

## Ayçiçeği Bitkisi Yapraklarında Tuz Stresi, Nitrik Oksit ve Hormon Uygulamalarının Antioksidan Savunma Sistemi Üzerine Etkileri

Oğuz Ayhan KİREÇÇİ<sup>1</sup>, Füsun YÜREKLİ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Bitlis Eren Üniversitesi Hizan Meslek Yüksekokulu, Bitlis <sup>2</sup>İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Malatya

<sup>1</sup><https://orcid.org/0000-0003-2205-4758>, <sup>2</sup><https://orcid.org/0000-0002-4111-9230>

✉: kireccioguzayhan@gmail.com

### ÖZET

Bu çalışmada ayçiçeği (*Helianthus annuus* L. cv. Tarsan-1018 çeşidi) bitkisinde tuz stresi, sodyum nitroprussid ve bitki hormonları uygulamalarının antioksidan sistem aktiviteleri üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışma 2016 yılında kontrollü iklim odası şartlarında yapılmıştır. Tohumlar 5 hafta süreyle kültür çözeltilisi ile sulanarak, 5. hafta sonunda tuz, sodyum nitroprussid ve bitki hormonları uygulamaları 48 saat süreyle yapılmıştır. 48. Saat sonunda örnekler alınarak, süperoksit dismutaz aktivitesi Sairam ve ark. (2002)' a katalaz aktivitesi Aebi (1984)'e glutatyon S transferaz aktivitesi Habig ve ark. (1974)' e ve prolin miktarı da Ninhidrin (Troll ve Lindsley, 1955) metoduna göre belirlenmiştir. Sonuçlar; tuz stresi ve Sodyum nitroprussid uygulamalarının antioksidan savunmayı teşvik ettiğini göstermiştir. Bitki hormonları farklı etkiler yapmış olup; absisik asidin antioksidan savunma sistemi üzerine olumlu etkilerde bulunduğu, gibberellik asidin ise enzim aktiviteleri ve prolin miktarı üzerine etkisinin olumsuz olduğu belirlenmiştir.

### Araştırma Makalesi

#### Makale Tarihçesi

Geliş Tarihi : 07.09.2018

Kabul Tarihi : 30.01.2019

#### Anahtar Kelimeler

Antioksidan enzim

Ayçiçeği

Nitrik oksit

Prolin

Tuz stresi

## The Effects of Salt Stress, Nitric Oxide and Hormone Applications on Antioxidant Defense in Sunflower Plant Leaves

### ABSTRACT

In this study, effects of salt stress, SNP and plant hormones on activities of antioxidant system in sunflower (*Helianthus annuus* L. cv. Tarsan-1018) leaf tissues were investigated. The study was conducted in 2016 under controlled climate room conditions. The seeds were irrigated with culture solution for 5 weeks. At the end of the fifth week, salt, SNP and hormone applications were applied for 48 hours. At the end of 48-hour samples were gathered. Superoxide dismutase activity, Catalase activity, Glutathione S transferase activity and Proline amount were determined according to Sairam et al. (2002), Aebi (1984), Habig et al. (1974) and Ninhidrin method (Troll and Lindsley, 1955), respectively. Results showed that salt stress and Sodium nitroprusside stimulated antioxidant defense. Plant hormones had different effects. Abscisic acid had positive effects on antioxidant defense. Gibberellic acid caused negative effects on enzyme activities and proline amount.

### Research Article

#### Article History

Received : 07.09.2018

Accepted : 30.01.2019

#### Keywords

Antioxidant enzyme

Nitric oxide

Proline

Salt stress

Sunflower

**To Cite :** Kireççi OA, Yürekli F 2019. Ayçiçeği Bitkisi Yapraklarında Tuz Stresi, Nitrik Oksit ve Hormon Uygulamalarının Antioksidan Savunma Sistemi Üzerine Etkileri. KSÜ Tarım ve Doğa Derg 22(3): 360-369. DOI: 10.18016/ksutarimdog.vi.457992.

### GİRİŞ

Stres; fiziksel açıdan bir nesneye birim alan başına uygulanan güç olarak tanımlanmaktadır. Bitkilerde bir stres faktörü tarafından uygulanan gücü ölçmek zor olduğundan biyolojik açıdan stresi tanımlamak zordur. Biyolojik koşullarda bir bitki için stres oluşturan durum başka bir bitki için optimum şartları

sağlayabilmektedir. Biyolojik stresin en pratik tanımı ise bitkiler gibi biyolojik sistemlerde normal fonksiyonları ve oluşumları engelleyen olumsuz şartlar olarak tanımlanabilir (Jones ve Jones 1989; Gaspar ve ark., 2002; Jaleel ve ark., 2009). Tuzluluk, son yıllarda dünya genelinde ciddi şekilde artarak devam eden bir stres türüdür. Yağış miktarında

azalma, kurak ve yarı kurak alanlardaki yüksek derecede nem oluşumu ve bunların neticesinde bitkiler için su ile besin maddelerine ulaşmadaki zorlukları meydana gelen tuz stresi su eksikliği ve kuraklık stresi sonuçlarına neden olmaktadır (Mahajan ve Tuteja 2005; Al-karaki 2006; Porcel ve ark., 2012). Yüksek tuzluluk ise; su stresi, iyon toksisitesi, besin yetersizliği, metabolik proseslerin değişimi, membran bozuklukları, hücre bölünmesi ve genişlemesinde gerileme, genotoksitate gibi bir çok yolla bitkiyi olumsuz etkilemektedir (Zhu 2007). Bu gibi durumlar bitkinin gelişimini, büyümesini ve yaşamını ciddi derecede sınırlandırmakta, tuz stresinin devam etmesiyle de protein sentezi, fotosentez, enerji ve lipid metabolizması gibi önemli fizyolojik aşamalar olumsuz etkilenmektedir (Parida ve Das 2005). Tuz stresinin ozmotik etkisi hemen gözlenebilmekte, hücre büyümesi ile bölünmesi inhibe edilerek, stomalar tedbir olması için kapatılabilmektedir. (Munns 2002; Flowers 2004). Uzun süreli tuzluluk, bitkide olgun yapraklarda senesensin başlamasına neden olmakta ve fotosentetik alan azalmaktadır (Cramer ve Nowak 1992). Bitkilerin birçoğunda tuzluluğun olumsuz etkisinden koruyucu veya tolare edici mekanizmalar bulunmaktadır. Bu mekanizmalar; stomaları kontrol altına alarak, ozmotik uyum sağlamakta, fotoprotektif etkiler geliştirerek, sekonder metabolit ve fitohormon üretimi sayesinde kuraklık ve tuz stresine başa çıkmaya çalışmaktadır (Yordanov ve ark., 2000; Valladeres ve Percy 2002; Martinez-Ferri ve ark., 2004; Radhakrishnan ve Lee 2013). Strese bağlı olarak ABA ve etilen gibi hormonların üretiminde ve çeşitli genlerin ifadelerinde değişimler meydana gelmektedir (Mahajan ve Tuteja 2005; Yamaguchi-Shinozaki ve ark., 2005; Shinozaki ve Yamaguchi-Shinozaki 2007). Serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı hücre veya organizmalar koruyucu mekanizmalara sahiptirler. Bu mekanizmalardan bir kısmı serbest radikal oluşumunu, bir kısmı ise oluşmuş serbest radikallerin zararlı etkilerini önler. Bu işlevleri yapan maddelerin tamamına genel olarak antioksidanlar denir. Bitki dokularındaki oksidatif hasar enzimatik ve enzimatik olmayan mekanizmalar tarafından baskılanmaktadır.  $\beta$ -karoten,  $\alpha$ -tokoferol, askorbat, glutatyon ile süperoksit dismutaz (SOD), peroksidaz (POX), askorbat peroksidaz (APX), katalaz (CAT) ve glutatyon redüktaz (GR) enzimleri bu mekanizma içerisinde yer almaktadır (Halliwell 1987; Asada 1992; 1997; Türkan ve ark., 2005). Stres çeşitlerinin sebep olduğu zararlar bitkinin türüne, stresten kaçınma ve tolerans kabiliyetine bağlı olarak değişebilmektedir (Dubey, 1994; Kadioğlu, 2004; Madhova Rao ve ark., 2005; Büyük ve ark., 2012). Bitkiler, düşük moleküler ağırlıklı çözünen maddeler veya prolin gibi ozmolitleri oluşturarak stres cevapları meydana getirebilmektedir. Koruyucu moleküllerden olan ozmolitler stres tarafından oluşturulan ROS'un temizlenmesinde görev yapan proteinlerdir (Büyük ve

