

T.C

NEVŞEHİR HACI BEKTAŞ VELİ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİDROJEN PEROKSİT (H_2O_2) ÖN MUAMELESİNİN TUZ
STRESİNE MARUZ BIRAKILMIŞ DOMATES (*SOLANUM
LYCOPERSICUM*) FİDELERİNDE ANTİOKSİDAN ENZİM
AKTİVİTELERİNDE VE GEN EKSPRESYON
SEVİYELERİNDE MEYDANA GETİRDİĞİ
DEĞİŞİMLERİN BELİRLENMESİ

Tezi Hazırlayan

Gökhan GÖKPINAR

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Musa KAR

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Ağustos 2023

T.C.

NEVŞEHİR HACI BEKTAŞ VELİ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİDROJEN PEROKSİT (H_2O_2) ÖN MUAMELESİNİN TUZ
STRESİNE MARUZ BIRAKILMIŞ DOMATES (*SOLANUM
LYCOPERSICUM*) FİDELERİNDE ANTIOKSİDAN ENZİM
AKTİVİTELERİNDE VE GEN EKSPRESYON
SEVİYELERİNDE MEYDANA GETİRDİĞİ
DEĞİŞİMLERİN BELİRLENMESİ

Tezi Hazırlayan

Gökhan GÖKPINAR

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Musa KAR

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Ağustos 2023

Doç. Dr. Musa KAR danışmanlığında Gökhan GÖKPINAR tarafından hazırlanan “**Hidrojen Peroksit (H₂O₂) Ön Muamelesinin Tuz Stresine Maruz Bırakılmış Domates (*Solanum lycopersicum*) Fidelerinde Antioksidan Enzim Aktivitelerinde Ve Gen Ekspresyon Seviyelerinde Meydana Getirdiği Değişimlerin Belirlenmesi**” bu çalışma jürimiz tarafından Nevşehir Hacı Bektaş Veli Ünivertesı Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

09.08.2023

JÜRİ

Başkan

: Prof.Dr. Zeliha LEBLEBİCİ

Üye

:

Doç.Dr. Fuat BOZOK

Üye

:

Doç.Dr. Musa KAR

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun tarih ve sayılı karar ile onaylanmıştır.

.../.../20..

Doç. Dr. Cemal ÇARBOĞA
Enstitü Müdürü

TEZ BİLDİRİM SAYFASI

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada yer alan bütün bilgilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu ve bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

İmza

Gökhan GÖKPINAR



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince danışmanlığımı yürüten, tez çalışmasının her aşamasında yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Sayın Doç. Dr. Musa KAR'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışması boyunca maddi ve manevi desteğinden ayrıca anlayışından dolayı kıymetli eşim Yasemin GÖKPINAR ve bu süreçte sıkıntımızı alan, mutluluğumuzu sağlayan oğlumuz Metehan GÖKPINAR'a, değerli öğretmen meslektaşımın çalışmam boyunca bilgi paylaşımı yaptığı için Ahmet Kalın'a en içten duygularla teşekkür ederim.

Tez çalışmamı TEZ21F2 numaralı proje ile destekleyen Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Projeler Birimi ne teşekkürlerimi sunarım.

RNA miktarı analizlerinde yardımlarını esirgemeyen yüksek lisans öğrencisi Büşra Şeniz DEMİR'e ve Erciyes Üniversitesi Betül Ziya Eren Genom ve Kök Hücre Merkezi'ne teşekkür ederim.

Hayatımın her anında olduğu gibi tez çalışması sürecin de beni her türlü destekleyen değerli aile büyüklerime teşekkürlerimi sunarım.

HİDROJEN PEROKSİT (H₂O₂) ÖN MUAMELESİNİN TUZ STRESİNE MARUZ BIRAKILMIŞ DOMATES (*SOLANUM LYCOPERSICUM*) FİDELERİNDE ANTİOKSİDAN ENZİM AKTİVİTELERİNDE VE GEN EKSPRESYON SEVİYELERİNDE MEYDANA GETİRDİĞİ DEĞİŞİMLERİN BELİRLENMESİ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

Gökhan GÖKPINAR

Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Ağustos 2023

ÖZET

Bitkiler sessil yapılarından dolayı çevrelerinde meydana gelen abiyotik ve biyotik streslerin meydana getirdiği strese faktörlerine antioksidan sistemleri sayesinde cevap verir. Tuzluluk ve alkalinite bitki için oldukça önemli abiyotik stres faktörlerinin başında gelmektedir. Bitkiler bu streslere karşı toleransını artırmak için çeşitli sinyal yollarını aktive ederek streslere cevap vermeye çalışır. Tarım arazilerinde ekimi yapılan bitkileri biyotik ajanlardan koruyabilmek için pestisidler, herbisitler gibi çok çeşitli zirai ilaç kullanılmaktadır. Buna karşın, abiyotik streslere karşı savunma mekanizmasını güçlendirilecek bilinen yaygın bir uygulama yoktur. Bu çalışmada H₂O₂ ön uygulamasının Domates fidelerinde tuz stresini hafifletme etkisi araştırılmıştır. Bu kapsamda 4 farklı deney grubu oluşturulmuş (kontrol, H₂O₂, Tuz, Tuz+H₂O₂) ve klorofil miktarı, MDA akümüslasyonu SOD, CAT, APX enzim aktivitelerinde ve ekspresyonunda meydana gelen değişimler incelenmiştir. Çalışma sonucunda priming uygulamasından sonra yalnız tuz stresi uygulanan gruba göre klorofil miktarında artış MDA birikiminde azalma meydana gelmiştir. Ayrıca, stres alakalı enzimlerin

aktivasyonu yalnızca tuz stresi uygulanan gruptan anlamlı düzeyde yüksek çıkmıştır. Ekspresyon seviyeleri kontrole göre istatistiksel olarak önemli düzeyde artış göstermiş, ancak CAT ve APX ekspresyon seviyeleri yalnızca tuz stresi uygulanan gruptan düşük olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak H₂O₂ priming uygulaması bitkinin stres toleransının artırılmasına yardımcı olduğu tespit edilmiştir. Priming yöntemi bitkiler için stres etkisini hafifletmede oldukça fonksiyonel bir araç olarak kullanılabilir ancak priming ajanının çeşidi, konsantrasyonu ve maruziyet süresi priming etkisinin düzenlenmesi için oldukça önemli unsur olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *H₂O₂ priming, Stres Alakalı Genler, Domates, Oksidatif sinyalizasyon*

Tez Danışman: Doç. Dr. Musa KAR

Sayfa Sayısı: 78

**DETERMINATION OF CHANGES IN ANTIOXIDANT
ENZYME ACTIVITIES AND GENE EXPRESSION
LEVELS IN TOMATO (*SOLANUM LYCOPERSICUM*)
SEEDLINGS EXPOSED TO SALT STRESS BY
HYDROGEN PEROXIDE (H₂O₂) PRETREATMENT**

(M. Sc. Thesis)

Gökhan GÖKPINAR

NEVŞEHİR HACI BEKTAŞ VELİ UNIVERSITY

Department of Molecular Biology and Genetics

August 2023

ABSTRACT

Due to their silent structure, plants respond to the stress factors caused by abiotic and biotic stresses occurring in their environment through their antioxidant systems. Salinity and alkalinity are the most important abiotic stress factors for plants. Plants try to respond to stresses by activating various signalling pathways to increase their tolerance to these stresses. A wide variety of pesticides such as pesticides and herbicides are used to protect the plants cultivated in agricultural lands from biotic agents. However, there is no known common practice to strengthen the defence mechanism against abiotic stresses. In this study, the effect of H₂O₂ pretreatment on the alleviation of salt stress in tomato seedlings was investigated. In this context, 4 different experimental groups were formed (control, H₂O₂, Salt, Salt+H₂O₂) and the changes in chlorophyll content, MDA accumulation, SOD, CAT, APX enzyme activities and expression were examined. As a result of the study, an increase in the amount of chlorophyll and a decrease in MDA accumulation occurred after the priming treatment compared to the salt stress alone group. In addition, the activation of stress-related enzymes was significantly higher than the salt stress only group. Expression levels showed a statistically significant increase compared to the control, but CAT and APX expression levels were found to be lower than the salt stress only group. As a result, H₂O₂ priming application was found to help increase the stress tolerance of the plant. The priming method can be used as a highly

functional tool to alleviate the stress effect for plants, but the type, concentration and exposure time of the priming agent were found to be very important factors for regulating the effect of priming.

Key Words: *H₂O₂ priming, stress-related genes, tomato, Oxidative signaling*

Thesis Supervisor: Doç. Dr. Musa KAR

Page Number: 78



İÇİNDEKİLER

KABUL ONAY SAYFASI.....	i
TEZ BİLDİRİM SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET	v
ABSTRACT.....	vii
İÇİNDEKİLER	ix
TABLolar LİSTESİ.....	xii
ŞEKİLLER LİSTESİ	xiii
SİMGE VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	xiv
BÖLÜM 1	
GİRİŞ	1
BÖLÜM 2	
GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Domates (Solanum lycopersicum, L.).....	4
2.1.1. Kökeni, Tarihçesi ve Coğrafi Dağılışı	4
2.1.2. Ekonomik önemi, Dünya ve Türkiye’de üretimi	4
2.1.3. İklim ve Toprak İstekleri.....	6
2.2. Bitkilerde Stres.....	6
2.2.1. Tuz Stresi	7
2.2.2. Oksidatif Stres	8
2.2.2.1. Singlet oksijen (1O2)	9
2.2.2.2. Süperoksit radikali (O ₂ -)	9
2.2.2.3. Hidroksil radikali (OH.)	10
2.2.2.4. Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂)	10
2.2.2.5. Oksidatif Stres Zararları.....	10
2.2.2.5.1. ROT’un Oksidatif Hasarı	10
2.2.2.5.2. Lipit peroksidasyonu	12
2.2.2.5.3. Proteinlerin modifikasyonu	12

2.2.2.5.4. DNA	13
2.3. Bitkilerde Antioksidatif Savunma Sistemi.....	13
2.3.1. Antioksidatif Savunma Sisteminin Enzimatik Olmayan Bileşenleri	14
2.3.1.1. Askorbat (AsA)	14
2.3.1.2. Glutasyon (GSH)	14
2.3.1.3. Tokoferoller.....	15
2.3.1.4. Karotenoidler.....	15
2.3.1.5. Fenolik Bileşikler	15
2.3.2. Antioksidatif Savunma Sisteminin Enzimatik Olan Bileşenleri	15
2.3.2.1. Süperoksit Dismutaz (SOD).....	17
2.3.2.2. Katalaz (CAT).....	17
2.3.2.3. Askorbat Peroksidaz (APX).....	17
2.3.2.4. Glutasyon Peroksidaz (GPX).....	18
2.3.2.5. Glutasyon redüktaz (GR).....	18
BÖLÜM 3	
ÖN UYGULAMA(PRİMİNG)	19
3.1 Cis Priming	20
3.2. Trans Priming.....	20
3.3. Hidropriming.....	20
3.4. Kimyasal Priming	20
3.5. Nanopartikül Priming.....	20
3.6. Manyetopriming.....	21
3.7. Ultraviyole Işını (UV) Priming	21
3.8. Hidrojen Peroksit(H ₂ O ₂) Priming	21
BÖLÜM 4	
LİTERATÜR TARAMASI	22
BÖLÜM 5	
MATERYAL VE METOD	29
5.1. Bitki Materyali ve Yetiştirme Koşulları.....	29
5.2. Toplam Klorofil tespiti.....	29
5.3. Malondialdehit (MDA) ölçümü	29

5.4. Enzim Aktivite Prosedürü	30
5.4.1. Ham protein/Enzim Ekstraksiyonu	30
5.4.2. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesinin Belirlenmesi	31
5.4.3. Katalaz Aktivitesinin Belirlenmesi	31
5.4.4. Askorbat Peroksidaz Aktivitesinin belirlenmesi.....	32
5.5. Primer Dizaynı ve Sentezi.....	32
5.6. RNA izolasyonu	33
5.7. cDNA (Komplementer DNA) Sentezi	34
5.8. Real Time PCR ve Veri analizi	34
5.9. İstatistiksel Analiz.....	35
BÖLÜM 6	
BULGULAR	36
BÖLÜM 7	
TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER	42
KAYNAKLAR	47
ÖZGEÇMİŞ	62

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2.1	2020 Yılı Dünya Domates Üretimi	5
Tablo 2.2	Türkiye Domates Verileri	5
Tablo 2.3.	Tuzluluğun artışına bağlı olarak önemli kültür bitkilerinin verimindeki nispi azalma	7
Tablo 2.4.	ROT' un özellikleri ve reaktivitesi	9
Tablo 2.5.	ROT ile İlgili En Önemli Enzimler ve Antioksidanlar	16
Tablo 5.1.	Primer listesi	32

ŞEKİLLER LİSTESİ

- Şekil 1. Deney esnasından analizi yapılmak üzere alınan örneklerin fotoğrafları. A. 24 saat B 72 saat C 120 saat..... 36
- Şekil 2. Farklı sürelerde tuz stresine maruz domates fidelerinde H₂O₂ ön uygulamasının Total klorofil miktarında ve MDA konsantrasyonlarına olan etkisi. 37
- Şekil 3. Farklı sürelerde tuz stresine maruz domates fidelerinde H₂O₂ ön uygulamasının antioksidan enzim aktivitelerine olan etkisi. 39
- Şekil 4. Farklı sürelerde tuz stresine maruz domates fidelerinde H₂O₂ ön uygulamasının antioksidan enzim ekspresyonlarına olan etkisi. 41

SİMGE VE KISALTMALAR LİSTESİ

CAT	Katalaz
POX	Peroksidaz
GR	Glutasyon Redüktaz
SOD	Süperoksit Dismutaz
GSH	Glutasyon
ASA	Askorbik Asit
GSSG	Glutasyon Disülfid
MDHAR	Monodehidroaskorbat Redüktaz
MDA	Malonaldehit
DHAR	Dehidroaskorbat redüktaz
GR	Glutasyon Redüktaz
AsA-GSH	Askorbat-Glutasyon
APX	Askorbat Peroksidaz
ROT	Reaktif Oksijen Türleri
SMF	Statik Manyetik Alana
PEG	Polietilen Glikol
IAA,	İndol-3-Asetik Asit
PEG	Polietilen Glikol
GA3	Giberellik Asit
SA	Askorbik Asit
ASA	Salisilik Asit
POD	Peroksidaz
SCY	Tohumluk Pamuk Verimi
PBS	Sodyum Fosfat, Sodyum Klorür, Potasyum Klorür ve Potasyum Fosfat
CuSO₄	Bakır Sülfat
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Tarımsal üretimde kültür bitkilerinin çevresel ortamlarında çok farklı stres kaynaklarının olması ürün verimi ve kalitesinin düşüklüğüne neden olmaktadır. Bitkilerde stres sonucu ortaya çıkan fizyolojik reaksiyonlar, stresin etki süreleri ve çeşitleri, strese dayanıklılık ve tepki mekanizmaları, stres maruziyetinin süresine bağlıdır. Bu durumların belirlenmesi dünyada mevcut gıda üretiminin korunması veya artırılması insanlık için yaşam kalitesinin devamlılığının olması açısından önem arz eder [1].

Dünyada meydana gelen iklim değişikliği, bitkiler üzerinde çok farklı abiyotik stres koşulları oluşturur. Bunlardan bazıları sıcaklık, kuraklık, tuzluluk ve aşırı yağış gibi abiyotik stresler kültür bitkilerinde istenilen düzeyde verimin sağlanamaması ve ürün kalitesinin azalmasına yol açarak üretimi sınırlandıran önemli faktörlerdir. Bitkilerde büyüme döneminde aşırı sulama, toprak tuzlanmasına ve toprağın alkali hale gelmesine neden olur. Toprakta meydana gelen bu değişikliklere bağlı olarak bitki kökleri tarafından su ve besleyici mineral madde alımı zorlaşır bunun sonucunda ürün kalite ve veriminde ciddi azalmalar meydana gelir [2]. Ekonomik ve besin değeri açısından önemli olan domates bitkisinde, tuz ve kuraklık koşullarına bağlı oluşan stresin ortaya çıkardığı olumsuz durumları en aza indirilmesi oldukça önemlidir.

Abiyotik streslere maruz kalan bitkiler, çevrelerinde meydana gelen değişiklikleri algılamak ve kötü koşullara en etkili cevabı verebilmek için moleküler düzeyde geliştirdikleri gen ekspresyonları ile stres proteinlerinin sentezlenmesi gerçekleştirerek enzim-protein çeşitliliğini artırmaktadırlar. Abiyotik streslerin sonucunda bitkilerde toksik olan radikal ve radikal olmayan reaktif oksijen türleri (ROS) ortaya çıkar. Başlıca bilinen ROS'lar hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit anyonları ve singlet oksijen (1O_2) dir. Kuraklık, ağır metal ve sıcaklık gibi çeşitli stres faktörleri reaktif oksijen türlerinin oluşumunu hızlandırmakta ve dokularda protein denatürasyonuna, hücre zarı lipid peroksidasyonuna sebep olarak bitkinin büyümesi ve gelişiminde engel teşkil etmektedir [3].

Bitkiler bu streslerin olumsuz etkilerini azaltma veya engelleme amacıyla enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan sistemler geliştirmiştir. Enzimatik antioksidan elemanları temel olarak; süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), askorbat peroksidaz (APX) ve glutatyon redüktaz (GR) gibi antioksidan enzimleri ihtiva eder. Enzimatik olmayan gruptaki elemanlar ise, glutatyon (GSH) ve askorbik asit (ASA) gibi molekülleri biriktirerek ROS'un ortadan kaldırılması veya oksidatif hasarı en aza indirilmesi sağlanır [4].

Bitkide üretilen bazı ROS'lar, strese karşı bitki adaptasyonunu sağlamak için gen ekspresyonunu, antioksidan enzim sistemini ve stoma hareketlerini düzenleyebilen önemli bir sinyal molekülüdür; bitkiler strese maruz kaldığında, ROS kısa bir süre içinde üretilir [5]. Bitki eksozomlarında biriken H₂O₂ molekülü, stresle alakalı genlerin eksprese edilmesine neden olur. Buna bağlı olarak üretilen antioksidan enzimleri yapraklarda biriken ROS'un ortadan kaldırılmasını ve bitkilerin kuraklığa, tuza ve yüksek sıcaklık stresine karşı toleransını geliştirir [6].

Tarımsal üretimde biyotik stres faktörlerine karşı oldukça gelişmiş önleyici ve öldürücü kimyasal ilaçlar kullanılmaktadır. Bununla birlikte özellikle kuraklık, sıcaklık, soğuk ve tuzluluk gibi abiyotik stres koşullarına karşı bitkinin dayanıklılığını sağlamak için araştırmalar son yıllarda yoğunlaşmıştır [7, 8].

Tarımsal üretimde verim alınması için çimlenme oranı, eş zamanlı çıkış, ideal bitki sıklığı, dirençli fide oluşumu ile mümkündür. Bitki tohumlarının çimlenme süreci ve fide aşaması hastalık ve zararlı stres koşullarından etkilenecek en hassas dönemleridir. Bu dönemlerde tuz stresi gibi olumsuz çevre faktörlerinin etkisini en aza düşürmek için ön uygulama(priming) uygulamaları yapılmaktadır [9].

“Priming” bitkinin tohum ya da vejetatif yapısını dolaylı veya doğrudan etkileyen çevresel faktörler nedeniyle çimlenme ve çimlenme sonrasında oluşabilecek sorunları en aza indirmek, fidelerin istenilen doğrultuda görünmesi sağlamak amacıyla yapılır. Fidelerin kısa sürede gelişmesini sağlamak ve stresli koşullara toleranslarını artırmak için yapılan ön uygulamalardır [10]. Ön uygulamadan sonra birçok bitki türünde çimlenme için gerekli olan sıcaklığın azaltılması gerçekleşse bile hızlı çimlenme tespit edilmiştir [11]. Günümüzde ön uygulama yöntemlerinde genel olarak hidropriming ve osmopriming gibi yöntemleri kullanılmaktadır [11]. Hydropriming, tohumların bir süre

suda bekletilmesi işlemidir. Tohumda çimlenme oranını artırmak için kullanılan bir yöntemdir [11]. Osmoprimering, tohumların kontrol altında su alınımını sağlarken, kök çıkışını engellemek amacı ile düşük su potansiyeline sahip ozmotik bir çözeltiye belirli bir süre bırakılması işlemine dayanmaktadır [12].

Heydecker ve Coolbear (1977) yapmış olduğu bir çalışmada ön uygulamayı birden fazla bitkide, sebze tohumlarında çimlenme hızı ve çimlenme oranını arttırdığını göstermiştir. Tarla bitkilerinde tohuma uygulanan ön uygulamalarının pozitif etkisi birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir [13].

