

**Atf İçin:** Türkhan A, Kaya ED, Sarı S, Tohumcu F, Özden E, 2021. Farklı Tuzluluk Sınıfındaki Topraklarda Yetiştirilen Domates Tohumlarında Bazı Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi. Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 11(Özel Sayı): 3406-3415.

**To Cite:** Türkhan A, Kaya ED, Sarı S, Tohumcu F, Özden E, 2021. Determination of Some Antioxidant Enzyme Activities in Tomato Seeds Grown in Soils of Different Salinity Classes. Journal of the Institute of Science and Technology, 11(Special Issue): 3406-3415.

### Farklı Tuzluluk Sınıfındaki Topraklarda Yetiştirilen Domates Tohumlarında Bazı Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

Ayşe TÜRKHAN<sup>1</sup>, Elif Duygu KAYA<sup>2</sup>, Serdar SARI<sup>3</sup>, Faruk TOHUMCU<sup>3</sup>, Eren ÖZDEN<sup>4</sup>

**ÖZET:** Toprak tuzluluğu bitkisel üretimde verim kaybına yol açmakla birlikte doğrudan veya dolaylı olarak tohum verim ve kalitesini de etkilemektedir. Iğdır ovası yazları sıcak ve kurak geçmesi, yıllık ortalama yağış miktarının Türkiye ortalamasının altında olması ve taban suyu yüksekliği nedeniyle yüksek tuzlanma potansiyeli taşımaktadır. Bu durum hali hazırda ovanın bir kısım topraklarının tarım dışı kalmasına yol açmıştır. Bu çalışma ile Iğdır üniversitesi Tarımsal Uygulama ve Araştırma Merkezinde bulunan altı farklı toprak tuzluluğuna sahip alanlarda iki yıl hasat edilmiş ‘Süper domates’ genotiplerinde bazı antioksidan enzim aktiviteleri belirlenmeye çalışılmıştır. Ayrıca çalışma sırasında SOD, KAT ve APX enzim aktiviteleri spektrofotometrik olarak belirlenen tohumlarda doğal poliakrilamid jel elektroforezleri (Doğal PAGE) ayrı ayrı yapılmıştır. Her bir enzim için elektroforez sonrası jellere substrat boyama yapılarak enzimlerin varlığı gösterilmiştir. Elde edilen veriler ışığında tuzlu-alkali topraklarda hasat edilen tohumlarda protein aktivitesi düşük belirlenmişken, en yüksek protein aktivitesi tuzlu topraklardan alınan tohumlarda belirlenmiştir. Toprak tuzluluğunun bitkide oluşturduğu tuz stresi ile tuzlu-alkali alanlarda SOD ve KAT enzim aktiviteleri en yüksek bulunmuşken, normal topraklardan hasat edilen topraklarda SOD ve KAT aktiviteleri daha düşük hesaplanmıştır. APX enzim aktivitelerinde ise normal toprak koşullarında tuzlu-alkali toprak koşullarına doğru aktivitenin arttığı gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlar toprak tuzluluğu ve alkaliliğine bağlı olarak bitkide tuz stresinin şiddeti arttıkça hasat edilen tohumlardaki antioksidan enzim aktivitelerinin de arttığını göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** APX, KAT, SOD, Doğal-PAGE, *Solanum lycopersicon*, toprak tuzluluğu, tuz stresi

#### Determination of Some Antioxidant Enzyme Activities in Tomato Seeds Grown in Soils of Different Salinity Classes

**ABSTRACT:** Soil salinity causes yield loss in plant production, but also directly or indirectly affects seed yield and quality. Iğdır plain has a high salinization potential due to hot and dry summers, low annual average rainfall for Turkey, and high groundwater. This situation has already caused some lands of the plain to be out of agriculture. In this study, it was tried to determine some antioxidant enzyme activities in ‘Süper domates’ genotypes harvested for two years in six different soil salinity areas in Iğdır University Agricultural Application and Research Center. In addition, Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Native-PAGE) was performed separately on the seeds whose SOD, CAT and APX enzyme activities were determined spectrophotometrically during the study. After electrophoresis for each enzyme, the presence of enzymes was demonstrated by performing substrate staining on the gels. In the light of the data obtained, while the protein activity was low in the seeds harvested in saline alkaline soils, the highest protein activity was determined in the seeds taken from saline soils. SOD and CAT enzyme activities were found to be highest in salt stress caused by soil salinity in the plant and in saline-alkaline areas, while SOD and CAT activities were calculated lower in soils harvested from normal soils. In the APX enzyme activities, it was observed that the activity increased from normal soil to saline-alkaline soil conditions. The results showed that the antioxidant activity in the harvested seeds increased as the severity of salt stress increased in the plant depending on the soil salinity and alkalinity.

**Keywords:** APX, CAT, SOD, Native-PAGE, *Solanum lycopersicon*, soil salinity, salt stress

<sup>1</sup> Ayşe TÜRKHAN ([Orcid ID: 0000-0002-2195-9435](https://orcid.org/0000-0002-2195-9435)) Iğdır Üniversitesi, Iğdır Teknik Bilimler Meslek Yüksekokulu, Kimya ve Kimyasal İşleme Teknolojileri Bölümü, Iğdır, Türkiye

<sup>2</sup> Elif Duygu KAYA ([Orcid ID: 0000-0003-1203-979X](https://orcid.org/0000-0003-1203-979X)) Iğdır Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Iğdır, Türkiye

<sup>3</sup> Serdar SARI ([Orcid ID: 0000-0002-9990-7918](https://orcid.org/0000-0002-9990-7918)) Iğdır Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Toprak Bilimi ve Bitki Besleme Bölümü

<sup>3</sup> Faruk TOHUMCU ([Orcid ID: 0000-0003-4092-4868](https://orcid.org/0000-0003-4092-4868)) Iğdır Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Toprak Bilimi ve Bitki Besleme Bölümü

<sup>4</sup> Eren ÖZDEN ([Orcid ID: 0000-0001-7507-9815](https://orcid.org/0000-0001-7507-9815)) Iğdır Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Eren ÖZDEN, e-mail: eren.ozden@igdir.edu.tr

Makale 15-17 Kasım 2021 tarihlerinde Iğdır’da online olarak düzenlenen “Uluslararası Katılımlı Türkiye 7. Tohumculuk Kongresi’nde Sözlü Sunum olarak sunulmuştur.

