



**BAZI BİTKİ BÜYÜME DÜZENLEYİCİLERİNİN
ÇİMLENEN MISIR (*Zea mays* L.) TOHUMLARINDA
METİLGLİOKSAL TOKSİSİTESİNİN
YATIŞTIRILMASI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ**

İhsan YİĞİT

**Yüksek Lisans Tezi
Biyoloji Anabilim Dalı
Botanik Bilim Dalı
Prof. Dr. Ökkeş ATICI
2019**

Her hakkı saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAZI BİTKİ BÜYÜME DÜZENLEYİCİLERİNİN ÇİMLENEN
MISIR (*Zea mays* L.) TOHUMLARINDA METİLGLİOKSAL
TOKSİSİTESİNİN YATIŞTIRILMASI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

İhsan YİĞİT

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
Botanik Bilim Dalı

ERZURUM
2019

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
TEZ ONAY FORMU



**BAZI BİTKİ BÜYÜME DÜZENLEYİCİLERİNİN ÇİMLENEN MISIR (*Zea mays* L.)
TOHURLARINDA METİLGLİOKSAL TOKSİSİTESİNİN YATIŞTIRILMASI
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ**

Prof. Dr. Ökkeş ATICI danışmanlığında, İhsan YİĞİT tarafından hazırlanan bu çalışma, 21/08/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı, Botanik Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği / oy çokluğu (.../...)** ile kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Özkan AKSAKAL

İmza :

Üye : Prof. Dr. Ökkeş ATICI

İmza :

Üye : Doç. Dr. Furkan ORHAN

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu'nun **26.09/2019** tarih ve **38.../...101** nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet KARAKAN
Enstitü Müdürü

Bu çalışma Atatürk Üniversitesi BAP kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: 2015/111

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BAZI BİTKİ BÜYÜME DÜZENLEYİCİLERİNİN ÇİMLenen MISIR (*Zea mays* L.)TOHUMLARINDA METİLGİOKSAL TOKSİSİTESİNİN YATIŞTIRILMASI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

İhsan YİĞİT

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Botanik Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ökkeş ATICI

Bu çalışmada, çimlenen tohumlarda metilglioksal (MG) toksisitesinin yatıştırılmasında bitki büyüme düzenleyicilerinden nitrik oksit (NO), hidrojen sülfür (H₂S) ve salisilik asidin (SA) etkileri araştırılmıştır. Bu amaç için mısır (*Zeamays* L., cv. Arifiye) tohumları, çimlenme öncesi farklı seviyelerde NO donörü olarak SNP (500 ve 750 µM), H₂S donörü olarak NaHS (0,25 ve 0,50 mM) veya salisilik asit (0,1 ve 1 mM) çözeltilerinde ön ıslatma tabi tutulduktan sonra, 1 ve 3 mM MG ortamında çimlendirilmişlerdir. Çalışmada, özellikle 3 mM MG'nin, çimlenen mısır tohumlarında büyüme ve gelişme parametrelerini (çimlenme oranını ve fide uzunluğu) ve antioksidatif sistemi (süperoksiddismutaz, katalaz, guaikolperoksidaz, askorbatperoksidaz ve glutatyonperoksidaz aktiviteleri; reaktif oksijen türleri ve lipidperoksidasyonu içeriği) olumsuz etkileyerek strese neden olduğu belirlenmiştir. Buna karşılık tohumlara MG stresinden önce uygulanan SNP, SA ve H₂S, MG toksisitesi altındaki tohumlarda bu parametreler iyileştirebilmiştir. EkzojenMG uygulaması, çimlenen mısır tohumlarında içsel MG'yi detoksifiye eden Glioksalaz I ve Glioksalaz II aktivitesini olumsuz etkilemiş, ancak SNP, SA ve H₂S uygulamalarınındaha çok düşük konsantrasyonları bu enzimlerin aktivitelerini artırarak MG toksisitesinin yatıştırılmasına önemli katkı yapmıştır. MG uygulamaları çimlenen tohumda içsel MG miktarını önemli ölçüde artırmış, fakat özellikle H₂S+MG ve SNP+MG uygulamaları içsel MG seviyesini düşürmüştür. MG toksisitesi altında çimlenen mısır tohumlarında SNP, SA ve H₂S uygulamaları büyüme, fizyolojik ve biyokimyasal parametrelerini iyileştirerek bitki toleransının artırılmasına önemli katkı yaptığı belirlenmiştir. MG toksitesini yatıştırmada bu sinyal bileşikler içerisinde SA genelde daha etkili olmuştur.

2019, 115 sayfa

Anahtar Kelimeler: Antioksidan, Çimlenme, Glioksalaz, Metilglioksal, Mısır, Reaktif Oksijen Türleri

ABSTRACT

MS Thesis

EFFECTS OF SOME PLANT GROWTH REGULATORS ON MITIGATING METHYLGLYOXAL TOXICITY IN GERMINATING MAIZE (*Zea mays* L.) SEEDS

İhsan YİĞİT

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology
Botany Science

Supervisor: Prof. Dr. Ökkeş ATICI

In this study, from the plant growth regulators, the effects of nitric oxide (NO), hydrogen sulfide (H₂S) and salicylic acid (SA) on the mitigating of methylglyoxal (MG) toxicity were aimed to investigate in germinating seeds. For this purpose, maize (*Zea mays* L., cv. Arifiye) seeds were pre-soaked in the solutions of SNP (500 and 750 µM) as NO donor, NaHS (0.25 and 0.50 mM) as H₂S donor, or SA (0.1 and 1 mM) before germination. Then, the seeds were germinated in the medium containing 1 or 3 mM MG. It was determined that especially 3 mM MG caused stress by negatively affecting the growth and development parameters (germination rate and seedling length) and antioxidative system (superoxide dismutase, catalase, guaiacol peroxidase, ascorbate peroxidase and glutathione peroxidase activities), and by increasing reactive oxygen species and lipid peroxidation contents in the germinating maize seeds. But, SNP, SA and H₂S applied to the seeds before MG stress were able to improve these parameters under the MG toxicity. Exogenous MG adversely affected Glyoxalase I and Glyoxalase II activities, which detoxify endogenous MG in the germinating seeds, but the low concentrations of SNP, SA, and H₂S contributed significantly to the alleviation of MG toxicity by increasing the activity of these enzymes. MG applications significantly increased endogenous MG content in the germinated seeds, but especially H₂S+MG and SNP+MG decreased the MG level. It was determined that SNP, SA and H₂S applications contributed to increasing plant tolerance by improving growth, physiological and biochemical parameters in germinating maize seeds under MG toxicity. SA between these signal compounds was generally more effective in alleviating MG toxicity.

2019, 115 pages

Keywords: Antioxidant, Germination, Glyoxalase, Methylglyoxal, Maize, Reactive Oxygen Species

TEŞEKKÜR

Kapsamlı Araştırma Projesi olarak hazırlanan bu araştırma, Atatürk Üniversitesi BAP/2015-111 No'lu araştırma projesi olarak desteklenmiş olup Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Bitki Fizyolojisi Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmada her an bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, çalışmalarım boyunca maddi ve manevi her türlü yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ökkeş ATICI'ya en içten duygularla teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım boyunca her türlü ilgi, yardım ve desteğini gördüğüm Sayın Özge ÇAKMAK, Ayşe Gülde ALHAN, Gamze KARACA, Elif GÜNEY, Özlem GÜLMEZ ve Bitki Fizyolojisi Araştırma Laboratuvarı çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Hayatın her anında yanımda oldukları gibi beni eğitim hayatım boyunca her zaman destekleyen, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen başta annem ve babam olmak üzere tüm aileme en içten dileklerimle şükranlarımı sunarım.

İhsan YİĞİT

Temmuz, 2019

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	16
3. MATERYAL ve YÖNTEMLER.....	27
3.1. Kullanılan Alet ve Cihazlar	27
3.2. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanmaları.....	27
3.3. Yöntemler	32
3.3.1. Bitki tohumlarının çimlendirilmesi	32
3.4. İçsel Metilglioksal'ın (MG) Belirlenmesi	34
3.5. Glioksalaz I ve Glioksalaz II Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	34
3.5.1. Glioksalaz I.....	34
3.5.2. Glioksalaz II	35
3.6. Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi	35
3.6.1. Süperoksid dismutaz aktivitesinin belirlenmesi	35
3.6.2. Katalaz aktivitesinin belirlenmesi	36
3.6.3. Askorbat peroksidaz aktivitesinin belirlenmesi	37
3.6.4. Guaicol peroksidaz aktivitesinin belirlenmesi	37
3.6.5. Glutasyon redüktaz (GR) aktivitesinin belirlenmesi	38
3.7. Lipid Peroksidasyonu (MDA olarak) İçeriğinin Belirlenmesi	38
3.8. Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂) Miktarının Belirlenmesi	39
3.9. Süperoksid Anyonu miktarının belirlenmesi.....	40
3.10. Protein Tayini	40
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	43
4.1. MG, SNP, SAve H ₂ S Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	43

4.2. SNP, SA ve H ₂ S Uygulamasının MG Toksitesi Altındaki Fidelerde	
Çimlenme ve Kök-gövde Uzunlukları Üzerinde Etkileri.....	43
4.3. Glioksalaz Yolu Enzimlerin Aktivitelerine Ait Bulgular	48
4.3.1. Glioksalaz I aktivitesine ait bulgular	48
4.3.2. Glioksalaz II aktivitesine ait bulgular	52
4.4. İçsel Metilglioksal (MG) Bulguları	56
4.5. Antioksidan Enzim Aktivitelerine Ait Bulgular	59
4.5.1. SOD aktivitesine ait bulgular	59
4.5.2. CAT aktivitesine ait bulgular	63
4.5.3. APX aktivitesine ait bulgular	68
4.5.4. GR aktivitesine ait bulgular	71
4.5.5. GPX aktivitesine ait bulgular	75
4.6. H ₂ O ₂ , O ₂ ^{•-} ve Lipid Peroksidasyonuna Ait Bulgular	79
4.6.1. İçsel H ₂ O ₂ miktarı bulguları	79
4.6.2. Süperoksid anyonu radikali (O ₂ ^{•-}) miktarı bulgular	83
4.6.3. LPO seviyesi (MDA olarak) bulguları	87
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	91
5.1. Bitki büyüme ve gelişmesi üzerinde yapılan çalışmaların	
değerlendirilmesi	92
5.2. Glioksalaz Sistemi enzimlerinden elde edilen bulguların değerlendirilmesi	93
5.3. Antioksidan Sistemi enzimlerinden elde edilen bulguların	
değerlendirilmesi	97
5.4. H ₂ O ₂ , O ₂ ^{•-} ve lipid peroksidasyonu bulgularının değerlendirilmesi	101
5.5. Sonuç	104
KAYNAKÇA	106
ÖZGEÇMİŞ	118

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

·OH	: Hidroksil radikali
¹ O ₂	: Singlet oksijen
AGE	: Glikasyon Son Ürünleri
APX	: Askorbat peroksidaz
CAS	: Siyanoalaninsintaz
CAT	: Katalaz
CDES	: Sisteindesülfhidraz
cDNA	: Siklik Deoksiribo Nükleik Asit
Co II	: Kobalt II
DHAP	: Dihidroksiaseton fosfat
DHAR	: Dehidroaskorbat redüktaz
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
E.C	: Enzim kod numarası
EDTA	: Etilendiamin tetra asetik asit
ETS	: Elektron taşıma zinciri
EU	: Enzim ünitesi
Fd	: Ferredoksin
GAP	: Gliseraldehid-3-fosfat
Gly I	: Glioksalaz I (Lactoylglutathionelyase)
Gly II	: Glioksalaz II (Hidroksiasilglutathionehydrorolase)
GPX	: Guaikol Peroksidaz
GR	: Glutasyon redüktaz
GSH	: Glutasyon (indirgen)
GSSG	: Glutasyon Disülfid (okside)
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
H ₂ S	: Hidrojen sülfür
HL60	: İnsan lösemi hücre hattı
ICS	: İzokorizmat sentaz
kDA	: Kilo dalton

MDHAR	: Monodehidroaskorbat redüktaz
MG	: Metilglioksal
mM	: Milimolar
Mo ⁺⁺	: Molibden
NAD	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NADP(H)	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NBT	: Nitroblue tetrazolium klorür
Ni II	: Nikel II
NiR	: Nitrit Redüktaz
NO	: Nitrik Oksit
NOS	: Nitrik oksit sentaz
O ₂ ⁻	: Süperoksit anyonu
OAS-TL	: O-asetilserintiolliaz
PAL	: Fenilalanin amonyum liyaz
PHGPX	: Fosfolipid hidroperoksit glutatyon peroksidaz
PSI	: Fotosistem I
PSII	: Fotosistem II
RCS	: Reaktif Karbonil Bileşikler
ROOH	: Organik hidroperoksitler
ROS	: Reaktif oksijen türleri
RuBisCO	: Ribuloz-1,5-bifosfat karboksilaz/oksigenaz
RuBP	: Ribuloz-1,5-bifosfat
SA	: Salisilik Asit
SNP	: Sodyum Nitroprussid
SOD	: Süperoksit Dismutaz
TP I	: Trioz fosfat izomeraz
TRX	: Tiorredoksin
UQ	: Ubikinon
XOR	: Ksantin oksido redüktaz
µL	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Bir bitki hücresinde ROS'un üretildiği genel yerler.....	3
Şekil 1.2. Metilglükoksal sentezinde yer alan basamaklar, biyolojik etkileri ve gliokzalaz sistemi ile detoksifikasyonu	9
Şekil 3.1. İçsel MG ölçümünde kullanılan standart grafik	34
Şekil 3.2. Katalaz aktivitesi ölçümünde kullanılan standart grafik	37
Şekil 3.3. Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) miktarını belirlemede kullanılan standart grafik.....	39
Şekil 3.4. Süperoksit anyon (O ₂ ^{•-}) miktarını belirlemede kullanılan standart grafik.....	40
Şekil 3.5. Protein tayini için kullanılan standart grafik	41
Şekil 4.1. SNP (µM) ön uygulaması yapıldıktan sonra farklı MG (mM) ortamında çimlenen mısır tohumlarının çimlenme yüzdeleri. ±: SE	45
Şekil 4.2. SNP (µM) ön uygulaması yapıldıktan sonra farklı MG (mM) ortamında çimlenen mısır tohumlarının kök-gövde uzunlukları. ±: SE	45
Şekil 4.3. H ₂ S (mM NaHS olarak) ön uygulaması yapıldıktan sonra farklı MG ortamında çimlenen mısır tohumlarının çimlenme yüzdeleri. ±: SE	46
Şekil 4.4. H ₂ S (mM NaHS olarak) ön uygulaması yapıldıktan sonra farklı MG ortamında çimlenen mısır tohumlarının kök-gövde uzunlukları. ±: SE	46
Şekil 4.5. SA (mM) ön uygulaması yapıldıktan sonra farklı MG ortamında çimlenen mısır tohumlarının çimlenme yüzdeleri. ±: SE	47
Şekil 4.6. SA (mM) ön uygulaması yapıldıktan sonra farklı MG ortamında çimlenen mısır tohumlarının kök-gövde uzunlukları. ±: SE	47

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan grupların tablosu	33
Çizelge 4.1. H ₂ S (mM NaHS olarak) ön muamelesinden sonra MG (mM) stresine maruz bırakılan bitkilerin kök ve gövdelerinde Gly I aktivitesi bulguları. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir.....	50
Çizelge 4.2. SNP (µM) ön muamelesinden sonra MG (mM) stresine maruz bırakılan fidelerin kök ve gövdelerinde Gly I aktivitesi bulguları. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir	51
Çizelge 4.3. SA (mM) ön muamelesinden sonra MG (mM) stresine maruz bırakılan fidelerin kök ve gövdelerinde Gly I aktivitesi bulguları. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir	52
Çizelge 4.4. H ₂ S(mM NaHS olarak) ön muamelesinden sonra MG (mM) stresine maruz bırakılan bitkilerin kök ve gövdelerinde Gly II aktivitesi bulguları. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir	53
Çizelge 4.5. SNP(µM) ön muamelesinden sonra MG stresine maruz bırakılan bitkilerin kök ve gövdelerinde Gly II aktivitesi bulguları. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir	54
Çizelge 4.6. SA(mM) ön muamelesinden sonra MG (mM) stresine maruz bırakılan bitkilerin kök ve gövdelerinde Gly II aktivitesi bulguları. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir	55
Çizelge 4.7. SA (mM) ön muamelesine tabi tutulup daha sonra MG (mM) stresine maruz bırakılan bitkilerin kök ve gövdelerinde içsel MG miktarı bulguları. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir.....	57

Çizelge 4.8. H ₂ S (mM NaHS olarak) ön muamelesine tabi tutulup daha sonra MG (mM) stresine maruz bırakılan bitkilerin kök ve gövdelerinde içsel MG bulguları. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir.....	58
Çizelge 4.9. SNP (µM) ön muamelesine tabi tutulup daha sonra MG (mM) stresine maruz bırakılan bitkilerin kök ve gövdelerinde MG içeriği bulguları. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir	59
Çizelge 4.10. SA (mM) ön uygulamasından sonra MG (mM) stresine maruz bırakılan bitkilerin kök ve gövdelerindeki SODaktivitesi bulguları. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir	61
Çizelge 4.11. H ₂ S (mM NaHS olarak) ön uygulamasından sonra MG (mM) stresine maruz bırakılan bitkilerin kök ve gövdelerine aitSOD aktivitesi bulguları. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir	62
Çizelge 4.12. SNP(µM) ön uygulamasından sonra MG (mM) stresine maruz bırakılan bitkilerin kök ve gövdelerinde SOD aktivitesi bulguları. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir	63
Çizelge 4.13. SA(mM) ön muamelesinden sonra MG'ye(mM)maruz bırakılan bitkilerin kök ve gövdelerindeki CAT aktivitesi. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir	65
Çizelge 4.14. SNP(µM) ön muamelesinden sonra MG(mM)'ye maruz bırakılan bitkilerin kök ve gövdelerindeki CATaktivitesi. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir	66
Çizelge 4.15. H ₂ S(mM NaHS olarak) ön uygulamasından sonra MG(mM) stresine maruz bırakılan bitkilerin kök ve gövdelerindeki CAT sonuçları. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir	67
Çizelge 4.16. H ₂ S(mM NaHS olarak) ön uygulamasından sonra MG(mM) stresine maruz bırakılan bitkilerin kök ve gövdelerinde APX	

aktivitesi bulguları. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir	69
Çizelge 4.17. SNP(μ M) ön muamelesine tabi tutulup daha sonra MG (mM) stresine maruz bırakılan bitkilerin kök ve gövdelerinde APX aktivitesi bulguları. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir	70
Çizelge 4.18. SA (mM) ön muamelesine tabi tutulup daha sonra MG stresine maruz bırakılan bitkilerin kök ve gövdelerinde APX aktivitesi bulguları. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir	71
Çizelge 4.19. H ₂ S (mM NaHS olarak) ön muamelesine tabi tutulup daha sonra MG (mM) stresine maruz bırakılan bitkilerin kök ve gövdelerinde GR aktivitesi bulguları. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir	73
Çizelge 4.20. SA(mM) ön muamelesine tabi tutulup daha sonra MG (mM) stresine maruz bırakılan bitkilerin kök ve gövdelerinde GR aktivitesi bulguları. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir	74
Çizelge 4.21. SNP(μ M) ön muamelesinden sonra MG (mM) stresine maruz bırakılan bitkilerin kök ve gövdelerinde GR aktivitesi bulguları. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir	75
Çizelge 4.22. SNP (μ M) ön muamelesine tabi tutulup daha sonra MG (mM) stresine maruz bırakılan bitkilerin kök ve gövdelerinde GPX aktivitesi bulguları. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir	77
Çizelge 4.23. H ₂ S(mM NaHS olarak) ön muamelesine tabi tutulup daha sonra MG (mM) stresine maruz bırakılan bitkilerin kök ve gövdelerinde GPX aktivitesi bulguları. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir	78
Çizelge 4.24. SA(mM) ön muamelesine tabi tutulup daha sonra MG (mM) stresine maruz bırakılan bitkilerin kök ve gövdelerinde GPX	

aktivitesi bulguları. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir	79
Çizelge 4.25. H ₂ S (mM MaHS olarak) ön muamelesine tabi tutulup daha sonra MG (mM) stresine maruz bırakılan bitkilerin kök ve gövdelerinde H ₂ O ₂ miktarı (nmol/mL) bulguları. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir	81
Çizelge 4.26. SNP (μM) ön muamelesine tabi tutulup daha sonra MG (mM) stresine maruz bırakılan bitkilerin kök ve gövdelerinde H ₂ O ₂ miktarı (nmol/mL) bulguları. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir	82
Çizelge 4.27. SA (mM) ön muamelesinden sonra MG (mM) stresine maruz bırakılan bitkilerin kök ve gövdelerinde H ₂ O ₂ miktarı (nmol/mL) bulguları. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir	83
Çizelge 4.28. H ₂ S (mM NaHS olarak) ön uygulamasından sonra MG (mM) stresine maruz bırakılan bitkilerin kök ve gövdelerinde O ₂ ⁻ içeriği (nmol/mL) bulguları. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir	84
Çizelge 4.29. SA (mM) ön uygulamasından sonra MG (mM) stresine maruz bırakılan bitkilerin kök ve gövdelerinde O ₂ ⁻ içeriği (nmol/mL) bulguları. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir	85
Çizelge 4.30. SNP (μM) ön uygulamasından sonra MG (mM) stresine maruz bırakılan bitkilerin kök ve gövdelerinde O ₂ ⁻ içeriği bulguları. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir	86
Çizelge 4.31. SNP (μM) ön muamelesine tabi tutulup daha sonra MG (mM) stresine maruz bırakılan bitkilerin kök ve gövdelerinde MDA içeriği bulguları. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir	88
Çizelge 4.32. SA (mM) ön muamelesinden sonra MG (mM) stresine maruz bırakılan bitkilerin kök ve gövdelerinde MDA içeriği bulguları.	

Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir	89
Çizelge 4.33. H ₂ S(mM NaHS olarak) ön muamelesinden sonra MG (mM) stresine maruz bırakılan bitkilerin kök ve gövdelerinde MDA içeriği bulguları. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir.....	90



1. GİRİŞ

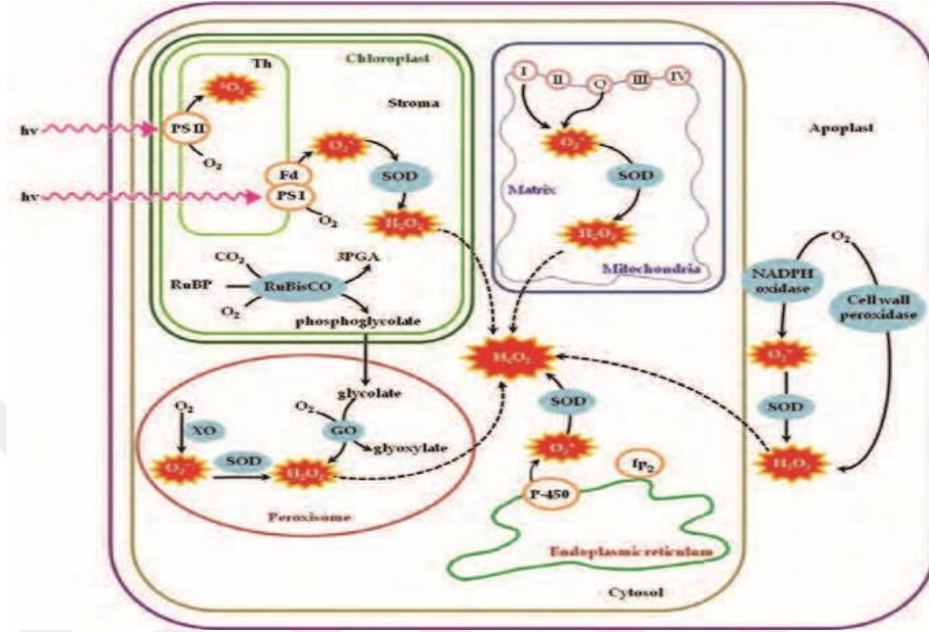
Doğal ekosistemlerinde stressiz yaşam sürdüren bitkilerin varlığını düşünmek pek olası değildir. Stres faktörleri, bitkilerin yaşamlarının herhangi bir döneminde ortaya çıkarak onları etkileyebilir, bitki türlerine göre farklı tepkilerin alınmasına yol açabilir, diğer bir ifadeyle farklı bitki türlerini farklı derecede etkileyebilir. Örneğin çoğu bitkiler, sürekli olarak kuraklık, sel, sıcaklık (düşük veya yüksek), yüksek tuz, ağır metaller, yüksek ışınlama, patojenik veya allelokimyasal ajanların neden olduğu olumsuz çevresel koşullara maruz kalmaktadırlar. Bu nedenle, doğal ekolojik nişlerinde yaşayan bitkiler, genellikle fizyolojik optimimlerinden (en azından yaşam döngüsünün bir bölümünde) nispeten daha uzakta yaşarlar. Bir bitkinin belirli fizyolojik parametreleri (su veya besin emilimi, fotosentez, solunum, büyüme, gelişme, üreme veya diğerleri) optimal koşullar altında ifade edilen azami oranın altına düştüğü zaman, açıkça onun stres altında olduğunu söyleyebiliriz. Doğada çok farklı biyotik ve abiyotik çevre etmenleri bitkilerde strese neden olabilir (Salisbury and Ross 1992; Reigosa *et al.* 2006). Kuraklık, ağır metal toksisitesi, tuzluluk ve aşırı sıcaklıklar gibi abiyotik stresler, dünya çapında ürün verimini %50'den fazla düşüren kritik faktörlerdir (Wanget *et al.* 2003). Günümüzde iklimde görülen küresel değişimler, ekilebilir arazilerin giderek bozulması, dünya nüfusunun sürekli artışı ve tatlı su kıtlığı gibi streslerin küresel çapta artması, stresli ortamlarda büyüeyebilen ve verimliliği sürdürebilen bitkileri geliştirmenin önemini giderek daha da artırmaktadır (Ahuja *et al.* 2010; Dubey *et al.* 2018).

Günümüzde bitkilerde stres esnasında değişen biyokimyasal yolların genel karmaşık ilişkilerini bilmekle birlikte, bu karmaşıklığı anlamaktan hala çok uzağız. Bu nedenle, biyotik ve abiyotik stresler esnasında farklı biyokimyasal yolların etkileşimine yönelik biyokimyasal ve moleküler cevapların anlaşılması, stresli koşullar altında bitki direnç mekanizmalarının değerlendirilmesi için oldukça önemlidir. Örneğin sürekli değişken çevreye maruz kalan toleranslı bitkiler, içsel homeostasiyi dengede tutabilmek için metabolik sistemlerini eşsiz bir şekilde düzenleyecek cevap mekanizmaları bulundururlar. Böyle koşullar altındaki bitkiler, bazı önemli stres indikatörleri sentezler. Bu bileşiklerin içsel seviyeleri değerlendirilerek, bitkinin strese toleransı veya cevap

stratejileri hakkında veriler elde etmek mümkündür. Örneğin, stres koşullarında bitkide metabolik yolların bozulmasından veya düzensizliğinden dolayı, hücrelerde yüksek düzeyde oksidatif hasara neden olan bazı toksik bileşiklerin seviyesinde büyük bir artış olur. Bunların en başında Reaktif Oksijen Türleri (ROS) ve Reaktif Karbonil Bileşikleri gelir (RCS) (Apel and Hirt 2004).

ROS veya serbest radikaller bir veya daha fazla eşlenmemiş elektronsa sahip, yarılanma ömrü kısa, yüksek seviyede kararsız ve reaktif bileşiklerdir. ROS hücrelerde membranlipidleri, DNA, karbohidratlar ve proteinler gibi biyomoleküllere zarar vererek hücrede toksik etki gösterirler (Noctor and Foyer 1998; Apel and Hirt 2004; Banu *et al.* 2009; Guo *et al.* 2009). ROS'lar arasında süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2), singlet oksijen (1O_2) ve hidroksil radikali ($^{\cdot}OH$) gibileri sayılabilir. Olumsuz abiyotik koşullar, oksidatif stresin başlamasına ve dolayısıyla $O_2^{\cdot-}$, radikali, $^{\cdot}OH$ radikali ve H_2O_2 gibi ROS oluşumuna ve bunların hücre sistemlerinde temizlenmesine yol açan hücrel homeostazi bozmaktadır. Çok güçlü metabolik aktiviteye sahip olan veya peroksizom, mitokondri ve kloroplast gibi yoğun bir elektron akış hızı olan organeller (Şekil 1.1), bitki hücrelerinde ROS üretiminin başlıca kaynaklarıdır (Mittler *et al.* 2004). Örneğin kloroplastta fotosentez esnasında güneş ışığından foton enerjisi yakalanır ve iki ışık hasat (pigment sistemi) kompleksi olan fotosistem I (PSI) ve fotosistemII'ye (PSII) aktarılır. Esasen PSI'in Fe-S merkezlerinden veya indirgenmiş Ferredoksin (Fd) O_2 'ye (Mehler tepkimesi) elektron sızıntısı ile oluşan $O_2^{\cdot-}$ radikali, SOD tarafından H_2O_2 'ye dönüştürülür (Gech ev *et al.* 2006).Özetle $O_2^{\cdot-}$ radikali, çoğunlukla kloroplastta PSI ve PSII'deki elektron taşıma zincirlerinden elektronların moleküler oksijene (O_2) transferiyle oluşur (Sgherri *et al.* 1996). Bu reaktif enzimatik tepkimelerin bir sonucu olarak da türetilir. Oldukça reaktif yani saldırgan olan $O_2^{\cdot-}$ radikali lipidler dahil diğer biyomoleküllerin oksidasyonunu tetikler. Örneğin, bu radikalin başlıca lipidperoksidasyonu, hücrel membranların bozulması, diğer reaktif toksik ürünlerin oluşması ve DNA yapısında tek zincir üzerinde kırılmaya neden olduğu rapor edilmiştir (Fridovich 1995; Asada 2006). Bu toksik radikal H_2O_2 ile etkileşerek daha toksik bir bileşik olan $^{\cdot}OH$ radikalinin üretilmesini uyarır. Haber-Weiss tepkimesi olarak bilinen

bu olay, Fe^{++} ve Cu^+ gibi ağır metal katalizörlerin varlığında oldukça hızlı olur (Halliwell and Gutteridge 1999; Desikan *et al.* 2005).



Şekil 1.1. Bir bitki hücresinde ROS'un üretildiği genel yerler (Mhamdi *et al.* 2010)

Diğer taraftan aşırı ışık koşulları altında PSII, triplet durumundaki klorofilden enerji transferi ile $^1\text{O}_2$ üretebilir (Asada 2006). $^1\text{O}_2$, moleküler oksijenin yüksek bir enerjili formu olup eşleşmiş 2 elektronu aynı orbitalde ya da farklı orbitallerde birbirine zıt spinler formunda bulundurulur. Diğer radikallerdeki gibi eşleşmemiş elektronu olmadığından radikal olarak tanımlanmaz, ancak oksidatif kapasitesi bir hayli yüksektir. $^1\text{O}_2$, diğer moleküllerle etkileşime girdiğinde ya yüksek enerjisini transfer eder ya da moleküllerde kovalent tepkimeler oluşturur. Spesifik olarak bileşiklerin yapısında karbonlar arasındaki çift bağları, $^1\text{O}_2$ ile tepkimeye giren kimyasal bağlardır. Bu nedenle, $^1\text{O}_2$ birçok biyomolekülle tepkimeye girebildiğinden, yüksek seviyede toksiktir ve organizmada büyük hasarlara yol olan temel reaktif oksijen türlerinden sayılır (Cadenas 1989; Durmuş 2003). $^1\text{O}_2$ çoklu doymamış (poliansature) yağ asitleri ile de tepkimeye girerek peroksit radikalinin oluşumunu katalize eder ve neredeyse $\cdot\text{OH}$ kadar etkin bir şekilde lipid peroksidasyonunu (LPO) başlatır (Minibaeva and Gordon 2009).

Süperoksit radikali göre daha az toksik olan H_2O_2 , oksijenin enzimatik olarak 2 elektron alıp indirgenmesi veya enzimatik olmayan dismutasyon tepkimeleri sonucu açığa çıkar. Örneğin peroksizomlarda, H_2O_2 esas olarak fotorespirasyon sırasında ve ayrıca yağ asitlerinin β -oksidasyonu sırasında da üretilir. Özetle, karbon asimilasyonu (Calvin çevrimi) esnasında ribuloz-1,5-bifosfatın (RuBP) karboksilasyonunu katalize eden ribuloz-1,5-bifosfat karboksilaz/oksijenaz (RuBisCO) enzimi, ribuloz-1,5-bifosfatı oksitlemek için O_2 'yi de kullanabilir (fotorespirasyon). Kloroplasttaki CO_2 fiksasyonunu bozan abiyotik stres koşulları altında, RuBisCO'nun bu oksijenaz aktivitesi artar ve üretilen glikolat (glikolik asit), kloroplasttan peroksizomlara hareket eder. Burada glikolat, glikolatoksidazın katalizörlüğünde O_2 ile oksitlenerek glioksalat oluşturulur. Bu esnada H_2O_2 bir yan ürün olarak açığa çıkar (Takahashi and Murata 2008). Mitokondriyal elektron taşıma zincirinde (ETS) ROS üretimi, esas olarak kompleks I (NADH dehidrogenaz) ve Ubikinon (UQ) çevriminde meydana gelir (Blokhina and Fagerstedt 2006). Peroksizomlarda ise H_2O_2 doğrudan O_2 'den SOD'a bağlı ksantinoksidaz gibi enzim sistemleri ile oluşturulabilir (Mhamdi *et al.* 2010). Bitki hücrelerinde glikosizomlarda ise açıl-CoAoksidaz, H_2O_2 üretiminden sorumlu birincil enzimdir. Plazma membranına bağlı NADPH oksidazların yanı sıra hücre duvarı ile bağlantılı peroksidazlar da H_2O_2 ve $O_2^{\cdot-}$ üreten apoplastik enzimlerin ana kaynağıdır (Mhamdi *et al.* 2010). H_2O_2 yapısında eşleşmemiş elektron bulundurmadığından radikal olarak kabul edilmez. H_2O_2 'nin oksidatif bir ajan olarak değerlendirilmesinin nedeni, Fe^{++} ve Cu^+ gibi ağır metal iyonlarının varlığında $^{\cdot}OH$ tetikleyicisi olarak davranmasındandır. Bu reaktif oksijen bileşiği, özellikle *HEM* içeren proteinlerde Fe ile etkileşerek yüksek derecede reaktif Fe formlarını oluşturur. Bu formdaki Fe, çok güçlü oksidatif yapıya sahip olup, hücresel membranlarda LPO gibi oksidatif yani ölümcül radikal tepkimeleri başlatabilir (Minibaeva and Gordon 2003). Son derece reaktif olan $^{\cdot}OH$ radikali, fotosentetik pigmentler, lipidler, protein ve DNA dahil olmak üzere membranlar ve diğer makromoleküllerin aşırı oksidatif hasarına neden olur (Foyer and Noctor 2005). $^{\cdot}OH$ radikali, yukarıda ifade edilen ROS'lar içerisinde en reaktif ve en zararlı olanıdır (Kehrer 2000; Gechev *et al.* 2006). Bu radikal birçok inorganik ve organik biyomolekül ile etkileşebilir. İlave olarak iyonize edici radyasyonun (x ve gama ışınları gibi) su moleküllerini parçalaması sonucu olduğu gibi H_2O_2 'nin metaller ile etkileşmesi ile eksik indirgenen OH iyonunun sonucunda da oluşabilir. Biyolojik

sistemlerde en reaktif radikal olan $\cdot\text{OH}$, rastladığı hemen her molekülle reaksiyona girebilir. Bunun en önemli sebebi $\cdot\text{OH}$ 'ın eşleşmemiş elektron taşıyan dış orbitaline bir elektron alma isteğindendir (Halliwell 1984; Nishiyama *et al.* 1998; Foyer and Noctor 2005).

Bitkiler, hücrelerde aşırı üretilen ve toksik seviyelere ulaşan ROS seviyelerini kontrol etmek için, bir savunma mekanizması olarak, antioksidan sistemi gibi güçlü mekanizmalara sahiptirler. Bu antioksidanlar arasında askorbat peroksidaz (APX), süperoksit dismutaz (SOD), mono dehidroaskorbat redüktaz (MDHAR), dehidroaskorbat redüktaz (DHAR), glutatyon peroksidaz (GPX), katalaz (CAT), glutatyon redüktaz (GR), glutatyonS-transferaz (GST) enzimatik olanlardır (Apel and Hirt 2004; Hossain and Fujita 2011; Tiryaki *et al.* 2019; Atıcı and Genç 2019).

Hücrelerde SOD (EC 1.15.1.1) enzimi, $\text{O}_2^{\cdot-}$ radikalinin H_2O_2 ve oksijene dönüşümünü katalize eden büyük bir metaloproteindir (Minibaeva and Gordon 2003; Hossain and Fujita 2011). SOD'un sitoplazmada ve mitokondride farklı iki izoenzimi bulunur (Atıcı and Genç 2019). SOD'lar, süperoksidin detoksifikasyonunu gerçekleştirmesinin bir sonucu olarak metallerin katalizlediği Haber-Weiss tepkimesiyle $\cdot\text{OH}$ radikalinin meydana gelme riskini düşürür. Buna ilave olarak, ROS'lara karşı antioksidan sisteminin ilk savunma hattı olup, aerobik organizmaların hepsinde ve oksijen üreten/tüketen tüm hücre sistemlerinde bulunur. Bu antioksidan enzimin katalitik aktivitesinin abiyotik ve biyotik streslere cevap esnasında arttığı ve bunun strese dirençle yüksek ilgisinin olduğu belirtilmiştir (Apel and Hirt 2004; Hossain and Fujita 2011).

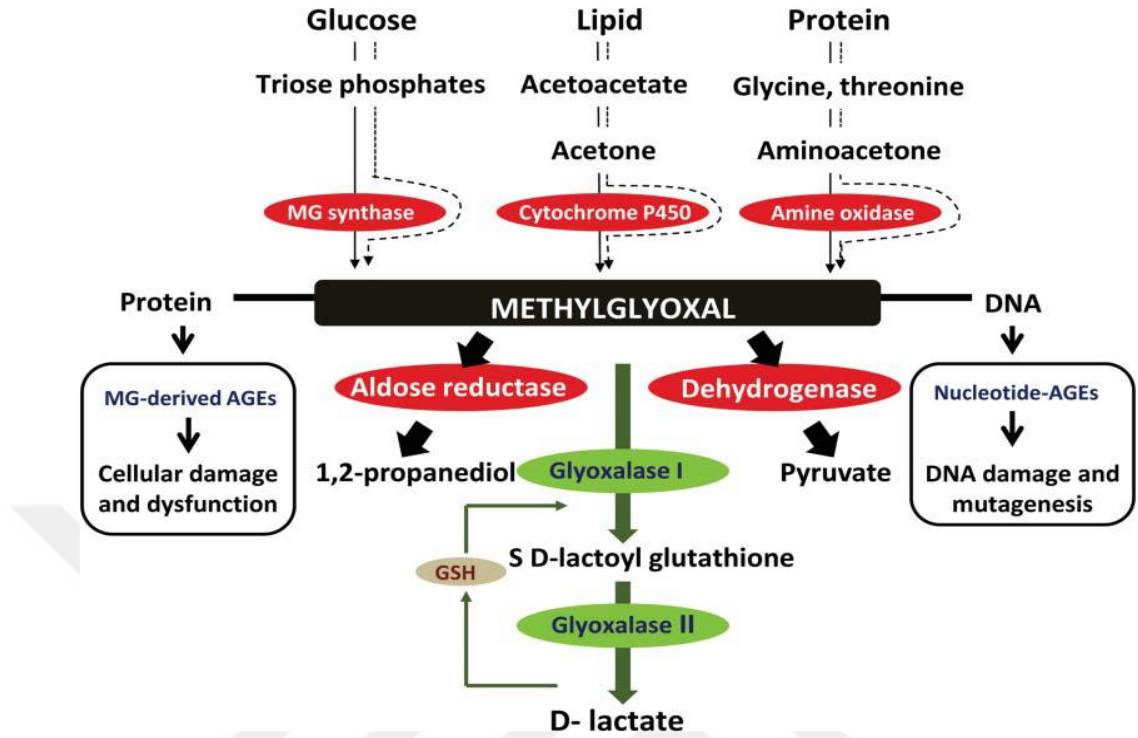
APX (EC 1.11.1.11), askorbat (AsA)-glutatyon (GSH) döngüsünün en önemli enzimlerinden biridir ve H_2O_2 'nin H_2O 'ya dönüşümünü katalize ederek oksidatif strese karşı bitki savunmasında hayati bir rol üstlenir. APX aktivitesi ve APX izoenzim gen ifadesi, aynı stres koşulları altında bile değişkendir ve bazıları normal ve oksidatif stres koşullarında H_2O_2 'nin derhal ve etkili bir şekilde detoksifikasyonu için ifade edilir (Ishikawa and Shigeoka 2008; Hossain and Fujita 2011). AsA-GSH döngüsünün en

önemli bileşenlerinden biri olan MDHAR (EC 1.6.5.4), monodehidroaskorbat'ı (MDHA) AsA'ya indirgemek için NADPH'yi bir elektron vericisi olarak kullanan monomerik bir enzimdir (Hossain *et al.* 1984). AsA ile APX'in oksidasyonu, kısa ömürlü bir MDHA radikalinin oluşumuna yol açar, bu MDHAR tarafından AsA'ya dönüştürülür veya non-enzimatik olarak AsA ve dehidroaskorbata (DHA) ayrışır. DHA, indirgeyici olarak GSH'yi gerektiren DHAR tarafından (EC 1.8.5.1) AsA'ya dönüştürülür (Chen *et al.* 2003). Wang *et al.* (2010) *Arabidopsis thaliana*'daki DHAR'ın aşırı ekspresyonunu yapan mutantların AsA ve GSH düzeylerinin arttırdığını ve yabancı tiplere göre bunların yüksek sıcaklık ve yüksek ışık ile indüklenen oksidatif stres toleranslarının yüksek olduğunu ileri sürmüşlerdir. GR(EC 1.6.4.2), NADPH'ı kullanarak okside glutatyonu (GSSG) indirgen glutatyona (GSH)dönüşümünü katalize eden bir flavoproteinoksidoredüktazdır. Keşif ve karakterize edilen ilk antioksidan enzimlerden olan CAT (EC 1.11.1.6), H₂O₂ süpürmek için glioksizomlar ve ağırlıklı olarak peroksizomlarda lokalizedir (Purev *et al.* (2010). Bitki hormonları, ağır metaller, ozmotik ajanlar, UV ve yüksek/düşük sıcaklık gibi çeşitli streslere yanıt olarak CAT geninin upregülasyonunu bildirmiştir. Bununla birlikte, çeşitli streslere yanıt olarak CAT aktivitesinde bir azalma da bildirilmiştir (Hossain *et al.* 2011; Hasanuzzaman *et al.* 2011a). GPX (EC 1.11.1.9), farklı hücre altı organellerde bulunan bitkilerdeki antioksidan ağı için önemli antioksidan enzimlerdir. Temel faaliyetlerinin, organik hidroperoksitler (ROOH), lipidhidroperoksitler ve H₂O₂'nin, GSH ve/veya diğer indirgeyici eşdeğerleri kullanarak H₂O ve alkole indirgenmesini katalize eder (Foyer and Noctor 2011). En belirgin bitki GPX genlerinin yüksek homolog lipidhidroperoksitlere H₂O₂'den daha yüksek bir afiniteye sahip olan memeli fosfolipidhidroperoksitglutatyonperoksidazlarına (PHGPX) benzerlik göstermektedir. Bununla birlikte, en az iki bitki PHGPX muhtemelen, lipid peroksitlere göre H₂O₂'ye karşı daha aktif olan TRX peroksidazın yeni izoformlarını temsil etmektedir (Foyer and Noctor 2005).GPX'i aşırı ifade eden transgenik bitkilerin, tuzluluk, kuraklık ve ağır metal gibi çevresel stres koşullarına ve oksidatif strese karşı daha toleranslı oldukları ileri sürülmüştür (Gaberet *et al.* 2006). GST'ler (EC 2.5.1.18), ksenobiyotiklerin enzimatik detoksifikasyonunda rolleri için en iyi bilinen çok fonksiyonlu enzimlerin süper ailesi içinde yer alırlar. Ek olarak, bitki GST'leri, abiyotik stresler ve oksidanlar tarafından indüklenen oksidatif strese karşı da koruma sağlar (Dixon and Edwards 2010). AsA

bitki hücrelerinde güçlü ve en bol antioksidanlardan biridir. Farklı hücre altı organellerde ve apoplastta çeşitli biyotik ve abiyotik stresler tarafından üretilen ROS'lara karşı savunmada ayrılmaz bir silahtır. AsA bir dizi hücrel redoks reaksiyonunda elektronları ifade etme yeteneğine sahiptir ve önemli bir hücrel redoks düzenleyici antioksidan olarak görev yapar. AsA direkt olarak $\cdot\text{OH}$, $^1\text{O}_2$ ve $\text{O}_2\cdot^-$ radikallerini temizleyebilir ve α -kromanoksil radikalinden α -okoferolü yeniler, böylece membranlara koruma sağlar (Thomas *et al.* 1992). Strese dayanıklı bitkilerin, duyarlı bitkilerden daha yüksek AsA düzeylerine sahip oldukları gösterilmiştir (Mittova *et al.* 2003; Shalata *et al.* 2001). Bir tiyoltripeptidolan GSH, tüm hücre bölmelerinde bol miktarda bulunan bitkilerdeki ana antioksidan ve redoks tamponlarından biridir. GSH, AsA-GSH çevrimi yoluyla H_2O_2 seviyelerinin kontrolünde yer alır (Foyer and Noctor 2005). Ayrıca, $\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2\cdot^-$, ve $^1\text{O}_2$ ile reaksiyona girerek doğrudan bir serbest radikal süpürücü olarak da işlev görebilir (Larson 1988). Ayrıca, GSH hücre farklılaşması, hücre yaşlanma ve ölümleri, patojen direnci ve enzimatik düzenlemeyi içeren bitkilerdeki bazı büyüme ve gelişme olaylarıyla ilişkilendirilmiştir. GSH genlerinin yukarı regülasyonu, GSH ve AsA ile ilgili enzimleri kodlayan genlerin düzenlenmiş aktivasyonunu içeren çeşitli kontrol noktaları ile farklı yollarla oluşan Metilglioksal (MG) ve ROS'a karşı sinyal iletimini ve savunmasını uyardığı için çok önemli bir yere sahiptir (Hossain and Fujita 2011). Tuzluluk ve Cd stresine maruz kalan mung fasulyesi, kolza tohumu ve buğday fidelerinde GSH içeriğinde bir artış tespit edilmiştir (Hossain *et al.* 2010; Hasanuzzaman *et al.* 2011). Ancak, kuraklığa dayanıklı bir pirinç genotipi GSH içeriğinde bir artış gösterirken, duyarlı genotipte GSH içeriği azalmıştır (Selote and Khanna-Chopra 2004).