Domates bitkisinin anavatanı Orta ve Güney Amerika olmasına rağmen Türkiye'nin uygun iklim koşulları sayesinde fazla miktarda yetiştirilmektedir. Domatesin ilk başlarda zehirli olduğu düşünülüp tüketim durumu ve yaygınlaşması gecikmiş olup ABD'de 1800'lü yıllarda yemek olarak tüketilmeye başlanmıştır. Anadolu topraklarında ise 150 yıldır tanınan domates bitkisi Osmanlı İmparatorluğu döneminde ilk olarak Halep'e gelmiş buradan Türkiye'nin güney bölgelerine daha sonrasında ise diğer bölgelere yetiştirilmeye başlanmıştır [14].

Dünyada domates üretimi 177 milyon ton olmakla birlikte Türkiye dünya domates üretiminde %7'lik paya sahiptir. Bu payın Türkiye'nin dünyada domates üretiminde söz sahibi olabilecek potansiyelde olması ve ihracatının geliştirilebilecek bir ürün olduğunu ortaya koymaktadır. Üretimi seralarda ve tarlada yapılmakta olup işleme sanayide hammadde olarak kullanılmaktadır. 2001 yılında 8.5 milyon ton üretimi söz konusu iken 2017'de %50'ye yakın artış göstererek 12.75 milyon tona yükselmiş olması önemli bir tarımsal üretim faaliyeti olduğunu göstermektedir [15].

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1. Domates (*Solanum lycopersicum*, L.)

2.1.1. Kökeni, Tarihçesi ve Coğrafi Dağılışı

Domates (*Solanum lycopersicum*), çift çenekliler sınıfında patlıcangiller (Solanaceae) familyasına ait tek yıllık otsu bitki grubunda yer alır. Kökünü And Dağlarından alan domates anavatanı Güney Amerika ülkelerinden Peru'dur. Amerika'da keşfedildiği ilk zamanlarda domatesin olgunlaşmamış meyvelerinin zehirli olabileceği düşünülmüş sonrasında ise zehirli olmadığı anlaşılmıştır [16]. Avrupa'ya Amerika'nın keşfinden sonra 15. yüzyılda getirilmiştir. Yabani domates türleri, deniz seviyesinden 3300m yüksekliğe kadar çok farklı habitatlarda yetiştirilmesi, varyasyonunun artmasına ve gen havuzunun fazla olmasını sağlamıştır. Günümüzde ise tüm dünyada yetiştirilen bir kültür bitkisi kazanımını sağlayarak üretim ve tüketimi artmaya devam etmektedir [17].

Türkiye'ye domatesin gelişi Osmanlı İmparatorluğu döneminde ilk olarak Suriye üzerinden güney bölgelerimize daha sonra da diğer bölgelere yayılarak günümüzde hemen hemen tüm bölgelerimizde yetiştirilmesi sağlanmaktadır [18].

2.1.2. Ekonomik önemi, Dünya ve Türkiye'de üretimi

Domates bitkisi dünyada en çok üretilen ve tüketilen sebzelerden biri olarak konserve, ketçap, salça, turşu gibi birçok kullanım alanlarına sahip olması nedeniyle ön plana çıkan en önemli sebzelerin başında gelir. Dünyada birçok domates türü yetiştirilmekte olup, Türkiye'de uygun iklim koşulları nedeniyle domates üretiminde en önemli ülkeler arasında yerini almaktadır [19].

Dünyada domates üretiminde 64.768.158 ton ile Çin birinci sırada olup, ardından 20.573.000 ton ile Hindistan ikinci ve ülkemiz ise 13.204.015 tonluk üretimi ile 3. Sırada yer almaktadır [20].

Tablo 2.1 2020 Yılı Dünya Domates Üretimi [20]

Sıra	Ülke	Üretim (Ton)	Yüzölçümü (Hektar)	Verim (Kg/m ²)
1	Çin	64.768.158	1.107.485	5,85
2	Hindistan	20.573.000	812.000	2,53
3	Türkiye	13.204.015	181.879	7,26
4	USA	12.227.402	110.439	11,07
5	Mısır	6.731.220	170.862	3,94

Türkiye’de tarımsal üretimdeki sebzeler içerisinde 2020 yılında en fazla üretimi yapılan sebze 13,2 milyon ton üretim ile domatestir. Domates 2020 yılında tek başına sebze üretiminin %42’sini oluşturarak sebze tarımında ilk sırayı almıştır. Ülkemizde domates üretimi 2019 yılında 12 841 990 ton olarak belirtilmiş, 2020 yılında ise bu rakam 13 082 827 tona ulaşmıştır [21]. Aynı zamanda ülkemizde sebzeler arasında üretimi ve tüketimi birinci sırada gerçekleşmektedir [21]. Ülkemizde örtü altı ve açık alanda toplam 128 010 ha alanda 7 941 780 ton sofralık, 6 112 ha alanda 3 378 220 ton salçalık domates üretim yapıldığı belirtilmektedir. Bölgeler itibarı ile en yüksek sofralık domates Akdeniz bölgesinde, salçalık domates Ege bölgesinde, örtü altı domates Akdeniz bölgesinde üretilmektedir. Açıkta ve örtü altında yetiştiriciliği artarak devam etmektedir [21].

Tablo 2.2 Türkiye Domates Verileri [21]

	2015	2016	2017	2018	2019	Değişim (%)
Alan (bin ha)	4.823	4.850	4.876	4.925	5.031	2,2
Verim (ton/ha)	36,59	36,46	36,47	36,53	35,93	-1,6
Üretim	176.467	176.858	177.817	179.898	180.766	0,5
İthalat	7.663	7.773	7.465	8.019	6.778	-15,5
İhracat	7.944	8.370	7.993	8.380	7.380	-11,5

2.1.3. İklim ve Toprak İstekleri

Domates sıcak ve ılıman iklim kuşağı bitkisi birlikte yetiştirilme devrelerinde ısı sıfırın altında (-2,-3 °C'ye) düştüğünde bitki ölümü ile sonuçlanır. Domateslerde genellikle gece ve gündüz arasında 6 °C ile 8°C'lik bir sıcaklık aralığı olması istenir. Gündüz sıcaklığının 19- 26 °C, gece sıcaklığının ise 14-18 °C olduğunda gelişiminin ideal ölçüde olması gözlenir. Domatesin döllenmesi sırasında sıcaklığın 10 °C ve daha yukarı derecelerde istenilen şekilde çimlenerek döllenme yapılabilmekte sıcaklığın 15 °C'nin altına düştüğünde meyve oluşturma yüzdesi azalmaktadır. Düşük sıcaklıkta polen az üretilir ve kısmi döllenmiş şekilsiz meyveler meydana gelirken yüksek sıcaklıkta ise çiçek tozları ölür ve meyve oluşumu gerçekleşmez. Domates tohumlarının çimlenmesi için en düşük 10 °C, optimum 20-29 °C, en fazla 36 °C toprak sıcaklığı olması gerekir [22, 23].

Domates su tutma özelliği iyi, humus ve besin maddelerince zengin kil, kum ve silt karışımı toprakları sever. Toprak pH'sı 5,5-7,0 arasında, tuzsuz-az tuzlu (2,3 mS'dan az) olan topraklarda iyi yetişir. Toprakta pH=5,5'un altında ise dekara 200-500 kg kireç verilmeli, pH=7,0'nin üzerinde ise her yıl dekara 30-50 kg toz kükürt verilmelidir [22, 23].

2.2. Bitkilerde Stres

Bitkilerin habitatlarında meydana gelen gelişimlerini kısıtlayıcı çeşitli olumsuz koşullara maruz kalarak, büyüme, gelişme ve metabolizmalarını etkileyen ya da engelleyen durumlara stres adı verilir [24]. Diğer bir ifadeyle bitki üzerinde zararlı etkileri olan dış faktörler stres olarak tanımlanır. Stres faktörleri biyotik ve abiyotik olmak üzere iki gruba ayrılır. Biyotik stres; mantar, bakteri ve virüs gibi farklı mikroorganizmaların oluşturduğu enfeksiyonlar ya da zararlı hayvanların saldırılarıyla oluşan olumsuz etkilerin ortaya çıkması şeklindedir. Abiyotik stres ise bitkinin habitatlarında meydana gelen su, sıcaklık, radyasyon, manyetik ve elektriksel değişimlerin fiziksel ve kimyasal etkileriyle çevre faktörlerinin değişmesidir. Tüm bu stres faktörleri olumsuz etki göstererek bitkilerde ürün verimliliğini düşürür [25]. Bitkiler, hayvanlarda olduğu gibi farklı stres faktörlerinden kaçınmaya sahip adaptasyonu olmaması nedeniyle strese direkt olarak maruz kalır. Sonuç olarak bitkide

büyüme ve gelişme olumsuz etkilenecek canlılık faaliyetlerinin sona ermesine neden olur [26].

2.2.1. Tuz Stresi

Tuz stresi NaCl ve diğer çözünebilir tuzların yeraltı sularına karışarak toprak yüzeyine çıkması sonucunda ortaya çıkar. Tarım arazilerinin bu tür sular ile sulanması toprak yüzeyinde ya da yakın kısımlarda tuz birikmesine neden olur [27]. Toprakta çözünebilir NaCl ve diğer tuzların miktarının artmasına bağlı olarak bitkinin büyüme ve gelişimi üzerinde olumsuz etkiler meydana gelmektedir. Tuz stresinin yoğunluk ve süresine bağlı olarak bitkide büyüme, gelişme, çimlenme, hücre bölünmesi ve fotosentez gibi birçok metabolik olayın yeterli seviyelerde gerçekleşmesi engellenmiş olur. Bu durum tarımsal alanlarda bitki verimliliğini ve ürün kalitesini sınırlamaktadır [28, 29].

Tablo 2.3. Tuzluluğun artışına bağlı olarak önemli kültür bitkilerinin verimindeki nispi azalma [29]

Ürün	EC (eşik değeri) dS m ⁻¹	Verimlilikteki nispi azalma (Her dS m ⁻¹ 'deki % kayıp)
<i>Phaseolus vulgaris</i> L. (Fasulye)	1.0	19.0
<i>Solanum melongena</i> L. (Patlıcan)	1.1	6.9
<i>Allium cepa</i> L. (Soğan)	1.2	16.0
<i>Capsicum annuum</i> L. (Biber)	1.5	14.0
<i>Zea mays</i> L. (Mısır)	1.7	12.0
<i>Saccharum officinarum</i> L. (Şeker kamışı)	1.7	5.9
<i>Solanum tuberosum</i> L. (Patates)	1.7	12.0
<i>Brassica oleracea</i> L. (Lahana)	1.8	9.7
<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. (Domates)	2.5	9.9
<i>Oryza sativa</i> L. (Çeltik)	3.0	12.0
<i>Arachis hypogaea</i> L. (Yerfıstığı)	3.2	29.0
<i>Soja hispida</i> Moench. (Soya fasulyesi)	5.0	20.0
<i>Triticum sp.</i> L. (Buğday)	6.0	7.1
<i>Beta vulgaris</i> L. var. <i>altissima</i> (Doll) Helm. (Şeker pancarı)	7.0	5.9
<i>Gossypium sp.</i> L. (Pamuk)	7.7	5.2
<i>Hordeum vulgare</i> L. (Arpa)	8.0	5.0

Toprak içerisinde özellikle çözülmüş halde bulunan tuz bitki köklerinde çeşitli fizyolojik hasara neden olmaktadır. Köklerdeki osmatik basıncın artmasına bağlı olarak bitkilerin sudan yarar sağlanma su tutma kapasitesinin azalmasına neden olmaktadır. Tuzluluğun artışı, bitkilerin su ve yoğunluk dengelenmesine olumsuz etki göstermektedir [30].

Bitkilerde fotosentez yapan dokularda tuzluluk artışı, grana membranlarında yığılmalara, tilakoid yapısının bozulması sonucu elektron taşıma sistemi aktivesinin azalmasına ve klorofillerin parçalanmasına neden olmaktadır. Tuz stresinin domateste kloroplastların kümelenmesine neden olduğu saptanmıştır. Tuzluluk, bitkilerde stoma kapanmasına neden olması sonucu CO₂ fiksasyonu ve calvin döngüsünde görev alan enzimlerin aktivitesini engellemiştir [31].

Tuz stresi sonucunda bitkilerde süperoksit (O₂⁻), hidrojen peroksit (H₂O₂), hidroksil radikalleri (OH[·]) ve singlet oksijen (¹O₂) gibi çeşitli ROS moleküllerinin meydana gelmesine neden olmaktadır [31]. Bitkiler, tuz stresi ile ortaya çıkan ROS'lerden hücreyi korumak için, askorbat, glutatyon, α-tokoferol, karotenoidler gibi antioksidanları ve katalaz (CAT), peroksidaz (POX), glutatyon redüktaz (GR), süperoksit dismutaz (SOD) gibi antioksidatif enzimleri kullanmaktadırlar [32].

2.2.2. Oksidatif Stres

Bir atom, etrafında hareket eden elektron çiftleriyle merkezi bir çekirdekten oluşur. Ancak bazı atomlar ve moleküller eşleşmemiş elektronlar bulundurması durumunda serbest radikal halini alır. Serbest radikaller genellikle kararsız ve yüksek oranda reaktif yapıdadır. Bu durum sonucunda eşleşmemiş elektronlar diğer elektronlarla çiftler oluşturur. Bir oksijen molekülü (O₂), *in vivo* metabolize edildiğinde dört elektronlu indirgenmeye maruz kalır. Bu işlem sırasında, enerji eklenmesine veya geçiş elementleri ile etkileşime ikincil elektronların uyarılmasıyla reaktif oksijen türleri üretilir. Bu şekilde üretilen ROT, normal oksijen molekülünden daha yüksek yüzde de reaktiftir ve aktif oksijen türleri olarak adlandırılır. Süperoksit, hidrojen peroksit, hidroksil radikalleri ve singlet oksijen bu anlamda aktif oksijen türleridir [33].

Tablo 2.4. ROT' un özellikleri ve reaktivitesi [33]

ROT	Reaksiyon	Üretim Yeri	Temizleme
Süperoksit radikali (O ₂ ⁻)	Fe-S proteinleriyle reaksiyona girer. H ₂ O ₂ ile değişmez.	kloroplast, mitokondri, peroksizomlar, elektron taşıma zincirleri.	SOD, flavonoid
Hidroksil radikali (OH.)	DNA, RNA, lipitler ve proteinler dahil tüm biyomoleküller ile son derece reaktif	Fe ve H ₂ O ₂ [Fenton reaksiyonu]	Flavonoidler, askorbat
Hidrojen peroksit(H ₂ O ₂)	Sistein ve metiyonin kalıntılarına saldıran proteinlerle, hem proteinleriyle, DNA ile reaksiyona girer.	Peroksizomlar, kloroplast, mitokondri, sitozol, apoplast.	APX, CAT, GPX, PER, PRX, Askorbat, Glutasyon
Singlet oksijen (¹ O ₂)	Okside lipitler, Proteinler, DNA'nın Guanin kalıntıları	Membranlar, kloroplast	Karotenoidler ve tokoferoller

Aerobik organizmalar, reaktif oksijen türlerini ortadan kaldırmak için çeşitli antioksidan savunma mekanizmaları geliştirmiştir. Reaktif oksijen türlerinin ve serbest radikallerin aşırı veya anormal düzeyde üretilmesine bağlı olarak, üretim ve uzaklaştırma arasındaki dengenin kaybolması sonucunda oksidatif stres ortaya çıkar. Bu durum biyolojik zar ve dokulardaki moleküllere zarar vererek tamiri zor durumlar ortaya çıkarır. Oksidatif stres reaksiyonların antioksidan reaksiyonlarından fazla olması canlıda hücre sel dengenin kaybolmasına neden olur [33].

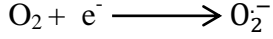
2.2.2.1. Singlet oksijen (¹O₂)

Singlet oksijen; elektron taşıma sisteminde son elektron alıcı olarak görev yapan O₂ molekülünün, enerji alarak kendi dönüş yönünün tersi yönünde olan başka bir orbitale yer değiştirmesi sonucu oluşmaktadır. Birçok biyolojik molekül ile benzer kuantum durumuna sahip olması onun kolaylıkla reaksiyona girmesini sağlar [44].

2.2.2.2. Süperoksit radikali (O₂⁻)

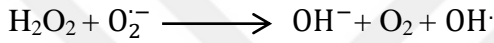
O₂ molekülüne bir elektronun aktarılmasıyla oksijenin indirgenmesi gerçekleşir. Bu sayede süperoksit radikali (O₂⁻) meydana gelir. Süperoksit radikali reaktif bir molekül

olmasından kaynaklı lipid peroksidasyonu, hücresel toksisite, zar hasarı ve DNA'daki tek zincir kırıklarına neden olduğu belirtilmektedir [44].



2.2.2.3. Hidroksil radikali (OH.)

Serbest radikaller arasında hidroksil radikali bilinen en reaktif ve en toksik ROT'tur. Nötr ph'da Fe^{+2+3} gibi geçiş metallere H_2O_2 ve $\text{O}^{\bullet-}$ tarafından katalize edilerek Fenton reaksiyonu ile üretilir. Lipid peroksidasyonu, protein hasarı ve membran yıkımı yoluyla farklı hücresel bileşenlere zarar verme kapasitesine sahiptir [44].



2.2.2.4. Hidrojen peroksit (H_2O_2)

Hidrojen peroksit, süperoksit radikalinin çevresinde bulunan moleküllerden bir elektron alması veya oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması neticesinde oluşan peroksitin iki proton (H^+) ile birleşmesi sonucu oluşmaktadır [44].



2.2.2.5. Oksidatif Stres Zararları

Aerobik metabolizma sonucu reaktif oksijen türleri olan ROT, süperoksit anyonu ($\text{O}_2^{\bullet-}$), hidroksil radikali ($\bullet\text{OH}$) gibi serbest radikalleri ve hidrojen peroksit (H_2O_2), singlet oksijen gibi radikal olmayan molekülleri içerir [44].

2.2.2.5.1. ROT'un Oksidatif Hasarı

Kuraklık, tuzluluk, ağır metal, UV radyasyonları, hipotermi ve hipertermi gibi abiyotik koşullardan kaynaklı oluşan stresler ve ayrıca patojen saldırılar hücrenin dengesinin bozulmasına neden olur. Bu yüzden bitkilerde yüksek enerji ve ya elektron transferi reaksiyonlarında moleküler oksijenin azalması sonucu ROT üretimi ortaya çıkar [34]. Çevresel stresler sırasında artan ROT üretimi, lipidlerin peroksidasyonuna, proteinlerin oksidasyonuna, nükleik asitlerde hasara, enzim inhibisyonuna, programlanmış hücre ölümü (PCD) aktivasyonu sağlar ve hücrenin ölümüne neden olarak hücreler için bir tehdit oluşturabilir [34].

ROT'un zarar veren aktivitelerine rağmen çevresel streslerde hücrel yapının ikincil habercisidir. ROT'un zarar verici veya sinyal molekülü olarak hareket edip etmeyeceği, ROT üretimi veya temizlenmesi arasındaki hassas dengeye bağlıdır [35]. Uzun yıllar boyunca ROT'lar, hücrel metabolizmanın zararlı yan ürünü olarak kabul edilmiştir. Ancak son yıllarda, ROT, bitkinin ortam şartlarına adaptasyonunu kolaylaştıran anahtar molekül olarak düşünüldüğünden bu moleküllere olan bakış açısı değişmiştir [36].

Diğer oksijen radikallerinden daha az zararlı olması, moleküler büyüklüğü açısından hücrel membranlardan kolayca geçebiliyor olması ve yüksek yarılanma ömrüne sahip olması (1 ms) gibi özellikleri nedeni ile ROT'lar arasında "H₂O₂" radikali bilim adamların ilgisini çekmektedir [37, 38]. Sinyal transdüksiyonu, transkripsiyonel düzenleme ve protein, karbonhidrat ve lipit metabolizması ve ROT kontrolünde görevli genlerin ekspresyonunu düzenliyor oluşu ve daha birçok metabolik aktivitede anahtar role sahip olması, H₂O₂'nin karmaşıklığını en iyi şekilde ifade etmektedir [39].

H₂O₂ priming, redoks bağımlı bir sinyalleşme ağını aktive eden küçük bir oksidatif stres üretebilir. Üretilen stres, reaktif oksijen türlerini temizleyen enzimler ve transkripsiyon faktörleri gibi gizli savunma proteinlerinin üretilmesine yol açar; böylece prime edilmiş bitkide gelişmiş bir stres tepkisi oluşmasını tetikler [40]

H₂O₂ primingin farklı abiyotik stres koşullarında bitkide stres toleransını arttırdığına dair birçok çalışma yapılmıştır [41]. Tuz stresi, bitkilerde oksidatif bir patlamaya neden olur. Düşük H₂O₂ konsantrasyonları ile priming, strese bağlı genlerin ekspresyonunu düzenleyen sinyal molekülleri olarak hareket ederek tuz toleransını artırır. H₂O₂ ile ön uygulama yapılarak tuz stresine maruz bırakılmış tohumlardan elde edilen buğday fideleri, ön uygulama edilmemiş tuz stresine maruz bırakılmış tohumlardan elde edilen fidelere göre önemli ölçüde daha az H₂O₂ üretir [41]. Ashraf ve arkadaşları (2015); ekzojen H₂O₂'nin mısırdaki kuraklık stres toleransı üzerindeki faydalı rollerini araştırmıştır. Mısır fideleri farklı H₂O₂ konsantrasyonları ile ön uygulamaya tabi tutulmuş ve kuraklık stresi koşulları altında büyütülmüştür. 140 mM H₂O₂ ön uygulama yapılmış tohumlarda daha yüksek çimlenme yüzdeleri bulunmuştur. Kuraklık, fotosentetik pigmentlerde belirgin bir düşüşe yol açarken, endojen H₂O₂, lipid peroksidasyon ve AsA seviyeleri ve CAT, SOD ve POX aktivitelerini artmıştır [42].