## GİRİŞ

Ülkemizde ve dünyada hızla artan nüfus beraberinde gıdaya olan ihtiyacı her geçen gün artırmaktadır. Yoğun nüfus artışı, su kaynaklarının ve tarım alanlarının azalmasına neden olmaktadır. Tarımsal üretimde verimi artırmak için kullanılan kimyasallar nedeniyle tarım alanları kirlenmekte ve verimsizleşmektedir (Dere, 2021).

Tuzluluk, özellikle kurak ve yarı kurak iklim bölgelerinde yıkama sonucu yeraltı suyuna karışan çözünabilir tuzların yüksek taban suyuyla birlikte toprak yüzeyine çıkması ve ardından buharlaşma sonucu suyun topraktan ayrılarak tuzun toprak yüzeyinde veya yüzeye yakın bölümünde birikmesi olayı olup abiyotik stres faktörleri olarak bilinen olumsuz çevre koşullarının yarattığı sınırlandırıcı etkilerin en başta gelenlerinden birisidir (Patel ve ark., 2002; Rogers, 2002; Demir, 2009). Abiyotik bir faktör olan toprak tuzluluğu, doğal ve yapay olarak iki şekilde ortaya çıkmaktadır. Doğal tuzluluğun sebepleri arasında drenaj problemleri, yağışlar ile tuzların taşınması ve yer altındaki tuzların yükselmesi nedenleri sayılabilmektedir. Yapay tuzluluk probleminin sebepleri ise sulama, gübreleme, sulama suyu kalitesi, bilinçsiz otlatmadır (Karaoğlu ve Yalçın, 2018; Korkmaz, 2021).

Tuz stresi dünyada her yıl çok büyük ekonomik zararlara neden olmaktadır ve ülkemiz topraklarının yaklaşık %5.5'i gibi büyük bir kısmı tuzluluk tehdidi ile karşı karşıyadır (Temel ve Şimşek, 2011). Bu durum, ürün verimi ve kalitesindeki azalmaya bağlı olarak büyük ekonomik kayıplara da yol açabilmektedir. 2030 yıllarda kuru ve sıcak bir iklim dalgasının Güney Avrupa'yı ki burası Türkiye'yi de içine alan bölgede oldukça etkili olacağı ve bitkisel üretimi olumsuz yönde etkileyeceği tahmin edilmektedir (Talhouni ve ark., 2017).

Tuz stresi oldukça karmaşık bir şekilde çalışarak birçok metabolik aktiviteyi etkilemektedir. Bitkiler için atmosferik oksijen ( $O_2$ ) düzeyi oldukça önemlidir.  $O_2$  normal koşullar altında bitki büyümesi ve gelişmesi için gerekli iken, konsantrasyonu gereğinden fazla arttığı zaman, ölüm ile sonuçlanabilecek hücrel hasarlar oluşmasına neden olabilir (Çulha ve Çakırlar, 2011). Ozmotik değişim sonucunda su noksanlığı oluşmakta ve bu noksanlık süperoksit ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), hidroksil radikalleri ( $OH^{\cdot}$ ) ve tekil oksijen ( $^1O_2$ ) gibi çeşitli reaktif oksijen türlerinin oluşumuna neden olmaktadır. Reaktif oksijen türleri, stres şartlarında kloroplast ve mitokondrilerde meydana gelen metabolik reaksiyonlar sonucu ve hücrede membran lipitleri, nükleik asitler, proteinler, klorofiller ve diğer makro moleküllere zarar vermektedir (Mittler, 2002; Apel ve Hirt, 2004; Çulha ve Çakırlar, 2011). Bitkiler, tuz stresi ile meydana getirilen Reaktif oksijen türlerinden hücreyi korumak için, askorbat, glutatyon,  $\alpha$ -tokoferol, karotenoidler gibi antioksidanları ve katalaz (KAT), Askorbat peroksidaz (APX), glutatyon redüktaz (GR), süperoksit dismutaz (SOD) gibi antioksidatif enzimleri kullanmaktadırlar (Chen ve Murata, 2002; Yaşar ve ark., 2008).

Türkiye, elverişli iklim koşulları sayesinde çeşitli meyve ve sebzelerin küresel üretim ve ihracatında önemli bir role sahiptir. Domates, Türkiye'de yerli sebze üretiminin %40'ından fazlasını karşılayan, iç piyasada yaygın olarak tüketilen ve gıda sanayisine hammadde sağlayan önemli bir üründür (Keskin, 2021). Dünyada yaklaşık 51 milyon dekar alanda 177 milyon ton domates üretimi yapılırken, ülkemizde yaklaşık 1.7 milyon dekar alanda 12.2 milyon ton domates üretimi yapılmaktadır (FAO, 2020). Buda domatesin Dünya'da ve ülkemizde en fazla üretimi yapılan ve ekonomik büyüklüğü olan sebzeler arasında olduğunu göstermektedir (Nangare ve ark., 2016; Cui ve ark., 2020). Abiyotik stres faktörleri olan, tuzluluk, kuraklık, ağır metal, düşük ve yüksek sıcaklık gibi etkenlerden domates olumsuz etkilenmektedir (Shao ve ark., 2015; Dere ve Daşgan, 2019; Dere, 2021).