Yukarıda ifade edildiği gibi stres altındaki bitkiler, diğer bir stres indikatörü olarak yüksek oranda reaktif karbonil bileşikler (RCS) üretirler. Bitki hücrelerinde RCS'ler arasında en önemlilerinden birisi de MG'dir. Bitki hücrelerinde ROS'ların sentezi, detoksifikasyon mekanizmaları ve biyokimyasal ile fizyolojik etkileri genelde iyi bilinse de MG'nin fizyolojik etkileri bitki biyologları tarafından ROS bileşikler kadar çok fazla bilinmeyip üzerinde de yeterli araştırmalar bulunmamaktadır (Kumar and Yadav 2009; Hossain *et al.* 2011). MG ilk olarak 1887 yılında Von Pechmann tarafından

keşfedilmiş ve etkileri konusunda özellikle hayvansal organizmalar üzerinde yoğun araştırmalar yapılmıştır. Yapısal olarak bir α,β -dikarbonilaldehid olan MG, sahip olduğu karbonil grubu, yüksek reaktivitesi nedeniyle hücrelerde metabolik işlevlerin tamamen bozulmasına neden olan güçlü bir metabolik toksindir. Yüksek konsantrasyonda MG, özellikle hücresel proteinlerde amino ve sülfhidril gruplarını geri döndürülemez bir biçimde modifiye eder ve sonuç olarak hücrelerde mutajenik protein ürünlerinin oluşumuna neden olur (Yadav *et al.* 2008; Kauret *et al.* 2014). İleri Glikasyon Son Ürünleri (AGE) olarak adlandırılan bu modifiye proteinler, biyokimyasal işlevlerini kaybederler. Bu hücrelerde protein metabolizmasında büyük sorunlara yol açar. MG ayrıca nükleik asitlerde guanil nükleotidleri ile reaksiyona girerek imidazopurinone türevlerini (DNA hasarının belirteçleri) oluşturur. Bu da DNA ve onun gen ürünlerinde hasarlara ve mutasyona neden olur (Espartero *et al.* 1995; Singla-Pareek *et al.* 2003). MG toksisitesi ile ilişkili protein modifikasyonları genellikle hücresel antioksidan sistemlerin işlev bozukluğuna da neden olur. İlginç olan ise MG'nin canlı sistemlerde hem enzimatik hem de enzimatik olmayan (spontane) metabolik reaksiyonların bir sonucu olarak endojen (Şekil 1.2) üretilmesidir (Kalapos 1999). Eskiden beri MG'nin glikolitik yola sıkıca bağlı olduğu ve bu nedenle üretiminin kaçınılmaz olduğuna inanılmaktadır. Bildiğimiz gibi solunumun glikoliz evresi, bitkiler de dahil tüm canlılarda şekerlerden hücresel enerji kaynaklarının (yani NADH ve ATP) üretilmesi için önemli katabolik bir yoldur. Bununla birlikte bu yol, yan ürünler olarak MG gibi RCS bileşiklerini de üretir. MG, protein (azot metabolizması) ve yağ asidi metabolizmasının bir yan ürünü olarak üretilse de glikolitik yolda (glikoliz), triozfosfatlardan gliseraldehid-3-fosfat (GAP) ve dihidroksiaseton fosfatın (DHAP) parçalanması en önemli ve en fazla MG üreten metabolik reaksiyonlardır (Şekil 1,2). Burada, ilk olarak, triozfosfatizomeras (TPI) enzimi DHAP ve GAP arasındaki denge reaksiyonunu katalize ederek MG'yi üretir. İkincisi, DHAP enzimatik olarak MG üretmek için GAP ile reaksiyona girer ve sonuçta hücrelerde MG birikimi artar (Thornalley 1996; Kalapos 1999).



Şekil 1.2. Metilglükoksal sentezinde yer alan basamaklar, biyolojik etkileri ve glioksalaz sistemi ile detoksifikasyonu (Kaur *et al.* 2014)

Tüm canlı sistemlerde olumsuz koşullar altında (stres koşullarında) içsel MG seviyesi tolere edilebilen eşik konsantrasyondan çok daha yüksek seviyelerde birikir. MG'nin yüksek seviyeleri, bitkiler için güçlü bir stres faktörü olarak kabul edilir (Yadav *et al.* 2008; Hoque *et al.* 2010). Genellikle stres altında glikoliz reaksiyonlarındaki aşırı dengesizliğin triozfosfatların bozunmasına yol açtığı ve bu bozuk triozların 1,2-enediolatından fosforil grubunun β -eliminasyon ile ortadan kaldırılmasının aşırı MG oluşumuna yol açtığı öne sürülmektedir. Ancak bitkilerde, tüm canlı sistemlerde olduğu gibi, olumsuz koşullar altında artan 'MG stresi' ile mücadele etmek için, hücrelerde bir savunma stratejisi olarak Glioksalaz Sistemi bulunur. Birçok çalışma, glioksalaz sisteminin MG'nin içsel seviyesini düşürerek streslere toleransı artırmada etkisini ortaya koymuştur (Saxena *et al.* 2005, 2011; Hoque *et al.* 2010; Viveros *et al.* 2013). Glioksalaz sisteminin bulunmasından bu yana seksen yıldan fazla zaman geçmesine rağmen, yine de farklı biyolojik sistemlerdeki fizyolojik rolü tam olarak anlaşılamamış durumdadır (Kaur *et al.* 2014).

Glioksalaz sistemi, başlıca glioksalaz I (GlyI) ve glioksalaz II (Gly II) enzimlerini içeren ve MG'nin glutatyona (GSH) bağımlı detoksifikasyonunu gerçekleştiren metabolik bir yoldur. Gly I, Lactoylglutathionelyase (EC 4.4.1.5) ve Gly II Hidroksiasilglutathionehydrorolase (EC 3.1.2.6) olarak bilinen iki enzimdir. MG'nin etkili detoksifikasyonu, Gly I ve Gly II enzimlerinin ardışık katalitik aktivitesi ile gerçekleştirilir. Gly I, GSH ve MG arasındaki etkileşimin bir sonucu olarak MG'nin S-laktoilglutatyona dönüşmesini katalize eder. Burada oluşan S-laktoilglutathion, Gly II tarafından D-laktata ve GSH'ye dönüştürülür. Bitkilerde glioksalaz sistemi varlığı ilk olarak *Dougloufirni* yapraklarında (Smitsand Johnson 1981) belirlenmiş ve bundan sonra mısır, buğday ve sorgum gibi çeşitli monokotlara ilave olarak soya fasulyesi, ıspanak, nohut, tütün, *Brassica* ve bezelye gibi kültür bitkilerinde de belirlenmiştir (Kauret *et al.* 2014). Gly I enzim aktivitesinin soya fasulyesinde (Paulus *et al.* 1993) ve *Amaranthuspaniculatus*'da (Chakravarty and Sopory 1990) hücre çoğalması ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir. Gly-I'i kodlayan genler, domates (Espartero *et al.* 1995), kabak (Hossain *et al.* 2009), soğan (Hossain and Fujita 2009) ve buğday dahil olmak üzere birkaç bitki türü içerisinde izole edilmiş ve abiyotik stres cevabında kritik bir rol oynadığı ileri sürülmüştür (Lin *et al.* 2010).Yukarıda da ifade dildiği gibi glioksalaz sistem, glikasyon ve oksidatif strese karşı hücrel savunmada çok önemli bir rol oynamaktadır. Bu yüzden, günümüzde glioksalazların aktivitesi ve MG içeriği, bitki stres cevapları için potansiyel belirteçler olarak değerlendirilmektedir (Kaur *et al.* 2014).

MG toksitesinin bitki büyüme ve gelişmesinde önemi ve neden olduğu zararlar yukarıda ifade edilmiştir. Ancak yapılan dikkatli literatür incelemelerimize göre, bitkilerde MG toksitesinin yatıştırılmasında, bitkilerin stres cevabında önemli sinyal bileşiklerinden olan Nitrikoksit (NO), Salisilik asit (SA) ve Hidrojen sülfürün (H₂S) etkileri hakkında literatürde neredeyse hiçbir bilgi bulunmamaktadır.

Nitrik oksit ya da azot monoksit (NO) uzun yıllardan beri bilim dünyasında bilinen gaz yapısında olan bir moleküldür. Bitkilerde NO salınımı ve bitki büyümesi üzerine olan etkileri ilk kez 1970'li yıllarda tanımlanmıştır. İlk defa memeli hücrelerinde, daha sonra

da bitkilerde NO'nun büyüme ve gelişme süreçlerinde, abiyotik ve biyotik stres cevaplarının oluşmasında haberci molekül olduğu ileri sürülmüştür (Graziano and Lamattina 2005). NO, normal şartlarda bitki hücrelerinde çok düşük miktarda sentezlenir. NO sentezi bitki türüne, dokusuna, bulunduğu büyüme koşullarına bağlı olarak değişebilmektedir. NO sentezinde enzimatik ve enzimatik olmayan başlıca iki metabolik yol bulunmaktadır. Enzimatik yolda, *L*-argininin NO ve *L*-sitruline dönüşümü nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi tarafından katalizlenir. NOS'un bezelye yapraklarında kloroplast ve peroksizomların matriksinde bulunduğu gösterilmiştir (Barroso *et al.* 1999; Pedroso *et al.* 2000). Diğer enzimatik yolda ise NO üretiminin başlıca kaynağı NADP(H)'a bağımlı nitrat redüktaz (NR) enzimidir. Kofaktör olarak molibden (Mo^{++}) içeren bu enzim elektron vericisi NADP(H)'ı kullanarak NO_2 'den NO üretimini katalizlemektedir (Yamasaki and Sakihama 2000; Lamattina *et al.* 2003). Bitkilerde NO üretiminin diğer enzimatik kaynakları ksantinoksidoredüktaz (XOR), peroksidaz, sitokrom P450 ve bazı Fe^{++} içeren proteinler olduğu ileri sürülmüştür. XOR'un bezelye yaprak peroksizomlarında bulunduğu ve bitkilerde haberci molekül olarak NO üretiminde anahtar rol oynadığı gösterilmiştir (Corpas *et al.* 2004). Endojen NO'nun bitki büyüme ve gelişmesi ya da strese karşı oluşturulan bitki cevaplarının bir düzenleyicisi olarak etki ettiğini gösteren çok az kanıt olmasına rağmen, bitki yaşam döngüsünün en azından bazı olaylarında rol oynadığı kesinlik kazanmıştır. NO, düşük molekül ağırlıklı, lipofilik özellikte olduğundan dolayı hücre membranlarından kolayca difüzyona uğrayabilen, renksiz ve gaz yapısında bir sinyal moleküldür (Shiet *al.* 2007). Dışarıdan (eksojen) uygulanan NO veya NO donörlerinin, özellikle Sodyum Nitroprussid (SNP), ışık, patojen ve oksidatif strese karşı bitki cevaplarını etkilemektedir (Esim and Atıcı 2014). İlave olarak, NO'nun tohum çimlenmesi, deetiyolasyon ve yaprak genişlemesini teşvik ettiği, hipokotil ve internod uzamasını inhibe ettiği, savunma genleri ve fitoaleksin üretimini arttırdığı bilinmektedir (Leshem 2000; Beligni and Lamattina 2001). Bitki büyümesi üzerine NO'nun etkilerinde konsantrasyonun son derece önemli olduğu vurgulanmıştır. NO'nun yüksek konsantrasyonlarının (40-80 ppm) marul, bezelye ve domateste büyümeyi inhibe ettiği, düşük konsantrasyonlarının (1-20 ppm) ise büyümeyi teşvik ettiği ileri sürülmüştür. NO tarafından lipid peroksidasyonunun (LPO) inhibisyonu, NO'nun potansiyel olarak antioksidatif rolünün olabileceğini güçlendirmektedir (Zottini *et al.* 2002). Eksojen

NO'nun, bitkilerde antioksidan enzimlerin aktivitelerini düzenleyerek süperoksit anyonunu temizlediği ve bitkiyi oksidatif zarardan koruduğu ileri sürülmüştür (Shi *et al.* 2007; Esim *et al.* 2012; Esim and Atıcı 2014; Esim and Atıcı 2016).

Salisilik asit (SA), bitkiler dahil olmak üzere çok çeşitli prokaryotik ve ökaryotik organizmalar tarafından üretilen sekonder bir metabolittir. SA, kimyasal olarak, aromatik bir halkaya sahip hidroksil grubu veya işlevsel türevi olan maddeler olarak tanımlanan fenolik bileşikler grubuna aittir. SA'nın bitkilerin çoklu fizyolojik süreçlerindeki düzenleyici rolü insanların dikkatini çekmeden çok önce salisilatların farmakolojik özellikleri (genel adı ve türevleri) yakından biliniyordu. Salisilatların MÖ. 5. yüzyıldan bu yana, salisilat bakımından zengin söğüt yaprağı ve doğum sırasında ağrı giderme için kabuğunu Hipokratlar reçete ettiği zaman, tıbbi özelliklere sahip oldukları bilinmektedir (Weissman 1991). 1828'de Alman bilim adamı Johann A. Buchner, söğüt ağacından salisin (salisilik alkol glukozid) adlı az miktarda sarımsı maddenin saflaştırılmasını gerçekleştirdi. Daha sonra Raffaele Piria, salisini şeker haline getirdi ve salisilik asit (SA) adını aldığı bir aside dönüştürdü. 1859'da Hermann Kolbe ve iş arkadaşları kimyasal olarak SA'yi sentezledi. Klasik biyokimyasal radyoaktif işaretleme yaklaşımı ve mutant temelli genetik analizi kullanarak, bitkilerde SA biyosentezi için iki farklı enzimatik yol belirlenmiştir (Chen *et al.* 2009). Bunlardan biri fenilalanin amonyumliyz (PAL) aracılı fenilalanin yolağıdır. Diğerisi ise izokorizmat sentaz (ICS) aracılı izokorizmat yolağıdır. Her iki metabolik yol da bitki fenilpropanoid yolunun bir ara ürünü olan birincil metabolit korizmata ihtiyaç duyar. İzotop deneyleri SA'nın esas olarak bezelye, salatalık, pirinç, tütün, patates ve ayçiçeği gibi bazı bitki türlerinde benzoik asitten sentezlendiğini göstermektedir (Silverman *et al.* 1995; Sticheret *et al.* 1997), diğer bitki türleri ise O-kumarate yolu ile SA'yı sentezleyebilir (Silverman *et al.* 1995). Bununla birlikte, genç *Primula acaulis* ve *Gaultheria procumbens* yaprak segmentlerine ¹⁴C etiketli sinamat, benzoikasid ve fenilalanin beslenmesi SA oluşumuna neden olup, her iki yolun muhtemelen SA biyosentezinde kullanılabileceğini düşündürmektedir (Silverman *et al.* 1995). Bitkilerde SA'nın en yüksek içeriği patojen istilasına uğramış doku ve doku nekrozlarında belirlenmiştir. SA'nın fizyolojik etkisi konusunda ilk kanıt, tütün (*Nicotiana tabacum*) hücre kültüründe çiçeklenmeyi sitümüle

etmesinin belirlenmesidir. SA'nın çiçeklenme üzerindeki uyarıcı rolü daha sonra diğer bitkilerde gösterilmiştir. Bu nedenle, SA'nın çiçeklenmenin endojen bir düzenleyicisi olduğu yönündeki görüşleri güçlendirmiştir (Silverman *et al.* 1995; Sticher *et al.* 1997). Bazı çalışmalar SA'nın UV, soğuk, kuraklık, ağır metal ve tuz stresi gibi çevresel streslerde bitki stres cevabını düzenlediği konusunda önemli bulgular sunmuştur (Janda *et al.* 1999; Taşgın *et al.* 2003; 2006; Ananieva *et al.* 2004; Sakhabutdinova *et al.* 2004; Mutlu *et al.* 2013). İlave olarak, soğuk koşullarda büyüyen buğdaya eksojen SA uygulaması, antioksidan sistemi regüle edebildiği gösterilmiştir (Taşgın *et al.* 2006; Esim *et al.* 2016).

Önemli bir reaktif sülfür türü olan Hidrojen sülfür (H_2S), etilen ve NO'dan sonra 3. gaz halindeki sinyal bir moleküldür (Li *et al.* 2011). H_2S genellikle bir kirletici olarak kabul edilir ve uzun zamandır bilim insanları bitkiler için toksik olduğu düşünmüştür. Bununla birlikte, yaşam H_2S açısından zengin bir atmosferde ortaya çıkmıştır; H_2S ve siyanür, prebiyotik ünya'da tüm biyomoleküler öncüllerin oluşumu için önkoşul olan tek kimyasaldır (Patel *et al.* 2015). H_2S , bakteriyel fotosentez için kullanılan ilk elektron vericisidir, kalıntıları günümüz modern anaerobik fotosentetik mor ve yeşil kükürt bakterilerinde gözlenmiştir. Kükürt asimilasyonu ve kükürtlü bileşiklerin üretimi uzunca bir süre bilinmektedir. H_2S 'nin sinyal rolü hakkındaki bilgilerimiz daha yenidir (Lisjak *et al.* 2013; Calderwood *et al.* 2014). Bitkiler aktiveleştirilmiş sülfatı sülfite indirgemekte ve daha sonra sülfite redüktaz, sülfitin daha fazla indirgenmesini katalize etmektedir. Bu reaksiyonlar plastidlerde gerçekleşir. Daha sonra H_2S , O-asetilserintioliaz (OAS-TL) ile katalize edilen bir reaksiyonda sistein oluşturmak üzere O-asetilserine (OAS) dahil edilir. Bununla birlikte, OAS-TL ters reaksiyonu da katalize edebilir ve sisteini H_2S ve OAS'a parçalayabilir. Buna ek olarak, H_2S , eşzamanlı olarak amonyak ve piruvat oluşumu ile birlikte sistein desülfhidraz (CDES) enzimi katalizörlüğünde üretilebilir. Ayrıca H_2S , siyanür ve sistein substratlar olarak ve siyanoalanin H_2S ile birlikte oluşturulduğu siyanoalaninsintaz (CAS) ile katalize edilen bir reaksiyonla salınabilir. H_2S bitkide antioksidan aktiviteyi arttırarak savunma sinyali olarak görev yaptığı gözlemlenmiştir ve ayrıca stoma kapanmasını sağlayarak koruyucu bir rol oynadığı da rapor edilmiştir. Yüksek konsantrasyonlarda fitotoksik olmakla

birlikte, düşük dozlardaki H_2S hem hidroponik sistemde hem de toprak koşullarında çeşitli bitki türlerinin büyüme-gelişmesini ve taze ağırlığını artırır (Dooley *et al.* 2013). Örneğin H_2S , buğdayda çimlenme, yaprak büyümesinde ve biyokütle verimi üzerinde olumlu bir etki göstermiştir. Buna ek olarak H_2S , kuraklık, ozmotik stres ve ağır metale karşı cevabında da önemli etkiler göstermiştir (Zhang *et al.* 2008; Jin *et al.* 2011).

Kültüre alınan neredeyse en eski tarımsal bitkilerinden biri olan mısır (*Zeamays*L.), dünyada yaygın olarak yetiştirilen *Gramineae*(*Poaceae*) familyasından monokotil bir tahıl bitkisidir. C4 fotosentezine sahip olan mısır, Türkiye’de tahıllar içerisinde buğday ve arpadan sonra en geniş ekim alanına sahip olup 6881 ha ekim alanına ve yıllık yaklaşık 6,3 milyon ton üretim ile Türkiye’de önemli bir yere sahiptir. Yaygın olarak özellikle Ege, Marmara, Akdeniz ve Karadeniz Bölgeleri’nde yetiştirilmektedir. Mısır bitkisi sahip olduğu zengin gıda ürünleri nedeniyle insan ve hayvan beslenmesi açısından çok önemli ve kullanım çeşitliliği çok geniştir. Bitkisel kaynaklı proteinlerin yeterli ve düşük ekonomik üretimi için büyük önem taşıyan mısırın tanesinden ayrıca nişasta, glukoz ve yağı da ekonomik açıdan tartışılmazdır (<http://www.zmo.org.tr>).

Günümüze kadar yapılan çalışmaların büyük çoğunluğunda bitki büyüme düzenleyicilerinden SA, NO ve H_2S bileşiklerinin koruyucu rolleri, daha çok stres koşulları altındaki bitkilerde, ROS bileşiklerini süpürücü mekanizmaları üzerinde yoğunlaşmıştır. Ancak bitkilerde bu sinyal bileşiklerin gerek içsel gerekse dışsal olarak MG toksitesini yatıştırma üzerinde herhangi bir araştırmaya rastlanılmamıştır. Bu konuda literatürde önemli bir boşluk bulunmaktadır. Bazı araştırmalarda stres koşullarında ROS bileşikleri detoksifiye edildiği halde bitki stres hasarının hala devam ettiği konusunda çalışmalar bulunmaktadır. Biz de toksik seviyelere ulaştığında, bitki büyüme ve gelişmesini etkileyen ROS bileşiklerinin yanında, MG’nin de değerlendirilmesi ve detoksifiye edilmesi konusunda çalışmalara gerek olduğu konusunda bir hipotez geliştirdik. Bu hipotez kapsamında, mısır (*Zeamays* cv. Arifiye) tohumları ekimden önce farklı seviyelerde SNP (NO donörü olarak), SA ve H_2S (NaSH olarak) çözeltlerinde 8 saat ön ıslatmaya (şişmeye) maruz bırakılmıştır. Daha sonra tohumlar 1 ve 3 mM MG içeren Petrilere ekilmiştir. Çimlenmenin 5. gününde hasat

işlemi yapılmış ve taze dokular (kök ve gövde) deneysel parametreler için kaynak olarak kullanılmıştır. Bu uygulamalardan sonra elde edilen dokularda antioksidan (SOD, CAT, GR, GPX ve APX) ve Gly I ile GlyII enzimlerin aktiviteleri belirlenmiştir. İlave olarak, içsel MG, LPO (MDA olarak), H_2O_2 ve $O_2^{\cdot-}$ seviyeleri de çalışılmıştır. Çalışmamız eksojen MG etkisinin bitki antioksidan sistem ile ilişkilerini ortaya koyması açısından önemlidir.



2. KAYNAK ÖZETLERİ

Literatürde metilglioksal'ın (MG) canlılardaki rolleri üzerine birçok çalışma bulunmaktadır. Ancak bitkilerde özellikle dışsal uygulanan MG'nin fizyolojik ve biyokimyasal etkisi ile ilgili sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Çalışma bu açıdan literatürdeki önemli bir boşluğu dolduracak niteliktedir.

Güçlü bir sitotoksik bileşik olan MG, glutatyon temelli detoksifikasyonu için glioksalaz I (Gly I) ve glioksalaz II (Gly II) enzimlerini içeren glioksalaz sistemine gerek duyar (Racker 1951). Bitkilerde glioksalaz yolunun tam fizyolojik rolü iyi bir şekilde çalışılmamıştır. Ancak, bazı çalışmalar normal şartlar altındaki bitkilerin belirli bir seviyede MG'yi biriktirebildiğini ve onun toksitesini tolere ettiğini göstermiştir. Yine birçok çalışma stres koşulları altında bitki içsel MG konsantrasyonunun arttığını göstermiştir (Martins *et al.* 2001). Bu durum bitkide yaşlanma ve senesens sürecini indükleyen faktörlerden biri olarak değerlendirilmiştir. Ancak glioksalaz sistemi enzimlerinin aktivitelerinin artırılmasıyla, hem yaşlanma hem de senesensin yavaşlayacağı ileri sürülmüştür (Thornalley 1990). Örneğin transgenik tütün ve pirinçte glioksalaz yolu enzim genlerinin aşırı ekspresyonu, yaprak senesensinin gecikmesini sağlamakla birlikte, yüksek NaCl, metal ve kuraklık stresinin toksik etkilerini tolere edebilmiştir. İlave olarak, bu stresler altında bitki çiçek ve tohum da verebilmiştir. Bu bulgular, MG'nin Gly I ve Gly II de dahil olmak üzere, bazı genlerin ekspresyonunu düzenleyen bir sinyal molekül olarak davranabileceğini düşündürmüştür (Sopory *et al.* 2007).

MG, hücrelerde Glikoliz'in bir yan ürünü olarak memeli sistemlerinde kaçınılmaz olarak üretilen toksik bir metabolittir (Carrington and Douglas 1986). Son yıllarda, glukoz, glutamin ve fetüs serum düzeylerindeki değişimlerin, MG'nin hücre içi konsantrasyonunda önemli değişikliğe neden olabileceği gösterilmiştir. Buna ek olarak, endojen MG'nin, kültür koşullarında HL60 (insan lösemi hücre hattı) hücrelerinde apoptosise neden olduğu da gösterilmiştir (Thornalley *et al.* 1996). MG'nin kültürdeki hücreler üzerindeki etkisinin kesin mekanizması bilinmemekle birlikte, onun fizyolojik

koşullar altında güçlü bir protein ve nükleik asit modifiye edici bileşik olduğu kabul edilmektedir (Thornalley 1996). MG aynı zamanda nükleik asitlerle, esasen guanil residüleri ile adüktler oluşturur. Yüksek hücre dışı konsantrasyonlarda ise kültürde yetişen hücreler için genotoksik olduğu gösterilmiştir. Fizyolojik konsantrasyonlarda bile MG (100 nM), korunmasız plasmid DNA'yı değiştirebilir ve gen mutasyonuna ve anormal gen ekspresyonuna neden olabilir (Chaplen 1998).

Esansiyel hipertansiyon için patojen mekanizmalar, son yıllarda ki birçok çalışmaya rağmen hala tam manasıyla çözülememiştir. ROS üretiminde ki artış, hipertansiyon gelişimiyle ilişkili olduğundan, son yıllarda hipertansiyon üzerine ROS'un rolü iyi belirlenmiştir (Escobales and Crespo 2005). Yüksek MG seviyesi, MG ile indüklenen ROS üretimi ve hipertansiyon gelişiminde ki ileri glikasyon ürünleri (AGE) arasında ortak bir bağ oluşturmaktadır. Yüksek MG seviyesinin ve bunun sonucunda oluşan protein glikasyonunun ve ROS üretiminin zincir reaksiyonlarında ki yukarı regüle edici bağlantılar olabileceği ve hipertansiyonun gelişimine yol açabileceği öne sürülmüştür (Wang *et. al.* 2007).

Farklı dozlarda MG'nin (50-400 mg/kg vücut ağırlığı) etkisi 6, 12 ve 24 saat sonra Swiss (İsviçre) albino farelerinin (7-8 haftalık) karaciğer ve dalaklarında glutatyon (GSH) içeriği, lipid peroksidasyonu ve antioksidan sistemde yer alan enzimler kullanılarak değerlendirilmiştir. Karaciğerde SOD, GST, CAT, Gly I ve Gly II'nin spesifik aktivitelerinin azaldığı görülmüştür. Spesifik aktivitelerdeki değişimin, MG dozuna ve uygulamadan sonraki zamana bağlı olarak değiştiği görülmüştür. MG, GSH içeriğini azaltmış ve karaciğerdeki lipid peroksidasyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Bu bulgular, MG'nin antioksidan savunma sistemi üzerindeki olumsuz etkisini düşündürmüştür. MG'nin bir redoks döngüsü geçirmesinden dolayı hayvanlarda antioksidan potansiyelini düşüren serbest radikaller oluşturabileceği de ileri sürülmüştür. MG'nin zararlı etkileri içinde yüksek lipid peroksidasyonu seviyelerine neden olması, onun serbest radikal proseslerinin oluşmasına destek sağladığını göstermektedir (Choudhary *et al.* 1997).

Gly I ve GST, hücre bölünmesi sırasında ve çeşitli stres tedavilerine yanıt olarak bitkilerde zenginleşen iki glutatyon bağımlı enzimdir (Misra *et al.* 1995). Soya fasulyesinde, bu iki enzim arasında bir başka bağlantı, bir Gly I olarak tanımlanan bir GST'yi andıran bir klon (Erişim No. X68819) tarafından önerilmiştir. Soya fasulyesinde bulunan Gly I'i karakterize etmek için, hayvanlardan dimerik enzime benzeyen *GmGlyox I* (*Glycine max* L.), soya fasulyesi süspansiyon kültürlerinden hazırlanan bir cDNA kütüphanesinden klonlanmıştır (Skipsey *et al.* 1997). *Escherichia coli*'de ifade edildiğinde, *GmGlyox I*'in 21-kDa alt birimlerinden oluşan bir 38-kDa dimer olduğu bulunmuş ve memelilerden gelen enzimin aksine, metal iyonlarının yokluğunda aktivite gösterdiği bulunmuştur (Skipsey *et al.* 2000).

Agrobacterium tumefaciens ile Blacgram'ın (*Vigna mungo* L. Hepper) embriyonal ekseninin düğüm bölgelerini kullanan tekrarlanabilir verimli bir dönüşüm sistemi kurulmuştur (Ignacimuthu *et al.* 1997; Sen and Guha-Mukherji 1998; Ignacimuthu and Franklin 1998; Das *et al.* 2002; Saini and Jaiwal 2002). Burada ilgilenilen gen, yeni bir kurucu Cestrum sarı yaprak kıvrıma viral promotör tarafından tahrik edilen Gly I'in tuz stresini azaltmak için transfer edilmiştir.. Bu genin kurucu ³⁵S CaMV (Kanamisin direncini kodlayan nptII genini tahrik eden promotörü) promotörü altında aşırı ekspresyonu, daha önce, model bitki tütünde tuz, ağır metal ve kuraklık stresine tolerans kazandırdığı gösterilmiştir (Stavalone *et al.* 2003; Singla-Pareek *et al.* 2007). T1 transgenik bitkilerin yanı sıra kontrol bitkilerinin (100 mM NaCl) tuz stresine maruz bırakılması, transgenik bitkilerin tuz stresi altında büyüyebildiğini ve tohum oluşturduğunu, ayrıca kontrol bitkilerinin hayatta kalmayı başardığını da göstermiştir (Bhomkar *et al.* 2008).

Hücresele seviyede MG içeriğindeki artış, bitkilerde farklı abiyotik streslerle ilişkilendirilmiştir. Örneğin transgenik bitkilerde GlyI ve/veya Gly II enzimlerinin aşırı üretiminin tuzluluk ve ağır metal streslerine karşı tolerans sağladığı gösterilmiştir. Pirinçte 19 potansiyel Gly I ve 4 Gly II proteinini ve *Arabidopsis*'te 22 Gly I ve 9 Gly II proteini belirlenmiştir. (Mustafiz *et al.* 2011).

Aflatoksinler, mısır gibi hassas bitkilerin enfeksiyonları sırasında esas olarak *Aspergillus flavus* tarafından üretilen toksinlerdir. Bu mantara dirençli ve duyarlı mısır genotiplerinin tohum embriyo proteinlerinin proteomik karşılaştırmaları yapıldığında, daha önce bir çok proteinin dirençli embriyolarda farklı olduğu (*de novo*) veya bazılarının da artırıldığı bulunmuştur (Nichols 1983). Örneğin Gly-I aktivitesinin dirençli mısır genotiplerinde duyarlı olanlara kıyasla belirgin şekilde daha yüksek olduğu belirlenmiştir. *A. flavus*'un enfeksiyonuyla Gly I aktivitesi, duyarlı genotiplerde dirençli genotiplere göre daha düşük kalmış ve bununla birlikte mantar enfeksiyonu, üç duyarlı genotipin ikisinde MG düzeylerini önemli ölçüde arttırdığı tespit edilmiştir. Dahası, dışsal uygulanan MG'nin *A. flavus* kültüründe aflatoksin üretimini 5µM kadar düşük bir konsantrasyonda indüklediği bulunmuştur. MG'nin etki şekli, 5 ila 20 µM MG varlığında önemli ölçüde yukarı regüle edilen aflatoksin biyosentezini düzenleyici gen olan aflR'nin ekspresyonunu uyarmak olabileceğini düşündürmüştür. Bu veriler, GLX-I'in tohum içindeki MG seviyelerini kontrol etmede önemli bir role sahip olabileceği ve böylece dirençli mısır genotiplerinde bulunan düşük aflatoksin seviyelerine katkıda bulunabileceğini göstermektedir (Chen *et al.* 2004).

Reaktif oksijen türlerinin (ROS), nitrik oksit (NO) ve MG'nin etkin bir şekilde detoksifikasyonu, bitkilerde NaCl kaynaklı zarara karşı koruma sağlayabildiği belirlenmiştir. Prolin ve glisinbetainin (betain) uygulamasının NaCl stresine karşı koruyucu mekanizmalarını aydınlatmak için tütün Brigh Yellow-2 hücreleri kullanılmış ve çalışmada H₂O₂, süperoksit (O₂⁻), NO ve MG'nin hücre içi seviyeleri araştırılmıştır. H₂O₂, O₂⁻, NO ve MG düzeyleri, kısa ve uzun süreli NaCl stresli hücrelerde stresli olmayanlara göre daha yüksek olmuştur (Yadav *et al.* 2005). Ancak, O₂⁻ seviyesi uzun süreli stresli hücrelerde daha yüksek çıkmıştır. Yine aynı çalışmada eksojen prolin ve betain uygulaması, uzun süreli NaCl stresli hücrelerde MG ve H₂O₂ seviyesini düşürmüştür, fakat O₂ veya NO seviyelerini değiştirmemiştir. Tuz stresi altında, hem prolin hem de betain uygulaması glutatyon peroksidazın transkripsiyon seviyesini artırarak H₂O₂'nin azalmasına katkıda bulunduğu ileri sürülmüştür (Banu *et al.* 2010).

Tuz stresine maruz kalan kolza tohumluklarında ki antioksidan savunma ve MG'nin detoksifikasyon sistemlerinde ki eksojen selenyumun (Se) düzenleyici rolü incelenmiştir. Tohumlar, Se (25 μ M Na₂SeO₄) ve tuz (100 ve 200 mM NaCl) ile ayrı ayrı ve kombinasyon halinde uygulanmıştır (Djanaguiraman *et al.* 2005). Artan tuz stresi ile fidelerin askorbat (AsA) içeriği ve GSH/GSSG oranı önemli ölçüde azalırken, GSH ve glutatyon disülfid (GSSG) miktarı tuz stresi düzeyindeki artış ile birlikte artmıştır. Buna ek olarak, glutatyon peroksidaz (GPX) aktivitesi sadece 100 mM tuz stresinde artarken, tuz konsantrasyonu arttıkça APX ve GST aktivitesi artmıştır (El-Shabrawi *et al.* 2010). Ayrıca GR aktivitesi, 100 mM NaCl'de değişmezken, şiddetli (200 mM NaCl) tuz stresinde azalmıştır. Bunların yanı sıra MDHAR, DHAR, CAT, Gly I ve Gly II aktiviteleri, 100 mM tuz stresi uygulandığında azalırken, şiddetli tuz stresi (200 mM NaCl) altında bu aktivitelerin keskin bir düşüşü gözlenmiştir (Hossain *et al.* 2010). Bunlara ek olarak, Se ön-muamele yapılmış stresli fideler ile tek başına tuz stresi karşılaştırıldığında Se uygulanan fidelerde H₂O₂ ve MDA düzeylerinde bir azalma görülmüştür. Bu sonuçlar, Se'nin oksidatif strese karşı tolerans sağladığını düşündürmüştür (Hasanuzzaman *et al.* 2011).

150 ve 300 mM NaCl stresine maruz bırakılan buğday fidelerinin antioksidan savunma ve MG'nin detoksifikasyon sistemlerinde ki eksojen NO olası düzenleyici rolü incelenmiştir (Innocenti *et al.* 2007). Fideler, bir NO vericisi olan 1 mM sodyum nitroprussid (SNP) ile ön-muameleye tabi tutulup daha sonra tuz stresine maruz bırakılmıştır. AsA içeriği artan tuz stresi ile birlikte önemli ölçüde azalırken, (Hasanuzzaman *et al.* 2010). GSH, GSHG ve GSH / GSSG oranı, tuz stresi düzeyindeki artış ile birlikte artmıştır (Wang and Yang 2005). Ancak GST aktivitesi ciddi tuz stresine (300 mM) belirgin olarak artış göstermiştir. Bunlara ek olarak APX, MDHAR, DHAR, CAT ve GPX aktiviteleri, tuz stresi üzerine anlamlı bir değişiklik gösterememiştir. H₂O₂ ve lipid peroksidasyon seviyelerinde ki artışla, özellikle 300 mM NaCl'de tuz stresinde GR, Gly I ve Gly II aktiviteleri azalmıştır. Bu sonuçlar, NO ön-muamelesinin sinerjik bir etkiye sahip olduğunu, AsA ve GSH içeriği, GSH / GSSG oranının yanı sıra, tuza maruz kalan fidelerin çoğunda MDHAR, DHAR, GR, GST,

GPX, Gly I ve Gly II aktivitelerinin stresle birlikte arttığı görülmüştür (Hasanuzzaman *et al.* 2011).

Mung fasulye fidelerinde, 300 mM NaCl stresi, kontrol ile karşılaştırıldığında ilk 24 saatte GSH içeriğinde belirgin bir artışa neden olurken, 48 saatten sonra hafif bir artış gözlenmiştir. En yüksek GSSG içeriği, 48 saat sonra glutatyon redoks durumunda ki azalma ile gözlenmiştir (Roxas *et al.* 1997). GPX, GST ve GlyII enzim aktiviteleri 48 saate kadar belirgin olarak yükselirken, GR ve GLYI aktiviteleri sadece 24 saate kadar yükselmiş ve daha sonra kademeli olarak azalmıştır. 15 mM prolin veya 15 mM glisinbetain uygulaması kontrol ve tuz stresli bitkiler ile karşılaştırıldığında GSSG, H₂O₂ ve lipid peroksidasyon seviyesinde ki eşzamanlı bir azalma göstermiştir. Buna ek olarak, 48 saate kadar MG detoksifikasyon sistemi ve ROS'a dahil olan GPX, GST, GR, Gly I ve Gly II enzimlerinin yüksek glutatyon redoks durumunun korunması ve GSSG içeriğinde artışa neden olduğu bulunmuştur (Veena *et al.* 1999; Jain *et al.* 2002; Hossain *et al.* 2009). Bu çalışma, hem prolin hem de glisin betainin, H₂O₂ ve lipid peroksidasyon seviyesini azaltarak ve antioksidan savunma ve MG detoksifikasyon sistemlerini arttırarak tuz kaynaklı oksidatif hasara karşı koruyucu bir etki sağladığı önerilmiştir (Hossain and Fujita 2010).

Tuz stresine maruz bırakılan mung fasulye fidelerinde (200 mmol·L⁻¹ NaCl, 48 saat) antioksidan savunma sistemi ve MG detoksifikasyon sisteminde eksojen olarak uygulanan prolin ve glisinbetainin ortak etkileri araştırılmıştır (Hoque *et al.* 2007). Tuz stresi, köklerde GSH / GSSG ve AsA içeriğini önemli ölçüde azaltırken yapraklarda GSH ve GSSG içeriğinde keskin bir artışa neden olmuştur. Ayrıca, tuz stresine yanıt olarak GR, GPX, GST ve Gly II aktiviteleri artarken MDHAR, DHAR, CAT ve Gly I aktiviteleri H₂O₂ ve MDA seviyesindeki artışa bağlı olarak keskin bir düşüş göstermiştir (El-Shabrawi *et al.* 2010). Prolin veya betain ön-muamelesinin, kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman non-enzimatik ve enzimatik bileşenler üzerinde çok az etki gösterdikleri bulunmuştur. Bununla birlikte, MG detoksifikasyon sistemi kontrol ve tuz stresli bitkiler ile karşılaştırıldığında GSSG içeriği, H₂O₂ ve MDA seviyesinde azalış göstermiştir. Prolin ya da betain uygulanmış tuz-stresli fideler, AsA, GSH içeriği,

GSH / GSSG oranında bir artışla birlikte ROS'a katılan APX, DHAR, GR, GST, GPX, CAT, Gly I ve Gly II'nin daha yüksek aktivite gösterdiği bulunmuştur. Bu sonuçlar, prolin ve betainin antioksidan savunma sistemi ile glioksalaz sisteminin birlikte oksidatif strese karşı ortak bir etki sağladığını düşündürmektedir (Hossain *et al.* 2011).

Tuz toleransına karşı biyokimyasal belirteçlerin belirlenmesi amacıyla, tuz toleransına karşı farklılık gösteren iki zıt pirinç çeşidi (*Oryza sativa* L.) olan POKKALİ ve IR64 de çeşitli parametreler için analizler yapılmıştır. Buna ek olarak, MG detoksifikasyon sisteminin (Gly I ve II) aktivitesi Pokkali'de IR64'de kıyasla belirgin olarak daha yüksek bulunmuştur (Hoque *et al.* 2008). GSH, MG detoksifikasyon yolunun yanı sıra, askorbat-glutasyon yolunda yer aldığından, bu ikisinin arasında bir etkileşim noktası olabileceğini düşündürmüştür (Hernandez *et al.* 2000; Uddin *et al.* 2007). Yapılan çalışmalarda hem glioksalaz enzimleriyle modüle edilen, hem askorbat hem de glutasyon mekanizmasının, Pokkali pirincinde tuz toleransı için biyolojik bir belirteç olabileceği düşünülmüştür (El-Shabrawi *et al.* 2010).