ark., 2012). Bitki hormonları, bitkinin büyüme ve gelişmesinde önemli rol oynayan maddelerdir. Bitkiler, abiyotik stres ile karşılaştığı zaman bazı endojen bitki hormonları sinyal iletimi ve gen ifadelerinin düzenlenmesinde önemli görevler yapar (Xiong ve ark., 2002). Bitki hormonları hücre bölünmesi, farklılaşması ve büyümesi gibi olayları düzenlerken (Hooley 1994), gibberellinler, etilen, sitokininler ve brassinosteroidler tohum çimlenmesinin ve gelişimin düzenlenmesini de sağlayabilmektedir. (Kucera ve ark., 2005; Kucera ve ark., 2007). Absisik asit (ABA) su stresi ve ağır metal stresi gibi durumlarda bitkinin strese karşı cevaplarının düzenlenmesinde rol oynarken, kuraklığa karşı cevapların düzenlenmesini de sağlar. Abiyotik ve biyotik stres şartlarında stomatal aktivite, dormansi ve diğer bitkisel faaliyetleri düzenler (Moore 1989; Davies ve Jones 1991; Weyers ve Paterson 2001; Popko ve ark., 2010). Gibberellik asit (GA), ise bitki büyüme ve gelişmesini önemli şekilde düzenlemekte tohum çimlenmesini, yaprak genişlemesini, kök uzamasını ve akışını kontrol eden, büyüme ve gelişme ile ilgili bir hormondur (Magome ve ark., 2004; Kim ve Park, 2008). Bunun yanında GA, NaCl stresinin etkilerini azaltmaktadır. GA'nın soya (*Glycine max*) bitkisinde diğer bitkisel hormonların miktarını düzenleyerek, NaCl stresinin neden olduğu olumsuz durumları düzelttiği bildirilmiştir (Hisamatsu ve ark., 2000; Hamayun ve ark., 2010; Iqbal ve ark., 2011). Bununla birlikte, bitkilerde GA'nın tuz toleransını uyarma mekanizmaları henüz net değildir. Tuzluluk, bitkilerdeki hormonal dengeyi bozmaktadır. Yapılan çalışmada antioksidan savunma üzerine tuz, nitrik oksit ve bitki hormonlarının etkileri araştırılmış ve bu amaçla SOD, CAT ve GST enzim aktiviteleri ile prolin miktarı analizleri yapılmıştır.

## MATERYAL ve METOT

Bu çalışmada deney materyali olarak Ayçiçeği tohumları (*Helianthus annuus* L. cv. TARSAN – 1018 çeşidi) kullanılmıştır. Bitkinin dayanabileceği maksimum tuz konsantrasyonu 300 mM olarak saptanmış ve sterilizasyon sonrasında, tohumlar karanlıkta 24 saat bekletilmiştir. Her uygulama için 5'er tane saksı hazırlandı. Çimlenmenin ardından bitkiler 5 hafta boyunca Hoagland kültür çözeltisi ile yetiştirilen bitkilere 5. hafta sonunda; sodyum nitroprusid (100  $\mu$ M), gibberellik asit (100  $\mu$ M), absisik asit (100  $\mu$ M) ve bunların diğer kombinasyonlarına ek olarak tuz stresi 48 saat boyunca uygulanmıştır. Örnekler 48. saatte rastgele seçildi ve sıvı azot ile dondurularak, analizlere kadar -40 °C'de saklanmışlardır. Süperoksit dismutaz, Katalaz, Glutatyon S transferaz ve Prolin analizleri için 10 deney grubu oluşturulmuş olup, bunlar; Kontrol, 300 mM NaCl, 100  $\mu$ M SNP, 300 mM NaCl + 100  $\mu$ M SNP, 300 mM NaCl + 100  $\mu$ M ABA, 300 mM NaCl + 100  $\mu$ M

GA, 100  $\mu$ M GA, 300 mM NaCl+ 100  $\mu$ M SNP+ 100  $\mu$ M ABA, 300 mM NaCl+ 100  $\mu$ M SNP+ 100  $\mu$ M GA 100  $\mu$ M ABA ve 100  $\mu$ M GA.

### Süperoksit Dismutaz Enzim Aktiviteyi Tayini

Stres altında oluşan süperoksit radikalleri nitroblue tetrazolium (NBT) ile reaksiyona girerek mavi renkli formazon oluşumuna neden olur. Ortamda süperoksit dismutaz varlığında formazon oluşumu inhibe edilir. Renk oluşumu ile enzim konsantrasyonu arasında ters orantı bulunmaktadır. Süperoksit dismutaz enziminin aktivitesinin belirlenmesinde Sairam ve ark. (2002), tarafından belirtilen yöntem, modifiye edilerek kullanılmıştır. Buna göre; elde edilen ekstraksiyon sıvısından alınan örnek üzerine 1'er mL. substrat tamponu ve katalizör eklenmiştir. 15 W'lık ışık kaynağı altında 15 dakika bekletilen karışım 560nm dalga boyunda spektrofotometrik (Agilent Cary 60 Uv Vis G6860 A) olarak ölçülmüştür.