Birçok çalışmada, antioksidan savunma sistemlerinin bitki tuz toleransının belirlenmesinde hayati bir role sahip olduğu bilinmektedir. Antioksidanlar, bitki hücrelerinin optimum sağlığını korumak için

kritik öneme sahiptir (Ali ve Alquainy, 2006). Antioksidan koruma sistemi, enzimatik [Süperoksit dismutaz (SOD), peroksidaz (POX) ve katalaz (CAT)] ve enzimatik olmayan [askorbik asit (AsA), salisilik asit, tokoferol, glutatyon (GSH) ve karotenoidler] moleküllere bağlıdır ve bu moleküller sayesinde ROT'ların zararlı etkileri bloke edilir (Chen ve Murata, 2002). Bitkilerde reaktif oksijen türlerinin temizlenmesinde rol oynayan antioksidan enzimlerin oksidatif strese maruz kaldıklarında arttığı kabul edilmektedir (Ozden ve ark., 2021). Bu tür enzimler arasında superoxide dismutase, (SOD; EC 1.15.1.1), katalaz (CAT; EC 1.1.1.6) ve askorbat peroksidaz (APX; EC 1.11.1.11)'de bulunur (Kapoor ve ark., 2019).

Oksijeni metabolize eden bütün hücrelerde bulunan süperoksit dismutaz [(SOD), süperoksit oksidoredüktaz, EC 1.15.1.1], süperoksidin hidrojen perokside dismutasyonunu katalizleyen metalloenzimdir. Organizmalarda serbest radikallere karşı ilk savunma süperoksit dismutaz ile gerçekleşmektedir (Blokhina ve ark., 2003). SOD, Süperoksidin daha az toksik olan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'ye dönüşümünü katalizler (Karadağ, 2013). Katalaz (KAT), (Hidrojen Peroksit; Hidrojen peroksit oksidoredüktaz, (EC.1.11.1.6), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin su ve oksijene indirgenmesini katalizleyen, tetramerik demir porfirin içeren yüksek molekül ağırlıklı bir antioksidan enzimdir (Brown-Peterson ve Salin 1993; Gonçalves ve ark., 1999; Chaudiere ve Ferrari-Iliou, 1999). Katalaz, moleküler O<sub>2</sub> varlığında metabolizmanın bazı kademelerinde sentezlenen, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> radikalliğini gidererek özellikle membranlarda oluşturabileceği geri dönüşümsüz hasarları engellemektir (Karadağ, 2013). Askorbat peroksidaz fotosentez sırasında meydana gelen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 'nin uzaklaştırılmasında CAT'a yardımcı olurlar. APX, askorbatı elektron vericisi olarak kullanır ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'i suya indirger. APX, birçok organizmada ROT'a karşı oluşturulan savunmada önemli bir rol üstlendiği bilinen enzimatik antioksidanlardandır (Demiral, 2003; Karadağ, 2013).

Çalışmamızda farklı toprak tuzluluk değerlerine sahip topraklarda yetiştirilen domates bitkilerinden alınan tohumlarda stres koşullarında bitki savunma mekanizmasında görev alan bazı antioksidan enzim aktiviteleri spektrofotometre kullanılarak hesaplanmış ve elektrofotometrik olarak gösterilmiştir.

## MATERYAL VE METOT

### Bitkisel Materyal

Bu çalışma Iğdır üniversitesi Tarımsal Uygulama ve Araştırma Merkezinde bulunan altı farklı toprak tuzluluğuna sahip alanda iki üretim sezonu yürütülmüştür. Domates çeşidi olarak Iğdır ovasında yoğun bir kullanım alanı bulunan yerel genotip 'Süper domates' kullanılmıştır. Domates fideleri tesadüf blokları deneme desenine göre dikilmişlerdir. Sulama hafta bir kez olarak yapılmış, ekim öncesi toprak işlemeyle beraber DAP gübresi (~18.4 kg/da) verilmiş, fide dikiminden sonraki 2 ve 4. haftalarda çapa ve boğaz doldurma işlemleri yapılmıştır. Bunların dışında bitkilerin yetiştirilmesi süresi boyunca gübreleme, budama ve çapalama gibi herhangi teknik bir işlem yapılmamıştır. Tohum alımı amacıyla meyveler olgun meyvelerden tek seferde üçüncü hasat döneminde yapılmıştır.

### Kimyasal Sarf Materyal

Deneylerde kullanılan kimyasal sarf malzemeler; bovine serum albümin, coomassie brilliant blue G-250, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O, NBT (nitro blue tetrazolium kloridin), askorbat, xhantine, EDTA, xanthine oxidase, akrilamid, TEMED, Tris, sodyum asetat, potasyum fosfat Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir.

## Toprak Analizi

Tohumların hasat edildiği bitkilerin yetiştirildiği toprak özellikleri yapılan toprak analizi sonuçlarına bakıldığında U1 ve U2 normal, U3 ve U4 tuzlu, U5 ve U6 tuzlu alkali sınıfına ait olduğu görülmüştür (Çizelge 1).

**Çizelge 1.** Tohumların hasat edildiği bitkilerin yetiştirildiği toprak özellikleri

Bölgeler	pH (Saturasyon.Ekstraktı)	EC (mS cm <sup>-1</sup> )	ESP (%)	Tuzluluk Sınıfı
U1	8.29	0.67	3.7	Normal
U2	8.21	2.55	4.7	Normal
U3	8.37	7.45	11.9	Tuzlu
U4	8.41	4.65	6.4	Tuzlu
U5	8.64	7.66	18.7	Tuzlu-Alkali
U6	10.14	11.87	50.6	Tuzlu-Alkali

## Enzim Ekstraktı Hazırlanması

Özkan ve arkadaşları (2000) yöntemi modifiye edilerek kullanılmıştır. Farklı tuzluluk değerlerine sahip topraklarda yetiştirilen domates bitkilerinden elde edilen tohumlardan 0.5 gram tartılarak 10 mL, 50 mM fosfat tamponu (pH 7.0) içerisinde homojenatörde parçalanmıştır. Numune 4 katlı tülbentten süzülüş ve elde edilen süzüntü 4 °C' de, 10.000 rpm'de 1 saat santrifüj edilip, elde edilen süpernatant enzim ekstraktı olarak kullanılmıştır (Özkan ve ark., 2000)

## Protein tayini

Protein miktarları Bradford yöntemiyle belirlenmiştir. Standart grafiğin hazırlanmasında 1 mg mL<sup>-1</sup> sığır serum albumininden hazırlanan (BSA)(0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 ve 1 mg mL<sup>-1</sup>) konsantrasyonları kullanılmıştır (Bradford, 1976).