2.2.2.5.2. Lipit peroksidasyonu

ROT seviyesi aşırı artışı hem hücre hem de organel membranlarında artan lipid peroksidasyonu gerçekleşerek normal hücresel işleyişi etkiler. Lipid peroksidasyonu, proteinler ve DNA ile reaksiyona girerek zarar verebilen lipid yapılı radikallerin üretimi yoluyla oksidatif stresi artırır. Lipid peroksidasyon seviyesi, stres koşulları altında hücre zarlarında ROT aracılı hasarın görülmesi konusunda yaygın olarak kullanılmaktadır. Çevresel baskılar altında büyüyen bitkilerde lipidlerin artan peroksidasyonu ortaya çıkmıştır [43]. Bu stresler altında lipid peroksidasyonundaki artış, artan ROT üretimi ile aynı anda gerçekleşir. Fosfolipidlerdeki doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu son ürünlerinden biri olan malondialdehit (MDA), hücre membranı hasarından sorumludur [44] Fosfolipid moleküllerinde bulunan doymamış (çift) bağ ve gliserol ile yağ asidi arasında ester bağları ROT'a karşı hassastır. Açığa çıkan tek bir •OH birçok çoklu doymamış yağ asidinin peroksidasyonuna neden olarak zincir kırılmasına ve zarda akışkanlık ve geçirgenlik artışı meydana gelir [45, 46].

2.2.2.5.3. Proteinlerin modifikasyonu

ROT üretiminin bir sonucu olarak, proteine özgü amino asit modifikasyonu, peptit zincirinin parçalanması ve elektrik yükü değişimi gibi durumlar meydana gelir. Protein yapısında bulunan amino asit çeşitlerin, tiyol grupları ve kükürt bulunan amino asitler ROT tarafından saldırıya karşı çok hassas kısımlardır. Aktive edilmiş oksijen, disülfid köprüsü oluşturmak üzere ikinci tiyol radikaline çapraz bağlanarak sistein kalıntılarından bir H⁺ atomu soyutlayabilir [47]. Oksitlenmiş proteinler proteolitik sindirim ortaya çıkmasında ve protein yapısının bozulması için hedef olacağı öne sürülmüştür [48].

Yapılan bir çalışmada bezelye yaprağı artan H₂O₂ konsantrasyonları ile ham ekstraktlarının, Cd ile muamele edilmesi sonucu bezelye yapraklarından saflaştırılan peroksizomların inkübasyonu karbonil içeriğinde artış göstermiştir. Oksitlenmiş proteinlerin yapısının bozulduğu ve metal ile muamelesinden dolayı proteolitik aktivitenin %20 arttığı görülmüştür [49]. Farklı çalışmalarda yapılan uygulamalar sonucunda oksitlenmiş proteinlerin yapısının bozulmasıyla kalmayıp proteazları da engelleyebilen geniş ölçüde çapraz bağlı ve kümelenmiş ürünlere yol açtığını ortaya koymuştur [50].

2.2.2.5.4. DNA

ROT'un, hücrede bulunan çekirdek, mitokondri ve kloroplastta bulunan DNA'daki herhangi bir hasarı, proteinlerde değişikliklere veya inaktivasyonuna neden olabilir. DNA'ya oksidatif hasar, deoksiriboz oksidasyonu, zincir kırılması, nükleotitlerin çıkarılması, nükleotitlerin organik bazlarındaki çeşitli modifikasyonları ve DNA-protein çapraz bağları ile sonuçlanır. Bazı durumlarda bir ipliğin nükleotidlerindeki değişiklikler, diğer zincirdeki nükleotitlerle uyumsuzluklara neden olur ve nokta mutasyonların açığa çıkmasını sağlar [51]. Ökaryotik hücrelerde DNA, histon proteinleriyle kaplanır ve oldukça kompakt ve dinamik bir kromatin yapısı oluşturulur. DNA ve proteinler arasındaki etkileşimler transkripsiyon ve replikasyon gibi hücresel süreç için önemlidir. ROT faaliyeti ile DNA protein bağlarının bozulması durumunda kolayca onarılması gerçekleşmez ve replikasyon veya transkripsiyon olayları hücre için öldürücü durumları oluşturur. Mitokondriyal ve kloroplast DNA'sı histon protein bulunmaması ve ROT üreten sistemlere yakın etkileşimi nedeniyle nükleer DNA'dan daha fazla oksidatif hasara karşı hassastır [52]. Hasarlı DNA için onarım sistemleri mevcut olmasına rağmen, ROT'un neden olduğu değişimler, hücre için kalıcı DNA hasarlarına yol açar.

2.3. Bitkilerde Antioksidatif Savunma Sistemi

Bitkiler, ROT'u temizlemek için enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidatif savunma sistemine sahiptir. Bitki hücrelerinde, kloroplast, mitokondri ve peroksizomlar gibi farklı organeller de ROT üreten ve etkisini temizleyen sistemler bulunur [53]. ROS'un zarar verici veya sinyal molekülü olarak hareket edip etmeyeceği, ROT üretimi veya temizlenmesi arasındaki hassas dengeye bağlıdır. Yüksek konsantrasyonda ROT, biyomoleküllerde hasara neden olurken, düşük/orta konsantrasyonda bitki hücrelerinde çeşitli tepkilere aracılık eder hücre içinde küçük bir sinyal ile büyük bir tepki doğurarak ikinci haberci görevi görür. Fazla ROT'un temizlenmesi veya detoksifikasyonu, enzimatik olmayan ve aynı zamanda enzimatik antioksidanlardan oluşan etkili bir antioksidatif sistem tarafından sağlanır. Enzimatik antioksidanlar arasında SOD, CAT, GPX, APX, monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR), dehidroaskorbat redüktaz (DHAR) glutatyon redüktaz (GR) ve askorbat-glutahyon (AsA-GSH) döngüsü enzimleri bulunur [54].

Optimum koşullar altında bulunan hücrede toksik oksijen metabolitleri düşük seviyede üretimi sağlanır. Ancak ROT üretimi ve temizlenmesi arasında uygun denge vardır. ROT üretimi ve temizlenmesi arasındaki dengede, lipidler, proteinler ve nükleik asitler oksidatif hasara neden olan hücre içi ROT seviyelerinde hızlı artışlara sebep olabilecek çevresel faktörler tarafından bozulabilir. Oksidatif hasarı önlemek için gelişmiş yapılı bitkiler hücre içi antioksidan savunma seviyelerini yükseltir [55, 56]. Antioksidatif savunma sisteminin ROT temizleme işlemine dâhil olan bileşenler aşağıdaki enzimatik olan ve enzimatik olmayan şekilde gruba ayrılmıştır.

2.3.1. Antioksidatif Savunma Sisteminin Enzimatik Olmayan Bileşenleri

Hücrede gerçekleşen indirgenme ve yükseltgenme tepkimelerinde askorbat (AsA) ve glutatyon (γ -glutamil-sisteinil-glisin, GSH) ile tokoferol, karotenoidler ve fenolik bileşikler hücre içi bileşenler ile etkileşime girerek savunma ve enzim kofaktörleri olarak görev alırlar. Bu antioksidanlar hücre bölünmesi ve yaşlanmasında görev alarak bitkinin büyümesine etki ederler. Enzimatik olmayan antioksidan içeriğine sahip mutantların strese karşı aşırı duyarlı olduğu gösterilmiştir [57].

2.3.1.1. Askorbat (AsA)

Askorbat (AsA), artan ROT seviyesinin neden olduğu oksidatif strese karşı savunmada anahtar rolü olan en çok, düşük moleküler ağırlıklı antioksidandır. AsA, bir dizi enzimatik ve enzimatik olmayan reaksiyonda elektron verme yeteneğinden dolayı kuvvetli bir antioksidan olarak kabul edilir. AsA'nın bitkilerde büyüme, farklılaşma ve metabolizma dahil olmak üzere çeşitli fizyolojik süreçlerde önemli rol oynadığı gösterilmiştir [58].

2.3.1.2. Glutatyon (GSH)

ROT'nin neden olduğu oksidatif hasara karşı hücre için savunmada önemli rol oynayan düşük moleküler ağırlıklı antioksidandır. Sitoplazma, kloroplast, ER, vakuol ve mitokondri gibi hücre yapılarında tespit edilmiştir. GSH, sinyal iletimi, metabolitlerin çevrimi, enzimatik düzenleme ve hücre büyümesi/bölünmesi gibi biyolojik işlemlerde önemli rol oynar ve strese yanıt olarak genlerin ifadesi şeklinde işlev görür. GSH, birçok yönden bir antioksidan olarak $O_2^{\bullet-}$, $\bullet OH$, H_2O_2 ile kimyasal olarak reaksiyona girebilir ve bu nedenle doğrudan serbest radikal temizleyici olarak görev alır [59].

2.3.1.3. Tokoferoller

Tokoferoller, serbest oksijen ve lipid peroksi radikallerinin ve 1O_2 'nin temizlenmesinde rol oynayarak lipitleri ve diğer membran bileşenlerini koruduğu ve böylece PSII'nin yapısını ve işlevini koruduğu bilinmektedir. Farklı bitki türlerinde α -tokoferol birikiminin soğuk, su eksikliği ve tuzluluğa karşı toleransını yükselttiği gözlemlenmiştir [60].

2.3.1.4. Karotenoidler

Karotenoidler, bitkilerde ve bazı mikroorganizmalarda bulunur ve görünür spektrumun 400 ile 550 nm arasındaki ışığı emer ve yakalanan enerjiyi klorofile aktarılmasında görev alır. Karotenoidler, klorofil molekülünü 1O_2 'den temizler ve bitki gelişiminde etkili olan biyotik ve abiyotik stres tepkilerini etkileyen sinyal moleküllerinin habercisi olarak görev alır. Yüksek karotenoid içeriğinin şeker kamışı bitkilerinin tuzlu koşullarda daha iyi adaptasyon olduğu ortaya koyulmuştur [61].

2.3.1.5. Fenolik Bileşikler

Fenolik bileşikler, antioksidan özelliklere sahip sekonder metabolit (flavonoidler, tanenler ve lignin) olarak görev alırlar. Polifenoller, metal iyonlarını şelatlar, ROS türlerinin doğrudan temizler. Lipit alkoksil radikalini yakalayarak membran düzenini değiştirir ve zarların akışkanlığının azaltılmasında görev alır[62]. Bu değişiklikler, serbest radikallerin difüzyonunu engelleyebilir ve peroksidatif reaksiyonları kısıtlayabilir. Ayrıca özellikle flavonoidler ve fenilpropanoidlerin peroksidaz tarafından oksitlendiği ve H_2O_2 tutucu, fenolik/AsA/POD sisteminde etkili olduğu gösterilmiştir. Bitkilerde birçok strese yanıt olarak fenolik metabolizmanın indüklendiğine ait bazı kanıtlar vardır [62].

2.3.2. Antioksidatif Savunma Sisteminin Enzimatik Olan Bileşenleri

Antioksidatif savunma sisteminin enzimatik bileşenleri, SOD, CAT, GPX, AsA-GSH MDHAR, DHAR, GR, APX gibi çeşitli antioksidan enzimlerden oluşur [54]. Bu enzimler hücrelerin farklı kısımlarında çalışarak hücrede oluşan oksidatif stresle karşı karşıya kalındığında bir arada uyum içinde yanıt verilmesini sağlar.

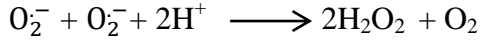
Tablo 2.5. ROT ile İlgili En Önemli Enzimler ve Antioksidanlar [54]

Enzimler/ Antioksidanlar	Fonksiyon	Lokalizasyon
SOD CAT APX MDHAR	$O_2^{\cdot-}$ 'nin dismutasyonu ile H_2O_2 oluşumunu sağlar. İndirgeyiciye gereksinim duymadan H_2O_2 'i detoksifiye eder. İndirgeyici olarak askorbat ile H_2O_2 detoksifikasyonu sağlar. İndirgeyici olarak NAD(P)H ile monodehidroaskorbat radikallerini indirger. İndirgeyici olarak GSH ile dehidroaskorbat radikallerini indirger. İndirgeyici olarak NADPH ile yükseltgenmiş glutatyonu indirger.	sit, klo, mit, per mit, per, gli sit, klo, mit, per sit, klo, mit
DHAR	İndirgeyici olarak çeşitli substratları kullanarak H_2O_2 'i detoksifiye eder; hücre duvarı polimerleri ile etkileşim içindedirler.	sit, klo, mit
GR	İndirgeyici olarak GSH kullanarak lipitleri hidroperokside eder ve H_2O_2 'i detoksifiye eder.	sit, klo, mit, per
POX	Lipit hidroksiperoksitleri detoksifiye eder ve DHAR aktivitesi sergiler.	hd, sit, mit, vak
GPX	APX'in substratıdır, H_2O_2 'i detoksifiye eder.	sit, klo, mit, er
GST	Glutatyon transferazlar ve glutatyon redüktazların substratıdır. H_2O_2 ve diğer hidroksiperoksitleri detoksifiye eder.	apo, cit, klo, mit, nuk
Askorbat	Membran lipitlerini peroksidasyondan korur, lipit peroksitlerini detoksifiye eder ve 1O_2 giderir.	apo, sit, klo, mit, per, vak apo, sit, klo, mit, per, vak
Glutatyon	1O_2 giderir, ABA'nın haberci molekülüdür, fotosentezde etkindir.	membranlar klo, kro, ami
α -tokoferol	Direk olarak H_2O_2 'i temizler.	vak
Karotenoidler		
Flavonoidler		

hd: hücre duvarı, apo: apoplast, sit: sitosol, klo: kloroplast, kro: kromoplast, ami: amiloplast, mit: mitokondri, er: endoplazmik retikulum, vak: vakuol, per: peroksizom, gli: glioksizom, nuk: nukleus

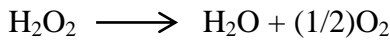
2.3.2.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Süperoksit Dismutaz (SOD) tüm aerobik organizmalarda oksidatif strese karşı savunmada merkezi rol oynayan enzimdir. Kuraklık ve metal toksisitesi gibi çeşitli abiyotik streslere karşı görev alan haberci enzimdir [63].



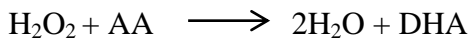
2.3.2.2. Katalaz (CAT)

Antioksidan enzimler arasında katalaz, keşfedilen ve karakterize edilen ilk enzimdir. Hidrojen peroksit (H_2O_2) molekülünün su ve oksijene dönüşümünü katalize eden, her yerde bulunan bir enzimdir. H_2O_2 için yüksek özgülüğe sahiptir, ancak organik peroksitlere karşı zayıf aktiviteye sahiptir. Peroksizomlar, H_2O_2 üretiminin ana bölgesi olup katalaz enzimi sayesinde, fotorespirasyon oksidasyonu, yağ asitlerinin β -oksidasyonu ve SOD'a bağlı ksantin oksidaz gibi diğer enzim sistemleri sırasında bu organelde üretilen H_2O_2 'yi temizler [64, 65]. H_2O_2 birçok stres koşulunda oluşturulur ancak hızla üretilen H_2O_2 katalaz tarafından parçalanarak stres altında olan hücrenin enerji verimine yararlı moleküllere dönüşümü sağlanır [66]. %10'u yabancı tip olarak transgenik tütün bitkilerinde, katalaz aktivitesi glutasyon birikimi ve askorbat molekülünde azalmayı sağlamıştır. Oksidatif stres sırasında redoks dengesini korumak için önemli koşula sahip olduğu anlaşılmıştır [67].



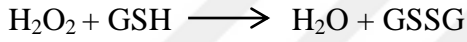
2.3.2.3. Askorbat Peroksidaz (APX)

Askorbat Peroksidaz (APX), bitki kloroplastlarındaki askorbat-glutasyon döngüsünde, H_2O_2 detoksifikasyon sistemi ile H_2O_2 katalizlemede görevli olan kilit bir enzimdir. APX H_2O_2 'yi H_2O 'ya indirger ve DHA(Dokosaheksaenoik asit), askorbikasit (AA) indirgeyici ajan olarak kullanılır. APX aktivitesi genellikle CAT, SOD gibi diğer enzim aktiviteleriyle birlikte artar. APX genlerinin ifadesi, bitki gelişimi sırasında olduğu kadar biyotik ve abiyotik streslere yanıt olarak düzenlenir. APX yaygın olarak hücrede dağılım gösterdiği için H_2O_2 'ye CAT daha fazla ilgi duyması etkili bir temizleyicidir [68].



2.3.2.4. Glutasyon Peroksidaz (GPX)

Glutasyon Peroksidaz (GPX), hücrede stres sırasında H_2O_2 'yi ortadan kaldıran hayvanlarda, bitkilerde yaygın olarak bulunan dört korunmuş disülfid köprüsü olan iki yapısal Ca^{+2} iyonu içerir [69]. GPX'in birçok izoenzimi bitki dokularının kofullarında, hücre duvarında ve sitoplazmada işlev görür. GPX, hücre duvarının ligninleşmesinde, oksin formu olan indol-3-asetik asit (IAA) bozunması, etilen biyosentezi, yara tamiri ve biyotik abiyotik streslere karşı ortaya çıkan O_2 ve peroksi radikallerinin reaktif ara formlarının temizlenmesinde işlev görür [70]. Öldürücü olmayan metal toksisitesi koşulları altında bulunan bitkilerde GPX'in artan aktivitesinin olması biyolojik belirteç olarak kullanılabilmesi öne sürülmüştür [71]. Ayrıca, tuza dayanıklı yaprak döken bitkilerin tuza bağlı oksidatif hasardan daha fazla korunmasının, en azından kısmen, tuza duyarlı çeşitlere kıyasla GPX aktivitesinin, katalitik verimliliğin ve spesifik izoenzimlerin indüksiyonunun artmasıyla neden olduğu tespit edilmiştir [72].



2.3.2.5. Glutasyon redüktaz (GR)

Glutasyon Redüktaz (GR), bitkilerde birçok antioksidan süreçlere katılan glutasyonu (GSH) indirgenmesini katalize ederek oksitlenmiş formu olan Glutathione Disulfide (GSSG) dönüştürülür. GR, çoğu zaman kloroplastlarda bulunsa da GR'nin az bir miktarı mitokondri ve sitozolde yer almaktadır [73].

BÖLÜM 3

ÖN UYGULAMA(PRİMİNG)

Ön uygulama(priming) bitkilerde tohumların çimlenme sürecinde çeşitli fizyolojik ve metabolik olayları harekete geçirerek çimlenmeyi ve fide oluşumunu artıran basit, düşük maliyetli bir tekniktir. Bitkide meydana gelen epigenetik değişiklikler, abiyotik stres için önemli sinyal moleküllerin oluşmasını sağlayarak strese karşı bitkinin dayanma gücünü artırır. Bu durum hem stres toleransına aracılık edebilir hem de gen ekspresyonunu daha da değiştiren ve mahsul üretimini artıran çok çeşitli streslere karşı kapsayıcı stres toleransını başlatabilir [74].

Tohumun çimlenme süreci öncesinde ön uygulama su eksikliğine bağlı olarak mRNA aktivasyonunu kolaylaştırır. Ozmolaritede değişiklikler çimlenme ile ilgili farklı fizyolojik aktivitelerin başlatılmasını sağlar. Tepkinin oluşması için gerekli transkripsiyon ve translasyon işlemleri meydana gelir [75]. Ön uygulamalar sayesinde DNA metilasyonlarında, kromatin modifikasyonlarında, transkripsiyon faktörlerinin birikmesinde değişiklikler oluşturur. Sinyal proteinlerinin formlarını etkisiz hale getirir. Bu mekanizmalar stres kaynağına karşı daha etkili bir savunma mekanizma geliştirmesini sağlar [75].

Abiyotik streslere hafif veya kısa süreli maruz kalan bitkiler zaman içerisinde daha fazla stres koşullarının oluşması sonucunda doğal tolerans potansiyeli artabilir. Uyarıcı ve stres aynı ise cis-priming, uyarıcı stresten farklı ise trans-priming olarak tanımlanır. Ön uygulama etkilerine sahip yaygın olarak abiyotik uyarıcılar, yüksek sıcaklık, soğuk, kuraklık, tuzluluk, su ve kimyasal bileşiklerdir [76].