Abiyotik stresler dünya çapında tarımsal üretimde büyük kayıplara neden olur (Wang *et al.* 2003). Çalışmada, çeşitli abiyotik streslerin, kabak fidelerinde (*Cucurbita maxima* Duch.) MG seviyesi ve Gly I aktivitelerinin upregülasyonu üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Yapılan çalışma da, beyaz ışık en yüksek indüksiyona ve ardından tuzluluk, kimyasal, kuraklık ve ağır metal streslerin çoğu MG seviyesinde ve Gly I aktivitesinde belirgin artışlara neden olduğu görülmüştür (Yadav *et al.* 2005a; Singla-Pareek *et al.* 2006). Çeşitli stresli koşullar altında bitkilerde MG birikiminin ortak bir fenomen olduğu ve bu nedenle MG'nin bitkilerin strese tepki vermesine yönelik bir sinyal görevi görebileceği ön görülmüştür (Hossain *et al.* 2009).

Kadmiyum (Cd) stresine (1 mM CdCl₂, 48 saat) maruz kalan mavi fasulye fidelerinde ROS ve MG detoksifikasyon sistemlerine ekzojen olarak uygulanan betain ve prolinin olası mediatör (aracı) rolü araştırılmıştır. Cd stresinde GSH ve GSSG içeriğinde belirgin bir artışa neden olmakla birlikte, ASA, H₂O₂ ve MDA'da keskin bir artışla önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir (Smirnoff 2000). Cd stresine yanıt olarak, APX, GST,

GPX ve Gly I aktiviteleri artmış, CAT, MDHAR, DHAR, GR ve Gly II aktivitelerinde bir azalma tespit edilmiştir (Shalata *et al.* 2001; Eltayeb *et al.* 2006, 2007; Wang *et al.* 2010). 5 mM betain veya 5 mM prolin'in eksojen uygulaması, H₂O₂, MDA ve GSSG içeriğinde eşzamanlı bir azalmaya neden olmuştur. Eksojen uygulamalar kontrol ve Cd stresli bitkiler ile karşılaştırıldığında ROS ve MG detoksifikasyon sistemine GSH / GSSG oranının korunması ile GSH ve ASA içeriğinde bir artışa ve APX, DHAR, MDHAR, GR, GST, GPX, CAT, Gly I ve Gly II aktivitelerinde artış sağladığı bulunmuştur (Hossain *et al.* 2010).

Camellia sinensis (L.) O. Kuntze'de soğuk stres esnasında prolin ve betain uygulamasının antioksidan ve MG detoksifikasyon sistemi üzerindeki etkisi incelenmiştir. MG detoksifikasyonda yer alan ve Gly I ve Gly II enzimleri üzerine prolin / betainin etkisi araştırılmıştır. Hem proline hem de betain, çay tomurcuğunda soğuk stres esnasında Gly I'in koruyucu etkisini ve Gly II'nin aktive edici etkisini ortaya koyduğu görülmüştür (Smirnoff 2005; Yadav *et al.* 2005a, b). Bu nedenle, prolin ve betainin, MG ve MDA oluşumunu düzenleyerek bazı antioksidan ve glioksalaz yolu enzimlerini aktive ederek veya korumak suretiyle çaydaki soğuk strese karşı koruma sağlayabileceğini düşündürmüştür (Kumar and Yadav 2008).

MG ve glioksalaz yoluna yönelik artan ilgiye rağmen, metabolik ağdaki gerçek rolleri tamamen kesinleşmemiş olup hâlâ eksik olan kısımları mevcuttur. Gelişmeler ışığında, bu alandaki araştırmalar ağırlıklı olarak bu araştırma alanının dar bir kesimi ile ilgili birkaç inceleme yayımlanmış olup, bu makalede MG araştırmasının kapsamlı bir genel görünümünü sunmaya çalışılmıştır. Ayrıca MG metabolizmasının ve toksisitesinin geniş bir yelpazedeki bazı önemli özelliklerini gözden geçirerek kimyadan biyolojik etkilere kadar tartışmayı genişletmek için bir deneme yapılmış olup MG'nin enerji üretimi, serbest radikal üretimi ve hücre ölümü üzerindeki etkisi vurgulanmaya çalışılmıştır (Kalapos 1999).

Gly I, substrat olarak MG kullanır ve aktivite için Ni (II) / Co (II) (Nikel II / Kobalt II) veya Zn II(Çinko II) gereklidir (Sukdeo *et al.* 2004). Burada, Gly I'in farklı metal iyon

özelliklerinin kökeni ve evrim sırasındaki kalıtım kalıpları araştırılmış ve sonuç olarak, tek alanlı Ni'ye bağımlı GlyI'nin [Ni-Gly I] ilkel bir köken olduğunu düşündürmüştür (Kaur *et al.* 2013).

Arabidopsis thaliana'da, en az dört farklı glioksalaz izoformu vardır, bunlardan Gly II-1 ve Gly II-4 ayrıntılı olarak karakterize edilmemiştir (Maiti *et al.* 1997). *Arabidopsis thaliana*'da Gly II-1'in işlevsel rolü araştırılmıştır. Gly II-1 fonksiyon kaybı mutantları ve bitki örtüsü Gly II-1'i aşırı eksprese eden bitkiler, normal büyüme koşulları altında vahşi tipli bitkilere benzemektedir (Limphong *et al.* 2009). Bu çalışmayla, Gly II-1 gen ekspresyonunun, vahşi tip *Arabidopsis thaliana*'a tuz ve anoksi stresiyle ve fazla L-treonin tarafından düzenlendiği görülmüştür. Ek olarak, Gly II-1'deki bir mutasyon, abiyotik stresler sırasında büyüme ve hayatta kalmayı inhibe ettiği görülmüştür. Bu sonuçlarla, *Arabidopsis thaliana*'da ki Gly II-1'in normal bitki ömrü için gerekli olmadığı, ancak belirli stres koşulları sırasında gerekli olabileceğini düşündürmüştür (Devanathan *et al.* 2014).

GST, GlyI ve Alliin liyaz (alliin liyaz, EC 4.4.1.4) bitki bünyelerinde önemli enzim sistemlerindendir (Lancaster and Boland 1990). GST ve Gly I esas olarak savunma mekanizmasında GSH' substrat olarak kullanan enzimleri detoksifiye ederler. Gly I ve Alliin liyaz olarak ikincil metabolizma ile ilgili olup ayrıca GSH'den türetilen sülfür bileşikleriyle ilgilidir (Coleman *et al.* 1997). GST, GLY I ve Alliin liyaz etkileri, kabak, lahana, brokoli, turp, havuç, patates, tatlı patates, mung fasulyesi ve soğan dahil olmak üzere sebze ekinlerinin çözünür ekstraktlarında araştırılmıştır. Sonuç olarak, Gly I aktivitesi soğan özütünde (4540 nmol/min/mgP) yüksek bulunmuş, bu da Western blot analizi ile tespit edilen kalın bandın Gly I'in anti serum tarafından kısmen tanınmasından kaynaklanabileceği öngörülmüştür. Ayrıca soğan özütü, alliin liyaz (2069 nmol piruvat/mgP) için en yüksek özgül etkinlik seviyesini de göstermiştir. Gly için spesifik aktiviteler turp ve havuçta orta derecedeyken bunun yanı sıra diğer sebzelerin ekstraktları oldukça düşük seviyelerde aktivite gösterdikleri tespit edilmiştir (Fujita1 2007).

Gly I kodlayan bir cDNA, Gly I, domatestte tuz kaynaklı genlerin diferansiyel taranmasıyla izole edilmiştir (Paulus *et al.* 1993). GlyI ve GlyII fonksiyonları açıkça anlaşılamayan her yerde bulunan enzimlerdir (Thornalley 1990). Gly I tarafından kodlanan protein sırasıyla bakteri ve insan tarafından izole edilen Gly I ile %49,4 ve %58,5 benzerliği paylaşmıştır. Dahası, Gly I eksprese eden maya hücreleri, dönüştürülmemiş hücrelere göre 20 kat daha yüksek bir Gly I spesifik aktivitesi gösterdiği bulunmuştur. Hem Gly I mRNA hem de Gly I polipeptit seviyeleri, ya NaCl, manitol ya da absisik asit (ABA) ile işlenmiş bitkilerde 2-3 kat arttığı bulunmuştur. İmmüno histokimyasal lokalizasyon, Gly I'in, tüm hücre tiplerinde eksprese edildiğini ve floem kalburlu elemanlarında tercihli birikim olduğunu göstermiştir. Bu ifade biçimi, tuz stresi sonucubir değişime uğramamıştır. Gly I'in artan ifadesinin, ATP üretimi için daha yüksek bir talep oluşturduğu ve tuz stresli bitkilerde glikoliz artışına bağlı olabileceği önerilmiştir (Espartero *et al.* 1995).

Glioksalaz yolu enzimlerinden olan Gly II, pirinçten (*OsglyII*) klonlanan cDNA, 336 amino asidin bir polipeptidini kodlayan 1010 bp açık okuma çerçevesine ve 8.08 tahmini bir izoelektrik noktasına sahip 1623 nükleotidden oluştuğu bulunmuştur (Maiti *et al.* 1997). *Osgly II*'yi aşırı ifade eden *E. coli*, yüksek MG konsantrasyonlarında büyüyebildiği bulunmuştur (Veena *et al.* 1999). Pirinçte transkript analizi, çeşitli abiyotik streslerden yanı sıra absisik asit veya salisilik asit ile muamele edilerek *OsglyII* geninin ekspresyonunun 15 dakika içinde uyarıldığını da göstermiştir. *OsglyII* geninin bu çok adımlı cevabı, bitkilerindeki çeşitli streslere karşı tolerans geliştirmek için gelecekteki faydalarını belgelemektedir (Yadav *et al.* 2007).

Kuraklık stresine maruz bırakılan mercimek fidelerinde prolin ve betain kaynaklı GST ve Gly I'in modülasyonları araştırılmıştır. Test edilen 7 mercimek çeşidi arasında, BARI mosur 2'de GST ve Gly I'in daha yüksek aktivitelere sahip olduğu bulunmuştur. Kuraklık stresi, stresin farklı dönemlerinde GSH, GSSG ve H₂O₂ içerikleri ve GST ve Gly I aktivitelerinde belirgin bir artışa neden olurken, kısa dönemde GST aktivitesinde önemli ölçüde bir azalışa neden olmuştur (Noctor *et al.* 2012). Bununla birlikte, kuraklık stresıyla 15 mM betain veya prolin'nin ekzojen uygulaması, kontrol ve

kuraklığa maruz kalmış bitkiler ile karşılaştırıldığında GSH içeriğinde bir artışa, GST ve Gly I'in yüksek aktivitelerinin sürdürülmesine ve GSSG ve H₂O₂ içeriğinde bir azalmaya neden olduğu bulunmuştur (Shalata *et al.* 2001; Aravind and Prasad 2005). Bu sonuçlarla, hücrenin ROS ve MG detoksifikasyon sisteminin toksik etkilerinden korunmasında önemli bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir (Molla *et al.* 2014).

Daha önce, Gly I'in tuzluluk toleransını vermede muhtemel bir aday gen olarak potansiyeli belirtilmiştir (Espartero *et al.* 1995). Burada Gly I ve GlyII'nin aşırı ekspresyonunun birlikte geliştirilmiş tuzluluk toleransına sahip olduğunu ve böylece bitkilerde stres toleransını manipüle etmek için etkili olan farklı bir strateji sunduğu bildirilmiştir (Veena *et al.* 1999). Gly II genini, transforme edilmemiş bitkilerde tek başına ya da Gly I transgenik arka planında aşırı ifade ettik..Transgenik bitkilerin her iki türü de enzim aktivitesini yükseltmiş ve yabancı proteini istikrarlı bir şekilde eksprese etmişlerdir.Transformant olmayanlarla karşılaştırıldığında, birkaç bağımsız glioksalaz II transgenik hat, yüksek MG ve NaCl konsantrasyonuna maruz kalmanın tolere edilmesi için geliştirilmiş bir yetenek gösterdi. Ayrıca, sürekli tuzluluk stresi koşulları altında normal canlı tohumlar üretebildiği de görülmüştür. Bu sonuçlar, mahsul bitkilerindeki verimi etkilemeksizin artan tuzluluk toleransı için glioksalaz sisteminin manipülasyon potansiyelini vurgulamıştır (Singla-Pareek *et al.* 2003).

3. MATERYAL ve YÖNTEMLER

3.1. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Buzdolabı	: Arçelik
Derin dondurucu (-20°C)	: Arçelik
Derin dondurucu (-80°C)	: NUAIRE
Hassas terazi	: Shimadzu AY220
Karıştırıcı	: Fisons Whirlimixer
Manyetik karıştırıcı	: Chiltern HS31
Masa santrifüjü	: Hettich EBA 21
Otomatik pipetler	: Ependhof, Axigen
pH metre	: Seven Compact
Soğuk su banyosu	: Huber Polystat CC1
Kuru Blok inkübatör	: Allsheng
Sıcak su banyosu	: Wise Bath Fuzzy Control System
Soğutmalı santrifüj	: Hettich Micro 22 R
Spektrofotometre	: Shimadzu UV mini-1240
Homojenizatör	: Wiggen Hauser D- 500
İklim dolabı	: Sanyo, Japonya ve Jeno Tech, Kore

3.2. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanmaları

Çalışmada kullanılan çözeltilerin kullanıldığı yerler ve hazırlanış şekilleri aşağıda belirtilmiştir. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler Sigma ve Fluka şirketlerinden temin edilmiştir.

1. 750 μ M SNP (SNP ön uygulaması için): 0.1115 g SNP 300 ml saf suda çözülmüş ve son hacim saf su ile 500ml'ye tamamlanarak stok çözelti hazırlanmıştır. Bu çözeltiden 100 ml alınarak tohumlara ön uygulama yapılmıştır.

2. 500 μ M SNP (SNP ön uygulaması için): 750 μ M SNP stok çözeltisinden 67 ml alınarak son hacmi saf su ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
3. 1 mM SA (SA ön uygulaması için): 0,0276 g SA 150 ml saf suda çözündürülüp daha sonra son hacmi saf su ile 200 ml'ye tamamlanarak stok çözelti hazırlanmıştır.
4. 0.1 mM SA (SA ön uygulaması için): 1 mM SA stok çözeltisinden 10 ml alınıp saf su ile hacmi 100 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
5. 0.50 mM H₂S (H₂S ön uygulaması için): 0,0140 g H₂S alınıp 300 ml saf suda çözündürülüp daha sonra saf su ile son hacmi 500 ml'ye tamamlanarak stok çözelti hazırlanmıştır.
6. 0.25 mM H₂S (H₂S ön uygulaması için): 0.50 mM H₂S stok çözeltisinden 50 ml alınıp saf su ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
7. 5 mM MG (MG ön uygulaması ve petri ekimi için): 1,5397 ml MG pipetlenip 1500 ml saf suda çözülüp daha sonra son hacmi saf su ile 2000 ml'ye tamamlanarak stok çözelti hazırlanmıştır.
8. 1 mM MG (MG ön uygulaması ve petri ekimi için): 5 mM MG stok çözeltisinden 300 ml alınıp saf su ile hacmi 1500 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
9. 0.1 M KH₂PO₄ (pH: 6,75) (Protein tayini için): 3,4 g KH₂PO₄ 200 ml saf suda çözülmüş, 1 N NaOH kullanılarak pH 6,5'e ayarlandıktan sonra hacim saf su ile 250 ml'ye tamamlanmıştır.
10. BCA reaktifi (protein tayini için): 15 ml Bicionchonic asit 0,3 ml FeCl₃ ile karıştırılır.
11. 0.1 M KH₂PO₄ (pH: 6,75), %1 PVP, 1 mM EDTA (antioksidan enzimlerin homojenizasyon tamponu) : 3,4 g KH₂PO₄ 200 ml saf suda çözülmüş, 1 N NaOH kullanılarak pH: 6,75'e ayarlandıktan sonra hacim saf su ile 250 ml'ye tamamlanmış ve üzerine 2,5 g PVP ve 0,073 g EDTA ilave edilmiştir.
12. 103.5 mM KH₂PO₄, pH: 7,5 (CAT aktivitesi ölçüm tamponu): 3,504 g KH₂PO₄, 150 ml saf suda çözülmüş, 1 N NaOH ile pH: 7,5'e ayarlanmış ve hacim saf su ile 250 ml'ye tamamlanmıştır.
13. 40 mM H₂O₂ çözeltisi (CAT aktivitesi ölçümü için substrat çözeltisi): 860 μ l %35'lik H₂O₂ alınıp hacmi saf su ile 250 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
14. 5 mM H₂O₂ çözeltisi (CAT aktivitesi standart grafik için kullanılan): 43 μ l %35'luk H₂O₂ alınıp hacmi saf su ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

- 15.** 50 mM Na_2HPO_4 , pH: 7,0 (APX aktivitesi ölçümünde kullanılan tampon çözeltisi): 3,90 g Na_2HPO_4 alınarak 300 ml saf suda çözülmüş ve pH: 7,0'ye ayarlandıktan sonra hacim saf su ile 500 ml'ye tamamlanmıştır.
- 16.** 0.5 mM Askorbik asid (APX aktivitesi ölçümünde kullanılan substrat çözeltisi): 0,0440 g askorbik asid tartılarak 50 mM Na_2HPO_4 (pH: 7,0) içerisinde eklenerek çözdürülmüştür.
- 17.** 2 mM H_2O_2 (APX aktivitesi ölçümünde kullanılan substrat çözeltisi): 86 μl H_2O_2 pipetlenip daha önce hazırlanan 50 mM Na_2HPO_4 (pH: 7,0) içerisine eklenmiştir.
- 18.** 0.1 mM EDTA (APX aktivitesi ölçümünde kullanılan substrat çözeltisi): 0,0185 g EDTA tartılıp daha önce hazırlanan 50 mM Na_2HPO_4 (pH: 7,0) içerisine eklenmiştir.
- 19.** 50 mM KH_2PO_4 (pH: 7,8) (SOD için tampon çözelti): 2,041 g KH_2PO_4 200 ml saf suda çözülmüş, pH: 7,8'e ayarlandıktan sonra ve hacim saf su ile 300 ml'ye tamamlanmıştır.
- 20.** 13 mM Methionine çözeltisi (SOD reaksiyon karışımı için): 0,581 g Methionine alınır, 10. maddede hazırlanmış olan 300 ml 50 mM KH_2PO_4 tamponu içerisine ilave edilerek çözülür.
- 21.** 75 μM NBT-Nitroblue Tetrazolium Klorür (SOD reaksiyon karışımı için): 0,0183 g NBT alınır, 10. maddede hazırlanmış olan 300 ml 50 mM KH_2PO_4 tamponu içerisine ilave edilerek çözülür.
- 22.** 0.1 mM EDTA (SOD reaksiyon karışımı için): 0,0111 g EDTA alınır, 10. maddede hazırlanmış olan 300 ml 50 mM KH_2PO_4 tamponu içerisine ilave edilerek çözülür.
- 23.** 2 μM riboflavin (SOD aktivitesi için 2. Çözelti): 0,005 g riboflavin, 15 ml saf suda çözülmüş, 3 ml'lik reaksiyon karışımının 2 μM riboflavin içermesi için 60 μl riboflavin alınmıştır.
- 24.** %5'lik TCA-trikloroasetik asit (Lipid peroksidasyon için homojenizasyon çözeltisi) : 100 ml saf su içerisine 5 g TCA ilave edilerek çözülür.
- 25.** %0,5'lik TBA-tiobarbutirik asit (Lipid peroksidasyon için reaksiyon çözeltisi): 100 ml saf su içine 20 gram TCA çözülür ve daha sonra içerisine %0,5 TBA ilave edilerek iyice çözünmesi sağlanır.
- 26.** 1 mM oksitlenmiş glutatyon (GSSG) (GR aktivitesi için): 0,0061 g GSSG, 10 ml saf su içerisinde çözdürülerek hazırlanmıştır.

- 27.** 50 mM Tris-HCl (GR aktivitesi için): 7,092 g Tris bir miktar saf su içerisinde çözülür, sonra pH:7,8'e ayarlanır ve son hacim 450 ml'ye tamamlanır.
- 28.** 1 mM EDTA (GR aktivitesi için): 0,1669 g EDTA bir miktar saf suda çözündürüldükten sonra 50 mM Tris-HCl içerisine ilave edilmiştir.
- 29.** 0.2 mM NADPH (GR aktivitesi için): 0,075 g NADPH bir miktar saf suda çözündürüldükten sonra 50 mM Tris-HCl içerisine ilave edilmiştir.
- 30.** 5 mM $MgCl_2$ (GR aktivitesi için): 0,2142 g $MgCl_2$ bir miktar saf suda çözündürüldükten sonra 50 mM Tris-HCl içerisine ilave edilmiştir.
- 31.** 0.1 M KH_2PO_4 (GPX aktivitesi): 6,804 g KH_2PO_4 tartılıp bir miktar saf suda çözündürüldükten sonra pH'ı 7,0'a ayarlanıp son hacmi 500 ml'ye tamamlanmıştır.
- 32.** 5 mM Guaicol (GPX aktivitesi): 280 μ l guaicol pipetle 0.1 M KH_2PO_4 içerisine eklenmiştir.
- 33.** 15 mM H_2O_2 (GPX aktivitesi): 646 μ l H_2O_2 pipetle 0.1 M KH_2PO_4 içerisine eklenmiştir.
- 34.** 65 mM KH_2PO_4 (süperoksit anyonu metodu için homojenizasyon çözeltisi): 2,653 g KH_2PO_4 bir miktar saf suda çözündürüldükten ve daha sonra pH 7,8'e ayarlanarak son hacim 300 ml'ye tamamlanır.
- 35.** 65 mM KH_2PO_4 (süperoksit anyon içeriği için): 170 ml homojenizasyon tamponundan alınıp kullanılmıştır.
- 36.** 10 mM hidrosillamin (süperoksit anyon içeriği için): 0,0138 g hidrosillamin 20 ml saf su içerisinde çözülür.
- 37.** 17 mM Aminobenzene Sülfanik Acid (süperoksit anyon içeriği için): 0,5886 g Aminobenzene Sülfanik Acid 200 ml saf suda çözülür.
- 38.** 17 mM naftilamin (süperoksit anyon içeriği için): 0,4860 g naftilamin 200 ml saf su içerisinde çözülür.
- 39.** 10 ml Aseton, H_2O_2 miktarının belirlenmesinde homojenat için kullanılmıştır.
- 40.** %5'lik $Ti(SO_4)_2$ (titanyum disülfat çözeltisi) (H_2O_2 miktarının belirlenmesinde kullanılır): 1,5 gram $Ti(SO_4)_2$ 30 ml saf suda çözülerek hazırlanmıştır.
- 41.** %19'luk NH_4OH (H_2O_2 belirlenmesinde kullanılan): 10,4 ml NH_3 40 ml saf suda çözülerek son hacmi 50 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

- 42.** 2 M'lık H_2SO_4 (H_2O_2 miktarının belirlenmesinde kullanılan): 80 ml %98'lik H_2SO_4 alınmış 250 ml saf su içerisine ilave edildikten sonra 400 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
- 43.** 0.1 M Na_2HPO_4 (Gly I ve Gly II homojenizasyon çözeltisi): 6,244 g Na_2HPO_4 bir miktar saf suda çözündürüldükten ve daha sonra pH 7,0'a ayarlanarak son hacmi 400 ml'ye tamamlanır.
- 44.** 16 mM $MgSO_4$ (Gly I ve Gly II homojenizasyon çözeltisi): 1,692 g $MgSO_4$ tartılıp bir miktar saf suda çözündürüldükten sonra 0.1 M Na_2HPO_4 içerisine eklenir.
- 45.** 0.2 mM PMSF (Gly I ve Gly II homojenizasyon çözeltisi): 0,0139 g PMSF tartılıp bir miktar saf suda çözündürüldükten sonra 0.1 M Na_2HPO_4 içerisine eklenir.
- 46.** %5 Glycerol (Gly I ve Gly II homojenizasyon çözeltisi): 20 ml Glycerol pipetle 0.1 M Na_2HPO_4 içerisine eklenir.
- 47.** %0.2 PVP (Gly I ve Gly II homojenizasyon çözeltisi): 0,8 g PVP tartılıp bir miktar saf suda çözündürüldükten sonra 0.1 M Na_2HPO_4 içerisine eklenir.
- 48.** 0.1 M Na_2HPO_4 (Gly I aktivitesi): 5,460 g Na_2HPO_4 bir miktar saf suda çözündürüldükten ve daha sonra pH 7,5'e ayarlanarak son hacmi 350 ml'ye tamamlanır.
- 49.** 3.5 mM MG (Gly I aktivitesi): 188 μ MG pipetle 0.1 M Na_2HPO_4 içerisine eklenir.
- 50.** 1.7 mM GSH (Gly I aktivitesi): 0,1827 g tartılıp bir miktar saf suda çözündürüldükten sonra 0.1 M Na_2HPO_4 içerisine eklenir.
- 51.** 16 mM $MgSO_4$ (Gly I aktivitesi): 1,480 g $MgSO_4$ tartılıp bir miktar saf suda çözündürüldükten sonra 0.1 M Na_2HPO_4 içerisine eklenir.
- 52.** 50 mM Tris-HCl (Gly II aktivitesi): 2,119 g Tris bir miktar saf suda çözündürüldükten sonra pH'ı 7,5'e ayarlanarak son hacmi 175 ml'ye tamamlanmıştır.
- 53.** 16 mM $MgSO_4$ (Gly II aktivitesi): 0,740 g $MgSO_4$ tartılıp bir miktar saf suda çözündürüldükten sonra 50 mM Tris-HCl içerisine eklenir.
- 54.** 300 μ M SLG (Gly II aktivitesi): 0,0199 g SLG tartılıp bir miktar saf suda çözündürüldükten sonra 50 mM Tris-HCl içerisine eklenir.
- 55.** 3.5 mM MG (Gly II aktivitesi): 94 μ l MG pipetle 50 mM Tris-HCl içerisine eklenmiştir.

56. 0.5 M perchloric acid (içsel MG'nin belirlenmesi için homojenizasyon çözeltisi): 6,450 ml perklorik asit bir miktar saf suya pipetlendirildikten sonra son hacmi 150 ml'ye tamamlanmıştır.

57. 7.2 mM 1,2-diaminobenzene (içsel MG içeriğini belirlemek için): 0,0155 g 1,2-diaminobenzene bir miktar saf suda çözündürüldükten sonra son hacmi 20 ml'ye tamamlanmıştır.

58. 5 M perchloric acid (içsel MG içeriğini belirlemek için): 4,270 ml perchloric acid bir miktar saf suya pipetlenenip daha sonra son hacmi 10 ml'ye tamamlanmıştır.

3.3. Yöntemler

3.3.1. Bitki tohumlarının çimlendirilmesi

Bu araştırmada, monokotil bir bitki olan mısır (*Zea mays* cv. Arifiye) kullanılmıştır. Mısır bitkisine ait tohumlar, May Tohumculuk'tan temin edilmiştir. Elde edilen tohumların sterilizasyonu, birkaç kez çeşme suyu ile yıkandıktan sonra %10'luk ticari çamaşır suyunda 5 dk bekletilerek daha sonra çeşme suyuyla iyice yıkanıp hafif alkol sıkılarak tekrar çeşme suyuyla yıkanmış ve en son saf su ile iyice yıkanarak yapılmıştır. Bitkiler Petri ortamında yetiştirilmiştir. Bitkilerin yetiştirildiği petri önce %10'luk çamaşır suyuyla yıkanıp bulaşık makinasında 70°C'de 3 defa yıkandıktan sonra alkollendirilmiş ve en son saf su ile iyice yıkanarak etüv de 200°C'de 2 saat bekletilerek steril edilmiştir. Buna ek olarak petri içine konulan kurutma kağıtları steril makas tarafından petrilere göre kesilerek petrilerle beraber etüv de steril edilmiştir. Bitkiler bir iklim dolabın da 25°C 5 gün süreyle çimlendirilmeye bırakılmıştır.

Amaç kısmında da anlatıldığı gibi bu araştırmada bitkilere birer sinyal bileşik olan Nitrik oksit (NO), Salisilik asid (SA) ve Hidrojen sülfür (H₂S) uygulanmıştır. Ancak burda önemli bir nokta olan NO, gaz formunda bir bileşik olduğundan hassas ve dengeli uygulanması pek mümkün değildir. Bu sebeple araştırmamızda suda çözünerek bitki içerisine alındığında parçalanarak NO üreten bir bileşik olan Sodyum nitroprussid (SNP) kullanılmıştır. Bu yüzden SNP'ye bu özelliğinden dolayı NO donörü

denilmektedir. Steril edilmiş mısır (*Zea mays* cv. Arifiye) tohumları çimlenmeden önce farklı konsantrasyonlarda 8 saat SA (0.0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.75 ve 1 mM), SNP (0.0,50, 100, 200, 300, 400, 750, 1000 μ M) ve H₂S (0.0,0.25, 0.50, 1.0, 1.5 ve 2.0 mM) çözeltilerinde ön ıslatmaya maruz bırakılmış ve daha sonra farklı konsantrasyonlarda MG (1,3,5,10 mM) çözeltileri içeren petri kaplarına ekilmişlerdir. Ayrıca MG'nin tek başına etkisini değerlendirmek için tohumlar saf suda 8 saatlik ön ıslanmadan sonra bulundukları petri ortamına MG'nin (1, 3, 5 ve 10 mM) farklı konsantrasyonları uygulanarak çimlendirilmiştir. Yapılan ön denemelerle SA (0.1 ve 1 mM), SNP (500 ve 750 μ M), H₂S (0.25 ve 0.50 mM) ve MG (1 ve 3 mM) çalışmada kullanılacak konsantrasyonlar olarak belirlenmiştir.

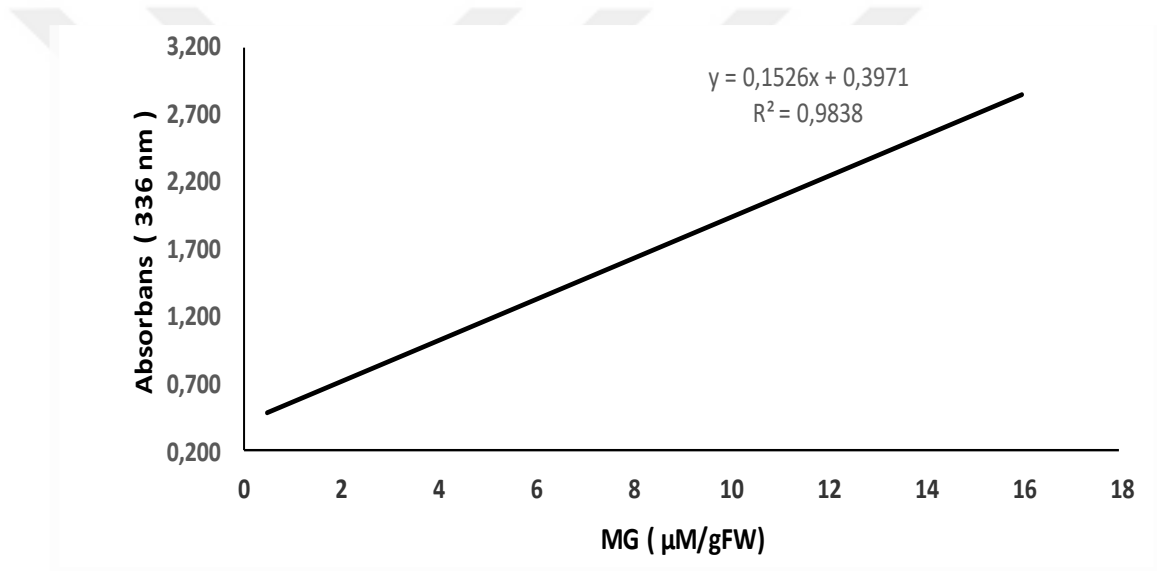
Çalışmalar da kullanılacak taze doku örnekleri için belirlenen konsantrasyonlarda SA (0.1 ve 1 mM), SNP (500 ve 750 μ M), H₂S (0.25 ve 0.50 mM) ve MG (1 ve 3 mM) esas ekimleri yapılarak 5. günün sonunda hasatı yapılmış ve alınan taze doku örnekleri -80°C de saklanarak aşağıdaki parametrelerin analizinde kaynak olarak kullanılmıştır. Bu çalışmada, her uygulama için içerisinde 10 adet mısır tohumu barındıran 90 petrilik bir ekim yapılmıştır ve bunların SNP, SA, H₂S ve MG uygulamaların grup düzeni aşağıdaki gibi olmuştur.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan grupların tablosu

Kontrol	Kontrol	Kontrol
0.1 mM SA	0.25 mM H ₂ S	500 μ M SNP
1 mM SA	0.50 mM H ₂ S	750 μ M SNP
1 mM MG	1 mM MG	1 mM MG
3 mM MG	3 mM MG	3 mM MG
0.1 mM SA + 1 mM MG	0.25 mM H ₂ S + 1 mM MG	500 μ M SNP + 1 mM MG
1 mM SA + 1 mM MG	0.50 mM H ₂ S + 1 mM MG	750 μ M SNP + 1 mM MG
0.1 mM SA + 3 mM MG	0.25 mM H ₂ S + 3 mM MG	500 μ M SNP + 3 mM MG
1 mM SA + 3 mM MG	0.50 mM H ₂ S + 3 mM MG	750 μ M SNP + 3 mM MG

3.4. İçsel Metilglioksal'ın (MG) Belirlenmesi

Taze bitki dokuları (0.5 g) bir havanda sıvı azot içinde öğütülür. Özüte 2.5 ml 0.5 M perklorik asit ilave edilir ve 4°C de santrifüjlenir (12 000 g). Ekstrakt 15 dk. oda sıcaklığında tutulur ve tekrar aynı şartlarda santrifüjlenir. Süpernatant bir tüpe alınır ve MG ölçümü için hazırdır. Standart ölçüm ortamı, 250 µl of 7.2 mM 1,2-diaminobenzene, 100 µl of 5 M perklorik asit ve 650 µl süpernatanttan oluşur. Karışımın absorbansı 30 dk sonra 336 nm de ölçülür (Kalapos 1999).



Şekil 3.1. İçsel MG ölçümünde kullanılan standart grafik

3.5. Glioksalaz I ve Glioksalaz II Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

3.5.1. Glioksalaz I

Taze bitki dokuları (0.5 g) bir havanda sıvı azot içinde öğütülür. Özüte 2.5 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.0; 50% glycerol; 16 mM MgSO₄, 0.2 mM PMSF ve 0.2% PVP'den oluşan) eklenerek iyice homojenize edilir ve 4°C'de santrifüjlenir (12 000 g).. Standart ölçüm ortamı, 0.1 M sodium phosphate buffer tamponundan (pH 7.5; 3.5 mM MG; 1.7 mM GSH; 16 mM MgSO₄'den oluşan) oluşmaktadır. Karışımın

absorbansı 240 nm de ölçülür (Kalapos 1999). Bu ortalama absorbans değerleri, standart grafik yardımıyla μmol cinsinden 25°C 'de, 1 dakika içinde, absorbansı 1 μmol azaltan enzim miktarı 1 enzim ünitesi olarak kabul edilir ve sonuçlar mg protein başına düşen enzim ünitesi ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ protein) olarak sunulur.

3.5.2. Glioksalaz II

Taze bitki dokuları (0,5 g) bir havanda sıvı azot içinde öğütülür. Özüte 2.5 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.0; 50% glycerol; 16 mM MgSO_4 , 0.2 mM PMSF ve 0.2% PVP'den oluşan) eklenerek iyice homojenize edilir ve 4°C 'de santrifüjlenir (12 000 g). Standart ölçüm ortamı, 50 mM Tris-HCl er tamponundan (pH 7.5; 3.5 mM MG 300 μM SLG; 16 mM MgSO_4 'den oluşan) oluşmaktadır. Karışımın absorbansı 240 nm de ölçülür (Kalapos 1999). Bu ortalama absorbans değerleri, standart grafik yardımıyla μmol cinsinden 25°C 'de, 1 dakika içinde, absorbansı 1 μmol azaltan enzim miktarı 1 enzim ünitesi olarak kabul edilir ve sonuçlar mg protein başına düşen enzim ünitesi ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ protein) olarak sunulur.

3.6. Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

Antioksidan enzimlerin çoğu (SOD, CAT, APX, GPX, GR gibi) oksidatif zarardan bitkileri korumaya yardımcı olur.

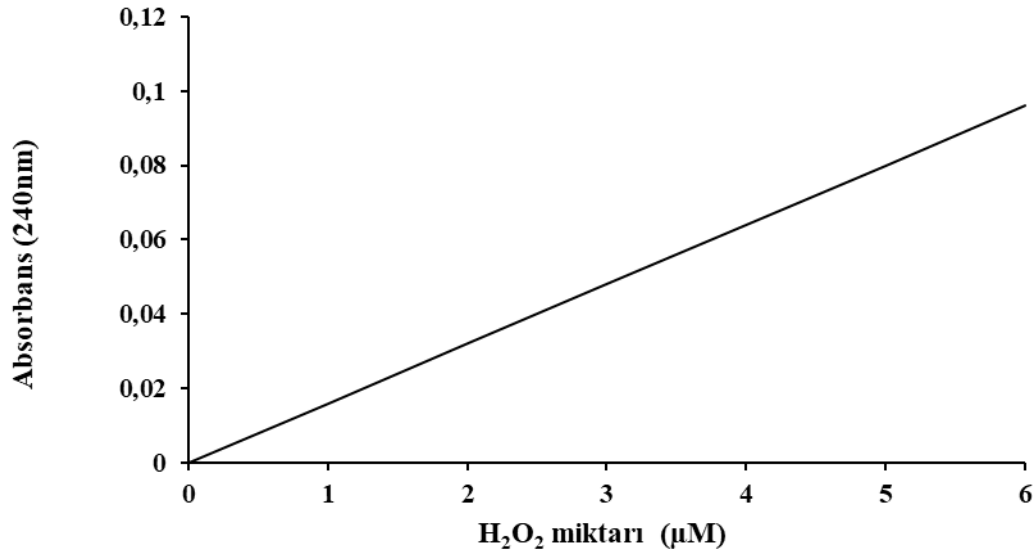
3.6.1. Süperoksid dismutaz aktivitesinin belirlenmesi

Süperoksid dismutaz (SOD) aktivitesi, nitro blue tetrazoliumun (NBT) süperoksit radikalleri ile mavi renkli formazona fotokimyasal indirgenmesi reaksiyonunun SOD enzimi tarafından engellenmesinin spektrofotometrik olarak belirleme temeline dayanır (Yordanova *et al.* 2004). Reaksiyon karışımında (3 ml); 50 mM KH_2PO_4 (pH: 7.8), 13 mM metiyonin, 75 μM NBT, 2 μM riboflavin ve 0.1 mM EDTA bulunmaktadır. Aktivite ölçümü için 3 ml spektrofotometre küvetine yukarıdaki riboflavin içermeyen reaksiyon karışımından 2.58 ml alınıp üzerine 30 μl enzim ekstraktı ilave edildi.

Reaksiyon, tüp üzerine 100 μM 'lık riboflavin çözeltisinden 60 μl pipetlenip karıştırıldıktan sonra, beyaz bir ışık kaynağı önüne yerleştirmek suretiyle başlatıldı. Tüp, ışık kaynağının karşısında 15 dk bırakıldı ve reaksiyon ışık kaynağının kapatılmasıyla durduruldu. 15 dk içerisinde NBT'nin renk açılma yoğunluğu 560 nm'de köre karşı okundu. Kör; aynı işlemin enzimsiz örneğinden oluşturuldu. SOD aktivitesinin 1 ünitesi, 560 nm'de gözlenen NBT indirgenmesinin %50 inhibisyonuna neden olan enzim miktarı, 1 enzim ünitesi olarak kabul edildi ve değerler U.mg^{-1} protein olarak sunuldu.

3.6.2. Katalaz aktivitesinin belirlenmesi

Katalazın (CAT) aktivite tayini için Gong *et al.* (2001) tarafından önerilen metot kullanıldı. Bu metot, katalazın ortamdaki H_2O_2 'nin oksijen ve suya dönüşümü esnasında meydana gelen absorbans değişiminin 240 nm'de izlenmesi esasına dayanır. Önce reaksiyonda azalan H_2O_2 miktarını belirlemek için standart grafik hazırlandı. Standart grafik (Şekil 2.1) hazırlamak için, 5 mM H_2O_2 çözeltisinden 3 ml'lik spektrofotometre tüplerine sırasıyla; 0,15, 0,3, 0,45, 0,6, 0,75, 0,9, 1,05, 1,2, 1,35 ve 1,5 ml ilave edildi ve tüplerin hacimleri saf su ile 1,5 ml'ye tamamlandıktan sonra her tüpe 1,47 ml 103,5 mM KH_2PO_4 ve 30 μl su ilave edildi. Hazırlanan karışımın absorbansı spektrofotometrede 240 nm'de köre karşı okunur ve absorbans değerlerine karşılık gelen μM H_2O_2 değerleri kullanarak standart grafik elde edildi. Aktivite ölçümü için 3 ml'lik spektrofotometre küvetine, 103 mM KH_2PO_4 tamponundan 1,475 ml ve 40 mM'lık H_2O_2 substrat çözeltisinden 1,5 ml konulduktan sonra, 25 μl enzim ekstraktı ilave edildi. Spektrofotometrede 240 nm'de 3 dakika boyunca 1 dakika aralıklarla köre karşı absorbansı okundu ve absorbansın doğrusal olarak azaldığı aralıktan dakika başına absorbans azalması hesaplandı. Bu ortalama absorbans değerleri, standart grafik yardımıyla μmol cinsinden H_2O_2 miktarına dönüştürüldü. 25°C'de, 1 dakika içinde, absorbansı 1 μmol azaltan enzim miktarı 1 enzim ünitesi olarak kabul edildi ve sonuçlar mg protein başına düşen enzim ünitesi (U.mg^{-1} protein) olarak sunuldu.



Şekil 3.2. Katalaz aktivitesi ölçümünde kullanılan standart grafik

3.6.3. Askorbat peroksidaz aktivitesinin belirlenmesi

Reaksiyon karışımı (3 ml), 50 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7.0) içinde 0.5 mM askorbik asit (AsA), 2 mM H₂O₂, 0.1 mM EDTA içerir ($E = 2.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Bir spektrofotometrede (3 ml), 2.90 ml reaksiyon karışımı pipetlenir. Enzim ekstresi 50 µl eklenerek reaksiyon başlar. (Eğer reaksiyon çok hızlı olursa, enzim miktarı azaltılabilir, aksi takdirde arttırılabilir). Reaksiyonun absorbansı, 1 dakika aralıkla 3 dakika boyunca 290 nm'de bir spektrofotometre üzerinde izlenir. 3 dakika boyunca absorbansın azaltılması kaydedilir ve hesaplama için değerlendirilir. Hesaplamak için, doğrusal artışın gerçekleştirildiği aralık kullanılır. Bir birim APX aktivitesi, 1 µmol askorbik asidi oksitlenmiş $\text{min}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$ i ayrıştırmak için gereken miktar olarak tanımlanır (Wang *et al.* 2010).

3.6.4. Guaicol peroksidaz aktivitesinin belirlenmesi

5 mM guaicol ve 15 mM H₂O₂ içeren 3 ml 0.1 M, NaH₂P₄O₇ (pH: 7) içeren bir spektrofotometre küvetine yerleştirilir. Enzim ekstresi 10 µl eklenerek reaksiyon başlar. (Eğer reaksiyon çok hızlı olursa, enzim miktarı azaltılabilir, aksi takdirde arttırılabilir).