## Katalaz (KAT) Aktivitesi

Katalaz aktivitesi spektrofotometrik yöntemle belirlenmiştir. 3 mL kuvarz kuvet içinde 25 °C'de 2 mL 30 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisi, 0.9 mL 50 mM fosfat (pH 7.0) tamponu ve 0.1 mL enzim çözeltisi karışımının 240 nm ( $\epsilon=43.6$ ) absorbanstai azalma  $\pm 0.001$  hassasiyetle kaydedilmiştir (Aebi, 1984; Dinçer, 2005). Bir ünite enzim, bir dakikada 1 mL'de 1  $\mu$ mol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in bozunması için gerekli olan enzim miktarı olarak belirlenmiştir. Spesifik aktivite, mg protein başına aktivite olarak belirlenmiştir.

## Askorbat Peroksidaz (APX) Aktivitesi

Askorbat peroksidaz (EC 1.11.1.11) aktivitesi Nakano ve Asada (1981)'nin önerdiği yöntemle belirlenmiştir. 1.6 mL 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7.0), 0.2 mL enzim ekstresi, 0.2 mL 0.5 mM askorbat ve 0.2 mL 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeren reaksiyon karışımının absorbanstaidaki azalma, askorbik asidin okside olmasına bağlı olarak, 290 nm'de 2 dakika boyunca 10 sn aralıklarla kaydedilmiştir. Toplam APX aktivitesi, askorbatın ekstinksiyon katsayısı (2800 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>) kullanılarak U mg<sup>-1</sup> protein olarak hesaplanmıştır. APX aktivitesi dakikada okside olan 1  $\mu$ mol ml<sup>-1</sup> askorbat olarak ifade edilmiştir.

## Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi

Süperoksit Dismutaz (SOD) enzim aktivitesi Sun ve ark. (1988) tarafından geliştirilen metot kullanılarak ölçülmüştür. Reaksiyon çözeltisini 30  $\mu$ L 0.6 mM Ksantin, 20  $\mu$ L 0.6 mM EDTA, 30  $\mu$ L 150 mg l<sup>-1</sup> NBT, 10  $\mu$ L 400 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 10  $\mu$ L 1 mg mL<sup>-1</sup> Sığır serum albümin, 0.166 U/mL Xanthine oxidase (Stoktan seyreltme yapılacaksa 2 M amonyum sülfat kullanılır.), 0.8 mM CuCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O ve 100  $\mu$ L enzim ekstraktı oluşturmuştur. Kör enzim dışındaki çözeltilerden oluşmaktadır. 20 dakika 25°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 50  $\mu$ L CuCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O eklenerek reaksiyon durdurulmuş hem kör tüpü hem de numune tüpü saf suya karşılık 560 nm de absorbanstai okunmuştur. İnkübasyon esnasına

NBT'nin redüksiyon hızındaki %50'lik inhibisyon 1 SOD ünitesi olarak ifade edilmiştir. Hesaplamalar için aşağıdaki formüller kullanılmıştır. Spesifik aktivite, mg protein başına aktivite olarak belirlenmiştir.

### **Doğal Poliakrilamid Jel Elektrofrez (Doğal-PAGE)**

Doğal PAGE jeller Laemmli (1970) tarafından tarif edildiği gibi hazırlanmıştır.

### **Katalaz (KAT) (DOĞAL-PAGE)**

Katalaz enzimi için Doğal-PAGE, SDS içermeyen %5'lik yükleme jeli ve %10'luk ayırma jeli kullanılarak yapılmıştır. Jeller hazırlandıktan sonra tanka yerleştirilmiş. Daha sonra tank doğal-PAGE yürütme tamponu ile doldurulmuştur. Doğal PAGE Yükleme Çözeltisi ile karıştırılan örnekler şırınga yardımıyla kuyucuklara yüklenmiş ve elektroforez ünitesi buz dolu bir kabın içine yerleştirilmiştir. Ve boya yığıma jelinden ayrılana kadar 30 mA'de daha sonra 50 mA'de çalıştırılarak yürütülmüştür. Elde edilen jel 3'er kez saf suda 10'ar dakika inkübe edilmiştir. 0.97 mM 100 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisinde 10 dk inkübe edilmiştir. Ardından jellerden H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uzaklaşması için saf suyla yıkanmış. Jelleri boyamak için taze hazırlanmış %2'lik FeCl<sub>3</sub>, %2'lik K<sub>3</sub>FeCN<sub>6</sub> çözeltilerinin karışımına eklenmiş jeller yeşil rengi gördüğü gibi saf suyla yıkanmıştır (Woodbury ve ark., 1971; Wayne ve Diaz, 1986; Dinçer, 2005). Jellerin görüntüsü alınmıştır.

