, 14: 818-835.
- Ali, S., Shahbaz, M., Shahzad, A. N., Khan, H. A. A., Anees, M., Haider, M. S., Fatima, A., 2015. Impact of copper toxicity on stone-head cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) in hydroponics, *PeerJ*, 3, 1119.
- Arnon, D.I., 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts, polyphenoxidase in beta vulgaris, *Plant physiology*, 24, 1-15.
- Asada K., 1992. Ascorbate peroxidase - A hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants, *Physiol Plantarum*, 85, 235-241.
- Ashraf, M, Foolad, M.R., 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance, *Environ Exp. Bot.*, 59, 206-216.
- Athar, H.R., Khan, A., Ashraf, M., 2008. Exogenously applied ascorbic acid alleviates salt-induced oxidative stress in wheat, *Environ Exp Bot.*, 63, 224-231.
- Banuelos, G. S., Ajwa, H.A., Mackey, B., Wu, L., Cook, C., Akohoue, S., Zambruski, S., 1997. Selenium- induced growth reduction in brassica land races considered for phytoremediation, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 36, 282-287.
- Barrett, D.M., Weakley, C., Diaz, J.V., Watnik, M., 2007. Qualitative and nutritional differences in processing tomatoes grown under commercial organic and conventional production systems, *Journal of Food Science*, 72(9), 441-451.
- Bassi, R, Sharma S.S., 1993. Proline accumulation in wheat seedlings exposed to zinc and copper, *Phytochem*, 33, 1339-42.
- Bates, L.S., Waldren, R.P. ve Teare, I.D., 1973. Rapid Determination of Free Proline for Water Stress Studies, *Plant and Soil*, 39, 205-207.
- Beauchamp, C. ve Fridovich, I., 1971. Superoxide Dismutase: Improved Assays and An Assay Applicable to Acrylamide Gels, *Analytical Biochemistry*, 44, 276-287.
- Bergougoux, V., 2014. The history of tomato: From domestication to biopharming, *Biotechnology Advances*, 32, 170-189.

- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Brands, S., Schein, P., Castro-Ochoa, K.F., Galinski, E.A., 2019. Hydroxyl radical scavenging of the compatible solute ectoine generates two N-acetimides. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 674, 108097.
- Büyük, İ., Soydam-Aydın, S., Aras, S., 2012. Molecular responses of plants to stress conditions, *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 69(2), 97-110.
- Carrier, P., Baryla, A., Havaux, M., 2003. Cadmium distribution and microlocalization in oilseed rape (*Brassica napus*) after long-term growth on cadmium-contaminated soil, *Planta*, 216(6), 939-950.
- Cohu, C.M., Pilon, M., 2010. Cell biology of copper. In: Hell, R., Mendel, R.R. (Eds.), *Plant Cell Monographs: Cell Biology of Metals and Nutrients*, Springer, Heidelberg, vol. 17, 55–74 s.
- Costa, G., Morel, J.L., 1994. Water relations, gas exchange and amino acid content in Cd-treated lettuce, *Plant Physiol Biochem*, 32:561-70.
- Cramer, G.R., 2010. Abiotic stress and plant responses from the whole vine to the genes, *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 16, 86-93.
- Cunningham, S.D., Shann, J.R., Crowley, D.E., Anderson, T.A., 1997. *Phytoremediation of Contaminated Water and Soil. Phytorematadion of Soil and Water Contaminants*, American Chemical Society, Washington, D.C., 2-17 s.
- DalCorso, G., Farinati, S., Furini, A., 2010. Regulatory networks of cadmium stress in plants. *Plant Signaling and Behavior*, 5(6), 663-667.
- Darvizheh, H., Zavareh, M., Ghasemnezhad, M., 2017. Effects of prolin application on biochemistry characteristics of German chamomil (*Matricaria chamomilla* L.) in water stress, *Applied Research of Plant Ecophysiology*, 4(1), 35-60.
- De Freitas, P.A.F., de Carvalho, H.H., Costa, J.H., de Souza Miranda, R., da Cruz Saraiva, K.D., de Oliveira, F.D.B., Gomes-Filho, E., 2019. Salt acclimation in sorghum plants by exogenous proline: physiological and biochemical changes and regulation of proline metabolism, *Plant Cell Rep*, 38, 403–416.
- De Freitas, P.A.F., de Souza Miranda, R., Marques, E.C., Prisco, J.T., Gomes-Filho, E., 2018. Salt tolerance induced by exogenous proline in maize is related to low oxidative damage and favorable ionic homeostasis, *J Plant Growth Regul.*, 37, 911–92.
- Demirevska-Kepova, K., Simova-Stoilova, L., Stoyanova, Z., Holzer, R., Feller, U., 2004. Biochemical changes in barley plants after excessive supply of copper and manganese, *Env. Exp. Bot.*, 52, 253–266.
- Dinney, J.R., Long, T.A., Wang, J.Y., Jung, J.W., Mace, D., Pointer, S., Benfey, P. N., 2008. Cell identity mediates the response of *Arabidopsis* roots to abiotic stress, *Science*, 320(5878), 942-945.