### Katalaz Enzim Aktivitesi Analizi

Katalaz aktivite tayini Aebi (1984)'ye göre yapılmıştır. Hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ultraviyole spektrumunda absorpsiyon veren bir maddedir. Maksimum absorbanı 240 nm'de vermektedir. Deney ortamına ilave edilen hidrojen peroksidin katalaz tarafından su ve oksijene parçalanması 240 nm'de absorbanın azalması ile kendini gösterir. Absorbansta meydana gelen azalış katalaz aktivitesi ile doğru orantılıdır. Katalaz aktivitesinin belirlenmesinde pH'sı 7 olan fosfat tamponuna 30 mM  $H_2O_2$  eklenerek elde edilen hidrojen peroksitli fosfat tamponu kullanılmıştır. Ekstraksiyon üst sıvısından alınan 2 mL örnek üzerine 1 mL hidrojen peroksitli fosfat tamponu eklenerek 240 nm'de  $H_2O_2$  konsantrasyonundaki azalışa göre spektrofotometre (Agilent Cary 60 Uv Vis G6860 A) ile ölçüm yapılmıştır. Ölçüm 15 saniye aralıklarla 60 saniye boyunca yapılmıştır.

### Glutatyon S Transferaz Enzim Aktivitesi Analizi

GST aktivite tayini Habig ve ark., (1974)'na göre yapılmıştır. GST aktivitesi tayini için 0.1 M potasyum fosfat tamponu, 0.01 M Tris HCl (pH 7.4) içerisinde 0.002 M redükte glutatyon ve % 96'lık etil alkol içerisinde 0.15 M CDNB (1-chloro,2-4dinitrobenzen) hazırlanarak, reaksiyon karışımı 400  $\mu$ L 0.1 M potasyum fosfat tamponu, 400  $\mu$ L redükte glutatyon, 100  $\mu$ L örnek ve 150  $\mu$ L CDNB olarak hazırlanmıştır. Enzim aktivitesi spektrofotometrede (Agilent Cary 60 Uv Vis G6860 A) 344 nm dalga boyunda 1 dakikada elde edilen absorban değişimi olarak belirlenmiştir

### Prolin Analizi

Ninhydrin metoduna göre belirlenmiştir. Kısaca 250 mg bitki materyali %95'lik (v/v) 3 ml etanol ile muamele edilip oda ısısında 5 dakika 2000 g devirde

santrifüj dildikten sonra 200  $\mu$ L ekstrakt üzerine 2 ml ninhydrin ayırıcı ve 300  $\mu$ L distile su eklenerek 60 dakika süreyle kaynatılmıştır. Buz banyosuna daldırarak reaksiyon durdurulmuş ve 6 ml toluene ile 20 saniye çalkalandıktan sonra 520 nm dalga boyunda spektroskopik (Agilent Cary 60 Uv Vis G6860 A) olarak belirlenmiştir (Troll ve Lindsley, 1955).

### İstatistik Analizi

Deney sonucunda elde edilen veriler SPSS 15.0 istatistik paket programı ile değerlendirilmiştir. Kontrol grubu ile deney gruplarının ortalamaları arasındaki farklılıklar önce tek-yönlü ANOVA testi ile belirlenirken, her bir grubun diğerine göre farklılıkları ise post hoc LSD testi yapılarak, değerler ortalama  $\pm$  standart sapma (ortalama $\pm$ SD) şeklinde belirtilmiştir.

## BULGULAR

### Süperoksit Dismutaz Aktivitesi

Ayçiçeği bitkisinin (*Helianthus annuus* L.cv. TARSAN - 1018) yaprak dokularındaki Süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesinin 48. saatte 300 mM NaCl + 100  $\mu$ M SNP + 100  $\mu$ M GA ve 100  $\mu$ M GA uygulamalarında kontrol grubundan düşük olduğu belirlenmiştir. En yüksek SOD enzim aktivitesi 365.61 $\pm$ 0.3  $\mu$ mol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> protein olarak 300 mM NaCl+ 100  $\mu$ M SNP+ 100  $\mu$ M ABA uygulamasında saptanırken, en düşük SOD enzim aktivitesi 100  $\mu$ M GA uygulamasında (148.81 $\pm$ 0.1  $\mu$ mol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> protein) gözlenmiştir. 300 mM NaCl uygulamasında artan SOD enzim aktivitesi 100  $\mu$ M SNP uygulamasında daha yüksek seviyeye ulaşmıştır. Çizelge 1 incelendiğinde; GA ve GA kombinasyonlu uygulamalarda SOD enzim aktivitesinin diğer uygulamalardan daha düşük olduğu görülmektedir.

### Katalaz Aktivitesi

*Helianthus annuus* L.cv. TARSAN - 1018 yaprak dokularında Katalaz (CAT) enzim aktivitesinin 300 mM NaCl + 100  $\mu$ M SNP + 100  $\mu$ M GA ve 100  $\mu$ M GA uygulamaları dışındaki tüm uygulama gruplarında kontrol grubundan yüksek olduğu belirlenmiştir. En yüksek CAT enzim aktivitesi 100  $\mu$ M SNP uygulamasında belirlenirken (50.01 $\pm$ 0.5  $\mu$ mol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> protein) en düşük CAT enzim aktivitesi 300 mM NaCl + 100  $\mu$ M SNP + 100  $\mu$ M GA uygulamasında (15.36 $\pm$ 0.1  $\mu$ mol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> protein) saptanmıştır (Çizelge 2).

### Glutatyon S Transferaz Aktivitesi

Ayçiçeği bitkisinin (*Helianthus annuus* L.cv. TARSAN - 1018) yaprak dokularında Glutatyon S transferaz (GST) enzim aktivitesinin 300 mM NaCl + 100  $\mu$ M IAA, 300 mM NaCl + 100  $\mu$ M GA ve 100  $\mu$ M GA uygulamalarında kontrol grubundan düşük olduğu, diğer tüm uygulamalarda ise kontrol grubundan

yüksek olduğu belirlenmiştir (Çizelge 3). 300 mM NaCl + 100 µM GA uygulamasında saptanan GST enzim aktivitesinin kontrol grubuna çok yakın olduğu ( $2.52 \pm 0.51 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$ ) gözlenmiştir. 300 mM NaCl + 100 µM SNP + 100 µM ABA uygulaması

en yüksek GST enzim aktivitesini sağlamıştır ( $10.33 \pm 0.23 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$ ). En düşük GST enzim aktivitesi ise, 100 µM GA uygulamasında ( $1.08 \pm 0.82 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$ ) belirlenmiştir.