### **Askorbat Peroksidaz (APX) (DOĞAL-PAGE)**

Askorbat peroksidazı doğal-PAGE'i Mittler ve Zilinkas (1993)'ın yöntemine göre belirlenmiştir. Doğal-PAGE, SDS içermeyen %5'lik yükleme jeli ve %10'luk ayırma jeli kullanılarak yapılmıştır. Jeller hazırlandıktan sonra tanka yerleştirilmiştir. Jeller örnekler yüklenmeden önce 2mM askorbat içeren tamponda 4 °C'de 30 dakika yürütülmüştür. Doğal PAGE yükleme çözeltisi ile karıştırılan örnekler şırınga yardımıyla kuyucuklara yüklenmiştir ve elektroforez ünitesi buz dolu bir kabın içine yerleştirilmiştir. Ve boya yığıma jelinden ayrılana kadar 30 mA'de daha sonra 50 mA'de çalıştırılarak yürütülmüştür. Yürütme işlemi bittikten sonra jeller 2 mM askorbat içeren 50 mM potasyum fosfat tamponunda (pH 7.0) 20 dakika inkübe edilmiştir. Ardından 4 mM askorbat ve 2 mM hidrojen peroksit içeren 50 mM potasyum fosfat tamponunda (pH 7.0) 20 dakika bekletilmiştir. Daha sonra jeller tamponla 1 dakika yıkanmış ve 28 mM TEMED ve 2.5 mM NBT içeren 50 mM potasyum fosfat tamponuna alınmış ve ışıktaki 10-20 dakika bekletilmiştir (Yıldızıtugay, 2011). Jellerin görüntüsü alınmıştır.

### **Süperoksit Dismutaz (SOD)(DOĞAL-PAGE)**

Süperoksit dismutazın doğal-PAGE'i Beauchamp ve Fridovich (1971)'e göre riboflavin ve NBT boyamasıyla yapılmıştır. Doğal-PAGE, SDS içermeyen %5'lik yükleme jeli ve %10'luk ayırma jeli kullanılarak yapılmıştır. Jeller hazırlandıktan sonra tanka yerleştirilmiştir. Daha sonra tank doğal-PAGE yürütme tamponu ile doldurulmuştur. Doğal PAGE Yükleme Çözeltisi ile karıştırılan örnekler şırınga yardımıyla kuyucuklara yüklenmiş ve elektroforez ünitesi buz dolu bir kabın içine yerleştirilmiştir. Ve boya yığıma jelinden ayrılana kadar 30 mA'de daha sonra 50 mA'de çalıştırılarak yürütülmüştür. Jel yürütme işlemi bitince jeller 1.22 mM 50 mL NBT içinde 45 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra jeller pH 7.0 fosfat tamponu içinde hazırlanmış 0.0265 mM riboflavin ve 28 mM TEMED içerisinde bantlar belirene kadar bekletilmiş ve jeller görüntülenmiştir.

### **İstatiksel Analiz**

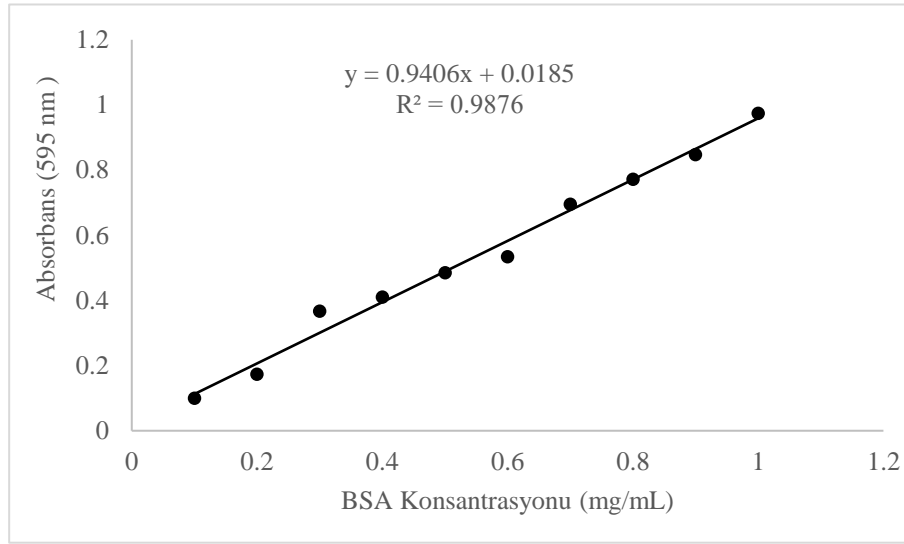
Farklı toprak tuzluluğuna sahip alanlardan hasat edilen domates tohumlarının antioksidan enzim aktivitelerindeki istatistik farklılık JMP 14 paket programı kullanılarak DUNCAN çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir.

## BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu çalışma Iğdır Üniversitesi Tarımsal Uygulama ve Araştırma Merkezinde bulunan altı farklı toprak tuzluluğuna sahip alanda iki üretim sezonu yürütülmüştür. Domates çeşidi olarak Iğdır ovasında yoğun bir kullanım alanı bulunan yerel genotip 'süper domates' kullanılmıştır. Bu altı bölgenin toprak analizi yapılmıştır. Domateslerin tohumları enzim ekstraktı hazırlanması yönteminde bahsedildiği gibi hazırlanmıştır. Her bir tohum için SOD, KAT ve APX antioksidan enzimleri aktiviteleri spektrofotometrik olarak belirlenmiş ve elektroforetik olarak enzimlerin varlığı gösterilmiştir.

### SOD, KAT, APX Aktiviteleri ve Protein Miktarlarının Belirlenmesi

2019, 2020 yıllarında 2 yıllık dönemde altı farklı toprak tuzluluğunda yetiştirilmiş domateslerden elde edilen tohumlardaki SOD, KAT, APX aktiviteleri ve protein miktarları aşağıdaki tabloda verilmiştir (Çizelge 2, Çizelge 3). Örneklerdeki protein miktarı tayininde kullanılan standart grafik Şekil 1. ile gösterilmiştir.



Şekil 1. Protein standart grafiği (1mg/ml BSA)

Çalışmamızdan elde edilen veriler ışığında farklı toprak tuzluluklarında hasat edilen tohumlarda protein içeriği açısından istatistik açıdan farklılık bulunmakla beraber, toprak sınıflarına göre farklılık görülmemiştir.