Reaksiyonun absorbansı, 1 dakika ile 5 dakika boyunca 470 nm'de bir spektrofotometre üzerinde izlenir. 5 dakika boyunca absorbans artışı kaydedilir ve hesaplama için değerlendirilir. Hesaplamak için, doğrusal artışın gerçekleştirildiği aralık kullanılır. 1 dakika boyunca 25°C'de absorbans seviyesini 0.01 arttıran enzim miktarı 1 Birim Enzim olarak kabul edilir ve elde edilen sonuç EU / mg proteini olarak verilir (Ye *et al.* 2002).

3.6.5. Glutasyon redüktaz (GR) aktivitesinin belirlenmesi

Glutasyon redüktaz aktivitesi (GR) aktivitesi Jithesh *et al.* (2006)'nın çalıştığı yöntemle göre yapılacaktır. Aktivite ölçümünde (3 ml) 50 mM Tris-HCl (pH: 7.5) içerisinde 200 µl EDTA (0.5 mM), 500 µl NADPH ve 250 µl GSSG içeren karışıma 10-100 µl enzim özütü ilave edilecektir. NADPH'ın oksidasyonu 340 nm'de 5 dakika boyunca absorbans azalması ölçülerek belirlenir.

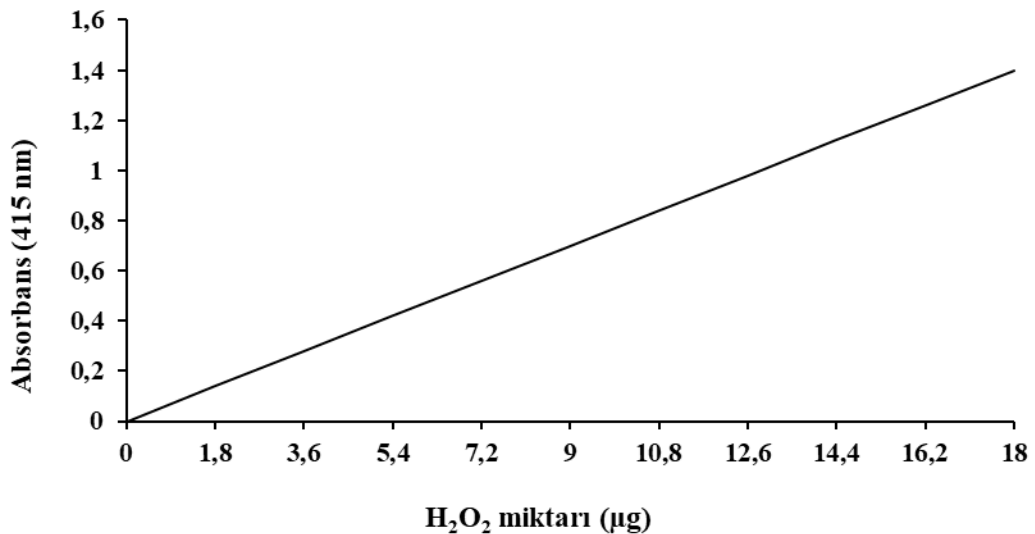
3.7. Lipid Peroksidasyonu (MDA olarak) İçeriğinin Belirlenmesi

Lipid peroksidasyonu için 0.5 g yaprak alınarak 5 ml %5'lik TCA içinde homojenize edildikten sonra elde edilen homojenat 10.000 xg'de 15 dakika santrifüj edilir. Tüpün süpernatant kısmından 4 ml alınarak üzerine 1 ml %0,5 lik TBA çözeltisi ilave edilir. Reaksiyon karışımı kaynar suda 30 dakika inkübe edilir ve reaksiyon tüplerin buz banyosuna alınmasıyla durdurulur. Örnekler tekrar 10000 x g'de 10 dakika santrifüj edilir. Süpernatant kısmı alınarak absorbansı 532 nm'de okunur ve daha sonra 600 nm'deki non-spesifik absorpsiyon için absorbans değeri belirlenir.

Lipid peroksidasyonun hesaplanması için; 532 nm'de ölçülen absorbans değerinden 600 nm'de belirlenen değeri çıkarılır ve 1 ml çözeltideki MDA (nmol/ml): $[(A_{532} - A_{600}) / 155000] \times 10^6$ formülüyle hesaplanır. Sonuçlar MDA (nmol/gram doku) şeklinde verilir (Ananieva *et al.* 2002).

3.8. Hidrojen Peroksit (H₂O₂) Miktarının Belirlenmesi

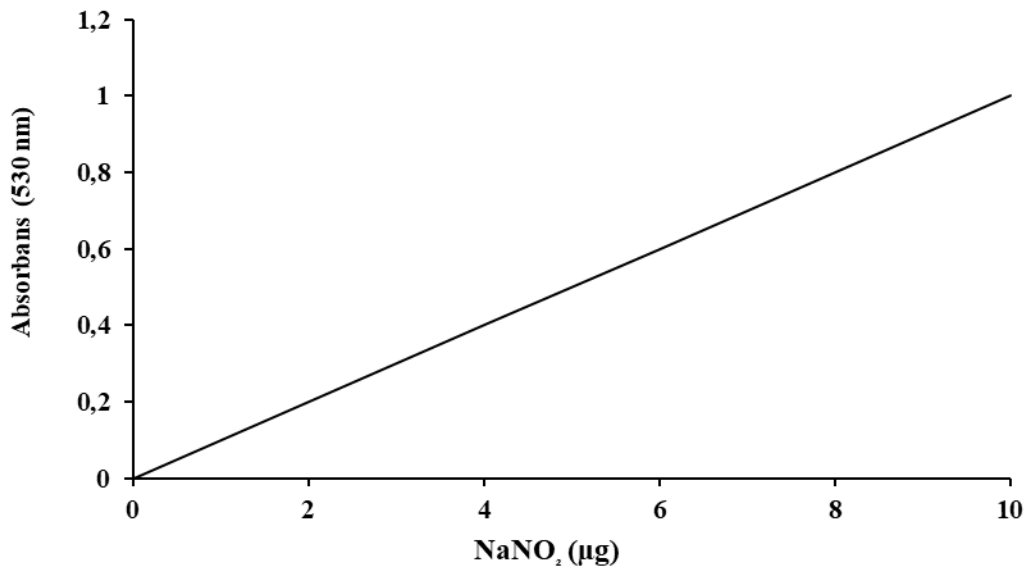
Taze bitki dokusundan alınan 0.5 gr doku örneği sıvı azotla havanda iyice homojenize edilmiştir. Daha sonra üzerine 5 ml soğuk aseton (-20°C) ilave edilip iyice homojenize olana kadar havan da öğütülmüştür. Homojenat ependorf tüplere aktarılarak +4°C'de 10.000 xg'de 15 dk santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Santrifüj sonrası süpernatanttan 1.5 ml alınarak üzerine sırasıyla 0.15 ml %5'lik Ti(SO₄)₂ ve 0.3 ml %19'luk NH₄OH ilave edilerek vortekslenmiştir. Çökelek oluştuktan sonra karışım +4°C'de 8.500 xg'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı dikkatli bir şekilde atıldıktan sonra tüpte kalan pelet üzerine 2 M'lık H₂SO₄ çözeltisinden 3 ml ilave edilip vortekslenmiştir. İyice çözülen pelet 415 nm absorbansda ölçülmüştür (Xu *et al.* 2006). Standart grafiği hazırlamak için 3 mM'lık %35'lik H₂O₂ stok çözeltisi kullanılmıştır. Stok çözeltiden tüplere sırasıyla 3.6, 7.2, 10.8, 14.4, 18, 21.6, 25.2, 28.8, 32.4 ve 36 ng H₂O₂ içeren hacimler alınmış ve üzerleri aseton ile 1.5 ml'ye tamamlanmıştır. Daha sonra karışım üzerine 0.15 ml %5'lik Ti(SO₄)₂ ve 0.3 ml %19'luk NH₄OH eklenmiştir. Tüpte çökelek oluştuktan sonra +4°C'de 8.500 xg'de 15 dk daha santrifüj edilmiştir. Süpernatantı atılan tüplerdeki peletin üzerine 3 ml 2 M'lık H₂SO₄ eklenip çözüldükten sonra absorbansı 415 nm'de köre karşı okunmuştur. Her bir absorbansa karşılık gelen µg (H₂O₂) değerlerinden faydalananak standart grafik oluşturulmuştur.



Şekil 3.3. Hidrojen peroksit (H₂O₂) miktarını belirlemede kullanılan standart grafik

3.9. Süperoksit Anyonu miktarının belirlenmesi

Taze doku (0.5 g) 2 ml 65 mM soğuk fosfat tamponunda (pH:7.8) homojenize edilir. Homojenat 5000 xg de 10 dakika santrifüj edilir. Süpernatanttan 1 ml alınır üzerine 0.9 ml fosfat tamponu ve 0.1 ml 10 mM hydroxylamine hydrochloride eklenir. Çözelti karıştırılır ve 20 dakika 25°C’de inkübe edilir. Daha sonra karışımdan 1 ml alınır üzerine 1 ml 17 mM aminobenzene sulfonic acid ve 1 ml 17 mM 1-naphtylamme eklenir karıştırılır ve 20 dakika 25°C’de inkübe edilir. Karışıma 3 ml n-butyl alcohol eklendikten sonra spektrofotometre de 530 nm de ölçülür. Standart grafik için farklı miktardaki HNO_2 nın 530 nm deki abs değerlerine bakılır ve çizilir (Şekil 2.3).

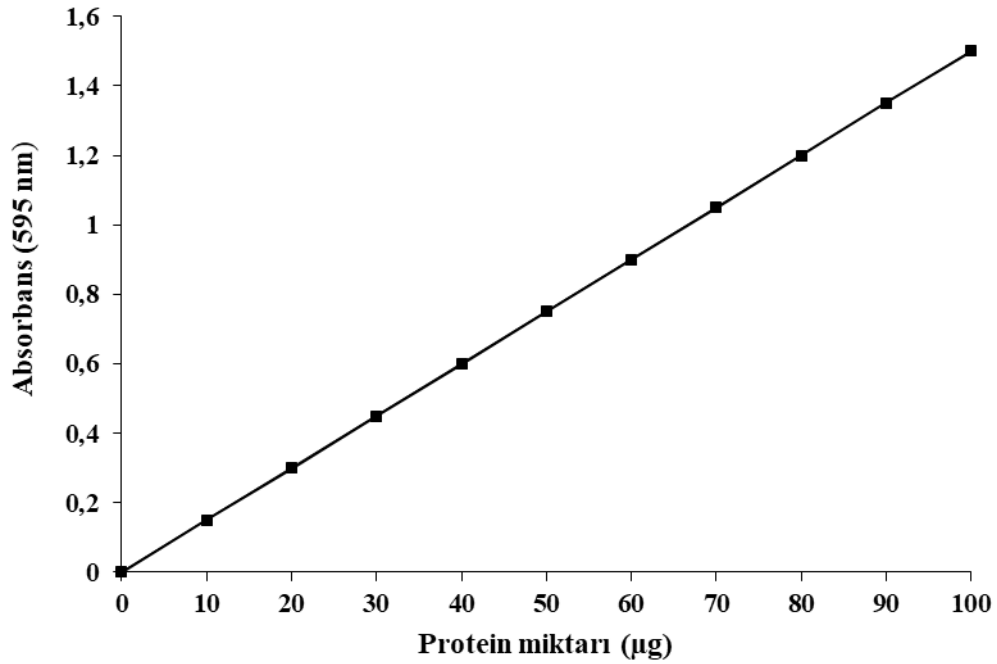


Şekil 3.4. Süperoksit anyon ($\text{O}_2^{\bullet-}$) miktarını belirlemede kullanılan standart grafik

3.10. Protein Tayini

Yapraklar (0.5 gr) önce sıvı azotta iyice ekstrakte edildi ve un haline gelen ekstrakt 4 kat hacimdeki 0.1 M fosfat tamponunda (pH: 6.75) havanda iyice ezilerek homojenizasyon tamamlandı. Daha sonra homojenat 15.000 rpm’de 15 dk boyunca santrifüj edildi. Protein tayini için elde edilen berrak süpernatant kullanıldı. Protein miktarı spektrofotometrik olarak tayin edildi. Bu süpernatantlar önce tamponla

seyreltildi ve seyreltilmiş özütten, 20 µl alınıp, 200 µl BCA (Bicinchoninic asit+CuSO₄) reaktifiyle karıştırıldı ve karışım bir mikropate içinde 60 °C’de 15 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası oda ısısına gelen örneklerin absorbansları bir mikropate spektrofotometrede 562 nm’de köre karşı okundu. Körde örnek yerine 20 µl saf su kullanıldı. Daha sonra, gerekli hesaplamalar standart grafik üzerinden yapılarak protein miktarları µg protein/gr doku olarak tayin edildi. Örneklerdeki protein miktarını hesaplamak için gerekli standart grafik şu şekilde hazırlandı; 1 ml’sinde 1 mg saf protein içeren standart sığır albümin (BSA) çözeltisinden 0, 2.5, 5, 7.5, 10 ve 12.5 µg protein içeren hacimler mikro platedeki kuyucuklarına yüklendi ve bütün tüplerin hacimleri saf su ile 20 µl’ye tamamlandı. Bu tüplerin her birine 200 µl BCA reaktifi ilave edilip karıştırıldı. Kör numune olarak 200 µl BCA reaktifi ve 20 µl saf su kullanıldı. Hazırlanan plate 60°C’de 15 dk inkübe edildi ve sonra mikropate ki örneklerin absorbansları 562 nm’de köre karşı okundu. Yapılan spektrofotometrik ölçümler sonucunda, 562 nm’deki absorbans değerlerine karşılık gelen protein miktarları kullanılarak bir standart grafik elde edildi (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Protein tayini için kullanılan standart grafik

İstatistik analiz

Sonuçlar, her bir uygulamadan üç örnek (3 paralel) ve her bir örnekten 3 tekrür yapıldıktan sonra elde edilen 9 değerin ortalamasıdır. Sonuçların karşılaştırılması, SPSS 20 paket programı kullanılarak tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile yapılmış $p<0.05$ önem seviyesinde Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma Testi kullanılarak belirlenmiştir.



4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. MG, SNP, SA ve H₂S Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

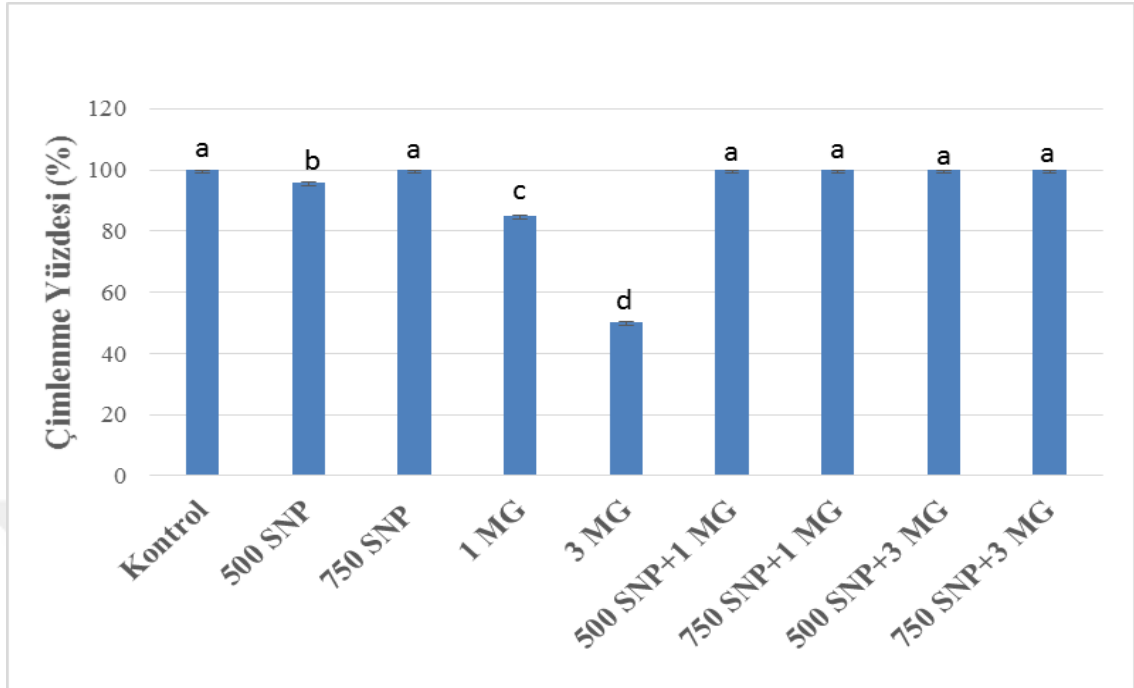
Çalışmamızda en uygun MG, SNP, SA ve H₂S konsantrasyonlarının belirlenmesi için mısır tohumları farklı konsantrasyonlarda SA (0,1, 0,3, 0,5, 0,75 ve 1 mM), SNP (50, 100, 200, 300, 500, 750, 1000 µM) ve H₂S (0,25, 0,50, 1,0, 1,5 ve 2,0 mM) çözeltilerinde 8 saat şişmeye (ön ıslatmaya) bırakılmış ve daha sonra Petrilere ekilmiştir. Bu ön çalışmanın 5. gününde hasat edilen fidelerde, kök-gövde uzunluğu, kuru ağırlık, klorofil ve protein miktarı tayini ile lipid peroksidasyonu (MDA olarak) seviyesi belirlenmiştir. Buradan elde edilen bulgulara göre, her bir bileşiğin (SA, SNP ve H₂S) mısır fideleri için toksik olmayan ve büyüme ile gelişmelerini teşvik etmede en uygun konsantrasyonları belirlendi. Diğer taraftan, çalışmamızda oksidatif stres ajanı olarak kullanılan MG'nin mısır tohumlarının çimlenme ve gelişmesinde %25 ve %50 inhibisyona neden olan konsantrasyonları belirlendi. Bunun için MG'nin 1, 3, 5 ve 10 mM konsantrasyonlarında denemeler yapıldı. Yapılan ön deneme bulgularına göre, çalışılacak en uygun konsantrasyonlar SNP için 500 ve 750 µM, SA için 0,1 ve 1 mM, H₂S için 0,25 ve 0,50 mM ve MG için 1 ve 3 mM olarak belirlenmiştir.

4.2. SNP, SA ve H₂S Uygulamasının MG Toksitesi Altındaki Fidelerde Çimlenme ve Kök-gövde Uzunlukları Üzerinde Etkileri

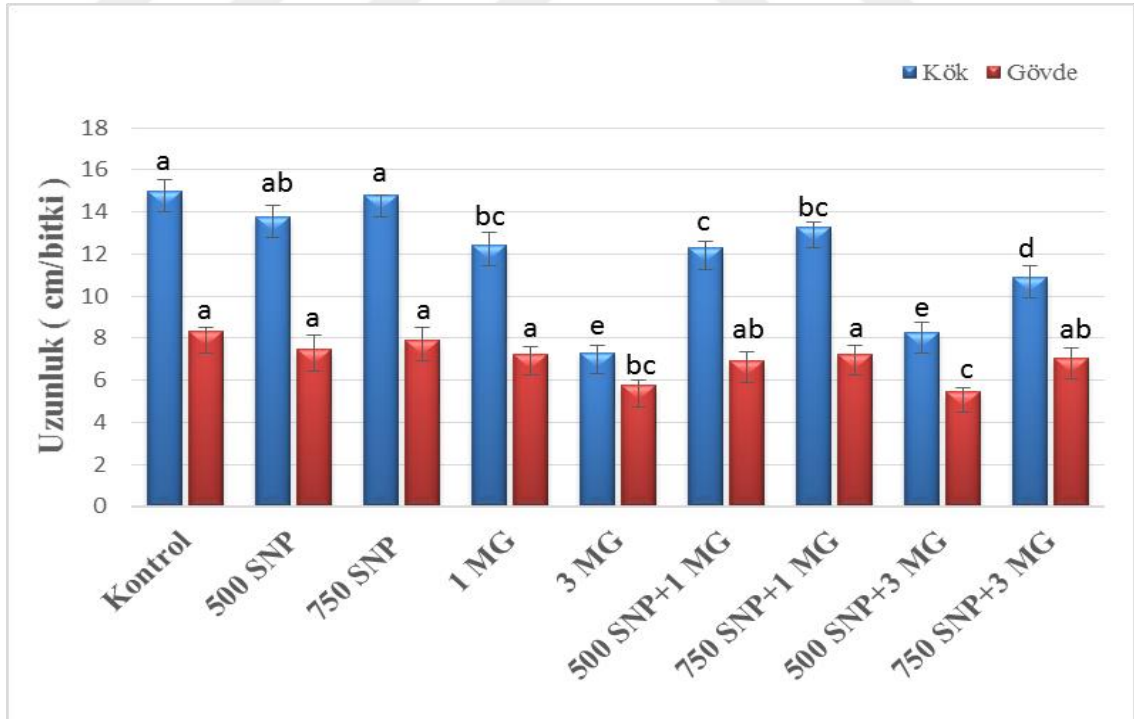
Çalışmamızdan elde edilen bulgulara göre, MG uygulamaları (1 ve 3 mM) mısır tohumlarının çimlenme oranını (%) ve çimlenme hızını (burada sunulmamıştır) önemli derecede ($P < 0,05$) inhibe etmiştir (Şekil 4.1-6). Ancak MG stresinden önce tohumlara uygulanan SNP, SA ve H₂S uygulamaları çimlenmeyi iyileştirmiş ve kontrole yakın seviyelere çıkarmıştır (Şekil 4.1-6).

Diğer taraftan MG uygulamaları çimlenen mısır fidelerinde hem kök hem de gövde uzunlukları üzerinde olumsuz etki yapmış, bu organların büyüme ve gelişimini kontrole

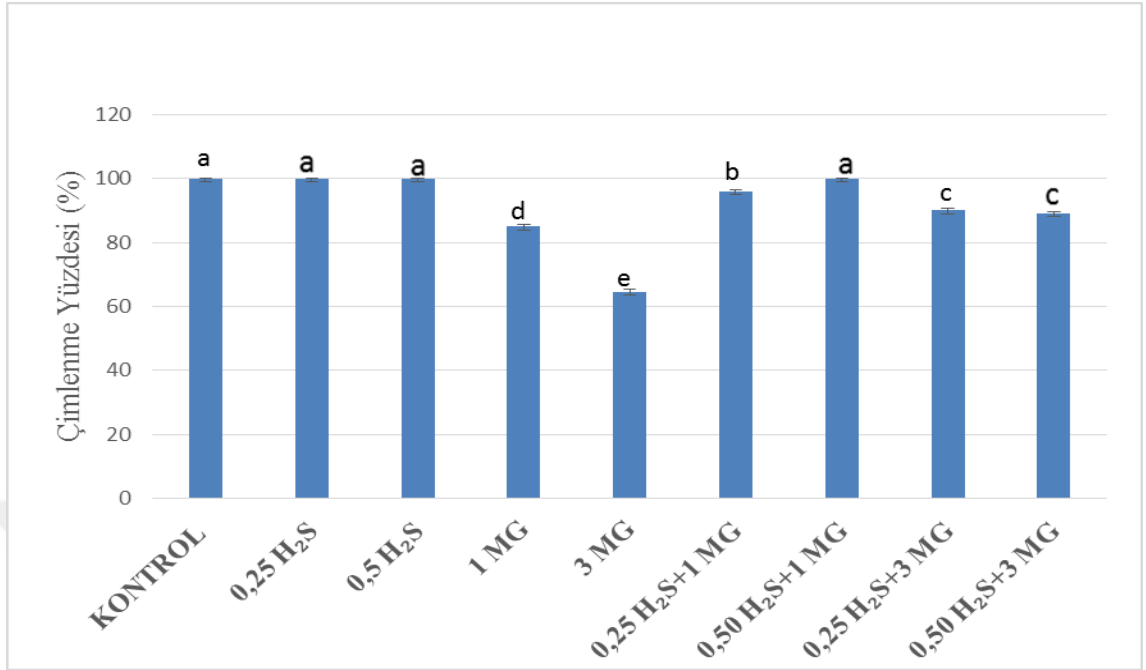
göre önemli ($P<0,05$) seviyelerde düşürmüştür (Şekil 4.1-6). MG'nin konsantrasyon artışıyla olumsuz etkisinin artmasının yanında, MG inhibisyonu gövdeye kıyasla kök uzunluğu üzerinde daha yüksek olmuştur (Şekil 4.1-6). SNP'nin 500 ve 750 μM ile muamele edilmiş ve sonra 1 ve 3 mM MG içeren ortamdaki (SNP+MG uygulaması) fidelerde, SNP'nin özellikle 750 μM 'lık dozu 3 mM MG uygulamasında hem kök hem de gövde uzunluklarında kontrolüne göre önemli iyileşmeler ($P<0,05$) sağlamıştır. Benzer etki 0,5 mM H_2S +1 mM MG uygulamasında da belirlenmiştir. Ancak SA+MG uygulamalarının hiçbirisi kontrolüne göre mısır fidelerinde kök ve gövde üzerinde anlamlı ($P>0,05$) bir etki yapamamıştır. Elde edilen bulgular genel olarak değerlendirildiğinde, MG ortamında çimlenen mısır tohumlarında, MG toksitesinden kaynaklı olarak hem çimlenme oranı azalmakta hem de çimlenen fidelerin kök ve gövde uzunlukları önemli seviyede düşmektedir. Buna karşılık SNP, SA ve H_2S ile ön uygulama yapılmış mısır tohumları aynı MG ortamında çimlendiklerinde; SNP, SA ve H_2S uygulamalarının hepsi MG etkisiyle düşen çimlenme oranını iyileştirebilmişlerdir. Aynı uygulamalardan 750 μM SNP ve 0,5 mM H_2S uygulamaları ise ilave olarak çimlenen mısır fidelerinin kök ve gövde uzunluklarını da iyileştirebilmişlerdir. SA uygulaması ise kök ve gövde uzunluğu üzerinde anlamlı etki yapamamıştır.



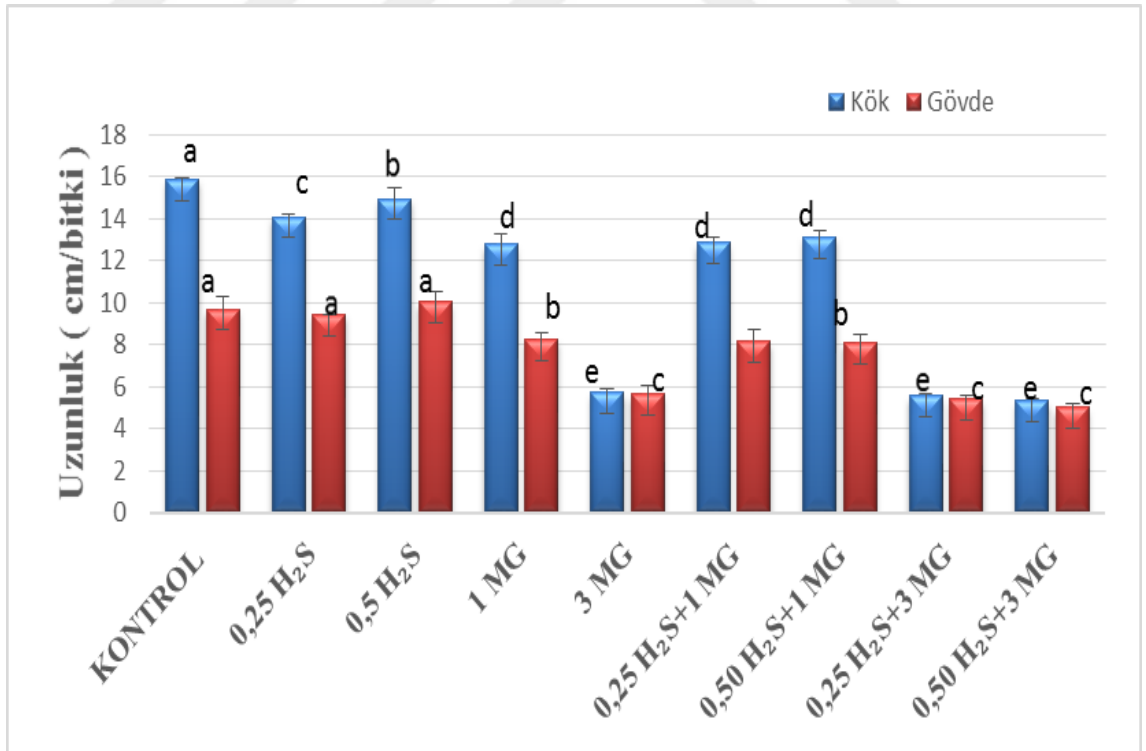
Şekil 4.1. SNP (μM) ön uygulaması yapıldıktan sonra farklı MG (mM) ortamında çimlenen mısır tohumlarının çimlenme yüzdeleri. $\pm$: SE



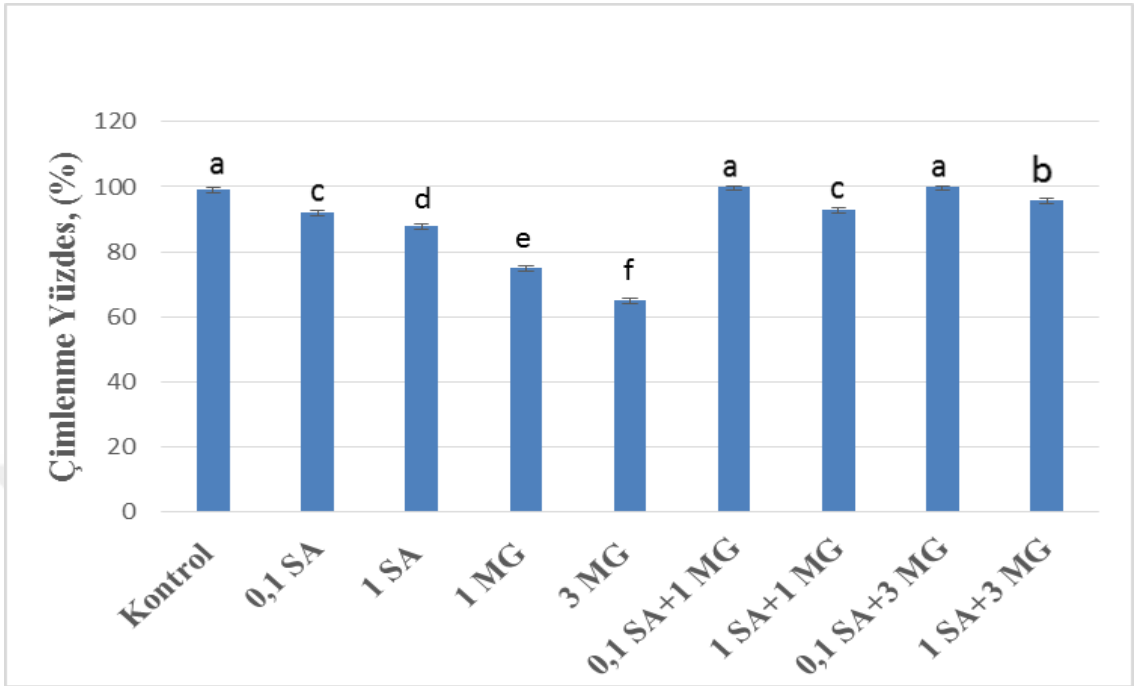
Şekil 4.2. SNP (μM) ön uygulaması yapıldıktan sonra farklı MG (mM) ortamında çimlenen mısır tohumlarının kök-gövde uzunlukları. $\pm$: SE



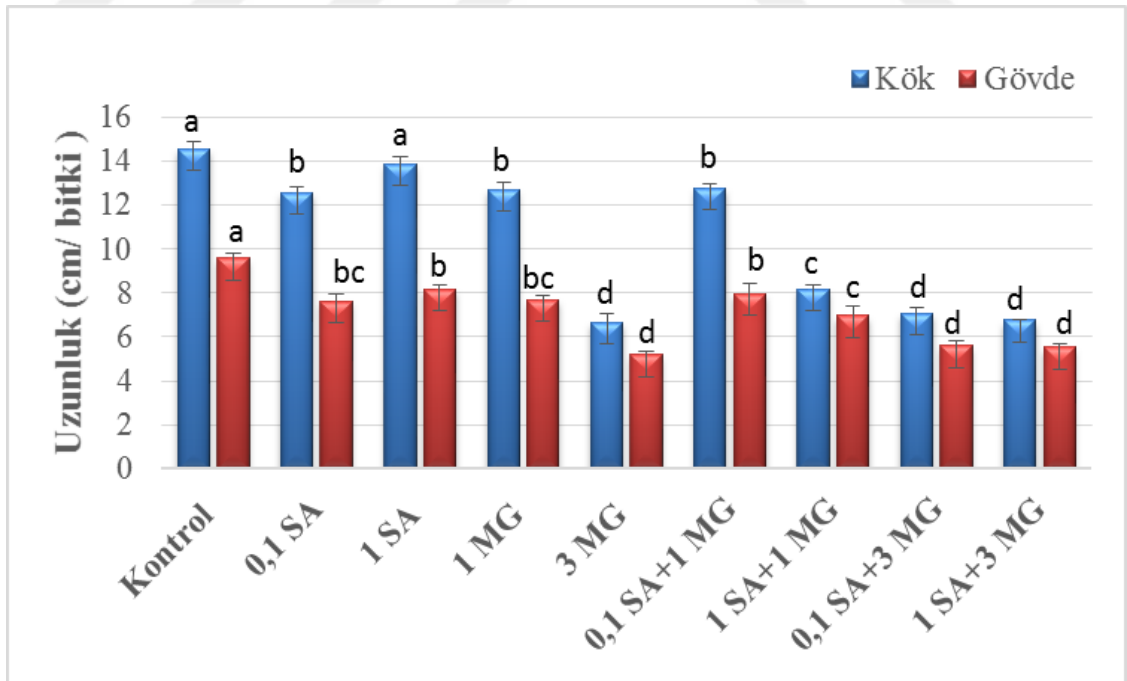
Şekil 4.3. H₂S (mM NaHS olarak) ön uygulaması yapıldıktan sonra farklı MG ortamında çimlenen mısır tohumlarının çimlenme yüzdeleri. ±: SE



Şekil 4.4. H₂S (mM NaHS olarak) ön uygulaması yapıldıktan sonra farklı MG ortamında çimlenen mısır tohumlarının kök-gövde uzunlukları. ±: SE



Şekil 4.5. SA (mM) ön uygulaması yapıldıktan sonra farklı MG ortamında çimlenen mısır tohumlarının çimlenme yüzdesi. $\pm$: SE



Şekil 4.6. SA (mM) ön uygulaması yapıldıktan sonra farklı MG ortamında çimlenen mısır tohumlarının kök-gövde uzunlukları. $\pm$: SE

Çalışmamızın bu aşamasında, mısır tohumları ekimden önce farklı seviyelerde SNP (500 ve 750 μ M), SA (0,1 ve 1 mM) ve H₂S (0,25 ve 0,50 mM) çözeltilerinde 8 saat ön ıslatmaya (şişmeye) maruz bırakılmıştır. Dahasonra bu tohumlar 1 ve 3 mM MG içeren Petrilere ekilmiştir. Çimlenmenin 5. gününde hasat işlemi yapılmış ve taze dokular (kök ve gövde) deneysel parametrelerinin belirleme çalışmaları için kullanılmıştır. Bu uygulamalardan sonra elde edilen dokularda antioksidan (SOD, GR, GPX, CAT ve APX) ve Gly-I ile Gly-II enzimlerin aktivitesi belirlenmiştir. İlave olarak, içsel MG, LPO (MDA olarak), H₂O₂ ve O₂⁻ seviyelerinde çalışılmıştır. Çalışmada uygulama deseni örnek olarak SNP uygulaması alınırsa, aşağıdaki şekilde olmuştur.

Kontrol: SNP ve MG uygulanmamış grup

Tek başına MG uygulaması: 1 veya 3 mM MG uygulanmış grup

Tek başına SNP uygulaması: 500 veya 750 μ M SNP uygulanmış grup

SNP+MG uygulamaları: 500 μ M SNP+1 mM MG; 750 μ M SNP+1 mM MG; 500 μ M SNP+3 mM MG; 750 μ M SNP+3 mM MG

H₂S (0,25 ve 0,50 mM) ve SA (0,1 ve 1 mM) uygulama desenleri de buna benzer olmuştur. Herbir gruba ait veriler, o gruba ait kontrol grubu verileri ile istatistik hata ($P < 0,05$) seviyesinde karşılaştırılmış ve istatistik olarak anlamlı bulgular aşağıda sunulmuştur.

4.3. Gliksalaz Yolu Enzimlerin Aktivitelerine Ait Bulgular

4.3.1. Gliksalaz I aktivitesine ait bulgular

Çalışmalarımızda tek başına MG uygulamasında, çimlenen mısır fidelerinin köklerinde 1 mM MG uygulaması, kontrole göre, Gliksalaz (Gly) I aktivitesini değiştirmezken ($P > 0,05$), 3 mM MG uygulaması aktiviteyi önemli seviyede ($P < 0,05$) artırmıştır (Çizelge 4.1-3). Örneğin 3 mM MG'de aktivite kontrole göre kök ve gövde de sırasıyla %102-%37 artmıştır. Yine fidelerin gövdelerinde ise MG uygulamaları Gly I aktivitesi üzerinde önemli ($P > 0,05$) seviyede etkili olamamıştır (Çizelge 4. 25). Çalışmamızda

mısır tohumlarına MG uygulamasından önce SNP, SA ve H₂S ön muamelelerinin Gly I aktivitesi üzerindeki etkileri aşağıda sunulmuştur.

H₂S ön uygulamasından sonra, MG'nin farklı ortamlarında çimlenen mısırfidelerinin köklerinde tek başına 0,25 mM H₂S uygulaması Gly I aktivitesini düşürürken 0,50 mM H₂S Gly I aktivitesinde artışa ($P<0,05$) neden olmuştur (Çizelge 4.1). H₂S+MG uygulaması yapılan bitkilerin köklerinde ise 0,25 mM H₂S+1 mM MG ve 0,50 mM H₂S+1 mM MG uygulamalarında Gly I aktivitesi artmıştır. İlave olarak 0,25 mM H₂S+3 mM MG uygulamasında Gly I aktivitesinde düşerken 0,50 mM H₂S+3 mM MG'de aktivite artırmıştır ($P<0,05$). Aynı fidelerin gövdelerinden elde edilen bulgulara ise (Çizelge 4.1), tek başına 0,25 ve 0,50 mM H₂S muameleleri, kontrollerine göre, Gly I aktivitesini artırmıştır ($P<0,05$). H₂S+MG uygulaması yapılan fidelerde ise 0,25 mM H₂S+1 MG grubunda önemli bir değişim görülmezken ($P>0,05$) 0,50 mM H₂S+1 MG Gly I aktivitesini artırmıştır ($P<0,05$). Ancak 0,25 ve 0,50 mM H₂S uygulamaları 3 mM MG koşullarında aktivite kontrolüne göre anlamlı düzeyde değişmemiştir ($P>0,05$).

Çizelge 4.1. H₂S (mM NaHS olarak) ön muamelesinden sonra MG (mM) stresine maruz bırakılan bitkilerin kök ve gövdelerinde Gly I aktivitesi bulguları. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir (P>0,05)

Uygulamalar	Kök			Gövde		
	(ΔA240)/50μL	EU/50μL	EU/gdoku	(ΔA240)/50μL	EU/50μL	EU/gdoku
Kontrol	0,0218±0,005	214,08	9,96 e	0,0340±0,006	216,94	14,1 d
0,25 H ₂ S	0,0207±0,002	187,44	8,72 f	0,0347±0,0058	355,45	23,1 a
0,50 H ₂ S	0,0240±0,004	267,91	10,04 d	0,0303±0,0044	250,93	16,3 c
1 MG	0,0194±0,001	149,72	7,18 g	0,0263±0,003	177,2	11,9 e
3 MG	0,0303±0,001	348,26	20,13 b	0,0363±0,003	284,44	19,4 b
0,25 H ₂ S +1MG	0,0267±0,008	222,78	10,65 d	0,0250±0,0036	170,16	11,4 e
0,50 H ₂ S +1MG	0,0177±0,008	178,24	8,82 f	0,0317±0,0006	208,81	13,9 d
0,25 H ₂ S +3MG	0,0233±0,001	307,70	16,43 c	0,0333±0,0044	272,63	18,5 b
0,50 H ₂ S +3MG	0,0370±0,003	394,86	22,82 a	0,0327±0,0036	271,19	18,4 b

Diğer taraftan, 500 ve 750 μM SNP ön uygulamasından sonra 1 ve 3 mM MG ortamlarında çimlenen fidelerin köklerinde Gly Iaktiviteleri incelendiğinde, tek başına 500 ve 750 μM SNP uygulamaları aktiviteyiönemli (P<0,05) derecede artırmıştır (Çizelge 4.2). SNP+MG uygulaması yapılan fide köklerinde ise 500 μM SNP+1 mM MG uygulamasında enzimin aktivitesi düşerken (P<0,05), 750 μM SNP+1 mM MG uygulamasında kontrolüne göre değişmemiştir (P>0,05). Ancak 500μM SNP+3 μM MG ve 750μM SNP+3 μM MG uygulamalarıkontrollerine göre Gly Iaktivitesini önemli derecede (P<0,05)artırmıştır. Aynı fidelerin gövdelerinde (Çizelge 4.2), tek başına 500 μM SNP uygulaması aktiviteyi düşürürken, 750 μM artırmıştır (P<0,05). Diğer taraftan, 500 μM SNP+1 mM MG uygulamasıaktivitede her hangi anlamlı (P>0,05) bir değişikliğe neden olmamış, ancak 750 μM SNP+1 mM MG artırmıştır (P>0,05). İlave olarak, 500 ve 750 μM SNP uygulamaları3 mM MG koşullarında Gly Iaktivitesini önemli (P<0,05) derecede artırmıştır.

Çizelge 4.2. SNP (μM) ön muamelesinden sonra MG (mM) stresine maruz bırakılan fidelerin kök ve gövdelerinde Gly I aktivitesi bulgular. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir ($P>0,05$)

Uygulamalar Kök Gövde						
	(ΔA240)/50 μL	EU /50 μL	EU/g doku	(ΔA240)/50 μL	EU /50 μL	EU/g doku
Kontrol	0,0218 $\pm$ 0,005	214,08	9,96 d	0,0340 $\pm$ 0,006	216,94	14,1 e
500 SNP	0,0217 $\pm$ 0,004	287,94	13,39 c	0,0350 $\pm$ 0,014	135,56	8,78 g
750 SNP	0,0447 $\pm$ 0,015	291,82	13,57 c	0,0307 $\pm$ 0,005	248,83	16,17 d
1 MG	0,0194 $\pm$ 0,001	149,72	7,18 e	0,0263 $\pm$ 0,003	177,2	11,9 f
3 MG	0,0303 $\pm$ 0,001	348,26	20,13 b	0,0363 $\pm$ 0,003	284,44	19,4 c
500SNP+1MG	0,0183 $\pm$ 0,001	120,3	5,76 f	0,0343 $\pm$ 0,003	175,67	11,7 f
750SNP+1MG	0,0190 $\pm$ 0,002	157,22	7,54 e	0,0297 $\pm$ 0,004	290,14	19,32 c
500SNP+3MG	0,0360 $\pm$ 0,006	480,80	27,79 a	0,0337 $\pm$ 0,002	324,46	22,13 b
750SNP+3MG	0,0377 $\pm$ 0,005	493,50	28,52 a	0,0350 $\pm$ 0,003	338,69	23,10 a

Çalışmamızda SA ön uygulamasından sonra farklı MG ortamlarında gelişen fidelerin köklerinde Gly I aktivitesi bulguları Çizelge 4.3’de sunulmuştur. Tek başına SA uygulanmış fide köklerinde 0,1 ve 1 mM SA aktiviteyi artırmıştır. Ancak 0,1 mM SA+1 mM MG uygulama grubunda aktivite artarken, 1 mM SA+1 mM MG uygulama grubunda düşük bulunmuştur ($P<0,05$). Diğer SNP+MG uygulamasında 0,1 mM SA+3 mM MG ve 1 mM SA+3 mM MG aktiviteyi önemli ölçüde ($P<0,05$) artırmıştır. Aynı fidelerin gövdelerinden elde edilen bulgulara göre (Çizelge 4.3), sadece SA muamelesine tabi tutulan bitkilerin gövdelerinde 0,1 ve 1 mM SA uygulamaları artış sağlamıştır ($P>0,05$). SA+MG uygulama grubunda ise 0,1 mM SA+1 mM MG aktivite üzerinde önemli bir etki göstermezken ($P>0,05$), 1 mM SA+1 mM MG aktiviteyi artırmıştır ($P<0,05$). Diğer SNP+MG uygulamasında, 0,1 mM SA+3 mM MG ve 1 mM SA+3 mM MG uygulamaları Gly I aktivitesini artırmıştır ($P>0,05$).