- Droppa, M., Masojidek, J., Ro'zsa, Z., Wolak, A., Horva'th, L.I., Farkas, T., Horva'th, G., 1987. Characteristics of Cu deficiency-induced inhibition of photosynthetic electron transport in spinach chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta*, 891, 75–84.
- Dubey, R.S., 2011. Metal toxicity, oxidative stress and antioxidative defense system in plants. In: *Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Higher Plants*, S. D. Gupta, Ed., CRC Press, Boca Raton, Fla, USA, 177–203 s.
- El-Enany, A.E., Issa, A.A., 2001. Proline alleviates heavy metal stress in *Scenedesmus armatus*, *Folia microbiologica*, 46(3), 227-230.
- Elleuch, A., Chaa'bene, Z., Grubb, D.C., Drira, N., Mejdoub, H., Khemakhem, B., 2013. Morphological and biochemical behavior of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) under copper stress, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 98, 46–53.
- Elloumi, N., Belhaj, D., Jerbi, B., Zouari, M., Kallel, M., 2016. Effects of sewage sludge on bio-accumulation of heavy metals in tomato seedlings, *Spanish Journal of Agricultural Research*, 14(4), 17.
- Erba, D., Casiraghi, M.C., Ribas-Agusti, A., Caceres, R., Marfa, O., Castellari, M., 2013. Nutritional value of tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.) grown in greenhouse by different agronomic techniques, *Journal of Food Composition and Analysis*, 31(2), 245-251.
- Fao, 2018. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). FAOSTAT, <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Erişim Tarihi: 11.05.2018.
- Farago, M.E., Mullen, W.A., 1989. Plants which accumulate metals. IV. A possible copper-proline complex from the roots of *Armeria maritima*, *Inorg Chim Acta* 32, 93-94.
- Favati, F., Lovelli, S., Galgano, F., Miccolis, V., Di Tommaso, T., Candido, V., 2009. Processing tomato quality as affected by irrigation scheduling. *Scientia Horticulturae*, 122(4), 562-571.
- Ferreira, P.A.A., Ceretta, C.A., Soriani, H.H., Tiecher, T.L., Soares, C.R.F.S., Rossato, L.V., Nicoloso, F.T., Brunetto, G., Paranhos, J.T., Cornejo, P., 2015. *Rhizophagus clarus* and phosphate alter the physiological responses of *Crotalaria juncea* cultivated in soil with a high Cu level, *Appl. Soil Ecol.*, 91, 37–47.
- Forlani, G., Trovato, M., Funck, D., Signorelli, S., 2019. Regulation of Proline Accumulation and Its Molecular and Physiological Functions in Stress Defence. In: Hossain M., Kumar V., Burritt D., Fujita M., Mäkelä P. (eds) *Osmoprotectant-Mediated Abiotic Stress Tolerance in Plants*. Springer, Cham.
- 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.
- Gamalero, E., Lingua, G., Berta, G., Glick B.R., 2009. Beneficial role of plant growth promoting bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi on plant responses to heavy metal stress, *Canadian. J. Microbiol.*, 55(5), 501– 514.