Çizelge 1. Uygulama gruplarının *Helianthus annuus* L.cv. TARSAN – 1018 yaprak dokularında Süperoksit dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesi Üzerine Etkileri

Uygulama Grupları (n=3) LSD (6.36)	SOD Enzim Aktivitesi ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$ ) $\bar{x} \pm \text{SD}$
KONTROL	48. Saat
300 mM NaCl	<sup>a</sup> 191.55±0.3
100 µM SNP	<sup>d</sup> 237.36±0.5*
300 mM NaCl + 100 µM SNP	<sup>h</sup> 346.85±0.3*
300 mM NaCl + 100 µM ABA	<sup>i</sup> 361.60±0.4*
300 mM NaCl + 100 µM GA	<sup>f</sup> 256.57±0.2*
300 mM NaCl + 100 µM SNP + 100 µM ABA	<sup>d</sup> 202.39±0.1*
300 mM NaCl + 100 µM SNP + 100 µM GA	<sup>i</sup> 365.61±0.3*
100 µM ABA	<sup>b</sup> 174.21±0.2*
100 µM GA	<sup>g</sup> 306.09±0.3*
	<sup>a</sup> 148.81±0.1*

100 µM GA ve 300 mM NaCl+ 100 µM SNP+ 100 µM GA uygulamaları dışındaki tüm uygulama gruplarının SOD aktivitesini kontrol grubuna göre artırdığı belirlenmiştir (\*p<0.05; Ortalama fark 0.05 düzeyinde önemlidir)

Çizelge 2. Uygulama gruplarının *Helianthus annuus* L.cv. TARSAN – 1018 yaprak dokularında Katalaz (CAT) Enzim Aktivitesi Üzerine Etkileri

Uygulama Grupları (n=3) LSD (2.63)	CAT Enzim Aktivitesi ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$ ) $\bar{x} \pm \text{SD}$
KONTROL	48. Saat
300 Mm NaCl	<sup>b</sup> 19.52±0.3
100 µM SNP	<sup>d</sup> 33.19±0.4*
300 mM NaCl + 100 µM SNP	<sup>f</sup> 50.01±0.5*
300 mM NaCl + 100 µM ABA	<sup>de</sup> 35.06±0.5*
300 mM NaCl + 100 µM GA	<sup>c</sup> 23.05±0.1*
300 mM NaCl + 100 µM SNP + 100 µM ABA	<sup>bc</sup> 21.68±0.1*
300 mM NaCl + 100 µM SNP + 100 µM GA	<sup>de</sup> 35.36±0.3*
100 µM ABA	<sup>a</sup> 15.36±0.1*
100 µM GA	<sup>e</sup> 36.36±0.4*
	<sup>ab</sup> 17.79±0.2*

100 µM GA ve 300 mM NaCl+ 100 µM SNP+ 100 µM GA uygulamaları dışındaki tüm uygulama gruplarının CAT aktivitesini kontrol grubuna göre artırdığı belirlenmiştir (\*p<0.05; Ortalama fark 0.05 düzeyinde önemlidir)

Çizelge 3. Uygulama gruplarının *Helianthus annuus* L.cv. TARSAN – 1018 yaprak dokularında Glutatyon S Tarnsferaz (GST) Enzim Aktivitesi Üzerine Etkileri

Uygulama Grupları (n=3) LSD (0.54)	GST Enzim Aktivitesi ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$ ) $\bar{x} \pm \text{SD}$
KONTROL	48. Saat
300 Mm NaCl	<sup>b</sup> 2.55±0.02
100 µM SNP	<sup>d</sup> 6.40±0.02*
300 mM NaCl + 100 µM SNP	<sup>e</sup> 7.36±0.02*
300 mM NaCl + 100 µM ABA	<sup>e</sup> 7.46±0.02*
300 mM NaCl + 100 µM GA	<sup>e</sup> 7.05±0.11*
300 mM NaCl + 100 µM SNP + 100 µM ABA	<sup>b</sup> 2.52±0.51
300 mM NaCl + 100 µM SNP + 100 µM GA	<sup>f</sup> 10.33±0.23*
100 µM ABA	<sup>c</sup> 4.56±0.01*
100 µM GA	<sup>e</sup> 7.47±0.24*
	<sup>a</sup> 1.08±0.82*

100 µM GA ve 300 mM NaCl+ 100 µM SNP+ 100 µM GA uygulamaları dışındaki tüm uygulama gruplarının GST aktivitesini kontrol grubuna göre artırdığı belirlenmiştir (\*p<0.05; Ortalama fark 0.05 düzeyinde önemlidir)



### Prolin Miktarı

Ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.cv. TARSAN - 1018) yaprak dokularında Prolin miktarının 300 mM NaCl + 100 µM IAA, 300 mM NaCl + 100 µM SNP + 100 µM IAA, 100 µM IAA ve 100 µM GA uygulamalarında kontrol grubundan daha az olduğu belirlenmiştir. (Çizelge 4). 300 mM NaCl + 100 µM SNP + 100 µM ABA uygulamasının en yüksek Prolin miktarı sağladığı (61.61±1.73 µg) saptandı. En düşük Prolin

miktarı ise 300 mM NaCl + 100 µM SNP + 100 µM IAA uygulamasında 10.46±1.54 µg olarak belirlenmiştir (Çizelge 4).

### TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmanın sonucunda; SOD, CAT ve GST enzim aktivitelerinin özellikle 100 µM GA uygulamasıyla azaldığı belirlenmiştir (Çizelge1, 2, 3).

Çizelge 4. Uygulama gruplarının *Helianthus annuus* L.cv. TARSAN – 1018 yaprak dokularında Prolin Miktarı Üzerine Etkileri

Uygulama Grupları (n=3) LSD (2.09)	Prolin Miktarı (µg) $\bar{x}\pm SD$
KONTROL	48. Saat b22.01±0.1
300 Mm NaCl	c32.40±0.2*
100 µM SNP	h48.36±0.32*
300 mM NaCl + 100 µM SNP	g44.78±0.52*
300 mM NaCl + 100 µM ABA	c24.36±0.15*
300 mM NaCl + 100 µM GA	d30.10±0.72*
300 mM NaCl + 100 µM SNP + 100 µM ABA	i61.61±1.73*
300 mM NaCl + 100 µM SNP + 100 µM GA	f42.60±0.71*
100 µM ABA	bc24.07±0.74*
100 µM GA	a14.02±0.11*

100 µM GA uygulaması dışındaki tüm uygulama gruplarının CAT aktivitesini kontrol grubuna göre artırdığı belirlenmiştir (\*p<0.05; Ortalama fark 0.05 düzeyinde önemlidir)

300 mM NaCl ve 100 µM SNP uygulamalarının antioksidan aktiviteyi artırdığı sonucunu varılmıştır. 100 µM GA uygulamasında belirlenen enzim aktivitelerindeki azalmanın 300 mM NaCl + 100 µM SNP + µM GA kombinasyonlu uygulamalarda da meydana geldiği saptanmıştır.