Çizelge 4.3. SA (mM) ön muamelesinden sonra MG (mM) stresine maruz bırakılan fidelerin kök ve gövdelerinde Gly I aktivitesi bulguları. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir ($P>0,05$).

Uygulamalar Kök Gövde						
	(AA240)/50 μ L	EU /50 μ L	EU/g doku	(AA240)/50 μ L	EU /50 μ L	EU/gdoku
Kontrol	0,0218 $\pm$ 0,005	214,08	9,96 d	0,0340 $\pm$ 0,006	216,94	14,1 f
0,1 SA	0,0232 $\pm$ 0,0020	236,66	11,01 c	0,0350 $\pm$ 0,0015	246,19	16,0 e
1 SA	0,0235 $\pm$ 0,0005	243,30	11,31 c	0,0390 $\pm$ 0,0060	268,27	17,43 d
1 MG	0,0194 $\pm$ 0,001	249,72	7,18 f	0,0263 $\pm$ 0,003	177,2	11,9 g
3 MG	0,0303 $\pm$ 0,001	348,26	20,13 b	0,0363 $\pm$ 0,003	284,44	19,4 c
0,1SA+1 MG	0,0287 $\pm$ 0,0046	294,6	8,66 e	0,0259 $\pm$ 0,0021	174,6	11,7 g
1 SA+1 MG	0,0303 $\pm$ 0,0048	142,83	4,19 g	0,0533 $\pm$ 0,0130	301,35	20,23 b
0,1 SA+3 MG	0,0323 $\pm$ 0,0029	398,95	23,05 a	0,0393 $\pm$ 0,0037	315,88	21,54 ab
1 SA+3 MG	0,0343 $\pm$ 0,0038	404,50	23,37 a	0,0403 $\pm$ 0,0032	333,77	22,75 a

4.3.2. Glioksalaz II aktivitesine ait bulgular

Çalışmalarımızda tek başına MG uygulamalarında 1 ve 3 mM MG ortamında çimlenen mısır fidelerinin hem kök hem de gövdelerinde Glioksalaz II (Gly II) aktivitesi kontrole göre önemli ölçüde ($P<0,05$) artırmıştır (Çizelge 4.4-6). Örneğin 3 mM MG'de kök ve gövdede kontrole göre artışlar sırasıyla kökte %174 olurken, gövde de %28 olmuştur. Bu bulgular 1 ve 3 mM MG uygulamasının çimlenen mısır tohumlarının kök ve gövdelerinde Gly II aktivitesini artırdığını göstermektedir. Mısır tohumlarına MG uygulamasından önce SNP, SA ve H₂S ön muamelelerinin Gly II aktivitesi üzerindeki etkileri ise aşağıda sunulmuştur.

H₂S ön uygulamasından sonra MG ortamlarında çimlenen mısır köklerinde Gly II aktivitesi bulguları Çizelge 4.4’de sunulmuştur. Tek başına H₂S uygulanmış tohumların köklerinde 0,25 ve 0,50 mM H₂S’nin iki uygulaması da Gly II aktivitesini artırmıştır (P<0,05). H₂S+MG uygulama grubunda ise 0,25 mM H₂S+1 mM MG ve 0,50 mM H₂S+1 mM MG uygulamalarında Gly II aktivitesi düşmüştür (P<0,05). Ancak 0,25 mM H₂S+3 mM MG, Gly II aktivitesini düşürürken 0,50 mM H₂S+3 mM MG artırmıştır (P<0,05). Aynı fidelerin gövdelerinden elde edilen bulgularda (Çizelge 4.4), tek başına H₂S ön muamelesinde 0,25 mM H₂S aktiviteyi artırırken (P<0,05), 0,50 mM H₂S aktiviteyi kontrole göre değiştirmemiştir (P>0,05). H₂S+MG uygulama grubunda ise 0,25 ve 0,50 mM H₂S uygulamaları 1 mM MG’de aktiviteyi düşürürken, 3 mM MG uygulanmış grupta artmıştır (P<0,05).

Çizelge 4.4. H₂S(mM NaHS olarak) ön muamelesinden sonra MG (mM) stresine maruz bırakılan bitkilerin kök ve gövdelerinde Gly II aktivitesi bulguları. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir (P>0,05)

Uygulamalar Kök Gövde						
	(ΔA240)/50 μL	EU/50 μL	EU/gdoku	(ΔA240)/50μ L	EU/50μ L	EU/gdok u
Kontrol	0,7760± 0,01	1,229	6,72 e	1,0383±,07	1,961	13,34 e
0,25 H ₂ S	0,9017± 0,02	2,016	8,43 d	0,9607±0,18	2,441	16,60 d
0,50 H ₂ S	0,9510± 0,07	2,058	8,60 d	0,7563±0,11	1,958	13,31 e
1 MG	1,2437± 0,14	1,093	5,98 f	1,1307±,07	1,750	11,91 f
3 MG	1,7533± 0,11	3,784	18,44 b	1,5657±,06	2,529	17,20 c
0,25 H ₂ S +1MG	0,8467± 0,06	1,753	5,18 g	0,9680±0,03	1,425	9,69 g
0,50 H ₂ S +1MG	0,7927±0,04	1,981	5,98 g	1,1233±0,12	1,556	10,58 g
0,25 H ₂ S +3MG	1,1137±0 ,01	3,494	15,44 c	1,3703±0,10	2,661	18,11 b
0,50 H ₂ S +3MG	1,9210±0 ,12	4,193	22,66 a	1,7740±0,09	3,073	20,89 a

SNP uygulaması verileri incelendiğinde (Çizelge 4.5), tek başına SNP uygulanmış fidelerin köklerinde 500 μ M SNP Gly II aktivitesini kontrole göre değiştirmezken ($P>0,05$), 750 μ M SNP artırmıştır ($P<0,05$). SNP+MG uygulaması yapılan grupta ise 500 μ M SNP+1 mM MG’de enzim aktivitesinde keskin bir dūřuř belirlenirken ($P<0,05$), 750 μ M SNP+1 mM MG’de önemli ($P>0,05$) bir değişiklik gözlenmemiştir. Ancak, 500 μ M SNP+3 mM MG ve 750 μ M SNP+3 mM MG uygulamalarında Gly II aktivitesi önemli derecede ($P<0,05$) artmıştır. Aynı fidelerin gövdelerinde ise sadece SNP ön uygulamasında 500 ve 750 μ M SNP Gly II aktivitesini artırmıştır ($P<0,05$). SNP+MG uygulaması yapılan grupta ise 500 μ M SNP+1 mM MG aktiviteyi dūřürürken ($P<0,05$), 750 μ M SNP+1 mM MG aktiviteyi değiştirmemiştir ($P>0,05$). Ancak, 500 μ M SNP+3 mM MG ve 750 μ M SNP+3 mM MG, Gly II aktivitesinde önemli derecede ($P<0,05$) artış sağlamıştır.

Çizelge 4.5. SNP(μ M) ön muamelesinden sonra MG stresine maruz bırakılan bitkilerin kök ve gövdelerinde Gly II aktivitesi bulguları. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir ($P>0,05$)

Uygulamalar Kök Gövde						
	(AA240)/50 μ L	EU/50 μ L	EU/gdoku	(AA240)/50 μ L	EU/50 μ L	EU/gdoku
Kontrol	0,7760 $\pm$ 0,015	1,229	6,72 e	1,0383 $\pm$ 0,071	1,961	13,34 e
500 SNP	0,8323 $\pm$ 0,039	1,331	7,26 de	1,2220 $\pm$ 0,032	2,475	16,83 c
750 SNP	1,3483 $\pm$ 0,232	2,276	12,44 c	1,1703 $\pm$ 0,015	2,300	15,64 d
1 MG	1,2437 $\pm$ 0,14	1,093	5,98 f	1,1307 $\pm$ 0,0700	1,750	11,91 f
3 MG	1,7533 $\pm$ 0,11	3,784	18,44 b	1,5657 $\pm$ 0,067	2,529	17,20 b
500SNP+1MG	0,9023 $\pm$ 0,065	0,517	2,82 g	1,2407 $\pm$ 0,174	1,398	9,50 g
750SNP+1MG	0,8740 $\pm$ 0,084	0,938	5,14 f	,8560 $\pm$ 0,037	1,630	11,10 f
500SNP+3MG	1,5230 $\pm$ 0,069	4,284	20,87 a	1,6640 $\pm$ 0,038	2,995	20,36 a
750SNP+3MG	1,6063 $\pm$ 0,069	4,373	21,31 a	1,7830 $\pm$ 0,030	3,085	20,98 a

SA uygulamalarından elde edilen verilere göre (Çizelge 4.6), tek başına SA uygulanmış fidelerin köklerinde 0,1 ve 1 mM SA Gly II aktivitesinde bir artış sağlamıştır ($P<0,05$). SA+MG uygulama grubunda ise 0,1 mM SA+1 mM MG Gly II aktivitesini düşürürken, 1 mM SA+1 mM MG artırmıştır ($P<0,05$). Diğer uygulamada, 0,1 mM SA+3 mM MG ve 1 mM SA+3 mM MG uygulamaları Gly II aktivitesini önemli ölçüde ($P<0,05$) artırmıştır. Aynı fidelerinin gövdelerinden elde edilen bulgulara göre (Çizelge 4.6), tek başına SA grubunda 0,1 ve 1 mM SA'nın iki uygulaması da Gly II aktivitesini düşürmüştür ($P<0,05$). SA+MG uygulaması yapılan grupta ise 0,1 mM SA+1 mM MG Gly II aktivitesini düşürürken, 1 mM SA+1 mM MG artırmıştır ($P<0,05$). Diğer SA+MG uygulamasında, 0,1 ve 1 mM SA'lar 3 MG koşullarında Gly II aktivitesinde önemli artışa ($P<0,05$) neden olmuştur.

Çizelge 4.6. SA(mM) ön muamelesinden sonra MG (mM) stresine maruz bırakılan bitkilerin kök ve gövdelerinde Gly II aktivitesi bulguları. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir ($P>0,05$)

Uygulamalar Kök Gövde

	(AA240)/50 μ L	EU/50 μ L	EU/gdoku	(AA240)/50 μ L	EU /50 μ L	EU/g doku
Kontrol	0,7760 $\pm$ 0,015	1,229	6,72 f	1,0383 $\pm$ 0,071	1,961	13,34 d
0,1 SA	0,8590 $\pm$ 0,039	1,899	10,37 d	0,7917 $\pm$ 0,044	1,716	11,67 ef
1 SA	0,9647 $\pm$ 0,048	2,218	12,12 c	0,7503 $\pm$ 0,066	1,565	10,64 f
1 MG	1,2437 $\pm$ 0,14	1,093	5,98 g	1,1307 $\pm$ 0,07	1,750	11,91 e
3 MG	1,7533 $\pm$ 0,11	3,784	18,44 b	1,5657 $\pm$ 0,067	2,529	17,20 b
0,1 SA+1 MG	1,4743 $\pm$ 0,123	0,762	4,17 h	1,1903 $\pm$ 0,184	1,442	9,82 g
1 SA+1 MG	1,2277 $\pm$ 0,076	2,866	7,88 e	1,5833 $\pm$ 0,126	2,317	15,76 c
0,1 SA+3 MG	1,9280 $\pm$ 0,090	4,330	21,10 a	1,7587 $\pm$ 0,065	2,991	20,34 a
1 SA+3 MG	1,8017 $\pm$ 0,196	4,289	20,90 a	1,6210 $\pm$ 0,074	2,960	20,13 a

4.4. İçsel Metilglioksal (MG) Bulguları

Çalışmalarımızda kontrol bitkilerinde içsek MG miktarı, kök ve gövde kendi arasında kıyaslanırsa, gövdede köke göre daha yüksek olmuştur (4,7-9). Örneğin kontrol bitkilerinin köklerinde içsel MG miktarı 1,08 $\mu\text{M}/\text{gr}$ olurken, gövdede 6,46 $\mu\text{M}/\text{gr}$ belirlenmiştir. Ancak tek başına eksojen MG uygulamaları (1 ve 3 mM), çimlenen mısır fidelerinin hem kök hem de gövdelerinde içsel MG miktarını kontrole göre önemli ölçüde ($P<0,05$) artırmıştır (Çizelge 4.7-9). Örneğin, 3 mM MG'de kök ve gövdede kontrole göre içsel MG miktarları sırasıyla kökte %481 gövdede %106 artmıştır. Bu bulgular, eksojen MG uygulamasının çimlenen mısır tohumlarının kök ve gövdelerinde içsel MG birikimini artırdığını göstermektedir. Çalışmamızda mısır tohumlarına MG (1 ve 3 mM) uygulamasından önce SNP, SA ve H_2S ön muamelelerinin içsel MG miktarı üzerindeki etkileri aşağıda sunulmuştur.

SA ön uygulamasından sonra 1 ve 3 mM MG ortamlarında çimlenen fidelerin köklerinde içsel MG bulguları Çizelge 4.7'de sunulmuştur. Tek başına SA uygulanmış bitkilerin köklerinde 0,1 ve 1 mM SA içsel MG içeriğinde kontrole kıyasla bir artış sağlamıştır ($P<0,05$). SA+MG uygulama grubunda ise 0,1 ve 1 mM SA uygulamaları hem 1 mM MG hem de 3 mM MG koşullarında içsel MG içeriğini artırmıştır ($P<0,05$). Sadece 1 mM SA+3 mM MG uygulamasında içsel MG içeriği önemli ($P<0,05$) derecede azalmıştır. Aynı fidelerin gövdelerinde ise tek başına SA uygulamaları içsel MG içeriğini kontrole göre anlamlı ($P>0,05$) seviyede etkilememiştir. SA+MG uygulama grubunda 0,1 mM SA+3 mM MG'de içsel MG miktarı düşerken, 1 mM SA+3 mM MG uygulamasında artmış ($P<0,05$), diğer uygulamalarda ise değişmemiştir (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7. SA (mM) ön muamelesine tabi tutulup daha sonra MG (mM) stresine maruz bırakılan bitkilerin kök ve gövdelerinde içsel MG miktarı bulguları. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir ($P>0,05$). TA: Taze ağırlık

Uygulamalar	Kök		Gövde	
	($\Delta A336$)/100 μ L	(μ M/g FW)	($\Delta A336$)/100 μ L	(μ M/ gFW)
Kontrol	0,664 $\pm$ 0,004	1,08 f	1,870 $\pm$ 0,012	6,46 e
0,1 SA	0,8967 $\pm$ 0,013	1,45 e	1,9289 $\pm$ 0,024	7,22 bc
1 SA	0,9100 $\pm$ 0,010	3,14 d	1,9042 $\pm$ 0,019	7,06 d
1 MG	0,6667 $\pm$ 0,008	1,22 ef	1,5463 $\pm$ 0,011	7,31 b
3 MG	2,0733 $\pm$ 0,031	5,28 c	2,1287 $\pm$ 0,032	13,37 a
0,1 SA + 1 MG	1,3833 $\pm$ 0,016	4,77 cd	1,5292 $\pm$ 0,027	7,23 b
1 SA + 1 MG	1,8467 $\pm$ 0,032	8,73 a	1,5571 $\pm$ 0,013	7,14 c
0,1 SA + 3 MG	2,0867 $\pm$ 0,043	7,37 b	1,5375 $\pm$ 0,020	7,26 b
1 SA + 3 MG	1,4367 $\pm$ 0,008	3,96 d	2,2961 $\pm$ 0,037	13,44 a

H₂S ön uygulamasından sonra MG ortamlarında çimlenen fidelerin köklerinde içsel MG içeriği Çizelge 4.8’de sunulmuştur. Tek başına H₂S uygulanmış fidelerin köklerinde 0,25 ve 0,50 μ M H₂S uygulamaları kontrole göre MG içeriğini değiştirmemiştir ($P<0,05$). Diğer taraftan 0,25mM H₂S+1 mM MG ve 0,50 mM H₂S+1 mM MG uygulamaları kontrollerine göre içsel MG seviyesini azaltmıştır ($P<0,05$). Ancak 0,25 mM H₂S+3 mM MG uygulaması içsel MG’yi artırırken, 0,50 mM H₂S+3 mM MG uygulaması önemli oranda ($P<0,05$) düşürmüştür. Aynı fidelerin gövdelerinden elde edilen bulgular Çizelge 4.8’de sunulmuştur. Sadece H₂S ön muamelesine tabi tutulan bitkilerin gövdelerinde 0,25 ve 0,50 μ M H₂S içsel MG aktivitesini kontrole kıyasla düşürmüştür ($P<0,05$). H₂S+MG uygulamaları yapılmış fidelerdeki bulgular incelendiğinde, 0,25mM H₂S+1 mM MG ve 0,50 mM H₂S+1 mM MG, içsel MG içeriğini kontrollerine göre düşürmüştür ($P<0,05$). Diğer H₂S+MG uygulamasında,

0,25mM H₂S+3 mM MG ve 0,50 mM H₂S+3 mM MG, içsel MG içeriğini azaltmıştır (P<0.05).

Çizelge 4.8. H₂S (mM NaHS olarak) ön muamelesine tabi tutulup daha sonra MG (mM) stresine maruz bırakılan bitkilerin kök ve gövdelerinde içsel MG bulguları. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir (P>0,05)

Uygulamalar	Kök		Gövde	
	(ΔA336)/100μL	(μM/gFW)	(ΔA336)/100μL	(μM/gFW)
Kontrol	0,664±0,004	1,08 d	1,870±0,012	6,46 d
0,25 H ₂ S	0,6044±0,004	0,98 d	0,939±0,016	3,24 f
0,50 H ₂ S	0,5800±0,007	0,94 d	1,319±0,012	4,55 e
1 MG	0,6594±0,009	1,24 d	1,362±0,034	7,70 c
3 MG	1,4169±0,026	4,89 b	2,020±0,029	12,65 a
0,25 H ₂ S + 1 MG	,6443±0,006	1,04 d	1,210±0,016	4,18 e
0,50 H ₂ S + 1 MG	,6300±0,040	1,02 d	1,283±0,012	4,43 e
0,25 H ₂ S + 3 MG	1,6039±0,050	7,58 a	1,889±0,028	8,93 b
0,50 H ₂ S + 3 MG	1,1871±0,044	4,10 c	1,7276±0,031	8,16 b

500 ve 750 μM SNP ön uygulamasından sonra 1 ve 3 mM MG ortamlarında çimlenen mısırfide köklerinde içsel MG miktarına ait bulgular Çizelge 4.9’da sunulmuştur. Tek başına SNP uygulanmış fide köklerinde 500 ve 750 μM SNP içsel MG miktarını önemli derecede artırmıştır (P<0,05). SNP ön uygulamasından sonra MG stresine maruz bırakılan fide köklerinde ise 500 μM SNP+1 mM MG uygulaması ve 750 μM SNP+1 mM MG uygulamasında içsel MG azalmıştır (P>0,05). Benzer sonuç, 500 μM SNP+3 mM MG ve 750 μM SNP+3 mM MG uygulamalarında da görülmüştür (P<0,05). Tek başına SNP ön uygulamasına tabi tutulan fide gövdelerinde kontrole kıyasla 500 ve 750 μM SNP MG içeriğini artırmıştır (P>0,05). SNP+MG uygulama gruplarında, 500 μM

SNP+1 mM ve 750 µM SNP+1 mM MG içsel MG miktarını düşürmüştür ($P<0,05$). Benzer sonuç, 500 µM SNP+3 mM MG ve 750 µM SNP+3 mM MG uygulamalarında da görülmüştür ($P<0,05$).

Çizelge 4.9. SNP (µM) ön muamelesine tabi tutulup daha sonra MG (mM) stresine maruz bırakılan bitkilerin kök ve gövdelerinde MG içeriği bulguları. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir ($P>0,05$)

Uygulamalar	Kök		Gövde	
	(ΔA336)/100µL	(µM/gFW)	(ΔA336)/100µL	(µM/gFW)
Kontrol	0,664±0,004	1,08 e	1,870±0,012	6,46 c
500 SNP	0,7262±0,012	1,18 c	1,5131±0,017	7,15 e
750 SNP	0,7903±0,016	1,28 d	1,6862±0,029	7,97 d
1 MG	0,7475±0,009	1,21 d	1,6469±0,027	7,78 d
3 MG	1,4480±0,018	5,00 a	2,8055±0,040	13,18 a
500 SNP+ 1 MG	0,5490±0,015	,89 f	1,5409±0,016	7,28 e
750 SNP+ 1 MG	0,5905±0,014	,96 ef	1,1904±0,009	6,86 f
500 SNP+ 3 MG	1,2412±0,017	4,28 b	2,4656±0,055	12,22 b
750 SNP+ 3 MG	1,0433±0,008	3,60 c	1,8824±0,027	10,86 c

4.5. Antioksidan Enzim Aktivitelerine Ait Bulgular

4.5.1.SOD aktivitesine ait bulgular

Çalışmalarımızda tek başına MG uygulamalarının her ikisi çimlenen mısır fidelerinin hem kök hem de gövdelerinde SOD aktivitesini kontrole göre önemli ölçüde ($P<0,05$) artırmıştır (Çizelge 4.10-12). Sadece 1 mM MG uygulaması kökte SOD aktivitesini düşürmüştür. SOD aktivitesindeki artışlar özellikle 3 mM MG uygulamasında daha

yüksek olmuştur. Örneğin 3 mM MG'de kök ve gövdede kontrole göre artışlar sırasıyla kökte %70 olurken, gövde de %83 olmuştur. Bu bulgular 1 ve 3 mM MG'nin çimlenen mısır tohumlarının kök ve gövdelerinde SOD aktivitesini artırdığını göstermektedir. Çalışmamızda mısır tohumlarına MG uygulamasından önce SNP, SA ve H₂S ön muamelelerinin SOD aktivitesi üzerindeki etkileri aşağıda sunulmuştur.

SA ön uygulamasından sonra, MG'nin iki ortamında çimlenen mısır bitkilerin köklerine ait SOD aktivitesi bulguları Çizelge 4.10'da sunulmuştur. Tek başına SA uygulamalarının her ikisinde kontrole göre etki gösterememiştir. SA+MG uygulaması yapılmış bitkilerden elde edilen bulgular incelendiğinde 0,1 SA+1 MG'de hafif bir artış belirlenirken, 1 mM SA+ 1 mM MG'de SOD aktivitesinde önemli bir artış görülmüştür ($P<0,05$). Bunun yanı sıra 0,1 mM SA + 3 mM MG ve 1 mM SA + 3 mM MG uygulamalarında SOD aktivitesinde bir düşüş belirlenmiştir ($P<0,05$). Aynı bitkilerin gövdelerinde SOD aktivitesine ait bulgular Çizelge 4.1'de sunulmuştur. Tek başına SA uygulanmış bitki gövdelerin de 0,1 ve 1 mM SA'nın her iki uygulamasında da SOD aktivitesinde azalış görülmüştür. SA+MG uygulaması yapılmış bitkilerin gövdelerinden elde edilen bulgular incelendiğinde 0,1 mM SA+ 1 mM MG ve 1 mM SA+ 1 mM MG uygulamasının SOD aktivitesi üzerinde önemli bir etki gösterdiği bulunmuştur ($P<0,05$). Ancak, 3 mM MG stresine maruz bırakılmış bitkilerin gövdelerinde 0,1 ve 1 SA'nın her iki uygulaması SOD aktivitesi üzerinde etkili olamamıştır ($P>0,05$).

Çizelge 4.10. SA (mM) ön uygulamasından sonra MG (mM) stresine maruz bırakılan bitkilerin kök ve gövdelerindeki SODaktivitesi bulguları. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir ($P>0,05$).

Uygulamalar	Kök			Gövde		
	(AA340)/100 μ L	EU/100 μ L	EU/gdoku	(AA340)/100 μ L	EU/100 μ L	EU/gdoku
Kontrol	0,6745 $\pm$ 0,09	0,119	11,94 d	0,4845 $\pm$ 0,01	0,114	11,41 d
0,1 SA	0,6085 $\pm$ 0,01	0,099	9,97 e	0,5020 $\pm$ 0,07	0,101	10,17 e
1 SA	0,6075 $\pm$ 0,04	0,095	9,59 e	0,5395 $\pm$ 0,05	0,105	10,57 e
1 MG	0,5990 $\pm$ 0,04	0,080	6,08 g	0,5920 $\pm$ 0,07	0,107	13,75 c
3 MG	0,3745 $\pm$ 0,02	0,203	20,36 a	0,3820 $\pm$ 0,07	0,180	20,93 a
0,1SA+1MG	0,4685 $\pm$ 0,01	0,086	8,66 f	0,6540 $\pm$ 0,03	0,151	15,10 b
1SA+1 MG	0,3550 $\pm$ 0,04	0,189	18,9 b	0,7095 $\pm$ 0,01	0,157	15,75 b
0,1SA+3MG	0,3535 $\pm$ 0,01	0,144	14,46 c	0,3405 $\pm$ 0,01	0,127	12,77 d
1SA+3 MG	0,3425 $\pm$ 0,01	0,129	12,94 cd	0,3555 $\pm$ 0,04	0,123	12,34 d

H₂S ön uygulamasından sonra MG stresine maruz bırakılmış bitki köklerinde SOD aktivitesi bulguları Çizelge 4.11’de sunulmuştur. Tek başına H₂S uygulanmış bitki köklerinde 0,25 mM H₂S ve 0,50 mM H₂S SOD aktivitesinde etkili olup önemli bir artış sağlamıştır ($P<0,05$). H₂S+MG uygulamasına ait bitki köklerinde önemli bulgular görülmüştür ($P<0,05$). Örneğin 0,25 mM H₂S + 1 mM MG ve 0,50 mM H₂S + 1 mM MG uygulamaları SOD aktivitesini artırmıştır ($P<0,05$). H₂S+MG (3 mM) uygulamasına ait bitki köklerinde H₂S’nin her iki konsantrasyonunda da (0,25 ve 0,50 mM) SOD aktivitesinde azalış tespit edilmiştir ($P<0,05$).

H₂S ön uygulamasından sonra MG stresine maruz bırakılmış bitki gövdelerinde SOD aktivitesi bulguları Çizelge 4.11’de sunulmuştur. Tek başına H₂S ön uygulamasına tabi tutulan bitki gövdelerinde SOD aktivitesi 0,25 ve 0,50 mM H₂S’de azalmıştır ($P<0,05$).

H₂S + MG uygulamasına ait bulgular incelendiğinde 0,25 mM H₂S + 1 mM MG hafif artış sağlarken, 0,50 mM H₂S + 1 mM MG aktivitede önemli bir artış göstermiştir (P>0,05). Ancak, 0,25 mM H₂S + 3 mM MG ve 0,50 mM H₂S + 3 mM MG uygulamaları aktiviteyi azaltmıştır (P>0,05).

Çizelge 4.11. H₂S (mM NaHS olarak) ön uygulamasından sonra MG (mM) stresine maruz bırakılan bitkilerin kök ve gövdelerine ait SOD aktivitesi bulguları. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir (P>0,05)

Uygulamalar Kök Gövde

	(AA340)/100µL	EU/100µL	EU/gdoKu	(AA340)/100µL	EU/100µL	EU/gdoku
Kontrol	0,6380±0,018	0,060	10,08 d	0,4480±0,024	0,119	10,93 e
0,25 H ₂ S	0,6685±0,008	0,098	12,86 c	0,7615±0,017	0,086	8,68
0,50 H ₂ S	0,6595±0,032	0,080	12,04 cd	0,8350±0,024	0,107	10,77 e
1 MG	0,6445±0,007	0,075	6,5 f	0,6350±0,014	0,110	12,97 d
3 MG	0,2900±0,006	0,192	19,28 a	0,3760±0,008	0,179	20,92 a
0,25 H ₂ S +1MG	0,7120±0,006	0,106	10,65 d	0,6800±0,009	0,117	11,7 de
0,50 H ₂ S +1MG	0,6845±0,035	0,088	8,82 e	0,6940±0,050	0,135	15,51 c
0,25 H ₂ S +3MG	0,2495±0,012	0,164	16,43 b	0,3698±0,004	0,152	17,01 b
0,50 H ₂ S +3MG	0,2885±0,005	0,122	12,28 c	0,3200±0,026	0,122	12,28 d

SNP ön uygulamasından sonra MG ortamlarındaki bitkilerin köklerine ait SOD aktivitesi bulguları Çizelge 4.12’de sunulmuştur. Tek başına SNP uygulanmış fide köklerinde 500 ve 750 µM SNP’nin her iki uygulaması SOD aktivitesini artırmıştır (P<0,05). SNP+MG uygulamasına ait köklerde ise 500 µM SNP + 1 mM MG ve 750 µM SNP + 1 mM MG uygulamaları, SOD aktivitesini artırmıştır. Ancak, 500 µM SNP + 3 mM MG ve 750 µM SNP + 3 mM MG uygulamaları aktivite üzerinde anlamlı (P>0,05) bir etki yapmamıştır.

Aynı tohumların gövdelerine ait bulgular Çizelge 4.12’desunulmuştur. Sadece SNP ön muamelesine tabi tutulan bitkilerin gövdelerinde 500 ve 750 μM SNP SOD aktivitesini artırmıştır ($P<0,05$). SNP + MG uygulamaları incelendiğinde, 500 μM SNP+1 mM MG ve 750 μM SNP+1 mM MG’nin SOD aktivitesini artırdığı tespit edilmiştir ($P<0,05$). Ancak, 500 μM SNP+3 mM MG ve 750 μM SNP+3 mM MG uygulamalarında aktivite düşüşü tespit edilmiştir ($P<0,05$).

Çizelge 4.12. SNP(μM) ön uygulamasından sonra MG (mM) stresine maruz bırakılan bitkilerin kök ve gövdelerinde SOD aktivitesi bulguları. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir ($P>0,05$)

Uygulamalar	Kök			Gövde		
	(ΔA340)/100 μL	EU/100 μL	EU/gdoku	(ΔA340)/100 μL	EU/100 μL	EU/g doku
Kontrol	0,6080 $\pm$ 0,034	0,087	9,78 d	0,4685 $\pm$ 0,021	0,116	11,68 f
500 SNP	0,6420 $\pm$ 0,045	0,102	11,26 c	0,5485 $\pm$ 0,030	0,137	13,78 cd
750 SNP	0,6595 $\pm$ 0,001	0,133	13,38 b	0,5900 $\pm$ 0,003	0,130	13,06 d
1 MG	0,5430 $\pm$ 0,063	0,069	6,96 f	0,6110 $\pm$ 0,002	0,124	12,46 e
3 MG	0,3785 $\pm$ 0,004	0,197	19,70 a	0,3260 $\pm$ 0,018	0,187	23,16 a
500 SNP+1 MG	0,5790 $\pm$ 0,049	0,111	11,11 c	0,7925 $\pm$ 0,029	0,195	19,56 b
750 SNP+1 MG	0,5560 $\pm$ 0,081	0,075	7,54 e	0,8525 $\pm$ 0,001	0,191	19,1 b
500 SNP+3 MG	0,3695 $\pm$ 0,017	0,067	6,70 f	0,2705 $\pm$ 0,004	0,147	14,70 c
750 SNP +3MG	0,3145 $\pm$ 0,006	0,105	10,58 cd	0,1845 $\pm$ 0,004	0,149	14,92 c

4.5.2. CAT aktivitesine ait bulgular

Tek başına MG uygulamalarının her ikisi (1 ve 3 mM) çimlenen mısır fidelerinin hem kök hem de gövdelerinde CAT aktivitesini kontrole göre önemli ölçüde ($P<0,05$)

artırmıştır (Çizelge 4.13-15). Sadece kökte 1 mM MG' de CAT aktivitesi kontrole göre azalmıştır. CAT aktivitesi artışları özellikle 3 mM MG uygulamasında 1 mM MG'ye göre daha yüksek olmuştur. Örneğin 3 mM MG'de kök ve gövdede kontrole göre artışlar sırasıyla kökte %128 olurken, gövde de %57 olmuştur. Bu bulgular 1 ve 3 mM MG'nin çimlenen mısır tohumlarının kök ve gövdelerinde CAT aktivitesini artırdığını göstermektedir. Çalışmamızda mısır tohumlarına MG uygulamasından önce SNP, SA ve H₂S ön muamelelerinin CAT aktivitesi üzerindeki etkileri aşağıda sunulmuştur.

Tohumlarına SA (0,1 ve 1 mM) ön uygulaması yapılmış ve sonra MG'nin iki farklı (1 ve 3 mM) ortamında çimlenen mısır fidelerinin köklerine ait CAT aktivitesi bulguları Çizelge 4.13'de sunulmuştur. Tek başına SA uygulamalarının her ikisi köklerde CAT aktivitesini önemli ölçüde artırmıştır ($P<0,05$). Kontrole kıyaslandığında, 0,1 ve 1 mM SA, CAT aktivitesinde sırasıyla %12 ve %7 oranında önemli artış sağlamıştır. SA ön uygulamasından sonra MG toksitesine maruz (SA+MG uygulaması) fidelerden elde edilen bulgular incelendiğinde, 0,1 ve 1 mM SA uygulamalarının her ikisi 1 ve 3 mM MG ortamında çimlenen bitki köklerinde CAT aktivitesini artırmıştır ($P<0,05$). Aynı bitkilerin gövdelerine ait CAT aktivitesi bulguları Çizelge 4.13'de sunulmuştur. Tek başına SA uygulanmış bitki gövdelerinde 0,1 ve 1 mM SA'nın her iki uygulaması CAT aktivitesinde önemli ($P<0,05$) bir artış sağlamıştır. Kontrole kıyaslandığında SA'nın her iki uygulaması sırasıyla %11 ve %16 oranında CAT aktivitesini artırmıştır. SA+MG uygulamasında, 0,1 mM SA+1 mM MG ve 1 mM SA+1 mM MG uygulamalarında CAT aktivitesi önemli seviyede ($P<0,05$) arttığı tespit edilmiştir. 3 mM MG+0,1 ve 1 mM SA'nın her iki uygulamasında da CAT aktivitesini arttığı tespit edilmiştir ($P<0,05$).

Çizelge 4.13. SA(mM) ön muamelesinden sonra MG'ye(mM)maruz bırakılan bitkilerin kök ve gövdelerindeki CAT aktivitesi. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir ($P>0,05$)

Uygulamalar	Kök			Gövde		
	(AA240)/25 μ L	EU/25 μ L	EU/gdoku	(AA240)/25 μ L	EU/25 μ L	EU/g doku
Kontrol	0,0041 $\pm$ 0,0001	0,083	35,64 f	0,0145 $\pm$ 0,0015	0,299	45,65 h
0,1 SA	0,0045 $\pm$ 0,0005	0,090	39,89 e	0,0170 $\pm$ 0,0001	0,350	50,69 g
1 SA	0,0065 $\pm$ 0,0005	0,134	38,37 e	0,0205 $\pm$ 0,0005	0,425	53,29 f
1 MG	0,003 $\pm$ 0,001	0,062	28,32 g	0,0135 $\pm$ 0,0005	0,215	51,01 fg
3 MG	0,0205 $\pm$ 0,0020	0,184	81,46 c	0,0200 $\pm$ 0,0001	0,412	71,73 c
0,1SA+1 MG	0,0115 $\pm$ 0,0005	0,237	34,64 f	0,0165 $\pm$ 0,0005	0,300	60,42 e
1 SA + 1 MG	0,0195 $\pm$ 0,0025	0,403	75,60 d	0,0197 $\pm$ 0,0010	0,393	63,01 d
0,1SA + 3MG	0,0285 $\pm$ 0,0005	0,382	97,86 a	0,0220 $\pm$ 0,0010	0,456	81,09 b
1 SA + 3 MG	0,0275 $\pm$ 0,0035	0,363	91,76 b	0,0285 $\pm$ 0,0015	0,593	89,38 a

Tohumlarına SNP ön uygulamasından sonra MG stresine maruz bırakılan bitkilerin köklerinde CAT aktivitesi sonuçları Çizelge 4.14'te sunulmuştur. Tek başına SNP uygulanmış bitki köklerinde 500 ve 750 μ M SNP uygulamaları CAT aktivitesinde kontrole kıyasla artış ($P<0,05$) göstermiştir. SNP+MG uygulaması yapılmış bitkilerden elde edilen bulgulara göre, 1 mM MG + 500 μ M SNP ve 750 μ M SNP uygulamaları CAT aktivitesinde önemli artış ($P<0,05$) sağlamıştır. Ancak 500 μ M SNP+3 mM MG ve 750 μ M SNP+3 mM MG uygulaması CAT aktivitesini düşürmüştür ($P>0,05$). Aynı fidelerin gövdelerinden elde edilen bulgular Çizelge 4.14'te sunulmuştur. Sadece SNP ön muamelesine tabi tutulan bitkilerde 500 μ M SNP'de önemli ($P>0,05$) bir değişiklik görülmezken, 750 μ M SNP'nin CAT aktivitesini düşürdüğü tespit edilmiştir ($P<0,05$). Diğer taraftan 500 μ M SNP + 1 mM MG uygulamasında CAT aktivitesinde düşüş görülürken, 750 μ M SNP+1 mM MG'nin aktiviteyi artırdığı tespit edilmiştir ($P<0,05$). 3

mM MG stresine maruz kalan bitki gövdelerinde 500 μ M SNP, CAT aktivitesinde önemli bir azalış gösterirken, 750 μ M SNP uygulamasında önemli ($P>0,05$) bir değişiklik belirlenememiştir.

Çizelge 4.14. SNP(μ M) ön muamelesinden sonra MG(mM)'ye maruz bırakılan bitkilerin kök ve gövdelerindeki CATaktivitesi. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir ($P>0,05$)

Uygulamalar	Kök			Gövde		
	(AA240)/25 μ L	EU/25 μ L	EU/gdoku	(AA240)/25 μ L	EU/25 μ L	EU/gdoku
Kontrol	0,0041 $\pm$ 0,0001	0,083	35,64 d	0,0155 $\pm$ 0,0005	0,321	47,74 d
500 SNP	0,0130 $\pm$ 0,0020	0,268	41,04 c	0,0155 $\pm$ 0,0015	0,318	47,14 d
750 SNP	0,0075 $\pm$ 0,0015	0,156	53,54 b	0,0130 $\pm$ 0,0010	0,268	42,26 e
1 MG	0,0030 $\pm$ 0,0010	0,059	27,86 e	0,0170 $\pm$ 0,0010	0,331	49,86 c
3 MG	0,0260 $\pm$ 0,0020	0,540	78,82 a	0,0225 $\pm$ 0,0015	0,468	72,66 a
500SNP+1MG	0,0035 $\pm$ 0,0005	0,070	44,45 c	0,0130 $\pm$ 0,0001	0,268	38,26 f
750SNP+1MG	0,0041 $\pm$ 0,0001	0,082	30,16 d	0,0270 $\pm$ 0,0010	0,476	56,40 b
500SNP+3MG	0,0035 $\pm$ 0,0005	0,0718	26,82 e	0,0160 $\pm$ 0,0001	0,331	58,82 b
750SNP+3MG	0,0056 $\pm$ 0,0044	0,206	42,34 c	0,0220 $\pm$ 0,0010	0,456	69,70 a

H₂S ön uygulamasından sonra 1 ve 3 mM MG stresine maruz bırakılmış bitki köklerinde CAT aktivitesi sonuçları Çizelge 4.15'de sunulmuştur. Tek başına H₂S uygulanmış bitki köklerinde 0,25 ve 0,50 mM H₂S uygulaması CAT aktivitesini sitümüle etmiştir. Bu etkide 0,25 H₂S uygulaması daha başarılı olduğu görülmektedir. H₂S ön uygulamasına tabi tutulup daha sonra MG stresine maruz bırakılan (H₂S+MG) bitki köklerinde önemli değişiklikler belirlenmiştir. Örneğin 1 mM MG stresine maruz bırakılan bitki köklerinde 0,25 mM H₂S CAT aktivitesini önemli ($P<0,05$) ölçüde artırırken 0,50 mM H₂S aktiviteyi hafif ($P>0,05$) artırmıştır. Yine 3 mM MG stresine

maruz kalan bitki köklerinde H₂S'nin her iki konsantrasyonunda da CAT aktivitesi kontrolüne göre düşük bulunmuştur. H₂S ön uygulamasından sonra MG stresine maruz kalan bitki gövdelerinde CAT aktivitesi bulguları Çizelge 4.15'de sunulmuştur. Sadece H₂S uygulamasına tabi tutulan bitki gövdelerinde, 0,25 mM H₂S CAT aktivitesini düşürürken 0,50 mM H₂S aktiviteyi artırmıştır (P<0,05). H₂S ön uygulamasına tabi tutulup daha sonra MG stresine maruz kalan bitki gövdelerinde önemli verilere ulaşılmıştır. Örneğin 1 mM MG stresine maruz kalmış bitki gövdelerinde 0,25 ve 0,50 mM H₂S'nin her iki konsantrasyonu CAT aktivitesini artırmıştır (P<0,05). Ayrıca 3 mM MG stresine maruz bırakılan bitki gövdelerinde de H₂S'nin iki konsantrasyonu CAT aktivitesini artırmıştır (P<0,05). Hem 1 MG hem 3 MG stresine karşı gövdede en iyi etkiyi 0,25 mM H₂S'nin gösterdiği tespit edilmiştir.

Çizelge 4.15. H₂S(mM NaHS olarak) ön uygulamasından sonra MG(mM) stresine maruz bırakılan bitkilerin kök ve gövdelerindeki CAT sonuçları. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir (P>0,05)

Uygulamalar	Kök			Gövde		
	(AA240)/25µL	EU/25 µL	EU/gdoku	(AA240)/25µL	EU/25 µL	EU/gdoku
Kontrol	0,0041±0,0001	0,083	35,64 f	0,0130±0,0001	0,225	47,73 e
0,25 H ₂ S	0,0075±0,0005	0,153	39,46 e	0,0070±0,0010	0,143	34,72 g
0,50 H ₂ S	0,0065±0,0005	0,112	37,18 ef	0,0145±0,0005	0,237	43,09 f
1 MG	0,0055±0,0015	0,112	27,83 g	0,0165±0,0015	0,343	50,09 de
3 MG	0,0255±0,0015	0,318	80,14 a	0,0230±0,0020	0,478	73,68 c
0,25 H ₂ S +1MG	0,0080±0,0001	0,162	42,61 d	0,0185±0,0015	0,381	58,8 d
0,50 H ₂ S +1MG	0,0070±0,0010	0,143	35,30 f	0,0175±0,0015	0,362	54,05 d
0,25 H ₂ S +3MG	0,0145±0,0015	0,299	65,73 b	0,0250±0,0020	0,518	88,05 a
0,50 H ₂ S +3MG	0,0150±0,0020	0,309	49,12 c	0,0245±0,0015	0,506	80,82 ab

4.5.3. APX aktivitesine ait bulgular

Çalışmalarımızda tek başına MG uygulamalarının her ikisi çimlenen mısır fidelerinin hem kök hem de gövdelerinde APX aktivitesini kontrole göre önemli ölçüde ($P<0,05$) artırmıştır (Çizelge 4,16-18). Sadece kökte 1 mM MG' de APX aktivitesi kontrole göre azalmıştır. APX aktivitesi artışı özellikle 3 mM MG uygulamasında 1 mM MG'ye göre daha yüksek olmuştur. Örneğin 3 mM MG'de kök ve gövdede kontrole göre artışlar sırasıyla kökte %62 olurken, gövde de %12 olmuştur. Bu bulgular 1 ve 3 mM MG'nin çimlenen mısır tohumlarının kök ve gövdelerinde APX aktivitesini artırdığını göstermektedir. Çalışmamızda mısır tohumlarına MG uygulamasından önce SNP, SA ve H₂S ön muamelelerinin APX aktivitesi üzerindeki etkileri aşağıda sunulmuştur.