- Gang, A., Vyar, A., Vgas, H., 2013. Toxic effect of heavy metals on germination and seedling growth of wheat, *J. Env. Res. and Dev.*, 8(2), 206-213.
- Gardea-Torresdey, J.L., Polette L., Artega S., Tiemann K.J., Bibb J. and Gonzales J.H., 1996. Determination of the content of hazardous heavy metals on *Larrea tridentata* grown around a contaminated area. Proceedings of the eleventh Annual EPA Conf. On Hazardous Waste Research, Edited by L.R. Erickson, D.L. Tillison, S.C. Grant and J.P. McDonald, Albuquerque, NM, 660 s.
- Garg, N., Cheema, D.S., Dhath, A.S., 2008. Genetics of yield, quality and shelf life characteristics in tomato under normal and late planting conditions. *Euphytica*, 159, 275–288.
- Gerszberg, A., Hnatuszko-Konka, K., 2017. Tomato tolerance to abiotic stress: a review of most often engineered target sequences, *Plant Growth Regulation*, 83(2), 175-198.
- Ghaffari, H., Tadayon, M. R., Nadeem, M., Cheema, M., Razmjoo, J., 2019. Proline-mediated changes in antioxidant enzymatic activities and the physiology of sugar beet under drought stress, *Acta Physiologiae Plantarum*, 41(2), 23.
- Gill, S.S., Tuteja, N., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery abiotic stress tolerance crop plants, *Plant Physiol Biochem*, 48, 909–930.
- Gölükcü, M., Toker, R., Tokgöz, H., 2016. Domatesin beslenme özellikleri ve gıda sanayisinde değerlendirilmesi. *Türkiye Tohumcular Birliği Dergisi*, 17, 46-51.
- Güvenç, İ., 2017. Sebzeçilik: Temel Bilgiler, Muhafaza ve Yetiştiricilik. Nobel Yayınları, 288 s.
- Güzel, S., Terzi, R., 2013. Exogenous hydrogen peroxide increases dry matter production, mineral content and level of osmotic solutes in young maize leaves and alleviates deleterious effects of copper stress. *Botanical Studies*, 54(1), 26.
- Habiba, U., Ali, S., Farid, M., Shakoob, M.B., Rizwan, M., Ibrahim, M., Abbasi, G.H., Hayat, T., Ali, B., 2015. EDTA enhanced plant growth, antioxidant defense system, and phytoextraction of copper by *Brassica napus* L., *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, 22, 1534–1544.
- Hayat, S., Hayat, Q., Alyemeni, M.N., Wani, A.S., Pichtel, J., Ahmad, A., 2012. Role of proline under changing environments, *Plant Signaling and Behavior*, 7, 1456-1466.
- Heath, R.L., Packer, L., 1968. Photoperoxidation in Isolated Chloroplast. I. Kinetics and Stoichiometry of Fatty Acid Peroxidation, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125, 189-198.
- Hegedus, A., Erdei S., Horvath, G., 2001. Comparative studies of H₂O₂ detoxifying enzymes in green and greening barley seedlings under cadmium stress, *Plant Sci.*, 160, 1085–1093.
- Hossain, M.A., Hoque, A., Burritt, D., Fujita, M., 2014. Proline Protects Plants Against Abiotic Oxidative Stress: Biochemical and Molecular Mechanisms stress, *Biologia Plantarum*, 42, 249–257.