Bitkide stres toleransı iki strateji ile sağlanır. İlk olarak, ön uygulama kuru tohumları çimlenme durumuna dönüştüren ve çıkış potansiyelini artıran gelişmiş enerji metabolizmaları, erken rezerv mobilizasyonu, embriyo genişlemesi ve endosperm zayıflaması gibi bir dizi olayı aktive eder. İkinci olarak ön uygulama, kök sürgününü baskılayan tohumlar üzerinde abiyotik bir stres uygulanır, ancak çapraz toleransı indükleyerek stres tepkilerini uyarır [76].

3.1 Cis Priming

Uyarının ve stresin aynı olduğu haloprining uygulamasında, tuzluluk stresine karşı toleransı ortaya çıkaran en yaygın cis-priming şeklidir. Farklı yoğunlukta tuz çözeltileri uygulaması yapılarak tohum çimlenmesinde yer alan çoğu enzimin aktivitesi sağlanır [77].

3.2. Trans Priming

Trans priming ilk önce hafif bir strese maruz bırakılarak farklı bir strese dayanıklılık sağlanabilir. Trans priming uygulaması ile çoklu stres durumlara karşı bitkide tolerans kazanması sağlanır. Bir tür abiyotik stres hazırlığının, farklı bir stres türüne karşı toleransı aktive edebileceğine dair çalışmalar olumlu sonuç vermiştir. Bitkilere uygulanan trans priming ile tuzluluk, kuraklık, ağır metal, sıcak ve soğuk stresleri arasındaki çapraz toleransın etkisi ile strese karşı gen ekspresyonu ortaya çıkar [77].

3.3. Hidropriming

Hidropriming, tohumların saf suda ıslatılmasına ve ekimden önce orijinal nem içeriğine kadar yeniden kurutulmasına dayanan basit, ekonomik ve çevre dostu bir tekniktir. Su ile birlikte herhangi bir ek kimyasal madde kullanılmadığı için bu yöntem düşük maliyetli ve çevre dostu olarak kabul edilmektedir. Hidropriming, bu tür koşullar altında su alma verimliliğini ve tohum hidrasyonunu iyileştirir [11].

3.4. Kimyasal Priming

Bitki tohumlarının çimlenme sürecinde çok sayıda kimyasal kullanılır. Etanol, $ZnSO_4$, KH_2PO_4 , $CuSO_4$ gibi kimyasallar, kültür bitkilerinde büyümeyi ve stres toleransını artırmak için ortam hazırlar. Tohumların bu kimyasallarla ön uygulama sayesinde bitkilerde büyüme artışı ve abiyotik strese karşı tolerans kazanır [78].

3.5. Nanopartikül Priming

Nanoteknoloji, boyutu 100 nm'den küçük olan nanoparçacıkları kullanır. Nanopartikül ön uygulamasında tohumun çimlenme sürecinde su alma ve besin kullanımını kolaylaştırır. Tohum kabuğundan gözenek açılması su alma potansiyelini artırarak hızlı çimlenmeyi sağlamıştır. Fakat bu yöntem bitkilerin tuzluluk stresine karşı toleransını artırmak için nanoparçacıklarla hazırlama raporları nispeten daha azdır [79].

3.6. Manyetoprining

Fiziksel yöntemler arasında magnetoprining, statik manyetik alana (SMF) kuru tohumlara ön uygulama yapılması sonrasında çimlenme yüzdesi ve çimlenme oranı artışı saptanmıştır [80]. Magnetoprining ile tohum hazırlamanın bitki köklerinde süperoksit üretiminin azalması ve antioksidan enzimlerin aktivasyon artışı saptanmıştır. Biyotik ve abiyotik streslere karşı toleransın yanı sıra fidelerde biyokütlenin artış olacağı saptanmıştır [81].

3.7. Ultraviyole Işını (UV) Priming

Ultraviyole ışınlar, iyonlaştırıcı olmayan ışınlar grubuna giren ve organizmalar için son derece zararlı olan fiziksel etkenlerdir. UV radyasyonları canlı dokulara nüfuz edebilir. DNA hasarına ve zar hasarına neden olma potansiyeline sahiptir. Düşük doz UV-B radyasyonları “Hormesis” olarak adlandırılır [82]. UV radyasyonunun artan serbest radikal yakalama aktiviteleri, artan fenolik içerik ve L-fenilalanin amonyak liyaz ve tirozin amonyak liyaz aktivitelerini artırma yoluyla çevresel stresleri azaltmak için bazı olumlu tepkiler ortaya çıkarabileceğini göstermiştir [81].

3.8. Hidrojen Peroksit(H₂O₂) Priming

Uzun yıllar H₂O₂ radikalinin hücrede toksik bir molekül olduğu konusunda bilim adamları arasında görüş birliği vardır. Ancak günümüzde sinyal molekülü olarak görev yaptığı bilinmektedir [83-85]. H₂O₂ ön uygulaması yapılan bitkilerde tuz stresine karşı tolerans sağladığı görüldü. Örneğin Antep fıstığı fideleri yaprağına H₂O₂ ön uygulaması tuz stresine karşı tolerans artışı görüldü. H₂O₂ ön uygulaması ile GSH, karotenoidler, CAT ve APX gibi enzimatik antioksidanlarda artış saptandı [115]. *Vigna radiata (L.) R. Wilczek*'in (maş fasulyesi) tuz toleransı fidelere H₂O₂ uygulanarak arttırıldı [86].

BÖLÜM 4

LİTERATÜR TARAMASI

Zhiwei Gu ve arkadaşları düşük sıcaklık ve normal sıcaklık uygulamak için 2 farklı gruba ayırdığı kolza tohumlarını (*Brassica napus L.*) H₂O₂, distile su ile prime etmiş ayrıca herhangi bir işlem yapmadığı tohumları düşük sıcaklık ve normal sıcaklık ortamında çimlenirmiştir. Sonuçlar, hidrojen peroksit ile hazırlanmış tohumların, glutasyon metabolizmasını, antioksidan kapasiteyi arttırdığını ve çimlenme sırasında stresi azalttığını göstermiştir. Çimlenme sırasında hücre enerji kaynağı ve amino asit metabolizmasında yer alan metabolitlerde bir artış bulunmuştur, bu da daha kısa bir çimlenme süresi ve daha iyi çimlenme yüzdesi ile sonuçlanmıştır [87].

Araújo ve arkadaşları, H₂O₂ ile ön uygulamaya tabi tutulmuş mısır bitkisi tuzlu koşullarda 12 gün süreyle büyütülmüştür. Tuzluluğun, fotosentez değerlerini ve yapısal kloroplast bütünlüğünü büyük ölçüde etkilediği saptanmıştır. Ayrıca tuzlu olmayan koşullarla karşılaştırıldığında yetiştirilen bitkilerin metabolizmasında bozulmayı teşvik eden ROT'un arttığı belirlenmiştir. Bu durumda ozmotik dengenin korunmasına ve oksidatif stresin azalmasına katkıda bulunabilecek arabitol, glikoz, asparagin ve tirozin gibi bazı metabolitlerin üretimi gözlenmiştir. Bu nedenle çalışmada, fotosentez metabolizması ve metabolit üretimine dayalı H₂O₂ ön uygulama ile bitkilerin tuzluluğa karşı adaptasyon sergilendiği saptanmıştır [81].

Wang ve arkadaşları, nano-ZnO ön uygulaması, oksidatif stresi bastırmak için antioksidan sistemi aktive ettiği ve tuz stresi altındaki buğday yapraklarında fotosentetik elektron taşınmasının ve sükröz biyosentezinin etkinliğini arttırdığı saptanmıştır.[79]

Jisha ve Puthur, tohumların hidropriming sonrasında fidelerdeki antioksidan enzimlerin arttığı gözlenmiştir. Antioksidan enzim aktivesi yoluyla fotosentetik aktivitelerde, prolin içeriğinde artış, lipid peroksidasyonunda ise azalış göstererek tuz stresine karşı tolerans potansiyeline sahip bitkiler elde edilmiştir [88].

Iqbal ve Ashraf, Buğday tohumlarına giberallik asit ile ön uygulama yapmış, sürgünler ve kökler arasındaki iyon alımı ve birikimindeki değişikliklerle birlikte hormon dengesi

sağlanarak ürünlerdeki tane verimini ve tuz stresine karşı toleransını artırdığı gözlenmiştir [89].

Jisha ve arkadaşları *Vigna radiata L.* ve *Oryza sativa L.* tohumlarına ABA ile ön uygulama yapmış, fidelerin canlılığını ve çıkışını desteklediği gözlemiştir. Fidelerdeki malondialdehit içeriğini azaltması sonucunda prolin, toplam protein, toplam karbonhidrat, nitrat redüktaz aktivitesi ve süperoksit dismutaz gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerini artırdığı saptanmıştır [90].

Thomas ve arkadaşları, tuz stresinin çimlenme ve fide gücü üzerindeki olumsuz etkilerini, nohut tohumlarını 1 saat süreyle manyetopriming uygulaması yapmışlar. Bu sayede hidrolitik enzimlerin (amizlaz, proteaz ve dehidrojenaz) daha yüksek aktivitesi ile birlikte artan su alımı, çimlenme oranı ve fide gücünde artış saptanmıştır. Ayrıca manyetopriming ile tohumlarda erken ve kontrollü H₂O₂ üretimi, tuz stresi koşullarında daha hızlı çimlenme sürecine gireceği saptanmıştır [91].

Thomas ve Puthur, tohumlarda düşük dozda UV-B radyasyonları ile ön uygulama yapmış pirinç fidelerinin NaCl stresine antioksidan enzim sistemini aktive ettiğini tuz stresine karşı toleransını artırabileceği saptanmıştır [92].

Demirbaş ve Balkan, *Triticum aestivum L.* tohumlarına H₂O₂ ön uygulaması yapılarak çeşitli tuz konsantrasyonların da fide gelişim dönemindeki değişimler incelenmiştir. *Triticum aestivum L.* tohumlarına yapılan H₂O₂ ön uygulaması ile morfolojik ve fizyolojik parametrelerde iyileşmeye ve tuzlu ortam koşullarına olan toleransın artışına katkı yaptığı saptanmıştır [93].

Iqbal ve arkadaşları, Tuz stresine tolerans için buğday tohumlarına eksojen olarak sağlanan fitohormonların kritik rolünü incelemek adına salisilik asit ile hormonal priming uygulaması yapılmıştır. Bu ön uygulama yönteminin buğdayın tuz stresi altında gelişme kabiliyetini artırdığı görülmüştür. Aynı çalışmada, ABA ile ön uygulama işleminin tuz stresine karşı tolerans geliştirmede etkili olmadığı saptanmıştır. [94]

Toklu ve arkadaşları, iki farklı buğday tohumunu potasyum dihidrojen fosfat (KH₂PO₄), potasyum klorür (KCl), indol-3-asetik asit (IAA), polietilen glikol (PEG-6000), gibberellik asit (GA3) ön uygulaması yapılarak oda sıcaklığında 12 saat boyunca işleme tabi tutmuştur. İki farklı sıcaklıkta (10 °C ve 20 °C) çimlenme yüzdesi, koleoptil

uzunluğu, fide çıkma yüzdesi ve fide büyüme hızı laboratuvar koşullarında değerlendirilmiştir. Her iki çeşidinin n uygulaması sonrasında PEG, IAA ve distile su uygulamaları, tohum çimlenme yüzdesini, fide çıkış yüzdesini ve fide büyüme oranını artırmıştır. Polietilen glikol (PEG), KCl ve hidropriming işlemleri, kontrole kıyasla tane verimini artırdığı saptanmıştır. Çalışmada kullanılan farklı ön uygulama yöntemleri arasında, PEG, KCl ve hidropriming, daha yüksek çimlenme yüzdesi ve tane verimi elde etmek için en etkili yöntem olduğu grlmştir [95].

Jira-Anunkul ve Pattanagul, pirinç (*Oryza sativa L.*) bitkisinde kuraklık stresi altındaki pirinç fidelerinde H₂O₂ n uygulaması büyüme, bazı fizyolojik özellikler ve antioksidan enzim aktiviteleri üzerinde etkileri araştırılmıştır. Yapılan çalışmada pirinç (*Oryza sativa L.*) düşük konsantrasyonlarda H₂O₂ ile n uygulama sonrasında bitki büyümesini ve biyokütlenin yanı sıra malondialdehit içeriğini ve elektrolit sızıntısını iyileştirdiği saptanmıştır. Uygun seviyelerde H₂O₂ ile n uygulama ayrıca SOD, CAT, APX ve GPX dahil olmak üzere antioksidan enzim aktivitelerini artırmıştır. Düşük yoğunlukta H₂O₂ ile n uygulama, antioksidan kapasiteyi artırarak eltik fidelerinde kuraklığa toleransı artırmada faydalı olduğu, bunun da oksidatif stresi ve hücrenel bileşenlere verilen zararları azalttığı sonucuna varılmıştır [96].

Hemalatha ve arkadaşları, H₂O₂ n uygulaması ile tuz stresine dayanıklı, tuza duyarlı iki farklı pirinç çeşidinin tohum çimlenmesi üzerindeki etkisini değerlendirmeye yönelik çalışma yapılmıştır. Farklı tuz konsantrasyonlarında (100, 150 ve 200mM) orta derecede tuza toleranslı çeşitler, %0,25'te H₂O₂ ile tohum hazırlamanın, tuzdan bağımsız olarak hidropriming n uygulaması yapılan tohumlarla karşılaştırıldığında tüm çeşitlerde en fazla çimlenme meydana gelmiştir. Bu işlem, tuza duyarlı pirinç çeşidinin daha yüksek NaCl konsantrasyonları altında da çimlenme performansını iyileştirdiği saptanmıştır [97].

Ghoohestani ve arkadaşları, tuz stresi altında domates tohumlarının çimlenmesini iyileştirmek için, salisilik asit (SA), askorbik asit (ASA) eşitli konsantrasyonlarda n uygulama yapılarak sonrasında H₂O₂ n uygulaması yapılarak domatesin tuz stresine toleransı incelenmiştir. Sonuçlarda, domates çimlenmesinin ve büyümesinin tuz stresi altında ciddi şekilde azaldığını göstermiştir. Askorbik asit ile n uygulama sonrasında tohumlar sadece çimlenme yüzdesini iyileştirmekle kalmadığı, aynı zamanda tuz stresi altında çimlenme süresini de azaldığı saptanmıştır. Salisilik asit ve askorbik asit ile n

uygulama sonrasında tohumlardan elde edilen fide büyümesi, tuz stresi altında diğer işlenmiş tohumlardan önemli ölçüde daha yüksek kök ve sürgün uzunluğuna sahip olduğu anlaşılmıştır. Tohum çimlenme oranının artışı, askorbik asit ve salisilik asit konsantrasyonlarında gözlemlendiği belirtilmiştir. Bu deneyde, yüksek seviyelerde H₂O₂ ön uygulama ile tohum çimlenmesinde ve büyümesinde hasara neden olduğu saptanmıştır. Askorbik asit ile ön uygulama yapılan tohumlarda tuz stresine karşı tolerans artışı sağlandığı sonucuna varılmıştır [98].

Mazhar ve arkadaşları, keten tohumlarının demiroksit (FeO) nanoparçaları ile ön uygulama yapılarak kuraklık stresini hafifletmeyi amaçlamıştır. Yapılan çalışmada kurak ve iyi sulanan iki arazi kullanılmıştır. Bu yöntem ile bitkinin gövde çapını, gövde uzunluğunu, boyunu, taze ağırlıklarını ve kuru ağırlıklarını artırmıştır. Meyve dalı, kapsül, kapsül başına tohum sayısı, toplam taze ve kuru gövde lifi üretimi gibi verim özellikleri de ağırlıklı olarak arttığı gözlemlenmiştir. Malondialdehit ve H₂O₂ seviyelerinin, tohum hazırlama sürecinde %66 ve %71 oranında düştüğü; antioksidan enzimler SOD, peroksidaz (POD) ve CAT aktivitesinde de bir artış olduğu saptanmıştır. Bu işlem ile demir oksit parçacıklarının su stresini azalması ortaya çıkmıştır [99].

Hu ve arkadaşları, pirinç fidelerinde kadminyumun (Cd) translokasyonunu azaltma ve tolerans artırmada H₂O₂ ön uygulaması yapılarak bitkilerde antioksidan enzim aktivitelerini artırarak Cd stresini hafifletilmesi amaçlanmıştır. H₂O₂ ön uygulaması sürgün ve köklerdeki Cd konsantrasyonunu düşürerek, H₂O₂ 'nin pirinç fidelerinde Cd dağılımını etkileyebileceğini göstermiştir. Geliştirilmiş Cd toleransı kısmen, Cd stresi sırasında H₂O₂ birikimini etkili bir şekilde önleyen gelişmiş bir antioksidan sistemden kaynaklandığı anlaşılmıştır. Pirinç köklerinde artan Cd birikimi, Cd translokasyonunun azalmasına katkıda bulunabildiği saptanmıştır [100].

Manaa ve arkadaşları, domates bitkisinde salisilik asit(SA) ve kalsiyum sülfatın (CaSO₄) ön uygulanması ile bitki büyümesi, fotosentetik pigmentler gibi bazı metabolik parametreler üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Tuz stresine maruz kalan domates bitkisinde klorofil, karotenoid miktarı düştüğü saptanmıştır. Tuz stresi ayrıca köklerde Na⁺ birikimine, K ve Ca konsantrasyonlarında azalma gerçekleştiği gözlemlenmiştir. SA ve CaSO₄ ön uygulaması ile tuz stresine karşı bitkide büyüme, fotosentetik pigment konsantrasyonları, Na⁺ birikiminin sınırlandırılması ve K⁺ ve Ca⁺² içeriğinin korunması) açısından sonuç elde edilmiştir [101]

Fedina ve arkadaşları, arpa fidelerini 2 gün boyunca H_2O_2 ön uygulaması yapılmasının ardından 4 ile 7 gün boyunca su veya 150mM NaCl işlemine tabi tutulmuştur. H_2O_2 'nin tek başına prolin, malondialdehid (MDA) ve H_2O_2 içerikleri üzerinde etkisi olmadığı saptanmıştır. Bu işlem sonrasında CAT aktivitesi azalması meydana gelmiştir. H_2O_2 uygulamasının bir sonucu olarak yapraklarda üç yeni SOD izoenzimi ortaya çıktığı görülmüştür. Ön uygulama yapılmış fidelerde karbondioksit (CO_2) fiksasyonu oranı doğrudan NaCl stresine maruz bırakılan fidelere göre daha yüksek, MDA, H_2O_2 ve prolin içerikleri daha düşük olduğu gözlenmiştir. NaCl uygulamasından 4 ve 7 gün sonra yapraklardaki Cl^- içeriği önemli ölçüde arttığı, ancak ön işlem görmüş bitkilerde daha az olduğu saptanmıştır. H_2O_2 metabolizmasının arpa bitkisinde tuza karşı tolerans süreçlerinde bir sinyal olarak yer aldığı ileri sürülmüştür. [102]

Andrade ve arkadaşları, soya fasüyesi tohumlarına H_2O_2 ön uygulaması yapılarak su stresine karşı tolerans artırmadaki rolünü incelenmiştir. 24 saat boyunca H_2O_2 çözeltisi ile ön işleme maruz bırakılmıştır. Tohum ekiminden 12 gün sonra belirli aralıklar ile su stresine maruz kalan fidelerde biyokütle birikimi, kök hacmi, gövde çapı, gaz değişimleri, antioksidan sistem aktivitesi ve hücre zarı hasarları değerlendirilmiştir. Tohumların H_2O_2 ile ön uygulaması, yüksek antioksidan enzim aktivitesi, düşük H_2O_2 ve O^{2-} ile fideler üretimi sağlanmıştır. H_2O_2 ön işlemi ayrıca fotosentetik pigment içeriğinin ve net fotosentetik oranın, yüksek biyokütle birikiminin, kök hacminin ve gövde çapının artmasına neden olmuştur. Soya fasüyesi tohumlarının H_2O_2 ön işlemi, fidelerin aşırı sulama stresine karşı daha toleranslı olmasını sağlamıştır. Soya fasüyesinde H_2O_2 aracılık ettiği toleransın uyarılması sürecinde yer alan bir stres uyarıcı olduğu saptanmıştır. [103]

Sarwar ve arkadaşları, pamuk bitkisinde H_2O_2 , SA, *Moringa oleifera* yaprağı ekstraktı (MLE) ve askorbik asit(ASA) gibi çeşitli büyüme maddelerinin sıcaklık stresine bağlı olarak yaprak fizyolojisi ve tohumluk pamuk verimi(SCY) üzerindeki etkisini araştırılmıştır. Pamuk bitkileri üç farklı ortamda yüksek sıcaklıklara maruz bırakılarak yetiştirilmesi sağlanmıştır. Yüksek sıcaklıklara maruz bırakılan bitkiler, optimum sıcaklık altındaki bitkilere kıyasla daha düşük tohumluk pamuk verimi saptanmıştır. Yüksek sıcaklığa tepki olarak pamuk bitkilerinde peroksidaz ve askorbik asit gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerinde artış görülmüştür. Ancak bu savunma sistemi, stres altındaki bitkilerin hücre zararını aşırı sıcaklıklardan koruması gerçekleşmemiştir.