Sanchez-Rodriguez ve ark., (2012) stres koşullarında glutatyon redüktaz (GR), askorbat peroksidaz (APX) ve katalaz (CAT) enzim aktivitelerinin artış gösterdiğini saptamışlardır. Sabra ve ark., (2012) üç *Echinacea* türünün (*Echinacea purpurea*, *Echinacea pallida* ve *Echinacea angustifolia*) hidroponik kültürasyonu altında 0 mM, 50 mM, 75 mM ve 100 mM konsantrasyonlardaki tuz stresine karşı süperoksit dismutaz (SOD) ve askorbat peroksidaz (APX) enzim aktivitelerinde artış olduğunu belirtmiştir. Mevcut çalışmada antioksidan enzim aktivitelerinin tuz stresi etkisiyle arttığı ve bu artışın tuz uygulamalı kombinasyonların neredeyse tamamında meydana geldiği belirlenmiştir ve sonuçlar literatür ile uyumludur. Nitrik oksit (NO) vericilerinin çoğu, sodyum nitroprusit (SNP) gibi NO kompleksleri oluşturan organik bileşiklerdir (Huo ve ark., 1999). NO'nun sıcak şartlarda antioksidan enzim aktivitelerini artırdığı bilinmektedir (Neill ve ark., 2002; Karpets ve ark., 2011). *Triticum aestivum*'da sıcaklık stresine bağlı olarak NO sinyali ile askorbat peroksidaz ve glutatyon redüktaz enzim aktivitelerinin uyarılmasının H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> metabolizmasında

önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (El-Beltagi ve ark., 2016). Benzer şekilde, 10 dakika boyunca 43 ° C'de ısı şoku verilen *T. aestivum* koleoptillerinde 0.5 mM SNP'nin süperoksit dismutaz ve katalaz enzimleri ile çözünür peroksidaz aktivitelerini yüksek miktarda artırdığı belirtilmiştir (Karpets ve ark., 2011). Sıcaklık stresi süresince antioksidan aktivitesinin teşvik edilmesi, çoğu türde gözlenen yaygın NO aracılıklı koruyucu yanıt ve bu antioksidan savunmanın stres bitiminden sonra da sürdüğü ile ilgili kanıtlar vardır (Parankusam ve ark., 2017). NO'nun dışsal uygulanması antioksidan enzimlerin artmasıyla hücreleri oksidatif stresin zararlarından korumaktadır (Wu ve ark., 2011). 50 µmol L<sup>-1</sup> SNP uygulaması, reaktif oksijen türleri (ROT) süpürücü enzimleri uyarır ve *Cucumis sativus* köklerinin mitokondrilerinde NaCl ile indüklenen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> birikimini azaltmıştır (Shi ve ark., 2007). Tuz stres koşulları altındaki *Cicer arietinum*'da 0.2 mmol L<sup>-1</sup> den daha düşük konsantrasyondaki SNP uygulamasının CAT ve glutatyon redüktaz (GR) aktivitesinin artırılmasında daha etkili olduğu, 1 mmol L<sup>-1</sup>den daha yüksek SNP konsantrasyonunun ise SOD aktivitesinin artırılmasında, membran hasarı ve lipid peroksidasyon seviyelerinin düşürülmesinde daha etkili olduğu bildirilmiştir (Sheokand ve ark., 2010). Tanou ve ark., (2009) tuzlulukla beraber gerçek enzim aktivitelerinin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> veya SNP'ye yanıt olarak yeniden düzenlendiğini belirtmişlerdir. Nitrik oksit abiyotik stresin neden olduğu ROT'u doğrudan

süpürme ile veya çeşitli ROT temizleyici enzimlerin aktivitesini tetiklediği için ikincil bir antioksidan olarak da kabul edilmektedir (Siddiqui ve ark., 2011; Hasanuzzaman ve ark., 2013; Arora ve ark., 2016). Fan ve ark., (2007), 10–400  $\mu\text{M}$  SNP ile 50 mM NaCl kombinasyonunun tuz kaynaklı stres altında *Cucumis sativus* bitkisi ile bir deney gerçekleştirmiş ve 50  $\mu\text{M}$  SNP uygulamasının, SOD, CAT, guaiacol peroksidaz (POD) ve askorbat peroksidaz (APX) dahil antioksidan enzimlerin aktivitesini arttırdığını belirtmişlerdir. Ahmad ve diğ. (2016), NO kaynağı olarak 50  $\mu\text{M}$  S-nitroso-N-asetil penisilaminin, (SNAP), *C. arietinum* bitkisinde SOD, CAT, APX ve GR aktivitelerini arttırdığını sonucuna varmışlardır (Hasanuzzaman ve ark., 2018). Bu çalışmada literatürde belirtildiği şekilde NO donörü SNP uygulamalarında artan antioksidan enzim aktiviteleri saptanmıştır (Çizelge 1, 2, 3).

Bitki büyüme hormonlarının ekzojen uygulamasının ağır metal toksisitesine karşı koruma geliştirdiğini gösteren çalışmalar da mevcuttur (Al-Hakimi 2007; El-Monem ve ark., 2009; Zhu ve ark., 2012; Agami and Mohamed 2013; Zhu ve ark., 2013; Masood ve ark., 2016). Mısır bitkisinde su stresi ve ABA uygulamasının ROT birikimini tetiklediği ve bu sayede antioksidan enzim aktivitelerini kodlayan genlerin artmış ekspresyonu ile antioksidan enzim aktivitelerinin arttığı belirtilmiştir (Jiang ve Zhang, 2002). Domates ile yapılan bir çalışmada ABA'nın kloroplastlarda ROT birikimini uyarabileceği sonucuna varılmıştır (Zhou ve ark., 2014). Pospisilova ve ark., (2005), ABA ön uygulamasının, mısır fidelerinde endojen ABA düzeyini daha da artırdığını bildirmişlerdir. Tohumların ABA ile muamelesinin, su stresine maruz kalan mısır fidelerinde antioksidan enzim aktivitesini önemli ölçüde arttırdığı bildirilmiştir (Jiang ve Zhang 2002). ABA tarafından kuraklık stresi altında SOD aktivitesinin arttığı belirtilmiştir (Jiang ve Zhang, 2001; Hu ve ark., 2005). Buğday bitkisinde kuraklık ile birlikte ABA uygulamasının SOD aktivitesinin kontrol grubuna göre 2 kat arttığı rapor edilmiştir (Bano ve ark., 2012). Yapılan çalışmada ABA uygulanması ile SOD, CAT ve GST enzim aktivitelerinde artış meydana geldiği ve bu artışın ABA kombinasyonlu uygulamalarda da olduğu sonucuna varılmıştır. Tuz stresi altındaki bitkilerde SOD aktivitesi,  $\text{GA}_3$ 'ün ekzojen uygulaması ile azalmıştır. Benzer şekilde,  $\text{GA}_3$  uygulamasının tuz stresli *Vigna radiata* bitkisinde SOD aktivitesini azalttığı bildirilmiştir (Chakrabarti ve Mukharji, 2003). Tuz stresli bitkilerde azalmış gibberellik asit içeriği olduğu bilgisi mevcuttur (Boucaud ve Unger, 1976). Bu veri; stres şartlarında azalan GA miktarının antioksidan savunmayı teşvik ettiği fikrini düşündürmektedir. Mevcut çalışma süresince ortama verilen GA antioksidan enzim aktivitelerinde azalmaya neden olmuştur. 300 mM NaCl + 100  $\mu\text{M}$  GA

uygulamasında saptanan enzim aktivitelerinin kontrol grubuna oldukça yakın olması stress şartlarında GA miktarının artırılmasıyla ilişkili olabilir. Öyle ki 300 mM NaCl + 100  $\mu\text{M}$  SNP + 100  $\mu\text{M}$  GA uygulamasında dahi SOD ve CAT aktivitesinin kontrol grubundan düşük olduğu anlaşılmaktadır. SNP uygulamasıyla elde edilen yüksek enzim aktiviteleri GA uygulamayla tersine dönmüştür. SNP'nin düzeltici etkisi sadece GST enzim aktivitesinde elde edilmiştir ve bu durum enzimlerin çalışma mekanizmalarının farklı olmasıyla açıklanabilir. Zira bilindiği üzere SOD super oksit radikalini  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'ye katalizlerken CAT  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'yi su ve oksijene katalizler.