Tek başına H₂S uygulanmış bitki köklerinde 0,25 ve 0,50 mM H₂S APX aktivitesi üzerinde önemli bir değişikliğe ($P>0,05$) neden olmamıştır (Çizelge 4.16). H₂S ön uygulamasından sonra 1 ve 3 mM MG'nin iki ortamında ayrı ayrı çimlenen bitki köklerinde APX aktivitesi buluları Çizelge 4.7'de sunulmuştur. Örneğin 0,25 mM H₂S+ 1 MG ve 0,50 mM H₂S+1 mM MG uygulamaları aktiviteyi önemli ölçüde ($P<0,05$) artırmıştır. Ayrıca 3 mM MG stresine maruz bırakılan bitki köklerinde H₂S'nin her iki konsantrasyonu da APX aktivitesini önemli derecede ($P<0,05$) artırmıştır. H₂S ön uygulamasından sonra MG stresine maruz bırakılan bitkilerin gövdelerine ait APX aktivitesi bulguları Çizelge 4.16'da sunulmuştur. Sadece H₂S ön uygulamasına tabi tutulan bitki gövdelerinde H₂S'nin her iki konsantrasyonu APX aktivitesini düşürdüğü belirlenmiştir. H₂S+MG uygulaması yapılmış bitki gövdelerine ait bulgular incelendiğinde 0,25 ve 0,50 mM H₂S uygulamaları hem 1 hem de 3 mM MG uygulamalarında APX aktivitesini düşürmüştür.

Çizelge 4.16. H₂S(mM NaHS olarak) ön uygulamasından sonra MG(mM) stresine maruz bırakılan bitkilerin kök ve gövdelerinde APX aktivitesi bulguları. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir (P>0,05)

Uygulamalar	Kök			Gövde		
	(ΔA290)/50μL	EU/50μL	EU/g doku	(ΔA290)/50μL	EU/50μL	EU/gdoku
Kontrol	0,0529±0,007	214,14	17,87 e	0,0755±0,014	155,12	23,34 e
0,25 H ₂ S	0,0270±0,007	121,24	19,73 d	0,0550±0,010	58,75	17,36 g
0,50 H ₂ S	0,0320±0,003	152,87	16,09 f	0,0725±0,006	72,40	21,55 f
1 MG	0,0561±0,005	169,51	12,03 g	0,0819±0,001	163,61	25,32 d
3 MG	0,1109±0,014	165,48	39,90 b	0,1380±0,004	175,34	36,01 a
0,25H ₂ S +1MG	0,0675±0,003	198,56	21,31 c	0,0955±0,008	110,25	23,40 e
0,50H ₂ S +1MG	0,0785±0,013	179,36	17,65 e	0,0840±0,017	102,72	21,02 f
0,25H ₂ S +3MG	0,1340±0,025	179,78	42,87 a	0,1365±0,001	93,45	34,02 b
0,50H ₂ S +3MG	0,1355±0,021	239,41	44,56 a	0,1360±0,006	104,56	30,41 c

SNP ön uygulamasından sonra, MG'nin farklı iki ortamında çimlenen tohumlara ait fidelerin köklerinde APX aktivitesi bulguları Çizelge 4.17'de sunulmuştur. Tek başına SNP uygulamasına ait fide köklerinde 500 ve 750 μM SNP uygulamaları APX aktivitesini önemli (P<0,05) seviyede artırmıştır. SNP+MG uygulamasında ise 500 μM SNP+1 mM MG ve 750 μM SNP+1 mM MG uygulaması aktiviteyi artırmıştır. Buna ilave olarak 500 μM SNP+3 mM MG ve 750 μM SNP+3 mM MG uygulamaları APX aktivitesinde önemli (P<0,05) bir artış sağlamıştır. SNP ön uygulaması yapılan fide gövdelerine ait bulgular Çizelge 4.17'de sunulmuştur. Tek başına SNP ön muamelelerinin her ikisi kontrole kıyasla APX aktivitesini düşürmüştür (P<0,05). SNP+MG uygulaması yapılmış bitki gövdelerinde, 500 μM SNP+1 mM MG'de APX aktivitesi önemli (P<0,05) sevide artarken, 750 μM SNP+1 mM MG'de hafif bir azalış

görülmüştür ($P>0,05$). Bunun yanı sıra, 500 μM SNP+3 MG ve 750 μM SNP+3 MG uygulamaları da APX aktivitesini artırmıştır ($P<0,05$).

Çizelge 4.17. SNP(μM) ön muamelesine tabi tutulup daha sonra MG (mM) stresine maruz bırakılan bitkilerin kök ve gövdelerinde APX aktivitesi bulguları. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir ($P>0,05$)

Uygulamalar	Kök			Gövde		
	(ΔA290)/50 μL	EU/50 μL	EU/g doku	(ΔA290)/50 μL	EU/50 μL	EU/g doku
Kontrol	0,0529 $\pm$ 0,007	214,14	17,87 g	0,0755 $\pm$ 0,014	155,12	23,34 f
500 SNP	0,0517 $\pm$ 0,013	226,6	20,52 f	0,0580 $\pm$ 0,019	149,93	17,57 d
750 SNP	0,0590 $\pm$ 0,012	190,45	26,77 d	0,0580 $\pm$ 0,016	148,23	16,13 de
1 MG	0,0561 $\pm$ 0,005	169,51	12,03 ı	0,0819 $\pm$ 0,001	163,61	25,32 e
3 MG	0,1109 $\pm$ 0,014	165,48	39,90 c	0,1380 $\pm$ 0,004	175,34	36,01 b
500SNP+1MG	0,0797 $\pm$ 0,010	221,29	22,63 e	0,0995 $\pm$ 0,015	183,86	39,13 a
750SNP+1MG	0,0660 $\pm$ 0,011	319,69	15,08 h	0,0735 $\pm$ 0,019	133,02	18,20 g
500SNP+3MG	0,1457 $\pm$ 0,019	362,16	47,41 a	0,0945 $\pm$ 0,023	229,08	29,41 c
750SNP+3MG	0,1387 $\pm$ 0,017	392,63	44,17 b	0,1180 $\pm$ 0,020	282,45	29,85 c

SA ön uygulamasından sonra MG toksitesine maruz bırakılmış mısır fidelerinin köklerine ait APX enzim aktivitesi bulguları Çizelge 4.18’de sunulmuştur. Tek başına SA uygulanan bitkilerin köklerinde SA’nın iki uygulaması da (0,1 ve 1 mM SA), APX aktivitesini önemli ölçüde ($P<0,05$) artırmıştır ($P<0,05$). SA+MG uygulaması yapılan bitkilerden elde edilen bulgular incelendiğinde, 0,1 mM SA+1 mM MG ve 1 mM SA + 1 mM MG uygulamaları enzim aktivitesinde önemli artışlara neden olmuştur ($P<0,05$). Yine 3 mM MG stresine maruz bırakılan bitki köklerinde 0,1 ve 1 mM SA’nın her iki konsantrasyonu APX aktivitesini sitümüle etmiştir. Aynı bitkinin gövdelerine ait APX aktivitesi bulguları Çizelge 4.18’de sunulmuştur. Tek başına SA uygulanmış bitki

gövdelerinde 0,1 ve 1 mM SA'nın her iki uygulaması APX aktivitesini önemli ölçüde artırmıştır. SA+MG uygulaması yapılan bitki gövdelerinde ise 1 mM SA+ mM 1 MG, APX aktivitesini önemli derecede artırırken, 0,1mM SA+1 mM MG'nin hafif bir artış ($P<0,05$) sağladığı tespit edilmiştir. 0,1 mM SA+3 mM MG ve 1 mM SA+3 mM MG uygulamalarının her ikisinde APX aktivitesini önemli derecede artırdıkları tespit edilmiştir.

Çizelge 4.18. SA (mM) ön muamelesine tabi tutulup daha sonra MG stresine maruz bırakılan bitkilerin kök ve gövdelerinde APX aktivitesi bulguları. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir ($P>0,05$).

Uygulamalar	Kök			Gövde		
	(AA290)/50 μ L	EU /50 μ L	EU/g doku	(AA290)/50 μ L	EU/50 μ L	EU/g doku
Kontrol	0,0529 $\pm$ 0,007	214,14	17,87 ef	0,0755 $\pm$ 0,014	155,12	23,34 f
0,1 SA	0,0635 $\pm$ 0,011	227,16	19,94 e	0,0885 $\pm$ 0,003	242,20	30,34 d
1 SA	0,0745 $\pm$ 0,002	276,91	19,18 e	0,0900 $\pm$ 0,007	237,58	31,15 c
1 MG	0,0561 $\pm$ 0,005	169,51	12,03 g	0,0819 $\pm$ 0,001	163,61	25,32 e
3 MG	0,1109 $\pm$ 0,014	165,48	39,90 c	0,1380 $\pm$ 0,004	175,34	36,01 b
0,1 SA+1 MG	0,1045 $\pm$ 0,003	430,54	17,32 f	0,1070 $\pm$ 0,001	172,31	30,21 cd
1 SA+1 MG	0,1185 $\pm$ 0,007	223,91	37,8 d	0,1260 $\pm$ 0,002	209,45	31,50 c
0,1 SA+3 MG	0,1350 $\pm$ 0,009	320,64	48,93 a	0,1365 $\pm$ 0,002	278,04	45,55 a
1 SA+3 MG	0,1280 $\pm$ 0,002	353,12	45,88 b	0,1320 $\pm$ 0,002	294,58	44,69 a

4.5.4. GR aktivitesine ait bulgular

Çalışmalarımızda tek başına MG uygulamaları çimlenen mısır fidelerinin hem kök hem de gövdelerinde GR aktivitesini kontrole göre önemli ölçüde ($P<0,05$) artırmıştır (Çizelge 4.19-21). GR aktivitesi artışı özellikle 3 mM MG uygulamasında daha yüksek

olmuştur. Örneğin 1 mM MG'de kök ve gövdede kontrole göre artışlar sırasıyla kökte %19 olurken, gövde de %32 olmuştur. Bu bulgular 1 ve 3 mM MG'nin çimlenen mısır tohumlarının kök ve gövdelerinde GR aktivitesini artırdığını göstermektedir. Çalışmamızda mısır tohumlarına MG uygulamasından önce SNP, SA ve H₂S ön muamelelerinin GR aktivitesi üzerindeki etkileri aşağıda sunulmuştur.

H₂S ön uygulamasından sonra 1 ve 3 mM MG stresine maruz bırakılmış bitki köklerinde GR aktivitesi bulguları Çizelge 4.19'da sunulmuştur. Tek başına H₂S uygulanmış bitki köklerinde 0,25 ve 0,50 mM H₂S'nin GR aktivitesini artırdığı belirlenmiştir (P<0,05). H₂S+MG uygulaması yapılan bitkilerin köklerinde ise hem 0,25 mM H₂S+1 mM MG hem de 0,50 mM H₂S+1 mM MG uygulamaları GR aktivitesini önemli ölçüde artırmıştır (P<0,05). Buna benzer olarak 0,25 mM H₂S+3 MG ve 0,50 mM H₂S+3 MG uygulamalarında GR aktivitesini önemli (P<0,05) derecede artırmıştır. H₂S ön uygulamasından sonra MG stresine maruz kalan bitki gövdelerinde GR enzim aktivitesi bulguları Çizelge 4.19'da sunulmuştur. Sadece H₂S ön uygulamasına tabi tutulan bitki gövdelerinde H₂S'nin her iki konsantrasyonu GR aktivitesini önemli seviyede (P<0,05) artırmıştır. H₂S+MG uygulaması yapılan bitki gövdelerinde ise 0,25 mM H₂S+1 mM MG ve 0,50 mM H₂S+ 1 MG uygulamalarının her ikisinde GR aktivitesini artırmıştır. Benzer sonuç 0,25 mM H₂S+3 mM MG ve 0,50 mM H₂S+3 mM MG uygulamalarında da belirlendi.

Çizelge 4.19. H₂S (mM NaHS olarak) ön muamelesine tabi tutulup daha sonra MG (mM) stresine maruz bırakılan bitkilerin kök ve gövdelerinde GR aktivitesi bulguları. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir (P>0,05)

Uygulamalar	Kök			Gövde		
	(ΔA340)/50μL	EU/50 μL	EU/gdoku	(ΔA340)/50μL	EU/50μL	EU/g doku
Kontrol	0,0083±0,0003	24,58	17,17 ef	0,0115±0,0005	15,20	23,86 d
0,25 H ₂ S	0,0113±0,0008	28,27	19,73 d	0,0105±0,0005	11,08	17,36 f
0,50 H ₂ S	0,0090±0,001	17,77	16,09 f	0,0111±0,0005	13,95	21,55 e
1 MG	0,0095±0,0001	22,72	11,00 g	0,0195±0,0015	27,9	23,55 d
3 MG	0,0243±0,002	25,44	40,57 a	0,0286±0,002	25,53	39,84 b
0,25 H ₂ S+1MG	0,0100±0,0005	23,89	21,31 cd	0,0225±0,0005	30,76	26,40 c
0,50 H ₂ S+1MG	0,0110±0,001	20,78	17,65 e	0,0205±0,002	31,24	27,02 c
0,25 H ₂ S+3MG	0,0210±0,001	20,48	32,87 b	0,0315±0,002	49,68	54,02 a
0,50 H ₂ S+3MG	0,0249±0,002	26,24	24,56 c	0,0305±0,0005	42,26	50,41 a

SA ön uygulamasından sonra MG stresine maruz bırakılmış mısır bitkilerin köklerine ait GR aktivite bulguları Çizelge 4.20’de sunulmuştur. Tek başına SA uygulanan bitki köklerinde SA’nın iki uygulaması da (0,1 ve 1 mM) GR aktivitesini artırmıştır (P<0,05). Diğer taraftan SA+MG uygulamasına maruz bitkilerden elde edilen bulgular incelendiğinde, SA+MG uygulamalarının hepsi kontrollerine göre GR aktivitesini artırmıştır (P<0,05). Aynı bitkilerin gövdelerinden elde edilen bulgular incelendiğinde (Çizelge 4.20), tek başına SA uygulamaları GR aktivitesini artırmıştır. SA+MG uygulaması yapılan bitkilerin gövdelerinde de GR aktivitesi kontrollerine göre artmıştır (P<0,05).

Çizelge 4.20. SA(mM) ön muamelesine tabi tutulup daha sonra MG (mM) stresine maruz bırakılan bitkilerin kök ve gövdelerinde GR aktivitesi bulguları Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir ($P>0,05$)

Uygulamalar	Kök			Gövde		
	(ΔA_{340})/50 μ L	EU/50 μ L	EU/g doku	(ΔA_{340})/50 μ L	EU /50 μ L	EU/g doku
Kontrol	0,0080 $\pm$ 0,0010	21,71	17,88 ef	0,0119 $\pm$ 0,0015	16,07	22,83 d
0,1 SA	0,0085 $\pm$ 0,0005	25,53	19,94 e	0,0185 $\pm$ 0,0005	29,19	20,34 e
1 SA	0,0105 $\pm$ 0,0005	29,35	19,18 e	0,0185 $\pm$ 0,0005	28,08	21,15 e
1 MG	0,0095 $\pm$ 0,0010	14,52	12,16 g	0,0170 $\pm$ 0,0010	26,32	25,50 c
3 MG	0,0206 $\pm$ 0,0005	16,10	40,73 a	0,0265 $\pm$ 0,0025	23,72	38,87 a
0,1SA+1MG	0,0140 $\pm$ 0,0010	35,91	17,32 f	0,0260 $\pm$ 0,0030	37,5	30,21 b
1SA+1MG	0,0145 $\pm$ 0,0025	36,24	37,8 b	0,0155 $\pm$ 0,0025	30,41	31,50 b
0,1SA+3MG	0,0214 $\pm$ 0,002	8,83	25,93 d	0,0230 $\pm$ 0,0010	18,96	25,55 c
1SA+3MG	0,0240 $\pm$ 0,0010	9,67	28,88 c	0,0240 $\pm$ 0,0001	21,34	24,69 cd

SNP ön uygulamasından sonra MG'nin farklı ortamlarında çimlendirilmiş bitkilerin köklerinde GR aktivitesi bulguları Çizelge 4.21'de sunulmuştur. Tek başına SNP uygulanmış tohumların köklerinde 500 ve 750 μ M SNP'nin her iki konsantrasyonu da GR aktivitesinde önemli bir değişiklik ($P>0,05$) gösterememiştir. SNP+MG uygulaması yapılan bitkilerin köklerinden elde edilen veriler incelendiğinde, 500 μ M SNP+1 MG ve 750 μ M SNP+1 mM MG uygulamaları GR aktivitesi üzerinde anlamlı ($P<0,05$) bir etki yapamamıştır. Ancak, 500 μ M SNP+3 mM MG ve 750 μ M SNP+3 mM MG uygulamaları GR aktivitesinde önemli ($P<0,05$) artış sağlamıştır. Bu bitkilerin gövdelerinden elde edilen bulgular incelendiğinde, Sadece SNP ön muamelesine tabi tutulan bitkilerin gövdelerinde 500 ve 750 μ M SNP'nin her iki konsantrasyonu kontrole kıyasla GR aktivitesi üzerine önemli ($P<0,05$) etki göstermiştir. SNP+MG uygulaması yapılan bitkilerin fidelerinde 500 μ M SNP+1 mM MG ve 750 μ M SNP+1 mM MG uygulamaları kontrollerine göre GR aktivitesine herhangi bir etki sağlayamamıştır

($P>0,05$). 500 μ M SNP+3 mM MG ve 750 μ M SNP+3 mM MG uygulamaları GR aktivitesinde önemli ($P<0,05$) artışa neden olmuştur.

Çizelge 4.21. SNP(μ M) ön muamelesinden sonra MG (mM) stresine maruz bırakılan bitkilerin kök ve gövdelerinde GR aktivitesi bulguları. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir ($P>0,05$)

Uygulamalar	Kök			Gövde		
	(ΔA_{340})/50 μ L	EU/50 μ L	EU/g doku	(ΔA_{340})/50 μ L	EU /50 μ L	EU/gdoku
Kontrol	0,0100 $\pm$ 0,0010	22,25	17,57 f	0,0127 $\pm$ 0,0005	15,47	23,37 g
500 SNP	0,0120 $\pm$ 0,0010	28,41	20,52 e	0,0170 $\pm$ 0,0020	16,96	27,57 e
750 SNP	0,0140 $\pm$ 0,0020	26,76	26,77 d	0,0145 $\pm$ 0,0035	17,6	26,13 e
1 MG	0,0932 $\pm$ 0,0005	16,05	13,93 g	0,0195 $\pm$ 0,0050	26,95	24,93 g
3 MG	0,0210 $\pm$ 0,0020	17,02	39,41 c	0,0255 $\pm$ 0,0025	25,63	42,33 c
500SNP+1MG	0,0105 $\pm$ 0,0005	22,63	22,63de	0,0150 $\pm$ 0,0001	32,69	39,13 d
750SNP+1MG	0,0115 $\pm$ 0,0010	20,73	15,08 f	0,0145 $\pm$ 0,0005	22,43	18,20 h
500SNP+3MG	0,0223 $\pm$ 0,0025	46,44	43,41 b	0,0340 $\pm$ 0,0001	36,78	52,41 b
750SNP+3MG	0,0235 $\pm$ 0,0005	30,6	51,17 a	0,0410 $\pm$ 0,0001	44,08	61,85 a

4.5.5. GPX aktivitesine ait bulgular

Çalışmalarımızda çimlenen mısır fidelerinin hem kök hem de gövdelerinde, kontrole göre kıyaslandığında, tek başına 1 mM MG uygulaması, GPX aktivitesini düşürürken ($P<0,05$), 3 mM MG aktiviteyi önemli oranda ($P<0,05$) artırmıştır (Çizelge 4.22-24). Örneğin 3 mM MG’de aktivitenin kök ve gövdede kontrole göre artışı sırasıyla kökte %68 olurken, gövde de %31 olmuştur. Bu bulgu, MG’nin düşük konsantrasyonda

çimlenen mısır tohumlarının kök ve gövdelerinde GPX aktivitesini düşürdüğünü, ancak yüksek konsantrasyonda artırdığını gösterir. Çalışmamızda mısır tohumlarına MG uygulamasından önce SNP, SA ve H₂S ön muamelelerinin GPX aktivitesi üzerindeki etkileri aşağıda sunulmuştur.

SNP ön uygulamasından sonra MG'nin farklı ortamlarında çimlendirilmiş bitkilerin köklerinde GPX aktivitesi bulguları Çizelge 4.22'de sunulmuştur. Tek başına SNP uygulanmış tohumların köklerinde 500 ve 750 µM SNP'nin her iki konsantrasyonu GPX aktivitesinde önemli ($P<0,05$) bir artış sağlamıştır. SNP+MG uygulaması yapılan bitkilerin köklerine ait bulgular incelendiğinde, 500 ve 750 µM SNP ön muamelelerinin her ikisi hem 1 mM hem de 3 mM MG'ye maruz köklerde GPX aktivitesini artırmıştır ($P<0,05$). Aynı tohumların gövdelerinden elde edilen bulgular Çizelge 4.22'de sunulmuştur. Sadece SNP ön muamelesine tabi tutulan bitkilerin gövdelerinde 500 ve 750 µM SNP ön muameleleri kontrole kıyasla GPX aktivitesi üzerine önemli ($P<0,05$) artış sağlamıştır. SNP+MG uygulaması yapılan bitki fidelerinde ise 500 µM SNP+1 mM MG ve 750 µM SNP+1 MG'de GPX aktivitesini artırmıştır ($P<0,05$). Bunun yanı sıra, 750 µM SNP+3 mM MG, GPX aktivitesinde bir etki göstermezken ($P>0,05$), 500 µM SNP+ 3 mM MG önemli ($P<0,05$) artış sağladığı tespit edilmiştir.

Çizelge 4.22. SNP (μM) ön muamelesine tabi tutulup daha sonra MG (mM) stresine maruz bırakılan bitkilerin kök ve gövdelerinde GPX aktivitesi bulguları. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir ($P>0,05$)

Uygulamalar Kök Gövde						
	(AA470)/10 μL	EU/10 μL	EU/gdoku	(AA470)/10 μL	EU/10 μL	EU/gdoku
Kontrol	0,1648 $\pm$ 0,039	20,79	87,86 f	0,0765 $\pm$ 0,006	11,74	116,86 e
500 SNP	0,2119 $\pm$ 0,012	22,25	102,6 e	0,0997 $\pm$ 0,012	19,56	137,86 d
750 SNP	0,2373 $\pm$ 0,010	23,72	133,86 d	0,0818 $\pm$ 0,008	18,63	130,66 d
1 MG	0,1311 $\pm$ 0,008	12,3	62,66 h	0,0592 $\pm$ 0,002	7,71	111,66 f
3 MG	0,1973 $\pm$ 0,019	19,04	197,06 c	0,0954 $\pm$ 0,006	10,2	176,66 b
500SNP+1MG	0,1441 $\pm$ 0,024	16,48	71,13 g	0,0633 $\pm$ 0,008	9,33	195,66 a
750SNP+1MG	0,3213 $\pm$ 0,058	26,29	75,4 g	0,1327 $\pm$ 0,026	12,46	191,00 a
500SNP+3MG	0,2564 $\pm$ 0,010	24,86	217,06 b	0,1875 $\pm$ 0,010	17,54	147,06 c
750SNP+3MG	0,2721 $\pm$ 0,057	32,69	225,86 a	0,0967 $\pm$ 0,032	10,68	179,26 b

H₂S ön uygulamasından sonra 1 ve 3 mM MG ortamlarında çimlendirilmiş bitki köklerinde GPX aktivitesi bulguları Çizelge 4.23’de sunulmuştur. Tek başına 0,25 ve 0,50 mM H₂S uygulamaları bitki köklerinde GPX aktivitesi üzerinde önemli bir etki gösterip, yüksek bir artış sağlamıştır ($P<0,05$). Diğer taraftan, H₂S+MG uygulaması yapılan bitki köklerinde de 0,25 ve 0,50 mM H₂S ön muamelerinin her ikisi hem 1 mM hem de 3 mM MG’ye maruz köklerde GPX aktivitesini artırmıştır ($P<0,05$). H₂S+MG uygulaması yapılmış bitki gövdelerinde elde edilen bulgular incelendiğinde, sadece H₂S ön uygulamasına tabi tutulan bitki gövdelerinde 0,25ve 0.50 mM H₂S uygulamaları GPX aktivitesini artırmıştır($P<0,05$). Aynı bitkilerin gövdelerinde ise 0,25 mM H₂S+1 mM MG ve 0,50 mM H₂S+1 mM MG GPX aktivitesi üzerinde anlamlı bir etki yapmıştır ($P<0,05$). 0,25 ve 0,50 mM H₂S ön muamelerinin her ikisi 3 mM MG’ye maruz gövdelerde GPX aktivitesini artırmıştır ($P<0,05$).

Çizelge 4.23. H₂S(mM NaHS olarak) ön muamelesine tabi tutulup daha sonra MG (mM) stresine maruz bırakılan bitkilerin kök ve gövdelerinde GPX aktivitesi bulguları. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir (P>0.05).

Uygulamalar Kök Gövde						
	(AA470)/10µL	EU/10µL	EU/gdoku	(AA470)/10µL	EU/10µL	EU/g doku
Kontrol	0,1605±0,008	21,91 d	80,86 f	0,0765±0,006	7,61	119,33 g
0,25 H ₂ S	0,3079±0,025	32,83 b	98,66 d	0,0814±0,016	9,31	126,80 f
0,50 H ₂ S	0,2801±0,043	32,1 b	80,46 f	0,1165±0,019	13,55	137,73 e
1 MG	0,1390±0,006	19,49 d	58,20 g	0,0634±0,012	7,46	113,73 h
3 MG	0,1933±0,023	27,26 c	199,86 b	0,0991±0,006	11,59	173,2 c
0,25 H ₂ S+1MG	0,2530±0,041	25,58 c	106,53 c	0,1333±0,020	15,11	147,00 d
0,50 H ₂ S+1MG	0,2843±0,030	24,43 cd	88,26 e	0,0915±0,007	9,84	135,13 e
0,25 H ₂ S+3MG	0,3179±0,055	38,12 a	244,33 a	0,1576±0,020	16,76	190,13 a
0,50 H ₂ S+3MG	0,4013±0,052	46,79 a	252,8 a	0,1661±0,008	16,94	182,06 b

SA uygulamalarından elde edilen veriler değerlendirildiğinde (Çizelge 4.24), tek başına SA uygulanan bitkilerin köklerinde 1 mM SA GPX aktivitesini düşürürken (P>0,05), 0,1 mM SA aktiviteyi önemli ölçüde artırmıştır (P<0,05). SA+MG uygulaması yapılmış bitki köklerinden elde edilen bulgular incelendiğinde, 0,1 mM SA+ mM 1 MG ve 1 mM SA+1 mM MG uygulamaları GPX aktivitesinde önemli (P<0,05) artış sağlamıştır. Aynı konsantrasyonda ki SA uygulamaları 3 mM MG koşullarında da GPX aktivitesini teşvik etmiştir (P<0,05). Aynı bitkilerin gövdelerinde ise tek başına 0,1 ve 1 mM SA'nın her iki uygulaması da GPX aktivitesinde çok anlamlı (P<0,05) artışa neden olmuştur. Kontrolle kıyaslandığında da SA'nın her iki uygulaması sırasıyla %33 ve %45 oranında GPX aktivitesini sitümüle etmiştir. SA+MG uygulaması yapılmış gövdelerde ise 0,1mM SA+1 mM MG ve 1 mM SA+1 mM MG uygulamalarında GPX aktivitesi artmıştır(P<0,05). Ancak 0,1 mM SA+3 mM MG koşullarında aktivitede düşüş

belirlenirken ($P>0,05$), 1 mM SA+3 mM MG uygulamasında önemli ($P>0,05$) bir değişiklik belirlenememiştir.

Çizelge 4.24. SA(mM) ön muamelesine tabi tutulup daha sonra MG (mM) stresine maruz bırakılan bitkilerin kök ve gövdelerinde GPX aktivitesi bulguları. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir ($P>0,05$)

Uygulamalar Kök Gövde						
	(AA470)/10 μ L	EU/10 μ L	EU/g doku	(AA470)/10 μ L	EU /10 μ L	EU/g doku
Kontrol	0,1713 $\pm$ 0,004	19,64	119,4 f	0,0970 $\pm$ 0,017	9,72	114,13 e
0,1 SA	0,2680 $\pm$ 0,014	42,16	126,73 e	0,1249 $\pm$ 0,020	12,49	116,73 d
1 SA	0,1511 $\pm$ 0,012	15,10	95,93 g	0,1812 $\pm$ 0,035	18,14	119,73 d
1 MG	0,1698 $\pm$ 0,026	17,34	62,80 ı	0,0650 $\pm$ 0,017	6,5	109,53 f
3 MG	0,3607 $\pm$ 0,011	36,06	203,66 c	0,1146 $\pm$ 0,026	11,46	179,33 a
0,1SA+1MG	0,2259 $\pm$ 0,072	38,74	86,60 h	0,2505 $\pm$ 0,018	23,92	151,06 b
1SA+1MG	0,2861 $\pm$ 0,036	28,60	189,00 d	0,3445 $\pm$ 0,001	23,68	157,53 b
0,1SA+3MG	0,3865 $\pm$ 0,044	40,01	214,66 b	0,1020 $\pm$ 0,006	8,2	127,73 c
1SA+3MG	0,4157 $\pm$ 0,033	44,9	229,4 a	0,112 $\pm$ 0,043	11.14	171,46 a

4.6. H₂O₂, O₂^{•-}ve Lipid Peroksidasyonuna Ait Bulgular

4.6.1. İçsel H₂O₂ miktarı bulguları

Çalışmalarımızda tek başına MG uygulamalarının her ikisi (1 ve 3 mM) çimlenen mısır fidelerinin kök ve gövdelerinde H₂O₂ içeriğini kontrole göre önemli ölçüde ($P<0,05$) artırmıştır (Çizelge 4.25-27). H₂O₂ içeriği artışları özellikle 3 mM MG uygulamasında 1 mM MG'ye göre daha yüksek olmuştur. Örneğin 3 mM MG'de kök ve gövdede kontrole göre artışlar sırasıyla kökte %31 olurken, gövde de %51 olmuştur. Bu bulgular, 1 ve 3 mM MG toksitesi altında çimlenen mısır tohumlarının kök ve

gövdelerinde içsel H_2O_2 miktarının arttığını göstermektedir. Çalışmamızda mısır tohumlarına MG uygulamasından önce SNP, SA ve H_2S ön muamelelerinin H_2O_2 içeriği üzerindeki etkileri aşağıda sunulmuştur.

H_2S +MG uygulamasın yapılmış mısır bitkilerin köklerine ait içsel H_2O_2 bulguları Çizelge 4.25’de sunulmuştur. Tek başına H_2S uygulanan bitkilerin köklerindeki H_2S ’nin iki uygulaması (0.25 ve 0.50 mM), H_2O_2 miktarını düşürmüştür ($P<0,05$). Bu düşüşler kontrolle kıyaslandığında, sırasıyla %5 ve %15 oranlarında olduğu bulunmuştur. Buna karşılık H_2S +MG uygulaması yapılan bitkilerin köklerinden elde edilen bulgular incelendiğinde 0,25 mM H_2S +1 mM MG ve 0,50 mM H_2S +1 mM MG uygulamaları kontrolle kıyaslandığında H_2O_2 miktarını azalttığı bulunmuştur ($P<0,05$). İlave olarak, 0,25 mM H_2S +3 mM MG ve 0,50 mM H_2S +3 mM MG uygulamaları da H_2O_2 miktarını düşürmüştür ($P<0,05$). Aynı bitkilerin gövdelerine ait H_2O_2 bulguları Çizelge 4.25’de sunulmuştur. Tek başına H_2S uygulanmış bitki gövdelerinde 0,25 ve 0.50 mM H_2S uygulaması H_2O_2 miktarını düşürmüştür ($P<0,05$). H_2S +MG uygulaması yapılmış mısır bitkilerinin gövdelerinden elde edilen bulgular incelendiğinde 0,25 H_2S +1 mM MG ve 0,50 mM H_2S +1 mM MG uygulamalarında kontrolle kıyasla H_2O_2 miktarında önemli düşme tespit edilmiştir ($P<0,05$). 0,25 mM H_2S +3 mM MG uygulamasında ise H_2O_2 miktarı kontrole kıyasla düşerken ($P<0,05$), 0,50 mM H_2S +3 mM MG uygulamasında artmıştır ($P<0,05$).

Çizelge 4.25. H₂S (mM MaHS olarak) ön muamelesine tabi tutulup daha sonra MG (mM) stresine maruz bırakılan bitkilerin kök ve gövdelerinde H₂O₂ miktarı (nmol/mL) bulguları. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir (P>0,05)

Uygulamalar	Kök	Gövde
	nmol/mL	nmol/mL
Kontrol	1,18 ±0,0016 d	1,41 ±0,0013 d
0,25 H ₂ S	1,13±0,0040 e	1,21 ±0,0013 e
0,50 H ₂ S	1,10 ±0,0009 e	1,09 ±0,0052 f
1 MG	1,29 ±0,0018 c	1,53 ±0,0012 c
3 MG	1,90 ±0,0006 a	2,13 ±0,0024 b
1 MG+0,25 H ₂ S	1,18 ±0,0007 d	1,20 ±0,0095 e
1 MG+0,50 H ₂ S	1,22 ±0,0006 c	1,41 ±0,0024 d
3 MG +0,25 H ₂ S	1,54 ±0,0031 b	1,59 ±0,0002 c
3 MG +0,50 H ₂ S	1,20 ±0,0003 cd	2,21 ±0,0018 a

Diğer taraftan, tek başına SNP uygulanmış bitki köklerinde 500 ve 750 µM SNP, H₂O₂ miktarında artış (P<0,05) sağlamıştır (Çizelge 4.26). SNP+MG uygulaması yapılmış bitki köklerinde ise 500 µM SNP+1 mM MG ve 750 µM SNP+1 mM MG uygulaması H₂O₂ miktarını önemli ölçüde artırmıştır (P<0,05). Buna karşılık 500 µM SNP+3 mM MG ve 750 µM SNP+3 mM MG uygulamalarında H₂O₂ miktarının önemli derecede azaldığı tespit edilmiştir (P<0,05). Benzer şekilde SNP+MG uygulaması yapılmış bitki gövdelerinde H₂O₂ miktarı bulguları Çizelge 4.26’de sunulmuştur. Tek başına SNP ön uygulamasına tabi tutulan bitki gövdelerinde SNP’nin her iki konsantrasyonu da H₂O₂ miktarını önemli derecede azaltmıştır (P<0,05). SNP+MG uygulaması yapılan bitki gövdelerinde ise 500 SNP+1 mM MG ve 750 SNP+1 MG uygulamalarında H₂O₂ miktarında düşüş (P<0,05) tespit edilmiştir. Ayrıca, SNP + 3 MG uygulamalarının ikisinde de H₂O₂ miktarının azaldığı tespit edilmiştir (P<0,05).

Çizelge 4.26. SNP (μM) ön muamelesine tabi tutulup daha sonra MG (mM) stresine maruz bırakılan bitkilerin kök ve gövdelerinde H_2O_2 miktarı (nmol/mL) bulguları. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir ($P>0,05$).

Uygulamalar	Kök	Gövde
	nmol/mL	nmol/mL
Kontrol	1,19 $\pm$ 0,00384 f	1,37 $\pm$ 0,00064 c
500 SNP	1,45 $\pm$ 0,00019 d	1,22 $\pm$ 0,00046 d
750 SNP	1,69 $\pm$ 0,00801 c	1,03 $\pm$ 0,00286 f
1 MG	1,30 $\pm$ 0,00057 e	1,55 $\pm$ 0,00188 b
3 MG	1,93 $\pm$ 0,00100 a	2,09 $\pm$ 0,00100 a
1 MG +500 SNP	1,49 $\pm$ 0,00070 d	1,25 $\pm$ 0,00096 d
1 MG+750 SNP	1,80 $\pm$ 0,00107 b	1,52 $\pm$ 0,00636 b
3 MG+500 SNP	1,80 $\pm$ 0,00132 b	1,58 $\pm$ 0,00084 b
3 MG+750 SNP	1,72 $\pm$ 0,00081 c	1,14 $\pm$ 0,00078 e

SA+MG uygulama grubunda çimlenen mısır fidelerinin köklerine ait H_2O_2 bulguları Çizelge 4.27’de sunulmuştur. Tek başına SA uygulanan bitkilerin köklerinde SA’nın iki uygulaması, H_2O_2 miktarını önemli ölçüde azaltmıştır ($P<0,05$). SA+MG uygulaması yapılmış bitkilerden elde edilen bulgular incelendiğinde ise 0,1 ve 1 mM SA uygulanmış ve sonra 1 mM MG’ye maruz bırakılan köklerde H_2O_2 miktarı artmıştır ($P>0,05$). Ancak, 3 mM MG’ye maruz bırakılmış fidelerin köklerinde H_2O_2 miktarı düşmüştür ($P<0,05$). Aynı bitkilerin gövdelerine ait bulgulara H_2O_2 miktarı, kontrole göre, tek başına 0,1 mM SA uygulamasında artarken ($P>0,05$), 1 mM SA’da düşmüştür ($P<0,05$). Bunlara ilave olarak, aynı fidelerin gövdelerde 0,1 mM SA+1 mM MG uygulamasında H_2O_2 miktarı düşerken, 1mM SA+1 mM MG’de artmıştır ($P>0,05$). Ancak 0,1 ve 1 mM SA uygulamalarının 3 mM MG koşullarında H_2O_2 içeriğini önemli derecede azaltmıştır ($P<0,05$).

Çizelge 4.27. SA (mM) ön muamelesinden sonra MG (mM) stresine maruz bırakılan bitkilerin kök ve gövdelerinde H_2O_2 miktarı (nmol/mL) bulguları. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir ($P>0,05$)

Uygulamalar	Kök	Gövde
	nmol/mL	nmol/mL
Kontrol	1,20 ±0,00076 d	1,39 ±0,00090 e
0,1 SA	0,98 ±0,00041 e	1,73±0,00155 c
1 SA	1,01 ±0,00037 e	1,09±0,00332 g
1 MG	1,31 ±0,00089 d	1,56 ±0,00083 d
3 MG	1,95 ±0,00064 a	2,06 ±0,00264 b
1 MG +0,1 SA	1,82 ±0,00079 b	1,18 ±0,00408 f
1 MG+1 SA	1,58 ±0,00135 c	2,38±0,00299 a
3 MG +0,1 SA	1,55 ±0,00227 c	1,52 ±0,00070 d
3 MG +1 SA	1,52± 0,00017 c	1,39±0,00063 e

4.6.2. Süperoksit anyonu radikali ($O_2^{\cdot-}$)miktarı bulgular

Çalışmalarımızda tek başına MG uygulamalarının her ikisi (1 ve 3 mM) çimlenen mısır fidelerinin hem kök hem de gövdelerinde $O_2^{\cdot-}$ içeriğini kontrole göre önemli ölçüde ($P<0,05$) artırmıştır (Çizelge 4.28-30). $O_2^{\cdot-}$ miktarı artışları özellikle 3 mM MG uygulamasında 1 mM MG'ye göre daha yüksek olmuştur. Örneğin 1 mM MG'de kök ve gövde de kontrole göre artışlar sırasıyla kökte %36 olurken, gövde de %12 olmuştur. Bu bulgular 1 ve 3 mM MG'nin çimlenen mısır tohumlarının kök ve gövdelerinde $O_2^{\cdot-}$ içeriğini artırdığını göstermektedir. Çalışmamızda mısır tohumlarına MG uygulamasından önce SNP, SA ve H_2S ön muamelelerinin $O_2^{\cdot-}$ içeriği üzerindeki etkileri aşağıda sunulmuştur.

H_2S ön uygulamasından sonra farklı MG ortamlarında çimlenen mısırın fidelerinin köklerinde $O_2^{\cdot-}$ içeriği bulguları Çizelge 4.28'de sunulmuştur. Tek başına H_2S

uygulanmış fidelerin köklerinde 0,25 ve 0,50 mM H₂S'in her iki uygulaması O₂⁻ içeriğinde önemli bir değişikliğe (P>0,05) neden olmamıştır. H₂S+MG uygulaması yapılmış fidelerin köklerine ait bulgularda 0,25 mM H₂S+1 mM MG ve 0,50 mM H₂S+1 mM MG uygulamalarında O₂⁻ içeriği kontrole kıyasla düşmüştür (P<0,05). Ancak 0,25mM H₂S+3 mM MG ve 0,50 mM H₂S+3 mM MG uygulamalarında O₂⁻ içeriğinde anlamlı değişiklik görülmemiştir (P>0,05). Aynı tohumların gövdelerinden elde edilen bulgular Çizelge 4.28'de sunulmuştur. Sadece H₂S ön muamelesine tabi tutulan bitkilerin gövdelerinde O₂⁻ içeriğinde önemli değişiklik görülmemiştir (P>0,05). H₂S+MG uygulaması yapılan bitki gövdelerinde ise 0,25 mM H₂S+1 mM MG ve 0,50 mM H₂S+1 mM MG uygulamalarında kontrole göre O₂⁻ içeriği düşmüştür. (P<0,05). Ancak, 0,25 mM H₂S+3 mM MG O₂⁻ içeriğinde bir artış sağlarken (P<0,05) 0,50 mM H₂S+3 mM MG uygulaması O₂⁻ içeriğini düşürmüştür (P<0,05).

Çizelge 4.28. H₂S (mM NaHS olarak) ön uygulamasından sonra MG (mM) stresine maruz bırakılan bitkilerin kök ve gövdelerinde O₂⁻ içeriği (nmol/ml) bulguları. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir (P>0,05).

Uygulamalar	Kök	Gövde
	nmol/ml	nmol/ml
Kontrol	0,091±0,00074 d	0,072 ±0,00315 e
0,25 H ₂ S	0,085±0,00075 e	0,065 ±0,00150 f
0,50 H ₂ S	0,078±0,00093 f	0,074±0,00202 de
1 MG	0,103±0,00069 c	0,085±0,00058 c
3 MG	0,118±0,00367 b	0,090±0,00145 b
1 MG+0,25 H ₂ S	0,088±0,00145 de	0,077±0,00086 d
1 MG+0,50 H ₂ S	0,085±0,00252 e	0,078±0,00195 d
3 MG +0,25 H ₂ S	0,118±0,00448 b	0,101±0,00127 a
3 MG +0,50 H ₂ S	0,138±0,0185 a	0,083±0,00582 c

SA ön uygulamasından sonra, MG'nin farklı ortamlarında (1 ve 3 mM) çimlendirilmiş mısır bitkilerin köklerinde O_2^- aktivitesi bulguları Çizelge 4.29'da sunulmuştur. Tek başına SA uygulanmış çimlenen tohumların köklerinde 0,1 ve 1 mM SA'nın her iki konsantrasyonu O_2^- içeriğinde önemli bir değişikliğe ($P>0,05$) neden olmamıştır. SA+MG uygulaması yapılan fidelerin köklerinde ise 0,1 mM SA+1 mM MG uygulaması O_2^- içeriğini azaltırken ($P<0,05$), 1 mM SA+1 mM MG uygulaması artırmıştır ($P>0,05$). Buna benzer olarak 0,1 mM SA+3 mM MG uygulaması O_2^- içeriğini düşürürken ($P<0,05$), 1 mM SA+3 mM MG uygulaması O_2^- içeriğini artırmıştır ($P>0,05$). Aynı tohumların gövdelerinden elde edilen bulgular Çizelge 4.29'da sunulmuştur. Sadece SA ön muamelesine tabi tutulan fidelerin gövdelerinde 0,1 mM SA O_2^- içeriğini düşürürken ($P<0,05$), 1 mM SA ise anlamlı ($P>0,05$) bir etki yapmamıştır. SA+MG uygulaması yapılan bitki gövdelerinde, 0,1 mM SA+1 mM MG uygulaması O_2^- içeriğini etkilemezken ($P>0,05$), 1 mM SA+1 mM MG uygulaması O_2^- içeriğini artırmıştır ($P<0,05$). 0,1 mM SA+3 mM MG ve 1 mM SA+3 mM MG uygulamaları da O_2^- içeriğini artırmıştır ($P>0,05$).