H₂O₂ ile ön uygulamaya maruz bırakılan pamuk bitkisinde hücre zarında sıcaklık kaynaklı hasarı azaltacak ölçüde toleransa sahip olduğu saptanmıştır. Büyüme düzenleyicilerin, özellikle H₂O₂'nin, antioksidan savunma sistemini artırdığı, pamuk mahsullerini sıcaklık kaynaklı stresin hücresel zar hasarından koruyabileceği sonucuna varılmıştır. [104]

Wen ve arkadaşları, mısır bitkisinde CuCl₂ uygulamasının büyümede azalmaya yol açtığı için H₂O₂ ön uygulamasının fidelerde bitki gelişimini artırdığını gözlemlemiştir. H₂O₂ ön uygulaması sırasında, glutamat yolunun Delta(1)-pirolin-5-karboksilatsentetaz (P5CS) ve GDH aktiviteleri hemen artarken, ornitin yolunun arginaz ve ornitin aminotransferaz (OAT) aktiviteleri 8 saat sonra yükseldiği ortaya çıkmıştır. CuCl₂ stresi altında arginaz ve OAT aktiviteleri hızla yükseldiği, P5CS ve GDH aktiviteleri de 8 saatlik uygulama ardından sonra arttığı saptanmıştır. CuCl₂ stresi sırasında prolin içeriğinin eş zamanlı artışı, ornitin ve glutamat yollarının ardışık aktivasyonu ve ProDH'deki azalma ile ilişkili olduğu ortaya çıkmıştır. H₂O₂ ile ön uygulama, arginaz ve OAT, P5CS ve GDH aktivitelerinde ani ve hızlı bir artışa neden olduğu saptanmıştır. İşlemler aynı zamanda, prolin bozunmasının asıl enzimi olan prolin dehidrojenaz aktivitesini de azaldığı saptanmıştır. Aynı zamanda, H₂O₂ ile ön uygulama, CuCl₂ stresi altında tatlı mısır fidelerinde ProDH ekspresyonunda azalma gözlenirken, ornitin yolu ve glutamat yolu enzimlerinin ekspresyonunda artışa neden olmuştur. H₂O₂'nin artan prolin içeriği yoluyla CuCl₂ tarafından üretilen stresi iyileştirdiği sonucuna varılmıştır. Genel olarak, CuCl₂ stresinin olumsuz etkileri, H₂O₂'nin harici olarak uygulanmasıyla hafifletildiği gözlenmiştir. [105]

Zhang ve arkadaşları, salatalık bitkisinde H₂O₂ düşük ışıktaki antioksidan enzimlerin ve lipid peroksidasyonun düzenlenmesinde yer alıp almadığı araştırılmıştır. H₂O₂ ile salatalık bitkisinde ön uygulama yapılarak düşük ışık kaynağında yapraklarındaki süperoksit radikali (O₂⁻), endojen H₂O₂ ve malonaldehit (MDA) düzeylerini artması gözlenmiştir. SOD, GSH gibi bazı antioksidanların aktivitelerinde artışı ortaya çıkmıştır. H₂O₂ uygulaması ise yapraklarda orta düzeyde strese ve APX aktivitesine neden olmuştur. H₂O₂ ile önceden işlenmiş fideler 144 saat boyunca düşük ışık yoğunluğuna maruz bırakıldığında, daha yüksek SOD, CAT, GSH-Px, APX, DHAR, aktiviteleri elde edilmiştir. H₂O₂ ve düşük ışık kombinasyonu ayrıca salatalık yapraklarında O₂⁻, hücre içi H₂O₂ ve MDA seviyelerinin düşmesine neden olmuştur.

H₂O₂, antioksidan enzimlerin aktivitelerini ve lipid peroksidasyonunu azaltması ortaya çıkmıştır. Böylece düşük ışııkta stres yoğunluğunu azaltması gözlenmiştir [10].



BÖLÜM 5

MATERYAL VE METOD

5.1. Bitki Materyali ve Yetiştirme Koşulları

Nevşehir Ziraat odasından alınmış olan domates tohumları Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Stres Biyolojisi laboratuvarında bulunan yetiştirme çemberinde 25°C sıcaklıkta perlit içerisinde çimlendirme işlemi uygulanmıştır. Çimlenen tohumlar, içerisinde 40 ml Hoagland çözeltisi bulunan 400 ml'lik beherler içerisine alınarak, iklim ve geliştirme dolabında hidroponik ortamda fidelerin büyümesi sağlanmıştır. Ortam şartları ortalama sıcaklığı 30 °C, nem içeriği yaklaşık %50 ve ışık yoğunluğu da 1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ve fotoperiyod 16 saat aydınlık 8 saat karanlık olacak şekilde ayarlanmıştır. 14 günlük bir süre sonunda, 10-15 cm kadar uzayan domates fideleri, kontrol, sadece H₂O₂, tuz (NaCl) ve H₂O₂ ön muamelesi + tuz (NaCl) şeklinde 4 farklı gruba ayrılarak stres uygulamaları gerçekleştirilmiştir.

H₂O₂ ön muamelesi yapılacak fidelerin yapraklarına 10 mM 15 ml H₂O₂ spreylenecek diğer gruba distile su sıkılmıştır. İlk H₂O₂ uygulamasından 24 sonra yeniden 10 mM 15 ml H₂O₂ uygulaması yapılmıştır. İlk H₂O₂ spreylemesinden 48 saat sonra fideler 80 mM tuz (NaCl) stresine maruz bırakılmıştır.

Tuz stresi uygulamasından 24, 72 ve 120 saatler sonunda bitki yaprakları sonraki analizler için hasat edilmiş, sıvı azot içerisinde toz haline getirilmiş ve analize kadar -80°C buzdolabında saklanmıştır.

5.2. Toplam Klorofil tespiti

0.1 gram bitki örneği alındıktan sonra, 100 ml %80'lik asetonda ezilmiştir. Süzüntü filtre kâğıdından geçirildikten sonra, klorofil A miktarı Witham ve arkadaşlarına göre hesaplanmıştır [107].

$\text{mg kl.a/g doku} = [12.7 (D630) - 2.69 (D450)] \cdot (V/1000.A)$

5.3. Malondialdehit (MDA) ölçümü

Heath ve Packer (1968) yöntemine göre yapılmıştır [108].

1. 100 mg bitki örneği tartılacak ve %0.1 lik 5 ml (w/v) Trikloroasetik asit (TCA) solüsyonu içerisinde parçalanmıştır.
2. Daha sonra bu örnek 10 000 x g de 20 dk santrifüj edilmiştir.
3. Elde edilen üst fazdan 1 ml alınacak ve üzerine %0,5 (w/v) Tiyobarbütirik Asit (TBA) içeren %20lik (w/v) TCA çözeltisinden 2 ml eklenmiştir.
4. Karışım kaynayan suda 30 dk inkübe edildikten sonra reaksiyonu durdurmak için tüpler buz içerisinde bekletilmiştir.
5. Daha sonra örnekler 10 000 x g de 5 dk santrifüj edilecek daha sonra üst fazın absorbansı 532 nm de ve 600 nm de okunmuştur. Kör olarak, 3 ml %0.5 TBA içeren %20'lik TCA çözeltisi kör olarak kullanılmıştır.
6. MDA miktarı, 155 mM-1cm-1 seyreltme katsayı değeri kullanılarak aşağıda verilen formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{MDA } (\mu\text{mol/g FW}) = [(A_{532} - A_{600}) / 155] \times 103 \times \text{Seyreltme faktörü (df)}$$

5.4. Enzim Aktivite Prosedürü

Enzim aktiviteleri ölçümleri Chen ve Zhang e göre yapılmıştır [109].

5.4.1. Ham protein/Enzim Ekstraksiyonu

1. Domates bitkisinin tepe yaprakları 0,5 gr olacak şekilde ayarlanarak ve havan içerisinde sıvı nitrojen ile toz haline getirilmiştir.
2. Bu yaprak tozu üzerine 100 mM 6 ml PBS tamponu ekleyerek homojenize hale getirilmiştir.
3. Homojenatı dört tane 1.5 ml santrifüj tüpüne dağıtılır ve 10000 g de +4°C de 20 dakika santrifüj edilmiştir.
4. Supernatant alınarak daha sonraki analizler için -80 derece dondurucuda saklanmıştır.
5. Elde edilen çözeltinin protein konsantrasyonu (mg/ml)= $1,55 \times A_{280} - 0,76 \times A_{260}$ formülü kullanılarak hesaplanmıştır.
6. Çalışmaların güvenilirliği için bu değer 2'nin altında çıkması gerekmektedir. Fazla çıkması durumunda PBS tamponu ile seyreltme yapılmıştır [110].

5.4.2. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesinin Belirlenmesi

1. 30 ml 100 mM PBS(pH 7.8), 0.6 ml 1 mM EDTA-2Na, 2 ml 130 mM Metionin, 7 ml 750 µM NBT ve 2 ml 20 µM Riboflovin içeren reaksiyon çözeltisi hazırlandı
2. Her 1 ml reaksiyon çözeltisi içerisine 50 µl ham protein ektresinden eklendi
3. 50 µl reaksiyon çözeltisi yerine 100 mM PBS olan 2 adet kontrol tüp hazırlandı.
4. Analiz edilecek örnekler ve kontrol tüplerinden biri 4000 lux ışık karşısında 10-15 dakika beklendi.
5. Diğer kontrol tüpü ise ışığa maruz bırakılmadan karanlıkta kalması sağlandı.
6. 560 nm de karanlıkta bekletilen tüp referans alınarak okuma yapıldı [110].

SOD total aktivitesi (unit: u/mg protein) = [(Ack-As) x V]/(0.5 x Ack x Vt)/Cp

ACK= ışıkta tutulan kontrol tüpünün absorbansı

As: örnek bulunan tüpün absorbansı

V: ham protein toplam hacmi

Vt. Test tüpünde kullanılan ham protein hacmi

Cp: ham protein ekstraksiyonun konsantrasyonu (mg/ml)

5.4.3. Katalaz Aktivitesinin Belirlenmesi

1. 50 ml 10 mM PBS tamponu içerisine 77,5 µl %30 H₂O₂ eklenerek reaksiyon çözeltisi elde edildi
2. Küvetlere önce 50 µl ham protein ekstraksiyonu koyulur üzerine 1 ml reaksiyon çözeltisi eklendi
3. 240 nm de 15 saniyede bir ölçüm alındı. Enzim ekstraksiyonu yerine 50 µl 100 ml PBS tamponu kontrol okuma olarak kullanıldı.

CAT aktivitesi (unit: u/mg protein) = ΔA₂₄₀ x (V/Vt)/(0.1 x t)/Cp formülü kullanılarak hesaplandı.

ΔA₂₄₀: her 15 saniyede 240 nm'de absorbans değişimi

V: toplam ham protein ekstrasyon hacmi

Vt: test tüpünde kullanılan ham enzim hacmi

t: reaksiyon süresi (dk)

Cp: ham protein konsantrasyonu (mg/ml)

5.4.4. Askorbat Peroksidaz Aktivitesinin belirlenmesi

1. 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7), 0,5 mM askorbat, 0,5 mM H₂O₂ ve 10 µl ham protein içeren reaksiyon karışımı soğuk ortamda hazırlandı.
2. Hazırlanan karışım 290 nm dalga boyunda kuvartz kuvet kullanılarak 3 dakika boyunca okuma yapıldı.
3. Enzim aktivitesinin hesaplanmasında, indirgenmiş askorbat için 2,8 mM⁻¹ cm⁻¹'lik ekstinksiyon katsayısı kullanıldı.

5.5. Primer Dizaynı ve Sentezi

Çalışmada kullanılacak olan Superoksit dismutaz(SOD) Katalaz (CAT), Askorbatperoksidaz (APX) ve aktin (ACT7) genleri primer dizileri litaretürdeki benzer bir çalışmadan alınmıştır [111]. **Primer listesi** Tablo 5.1’de verilmiştir.

Tablo 5.1. Primer listesi [111]

Gen Adları	Aksesyon numaraları	İleri primer	Ters primer
Actin7	Solyc03g078400	GGGATGGAGAAGTTTGGT GGTGG	CTTCGACCAAGGGATGGTG TAGC
Cu/Zn-SOD	Solyc11g066390	TCACCACAACCAGCACTAC CA	AGTGACAACCCCTCAACA TTAG
CAT1	Solyc12g094620	CGCATA CGACACCCCTTTC	CGGAGAAAATCAGCACAA GTAAG
cAPX	Solyc06g005160	TCTGAATTGGGATTTGCTG A	CGTCTAACGTAGCTGCCAA A

5.6. RNA izolasyonu

24,72 ve 120 saatler sonunda alınan taze yapraklar sıvı azot içerisinde toz haline getirilmiş, ticari kitte yazan kullanım kılavuzuna göre 0.1 gr olacak şekilde eppendorf tüplere alınmıştır.

RNA izolasyonu uygulamasına kadar -80°C 'de buzdolabında saklanması gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada her bir stres koşulu için 3 biyolojik tekrar ele alınmıştır.

Genlerin ifade analizleri için kontrol ve stres uygulamalarından elde tepe yaprakları, ilk olarak RNA izolasyonu yapılmıştır.

Total RNA izolasyonu, 'Thermo Scientific GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit' kullanılarak üreticinin kullanım kılavuzundaki yönergelere göre yapılmıştır.

RNA izolasyonu basamakları

1. Buzdolabından çıkarılan içinde yaprak örneklerinin bulunduğu eppendorf tüplerin her birine (100 mg), 500 μL Plant RNA Lysis Solution ve 10 μL Dithiothreitol (DDT) eklenmiş ve her bir tüp yaklaşık 10 sn vortekslenmiştir.
2. Tüpler 56°C 'de 3 dk inkübe edilmiştir ve 20.000 g'de (14.000 rpm) 5 dk santrifüj edilmiştir.
3. Tüplerdeki 450-550 μL 'lik süpernatant kısım, temiz tüplere aktarılmıştır ve 250 μL etanol de ilave edilerek pipet yardımıyla karışım sağlanmıştır. Sonrasında karışımlar, saflaştırma kolonu takılı toplama tüplerine aktarılmıştır.
4. Tüpler 12.000 g'de (11.000 rpm) 2.5 dk santrifüj edilmiştir.
5. Santrifüjden sonra toplama tüplerindeki süzüntü dökülmüş ve saflaştırma kolonları yeniden takılmıştır.
6. Saflaştırma kolonlarına 700 μL WB 1 yıkama tamponu ilave edilmiş, 12.000 g'de 2.5 dk santrifüj edilmiştir.
7. Santrifüj sonunda saflaştırma kolonlarının takılı olduğu toplama tüpleri atılmış, saflaştırma kolonları yeni toplama tüplerine yerleştirilmiştir.
8. Saflaştırma kolonlarına 500 μL WB 2 yıkama tamponu ilave edilmiş, 12.000 g'de 2.5 dk santrifüj edilmiştir. Toplama tüplerindeki süzüntü dökülüp kolonlar tekrar takılmıştır.

9. Saflaştırma kolonlarına tekrar 500 µL WB 2 yıkama tamponu eklenmiş, 12.000 g'de 2.5 dk santrifüj edilerek kolonların son yıkaması gerçekleştirilmiştir. Toplama tüpleri atılmıştır.

10. Son basamakta RNA eldesi için saflaştırma kolonları RNaz içermeyen 1.5 ml'lik eppendorflara yerleştirilmiştir ve saflaştırma kolon membranlarının merkezine 50 µL nükleaz içermeyen saf su eklenip 12.000 g'de 1 dk santrifüj edilmiştir.

11. Örnekler -20 °C de saklanmıştır.

5.7. cDNA (Komplementer DNA) Sentezi

cDNA sentezine geçmeden önce, izole edilmiş olan RNA'ların, kalitesi ve miktarını belirlemek için Donovix Marka nanodrop absorbans cihazında 260/280 nanometre dalga boyunda ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Bu ölçümün temel amacı, bir sonraki basamak olan cDNA sentezinde eşit konsantrasyonlarda DNA elde etmektir.

RNA örneklerinden cDNA sentezi, RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

cDNA sentezi basamakları:

1. Steril tüplere; total RNA (0.1 ng – 5 g), 1 L Oligo (dT)18 primer ve toplam hacim 12 µL olacak şekilde su ilave edilmiştir.
2. Sonrasında tüplere sırasıyla; 4 µL 5X Reaction Buffer, 1 µL RiboLock RNase Inhibitor (20 U/µL), 2 µL 10 mM dNTP Mix, 1 µL RevertAid M-MuLV RT (200 U/µL) bileşenleri eklenerek toplam hacim 20 µL'ye tamamlanmıştır.
3. Yavaşça karıştırılıp kısa bir süre santrifüjlenmiştir.
4. Ters transkripsiyon reaksiyonu, ısı döngü cihazında 42°C'de 60 dakikalık bir sürede gerçekleştirilmiştir.

5.8. Real Time PCR ve Veri analizi

Real time reaksiyonları için Bioneer marka AccuPower® RT-PCR PreMix kullanıldı. DNA fragmanı, aşağıdaki termal koşullar kullanılarak 35 döngü için amplifiye edildi: DNA şablonunu 94 °C'de 30 saniye denatüre etme, 15 saniye boyunca primer Tm'nin 5 °C altında primer tavlama, 1 dakika boyunca 72 °C'de DNA sentezi. Real-Time PCR sonucu elde edilen bağlantı 2-ΔΔCT yöntemiyle değerlendirilmiştir [112].

- Kontrol $\Delta CT = \text{Kontrol CT}(\text{Hedef gen}) - \text{Kontrol CT}(\text{referans gen})$
- Örnek $\Delta CT = \text{Örnek CT}(\text{hedef gen}) - \text{Örnek CT}(\text{referans gen})$
- $\Delta\Delta CT = (\text{Örnek } \Delta CT)_{\text{ort.}} - (\text{Kontrol } \Delta CT)_{\text{ort.}}$
- Hedef Genin mRNA miktarı = $2^{-\Delta\Delta CT}$

5.9. İstatistiksel Analiz

Gruplar arasındaki farklılıklar SPSS 22.0 programında one-way anova testi ile belirlenecektir. Gruplar arasındaki farklılığın önem düzeyi posthoc testlerden Tukey ile gerçekleştirilmiştir. ($p < 0.05$).

BÖLÜM 6

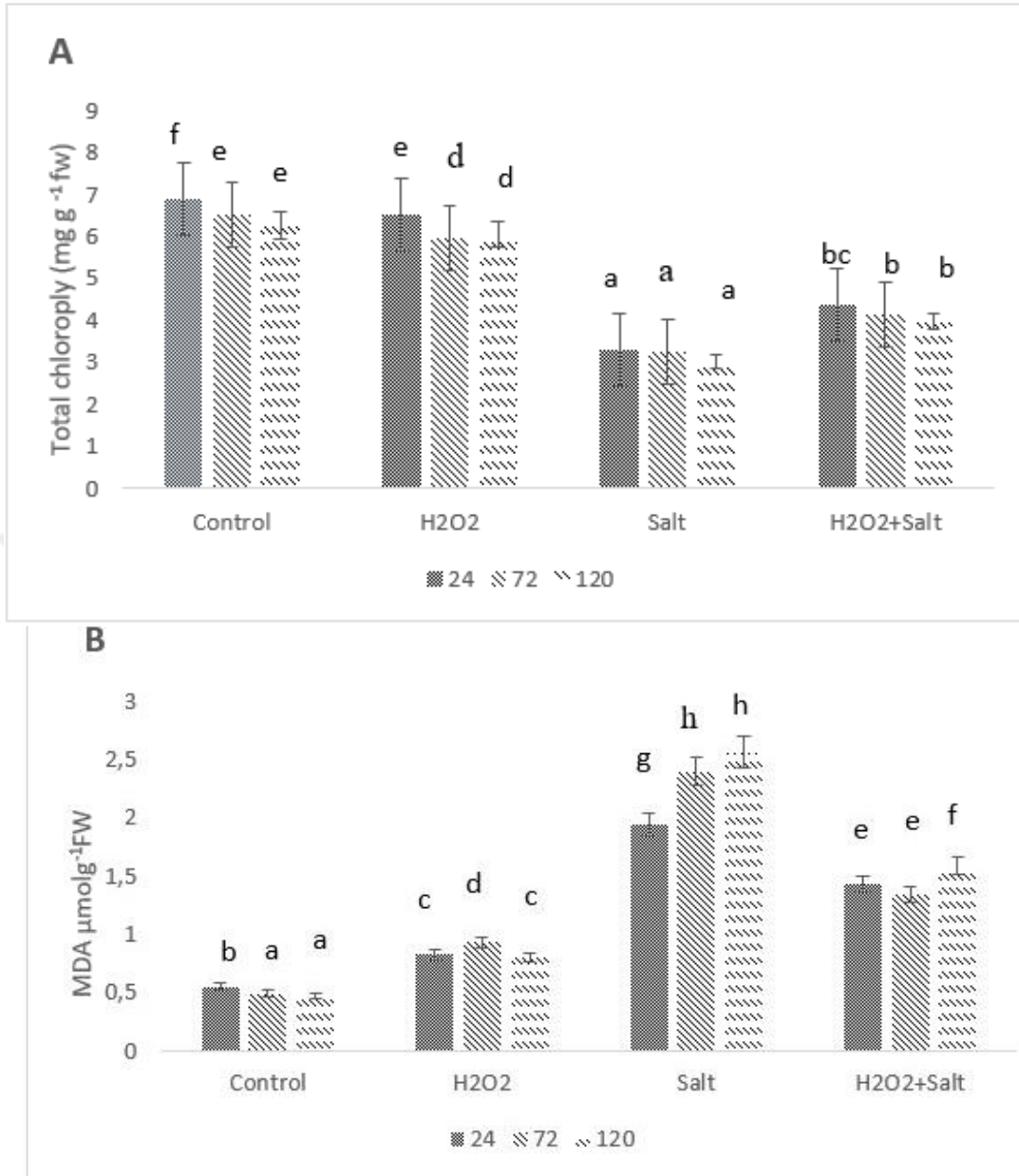
BULGULAR

Bu çalışmada domates bitkisi 4 farklı gruba ayrılarak (kontrol, H₂O₂, tuz ve H₂O₂+tuz) farklı sürelerde örnekleme yapılarak bitki yapraklarında meydana gelen toplam klorofil miktarındaki değişim, lipid peroksidasyonu, SOD, CAT ve APX enzim aktivitesi ve gen ekspresyon düzeylerinde meydana gelen değişiklikler çalışılmıştır.