Prolin gibi ozmolitlerin birikimi tuz stresine karşı adaptasyon mekanizmasının en önemli parçalarından biridir. Çavdar çimlerinde Prolin birikimi üzerine ilk çalışmadan sonra (Kemble ve MacPherson 1954), Prolinin tuz stresi toleransındaki rolü üzerine çalışmalar yapılmıştır. Çeşitli çalışmalarda Prolin'in antioksidan özelliği ve radikalleri temizleme aktiviteleri araştırılmıştır (Smirnoff ve Cumbes, 1989; Matysik ve ark., 2002). Prolin bir serbest radikal süpürücü olarak işlev görür ve kuraklık stresinde serbest radikal aracılı hasarları bastırır. Birkaç çalışmada, kuraklık stresi boyunca Prolin içeriğinin arttığını ve Prolin birikiminin, bazı bitkilerde kuraklık toleransında iyileşme ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Seki ve ark., 2007; Zhang ve ark., 2009). Kuraklık stresinin çayırotu yapraklarında Prolin birikimini artırdığı rapor edilmiştir (Man ve ark., 2011). Mevcut çalışmada tuz stresi ile artan Prolin içerikleri tespit edilmiştir. Bu durum litertürler ile uyumludur. SNP uygulamasında da Prolin miktarlarının arttığı belirlenmiştir. Araştırmacılar SNP'nin Prolin birikimine olumlu katkı sağladığını bildirmişlerdir (Dong ve ark., 2015). Yine farklı bir çalışmada kuraklık stresi altındaki *Ginkgo biloba* ve *Populus przewalskii* bitkilerinde SNP uygulamasının Prolin içeriğini 3 kata kadar artırdığı rapor edilmiştir (Miao ve ark., 2005; Hao ve ark., 2007). Elde edilen bulgular literatürler ile uyumludur. Prolin miktarının SA'nın ABA'nın aracılık ettiği Prolin birikimiyle buğday bitkisinde tuz stresinin olumsuz etkilerini azalttığı ile ilgili çalışma mevcuttur (Sakhabutdinova ve ark., 2003). Ekzojen ABA uygulamalarının, stres altındaki prolin birikiminin kısmen ABA tarafından regüle edildiği ancak stres olmayan ortamlarda eklenen ABA uygulamasının yüksek Prolin içeriği sağlamada yetersiz olduğu bilgisi de bulunmaktadır (Ober and Sharp 1994; Verslues ve Bray 2006; Sharma ve Verslues 2010). Çalışmada elde edilen sonuçlar ABA'nın tek başına Prolin miktarı üzerinde artırıcı etkisinin olduğunu ortaya koymuştur ve literatür ile uyumludur. Yine ABA kombinasyonlu uygulamalar Prolin miktarında artış sağlamıştır ve ABA'nın antioksidan savunmada etkili bir hormon grubu olduğunu göstermektedir. GA uygulamasında ise

düşük Prolin miktarı belirlenmiştir ve bu durum tuz stresi varlığında farklı buğday çeşitlerinde GA uygulamasının Prolin içeriğini azalttığını bildiren çalışmayla uyumludur (Manjili ve ark. 2012). Ek olarak; Tuna ve ark., (GA enzim) mısır bitkisinde 100 mM NaCl ile birlikte 50 ppm ve 100 ppm GA uygulamasının prolin miktarını artırdığını rapor etmişlerdir. Bu çalışmada tek başına GA uygulamasının Prolin miktarını düşürdüğü saptanmıştır. Bu durum uygulama dozundan kaynaklanabileceği gibi, çalışma materyallerinin farklılığından da meydana gelmiş olabilir. Çizelge 4 incelendiğinde GA kombinasyonlu uygulamalarda Prolin miktarının arttığı anlaşılmaktadır. Elde ettiğimiz sonuçlar GA'nın tek başına Prolin miktarı üzerine baskılayıcı etkisi olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar enzim aktiviteleri sonuçlarıyla da benzerlik göstermektedir.

Sonuç olarak; tuz stresi, NO ve bitki hormonlarının antioksidan savunma mekanizması üzerindeki etkilerinin açıklanmaya çalışıldığı bu çalışmada; NO'nun önemli bir sinyal molekülü olarak hareket ederek antioksidan enzim aktiviteleri üzerinde olumlu etkiler yaptığı anlaşılmıştır. Bitki hormonları bitkilerin yaşamlarında önemli olayları regule eden yegane moleküllerdir. Çalışmanın sonuçları; hormonların enzim aktiviteleri üzerine etkilerinin farklı olduğunu gösterirken, ABA'nın antioksidan savunmada önemli bir molekül olduğuna işaret etmektedir. GA bitki hayatında her ne kadar önemli bir hormon olsa da, bu çalışmada, antioksidan enzim aktiviteleri ve Prolin miktarı üzerine olumsuz etkiler yapmıştır. Bitkiler gibi canlı organizmalarda stress cevaplarının ve mekanizmasının anlaşılması oldukça güçtür. Bu kapsamda sınırlı literatür bilgisine katkı sağlanması amacıyla, daha fazla sayıda hormonun bitkilerdeki antioksidan savunma üzerine etkilerinin araştırılması, mekanizmanın anlaşılmasına yardımcı olacağı düşünülmektedir.