### Çizelge 2. 2019 yılı hasat edilen domates tohumlarında bazı antioksidan enzim aktiviteleri

Bölgeler	SOD EU/mg protein	KAT EU/mg protein	APX EU/mg protein	Protein mg/0,5 gram tohum
U1	0.445e	0.953d	0.0013c	342.2a
U2	0.629c	1.842b	0.0012c	220.8b
U3	0.518d	1.880b	0.0014bc	217.2b
U4	0.409e	1.245c	0.0016b	334.9a
U5	0.700b	2.129a	0.0026a	213.4b
U6	0.982a	2.393a	0.0023a	136.8c

$P \leq \%0.5$  'e göre önemli olduğunu göstermektedir.

2019 yılında istatistiki olarak en yüksek protein içeriği U1 ve U4 alanlarından alınan tohumlarda tespit edilmişken, 2020 yılında istatistiki olarak en yüksek protein içeriği U2 ve U4 alanlarından alınan tohumlarda belirlenmiştir. Ancak 2019 yılında en düşük protein içeriği istatistik açıdan U6 alanından alınan tohumlarda, 2020 yılında ise U1 ve U6 alanından alınan tohumlarda belirlenmiştir (Çizelge 2, Çizelge 3). Benzer olarak Durukan, (2011) yaptığı çalışmada, farklı konsantrasyonlarda tuz stresi uygulanmış haşhaş (*Papaver somniferum* L) çeşitlerinden elde edilen tanelerde, tuz stresi uygulamalarının genel olarak toplam protein miktarlarında azalmalara neden olduğu bildirilmiştir.

**Çizelge 3.** 2020 yılı hasat edilen domates tohumlarında bazı antioksidan enzim aktiviteleri

Bölgeler	SOD EU/mg protein	KAT EU/mg protein	APX EU/mg protein	Protein mg/0.5 gram tohum
U1	0.227e	1.057c	0.0009d	140.0d
U2	0.387d	1.055c	0.0014c	375.4a
U3	0.405cd	1.666b	0.0016c	271.2c
U4	0.544b	2.476a	0.0013c	381.7a
U5	0.462c	1.357bc	0.0024b	330.1b
U6	0.665a	2.757a	0.0034a	148.1d

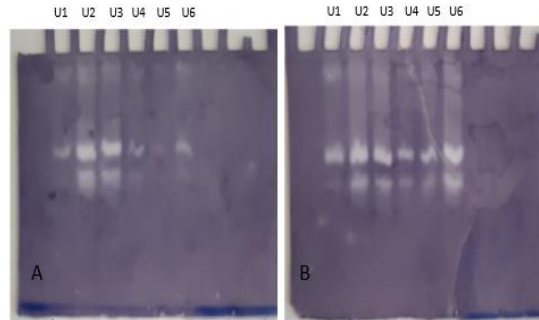
$P \leq \%0.5$  'e göre önemli olduğunu göstermektedir.

Stress koşullarında oluşan ROT'ların oksidatif hasarını ortadan kaldırmak için bitkide var olan antioksidan enzimlerin aktivitelerinin arttığı birçok çalışmada bildirilmektedir. Birçok araştırmacı farklı bitkisel kaynaklarda tuzun zararlarından kurutulmak için antioksidan enzim aktivitelerinde oluşan değişimleri incelemiştir (Yaşar ve ark., 2008; Durukan, 2011).

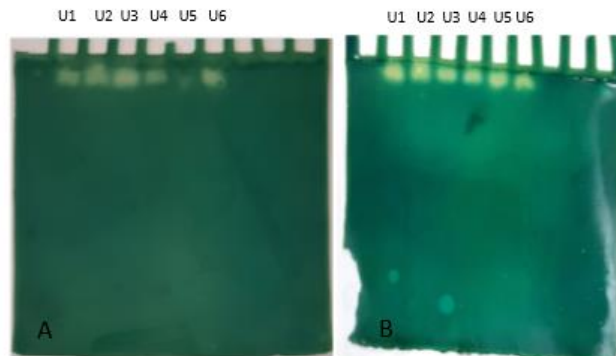
SOD, KAT ve APX enzim aktivitelerinin her üçü de toprak tuzluluğuna göre istatistiki olarak önemli bulunmuştur. Çalışmamızda toprak tuzluluğunun bitkide oluşturduğu tuz stresi ile tuzlu-alkali alanlarda SOD ve KAT enzim aktiviteleri en yüksek bulunmuşken, normal topraklardan hasat edilen topraklarda SOD ve KAT aktiviteleri daha düşük hesaplanmıştır. APX enzim aktivitelerinde ise normal toprak koşullarında tuzlu-alkali toprak koşullarına doğru aktivitenin arttığı gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlar toprak tuzluluğu ve alkaliliğine bağlı olarak bitkide tuz stresinin şiddeti arttıkça hasat edilen tohumlardaki antioksidan enzim aktivitelerinin de arttığını göstermiştir. Benzer çalışmalar literatürde gösterilmiştir (Bor ve ark., 2003; Li, 2009; Yıldıztuğay, 2011; Sharma ve ark., 2013).

### SOD, KAT ve APX Doğal-PAGE

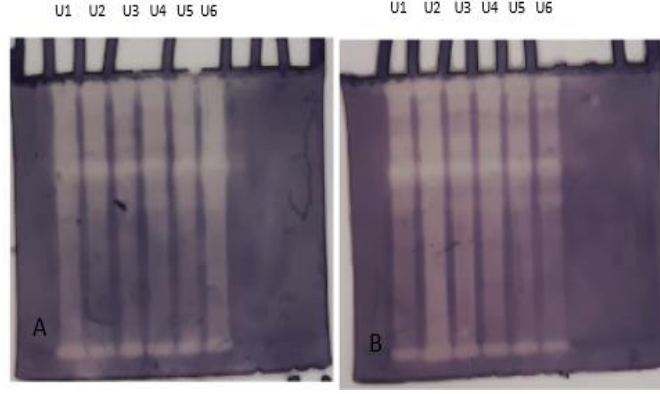
Bu çalışmada, domates tohumlarına SOD, CAT ve APX enzimleri için Doğal-PAGE yapılmış ve enzimlerin varlığı elektroforetik olarak substrat boyamaları yapılarak gösterilmiştir (Şekil 2, Şekil 3, Şekil 4). Benzer çalışmalarda jel görüntüleri literatürde verilmiştir (Yıldızdoğan, 2011; Tang ve ark., 2019).