- Hossain, M.A., Kumar, V., Burritt, D.J., Fujita, M. ve Mäkelä, P.S., 2019. Osmoprotectant-Mediated Abiotic Stress Tolerance in Plants. Osmoprotectant-Mediated Abiotic Stress Tolerance in Plants, Springer Nature Switzerland AG.
- Imran, M.A., Sajid, Z.A., Chaudhry, M.N., 2015. Arsenic (As) toxicity to germination and vegetative growth of sunflower (*Helianthus annuus* L.), *Pol J Environ Stud*, 24 (5), 1993-2002.
- Jangid, K.K., Dwivedi, P., 2016. Physiological responses of drought stress in tomato: a review, *International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology*, 9, 53.
- Jung, H.I., Gayomba, S.R., Yan, J., Vatamaniuk, O.K., 2014. Brachypodium distachyon as a model system for studies of copper transport in cereal crops, *Front. Plant Sci.*, 5, 236–242.
- Kasote, D.M., Katyare, S.S., Hegde, M.V., Bae, H., 2015. Significance of antioxidant potential of plants and its relevance to therapeutic applications. *International Journal of Biological Sciences*, 11(8), 982–991.
- Kavi Kishore, P.B., Sangam, S., Amrutha, R.N., Laxmi, P.S., Naidu, K.R., Rao, K.R.S.S., Rao, S., Reddy, K.J., Theriappan, P., Sreenivasulu, N., 2005. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance, *Curr. Sci.*, 88, 424–438.
- Kaya, A., İnan, M., 2017. Tuz (NaCl) stresine maruz kalan reyhan (*Ocimum basilicum* L.) bitkisinde bazı morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal parametreler üzerine salisilik asidin etkileri, *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 21 (3), 332-342.
- Khan, S., Cao, Q., Zheng, Y.M., Huang, Y.Z., Zhu, Y.G., 2008. Health risks of heavy metals in contaminated soils and food crops irrigated with wastewater in Beijing, *China. Environ Pollut.*, 152:686-692.
- Khator, K., Shekhawat, G.S., 2018. Regulatory role of thiols and proline in mitigation of Cu induced phytotoxicity in seven day's old hydroponically acclimatized seedling of *Cyamopsis tetragonoloba*, *Biotech Today: An International Journal of Biological Sciences*, 8, 48-57.
- Kholodova, V., Volkov, K., Abdeyeva, A., Kuznetsov, V.V., 2011. Water status in *Mesembryanthemum crys-talinum* under heavy metal stress, *Environ. Exp. Bot.*, 71, 382–389.
- Kolbert, Z., Peto, A., Lehotai, N., Feigl, G., Erdei, L., 2012. Long-term copper (Cu²⁺) exposure impacts on auxin, nitric oxide (NO) metabolism and morphology of *Arabidopsis thaliana* L., *Plant Growth Regul.*, 68, 151–159.
- Kováčik, J., Klejdus, B., Bačkor, M., 2011. Physiological responses of root-less epiphytic plants to acid rain, *Ecotoxicology* 20, 348–357.
- Ku, H.M., Tan, C.W., Su, Y.S., Chiu, C., Chen, C.T., Jan, F.J., 2012. The effect of water deficit and excess copper on proline metabolism in *Nicotiana benthamiana*, *Biol. Plant*, 56, 337–343.

- Lenntech, K., 2004. Water treatment and air purification. *Netherlands: Rotter Dam Seweg*.
- Lewis, S, Donkin, M.E., Depledge, M.H., 2001. Hsp 70 expression in *Enteromorpha intestinalis* (Chlorophyta) exposed to environmental stressors, *Aqua. Toxicol.*, 51, 277–291.
- Li, J., Wang, Y., Wei, J., Pan, Y., Su, C., Zhang, X., 2018. A tomato proline-, lysine-, and glutamic-rich type gene SpPKE1 positively regulates drought stress tolerance, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 499(4), 777-782.
- Li, Y., Tian, X., Wei, M., Shi, Q., Yang, F., Wang, X., 2015. Wang: Mechanisms of tolerance differences in cucumber seedlings grafted on rootstocks with different tolerance to low temperature and weak light stresses, *Turk. J. Bot.*, 39, 606-614.
- Liu, F., Sun, K., Li, W., Yan, C., Cui, H., Jiang, L., Green, M.A., 2014. Enhancing the $\text{Cu}_2\text{ZnSnS}_4$ solar cell efficiency by back contact modification: Inserting a thin TiB2 intermediate layer at $\text{Cu}_2\text{ZnSnS}_4/\text{Mo}$ interface, *Applied Physics Letters*, 104(5), 051105.
- Mafakheri, A., Siosemardeh, A. F., Bahramnejad, B., Struik, P. C., Sohrabi, Y., 2010. Effect of drought stress on yield, proline and chlorophyll contents in three chickpea cultivars, *Australian Journal of Crop Science*, 4(8), 580.
- Maiti, S.K., Ramanathan, A., Thompson, W.H., Subramaniam, B., 2017. Strategies to passivate Brønsted acidity in Nb-TUD-1 enhance hydrogen peroxide utilization and reduce metal leaching during ethylene epoxidation. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 56(8), 1999-2007.
- Maksymiec, W., 1997. Effect of copper on cellular processes in higher plants, *Photosynthetica*, 34, 321–342.
- Marschner, H., 2011. Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic Press, London, 672 s.
- Meagher, R.B., 2000. Phytorematadion of Toxic elemental and organic pollutants, *C.Op.In Plant Biol.*, 3, 153-162.
- Mildvan, A.S., 1970, Metal in enzymes catalysis. In: Boyer, D.D. (ed) The enzymes, vol 11. Academic Press, London, 445–536 s.
- Monteoliva, M.I., Rizzi, Y.S., Cecchini, N.M., Hajirezaei, M.R., Alvarez, M.E., 2014. Context of action of proline dehydrogenase (ProDH) in the hypersensitive response of *Arabidopsis*, *BMC Plant Biol.*, 14, 21.
- Nakano, Y., Asada, Y., 1981. Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate Specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts, *Plant Cell Physiology*, 22, 867-880.
- Nanjo, T, Kobayashi, M., Yoshiba, Y., Kakubari, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., 1999. Antisense suppression of proline degradation improves tolerance to freezing and salinity in *Arabidopsis thaliana*, *FEBS Lett*, 461, 205-210.