#### KAYNAKLAR

- Aebi H, 1984. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105: 121-126.
- Agami RA, Mohamed GF 2013. Exogenous treatment with indole-3-acetic acid and salicylic acid alleviates cadmium toxicity in wheat seedlings. *Ecotoxicol Environ Saf*, 94: 164-171.
- Al-Hakimi AMA 2007. Modification of cadmium toxicity in pea seedlings by kinetin. *Plant Soil Environ*, 53:129-135.
- Al-Karaki GN 2006. Nursery inoculation of tomato with arbuscular mycorrhizal fungi and subsequent performance under irrigation with saline water. *Sci. Hort*, 109: 1-7.
- Arora D, Jain P, Singh N, Kaur H, Bhatla SC 2016. Mechanisms of nitric oxide crosstalk with reactive oxygen species scavenging enzymes during abiotic stress tolerance in plants. *Free Radic Res*, 50: 291-303.
- Asada K 1992. Ascorbate peroxidase—a hydrogen scavenging enzyme in plants, *Physiol. Plant*, 85: 235-241.
- Boucaud J, Unger IA 1976. Hormonal control of germination under saline conditions of three halophyte taxa in genus Suaeda. *Physiol. Plant*, 36: 197-200.
- Büyük İ, Saydam Aydın S, Aras S 2012. Bitkilerin Stres Koşullarına Verdiği Moleküler Cevaplar. *Türk Hij Den Biyol Derg* 69(2): 97-110.
- Chakrabarti N, Mukharji S, 2003. Alleviation of NaCl stress by pretreatment of phytohormones in *Vigna radiata*. *Biol. Plant*, 46: 589-594.
- Cramer GR, Nowak RS 1992. Supplemental manganese improves the relative growth, net assimilation and photosynthetic rates of salt-stressed barley. *Physiologia Plantarum*, 84(4): 600-605.
- Davies WJ, Jones HG 1991. *Abscisic acid: physiology, biochemistry*. BIOS. Scientific Publishers Ltd., Cambridge, UK.
- Dubey RS 1994. *Handbook of Plant and Crop Stress*. New York: Marcel Dekker, 227.
- El-Beltagi HS, Ahmed OK, Hegazy AE 2016. Protective effect of nitric oxide on high temperature induced oxidative stress in wheat. *Not. Sci. Biol*, 8: 192.
- El-Monem A, Sharaf AE-MM, Farghal II, Sofy MR 2009. Role of gibberellic acid in abolishing the detrimental effects of Cd and Pb on broad bean and lupin plants. *Res J Agric Biol Sci*, 5: 6-13.
- Fan H, Guo S, Jiao Y, Zhang R, Li J 2007. Effects of exogenous nitric oxide on growth, active oxygen species metabolism, and photosynthetic characteristics in cucumber seedlings under NaCl stress. *Front Agric China*, 1: 308-314.
- Flowers TJ 2004. Improving crop salt tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 55(396): 307-319.
- Gaspar T, Franck T, Bisbis B, Kevers C, Jouve L, Hausman JF, Dommes J 2002. Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. *Plant Growth Regul*, 37: 263-285
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem*, 249(22):7130-7139.
- Halliwell B 1987. Oxidative damage, lipid peroxidation, and antioxidant protection in chloroplasts. *Chem. Phys. Lipids*, 44: 327-340.
- Hamayun M, Khan SA, Khan AL, Shin JH, Ahmad B, Shin DH, Lee IJ 2010. Exogenous gibberellic acid reprograms soybean to higher growth and salt stress tolerance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 7226-7232.
- Hasanuzzaman M, Gill SS, Fujita M 2013. Physiological role of nitric oxide in plants grown under adverse environmental conditions. In: Tuteja



- N, Singh Gill S (eds) Plant acclimation to environmental stress. Springer, New York, 269–322
- Hasanuzzaman M, Oku H, Nahar K, Borhannuddin MHM, Al Mahmud J, Baluska F, Fujita M 2018. Nitric oxide-induced salt stress tolerance in plants: ROS metabolism, signaling, and molecular interactions. *Plant Biotechnology Reports*, 12(2): 77-92.
- Hisamatsu T, Koshioka M, Kubota S, Fujime Y, King RW, Mander LN 2000. The role of gibberellin in the control of growth and flowering in *Matthiola incana*. *Physiologia Plantarum*, 109: 97–105
- Hooley R 1994. Gibberellins: perception, transduction and responses. *Plant Mol Biol*. 26: 1529-1555.
- Hou YC, Janczuk A, Wang PG 1999. Current trends in the development of nitric oxide donors, *Curr. Pharm. Des*, 5: 417–442.
- Hu X, Jian M, Zhang A, Lu J 2005, Abscisic acid-induced apoplastic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation up-regulates the activities of chloroplastic and cytosolic antioxidant enzymes in maize leaves. *Planta*, 223: 57–68.
- Iqbal N, Nazar R, Khan MIR, Masood A, Khan NA 2011. Role of gibberellins in regulation of source sink relations under optimal and limiting environmental conditions. *Current Science*, 100: 998–1007.
- Jaleel AC, Manivannan P, Wahid A, Farooq M, Al-Juburi HJ, Somasundaram R, Panneerselvam R 2009. Drought Stress in Plants: A Review on Morphological Characteristics and Pigments Composition. *Int. J. Agric. Biol*, 11(1) 100-105.
- Jiang M, Zhang J 2001, Effect of abscisic acid on active oxygen species, antioxidative defence system and oxidative damage in leaves of maize seedlings. *Journal of Plant Cell Physiology*, 42: 1265–1273.
- Jiang MY, Zhang JH 2002. Role of abscisic acid in water stress induced antioxidant defense in leaves of maize seedlings. *Free Radical Research*, 36: 1001–1015.
- Jones HG, Jones MB 1989. Introduction: some terminology and common mechanisms, in: Jones HG, Flowers TJ, Jones MB (Eds.), *Plants Under Stress*, Cambridge university Press, Cambridge, 1–10.
- Kadioğlu A 2004. *Bitki Fizyolojisi*. Trabzon: Lokman Yayın, 453.
- Karpets YV, Kolupaev YE, Yastreb TO 2011. Effect of sodium nitroprusside on heat resistance of wheat coleoptiles: dependence on the formation and scavenging of reactive oxygen species. *Russ. J. Plant Physiol*, 58(6): 1027-1033.
- Kemble AR, Macpherson HT 1954. Liberation of amino acids in perennial rye grass during wilting. *Biochemical Journal*, 58(1): 46-49.
- Kim SG, Park CM 2008. Gibberellic acid-mediated salt signaling in seed germination. *Plant Signaling & Behavior*, 3:877–879.
- Kucera B, Cohn MA, Leubner-Metzger G 2005. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. *Seed Sci Res*, 15: 281–307.
- Kucera K, Meinhard J, Dobrev P, Linkies A, Pesek B, Heß B, Machackova I, Fischer U, Leubner-Metzger G 2007. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid and abscisic acid during the germination of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) - A comparative study of fruits and seeds. *J. Exp. Bot*, 58: 3047–3060.
- Madhava Rao KV, Raghavendra AS, Janardhan Reddy K 2005. *Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants*. Netherlands: Springer, 345.
- Magome H, Yamaguchi S, Hanada A, Kamiya Y, Odadoi K 2004. Dwarf and delayed- flowering 1, a novel *Arabidopsis* mutant deficient in gibberellins biosynthesis because of overexpression of a putative AP2 transcription factor. *Plant Journal*, 37:720–729
- Mahajan S, Tuteja N 2005. Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Arch. Biochem., Biophys*, 444:139-158.
- Manjili FA, Sedghi M, Pessarakli M 2012. Effects if Phytohormones in Proline Content and Antioxidant Enzymes of Various Wheat Cultivars Under Salinity Stress. *Journal of Plant Nutrition*, 35(7): 1098-1111.
- Martinez-Ferri E, Manrique E, Valladares F, Balaguer L 2004. Winter photoinhibition in the field involves different processes in four co-occurring Mediterranean tree species. *Tree Physiol*, 24: 981-990.
- Masood A, Khan MIR, Fatma M, Asgher M, Per TS, Khan NA 2016. Involvement of ethylene in gibberellic acid-induced sulfur assimilation, photosynthetic responses, and alleviation of cadmium stress in mustard. *Plant Physiol Biochem*, 104: 1-10.
- Matysik JA, Bhalu B, Mohanty P 2002. Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. *Curr. Sci*, 82: 525–532.
- Moore TC 1989. *Biochemistry and Physiology of Plant Hormones*, 2nd edn. Springer-Verlag, New York U.S.A
- Munns R 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell & Environment*, 25(2): 239-250.
- Neill SJ, Desikan R, Clarke A, Hancock JT 2002. Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling in stomatal guard cells. *Plant Physiol*, 128: 13–16.
- Ober ES, Sharp RE 1994. Proline accumulation in maize (*Zea mays* L) primary roots at low water potentials. 1. Requirement for increased levels of abscisic acid. *Plant Physiology*, 105: 981–987.
- Parankusam S, Adimulam SS, Bahatnagar-Mathur P, Sharma KK 2017. Nitric Oxide (NO) in Plant Stress Tolerance: Current Knowledge and Perspectives. *Frontiers in Plant Sci*, 8: 1582-1600.