**Şekil 2.** Domates tohumunun Süperoksit dismutaz enzimi için Doğal –PAGE görüntüleri. A) 2019 yılı B) 2020 yılı



**Şekil 3.** Domates tohumunun Katalaz enzimi için Doğal –PAGE görüntüleri. A) 2019 yılı, B) 2020 yılı



**Şekil 4.** Domates tohumunun Askorbat peroksidaz enzimi için Doğal –PAGE görüntüleri. A) 2019 yılı B) 2020 yılı

## SONUÇ

Toprakta veya bitkinin yetiştiği herhangi bir ortamda tuzluluk seviyesi arttıkça başta sebzeler olmak üzere bitkilerin birçoğunda gelişiminin olumsuz etkileneceği bilinen bir gerçektir. Bu çalışma ile farklı toprak tuzluluğuna sahip alanlarda yetiştirilen domateslerden hasat edilen tohumlarda topraktaki tuzluluk şiddeti arttıkça SOD, KAT ve APX antioksidan enzim aktivitelerinin de artış gösterdiği görülmüştür. Yani tuzluluk stresinin etkilerini sadece bitki yaşamamış, bu bitkilerden hasat edilen tohumlarda da stresin etkileri görülmüştür. Bu bağlamda özellikle açık tozlanan çeşitler veya genotiplerde tohumların farklı çimlenme ya da gelişim göstermelerinin nedeni esas bitkinin yetiştiği toprak veya ortam koşullarına bağlı olabileceğini göstermiştir. Bitki fizyolojisi birçok etmen tarafından yönlendirildiğinden benzer şekilde hasat edilen tohum partilerinde diğer birçok enzim, hormon, aminoasit ve fenoliklerin de incelenmesi konunun aydınlatılmasının önünü açabilecektir.

## Çıkar Çatışması

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

## Yazar Katkısı

Bu çalışmada antioksidan enzim analizleri, DOĞAL-PAGE Ayşe Türkhan, Elif Duygu Kaya, Eren Özden tarafından, toprak tuzluluk analizleri Serdar Sarı ve Faruk Tohumcu tarafından, domates tohumlarının üretimi ve hasadı Eren Özden tarafında yapılmıştır.

## KAYNAKLAR

- Aebi H, 1984. Catalase *In Vitro*, In: *Methods in Enzymology*, Eds: Elsevier, 121-126.
- Ali AA, Alqurainy F, 2006. Activities of Antioxidants in Plants Under Environmental Stress. *The Lutein-Prevention and Treatment For Diseases*, 187-256.
- Apel K, Hirt, 2004. Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55:373-399.
- BeauchampC, Fridovich I, 1971, Superoxide Dismutase: Improved Assays and An Assay Applicable to Acrylamide Gels. *Analytical Biochemistry*, 44:276-287.
- Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV, 2003. Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stres. *Analns of Botany*, 91:179-194
- Bor M, Özdemir F, Türkan I. 2003. The Effect of Salt Stress on Lipid Peroxidation and Antioksidants in Leaves of Sugar Beet *vulgaris L.* and wild beet *Beta maritima L.* *Plant Science*, 164(1):77-84.
- Bradford MM, 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitationof Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.



- Brown-Peterson NJ, Salin ML, 1993. Purification of Catalase-Peroxidase from Halobacterium Halobium: Characterization of Some Unique Properties of the Halophilic Enzyme. *Journal of bacteriology*, 175(13): 4197-4202.
- Chaudiere J, Ferrari-Iliou R, 1999. Intracellular Antioxidants from Chemical to Biochemical Mechanism. *Food Chemical Toxicology*, 37:949-962.
- Chen TH, Murata N, 2002. Enhancement of Tolerance of Abiotic Stress by Metabolic Engineering of Betaines and Other Compatible Solutes. *Current Opinion in Plant Biology*, 5: 250–257.
- Cui J, Shao G, Lu J, Keabetswe L, Hoogenboom G, 2020. Yield, Quality and Drought Sensitivity of Tomato to Water Deficit during Different Growth Stages. *Scientia Agricola*, 7(2):e20180390.
- Çulha Ş, Çakırlar H, 2011. Tuzluluğun Bitkiler Üzerine Etkileri ve Tuz Tolerans Mekanizmaları. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 11:11-34.
- Demir S, 2009. Tuz gölü Çevresinde Yetiştirilen Yöresel Kavun Populasyonunun (Koçhisar Kavunu) Tuza Tolerans Özellikleri Bakımından İncelenmesi. *Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*. Ankara.
- Demiral T, 2003. Genç Prinç Fidelerine Dışarıdan Glisinbetain Uygulamasıyla, Tuza Toleransının Arttırılmasında Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Rolünün Araştırılması. *Yüksek Lisans Tezi*, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Dere S, 2021. Kuraklık Stresi Koşullarında Bakteri Uygulamasının Domates Bitkileri Üzerine Etkileri. *Türk Doğa ve Fen Dergisi*, 10(1):52-62.
- Dere S, Daşgan HY, 2019. Effect of Waterlogging on Three Different Tomato Genotypes. *2th International Mersin Symposium, Mersin;2003.p.145-158*.
- Diñer B, 2005. Bazı Termofilik Bakterilerden Katalazın Aktivitesinin İncelenmesi, *Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktra Tezi*, Trabzon.
- Durukan H, 2011. Tescilli Haşhaş (*papaver somniferum* l.) Çeşitlerinde tuz stresinin antioksidan enzimler üzerine etkisi. *Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilimdalı Yüksek Lisans tezi*. Tokat.
- FAO, 2020. The Global Status of Vegatable Production, Trade and Utilization. *Crop Production Manual*. <https://www.fao.org/3/ca7556en/CA7556EN.pdf>
- Gonçalves VM, de Cerqueira Leite, LC, Raw I, Cabrera-Crespo J, 1999. Purification of Catalase from Human Placenta. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 29:73-77.
- Gökoğlu BÇ, Aycı G, 2021. Organik Materyal Kullanımının Alkali Bir Toprağın Bazı Islah Göstergeleri Üzerine Etkisi. *Toprak Su Dergisi*, 10(1): 60-67.
- Kapoor D, Singh S, Kumar V, Romero R, Prasad R, 2019. Antioxidant Enzymes Regulation in Plants in Reference to Reactive Oxygen Species (Ros) and Reactive Nitrogen Species (rns). *Plant Gene*, 19.
- Karadağ F, 2013. Farklı dozlarda selenyum uygulamalarının Haşhaş (*papaver somniferum* l.)Yapraklarında Antioksidan Enzimler Üzerine Etkisi. *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi*.
- Karaoğlu M, Yalçın AM, 2018. Toprak Tuzluluğu ve Iğdır Ovası Örneği. *Journal of Agriculture*, 1(1):27-41.
- Keskin G, 2021. Türkiye'nin Domates Üretimindeki Kayıpları Ve Rekabet Gücü. *Eurasian Journal of Agricultural Economics*, 1(2):18-37.
- Korkmaz Ş, 2021. In Vitro Tuz Stresinde Ayçiçeğinin (*Helianthus annuus* l.) Çimlenme ve Fide Gelişimine Putresinin Etkisi. *Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Yüksek Lisans tezi*.
- Laemmli DK, 1970. Cleavage of Structural Proteins during in Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680.
- LiY,2009. Physiological Responses of Tomato Seedlings (*Lycopersicon esculentum*) to Salt Stress. *Modern Applied Science*, 3(3):171.
- Mittler R, 2002. Oxidative Stress, Antioxidants and Stress Tolerance. *Trends in Plant Science*, 7:405- 410.