Toplam klorofil miktarında meydana gelen değişime bakıldığında kontrol grubu ve sadece H₂O₂ uygulanan gruplar arasında çok belirgin bir fark olmadığı tespit edilmiştir. Ancak tuz ve H₂O₂+tuz uygulanan gruplara baktığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görülmektedir. Ayrıca maruziyet süresine bağlı olarak Tuz+H₂O₂ 120 saat uygulaması diğer priming ve tuz farklı olarak azalmıştır. (Şekil 1.)



Şekil 1. Deney esnasından analizi yapılmak üzere alınan örneklerin fotoğrafları. A. 24 saat B 72 saat C 120 saat



Şekil 2. Farklı sürelerde tuz stresine maruz domates fidelerinde H₂O₂ ön uygulamasının Total klorofil miktarında ve MDA konsantrasyonlarına olan etkisi. (A) Total klorofil (B) MDA. Çubuklar standart hatayı, farklı harfler istatistiksel farkı göstermektedir (p<0.05)

Strese bağlı olarak meydana gelen ROT ilk hedefi hücre zarında lipid peroksidasyona neden olmamaktır. Peroksidasyon sonucu üreten MDA bitkinin stres durumu hakkında fikir vermektedir. Yapılan çalışmada sadece H₂O₂ uygulanan grubun kontrol grubundan istatistik olarak farklılık gösterdiği istatistik olarak en yüksek MDA konsantrasyonuna sadece tuz uygulaması 72 ve 120. Saatlerde olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca tuz+ H₂O₂

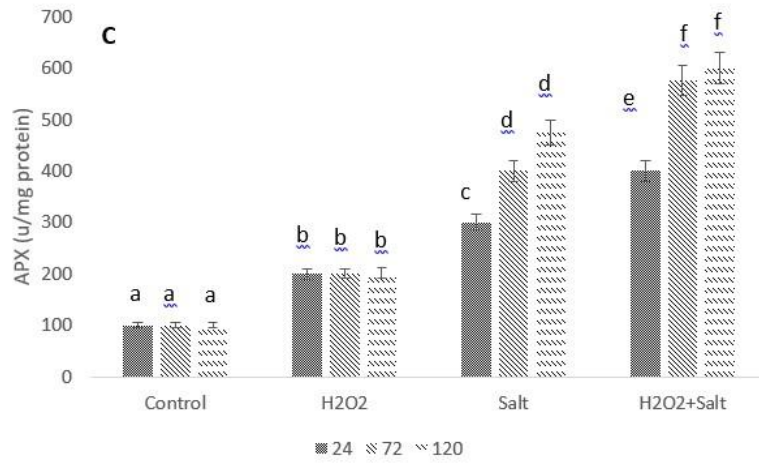
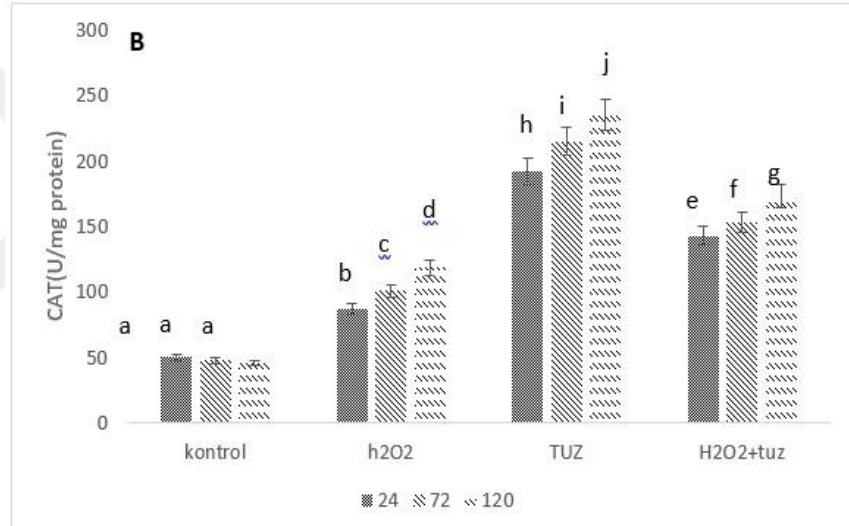
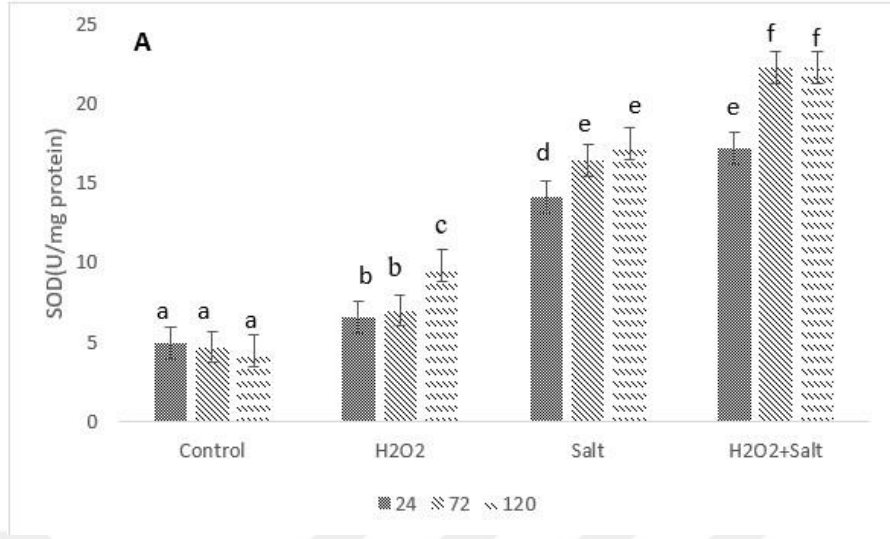
uygulamasındaki bütün gruplarda MDA akümülyasyonu sadece tuz uygulanan gruptan düşük çıkmıştır. 120 saatlik uygulamada ise MDA konsantrasyonu diğer priming uygulaması yapılmış gruplardan istatistiksel olarak farklılık göstermektedir. (Şekil 2 B).

Antioksidan enzim aktivitelerine bakıldığı zaman enzim aktivitelerinde uygulama süresi ve grubuna bağlı olarak kontrole göre yukarı yönlü değişimler meydana gelmiştir.

SOD enzimi aktivitesi en yüksek aktivite değerine H_2O_2 +tuz 72 ve 120 saatlerde ulaşmıştır. Kontrole göre kıyasladığında bütün uygulama gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış meydana gelmiştir. (Şekil 3 A)

CAT enzim aktivitesi en yüksek 120 saat tuz stresinde tespit edilmiştir. Farklı sürelerde H_2O_2 +Tuz uygulanan gruplarda CAT aktivitesi kontrol grubundan anlamlı düzeyde yüksek ancak yalnızca tuz uygulanan gruptan daha düşük olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$) Şekil 3 B).

APX enzim aktivitesine bakıldığı zaman en yüksek aktivitesi 120 ve 72. Saat H_2O_2 +tuz uygulamasında tespit edilmiştir. Yalnızca tuz uygulanan konsantrasyonda aktivite kontrole göre yüksek çıkmasına rağmen CAT enziminden farklı olarak H_2O_2 +tuz uygulamasından daha düşük olarak tespit edilmiştir (Şekil 3.C).



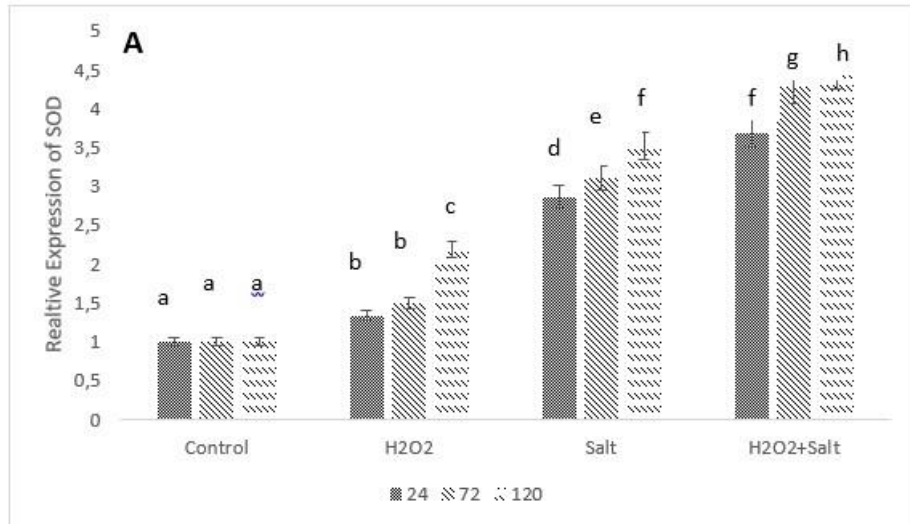
Şekil 3. Farklı sürelerde tuz stresine maruz domates fidelerinde H₂O₂ ön uygulamasının antioksidan enzim aktivitelerine olan etkisi. A.SOD, B.CAT ve C. APX. Çubuklar standart hatayı, farklı harfler istatistiksel farkı göstermektedir (p<0.05)

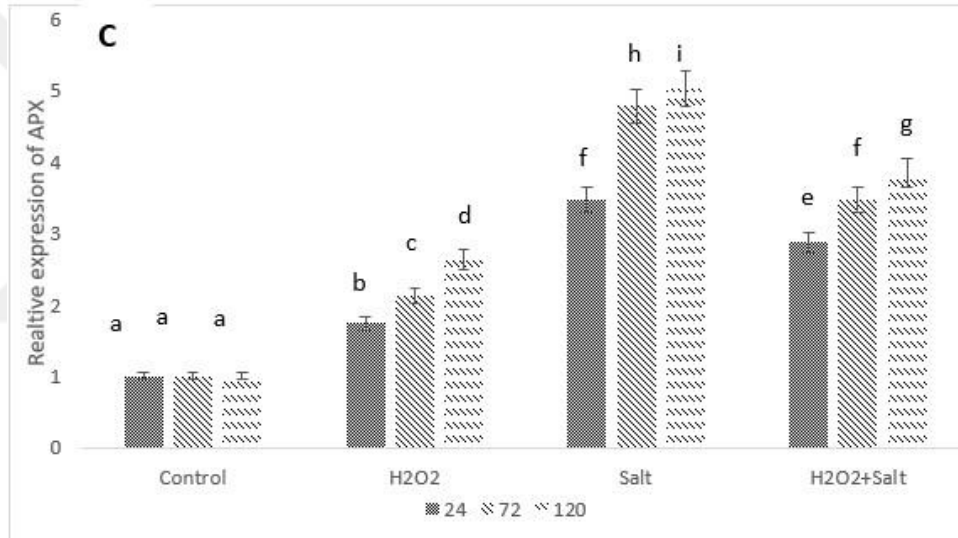
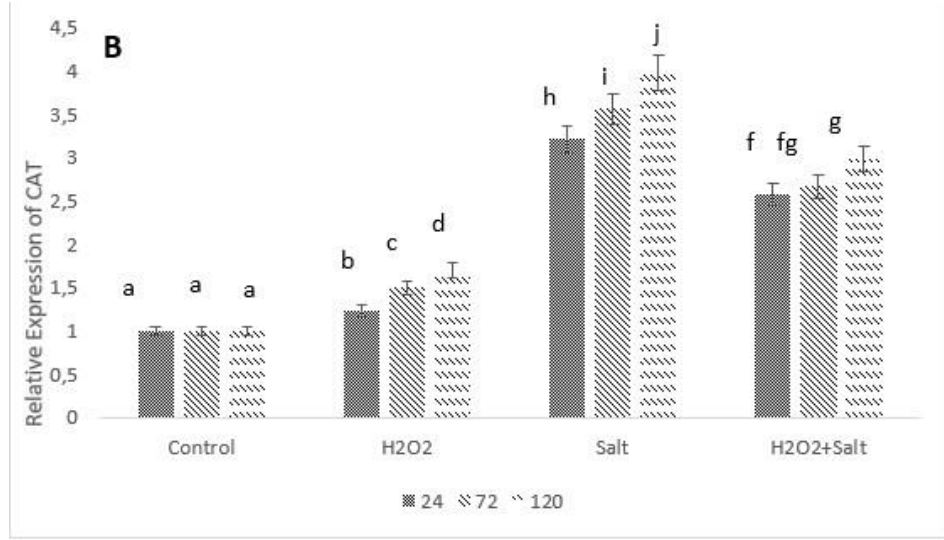
Antioksidan gen ekspresyonlarında meydana gelen değişiklik house keeping gen olarak kullanılan actin7 genine göre ekspresyonuna göre değerlendirilmiştir.

SOD ekspresyonuna bakıldığı zaman istatistiksel olarak en yüksek ekspresyon miktarına kontrol grubundan 4 kat fazla olarak 72 saat ve 120 saat H₂O₂+tuz konsantrasyonlarında rastlanmıştır. Ayrıca diğer uygulama şartlarında da ekspresyon seviyesinin kontrol grubundan istatistiksel olarak farklılık gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4-A).

CAT gen ekspresyonunda sadece H₂O₂ uygulanan grupta kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artış göstermiştir. En yüksek CAT ekspresyonu kontrolden 3 kat fazla olacak şekilde 120 saatlik tuz uygulamasında tespit edilmiştir. H₂O₂+tuz uygulamasında meydana gelen ekspresyon kontrol grubundan farklıdır ancak yalnız tuz uygulanan bütün gruplardan düşük miktarlarda ekspresyon meydana gelmiştir. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır.(p<0.05) (Şekil 4-B).

APX gen ekspresyonlarına bakıldığı zaman CAT'a benzer şekilde en yüksek ekspresyon seviyeleri sadece tuz uygulanan konsantrasyonlarda meydana gelirken H₂O₂+tuz uygulamasında gruplarda meydana gelen ekspresyon seviyesi istatistiksel olarak yalnızca tuz uygulanan gruptan daha düşük kontrole göre ise daha fazladır (P<0.05) (Şekil 4-C).





Şekil 4. Farklı sürelerde tuz stresine maruz domates fidelerinde H₂O₂ ön uygulamasının antioksidan enzim ekspresyonlarına olan etkisi. A. SOD, B.CAT and C. APX. Çubuklar standart hatayı, farklı harfler istatistiksel farkı göstermektedir (p<0.05)

BÖLÜM 7

TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER

Tuzluluk bitkilerin başa çıkması gereken en önemli çevresel koşulların başında gelmektedir. Tuzluluk stresine karşı geliştirilen stratejiler bitki toleransı ve ürün veriminin artırılmasında oldukça önem kazanmaktadır. Mevcut çalışmamızda tuz stresine maruz bırakılmadan önce H₂O₂ ön muamelesi yapılmıştır sonuçta bitki stres faktörüne karşı daha dayanıklı bir yapı gösterdiği tespit edilmiştir.

Aazami ve arkadaşları klorofil konsantrasyonunda meydana gelen değişimler bitkilerde stres toleransının değerlendirilmesi için iyi göstergeler olarak kabul edildiğini önermişlerdir [113]. Bizim çalışmamızda kontrol grubu ile sadece H₂O₂ uygulanmış gruplar arasında bir değişim yok iken H₂O₂ ve tuz uygulamasında tespit edilen klorofil miktarı tuz uygulanan klorofilden daha yüksek olarak bulunmuştur. Meloni ve arkadaşları tuz stresinde artan sodyum içeriğine bağlı olarak klorofil zarar görmektedir [114]. Farklı bitkilerle yapılan çalışmalarda bizim çalışmamızdaki bulgulara benzer şekilde tuz stresi klorofil miktarında ciddi bir azalmaya neden olmuştur. Yao ve arkadaşları, karabuğday (*Fagopyrum tataricum* L.) fidelerinde tuz stresine karşı H₂O₂ eksojen aktivitesi incelemişler 5milimolar H₂O₂ ön uygulamasının stres grubundan yüksek total klorofile sahip olduğunu 10 milimolar H₂O₂ ön uygulaması ile stres grubu arasında fark olmadığını bildirmişlerdir [115]. Bizim çalışmamızda da H₂O₂+Tuz stresi yapılan grupta klorofil miktarının fazla olduğu tespit edilmiştir. Asgher ve arkadaşları pirinç bitkisinde H₂O₂ nin ön muamesinin Arsenik stresine karşı etkilerini araştırdığı çalışmasında As maruziyetinde, kontrole kıyasla klorofil içeriğinin %14.8 azaldığını. H₂O₂ uygulaması sonucunda ise, kontrole kıyasla toplam klorofil içeriğinde %29.6'lık bir artışın olduğunu bildirmişlerdir [116]. Bizim bulgularımızda bu çalışma ile benzerlik göstermektedir.

Hücrede meydana gelen reaktif oksijen türlerinin ilk olarak hücre zarı ile etkileşime girerek lipid peroksidasyonuna neden olur. Lipid peroksidasyonu sonucu meydana gelen MDA öncül stres göstergesidir. Yapılmış olan bir çalışmada sadece tuz maruziyetinde yapraklarda MDA konsantrasyonunda önemli bir artış gözlemlendi. H₂O₂ ve tuz stresinde ise azalan MDA konsantrasyonu tespit edilmiştir bu durumda H₂O₂

ilavesinin oksidatif hasara karşı koruyucu bir mekanizmayı indüklediğini düşündürmektedir [117]. Farklı priming uygulamaları stres karşısında meydana gelen MDA konsantrasyonu düşürmede etkili olmuştur [118]. Jiang ve arkadaşları, pirinç bitkisinde eksojen salisilik asit uygulamasının As stresin karşı MDA miktarında azalmaya neden olduğunu tespit etmiştir [119]. Ayrıca bazı ekstraktları da stres toleransını arttırmada priming ajanları olarak kullanılmaktadır. Elsayed ve arkadaşları, Cupresus bitki ekstraktının tuz stresine maruz kalmış bitkilerde salisilik asitten daha etkili bir şekilde MDA konsantrasyonunu azalmasını sağladığını bildirmiştir [120]. Bizim bulgularımızda bu çalışmalara benzer şekilde ön uygulama yapılmış grupta MDA miktarında azalma tespit edilmiştir. Bunların yanında Silva ve arkadaşları, ayçiçeği bitkisinde H₂O₂ priming tuz stresine karşı MDA miktarında azalmaya neden olduğunu tespit etmiştir [118]. Bu durumunun H₂O₂ nin sinyalizasyon etkisi sayesinde antioksidan sistemi erken harekete geçirerek MDA birikimini engellemiş olabileceğini öne sürmektedir [118]. Bizim bulgularımızda Silva ve arkadaşlarının bulguları ile paralellik göstermektedir. Eksojen H₂O₂ uygulanması gerek klorofil miktarındaki değişim açısından gerekse MDA akümüasyonu açısından incelendiğinde lipid peroksidasyonu azalttığı ve yaprak kloroplastlarının ince yapısını koruduğu görülmektedir [121].