- Parida AK, Das AB, Mohanty P 2004. Investigations on the antioxidative defense responses to NaCl stress in a mangrove, *Bruguiera parvi flora*: differential regulations of isoforms of some antioxidative enzymes. *Plant Growth Regul*, 42:213–226
- Popko J, Hänsch R, Mendel R, Polle A, Teichmann T, 2010. The role of abscisic acid and auxin in the response of poplar to abiotic stress. *Plant Biol*. 12: 242–258.
- Porcel R, Aroca R, Ruiz-Lozano JM 2012. Salinity stress alleviation using arbuscular mycorrhizal fungi. A review. *Agron. Sustain. Dev*, 32: 181-200.
- Pospisilova J., Vagner M., Malbeck J., Travnickova A., Batkova P 2005. Interactions between abscisic acid and cytokinins during water stress and subsequent rehydration. *Biologia Plantarum*, 49: 533–540.
- Radhakrishnan R, Lee IJ 2013. Spermine promotes acclimation to osmotic stress by modifying antioxidant, abscisic acid, and jasmonic acid signals in soybean. *Journal of Plant Growth and Regulation*, 32: 22-30.
- Sabra A, Daayf F, Renault S 2012. Differential physiological and biochemical responses of three *Echinacea* species to salinity stress. *Scientia Horticulturae*, 135: 23-31.
- Sairam RK, Rao KV, Srivastava GC 2002. Differential response of wheat genotypes to term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. *Plant Sci*, 163: 1037–46.
- Sanchez-Rodriguez E, Rubio-Wilhelmi MM, Blasco B, Leyva R, Romero L, Ruiz JM, 2012. Antioxidant response resides in the shoot in reciprocal grafts of drought-tolerant and drought-sensitive cultivars in tomato under water stress. *Plant Sci*, 188: 89-96.
- Savoure A, Hua XJ, Bertauche N, VanMontagu M, Verbruggen N 1997. Abscisic acid-independent and abscisic acid-dependent regulation of proline biosynthesis following cold and osmotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular and General Genetics*, 254: 104–109.
- Seki M, Umezawa T, Urano K, Shinozaki K 2007. Regulatory metabolic networks in drought stress responses. *Curr. Opin. Plant Biol*, 10: 296–302
- Sharma S, Verslues PE 2010. Mechanisms independent of ABA or proline feedback have a predominant role in transcriptional regulation of proline metabolism during low water potential and stress recovery. *Plant Cell and Environment*, 33: 1838–1851.
- Sheokand S, Bhankar V, Sawhney V 2010. Ameliorative effect of exogenous nitric oxide on oxidative metabolism in NaCl treated chickpea plants. *Braz J Plant Physiol*, 22: 81–90
- Shi Q, Ding F, Wang X, Wei M 2007. Exogenous nitric oxide protect cucumber roots against oxidative stress induced by salt stress, *Plant Physiol Biochem*, 45: 542–550.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K 2007. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 58(2): 221–22.
- Siddiqui MH, Al-Whaibi MH, Basalah MO 2011. Role of nitric oxide in tolerance of plants to abiotic stress. *Protoplasma*, 248: 447–455
- Smirnoff N, Cumbes QJ 1989. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*, 28: 1057–1060.
- Tanou G, Molassiotis A, Diamantidis G 2009. Hydrogen peroxide- and nitric oxide-induced systemic antioxidant prime-like activity under NaCl-stress and stress-free conditions in citrus plants. *Journal of Plant Physiology*, 166: 1904–1913.
- Troll W, Lindsley J 1955. A photometric method for the determination of proline. *Biol. Chem*, 215: 655-660.
- Tuna AL, Kaya C, Dikilitaş M, Higgs D 2008. The combined effects of gibberellic acid and salinity on some antioxidant enzyme activities, plant growth parameters and nutritional status in maize plants. *Environmental and Experimental Botany*, 62: 1–9.
- Türkan İ, Bor M, Özdemir F, Koca H 2005. Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought-tolerant *P. acutifolius* Gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress, *Plant Science*, 168: 223–231.
- Valladares F, Pearcy RW 2002. Drought can be more critical in the shade than in the sun: a field study of carbon gain and photo-inhibition in a Californian shrub during a dry El Nino year. *Plant Cell Environ*, 25: 749-759.
- Verslues PE, Bray EA 2006. Role of abscisic acid (ABA) and *Arabidopsis thaliana* ABA-insensitive loci in low water potential-induced ABA and proline accumulation. *Journal of Experimental Botany*, 57: 201–212.
- Weyers JDB, Paterson NW, 2001. Plant hormones and the control of physiological processes. *New Phytol*. 152: 375–407.
- Wu X, Zhu W, Zhang H, Ding H, Zhang HJ 2011. Exogenous nitric oxide protects against salt-induced oxidative stress in the leaves from two genotypes of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.), *Acta Physiol Plant*, 33: 1199–1209.
- Xiong L, Schumaker KS, Zhu JK 2002. Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *The Plant Cell* 14:165–183.
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K 2005. Organization of cis acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters. *Trends in Plant Science*, 10: 88–94.
- Yordanov I, Velikova V, Tsonev T 2000. Plant responses to drought, acclimatation and stress

- tolerance. *Photosynthetica*, 38: 171-186.
- Zhang X, Ervin EH, Evanylo GK, Haering KC 2009. Impact of biosolids on hormone metabolism in drought-stressed tall fescue. *Crop Sci*, 49(1): 1893-1901.
- Zhu JK 2007. *Plant Salt Stress*: John Wiley & Sons, Ltd.
- Zhu XF, Wang ZW, Dong F, Lei GJ, Shi YZ, Li GX, Zheng SJ 2013. Exogenous auxin alleviates cadmium toxicity in *Arabidopsis thaliana* by stimulating synthesis of hemicellulose 1 and increasing the cadmium fixation capacity of root cell walls. *J Hazard Mater*, 263: 398-403.