- Nazir, F., Hussain, A., Fariduddin, Q., 2019. Hydrogen peroxide modulate photosynthesis and antioxidant systems in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants under copper stress, *Chemosphere*, 230, 544-558.
- Neelima, P., Reddy, K.J., 2002. Interaction of copper and cadmium with seedlings growth and biochemical responses in *Solanum melongena*, *Env. Pollu. Technol.*, 1, 285-290.
- Noctor, G., Foyer, C.H., 1998. Ascorbate glutathione: Keeping active oxygen under control, *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.*, 49, 249-279.
- Osman, H.S., 2015. Enhancing antioxidant-yield relationship of pea plant under drought at different growth stages by exogenously applied glycine betaine and proline, *Ann Agric Sci.*, 60, 389-402.
- Oteef, M.D.Y., Fawy, K.F., Abd-Rabboh, H.S.M., Idris, A.M.J.E.M., 2015. Assessment. Levels of zinc, copper, cadmium, and lead in fruits and vegetables grown and consumed in Aseer Region, Saudi Arabia, *Environ. Monit. Assess.*, 187, 676.
- Panou-Filotheou, H., Bosabalidis, A.M., 2004. Root structural aspects associated with copper toxicity in oregano (*Oreganum vulgare* sudsp. *hirtum*), *Plant Sci.*, 166, 1497-1504.
- Panou-Filotheou, H., Bosabalidis, A.M., Karataglis, S., 2001. Effects of copper toxicity on leaves of oregano (*Origanum vulgare* subsp. *hirtum*), *Ann. Bot.*, 88, 207-214.
- Pinheiro, C., Chaves, M.M., 2011. Photosynthesis and drought: can we make metabolic connections from available data?, *Journal of experimental botany*, 62(3), 869-882.
- Qaryouti, M.M., Qawasmi, W., Hamdan, H., Edwan, M., 2007. Tomato fruit yield and quality as affected by grafting and growing system, *Acta Horticulturae*, 741, 199-206.
- Rady, M.M., Kuşvuran, A., Alharby, H.F., Alzahrani, Y., Kuşvuran, S., 2019. Pretreatment with proline or an organic bio-stimulant induces salt tolerance in wheat plants by improving antioxidant redox state and enzymatic activities and reducing the oxidative stress, *Journal of Plant Growth Regulation*, 38(2), 449-462.
- Ravet, K., Pilon, M., 2013. Copper and iron homeostasis in plants: the challenges of oxidative stress. *Antioxidants and Redox Signaling*, 19(9), 919-932.
- Roosens, N.H., Al Bitar, F., Loenders, K., Angenon, G., Jacobs, M., 2002. Overexpression of ornithine-delta-aminotransferase increases proline biosynthesis and confers osmotolerance in transgenic plants. *Mol. Breed.*, 9, 73-80.
- Ross, S.M., 1994. Toxic metals in soil-plant systems. Wiley, Chichester, 469 s.
- Schat, H., Sharma, S.S., Vooijs, R., 1997. Heavy metalinduced accumulation of free proline in a metaltolerant and a nontolerant ecotype of *Silene vulgaris*, *Physiol Plant*, 101, 477-82.