Yapılan çalışmada H₂O₂'nin sinyalizasyon etkisinin olduğu tespit edilmiştir. Ancak CAT aktivitesi, CAT ve APX ekspresyon düzeyleri ele alındığında buradaki ekspresyon seviyeleri literatürden farklı olarak en yüksek aktivite ve ekspresyon düzenine ulaşmamıştır. Zhang ve arkadaşları mekanik yaralanmanın neden olduğu donma toleransına H₂O₂ ön uygulaması etkisini incelemişler ve diğer donma stresine karşı yapılan çalışmalardan farklı olarak anlamlı bir etkisi olmadığını tespit etmişlerdir. Bu durumu soğuk stresi için kurmuş oldukları deney düzenindeki sıcaklık ile ilişkilendirilmişlerdi [122]. Benzer şekilde bizim çalışmamızda literatürden farklı olmasının nedeni priming için uygulanan H₂O₂' miktarı ile Tuz konsantrasyonu ve süreler olabilir.

Tohum veya fide bitki gelişiminin ilk periyotlarında priming uygulaması bitkilerin abiyotik streslere karşı toleransının geliştirilmesi amacıyla oldukça büyük ilgi görmüştür. Priming amacı ile organik biyomoleküller veya inorganik kimyasal moleküller kullanılmaktadır [120, 123, 124].

Kimyasallar arasında H_2O_2 iki farklı yüzü ile en fazla ilgi çeken priming ajanların başında gelmektedir [123]. H_2O_2 toksik bir molekül olarak değerlendirilirken son yıllarda diğer reaktif oksijen türlerinden farklı olarak zardaki yüksek geçirgenlik ve neredeyse uzun yarı ömür süresi nedeniyle oksidatif stresin en altta yatan patlama sinyali olarak işlev görmektedir [124, 125]. SOD aktivitesi bitkilerin stres cevaplarının belirlenmesinde önemlidir. Çünkü meydana gelen oksidatif strese erken savunma hattını oluşturmaktadır. Çalışmamızda SOD aktivitesi H_2O_2 uygulanan grupta Tuz stresi uygulanan grupta kontrole göre artmış ve en yüksek aktivitesi H_2O_2 ve tuzun birlikte uygulandığı grupta tespit edilmiştir. Gomez ve arkadaşları, tuzluluk stresi altında SOD enzim aktivitesinde bir artış olduğunu bildirmiştir [126]. Bizim çalışmamızda SOD aktivitesi tuzluluk stresinde artmaktadır. Başka bir çalışmada ise sıcaklık stresine karşı H_2O_2 priming etkisi çalışılmış ve SOD aktivitesinin stres faktöründen bağımsız olarak artış gösterdiğini tespit etmişlerdir. H_2O_2 ön işleminin, stres altında SOD yoluyla O^2 radikali ve H_2O_2 miktarlarını azaltarak lipid peroksidasyonunu azaltabileceğini saptamıştır [127]. Benzer bulgularla bizim çalışmamızda bu bulguları destekler niteliktedir.

Asgher ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmalarında bizim bulgularımızla benzer olarak; SOD ve APX aktivitelerinin sadece H_2O_2 uyguladığı grupta artış gösterdiğini ancak en yüksek artışın H_2O_2 ve Arsenik birlikte olduğu zaman meydana geldiğini bildirmiştir. Düşük konsantrasyonda H_2O_2 uygulamasının daha sonraki As stresine karşı bitki daha toleranslı duruma getirdiğini bildirmişlerdir [116].

Bitki hücrelerinde abiyotik stres altında, H_2O_2 'nin temel olarak askorbat peroksidaz izoenzimi (APX) tarafından H_2O 'ya dönüştürülerek detoksifiye edildiği glutatyon-askorbat döngüsü, ana detoksifikasyon sistemi olarak işlev görür. APX, bitkilerin tuzluluk ve alkalik stresine karşı toleransında ve ROT inhibisyon sisteminde hayati bir rol oynar. H_2O_2 detoksifikasyonu çeşitli hücre bileşenlerinde AsA (askorbik asit) homeostazında yer alır ve ROT'un hücreler arası iletişim ağında denge sağlar. Askorbat, bitkilerde H_2O_2 'nin hücreler arası düzenlemesinde önemli bir rol oynar. Antioksidan savunmanın uyarılması: H_2O_2 ön işleminin, bitkilerde antioksidan savunma sistemlerinin yukarı regülasyonunu tetikleyerek bir sinyal molekülü görevi görebilir. Bu, H_2O_2 'nin detoksifikasyonundan sorumlu olan APX gibi enzimlerin aktivasyonunu içerir. Uygun H_2O_2 konsantrasyonunun antioksidan enzim aktivitesini iyileştirdiği ve abiyotik

streslere karşı bitki toleransını arttırdığı gösterilmiştir [128]. Bu çalışmaya paralel olarak bizim bulgularımızda da APX aktivitesi priming yapılan grupta diğerlerinden daha yüksek olarak tespit edilmiştir.

Katalaz enzimi ve askorbat peroksidaz (APX) aktivitesi, metabolik hasarla başa çıkmaya yardımcı olmak için H_2O_2 'nin toksik seviyesini azaltmada karşılaştırmalı bir özellik olarak görülür. Yüksek CAT aktivitesi, tuzluluk stresine karşı artan toleransla ilişkilidir, çünkü H_2O_2 'nin detoksifikasyonunu sağlar. Afrin ve arkadaşları, pirinç bitkisinde H_2O_2 priming donma stresine karşı etkisini incelemişlerdir uygulama sonrası CAT aktivitesinde bir artış meydana geldiğini bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda da en yüksek CAT aktivitesine tuz stresine maruz bırakılan grupta olduğu tespit edilmiştir. CAT aktivitesindeki değişiklikler, bitkinin büyümesine, metabolik durumuna, stresin süresine ve yoğunluğuna bağlı olarak ortaya çıkar [129]. Bagheri ve arkadaşları çalışmasında, hem H_2O_2 ile muamele edilmemiş bitkilerde hem de bitkiler daha önce H_2O_2 ile muamele edildiğinde, tuzlu koşullar altında CAT aktivitesi artmıştır. APX'ten farklı olarak, H_2O_2 yaprak spreylemenin CAT aktivitesini artırma yeteneği erken aşamalarda (püskürtmeden 48 saat sonra) belirgindi [130]. Bizim çalışmamızda benzer şekilde sadece H_2O_2 spreylene deney grubunda CAT aktivitesi kontrolden farklı iken APX de belirgin fark meydana gelmemiştir. Bununla beraber APX de en yüksek aktive priming grubu ile CAT aktivitesi düşüş göstermiştir. Ayrıca Yao ve arkadaşları, H_2O_2 priming uygulamasında 5nmol+tuz uygulaması oldukları grupta en yüksek CAT aktivitesinin tespit ederken 10nm+tuz uygulamasında aktivitede bir düşme olduğunu sadece tuz uygulanan grup ile aynı düzeyde aktivite gösterdiğini bildirmiştir[131]. Bizim çalışmamızdaki aktivitelerde meydana gelen değişimler bu çalışmadaki bulgularla bağlantılı olabilir. H_2O_2 'nin stresle ilişkili promotörleri ve genleri indüklemedeki rolüne ilişkin doğrudan kanıtlar sağlanmıştır.

Yao ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmalarında stresle beraber eksojen olarak uygulamış oldukları H_2O_2 gruplarında tedavisi Tatar karabuğdayındaki stresle ilgili genlerin ve ilgili enzim genlerinin göreceli ifadesinin, diğer deney gruplarına göre önemli ölçüde arttığını ve bu genlerin ifadesindeki değişimlerin diğer fizyolojik ve biyokimyasal değişimleri ile benzerlik gösterdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca birçok farklı çalışmada priming uygulamalarının stres alakalı genlerin ekspresyonlarında önemli bir artışa neden olduğunu bildirmektedir [131]. Bizim çalışmamızda stres alakalı gen

ekspresyon seviyeleri priming uygulaması sonucunda kontrole göre artış göstermiştir. Bu bulguları destekler ekspresyon seviyesinde kontrol grubuna göre artış tespit edilmesine rağmen enzim aktivasyonu gibi model göstermemiştir.

Antioksidan enzim aktivasyonu ve ekspresyon seviyeleri, bitkilerde antioksidan savunma sisteminin iki farklı yönüdür. Antioksidan enzim aktivasyonu, bir enzimin aktif olmayan formunun aktif formuna dönüştürülmesi sürecini ifade ederken, antioksidan enzim ekspresyon seviyeleri, bir antioksidan enzimi kodlayan bir gen tarafından üretilen mRNA veya protein miktarını ifade eder. Her iki yön de, bitki hücrelerinde ROT dengesini korumak ve bitkinin abiyotik stres koşullarına karşı toleransını arttırmak için önemlidir. Bu durum ekspresyon sonra post transkripsiyonel işlemlerden kaynaklanıyor olabilir [117, 132].

Sonuç olarak farklı sürelerde H_2O_2 , tuz ve H_2O_2 +tuz maruz bırakılan domates fidelerinde priming uygulamasının öncül stres göstergelerinden klorofil içeriği ve MDA miktarında azalmaya neden olduğu antioksidan enzim aktivelerinde ve ekspresyon seviyelerinde artışa neden olduğu tespit edilmiştir. Bununla beraber literatürle paralel olarak primingin bitki toleransının arttırdığı bulunmuş ancak uygulanan priming ajanının konsantrasyonu maruziyet süresinin daha sonraki çalışmalarda daha detaylı çalışılması gerektiği kanaatine varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. V. Hernandez M, M.Bobadilla, I, G. Gonzalez, RG, R. Gomez SdJ, R. Garcia E, O.Velazquez RV, A. Arquieta LdL and T. Pacheco I, Plant Hormesis Management with Biostimulants of Biotic Origin in Agriculture. *Front. Plant Sci.* 8: s. 1762-1768, (2017)
2. Rady, M.M., Hemida, K.A., “Sequenced application of ascorbate-proline-glutathione improves salt tolerance in maize seedlings. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 133, s 252–259, (2016)
3. Jin, X.Q., Liu, T., Xu, J.J., Gao, Z.X., Hu, X.X., Exogenous GABA enhances muskmelon tolerance to salinity-alkalinity stress by regulating redox balance and chlorophyll biosynthesis. *BMC Plant Biol.* 19, s. 48, 2019.
4. Sofy, M.R., Elhawat, N., Tarek, A., Glycine betaine counters salinity stress by maintaining high K⁺/Na⁺ ratio and antioxidant defense via limiting Na⁺ uptake in common bean (*Phaseolus vulgaris L.*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* s. 200, 110732, 2020.
5. Zhang, F.L., Wang, Y.H., Liu, C., Chen, F.J., Ge, H.L., Tian, F.S., Yang, T.W., Ma, K.S., Zhang, Y., Trichoderma harzianum mitigates salt stress in cucumber via multiple responses. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 170, s. 436–445, 2019.
6. Li, X., Li, Y., Ahammed, G.J., Zhang, X.N., Ying, L., Zhang, L., Yan, P., Zhang, L.P., Li, Q. Y., Han, W.Y., RBOH1-dependent apoplastic H₂O₂ mediates epigallocatechin-3-gallate-induced abiotic stress tolerance in solanum lycopersicum. *Environ. Exp. Bot.* 161, s. 357–366, 2019a
7. A. M. El-Badri, M. Batool, C. Wang, A. M. Hashem, K. M. Tabl, Elsayed N., Jie Kuai, G. Zhou, Bo Wang “Selenium and zinc oxide nanoparticles modulate the molecular and morpho-physiological processes during seed germination of Brassica napus under salt stress” *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 225, 112695, 2021.
8. H.Ellouzi, S. Oueslati, K. Hessini, M. Rabhi, Chedly Abdelly “Seed-priming with H₂O₂ alleviates subsequent salt stress by preventing ROS production and

- amplifying antioxidant defense in cauliflower seeds and seedlings” *Scientia Horticulturae*, 288, 110360, 2021.
9. Maiti R, Pramanik K. Vegetable seed priming: A low cost, simple and powerful techniques for farmers’ livelihood. *International Journal of Bio-resource and Stress Management*; 4: s 475-481, 2013.
 10. Parera, C.A., Cantliffe, D.J., Presowing seed priming. *Horticultural Reviews*, 16: s. 109-141, 1994.
 11. McDonald, M.B., Seed deterioration: physiology, repair and assesment. *Seed Science and Technology*, 27: s. 177-237, 1999.
 12. Heydecker, W., Gibbins, B., The `priming` of seeds. *Acta Horticulturae*, 83: s. 213-215, 1978.
 13. Heydecker, W. and Coolbaer, P., Seed treatments for improved performance survey and attempted prognosis. *Seed Science Technology*, 5, s: 353-425, 1977
 14. Güvenç İ., *Sebzecilik: Temel Bilgiler, Muhafaza ve Yetiştiricilik (2017)* Nobel Yayınları, s. 288.
 15. Kaymak HC, Güvenç İ, Dursun A, Türkiye’de Sebze Tarımının Mevcut Durumu, Önemli Bazı Gelişmeler ve Çözüm Önerileri. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 36 (2): s. 221-228, 2005.
 16. Aksoy, A. & Kaymak, H.Ç. , Outlook on Turkish tomato sector. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 6(2), s 121-129, 2016.
 17. Al-Remi, F., et al., Domates Bitkisi ve in Vitro Mikro Çoğaltımı (Tomato Plant and Its In Vitro Micropropagation). *Journal of Engineering Technology and Applied Sciences*, 3(1): s. 55-73, 2018.
 18. Güvenç İ, *Sebzecilik: Temel Bilgiler, Muhafaza ve Yetiştiricilik*. Nobel Yayınları (2017), s: 288.
 19. Keskin G, Dölekoğlu Özçiçek C, (2004). Domates ve Domates Salçası Durum – Tahmin, *Tarım Ekonomisi Araştırma Enstitüsü*, Yayın No:123, s:8-11.
 20. 2020 Yılı Dünya Domates Üretimi- FAO 2021

21. Türkiye Domates Verileri- TÜİK 2021
22. Kaygısız H. *Domates Yetiştiriciliği*, Hasat Yayıncılık s: 2-3, 2004.
23. Günay A. , *Özel Sebze Yetiştiriciliği Cilt IV*, A.Ü. Ziraat Fak., 1992.
24. Gürel A., ve Avcıoğlu, R., “Bitkilerde Strese Dayanıklılık Fizyolojisi”, 21. bölüm, Editörler: Özcan, S., Gürel, E., Babaoğlu, M., “Bitki Biyoteknolojisi II, Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları”, *Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları*, 308-313, 2001.
25. E. A., Bailey-Serres, J., Weretilnyk, E., Responses to abiotic stresses. In *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Edited by GruissemW, Buchannan B, Jones R., *American Society of Plant Physiologists*, s: 1158-1249, 2000.
26. Büyük, İ., Soydam-Aydın, S., Aras, S., “Bitkilerin stres koşullarına verdiği moleküler cevaplar”, *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 69(2): s: 97 – 110, 2012.
27. Kara, A., Tunçtürk, R. & Tunçtürk, M., *Ekinezya (Echinacea purpurea L.) bitkisinde tuz stresi ve deniz yosunu uygulamalarının bazı fizyolojik parametreler üzerine etkisinin araştırılması. Derim*, 36(2), s: 199-206, 2019.
28. Bressan, R.A. , “Stres Fizyolojisi”, Editörler: Taiz, L., Zeiger, E., Çeviri Editörü: Türkan Đ., “*Bitki Fizyolojisi*”, Palme Yayıncılık, Ankara, s: 591-620, 2008.
29. Koca, H., Bor, M., Özdemir, F., and Türkan, Đ., “The effect of salt stress on lipid peroxidation, antioxidative enzymes and proline content of sesame cultivars”, *Environmental and Experimental Botany*, 60: s: 344-351, 2007.
30. Mudgal, V., Madaan, N., and Mudgal A., “Biochemical mechanisms of salt tolerance in plants: a review”, *International Journal of Botany*, 6 (2): s: 136-143, 2010.
31. Parida, A.K., and Das, A.B., “Salt tolerance and salinity effects on plants: a review”, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60: s: 324- 349, 2005.

32. Zhou, J., Xu, X.C., Cao, J.J., Yin, L.L., Xia, X.J., Shi, K., Zhou, Y.H., Yu, J.Q., Heat shock factor HsfA1a is essential for R gene-mediated nematode resistance and triggers H₂O₂ production. *Plant Physiol* 176, 2456–2471, 2018.
33. T. Yoshikawa and Y. Naito, ‘What Is Oxidative Stress?’ *Journal of the Japan Medical Association* 124 (11), s: 1549–1553, 2000
34. P. Sharma and R. S. Dubey, ‘Involvement of oxidative stress and role of antioxidative defense system in growing rice seedlings exposed to toxic concentrations of aluminum,’ *Plant Cell Reports*, vol. 26, no. 11, s: 2027–2038, 2007.
35. M. C. Romero-Puertas, M. Rodríguez-Serrano, F. J. Corpas, M. Gómez, L. A. Del Río, L. M. Sandalio ‘Cadmium-induced subcellular accumulation of O₂^{•-} and H₂O₂ in pea leaves’ *Plant Cell Environment*, 27, s: 1122-1134, 2004
36. R. Mittler ‘ROS Are Good’ *Trends In Plant Sciens*, 22, s: 11-19, 2016
37. C. H. Foyer and G. Naktor, ‘Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context’ *Plant Cell Environment*, 28, s: 1056 – 1071, 2005.
38. K. Maruta, J. Wan, A. Fan, , H. Yao, W.Liu, ‘Experimental and numerical investigation on combustion characteristics of premixed hydrogen/air flame in a micro combustor with a bluff body’ *International Journal of Hydrogen Energy*, 37 s: 19190-19197, 2012.
39. Jin Li, Andrew D. Heap, Anna Potter, James J. Daniell, ‘Application of machine learning methods to spatial interpolation of environmental variables’ *Elsevier Declaration Of Interest Statement*, 26, s: 1647-1659, 2011.
40. Hossain, M. S., Akhtar, A., Hossain, M. H., Choudhury, M. P. & Islam, F. (2015), Goat husbandry practices in Southern region of Bangladesh. *Journal of Bioscience and Agriculture Research*, 5, s: 59-64, 2015.
41. A. Wahid, S. Gelani, M. Ashraf, M.R. Foolad ‘Heat tolerance in plants: An overview’ *Environmental and Experimental Botany*, 61, s: 199-223, 2007.

42. N. Ashraf, Shoib A. B., A. Hussain M., Z. A. Wani, T. Mohiuddin, Z. Shah, Nazia A. " Phytochemical analysis and antioxidant activity of different tissue types of *Crocus sativus* and oxidative stress alleviating potential of saffron extract in plants, bacteria, and yeast" *South African Journal of Botany*, 99, s: 80-87, 2015.
43. K. Shah, R. G. Kumar, S. Verma, and R. S. Dubey, "Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings," *Plant Science*, vol. 161(6), s: 1135–1144, 2001.
44. B. Halliwell and J. M. C. Gutteridge, *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, Oxford, UK, 2nd edition, 1989.
45. N. Smirnoff, "Antioxidant systems and plant response to the environment," in *Environment and Plant Metabolism: Flexibility and Acclimation*, Bios Scientific Publishers, s: 217–243, 1995.
46. K. J. A. Davies (2000), "Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems," *IUBMB Life*, 50(4-5), s: 279–289, 2000.
47. Y. Yamauchi, A. Furutera, K. Seki, Y. Toyoda, K. Tanaka, and Y. Sugimoto, (2008) "Malondialdehyde generated from peroxidized linolenic acid causes protein modification in heat-stressed plants," *Plant Physiology and Biochemistry*, 46(8-9), s: 786–793, 2008.
48. E. Cabisco, E. Piulats, P. Echave, E. Herrero, and J. Ros (2000), "Oxidative stress promotes specific protein damage in *Saccharomyces cerevisiae*," *Journal of Biological Chemistry*, 275(35), s: 27393–27398, 2000.
49. M. C. Romero-Puertas, J. M. Palma, M. Gómez, L. A. Del Río, and L. M. Sandalio, "Cadmium causes the oxidative modification of proteins in pea plants," *Plant, Cell and Environment*, 25(5), s: 677–686, 2002.
50. T. Grune, T. Reinheckel, and K. J. A. Davies, "Degradation of oxidized proteins in mammalian cells," *FASEB Journal*, 11(7), s: 526–534, 1997
51. T. Liu, J. Van Staden, and W. A. Cress, "Salinity induced nuclear and DNA degradation in meristematic cells of soybean (*Glycine max* (L.) roots," *Plant Growth Regulation*, 30(1), s: 49–54, 2000.