Çizelge 4.29. SA(mM) ön uygulamasından sonra MG(mM) stresine maruz bırakılan bitkilerin kök ve gövdelerinde O_2^- içeriği (nmol/mL) bulguları. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir ($P>0,05$)

Uygulamalar	Kök	Gövde
	nmol/ml	nmol/ml
Kontrol	0,104±0,00364 c	0,077±0,00111 e
0,1 SA	0,101±0,00364 cd	0,068±0,00196 f
1 SA	0,101±0,00953 cd	0,077±0,00390 e
1 MG	0,106±0,00682 c	0,086±0,00117 c
3 MG	0,116±0,00186 bc	0,088±0,00376 c
0,1 SA + 1 MG	0,077±0,00081 e	0,081±0,00185 d
1 SA + 1 MG	0,122±0,01668 b	0,120±0,00084 a
0,1 SA + 3 MG	0,096±0,00186 d	0,096±0,00077 b
1 SA + 3 MG	0,140±0,00998 a	0,101±0,00110 b

SNP ön uygulamasından sonra, MG'nin farklı ortamlarında çimlendirilen mısır bitkilerin köklerinde O_2^- içeriği bulguları Çizelge 4.30'da sunulmuştur. Tek başına SNP uygulanmış çimlenen tohumların köklerinde, kontrole göre, 500 μ M SNP O_2^- içeriğini değiştirmezken ($P>0,05$), 750 μ M SNP düşürmüştür ($P<0,05$). SNP+MG uygulaması yapılmış fidelerin köklerinde 500 μ M SNP+1 mM MG ve 750 μ M SNP+1 mM MG uygulamaları O_2^- içeriğini düşürmüştür ($P<0,05$). Ancak 500 μ M SNP+3 mM MG uygulamasında O_2^- içeriği artarken ($P<0,05$), 750 μ M SNP+3 mM MG uygulamasında içerikte önemli bir değişik olmamıştır ($P>0,05$). Aynı fidelerin gövdelerinden elde edilen bulgular incelendiğinde sadece SNP ön muamelesine tabi tutulan bitkilerin gövdelerinde 500 ve 750 μ M SNP, O_2^- içeriği üzerinde etkili olmamıştır ($P>0,05$). SNP+MG uygulamasına maruz bırakılmış bitki gövdelerinde 500 ve 750 μ M SNP uygulanmış grupta O_2^- içeriğini üzerine önemli etkisi görülmemiştir ($P>0,05$). Ancak, 500 μ M SNP+3 mM MG ve 750 μ M SNP+3 mM MG uygulamaları O_2^- içeriğini önemli oranda ($P<0,05$) artırmıştır.

Çizelge 4.30. SNP(μ M) ön uygulamasından sonra MG(mM) stresine maruz bırakılan bitkilerin kök ve gövdelerinde O_2^- içeriği bulguları. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir ($P>0,05$)

Uygulamalar	Kök	Gövde
	nmol/ml	nmol/ml
Kontrol	0,093 $\pm$ 0,00201 c	0,079 $\pm$ 0,00092 c
500 SNP	0,087 $\pm$ 0,00558 cd	0,083 $\pm$ 0,00274 bc
750 SNP	0,072 $\pm$ 0,00231 e	0,079 $\pm$ 0,00090 c
1 MG	0,098 $\pm$ 0,00161 c	0,086 $\pm$ 0,00080 b
3 MG	0,117 $\pm$ 0,00166 b	0,086 $\pm$ 0,00058 b
500 SNP + 1 MG	0,078 $\pm$ 0,00188 de	0,087 $\pm$ 0,00388 b
750 SNP + 1 MG	0,073 $\pm$ 0,00113 e	0,086 $\pm$ 0,00135 b
500 SNP + 3 MG	0,129 $\pm$ 0,00609 a	0,116 $\pm$ 0,00167 a
750 SNP + 3MG	0,112 $\pm$ 0,00341 b	0,119 $\pm$ 0,00304 a

4.6.3. LPO seviyesi (MDA olarak) bulguları

Çalışmalarımızda tek başına MG uygulamaları çimlenen mısır fidelerinin hem kök hem de gövdelerinde MDA içeriğini kontrole göre önemli ölçüde ($P<0,05$) artırmıştır (Çizelge 4.31-33) MDA içeriği artışı özellikle 3 mM MG uygulamasında 1 mM MG'ye göre daha yüksek olmuştur. Örneğin 3 mM MG'de kök ve gövdede kontrole göre artışlar sırasıyla kökte %64 olurken, gövde de %48 olmuştur. Bu bulgular 1 ve 3 mM MG'nin çimlenen mısır tohumlarının kök ve gövdelerinde hücrel membranlarda LPO seviyesini artırdığını göstermektedir. Çalışmamızda mısır tohumlarına MG uygulamasından önce SNP, SA ve H₂S ön muamelelerinin O₂⁻ içeriği üzerindeki etkileri aşağıda sunulmuştur.

SNP ön uygulamasından sonra, MG'nin farklı konsantrasyonunda gelişen mısır fidelerinin köklerinde LPO seviyesi (MDA içeriği olarak) bulguları Çizelge 4.31'de sunulmuştur. Tek başına SNP uygulanmış fidelerin köklerinde 500 ve 750 µM SNP, MDA seviyesinde önemli bir değişikliğe neden olmamıştır ($P>0,05$). SNP+MG uygulaması yapılan bitki köklerinde ise 500 ve 750 µM SNP'nin her iki konsantrasyonu 1 mM MG uygulanmış fide köklerinde MDA içeriğini önemli oranda ($P<0,05$) artırırken, aynı etki 3 mM MG uygulamasında da görülmüştür. Aynı bitkilerin gövdelerinden elde edilen bulgular Çizelge 4.31'de sunulmuştur. Sadece SNP ön muamelesine tabi tutulan fidelerin gövdelerinde 500 ve 750 µM SNP MDA içeriği üzerinde etki olmamıştır ($P>0,05$). SNP+MG uygulaması yapılan bitki fidelerinde ise 500 ve 750 µM SNP uygulamaları MDA içeriği üzerinde genelde anlamlı ($P>0,05$) bir değişikliğe neden olmamıştır.

Çizelge 4.31. SNP (μM) ön muamelesine tabi tutulup daha sonra MG (mM) stresine maruz bırakılan bitkilerin kök ve gövdelerinde MDA içeriği bulguları. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir ($P>0,05$)

Uygulamalar	Kök	Gövde
	nmol/g doku	nmol/g doku
Kontrol	3,47 $\pm$ 0,00003 d	4,41 $\pm$ 0,00067 e
500 SNP	4,95 $\pm$ 0,00061 c	5,85 $\pm$ 0,00007 cd
750 SNP	3,83 $\pm$ 0,00015 d	5,18 $\pm$ 0,00072 d
1 MG	2,93 $\pm$ 0,01457 e	3,51 $\pm$ 0,00061 f
3 MG	6,12 $\pm$ 0,00035 b	7,52 $\pm$ 0,00093 b
500 SNP + 1 MG	3,81 $\pm$ 0,00017 d	6,66 $\pm$ 0,00085 c
750 SNP + 1 MG	3,96 $\pm$ 0,00368 cd	14,12 $\pm$ 0,02293 a
500 SNP + 3 MG	7,43 $\pm$ 0,00086 a	7,41 $\pm$ 0,00512 b
750 SNP + 3 MG	6,85 $\pm$ 0,00051 a	7,30 $\pm$ 0,00087 b

Diğer taraftan, SA ön muamelesine tabi tutulup daha sonra MG stresine maruz bırakılan bitkilerin köklerinde MDA içeriği bulguları Çizelge 4.32’de sunulmuştur. Tek başına SA uygulanmış tohumların köklerinde 0,1 ve 1 mM SA kontrole göre MDA içeriğini düşürmüştür ($P<0,05$). Ancak, 1 mM MG stresine maruz kalmış fide köklerinde 0,1 ve 1 mM SA uygulamaları MDA içeriğinde artışa neden olurken, aynı SA uygulamaları 3 mM MG uygulanmış köklerde MDA içeriğini kontrolüne göre düşürmüştür ($P<0,05$). Aynı fidelerin gövdelerinden elde edilen bulgular Çizelge 4.32’de sunulmuştur. Sadece SA ön muamelesine tabi tutulan fidelerin gövdelerinde 0,1 ve 1 mM SA MDA içeriğini kontrole göre düşürmüştür ($P<0,05$). SA+MG uygulamaları yapılmış fidelerin gövdelerinde ki bulgular kontrollerine göre kıyaslandığında, 0,1 mM SA+1 mM MG MDA içeriğini artırırken, 1 mM SA+1mM MG düşürmüştür. Ancak 0,1mM SA+3 mM MG ve 1 mM SA+3 mM MG uygulamaları MDA içeriğini düşürmüştür.

Çizelge 4.32. SA (mM) ön muamelesinden sonra MG (mM) stresine maruz bırakılan bitkilerin kök ve gövdelerinde MDA içeriği bulguları. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir ($P>0,05$)

Uygulamalar	Kök	Gövde
	nmol/g doku	nmol/g doku
Kontrol	3,47 $\pm$ 0,00083 d	4,41 $\pm$ 0,00038 c
0,1 SA	1,99 $\pm$ 0,00372 f	2,89 $\pm$ 0,00043 de
1 SA	2,18 $\pm$ 0,00025 e	2,01 $\pm$ 0,00310 e
1 MG	2,93 $\pm$ 0,00061 e	3,51 $\pm$ 0,00052 d
3 MG	6,12 $\pm$ 0,00031 b	7,52 $\pm$ 0,00067 b
0,1SA + 1 MG	4,88 $\pm$ 0,00030 c	8,63 $\pm$ 0,00537 a
1SA + 1 MG	8,12 $\pm$ 0,00089 a	3,00 $\pm$ 0,00522 d
0,1 SA + 3 MG	4,90 $\pm$ 0,00420 c	3,15 $\pm$ 0,00021 d
1 SA + 3 MG	4,20 $\pm$ 0,00058 cd	3,90 $\pm$ 0,00176 c

Çalışmamızda H_2S ön uygulamasından sonra, MG'nin farklı ortamlarında gelişen fidelerin köklerinde MDA içeriği bulguları Çizelge 4.33'te sunulmuştur. Tek başına H_2S uygulanmış fidelerin köklerinde 0,25 ve 0,50 mM H_2S MDA içeriğini kontrole göre düşürmüştür. Diğer taraftan, 0,25 mM H_2S +1 mM MG ve 0,50 mM H_2S +1 mM MG uygulamaları MDA içeriğini düşürürken, 0,25 ve 0,50 mM H_2S uygulamaları 3 mM MG koşullarında MDA içeriğini artırmıştır. Aynı bitkilerin gövdelerinde ise tek başına H_2S ön muameleleri MDA içeriğini düşürmüştür ($P<0,05$). H_2S +MG uygulamalarında 0,25 mM ve 0,50 mM H_2S uygulamaları 1 mM MG'ye maruz kalan fide gövdelerinde MDA içeriğini düşürmüştür. 3 mM MG'ye maruz kalan fidelerde ise 0,25 mM H_2S ve 0,50 mM H_2S uygulamaları MDA içeriğini düşürmüştür ($P<0,05$).

Çizelge 4.33. H₂S(mM NaHS olarak) ön muamelesinden sonra MG (mM) stresine maruz bırakılan bitkilerin kök ve gövdelerinde MDA içeriği bulguları. Aynı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemsizdir (P>0,05)

Uygulamalar Kök Gövde		
	nmol/g doku	nmol/g doku
Kontrol	3,47 ±0,00406 b	4,41 ±0,00024 c
0,25 H ₂ S	2,16 ±0,00022 d	2,57 ±0,00209 e
0,50 H ₂ S	1,54 ±0,00112 e	2,31 ±0,00022 e
1 MG	2,93 ±0,00070 bc	3,51 ±0,00242 d
3 MG	6,12 ±0,00024 a	7,52 ±0,00075 a
0,25 H ₂ S + 1 MG	1,99 ±0,00049 de	2,95 ±0,00047 de
0,50 H ₂ S + 1 MG	2,14 ±0,00013 d	3,36 ±0,00073 d
0,25 H ₂ S + 1 MG	2,85 ±0,00039 c	6,08 ±0,00062 b
0,50 H ₂ S + 1 MG	2,40 ±0,00062 c	4,80 ±0,00123 c

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bitki hücrelerinde metilglioksal (MG), özellikle stresli koşullar altında karbohidrat, protein ve lipid metabolizmasının bir yan ürünü olarak yüksek seviyede üretilir. Yüksek seviyelerde MG, hem bir mutajen hem de genotoksik bir ajandır (Yadav *et al.* 2008). Stres koşullarında glikoliz yolu ara ürünlerinin aşırı birikiminden dolayı yüksek hücresel konsantrasyonlara ulaşan MG'nin hücre yenilenmesini inhibe ettiği, proteinlerin degradasyonuna ve antioksidan sisteminin inaktivasyonuna yol açtığı tespit edilmiştir. Bunun yanında MG, DNA kırılmalarına ve nokta mutasyonlarına sebep olur. MG toksisitesi hayvansal organizmalarda yoğun çalışılmış olmasına karşın, bitkilerde içsel MG üretimi ve özellikle yüksek konsantrasyonda ekzojen MG'nin detoksifikasyonu, biyokimyasal ve fizyolojik etkileri konusunda yeterli araştırma bulunmamaktadır (Kaur *et al.* 2016; Hoque *et al.* 2016).

Bu çalışmada, bitki hücrelerinde MG detoksifikasyon sisteminin ekzojen SA, H₂S ve NO uygulamaları ile iyileştirilmesi amaçlanmış ve bunun için MG'nin bitkisel ve hayvansal organizmalardaki detoksifikasyon sistemi olan Glioksalaz Sistem'i üzerine odaklı bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Glioksalaz sistemi, MG'nin toksik seviyelerine karşı bitki hücrelerini Glioksalaz I (Gly I) ve Glioksalaz II (Gly II) enzimleri ile strese karşı koruduğundan bu iki enzimin aktivitelerinde yapılacak artış, MG'nin toksik etkisini ortadan kaldırmada büyük öneme sahiptir. MG'nin yanı sıra stres esnasında hücrelerde artan ROS bileşikleri hücre membranlarına saldırır ve fosfolipidlerin oksidasyonunu artırarak hücrelerde hasara sebep olurlar. Oksidasyon derecesi ölçülerek bitkinin stresten korunup korunamadığı hakkında fikir sahibi olunabilmektedir. Hücre membranlarında fosfolipidlerin oksidasyon ürünü malondialdehittir (MDA). Bu bileşiğin azalması stres etkisinin azaldığına işaret eder. Ayrıca stres etkisinin azaltılması için ROS bileşiklerinin katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon redüktaz (GR), guaikol peroksidaz (GPX) gibi antioksidan enzimlerce çok hızlı bir şekilde zararsız hale getirilmesi gerekir.

Yukarıda ifade edilen amaç doğrultusunda, çalışmamızda model bir organizma olarak mısır (*Zea mays*L., cv. Arifiye) bitkisi kullanılmıştır. MG toksisitesini yatıştırmak amacıyla kullanılan sinyal bileşiklerin konsantrasyonları, SNP (NO donörü) için 500 ve 750 μ M, SA için 0,1 ve 1 mM, NaHS (H_2S donörü) için 0,25 ve 0,50 mM olarak belirlenmiştir. Çalışmada çimlenen mısır tohumlarında MG toksisitesini sağlayacak konsantrasyonlar ise 1 ve 3 mM olarak belirlenmiştir. Bu konsantrasyonlar, literatür bilgilerine ve yapılan ön denemelere göre belirlenmiştir. Çalışmada tohumlar önce SNP, SA ve NaHS ile ön ıslatmaya tabi tutulmuş, sonra MG toksisitesine maruz bırakılmıştır. Araştırmadan elde edilen sonuçlar yorumlanırken, çalışılan bir parametre üzerinde sırayla tek başına MG uygulamasından; tek başına SNP, H_2S ve SA uygulamalarından ve son olarak SNP+MG, H_2S +MG ve SA+MG uygulamalarından elde edilen bulgular, literatür verileri ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiş ve sunulmuştur.

5.1. Bitki büyüme ve gelişmesi üzerinde yapılan çalışmaların değerlendirilmesi

Yüksek konsantrasyonlarda MG'nin bitki büyümesi ve gelişimini engellediği bilinmektedir (Paulus *et al.* 1993; Kaur *et al.* 2016). Çalışmamız bulgularına göre, 1 ve 3 mM MG konsantrasyonlarında çimlenen mısır tohumlarının çimlenme oranını önemli derecede inhibe edilmiştir (Şekil 4.1-6). Ancak MG stresinden önce tohumlara uygulanan NO (SNP olarak), H_2S (NaHS olarak) ve SA uygulamaları çimlenme oranını iyileştirmiş ve kontrole yakın seviyelere çıkarmıştır (Şekil 4.1-6). Diğer taraftan MG uygulamaları çimlenen mısır fidelerinde kök ve gövde uzunlukları üzerinde olumsuz etki yapmış ve bu organların gelişimini kontrole göre önemli seviyelerde düşürmüştür (Şekil 4.2-4-6). MG'nin konsantrasyon artışıyla bu olumsuz etkisinin artmasının yanında, MG inhibisyonu gövdeye kıyasla kök uzunluğu üzerinde daha yüksek olmuştur. SNP+MG uygulama grubunda ise SNP'nin özellikle 750 μ M'lık dozu fidelerin kök ve gövde uzunluğunda kontrolüne göre önemli iyileşmeler sağlamıştır. Benzer etki H_2S +MG uygulama grubunda da belirlenmiştir. Ancak SA+MG uygulamalarının hiçbirisi, kontrolüne göre, mısır fidelerinde kök ve gövde üzerinde anlamlı bir etki yapamamıştır. Elde edilen bulgular genel olarak değerlendirildiğinde, çalışılan 1 ve 3 mM MG ortamında çimlenen mısır tohumlarında, MG toksisitesinden

kaynaklı olarak hem çimlenme oranı azalmakta hem de çimlenen fidelerin kök ve gövde uzunlukları önemli seviyede düşmektedir. Buna karşılık NO, SA ve H₂S ile ön ıslatma yapılmış mısır tohumları aynı MG ortamında çimlendiklerinde; NO, SA ve H₂S uygulamalarının hepsi MG etkisiyle düşen çimlenme oranını iyileştirebilmişlerdir. Arabidopsis'te Hoque *et al.* (2012b) yaptıkları bir çalışmada, ABA eksik bir mutant (aba2-2) kullanılarak MG'nin tohum çimlenmesi, kök uzaması, kloroz ve strese duyarlı gen ekspresyonu üzerindeki etkisi incelenmiştir. Elde edilen sonuçlarda MG'nin çimlenme, kök uzamasını ve indüklenen klorozu inhibe ettiği belirtilmiştir. Bu sonuçlar, çalışmamızdaki bulguları desteklemektedir. MG'nin yüksek dozlarda tohum çimlenmesini ve fide büyümesini inhibe ettiğini gösteren bazı çalışmalar vardır. Çünkü MG yüksek konsantrasyonda sitotoksiktir ve bu seviyelerde hücre çoğalmasını inhibe eder ve Glikasyon Son Ürünlerinin (AGE'ler) artışı yoluyla proteinlerin bozunmasını ve antioksidan enzimlerin etkisizleşmesini artırır (Martins *et al.* 2001; Wang *et al.* 2003; Hoque *et al.* 2012a; Kaur *et al.* 2014a,b; Singh and Dhaka 2015; Hossain *et al.* 2016). Literatürde stres koşullarında NO, SA ve H₂S sinyal bileşiklerinin çevresel stres koşullarında koruyucu rolü ile ilgili birçok çalışma olmasına rağmen, bu sinyal bileşiklerin MG toksisitesindeki rolleri ile ilgili bilgi bulunmamaktadır. Bizim çalışmamız bu bileşiklerin çimlenen mısır tohumlarında MG toksisitesini düşürmede de etkili olduğunu göstermektedir.

5.2. Glioksalaz Sistemi enzimlerinden elde edilen bulguların değerlendirilmesi

Glioksalaz sistemi birçok hücrel fonksiyonlarda rol alır, ancak bu sistemin en önemli rolü bitkinin stres cevabında ve toleransında ortaya çıkar (Kaur *et al.* 2014a). Stres altındaki bitkilerde MG seviyelerini Glioksalaz sistemi düzenler ve GSH'nin yeniden üretilmesini sağlar. Oksidatif strese karşı korunmanın sağlanması için bitkide yüksek GSH içeriği ve yüksek GSH/GSSG oranının bulunması önemlidir (Yadav *et al.* 2005a,b; Noctor *et al.* 2012). Ayrıca GSH, bazı antioksidan enzimlerin (GlutatyonS-transferaz, Glutatyon peroksidaz ve APX gibi) çalışması içinde gereklidir (Yadav *et al.* 2008). Yapılan bazı araştırmalar, glioksalaz ve antioksidan sistemlerinin bitkilerde birbiriyle ilişkili olduğunu; bu da glioksalaz sisteminin ROS detoksifikasyonuna doğrudan etkisi

olduğunu göstermektedir (Yadav *et al.* 2005a; El-Shabrawi *et al.* 2010; Upadhyaya *et al.* 2011; Mostofa *et al.* 2014a, 2015a). Bitkilerde, yüksek sıcaklık, ağır metal, ozmotik stres, ABA ve SA dahil olmak üzere strese bağlı hormonlara maruz kalma gibi birçok farklı faktöre cevaben, bitkilerde glioksalaz enzim aktivitelerinde artışın olduğu gösterilmiştir (Hossain and Fujita 2009; Hossain *et al.* 2009).

Bu çalışmada, tek başına 1 mM MG, kontrole kıyasla, Gly I aktivitesini kök ve gövdede düşürürken, 3 mM MG her ikisinde artırmıştır (Çizelge 4.1-3). Kontrole kıyasla tek başına 0,25 ve 0,50 mM H₂S uygulamaları Gly I aktivitesini kökte artırırken, gövdede düşürmüştür (Çizelge 4.1). H₂S+MG uygulama grubunda, 0,25 ve 0,50 mM H₂S, 1 mM MG koşullarında aktiviteyi kök ve gövdede genelde artırmıştır. Ancak aynı konsantrasyonlar 3 mM MG koşullarında aktiviteyi düşürmüştür (Çizelge 4.1). SNP uygulamaları incelendiğinde, tek başına 500 ve 750 µM SNP, kontrole kıyasla, Gly I aktivitesini kökte artırırken, gövdede düşürmüştür (Çizelge 4.2). Buğday fidelerinde yapılan bir çalışmada NO donörü olarak 1 mM SNP'nin fidelede Gly I aktivitesini etkilemediği belirlenmiştir (Hasanuzzaman *et al.* 2011). Yine Çizelge 4.2'ye dikkat edilirse, SNP+MG uygulamalarında sadece 500 µM SNP, 1 ve 3 mM MG koşullarında Gly I aktivitesini kök ve gövdede artırmıştır (Çizelge 4.2). Ancak diğer SNP+MG uygulamalarının hepsi kök ve gövdede aktiviteyi düşürmüştür. SA uygulamaları incelendiğinde (Çizelge 4.3), kontrole kıyasla tek başına 0,1 ve 1 mM SA kökte aktiviteyi düşürürken, gövdede artırmıştır. SA+MG uygulamalarında ise 0,1 mM SA+1 mM MG koşulları kök ve gövdede aktiviteyi hafif artırsa da bu istatistik olarak anlamlı ($P>0,05$) olmamıştır. Ancak 0,1 mM SA+3 mM MG koşullarında aktivite artmıştır. Diğer SA+MG uygulamaları aktiviteyi düşürmüştür (Çizelge 4.3).

Burada sunulan bulgulara göre, çimlenen mısır tohumlarına ekzojen uygulanan 1 mM MG, mısır fidelerinde Gly I aktivitesini düşürmüştür. İlginç olarak 3 mM MG aktivitenin artmasına neden olmuştur. *Arabidopsis thaliana* ile yapılan bir çalışmada ekzojen 1 mM MG uygulamasının Gly I aktivitesini artırdığı belirlenmiştir (Hoque *et al.* 2017). Bu çalışmada kullanılan bitki farklı olsa da bizim sonuçlarımız da mısırdaki 3 mM MG'nin Gly I aktivitesini artırdığını göstermektedir. İlave olarak, çimlenen mısır

tohumlarında MG stresinden önce uygulanan H₂S, NO ve SA'nın daha çok düşük konsantrasyonları Gly I aktivitesini artırmıştır. Literatürde bu bileşiklerin Gly I aktivitesi üzerinde etkisini gösteren herhangi bir çalışma belirlenmediğinden dolayı burada sunulan bilgiler ileride yapılacak çalışmalar için önemlidir.

Glioksalaz sisteminin ikinci önemli enzimi Gly II aktivitesine ait bulgular incelendiğinde, 1 mM MG, Gly II aktivitesini kök ve gövdede düşürürken, 3 mM MG her ikisinde artırmıştır (Çizelge 4.4-6). Bu bulgu Gly I'den elde edilen bulguyla (Çizelge 4.1-3) örtüşmektedir. Yukarıda ifade edilen *Arabidopsis thaliana* ile yapılan çalışmada ekzojen 1 mM MG uygulamasının Gly I'e ilaveten Gly II aktivitesini de artırdığı belirlenmiştir (Hoque *et al.* 2017). Bu çalışmada kullanılan bitki farklı olsa da sonuçlarımız mısırdaki özellikle 3 mM MG'nin Gly II aktivitesini artırdığını göstermektedir. Kontrole kıyasla tek başına H₂S uygulamalarının her ikisi (0,25 ve 0,50 mM) kökte aktiviteyi artırırken, gövdede düşürmüştür (Çizelge 4.4). H₂S+MG uygulama grubunda ise 0,25 ve 0,50 mM H₂S, köklerde genel olarak 1 ve 3 mM MG koşullarında aktiviteyi artırmıştır. Ancak aynı uygulamalar, gövdede 3 mM MG'de aktiviteyi artırabilmiştir (Çizelge 4.4). Çalışmamızda tek başına 500 ve 750 µM SNP uygulamaları kökte ve gövdede Gly II aktivitesini artırmıştır (Çizelge 4.5). Buğday fidelerinde yapılan bir çalışmada NO donörü olarak 1 mM SNP'nin fidelede Gly II aktivitesini etkilemediği belirlenmiştir (Hasanuzzaman *et al.* 2011). Çalışmamızda SNP+MG uygulamalarında, sadece 500 µM SNP+1 mM MG uygulaması kök ve gövde de Gly II aktivitesini artırmıştır. Diğer SNP+MG uygulamaları aktiviteyi genelde düşürmüştür (Çizelge 4.5). SA uygulamasından elde edilen veriler incelendiğinde, kontrole kıyasla tek başına 0,1 ve 1 mM SA uygulamaları kökte ve gövdede Gly II aktivitesini düşürmüştür (Çizelge 4.6). SA+MG uygulamalarında, 0,1 ve 1 mM SA'nın her ikisi 1 mM MG koşullarında aktiviteyi gövdede artırırken, kökte genel olarak düşürmüştür, ancak aynı uygulamalar 3 mM MG koşullarında aktiviteyi hem kök ve hem de gövdede düşürmüştür (Çizelge 4.6). Bu sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde, çimlenen mısır tohumlarında MG stresi öncesi uygulanan H₂S, NO ve SA, daha çok düşük konsantrasyonlarda Gly II aktivitesini artırmıştır. Literatürde bu bileşiklerin Gly II

aktivitesi üzerinde etkisini gösteren herhangi bir çalışma belirlenmediğinden dolayı bu çalışma verileri ileride yapılacak çalışmalar için önemli olacaktır.

Bu çalışmada, mısır fidelerinde içsel MG miktarı da değerlendirilmiştir. Normal koşullarda, bitki metabolizmasında MG düşük miktarda (5-75 μ M) bulunur (Yadav *et al.* 2005a; Hossain *et al.* 2009), fakat herhangi bir stres durumunda bitkide içsel MG miktarı artış gösterir (Yadav *et al.* 2005a; Hossain *et al.* 2009; Mostofa *et al.* 2015a,b). Mevcut çalışmanın kontrol bitkilerinde içsel MG miktarı, kök ve gövde kendi arasında kıyaslanırsa, gövdede köke göre daha yüksek olmuştur (Çizelge 4.7-9). Tek başına ekzojen MG uygulamaları (1 ve 3 mM), çimlenen mısır fidelerinin kök ve gövdelerinde içsel MG miktarını kontrole göre önemli ölçüde ($P<0,05$) artırmıştır (Çizelge 4.7-9). Bu bulgular, MG uygulamasının çimlenen mısır tohumlarının kök ve gövdelerinde içsel MG birikimini artırdığını göstermektedir. Bu bulgu literatür verilerine uygundur (Hoque *et al.* 2017; Li *et al.* 2017). Diğer taraftan, çimlenen mısır tohumlarına MG (1 ve 3 mM) stresi öncesi uygulanan H_2S , NO ve SA ön muamelelerinin içsel MG miktarı üzerindeki etkileri aşağıda sunulmuştur.

Tek başına SA ve SNP uygulamaları genel olarak içsel MG içeriğini kök ve gövdede hafif artırırken, tek başına H_2S uygulamaları düşürmüştür (Çizelge 4.7-9). İçsel MG seviyesini düşürmede en iyi etkiyi 0,50 mM H_2S ortaya koymuştur. Bu konuda literatürde sadece ekzojen SNP'nin içsel MG içeriğine etkisini gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin buğday yaprakları ile yapılan bir çalışmada tek başına 500 μ M SNP uygulamasının içsel MG içeriğini hafif düşürdüğü belirlenmiştir (Hasanuzzaman *et al.* 2018a). Ancak aynı araştırmacılar, *Brassica napus*'ta SNP'nin içsel MG üzerinde anlamlı bir etki yapmadığını ifade etmişlerdir (Hasanuzzaman *et al.* 2018b). Bu sonuçlar NO'un (SNP olarak) içsel MG üzerinde farklı bitkilerde farklı tepkilere neden olabileceğini göstermektedir. Çalışmamızın SA+MG uygulamalarında, tek başına MG kontrolüne göre, içsel MG seviyesinde anlamlı ve belirgin bir sonuç elde edilememiştir (Çizelge 4.7). Ancak H_2S +MG ve SNP+MG uygulamalarının hemen hepsi kontrollerine göre genelde içsel MG seviyesini düşürmüştür (Çizelge 4.8-9). Bu bulgular literatür için yeni olup farklı bitkilerde de test edilmeye ihtiyaç duyulmaktadır.

5.3. Antioksidan Sistemi enzimlerinden elde edilen bulguların değerlendirilmesi

Süperoksid dismutaz (SOD) enzimi ROS'lara karşı ilk savunma hattını sağlar ve $O_2^{\cdot-}$ oluşumunu düşürür (Mittler 2002). Bu nedenle antioksidan savunma sisteminde önemli bir enzimdir (Esim *et al.* 2013; Esim and Atıcı 2016). Bu çalışmada tek başına uygulanan MG'nin SOD aktivitesi üzerindeki etkisi değerlendirildiğinde, 1 mM MG aktiviteyi kökte düşürmüş gövdede ise artırmış, diğer uygulama olan 3 mM MG'de ise hem kök hem de gövde de artırmıştır (Çizelge 4.12). Çimlenen mısır fideleriyle yapılan bir çalışmada, düşük konsantrasyonlarda (50 ve 150 μ M) MG uygulamasının SOD aktivitesini genelde değiştirmedeği belirlenmiştir (Wang *et al.* 2019). Çalışmamızda MG konsantrasyonunun bu çalışmaya göre daha yüksek olması bulgular arasındaki farklılığın sebebi olabilir. SNP uygulama grubunda, tek başına SNP uygulamaları kontrole kıyasla SOD aktivitesini kök ve gövdede artırmıştır (Çizelge 4.12). SNP+MG grubunda, 500 ve 750 μ M SNP uygulaması 1 mM MG etkisine maruz bırakılan bitkilerde, kök ve gövdede, SOD aktivitesini genelde artırmıştır (Çizelge 4.12). Ancak aynı uygulamalar 3 mM MG stresine maruz bırakılan bitkilerde, kök ve gövdede düşürmüştür (Çizelge 4.12). SA uygulamasına ait veriler incelendiğinde, kontrole kıyasla tek başına SA uygulamaları (0,1 ve 1 mM), kök ve gövdede SOD aktivitesini genelde düşürmüştür (Çizelge 4.10). Ancak, 0,1 ve 1 mM SA uygulamaları, 1 mM MG koşullarında kök ve gövdede SOD aktivitesini genelde artırırken, aynı SA uygulamaları 3 mM MG koşulunda, aktiviteyi düşürmüştür (Çizelge 4.10). SOD aktivitesini artırmada 1 mM SA daha etkili olmuştur. H_2S uygulamasından elde edilen veriler incelendiğinde, tek başına 0,25 ve 0,50 mM H_2S , köklerde SOD aktivitesini artırmış, ancak gövdede genelde düşürmüştür (Çizelge 4.11). H_2S +MG uygulama grubunda ise 0,25 ve 0,50 mM H_2S uygulamaları 1 ve 3 mM MG stresindeki bitkilerde köklerde SOD aktivitesini genel artırmıştır, ancak gövdede anlamlı bir durum sergilememiştir (Çizelge 4.11). SOD aktivitesi verileri genel olarak değerlendirildiğinde, tek başına 1 mM MG aktiviteyi düşürürken, 3 mM MG artırmıştır. İlave olarak, 1 mM MG stresinin etkisiyle düşen SOD aktivitesi; 1 mM SA, 500 μ M SNP ve 0,25 mM H_2S ile artırılmıştır. Diğer taraftan, 3 mM MG etkisiyle artan SOD aktivitesi, 750 μ M SNP, 0,50 H_2S ve 1 mM SA ile düşürülmüştür.

Katalaz (CAT), bitki hücrelerinde özellikle kloroplast, glioksizom ve peroksizom gibi organellerde lokalize olan ve spesifik olarak H_2O_2 'yi süpürmede çok büyük rol alan güçlü bir antioksidan enzimdir. Stres koşullarında CAT seviyesinin düzenlenmesi oldukça önemlidir (Purev *et al.* 2010; Esim and Atıcı 2014 ve 2016). Çalışmamızda tek başına uygulanan 1 mM MG, kontrole kıyasla CAT aktivitesini kök ve gövdede genelde düşürmüştür, aksine 3 mM MG artırmıştır (Çizelge 4.13-15). Tek başına SA uygulamaları kontrole kıyasla, CAT aktivitesini hem kök hem de gövde de artırmıştır (Çizelge 4.13). SA+MG uygulamalarında; 0,1 ve 1 mM SA, 1 mM MG koşullarında CAT aktivitesini kök ve gövdede genelde artırmıştır, benzer sonuç olarak 3 mM MG koşullarında da aktiviteyi artırmışlardır (Çizelge 4.13). SNP uygulamasına ait bulgular değerlendirildiğinde, tek başına SNP uygulamaları kontrole kıyasla, CAT aktivitesini köklerde artırmış, ancak gövdede düşürmüştür (Çizelge 4.14). SNP+MG uygulamalarında da (SA+MG'ye benzer olarak) 500 ve 750 μ M SNP, 1 mM MG koşullarında CAT aktivitesini kökte artırırken gövde de düşürmüştür, ancak aynı uygulamalar 3 mM MG koşullarında aktiviteyi düşürmüştür (Çizelge 4.14). H_2S uygulamasına ait bulgular değerlendirildiğinde, tek başına H_2S uygulamaları CAT aktivitesini kökte artırırken, gövdelerde düşürmüştür (Çizelge 4.15). H_2S +MG koşullarında ise 0,25 ve 0,50 mM H_2S uygulamaları 1 mM MG koşulunda aktiviteyi kök ve gövdede artırmıştır. Ancak aynı uygulamalar, 3 mM MG koşulunda kökte düşürmüştür gövde de ise artırmıştır (Çizelge 4.15). CAT aktivitesi verileri genel olarak değerlendirildiğinde, tek başına 1 mM MG kök ve gövdede aktiviteyi düşürürken, 3 mM MG artırmıştır. SA, SNP ve H_2S uygulamaları, kontrollerine kıyasla, 1 mM MG stresi altındaki bitkilerin kök ve gövdelerinde CAT aktivitesini artırmıştır. Buna karşılık her üç bileşik, 3 mM MG stresi altındaki bitkilerin köklerinde aktiviteyi düşürürken, gövdelerinde aktiviteyi artırmıştır. Wang *et al.* (2019) yaptıkları çalışmada MG ile muamele edilmiş çimlenen mısır fidelerinde CAT aktivitesinin arttığını belirlemişlerdir. Ancak, literatürde MG toksisitesini yatıştırmada SNP, SA ve H_2S etkilerini araştıran bir çalışma olmadığından verilerimiz literatür için yeni bilgi olarak değerlendirilmiştir.

Askorbat peroksidaz (APX) indirgeyici olarak iki molekül askorbatı kullanarak H_2O_2 'yi detoksifiye eden bir enzimdir. Hücre içerisinde kloroplast stromasında, tilakoit zarda,

sitozolde, glioksizom zarında ve mitokondride bulunur (Apel and Hirt 2004). Bu çalışmada, tek başına uygulanan 1 mM MG, kontrole kıyasla APX aktivitesini kök ve gövdede genelde düşürmüştür, aksine 3 mM MG aynı dokularda artırmıştır (Çizelge 4.16-18). H₂S uygulaması verileri incelendiğinde, tek başına H₂S uygulamaları, APX aktivitesini köklerde artırmış, gövdelerde ise düşürmüştür (Çizelge 4.16). H₂S+MG uygulamasında ise 0,25 ve 0,50 mM H₂S, genel olarak 1 ve 3 mM MG koşullarında kök ve gövdede aktiviteyi artırdığı söylenebilir (Çizelge 4.16). SNP uygulaması verileri incelendiğinde, tek başına SNP uygulamaları, APX aktivitesini köklerde artırmış, gövdelerde ise düşürmüştür (Çizelge 4.16). SNP+MG uygulamalarında ise 500 ve 750 µM SNP, 1 mM MG koşullarında kök ve gövdede aktiviteyi genelde artırırken, 3 mM MG koşullarında kökte artırmış ancak gövdede düşürmüştür (Çizelge 4.16). SA uygulaması verileri incelendiğinde, tek başına özellikle 1 mM SA, APX aktivitesini kök ve gövdelerde artırmış (Çizelge 4.18). SA+MG uygulamalarında ise özellikle 1 mM SA+1 mM MG koşullarında aktivite kök ve gövdede artmıştır. Benzer sonuç olarak, 3 mM MG toksisitesi altındaki fidelerde 0,1 ve 1 mM SA aktiviteyi kök ve gövdede artırmış (Çizelge 4.18). APX aktivitesine ait bulgular genel olarak değerlendirildiğinde, aktivite 1 mM MG ile düşerken, 3 mM MG ile artmaktadır. SNP, SA ve H₂S uygulamaları, genelde 1 mM MG ortamında düşen aktiviteyi artırırken, 3 mM MG koşullarında ise artan aktiviteyi de artırmıştır. Literatürde bulunan tek bir çalışmada MG ile muamele edilmiş çimlenen mısır fidelerinde APX aktivitesinin arttığı belirlenmiştir (Wang *et al.* 2019). Ancak, literatürde MG toksisitesini yatıştırmada APX aktivitesi üzerinde SNP, SA ve H₂S etkilerini araştıran bir çalışma belirlenememiştir.

Glutasyon redüktaz (GR), yükseltgen glutasyonun (GSSG) indirgen glutatyon (GSH) dönüşümünü katalize eden önemli bir antioksidan enzimdir. GR ayrıca, hücrelerin GSH seviyelerini koruyan glutasyon redoks döngüsü için anahtar bir görev üstlenir. GSH, oksidatif strese cevapta önemli olup serbest radikallerle ve organik peroksitlerle reaksiyona giren bir antioksidan, amino asit taşınımında ve organik peroksitlerin ile xenobiyotiklerin detoksifikasyonunda glutasyon S-transferazlar için bir substrat olarak görev yapar. Bu nedenle stres altındaki bitkide GR aktivitesinin metabolik önemi çok yüksektir (Apel and Hirt 2004). Bu çalışmada, tek başına 1 mM MG, kontrole kıyasla

GR aktivitesini kök ve gövdede düşürmüştür, aksine 3 mM MG aynı dokularda artırmıştır (Çizelge 4.19-21). H₂S uygulaması incelendiğinde, tek başına H₂S muameleleri, GR aktivitesini kök ve gövdelerde genelde düşürmüştür (Çizelge 4.19). H₂S+MG grubunda ise 0,25 ve 0,50 mM H₂S uygulamaları, 1 mM MG toksisitesi koşullarında aktiviteyi özellikle köklerde artırmıştır. Aynı H₂S uygulamaları aktiviteyi 3 mM MG koşullarında genelde kökte düşürürken, gövdede artırmıştır (Çizelge 4.19). SA uygulaması verileri değerlendirildiğinde, tek başına SA'nın her iki konsantrasyonu GR aktivitesini kontrole göre artırmıştır (Çizelge 4.20). SA+MG uygulama grubunda, 0,1 ve 1 mM SA uygulamaları, kontrollerine göre, 1 mM MG'de artırırken, 3 mM MG koşullarında GR aktivitesini düşürmüştür. Aktivitenin düşürülmesinde 1 mM SA daha etkili olmuştur (Çizelge 4.20). SNP uygulaması grubunda ise tek başına SNP muameleleri, kontrole kıyasla, GR aktivitesini köklerde artırmış, ancak gövdede anlamlı ($P>0,05$) bir etki yapamamıştır (Çizelge 4.21). SNP+MG koşullarında, 1 mM MG stresi altındaki bitkilerde SNP (500 ve 750 μ M) uygulamaları, kök ve gövdede GR aktivitesini genelde artırmıştır. Ancak 3 mM MG stresi altındaki bitkilerde ise aynı SNP dozları kök ve gövdede GR aktivitesini artırmıştır (Çizelge 4.21).

Peroksidazlar, bitki hücre ve dokularında hemen her yerde bulunan geniş bir enzim ailesine aittir. Guaikol peroksidaz (GPX) dahil peroksidazlar, H₂O₂'yi kullanarak fenoller ve hidrokinonlar gibi çok sayıda aromatik bileşiklerin dehidrojenasyonunu katalizleyen ve *HEM* prostetik grubu içeren güçlü antioksidatif enzimlerdir. Kuraklık, tuzluluk, düşük sıcaklık, patojen ve parazit enfeksiyonu, ağır metal gibi farklı stres faktörlerinden çok yüksek derecede etkilenmelerinden dolayı, peroksidazların stres enzimleri olarak anılmasına sebep olmuştur (Apel and Hirt 2004). Bu çalışmada tek başına uygulanan 1 mM MG, kontrole kıyasla GPX aktivitesini kök ve gövdede düşürürken, 3 mM MG uygulaması artırmıştır (Çizelge 4.22). Tek başına SNP uygulamaları ise GPX aktivitesini kök ve gövdede artırmıştır (Çizelge 4.22). SNP+MG grubunda, SNP uygulamaları, 1 mM MG koşullarında aktivite üzerinde belirgin bir artış sağlarken, 3 mM MG koşullarındaki bitkilerin kök ve gövdelerinde GPX aktivitesini de genel olarak artırmıştır (Çizelge 4.22). H₂S uygulama grubunda, kontrole kıyasla tek başına H₂S uygulamaları GPX aktivitesini kökte ve gövdede artırmıştır (Çizelge 4.23).