- Seaward, M.R.D., Richardson, D.H.S., 1990. Atmospheric sources of metal pollution and effects on vegetation. In: Shaw A.J. (ed) Heavy metal tolerance in plants evolutionary aspects, CRC Press, Boca Raton, 75–94 s.
- Seki, K., 2007. A Program for Nonlinear Fitting of Soil Water Retention Curve Written in Numerical Calculation Language GNU Octave, *Journal of the Japanese Society of Soil Physics*, 409, 415-419.
- Sekin, Y., Bağdatlıoğlu, N., Kırdinli, Ö., 2005. Domates konservesi üretiminde çeşitli faktörlerin likopen niceliğine etkisi. *Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 1, 7-13.
- Shahbaz, M, Mushtaq, Z., Andaz, F., Masood, A., 2013. Does proline application ameliorate adverse effects of salt stress on growth, ions and photosynthetic ability of eggplant (*Solanum melongena* L.)?, *Sci Horti-Amsterdam*, 164, 507-511.
- Sharma, P., Dubey, R.S., 2007. Involvement of oxidative stress and role of antioxidative defense system in growing rice seedlings exposed to toxic concentrations of aluminum. *Plant. Cell. Reports.*, 26(11), 2027-2038.
- Sharma, S.S., Schat, H., Vooijs, R., 1998. In vitro alleviation of heavy metal-induced enzyme inhibition by proline, *Phytochemistry*, 49:1531-5.
- Shetty, K., 1997. Biotechnology to harness the benefits of dietary phenolics; focus on Lamiaceae, *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 6, 162-171.
- Shi, J., Maguer, M.L., 2000. Lycopene in tomatoes: Chemical and physical properties affected by food processing, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40, 1-42.
- Singh, A.K., Sharma, L., Mallick, N., 2004. Antioxidative role of nitric oxide on copper toxicity to a chlorophycean alga, *Chlorella*, *Ecotoxicol Environ Saf*, 59(2), 223–227
- Singh, D., Nath, K., Sharma, Y.K., 2007. Response of wheat seed germination and seedling growth under copper stress, *J. Environ. Biol.*, 28, 409.
- Singh, M., Kumar, J., Singh, V.P., Prasad, S.M., 2014. Proline and Salinity Tolerance in Plants, *Biochemistry and Pharmacology*, 3, 100–170.
- Singh, R., Gautam, N., Mishra, A., Gupta, R., 2011. Heavy metals and living systems: an overview, *Indian J. Pharmacol.*, 43, 246–253.
- Skirycz, A., Inzé, D., 2010. More from less: plant growth under limited water, *Current Opinion in Biotechnology*, 21(2), 197-203.
- Smart, R. E. ve Bingham, G. E., 1974. Rapid estimates of relative water content, *Plant Physiology*, 53, 258-260.
- Smirnoff, N, Stewart, G.R., 1987. Nitrogen assimilation and zinc toxicity to zinc-tolerant and nontolerant clones of *Deschampsia cespitosa* (L.) Beauv., *New Phytol.*, 107, 671-80.
- Smirnoff, N., Cumbes, Q.J., 1989. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes, *Phytochemistry*, 28, 1057-1060.