52. C. Richter, "Reactive oxygen and DNA damage in mitochondria," *Mutation Research, DNAging Genetic Instability an Aging*, 275(3-6), s: 249–255, 1992
53. C. H. Pang and B. S. Wang, "Oxidative stress and salt tolerance in plants," *in Progress in Botany*, s: 231–245, 2008.
54. Noctor, G. and Foyer, C.H. Ascorbate and Glutathione: Keeping Active Oxygen under Control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49, s: 249-279, 1998.
55. G. Noctor, S. Veljovic-Jovanovic, S. Driscoll, L. Novitskaya, and C. H. Foyer, "Drought and oxidative load in the leaves of C3 plants: a predominant role for photorespiration?" *Annals of Botany*, 89, s: 841–850, 2002.
56. P. Sharma, A. B. Jha, and R. S. Dubey, "Oxidative stress and antioxidative defense system in plants growing under abiotic Stresses," in *Handbook of Plant and Crop Stress*, M. Pessarakli, , *CRC Press*, 3, s: 89–138, 2010.
57. M. C. De Pinto and L. De Gara, "Changes in the ascorbate metabolism of apoplastic and symplastic spaces are associated with cell differentiation," *Journal of Experimental Botany*, 55(408), s: 2559–2569, 2004.
58. G. L. Wheeler, M. A. Jones, and N. Smirnoff, "The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants," *Nature*, 393(6683), s: 365–369, 1998.
59. C. H. Foyer, H. Lopez-Delgado, J. F. Dat, and I. M. Scott, "Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling," *Physiologia Plantarum*, 100(2), s: 241–254, 1997.
60. S. O. Bafeel and M. M. Ibrahim, "Antioxidants and accumulation of α -tocopherol induce chilling tolerance in *Medicago sativa*," *International Journal of Agriculture and Biology*, 10(6), s: 593–598, 2008.
61. R. Gomathi and P. Rakkiyapan, "Comparative lipid peroxidation, leaf membrane thermostability, and antioxidant system in four sugarcane genotypes differing in salt tolerance," *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry*, 3(4), s:67–74, 2011.

62. A. Michalak, "Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress," *Polish Journal of Environmental Studies*, 15(4), s: 523–530, 2006
63. P. Sharma, A. B. Jha, and R. S. Dubey, "Oxidative stress and antioxidative defense system in plants growing under abiotic Stresses," in *Handbook of Plant and Crop Stress*, M. Pessarakli, Ed., , *CRC Press*, Taylor and Francis Publishing Company, Fla, USA, 3, s:89–138, 2010.
64. L. A. Del R'io, G. M. Pastori, J. M. Palma et al, "The activated oxygen role of peroxisomes in senescence," *Plant Physiology*, 116(4), s: 1195–1200, 1998.
65. F. J. Corpas, J. M. Palma, L. M. Sandalio, R. Valderrama, J. B. Barroso, and L. A. del R'io, (2008), "Peroxisomal xanthine oxidoreductase: characterization of the enzyme from pea (*Pisum sativum* L.) leaves," *Journal of Plant Physiology*, vol. 165(13), s:1319–1330, 2008.
66. N. Mallick and F. H. Mohn, "Reactive oxygen species: response of algal cells," *Journal of Plant Physiology*, vol. 157(2), s:183–193, 2000.
67. H. Willekens, S. Chamnongpol, M. Davey et al., "Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C-3 plants," *EMBO Journal*, vol. 16(16), s: 4806–4816, 1997.
68. Caverzan, A., Passaia, G., Rosa, S.B., Ribeiro, C.W., Lazzarotto, F., Margis-Pinheiro, "Plant responses to stresses: Role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection", *Genetics and Molecular Biology*, 35(4), s: 1011-1019, 2012.
69. David J Schuller, Nenad Ban, Robert B van Huystee, Alexander McPherson and Thomas L Poulos (1996), The crystal structure of peanut peroxidase, *Elsevier Science*, 4(3), s: 311-321, 1996.
70. K. Kobayashi, Y. Kumazawa, K. Miwa, and S. Yamanaka, "ε-(γ-Glutamyl)lysine cross-links of spore coat proteins and transglutaminase activity in *Bacillus subtilis*," *FEMS Microbiology Letters*, 144(2-3), s: 157–160, 1996.

71. K. Radoti'c, T. Du'ci'c, and D. Mutavd'zi'c, "Changes in peroxidase activity and isoenzymes in spruce needles after exposure to different concentrations of cadmium," *Environmental and Experimental Botany*, 44(2), s: 105–113, 2000.
72. H. Tayefi-Nasrabadi, G. Dehghan, B. Daeihassani, A. Movafegi, and A. Samadi, "Some biochemical properties of guaiacol peroxidases as modified by salt stress in leaves of salt-tolerant and salt-sensitive safflower (*Carthamus tinctorius* L.cv.) cultivars," *African Journal of Biotechnology*, 10(5), s: 751–763, 2011.
73. Gill, S. S., Tuteja, N. (2010), "Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants", *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), s: 909-930, 2010.
74. R. Johnson, Jos T. Puthur, Seed priming as a cost effective technique for developing plants with cross tolerance to salinity stress, *Plant Physiology and Biochemistry* s: 162 247–257, 2021.
75. Tanou, G., Fotopoulos, V., Molassiotis, A, Priming against environmental challenges and proteomics in plants: update and agricultural perspectives. *Front. Plant Sci.*, 3, s: 216, 2012.
76. Chen, K., Arora, R., Dynamics of the antioxidant system during seed osmopriming, post-priming germination, and seedling establishment in Spinach (*Spinacia oleracea*). *Plant Sci.* 180 (2), s: 212–220, 2011.
77. Hossain, M.A., Burritt, D.J., Fujita, M., Cross-stress Tolerance in Plants: Molecular Mechanisms and Possible Involvement of Reactive Oxygen Species and Methylglyoxal Detoxification Systems. *Abiotic Stress Response in Plants*, s: 327-380, 2016.
78. Jisha, K.C., Puthur, J.T., Seed priming with BABA (β -amino butyric acid): a costeffective method of abiotic stress tolerance in *Vigna radiata* (L.) Wilczek. *Protoplasma* 253 (2), 277–289, 2016.
79. Wang, Z., Li, H., Li, X., Xin, C., Si, J., Li, S., et al. , Nano-ZnO priming induces salt tolerance by promoting photosynthetic carbon assimilation in wheat. *Arch. Agron Soil Sci.* 66 (9), s: 1259–1273, 2020.

80. Bilalis, D.J., Katsenios, N., Efthimiadou, A., Karkanis, A., Efthimiadis, P., Investigation of pulsed electromagnetic field as a novel organic pre-sowing method on germination and initial growth stages of cotton. *Electromagn. Biol. Med.* 31 (2), s: 143–150, 2012.
81. Araújo, S.D.S., Paparella, S., Dondi, D., Bentivoglio, A., Carbonera, D., Balestrazzi, A., Physical methods for seed invigoration: advantages and challenges in seed technology. *Front. Plant Sci.* 7, s: 646, 2016.
82. Calabrese, E.J., Hormesis: changing view of the dose-response, a personal account of the history and current status. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* 511 (3), s: 181–189, 2002.
83. Gohari, G., Alavi, Z., Esfandiari, E., Panahirad, S., Hajihoseinlou, S., and Fotopoulos, V., Interaction between hydrogen per-oxide and sodium nitroprusside following chemical priming of *Ocimum basilicum* L. against salt stress. *Physiol. Plant.* 168, s: 361–373, 2020a
84. Gohari, G., Mohammadi, A., Akbari, A., Panahirad, S., Dadpour, M. R., Fotopoulos, V., et al., Titanium dioxide nanoparticles (TiO₂ NPs) promote growth and ameliorate salinity stress effects on essential oil profile and biochemical attributes of *Dracocephalum Moldavica*. *Sci.* 10, s:912, 2020b.
85. Nazir, F., Fariduddin, Q., and Khan, T. A., Hydrogen peroxide as a signalling molecule in plants and its crosstalk with other plant growth regulators under heavy metal stress. *Chemosphere* 28(73), s: 22-38, 2020.
86. Shan, C., and Liu, R., Exogenous hydrogen peroxide up-regulates the contents of ascorbate and glutathione in the leaves of *Vigna radiata* (L) Wilczek. exposed to salt stress. *Brazil. J. Bot.* 40, s: 583–589, 2017.
87. Zhiwei Gu, D. Wang, Q. Gong, J.You, Q. Ren, H. An, Y. Z. H. Jiang (2023), ‘‘Metabolomic analysis of rapeseed priming with H₂O₂ in response to germination under chilling stress’’ *Plant Growth Regulation* , 99, s: 477–491, 2023
88. Jisha V, Dampanaboina L, Vadassery J, Mithöfer A, Kappara S, Ramanan R. , Overexpression of an AP2/ERF Type Transcription Factor OsEREBP1 Confers Biotic and Abiotic Stress Tolerance in Rice. *Plos ONE* 10(6): s: 0127831, 2015.

89. Iqbal, M. and Ashraf, M. ,Alleviation of Salinity-Induced Perturbations in Ionic and Hormonal Concentrations in Spring Wheat through Seed Preconditioning in Synthetic Auxins. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35, s: 1093-1112, 2013.
90. Jisha V, Dampanaboina L, Vadassery J, Mithöfer A, Kappara S, Ramanan R. Overexpression of an AP2/ERF Type Transcription Factor *OsEREBP1* Confers Biotic and Abiotic Stress Tolerance in Rice. *Plos ONE* 10(6): e0127831, 2015.
91. S. Thomas, A. Anand, V.Chinnusamy, A. Dahuja & S. Basu, ‘‘Magnetopriming circumvents the effect of salinity stress on germination in chickpea seeds’’ *Acta Physiologiae Plantarum*, 35, s: 3401–3411, 2013.
92. T.T. Dhanya Thomas a, Challabathula Dinakar b, Jos T. Puthur , ‘‘Effect of UV-B priming on the abiotic stress tolerance of stress-sensitive rice seedlings: Priming imprints and cross-tolerance’’ *Plant Physiology and Biochemistry*, 147, s: 21-30, 2019.
93. S. Demirbaş ve A.Balkan‘‘ Tuz Stresi Koşullarında Bazı Triticale Çeşitlerinin Hidrojen Peroksit (H₂O₂) Ön Uygulamasına Tepkileri’’ *Journal of Tekirdag Agricultural Faculty*, 15, s: 02, 2018.
94. Iqbal, A., Khalil, I.A., Ateeq, N. and Khan, M.S., Nutritional Quality of Important Food Legumes. *Food Chemistry*, 97, s: 331-335, 2006.
95. F. Toklu, F. Shahzad Baloch, T.Karaköy, H. Özkan, ‘‘Farklı priming uygulamalarının ekmeçlik buğdayın (*Triticum aestivum* L.) tohum çimlenmesi ve bazı agromorfolojik özellikleri üzerine etkileri’’ *Türk Tarım ve Ormanlık Dergisi*, 6(39), s: 1005-1013, 2015.
96. Weeraphorn Jira-anunkul, Wattana Pattanagul, ‘ Effects of hydrogen peroxide application on agronomic traits of rice (*Oryza sativa* L.) under drought stress’’ *Plant Soil Environ*, 67(4), s: 221-229, 2020.
97. G. Hemalatha, J. Renugadevi and T. Eevera,’’ Studies on Seed Priming with Hydrogen Peroxide for Mitigating Salt Stress in Rice’’ *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 6(6) s: 691-695, 2017.

98. A. Ghoohestani, Hadi Gheisary, Seyed Morteza Zahedi, Ali Dolatkhahi, ‘‘Effect of Seed Priming of Tomato with Salicylic Acid, Ascorbic Acid and Hydrogen Peroxide on Germination and Plantlet Growth in Salin Conditions’’ *International journal of Agronomy and Plant Production.* , 3, s: 700-704, 2012.
99. M. W.Mazhar, M. Ishtiaq, M. Maqbool, R. Akram, A. Shahid, S. Shokralla, Hussein Al-Ghobari, A. Alataway, A.Z. Dewidar, A. M. El-Sabroun and H. O. Elansary, ‘Seed Priming with Iron Oxide Nanoparticles’’ *Raises Biomass Production and Agronomic Profile of Water-Stressed Flax Plants* 12, s: 982, 2022.
100. Hu, Y., Ge, Y., Zhang, C., Ju, T., Cheng, W. (2009), Cadmium toxicity and translocation in rice seedlings are reduced by hydrogen peroxide pretreatment. *Plant Growth Regul.* 59, s: 51–61, 2009.
101. Manaa, A., Gharbi, E., Mimouni, H., Wasti, S., Aschi-Smiti, S., Lutts, S., Ben Ahmed, H., Simultaneous application of salicylic acid and calcium improves salt tolerance in two contrasting tomato (*Solanum lycopersicum*) cultivars. *S. Afr. J. Bot.* 95, 32–39, 2014.
102. Fedina, I.S., Nedeva, D., Çiçek, N., Pre-treatment with H₂O₂ induces salt tolerance in barley seedlings. *Biol. Plant.* 53, 321–324, 2009.
103. Andrade, C.A., de Souza, K.R.D., de Oliveira Santos, M., da , D.M., Alves, J.D., Hydrogen peroxide promotes the tolerance of soybeans to waterlogging. *Sci. Hortic.* 232, s: 40–45, 2018.
104. Sarwar, M., Saleem, M.F., Najeeb, U., Shakeel, A., Ali, S., Bilal, M.F., Hydrogen M. Bagheri et al. *Scientia Horticulturae* 243 207–213 peroxide reduces heat-induced yield losses in cotton (*Gossypium hirsutum L.*) by protecting cellular membrane damage. *J. Agro. Crop Sci.* 203, 429–441, 2017.
105. Wen, J.-F., Gong, M., Liu, Y., Hu, J.-L., Deng, M.-H. , Effect of hydrogen peroxide on growth and activity of some enzymes involved in proline metabolism of sweet corn seedlings under copper stress. *Sci. Hortic.* 164, s: 366–371, 2013.
106. Zhang, X.-L., Jia, X.-F., Yu, B., Gao, Y., Bai, J.-G., Exogenous hydrogen peroxide influences antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in cucumber leaves at low light. *Sci. Hortic.* 129, s: 656–662, 2011.

107. Ross Witham, Preliminary Thermal Studies On Young *Panulirus Argus*, *Florida Scientist*, Vol. 36 (2/4), s: 154-158, 1973.
108. Heath, R.L. and Packer, L., Photoperoxidation in Isolated Chloroplasts: I. Kinetics and Stoichiometry of Fatty Acid Peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125, 189-198.
109. Zhang, Q.F., Li, Y. W., Liu, Z. H. and Chen, Q. L.. Exposure to mercuric chloride induces developmental damage, oxidative stress and immunotoxicity in zebrafish embryos-larvae. *Aquatic Toxicology*, 181, 76-85, 2016.
110. Simonian, M.H. and Smith, J.A., Spectrophotometric and Colorimetric Determination of Protein Concentration. *Current Protocols in Molecular Biology*, 76, s:1-10, 2006.
111. Jisheng Li, Cong Shi, Xiaofeng Wang, Cuixia Liu, Xueting Ding, Peiyun Ma, Xiao Wang, Honglei Jia, Catalase and superoxide dismutase response and the underlying molecular mechanism for naphthalene, *Science of The Total Environment*, 736, 139567, 2020.
112. Livak KJ, Schmittgen TD., Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} *Methods*. 8, s:402, 2001.
113. Mohammad A. Aazami, Majid Asghari-Aruq, Mohammad B. Hassanpouraghdam, S. Ercisli, M. Baron and J. Sochor (2021), Low Temperature Stress Mediates the Antioxidants Pool and Chlorophyll Fluorescence in *Vitis vinifera* L. Cultivars, *Journal: Plants*, 10, 1877, 2021.
114. Diego A. Meloni, Marco A. Olivai, Carlos A. Martinez, Jose' Cambraia, Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress, *Environmental and Experimental Botany* 49 s: 69-76, 2003.
115. Huipeng Yao, Chenglei Li, Haixia Zhao, Jianlan Zhao, Hui Chen, Tongliang Bu, Wang Anhu, Qi Wu, Deep sequencing of the transcriptome reveals distinct flavonoid metabolism features of black tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.), *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 124, s: 49-60, 2017.

116. M. Asgher, S. Ahmed, Zebus Sehar, H. Gautam, S. G. Gandhi, Nafees A. Khan, Hydrogen peroxide modulates activity and expression of antioxidant enzymes and protects photosynthetic activity from arsenic damage in rice (*Oryza sativa L.*) *Journal of Hazardous Materials*, 401, 123365, 2021.
117. Z. Bagheri, A. A. Talebi, S. Asgari, M. Mehrabadi, Wolbachia induce cytoplasmic incompatibility and affect mate preference in *Habrobracon hebetor* to increase the chance of its transmission to the next generation, *Journal of Invertebrate Pathology*, 163, s:1-7, 2019.
118. P. Costa Conceic Silva, A. D. Azevedo Neto, H. R. Gheyia, R. F. Ribasc, C. R. R. Silvad, and A. M. W., Seed priming with H₂O₂ improves photosynthetic efficiency and biomass production in sunflower plants under salt stress *Cova Arid Land Research And Management*, 36(3), s: 283–297, 2022.
119. Zulfiqar U, Jiang W, Xiukang W, Hussain S, Ahmad M, Maqsood MF, Ali N, Ishfaq M, Kaleem M, Haider FU, Farooq N, Naveed M, Kucerik J, Brtnicky M and Mustafa A, Cadmium Phytotoxicity, Tolerance, and Advanced Remediation Approaches in Agricultural Soils; A Comprehensive Review. *Front. Plant Sci.* 13, 773815, 2022.
120. A. M. R. Hamed, I. R. Abdel-Shafi, M. D. A. Elsayed, A. M. Mahfoz, S. E. Tawfeek and M. S. A. , Abdeltawab Investigation of the effect of curcumin on oxidative stress, local inflammatory response, COX-2 expression, and microvessel density in *Trichinella spiralis* induced enteritis, myositis and myocarditis in mice, *Sciendo*, 59, s: 18 – 36, 2022.
121. Yang Gao, Pei Zhou, Liang Mao, Yueer Zhi, Chunhua Zhang, Wanjun Shi, Effects of plant species coexistence on soil enzyme activities and soil microbial community structure under Cd and Pb combined pollution, *Journal of Environmental Sciences*, 22(7), s: 1040-1048, 2010.
122. Zhang, H., Si, X., Ji, X. et al., Genome editing of upstream open reading frames enables translational control in plants. *Nat Biotechnol* 36, s: 894–898, 2018.
123. Pavel Kercheva, Tom van der Meer, Neerakkal Sujeethe, Arno Verleef, Christian V. Stevensf, Frank Van Breusegem, Tsanko Gechev, Molecular priming as an

- approach to induce tolerance against abiotic and oxidative stresses in crop plants, *Biotechnology Advances*, 40, 107503, 2020.
- 124.M. Kar, Heavy Metals Accumulation in Vegetables Irrigated with Different Water Sources and Their Human Daily Intake in, *J. Agr. Sci. Tech.* , 20, s: 401-415, 2018.
125. F. Nazir, Q. Fariduddin, T. Alam Khan, Hydrogen peroxide as a signalling molecule in plants and its crosstalk with other plant growth regulators under heavy metal stress, *Chemosphere*, 252, 126486, 2020.
- 126.Gomez, M.I., McLaughlin, E.W. and Wittink, D.R. , Customer Satisfaction and Retail Sales Performance: An Empirical Investigation. *Journal of Retailing*, 80, s: 265-278, 2004.
127. Yang Gao, Pei Zhou, Liang Mao, Yueer Zhi, Chunhua Zhang, Wanjun Shi, Effects of plant species coexistence on soil enzyme activities and soil microbial community structure under Cd and Pb combined pollution, *Journal of Environmental Sciences*, 22(7), s: 1040-1048, 2010.
128. C. Tao, X. Jin, L. Zhu, Q. Xie, X. Wang, Genome-wide investigation and expression profiling of APX gene family in *Gossypium hirsutum* provide new insights in redox homeostasis maintenance during different fiber development stages. *Mol Genet Genomics* 293, s: 685–697, 2018.
129. Afrin S, Tahjib-Ul-Arif M, Sohag AAM, Polash MAS, Hossain MA., Hydrogen peroxide priming alleviates chilling stress in rice (*Oryza sativa L.*) by enhancing oxidant scavenging capacity, *Fundamental and Applied Agriculture* 4(1), s: 713–722, 2019.
- 130.Bagheri, M., Gholami, M., and Baninasab, B., Hydrogen peroxide induced salt tolerance in relation to antioxidant systems in pistachio seedlings. *Sci. Hortic.* 243, s: 207–213, 2019.
131. Shi, W., Wang, L., Yao, L. et al., Spatially patterned hydrogen peroxide orchestrates stomatal development in *Arabidopsis*. *Nat Commun* 13, 5040, 2022.
- 132.Rossatto, T. do Amaral, M.N. Benitez, L.C. Vighi, I.L. Braga, E.J.B. de Magalhaes Junior, A.M. Maia, M.A.C. and da Silva Pinto, L., Gene expression and activity of

antioxidant enzymes in rice plants, cv. BRS AG, under saline stress. *Physiology and Molecular Biology of Plants: An International Journal of Functional Plant Biology* 23(4), s: 865–875, 2017.