- Mittler R, Zilinskas BA, 1993. Detection of Ascorbate Peroxidase Activity in Native Gels by Inhibition of the Ascorbate Dependent Reduction of Nitroblue Tetrazolium. *Analytical Biochemistry*, 212:540-546.
- Nakano Y, Asada K, 1981. Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate Specific Peroxidase in Spinach Chloroplast. *Plant Cell Physiology*, 22:867-80.
- Nangare DD, Singh Y, Kumar PS, Minhas PS, 2016. Growth, Fruit Yield and Quality of Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) as Affected by Deficit Irrigation Regulated on Phenological Basis. *Agricultural Water Management*, 171:73-79.
- Ozden E, Light ME, Demir I, 2021. Alternating Temperatures Increase Germination and Emergence in Relation to Endogenous Hormones and Enzyme Activities in Aubergine Seeds. *South African Journal of Botany*, 139:130-139.
- Özkan A, Gündüz G, Çıplak B, Fışkın K, 2000. Kimyasal mücadele uygulanmış *Dociostaurus maroccanus* epidemik popülasyonundan alınan örneklerde antioksidan enzim aktiviteleri. *Turkish Journal of Biology*, 24(1): 141 - 149.
- Patel R, Prasher S, Bonnell R, Broughton R, 2002. Development of Comprehensive Soil Salinity Index. *Journal of Irrigation and Drainage Engineering*, 128(3):185-188.
- Rogers M, 2002. Irrigating Perennial Pasture with Saline Water: Effects on Soil Chemistry, Pasture Production and composition. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 42(3):265-272.
- Shao GC, Deng S, Liu N, Wang MH, She DL, 2015. Fruit Quality and Yield of Tomato as Influenced by Rain Shelters and Deficit Irrigation. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 17:691-704.
- Sharma I, Bhardwaj R, Pati PK, 2013. Stress Modulation Response of 24- epibrassinolide Against Imidacloprid in An Elite Indica Rice Variety Pusa Basmati-1. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 105(2):144-153.
- Talhouni M, Sönmez K, Ellialtıoğlu ŞŞ, Kuşvuran Ş, 2017. Tuz Stresi Altında Yetiştirilen Aşılı Patlıcan Bitkilerinde Bazı Bitki ve Meyve Özelliklerinin İncelenmesi. *Akademik Ziraat Dergisi*, 6:71-80.
- Tang J, Wang SO, Hu KD, Huang ZO, Li YH, Han Z, Chen XY, Hu LY, Yao GF, Zhang, H, 2019. Antioxidative Capacity is Highly Associated with the Storage Property of Tuberous Roots in Different Sweet potato Cultivars. *Scientific Reports*, 9:11141.
- Temel S, Şimşek U, 2011. İğdır Ovası Toprakların Çoraklaşma Süreci ve Çözüm Önerileri. *Alınteri*, 21(B):53-59.
- Wayne LG, Diaz GA, 1986. A Double Staining Method for Differentiating Between Two Classes of Mycobacterial Catalase in Polyacrylamide Electrophoresis Gels. *Analytical Biochemistry*, 157: 89-92.
- Woodbury W, Spencer AK, Stahmann MA, 1971. An Improved Procedure Using Ferricyanide for Detecting Catalase Isozymes. *Analytical Biochemistry*, 44: 301-305.
- Yaşar F, Ellialtıoğlu Ş, Özpay T, Uzal Ö, 2008. Tuz Stresinin Karpuzda (*Citrulluslanatus* (Thunb.) Mansf.) Antioksidatif Enzim (SOD, CAT, APX ve GR) Aktivitesi Üzerine Etkisi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi. Ziraat Fakültesi, Tarım Bilimleri Dergisi*, 18(1): 61-65.
- Yıldıztuğay E, 2011. Endemik *Centaurea tuzgoluensis* Aytaç & H. Duman ve *Centaurea Lycaonica* Boiss. & Heldr.'nin Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri Üzerine Tuz Stresinin Etkileri, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Konya.