- Stadtman, E.R., Oliver, C.N., 1991. Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences, *J Biol Chem*, 266, 2005–2008.
- Sun, X.H., Yu, G., Li, J.T., Jia, P., Zhang, J.C., Jia, C.G., Zhang, Y.H., Pan, H.Y., 2014. A heavy metal-associated protein (AcHMA1) from the Halophyte, *Atriplex canescens* (Pursh) Nutt. confers tolerance to iron and other abiotic stresses when expressed in *Saccharomyces cerevisiae*, *Int. J. Mol. Sci.* 15, 14891–14906.
- Sun, Z., Wang, L., Chen, M., Wang, L., Liang, C., Zhou, Q., Huang, X., 2012. Interactive effects of cadmium and acid rain on photosynthetic light reaction in soybean seedlings, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 79, 62-68.
- Szabados, L., Savoure, A., 2010. Proline: a multifunctional amino acid, *Trends Plant Sci.*, 15, 89–97.
- Talanova, V.V., Titov, A.F., Boeva, N.P., 2000. Effect of increasing concentrations of lead and cadmium on cucumber seedlings, *Biol Plant*, 43:441-4.
- Tattersall, E.A., Grimplet, J., DeLuc, L., Wheatley, M.D., Vincent, D., Osborne, C., Cushman, J.C., 2007. Transcript abundance profiles reveal larger and more complex responses of grapevine to chilling compared to osmotic and salinity stress, *Functional and Integrative Genomics*, 7(4), 317-333.
- Torun, A.A., Abdullah, E.R., Erdem, H., Torun, B., 2016. Tohumu çinko uygulama metodunun su kültürü koşullarında mısırın kuru madde verimi ve çinko konsantrasyonu üzerine etkisinin belirlenmesi, *Toprak Su Dergisi*, 5(2), 42-51.
- Urbanek, H., Kuzniak-Gebarowska, E., Herka, K., 1991. Elicitation of Defense Responses in Bean Leave By *Botrytis cinerea* Polygalacturanase, *Acta Physiologiae Plantarum*, 13, 43-50.
- Velikova, V., Yordanov, I., Edreva, A., 2000. Oxidative Stress and Some Antioxidant Systems in Acid Rain-Treated Bean Plants, Protective Role of Exogenous Polyamines, *Plant Science*, 151, 59-66.
- Verbruggen, N., Hermans, C., 2008. Proline accumulation in plants: a review, *Amino Acids*, 35, 753-759.
- Villiers, F., Ducruix, C., Hugouvieux, V., Jarno, N., Ezan, E., Garin, J., Bourguignon, J., 2011. Investigating the plant response to cadmium exposure by proteomic and metabolomic approaches, *Proteomics*, 11(9), 1650-1663.
- Whitacre, D.M., 2011. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, Springer, USA, vol. 213, 180 s.
- Witham, F.H., Blaydes B.F., Devlin R.M., 1971. Experiments in plant physiology, Van Nostrand Reinhold, New York, USA, 167-200.
- Wu, L.Q., Fan, Z.M., Guo, L., Li, Y.Q., Zhang, W.J., Qu, L.J., Chen, Z.L., 2003. Over-expression of an *Arabidopsis* delta-OAT gene enhances salt and drought tolerance in transgenic rice, *Chin. Sci. Bull.*, 48, 2594-2600.

- Yanqun, Z., Yuan, L., Jianjun, C., Haiyan, C., Li, Q., Schratz, C., 2005. Hyper accumulation of Pb, Zn and Cd in herbaceous grown on lead-zinc mining area in Yunnan, China, *Environ. Int.*, 31, 755–762.
- Yıldız, N., 2003. Toprak Kirlenici Ağır Metaller ve Toprak Bitki İlişkileri. I. Ulusal Çevre Sempozyumu, Atatürk Üniversitesi Çevre Sorunları Araştırma Merkezi Müdürlüğü, Erzurum.
- Yılmaz, E., Tuna, L.A., Bürün, B., 2011. Bitkilerin Tuz Stresi Etkilerine Karşı Geliştirdikleri Tolerans Stratejileri, *Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 7, 47-66.
- Zhao, S., Liu, Q., Qi, Y., Duo, L., 2010. Responses of root growth and protective enzymes to copper stress in Turfgrass, *Acta Biol. Cracov Ser. Bot.*, 52, 7–11.
- Zouari, M., Ahmed, C.B., Zorrig, W., Elloumi, N., Rabhi, M., Delmail, D., Abdallah, F.B., 2016a. Exogenous proline mediates alleviation of cadmium stress by promoting photosynthetic activity, water status and antioxidative enzymes activities of young date palm (*Phoenix dactylifera* L.), *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 128, 100-108.
- Zouari, M., Ben Ahmed, C., Elloumi, N., Bellassoued, K., Delmail, D., Labrousse, P., Ben Abdallah, F., Ben Rouina, B., 2016b. Impact of proline application on cadmium accumulation, mineral nutrition and enzymatic antioxidant defense system of *Olea europaea* L. cv Chemlali exposed to cadmium stress, *Ecotoxicol Environ Saf.*, 128, 195–205.
- Zouari, M., Hassena, A.B., Trabelsi, L., Rouina, B.B., Decou, R., Labrousse, P., 2019. Exogenous Proline-Mediated Abiotic Stress Tolerance in Plants: Possible Mechanisms. (In) *Osmoprotectant-Mediated Abiotic Stress Tolerance in Plants*, Springer, Cham., 99-121 s.

ÖZGEÇMİŞ

Fotoğraf

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : Coşkun, Fatih
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri :26/10/1990
Medeni hali :Evli
Yabancı Dili :İngilizce
Telefon :05453176065
Faks :
e-posta :tetro008@gmail.com

Eğitim

<u>Derece</u>	<u>Eğitim Birimi</u>	<u>Mezuniyet Tarihi</u>
Lisans	Lisans	07/02/2014