H₂S+MG grubunda, 1 mM MG etkisi altındaki bitkilerde 0,25 ve 0,50 mM H₂S kök ve gövdede aktiviteyi artırmıştır (Çizelge 4.23). Aynı H₂S konsantrasyonları 3 mM MG koşullarında aktiviteyi genelde artırmıştır. SA uygulama grubunda ise 0,1 ve 1 mM SA uygulamaları GPX aktivitesini kök ve gövdede genel laraka artırmıştır (Çizelge 4.24). SA+MG grubunda, SA uygulamalarının her ikisi 1 mM MG stresi altındaki bitkilerin kök ve gövdelerinde aktiviteyi genelde artırırken, 3 mM MG stresindeki bitkilerde kökte artırırken gövde de düşürmüştür (Çizelge 4.24).

5.4. H₂O₂, O₂^{•-} ve lipid peroksidasyonu bulgularının değerlendirilmesi

Bitki hücreleri oksijenin yüksek enerji potansiyelinin kullanıldığı metabolik yollarda (solunum ve fotosentez gibi) üretilen ve reaktif oksijen türleri (ROS) olarak bilinen moleküllerin yıkıcı etkileriyle sürekli yüzleşmektedirler. Bitkilerde, abiyotik stres koşullarında ROS (H₂O₂ ve O₂^{•-} gibi) üretimi artar ve oksidatif stresin başlamasına neden olur (Kaur *et al.* 2014 ve 2016; Wang *et al.* 2019).

Bu çalışmada, tek başına uygulanan 1 ve 3 mM MG, kontrole kıyasla, H₂O₂ içeriğinin kök ve gövdede artırmıştır. Bazı çalışmalar, strese bağlı olarak artan veya ekzojen uygulanan MG'nin, ROS seviyesini artırdığını bildirmişlerdir (Kaur *et al.* 2014 ve 2016; Wang *et al.* 2019). H₂S uygulama grubunda, tek başına 0,25 ve 0,50 mM H₂S, özellikle gövdede H₂O₂ içeriğini düşürmüştür (Çizelge 4.25). H₂S+MG grubunda ise her iki H₂S uygulaması 1 ve 3 mM MG koşullarında H₂O₂ içeriğini kontrolüne göre düşürmüştür (Çizelge 4.26). SNP uygulama grubunda, tek başına 500 ve 750 µM SNP, H₂O₂ içeriğini kökte artırırken, gövdede düşürmüştür (Çizelge 4.26). SNP+MG grubunda, SNP uygulamalarının her ikisi, 1 mM MG koşullarında H₂O₂ içeriği üzerinde anlamlı (P>0,05) bir etki göstermezken, aynı uygulamalar 3 mM MG koşullarında bitki kök ve gövdelerinde H₂O₂ içeriğini düşürmüştür (Çizelge 4.26). SA uygulama grubunda, tek başına 0,1 mM SA H₂O₂ içeriğini sadece kökte düşürürken, 1 mM SA her iki dokuda düşürmüştür (Çizelge 4.27). SA+MG koşullarında, SA uygulamalarının her ikisi, 1 mM MG koşullarında H₂O₂ içeriğini artırmıştır, ancak aynı uygulamalar 3 mM MG koşullarında bitki kök ve gövdelerinde H₂O₂ içeriğini düşürmüştür (Çizelge 4.27).

Bu çalışmada, bitki hücrelerinde diğer bir ROS bileşiği olan O_2^- anyonu içeriği de değerlendirilmiştir. Tek başına uygulanan 1 ve 3 mM MG, kontrole kıyasla, O_2^- anyonu içeriğini kök ve gövdede artırmıştır (Çizelge 4.28-30). Ancak H_2S uygulamaları incelendiğinde, her iki H_2S konsantrasyonu istatistik olarak çok anlamlı ($P>0,05$) olmasa da kök ve gövdede düşürmüştür (Çizelge 4.28). H_2S+MG grubu incelendiğinde, 0,25 ve 0,50 mM H_2S uygulamaları O_2^- anyonu içeriğini 1 mM MG koşullarında düşürebilmiştir. Ancak aynı uygulamalar 3 mM MG koşullarında O_2^- anyonu içeriğini artırmıştır (Çizelge 4.28). SA uygulama verileri incelendiğinde, tek başına 0,1 ve 1 mM SA uygulamaları, O_2^- anyonu içeriğini kök ve gövdede hafif derece düşürmüştür. SA+MG uygulamalarında, 0,1 mM SA, 1 ve 3 mM MG koşullarında O_2^- anyonu içeriğini kök ve gövdede düşürürken, 1 mM SA aynı koşullarda artırmıştır. Bu bulgu, O_2^- anyonu içeriğini düşürmede 0,1 mM SA'nın daha etkin olduğunu göstermektedir (Çizelge 4.29). SNP grubuna ait veriler değerlendirildiğinde, tek başına 500 ve 750 μM SNP uygulamaları, özellikle köklerde O_2^- anyonu içeriğini düşürmüştür (Çizelge 4.30). SNP+MG koşullarında, 500 ve 750 μM SNP uygulamaları, sadece 1 mM MG etkisi altındaki bitkilerin köklerinde O_2^- anyonu içeriğini düşürmüştür. Aynı uygulamalar 3 mM MG etkisindeki bitkilerde artırmıştır (Çizelge 4.30).

ROS içeriği bulguları genel olarak değerlendirildiğinde, çimlenen mısır tohumlarında eksojen MG uygulaması, her iki (H_2O_2 ve O_2^-) ROS bileşiğinin içeriğini artırmıştır. Ancak tek başına NO, SA ve H_2S uygulamaları ROS içeriğini düşürmüştür. Buna ilave olarak MG toksisitesinden önce aynı tohumlara uygulanan NO, SA ve H_2S uygulamaları genel olarak ROS içeriğini düşürmüştür. Bu bileşiklerin ROS içeriğini düşürmede konsantrasyon farklılıkları olmuştur.

Lipid peroksidasyonu (LPO) doymamış (poliansature) yağ asitlerinin oksidatif yıkımı olarak bilinir. Hücre mebranlarındaki yağ asitleri ve kolesterolün doymamış bağları, ROS'larla hızlıca reaksiyon vererek lipid peroksidasyon ürünlerinin oluşmasına neden olur. Bu olay sonucunda membran geçirgenliği ve özellikleri bozulur ve membranlarda elektrolit sızıntısı artar. LPO seviyesi değerlendirilerek, hücresel düzeyde stresin sebep olduğu hasarın derecesi hakkında bilgi sağlanmaktadır. Oksidatif stres koşullarında,

doymamış yağ asitlerinin bozulmasıyla son ürün olarak çok sayıda aldehit bileşikleri oluşur. Bunlar içerisinde en yaygını malondialdehittir (MDA). MDA içeriğindeki artış LPO miktarını göstermekten ziyade, onun derecesi hakkında bir bilgi verir. Dolayısıyla MDA içeriğindeki artış, hücrel membranların yapısal bütünlüğünün bozulduğunun ve LPO seviyesinin önemli bir indikatörüdür (Noctor and Foyer 1998; Apel and Hirt 2004; Esim and Atıcı 2016).

Bu çalışmada da tek başına uygulanan 1 mM MG, kontrole kıyasla, MDA içeriğini kök ve gövdede düşürürken, 3 mM MG'de her iki dokuda da artırmıştır (Çizelge 4.31-33). Son yıllarda yapılan çalışmalarda MG'nin konsantrasyona bağlı olarak farklı cevaplara neden olduğu belirlenmiştir. Örneğin buğday fideleriyle yapılan bir çalışmada yüksek dozda (3- 7 mM) MG uygulamasının MDA içeriğini artırdığı (Li *et al.* 2017), ancak çimlenen mısır tohumlarıyla yapılan bir çalışmada ise düşük dozda (15-150 μ M) MG uygulamasının MDA içeriğini düşürdüğü belirlenmiştir (Wang *et al.* 2019). Bizim çalışmamızda özellikle 3 mM MG uygulamasında MDA içeriğinin artması bu verilere göre uygunluk göstermektedir. SNP uygulama grubu verileri incelendiğinde, tek başına 500 ve 750 μ M SNP uygulamaları kontrole kıyasla MDA içeriği üzerinde anlamlı ($P>0,05$) etki yapmamıştır (Çizelge 4.31). SNP+MG grubu uygulamalarında da MDA içeriği kontrollerine göre istatistik anlamda ($P>0,05$) değişmemiştir (Çizelge 4.31). SA uygulama grubunda, tek başına SA uygulamaları kontrole göre MDA içeriğini önemli oranda düşürmüştür (Çizelge 4.32). SA+MG grubunda 0,1 ve 1 mM SA uygulamaları 1 mM MG koşullarında MDA içeriğini artırırken, aynı SA uygulamaları 3 mM MG koşullarında MDA içeriğini kontrolüne göre düşürmüştür. H₂S uygulama grubunda, tek başına H₂S uygulaması kontrole göre MDA içeriğini düşürmüştür (Çizelge 4.33). H₂S+MG grubunda, her iki H₂S uygulamaları, MDA içeriğini hem 1 hem de 3 mM MG koşullarında kök ve gövdede MDA içeriğini kontrollerine göre düşürmüştür (Çizelge 4.33).

MDA bulguları genel olarak değerlendirildiğinde, tek başına MG uygulamaları çimlenen mısır tohumlarının kök ve gövdelerinde LPO seviyesini (MDA olarak) artırmıştır. Ancak MG toksisitesinden önce aynı tohumlara uygulanan özellikle SA ve

H₂S uygulamaları genel olarak MDA içeriğini düşürmüştür. Bu bileşiklerin MDA içeriğini düşürmede konsantrasyon farklılıkları olmuştur.

5.5. Sonuç

1. Çalışmamızda özellikle 3 mM metilglioksalın (MG), çimlenen mısır (*Zea mays*L., cv. Arifiye) tohumlarında büyüme ve gelişme parametrelerini (çimlenme oranını, fide uzunluğu, ROS içeriği ve lipid peroksidasyonu) daha çok olumsuz etkileyerek strese neden olduğu belirlenmiştir. Ancak antioksidatif sisteminin (SOD, CAT, GPX, APX ve GR aktivitelerini) aktivitesini artırarak stres hasarının hafifletilmesi sağlanmıştır. Buna karşılık tohumlara MG stresinden önce uygulanan NO (SNP olarak), SA ve H₂S (NaHS olarak) uygulamaları, MG toksisitesi altındaki tohumlarda bu parametreler iyileştirebilmiştir. Bileşiklerin bu olumlu etkilerinde konsantrasyon farklılığı olmuştur.
2. MG stresi, çimlenen mısır tohumlarında MG'yi detoksifiye eden Gly I ve Gly II enzimlerini etkileyerek aktivitelerini artırmıştır. Tohumlara MG stresinden önce uygulanan H₂S, NO ve SA, daha çok düşük konsantrasyonları Gly I ve Gly II aktivitelerini artırarak MG toksisitesinin yatıştırılmasına önemli katkı yapmıştır. Bileşiklerin bu olumlu etkilerinde konsantrasyon farklılığı olduğu görülmüştür.
3. MG uygulamaları çimlenen tohumda içsel MG miktarını önemli ölçüde artırmıştır. Ancak özellikle H₂S+MG ve NO+MG uygulamalarının hemen hepsi genelde içsel MG seviyesini düşürmüştür.
4. MG toksitesini yatıştırmada kullanılan NO, SA ve H₂S bileşiklerinin iyileştirici etkileri kök ve gövde üzerinde bazen farklı olsa da etkide kesin bir kök-gövde ayrımı görülememiştir.
5. Kullanılan NO, SA ve H₂S bileşikleri içerisinde MG toksitesini yatıştırmada genel olarak değerlendirildiğinde H₂S daha etkili olmuştur.
6. Mısır bitkisi MG stresine maruz kaldığında SNP, SA ve H₂S uygulamaları, büyümeyi iyileştirici bir madde olarak bitkide çalışılan fizyolojik ve biyokimyasal parametreler ile bitki toleransının artırılmasına önemli bir katkı yaptığı belirlenmiştir.

7. Bu amaç için kullanılan NO, SA ve H₂S düşük konsantrasyonlarda toksik olmaması, biyo-uyumluluğu ve antioksidan özelliklerinden dolayı řu ana kadar strese karşı uygulanan zararlı kimyasallar yerine kullanılması uygun olabilir.



KAYNAKÇA

- Abdel-Gaber, A. M., Abd-El-Nabey, B. A., Sidahmed, I. M., El-Zayady, A. M., Saadawy, M., (2006). Inhibitive action of some plant extracts on the corrosion of steel in acidic media. *Corrosion science*, 48(9), 2765-2779.
- Afrika Biyoteknoloji Dergisi Vol. 9 (44).., (2017) sayfa 7470-7476
- Ahuja, I., de Vos, R. C., Bones, A. M., Hall, R. D. (2010). Plant molecular stress responses face climate change. *Trends in plant science*, 15(12), 664-674.
- Ananieva, E. A., Alexieva, V. S., Popova, L. P., (2002). Treatment with salicylic acid decreases the effects of paraquat on photosynthesis. *Journal of Plant Physiology*, 159(7), 685-693.
- Ananieva, E. A., Christov, K. N., Popova, L. P., (2004). Exogenous treatment with salicylic acid leads to increased antioxidant capacity in leaves of barley plants exposed to paraquat. *Journal of Plant Physiology*, 161(3), 319-328.
- Apel, K., Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55, 373-399.
- Aravind, P., Prasad, M. N. V., (2005). Modulation of cadmium-induced oxidative stress in *Ceratophyllum demersum* by zinc involves ascorbate–glutathione cycle and glutathione metabolism. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43(2), 107-116.
- Asada, K., 2006. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiol* 141:391–396
- Banu, M. N. A., Hoque, M. A., Watanabe-Sugimoto, M., Islam, M. M., Uraji, M., Matsuoka, K., Murata, Y., (2010). Proline and glycinebetaine ameliorated NaCl stress via scavenging of hydrogen peroxide and methylglyoxal but not superoxide or nitric oxide in tobacco cultured cells. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 1010012170-1010012170.
- Barroso, J.B., Corpas, F.J., Carreras, A., Sandalio, L.M., Valderrama, R., Palma J.M., Lupianez, J.A. ve del RIO, L.A., (1999), Localization of Nitric Oxide Synthase in Plant Peroxisomes, *Journal of Biological Chemistry*, 274, 36729-36733.
- Beligni, M.V., and Lamattina, L., 2001. Nitric oxide in plants: the history is just beginning. *Plant, Cell and Environment.*, (24), 259-264. *Plant, Cell and Environment*, 24, 267-278.
- Bhomkar, P., Upadhyay, C. P., Saxena, M., Muthusamy, A., Prakash, N. S., Pooggin, M., Sarin, N. B., (2008). Salt stress alleviation in transgenic *Vigna mungo* L. Hepper (blackgram) by overexpression of the glyoxalase I gene using a novel *Cestrum* yellow leaf curling virus (CmYLCV) promoter. *Molecular breeding*, 22(2), 169-181.
- Blokhina, O., Fagerstedt, K. V., (2006). Oxidative stress and antioxidant defenses in plants. *Oxidative stress, disease and cancer*, 151-199.
- Cadenas, E., 1989. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu. Rev. Biochem.* 58, 79.
- Calderwood, A., Kopriva, S., (2014). Hydrogen sulfide in plants: from dissipation of excess sulfur to signaling molecule. *Nitric Oxide*, 41, 72-78.
- Carrington, S. J. (1986). The glyoxalase enigma. The biological consequences of a ubiquitous enzyme. *IRCS Med Sci*, 14, 763-768.

- Chakravarti, T., Sopory, S. K., (1990). Light Stimulated Cell Proliferation and Glyoxalase Activity in Callus Cultures of *Amaranthus Paniculatus*. In *Progress in Plant Cellular and Molecular Biology* (pp. 379-384). Springer, Dordrecht.
- Chaplen, F. W. (1998). Incidence and potential implications of the toxic metabolite methylglyoxal in cell culture: A review. *Cytotechnology*, 26(3), 173-183.
- Chen, B., Jahn, B. M., Zhai, M., (2003). Sr–Nd isotopic characteristics of the Mesozoic magmatism in the Taihang–Yanshan orogen, North China craton, and implications for Archaean lithosphere thinning. *Journal of the Geological Society*, 160(6), 963-970.
- Chen, H., Xue, L., Chintamanani, S., Germain, H., Lin, H., Cui, H., Guo, H., (2009). ETHYLENE INSENSITIVE3 and ETHYLENE INSENSITIVE3-LIKE1 repress SALICYLIC ACID INDUCTION DEFICIENT2 expression to negatively regulate plant innate immunity in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 21(8), 2527-2540.
- Chen, Z. Y., Brown, R. L., Damann, K. E., Cleveland, T. E., (2004). Identification of a maize kernel stress-related protein and its effect on aflatoxin accumulation. *Phytopathology*, 94(9), 938-945.
- Choudhary, D., Chandra, D., Kale, R. K., (1997). Influence of methylglyoxal on antioxidant enzymes and oxidative damage. *Toxicology letters*, 93(2-3), 141-152.
- Coleman, J. O. D., Randall, R., Blake-Kalff, M. M. A., (1997). Detoxification of xenobiotics in plant cells by glutathione conjugation and vacuolar compartmentalization: a fluorescent assay using monochlorobimane. *Plant, Cell & Environment*, 20(4), 449-460.
- Corpas, F.J., Barroso, J.B., Carreras, A., Quiro's, M., Leo'n, A.M., Romero-Puertas, M.C., Esteban, F.J., Valderrama, R., Palma, J.M., Sandalio, L.M., (2004). Cellular and subcellular localization of endogenous nitric oxide in young and senescent pea plants. *Plant Physiol*, 136, 2722–2733.
- D. K., Bhomkar, P., Prakash, N. S., Bhalla-Sarin, N., (2002). Improved method of regeneration of black Das gram (*Vigna mungo* L.) through liquid culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 38(5), 456-459
- Desikan, R., Hancock, J.T., Bright, J., Harrison, J., Weir, I., Hooley, R., Neill, S.J., (2005). A role for ETR1 in hydrogen peroxide signaling in stomatal guard cells. *Plant Physiol.*, 137, 831–83.
- Devanathan, S., Erban, A., Perez-Torres Jr, R., Kopka, J., Makaroff, C. A., (2014). *Arabidopsis thaliana* glyoxalase 2-1 is required during abiotic stress but is not essential under normal plant growth. *PLoS One*, 9(4), e95971.
- Dixit, P., Mukherjee, P. K., Ramachandran, V., Eapen, S., (2011). Glutathione transferase from *Trichoderma virens* enhances cadmium tolerance without enhancing its accumulation in transgenic *Nicotiana tabacum*. *PLoS One*, 6(1), e16360.
- Dixon, D. P., Edwards, R., (2010). Glutathione transferases. *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists*, 8.
- Djanaguiraman, M., Devi, D. D., Shanker, A. K., Sheeba, J. A., Bangarusamy, U., (2005). Selenium—an antioxidative protectant in soybean during senescence. *Plant and Soil*, 272(1-2), 77-86.

- Dooley, F. D., Nair, S. P., Ward, P. D., (2013). Increased growth and germination success in plants following hydrogen sulfide administration. *Plos one*, 8(4), e62048.
- Dubey, D., Pittock, S. J., Kelly, C. R., McKeon, A., Lopez-Chiriboga, A. S., Lennon, V. A., Aksamit, A. J., (2018). Autoimmune encephalitis epidemiology and a comparison to infectious encephalitis. *Annals of neurology*, 83(1), 166-177.
- Dubey, R., Altay, N., Gunasekaran, A., Blome, C., Papadopoulos, T., Childe, S. J., (2018). Supply chain agility, adaptability and alignment: empirical evidence from the Indian auto components industry. *International Journal of Operations & Production Management*, 38(1), 129-148.
- Durmuş, N., (2003). Büyümeği düzenleyici maddelerin oksidatif stres üzerine etkileri. Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Ebru, G. E. N. Ç., ATICI, Ö., (2019). Chicken feather protein hydrolysate as a biostimulant improves the growth of wheat seedlings by affecting biochemical and physiological parameters. *Turkish Journal of Botany*, 43(1), 67-79.
- El-Shabrawi, H., Kumar, B., Kaul, T., Reddy, M. K., Singla-Pareek, S. L., Sopory, S. K., (2010). Redox homeostasis, antioxidant defense, and methylglyoxal detoxification as markers for salt tolerance in Pokkali rice. *Protoplasma*, 245(1-4), 85-96.
- Eltayeb, A. E., Kawano, N., Badawi, G. H., Kaminaka, H., Sanekata, T., Morishima, I., Tanaka, K., (2006). Enhanced tolerance to ozone and drought stresses in transgenic tobacco overexpressing dehydroascorbate reductase in cytosol. *Physiologia Plantarum*, 127(1), 57-65.
- Eltayeb, A. E., Kawano, N., Badawi, G. H., Kaminaka, H., Sanekata, T., Shibahara, T., Tanaka, K., (2007). Overexpression of monodehydroascorbate reductase in transgenic tobacco confers enhanced tolerance to ozone, salt and polyethylene glycol stresses. *Planta*, 225(5), 1255-1264.
- Escobales, N., Crespo, M. J., (2005). Oxidative-nitrosative stress in hypertension. *Current vascular pharmacology*, 3(3), 231-246.
- Esim, N., Tiryaki, D., Karadagoglu, O., Atici, O., (2013). Toxic effects of boron on growth and antioxidant system parameters of maize (*Zea mays* L.) roots. *Toxicology and industrial health*, 29(9), 800-805.
- Esim, N., ATICI, Ö., (2016). Relationships between some endogenous signal compounds and the antioxidant system in response to chilling stress in maize (*Zea mays* L.) seedlings. *Turkish Journal of Botany*, 40(1), 37-44.
- Esim, N., Atici, Ö., (2014). Nitric oxide improves chilling tolerance of maize by affecting apoplastic antioxidative enzymes in leaves. *Plant growth regulation*, 72(1), 29-38.
- Espartero, J., Sanchez-Aguayo, I., Pardo, J. M., (1995) *Plant Mol. Biol.* 29, 1223–1233, 8616220
- Espartero, J., Sánchez-Aguayo, I., Pardo, J. M., (1995). Molecular characterization of glyoxalase-I from a higher plant; upregulation by stress. *Plant molecular biology*, 29(6), 1223-1233.
- Foyer, C. H., Noctor, G., (2005). Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell & Environment*, 28(8), 1056-1071.

- Foyer, C. H., Noctor, G., (2011). Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant physiology*, 155(1), 2-18.
- Fridovich, I., (1995). Superoxide Radical and Superoxide Dismutases. *Annu. Rev. Biochem.*, 64, 97-112.
- Gechev, T.S., Van Breusegem, F., Stone, J.M., Denev, I. ve Laloi, C., (2006). Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death *BioEssays*, 28, 1091-1101.
- Graziano, M., & Lamattina, L., (2005). Nitric oxide and iron in plants: an emerging and converging story. *Trends in plant Science*, 10(1), 4-8.
- Guo, R., Dong, Y., Hou, W., Yu, Z., Weiner, C., (2009). 409: The inflammatory profile and ROS levels in fetal brain differ by the cause of fetal inflammatory response syndrome (FIRS): lipopolysaccharide (LPS) vs. chronic hypoxia (HPX). *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 201(6), S157-S158.
- Halliwell, B., (1984). Toxic Effects of Oxygen on Plant Tissues, In: *Chloroplast Metabolism, The Structure and Function of Chloroplasts in Green Leaf Cells*. Oxford Press, Oxford, 180-206.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J.M.C., (1999). *Free radicals in biology and medicine*, Oxford university press, Oxford.
- Aust, S.D., Morehouse, L.A., and Thomas, C.E. 1985. Role of metals in oxygen radical reactions. *J. Free Radical. Biol. Med.*, (1), 3-25.
- Hasanuzzaman, M., Hossain, M. A., Fujita, M., (2010). Physiological and biochemical mechanisms of nitric oxide induced abiotic stress tolerance in plants. *Am J Plant Physiol*, 5(6), 295-324.
- Hasanuzzaman, M., Hossain, M. A., Fujita, M., (2011). Nitric oxide modulates antioxidant defense and the methylglyoxal detoxification system and reduces salinity-induced damage of wheat seedlings. *Plant Biotechnology Reports*, 5(4), 353.
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Alam, M. M., Bhuyan, M. B., Oku, H., Fujita, M., (2018b). Exogenous nitric oxide pretreatment protects *Brassica napus* L. seedlings from paraquat toxicity through the modulation of antioxidant defense and glyoxalase systems. *Plant physiology and biochemistry*, 126, 173-186.
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Rahman, A., Inafuku, M., Oku, H., Fujita, M., (2018a). Exogenous nitric oxide donor and arginine provide protection against short-term drought stress in wheat seedlings. *Physiology and molecular biology of plants*, 24(6), 993-1004.
- Hernandez, J. A., Jimenez, A., Mullineaux, P., Sevilla, F., (2000). Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defences. *Plant, cell & environment*, 23(8), 853-862.
- Hoque, M. A., Banu, M. N. A., Nakamura, Y., Shimoishi, Y., Murata, Y., (2008). Proline and glycinebetaine enhance antioxidant defense and methylglyoxal detoxification systems and reduce NaCl-induced damage in cultured tobacco cells. *Journal of plant physiology*, 165(8), 813-824.
- Hoque, M. A., Banu, M. N. A., Okuma, E., Amako, K., Nakamura, Y., Shimoishi, Y., Murata, Y., (2007). Exogenous proline and glycinebetaine increase NaCl-induced ascorbate-glutathione cycle enzyme activities, and proline improves salt tolerance more than glycinebetaine in tobacco Bright Yellow-2 suspension-cultured cells. *Journal of plant physiology*, 164(11), 1457-1468.

- Hoque, M. A., Uraji, M., Banu, M. N. A., Mori, I. C., Nakamura, Y., Murata, Y., (2010). The effects of methylglyoxal on glutathione S-transferase from *Nicotiana tabacum*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 74(10), 2124-2126.
- Hoque, T. S., Hossain, M. A., Mostofa, M. G., Burritt, D. J., Fujita, M., Tran, L. S. P., (2016). Methylglyoxal: an emerging signaling molecule in plant abiotic stress responses and tolerance. *Frontiers in plant science*, 7, 1341.
- Hoque, T. S., Uraji, M., Hoque, M. A., Nakamura, Y., Murata, Y., (2017). Methylglyoxal induces inhibition of growth, accumulation of anthocyanin, and activation of glyoxalase I and II in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 31(7), e21901
- Hoque, T. S., Uraji, M., Tuya, A., Nakamura, Y., Murata, Y., (2012b). Methylglyoxal inhibits seed germination and root elongation and up-regulates transcription of stress-responsive genes in ABA-dependent pathway in *Arabidopsis*. *Plant Biology*, 14(5), 854-858.
- Hoque, T. S., Uraji, M., Tuya, A., Nakamura, Y., Murata, Y., (2012a). Methylglyoxal inhibits seed germination and root elongation and up-regulates transcription of stress-responsive genes in ABA-dependent pathway in *Arabidopsis*. *Plant Biology*, 14(5), 854-858.
- Hossain, M. A., Burritt, D. J., Fujita, M., (2016). Cross-stress tolerance in plants: molecular mechanisms and possible involvement of reactive oxygen species and methylglyoxal detoxification systems. *Abiotic Stress Response in Plants*.
- Hossain, M. A., Hasanuzzaman, M., Fujita, M., (2010). Up-regulation of antioxidant and glyoxalase systems by exogenous glycinebetaine and proline in mung bean confer tolerance to cadmium stress. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 16(3), 259-272.
- Hossain, M. A., Hossain, M. Z., Fujita, M., (2009). Stress-induced changes of methylglyoxal level and glyoxalase I activity in pumpkin seedlings and cDNA cloning of glyoxalase I gene. *Australian Journal of Crop Science*, 3(2), 53.
- Hossain, M. A., Nakano, Y., Asada, K., (1984). Monodehydroascorbate reductase in spinach chloroplasts and its participation in regeneration of ascorbate for scavenging hydrogen peroxide. *Plant and cell physiology*, 25(3), 385-395.
- Hossain, M. A., Fujita, M., (2009). Purification of glyoxalase I from onion bulbs and molecular cloning of its cDNA. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 73(9), 2007-2013.
- Hossain, M. A., Fujita, M., (2010). Evidence for a role of exogenous glycinebetaine and proline in antioxidant defense and methylglyoxal detoxification systems in mung bean seedlings under salt stress. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 16(1), 19-29.
- Hossain, M.A. Fujita, M., (2011). Regulatory role of components of ascorbate-glutathione (AsA-GSH) pathway in plant tolerance to oxidative stress. In *Oxidative Stress in Plants: Causes, Consequences and Tolerance*, Anjum, N.A., Umar, S., Ahmed, A. (eds.), pp 81-147, IK International Publishing House Pvt. Ltd., ISBN 9789381141021, INDIA
- Hossain, M.A., Hasanuzzaman, M. Fujita, M., (2011). Coordinate induction of antioxidant defense and glyoxalase system by exogenous proline and

- glycinebetaine is correlated with salt tolerance in mung bean. *Frontiers of Agriculture in China*, 5, 1, 114, ISSN 1673-744X
<http://www.zmo.org.tr>
- Ignacimuthu, S., Franklin, G., Melchias, G., (1997). Multiple shoot formation and in vitro fruiting from cotyledonary nodes of *Vigna mungo* (L.) Hepper. *Current science*, 73(9), 733-735.
- Ignacimuthu, S., Franklin, G., (1998). Regeneration of plantlets from cotyledon and embryonal axis explants of *Vigna mungo* L. Hepper. *Plant cell, tissue and organ culture*, 55(1), 75-78.
- Innocenti, G., Pucciariello, C., Le Gleuher, M., Hopkins, J., de Stefano, M., Delledonne, M., Frendo, P., (2007). Glutathione synthesis is regulated by nitric oxide in *Medicago truncatula* roots. *Planta*, 225(6), 1597-1602.
- Ishikawa, T., Shigeoka, S., (2008). Recent advances in ascorbate biosynthesis and the physiological significance of ascorbate peroxidase in photosynthesizing organisms. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 72(5), 1143-1154.
- Jain, M., Choudhary, D., Kale, R. K., Bhalla, Sarin, N., (2002). Salt and glyphosate induced increase in glyoxalase I activity in cell lines of groundnut (*Arachis hypogaea*). *Physiologia Plantarum*, 114(4), 499-505.
- Janda, T., Szalai, G., Tari, I., Paldi, E., (1999). Hydroponic treatment with salicylic acid decreases the effects of chilling injury in maize (*Zea mays* L.) plants. *Planta*, 208(2), 175-180.
- Jin, Z., Shen, J., Qiao, Z., Yang, G., Wang, R., & Pei, Y., (2011). Hydrogen sulfide improves drought resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical and biophysical research communications*, 414(3), 481-486.
- Kalapos, M. P. (1999). Methylglyoxal in living organisms: chemistry, biochemistry, toxicology and biological implications. *Toxicology letters*, 110(3), 145-175.
- Kaur, C., Ghosh, A., Pareek, A., Sopory, S. K., Singla-Pareek, S. L., (2014a). Glyoxalases and stress tolerance in plants.
- Kaur, C., Mustafiz, A., Sarkar, A. K., Ariyadasa, T. U., Singla-Pareek, S. L., Sopory, S. K., (2014b). Expression of abiotic stress inducible ETHE1-like protein from rice is higher in roots and is regulated by calcium. *Physiologia plantarum*, 152(1), 1-16.
- Kaur, C., Sharma, S., Singla-Pareek, S. L., Sopory, S. K., (2016). Methylglyoxal detoxification in plants: Role of glyoxalase pathway. *Indian journal of plant physiology*, 21(4), 377-390.
- Kaur, C., Singla-Pareek, S. L., Sopory, S. K., (2014). Glyoxalase and methylglyoxal as biomarkers for plant stress tolerance. *Critical reviews in plant sciences*, 33(6), 429-456.
- Kaur, C., Vishnoi, A., Ariyadasa, T. U., Bhattacharya, A., Singla-Pareek, S. L., Sopory, S. K., (2013). Episodes of horizontal gene-transfer and gene-fusion led to co-existence of different metal-ion specific glyoxalase I. *Scientific reports*, 3, 3076.
- Kehrer, J.P., 2000. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* 149, 43.
- Kumar, V., Yadav, S. K., (2009). Plant-mediated synthesis of silver and gold nanoparticles and their applications. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, 84(2), 151-157.

- Kumar, V., Yadav, S. K., (2009). Proline and betaine provide protection to antioxidant and methylglyoxal detoxification systems during cold stress in *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze. *Acta Physiologiae Plantarum*, 31(2), 261-269.
- Lamattina, L., García-Mata, C., Graziano, M., Pagnussat, G., (2003). Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. *Annual review of plant biology*, 54(1), 109-136.
- Lancaster, J.E. and M.J. Boland. 1990. Flavor biochemistry, p. 33-72. In: H.D.Rabinowitch and J.L. Brewster (eds.). *Onions and allied crops*. vol.3. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Larson, R. A. (1988). The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*, 27(4), 969-978.
- Leshem, Y.Y., 2000. Nitric oxide in plants. Occurrence, function and use. Kluwer Academic Publishers, Boston.
- Li, X., Wang, T., Sattayatewa, C., Venkatesan, D., Noll, K. E., Pagilla, K. R., Moschandreas, D. J. (2011). Odor emission rate estimation of indoor industrial sources using a modified inverse modeling method. *Journal of the Air & Waste Management Association*, 61(8), 872-881.
- Li, Z. G., Duan, X. Q., Min, X., Zhou, Z. H. (2017). Methylglyoxal as a novel signal molecule induces the salt tolerance of wheat by regulating the glyoxalase system, the antioxidant system, and osmolytes. *Protoplasma*, 254(5), 1995-2006.
- Limphong, P., Crowder, M. W., Bennett, B., Makaroff, C. A. (2009). *Arabidopsis thaliana* GLX2-1 contains a dinuclear metal binding site, but is not a glyoxalase 2. *Biochemical Journal*, 417(1), 323-330.
- Lin, F., Xu, J., Shi, J., Li, H., Li, B. (2010). Molecular cloning and characterization of a novel glyoxalase I gene TaGly I in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Molecular biology reports*, 37(2), 729.
- Lisjak, M., Teklic, T., Wilson, I. D., Whiteman, M., Hancock, J. T. (2013). Hydrogen sulfide: environmental factor or signalling molecule. *Plant, cell & environment*, 36(9), 1607-1616.
- Maiti, M. K., Krishnasamy, S., Owen, H. A., Makaroff, C. A. (1997). Molecular characterization of glyoxalase II from *Arabidopsis thaliana*. *Plant molecular biology*, 35(4), 471-481.
- Martins, A. M. T., Cordeiro, C. A. A., Ponces Freire, A. M. J. (2001). In situ analysis of methylglyoxal metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS letters*, 499(1-2), 41-44.
- Mhamdi, A., Queval, G., Chaouch, S., Vanderauwera, S., Van Breusegem, F., Noctor, G. (2010). Catalase function in plants: a focus on *Arabidopsis* mutants as stress-mimic models. *Journal of experimental botany*, 61(15), 4197-4220.
- Minibaeva, F. V., Gordon, L. K. (2003). Superoxide production and extracellular peroxidase activity in plant tissues under stress. *Fiziol. Rast*, 50(3), 459-464.
- Minibaeva, F.V. and Gordon L.Kh., 2003a. Superoxide production and the activity of extracellular peroxidase in plant tissues under stress conditions. *Russ. J. of Plant Physiology*, 50(3), 411-416.
- Misra, P., Srivastava, S. K., Singhal, S. S., Awasthi, S., Awasthi, Y. C., Boor, P. J. (1995). Glutathione S-transferase 8-8 is localized in smooth muscle cells of rat aorta and is induced in an experimental model of atherosclerosis. *Toxicology and applied pharmacology*, 133(1), 27-33.

- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in plant science*, 7(9), 405-410.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., Van Breusegem, F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in plant science*, 9(10), 490-498.
- Mittova, V., Tal, M., Volokita, M., Guy, M. (2003). Up-regulation of the leaf mitochondrial and peroxisomal antioxidative systems in response to salt-induced oxidative stress in the wild salt-tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii*. 26(6), 845-856.
- Molla, M. R., Ali, M. R., Hasanuzzaman, M., Al-Mamun, M. H., Ahmed, A., Nazimud-Dowla, M. A. N., Rohman, M. M. (2014). Exogenous proline and betaine-induced upregulation of glutathione transferase and glyoxalase I in lentil (*Lens culinaris*) under drought stress. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 42(1), 73-80.
- Mostofa, M. G., Fujita, M., Tran, L. S. P. (2015a). Nitric oxide mediates hydrogen peroxide-and salicylic acid-induced salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Plant growth regulation*, 77(3), 265-277.
- Mostofa, M. G., Hossain, M. A., Fujita, M., Tran, L. S. P. (2015b). Physiological and biochemical mechanisms associated with trehalose-induced copper-stress tolerance in rice. *Scientific reports*, 5, 11433.
- Mostofa, M. G., Seraj, Z. I., Fujita, M. (2014a). Exogenous sodium nitroprusside and glutathione alleviate copper toxicity by reducing copper uptake and oxidative damage in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Protoplasma*, 251(6), 1373-1386.
- Mustafiz, A., Singh, A. K., Pareek, A., Sopory, S. K., Singla-Pareek, S. L. (2011). Genome-wide analysis of rice and Arabidopsis identifies two glyoxalase genes that are highly expressed in abiotic stresses. *Functional & integrative genomics*, 11(2), 293-305.
- Mutlu, S., Karadağoglu, Ö., Atici, Ö., Nalbantoğlu, B. (2013). Protective role of salicylic acid applied before cold stress on antioxidative system and protein patterns in barley apoplast. *Biologia plantarum*, 57(3), 507-513.
- Nichols Jr, T. E. (1983). Economic impact of aflatoxin in corn. *Southern cooperative series bulletin* (USA).
- Nishiyama, Y., Ikeda, H., Haramaki, N., 1998. Oxidative Stress is Related to Exercise in Tolerance in Patients With Heart Failure. *Am. Heart. J.*, 135, 115.
- Noctor, G., Mhamdi, A., Chaouch, S., Han, Y. I., Neukermans, J., Marquez-Garcia, B. E. L. E. N., Foyer, C. H. (2012). Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant, cell & environment*, 35(2), 454-484.
- Noctor, G., Foyer, C. H. (1998). Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual review of plant biology*, 49(1), 249-279.
- Patel, V. B., McLean, B. A., Chen, X., Oudit, G. Y. (2015). Hydrogen sulfide: an old gas with new cardioprotective effects. *Clinical Science*, 128(5), 321-323.
- Paulus, C., Köllner, B., Jacobsen, H. J. (1993). Physiological and biochemical characterization of glyoxalase I, a general marker for cell proliferation, from a soybean cell suspension. *Planta*, 189(4), 561-566.
- Pedroso, M.C. and Durzan, D.J., 2000. Effect of Different Gravity Environments on DNA Fragmentation and Cell death in *Kalanchoë* Leaves, *Ann. Bot.*, 86:983–994

- Purev, M., Kim, Y. J., Kim, M. K., Pulla, R. K., & Yang, D. C. (2010). Isolation of a novel catalase (Cat1) gene from *Panax ginseng* and analysis of the response of this gene to various stresses. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(6), 451-460.
- Racker, E. (1951). The mechanism of action of glyoxalase. *Journal of Biological Chemistry*, 190(2), 685-696.
- Reigosa, M. J., Pedrol, N., & González, L. (Eds.). (2006). *Allelopathy: a physiological process with ecological implications*. Springer Science & Business Media.
- Roxas, V. P., Smith, R. K., Allen, E. R., & Allen, R. D. (1997). Overexpression of glutathione S-transferase/glutathioneperoxidase enhances the growth of transgenic tobacco seedlings during stress. *Nature biotechnology*, 15(10), 988.
- Saini, R., Jaiwal, P. K., (2002). Age, position in mother seedling, orientation, and polarity of the epicotyl segments of blackgram (*Vigna mungo* L. Hepper) determines its morphogenic response. *Plant Science*, 163(1), 101-109.
- Sakhabutdinova, A. R., Fatkhutdinova, D. R., Shakirova, F. M., (2004). Effect of salicylic acid on the activity of antioxidant enzymes in wheat under conditions of salination. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 40(5), 501-505.
- Salisbury, F.B., and Ross C.W., 1992. *Plant Physiol*. Wadsworth Publishing Company. California, pp.682, USA
- Saxena, M., Bisht, R., Roy, S. D., Sopory, S. K., Bhalla-Sarin, N., (2005). Cloning and characterization of a mitochondrial glyoxalase II from *Brassica juncea* that is upregulated by NaCl, Zn, and ABA. *Biochemical and biophysical research communications*, 336(3), 813-819.
- Selote, D. S., Khanna-Chopra, R., (2004). Drought-induced spikelet sterility is associated with an inefficient antioxidant defence in rice panicles. *Physiologia Plantarum*, 121(3), 462-471.
- Sen, J., Guha-Mukherjee, S., (1998). In vitro induction of multiple shoots and plant regeneration in *Vigna*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 34(4), 276-280.
- Sgherri, C. L., Pinzinc, C., Navari-Izzo, F., (1996). Sunflower seedlings subjected to increasing stress by water deficit: Changes in O₂⁻ production Aated to the composition of thylakoid membranes. *Physiologia Plantarum*, 96(3), 446-452.
- Shalata, A., Mittova, V., Volokita, M., Guy, M., Tal, M., (2001). Response of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to salt-dependent oxidative stress: The root antioxidative system. *Physiologia Plantarum*, 112(4), 487-494.
- 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.
- Silverman, P., Seskar, M., Kanter, D., Schweizer, P., Metraux, J. P., Raskin, I., (1995). Salicylic acid in rice (biosynthesis, conjugation, and possible role). *Plant Physiology*, 108(2), 633-639.
- Singh, P., Dhaka, N., (2015). Glyoxalase system and salinity stress in plants. *Managing Salt Tolerance in Plants: Molecular and Genomic Perspectives*, 173.
- Singla-Pareek, S. L., Pareek, A., Sopory, S. K., (2007). Transgenic plants for dry and saline environments. In *Advances in Molecular Breeding Toward Drought and Salt Tolerant Crops*. 501-530. Springer, Dordrecht.

- Singla-Pareek, S. L., Reddy, M. K., Sopory, S. K., (2003). Genetic engineering of the glyoxalase pathway in tobacco leads to enhanced salinity tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(25), 14672-14677.
- Singla-Pareek, S. L., Yadav, S. K., Pareek, A., Reddy, M. K., Sopory, S. K., (2006). Transgenic tobacco overexpressing glyoxalase pathway enzymes grow and set viable seeds in zinc-spiked soils. *Plant Physiology*, 140(2), 613-623.
- Sis, B., Jhangri, G. S., Bunnag, S., Allanach, K., Kaplan, B., Halloran, P. F., (2009). Endothelial gene expression in kidney transplants with alloantibody indicates antibody-mediated damage despite lack of C4d staining. *American Journal of Transplantation*, 9(10), 2312-2323.
- Skipsey, M., Andrews, C. J., Townson, J. K., Jepson, I., Edwards, R., (1997). Substrate and thiol specificity of a stress-inducible glutathione transferase from soybean. *FEBS letters*, 409(3), 370-374.
- Skipsey, M., Andrews, C. J., Townson, J. K., Jepson, I., Edwards, R., (2000). Cloning and characterization of glyoxalase I from soybean. *Archives of biochemistry and biophysics*, 374(2), 261-268.
- Smirnoff, N. (Ed.). (2005). *Antioxidants and reactive oxygen species in plants*. 169-177. Oxford: Blackwell.
- Smits, M. M., Johnson, M. A., (1981). Methylglyoxal: enzyme distributions relative to its presence in Douglas-fir needles and absence in Douglas-fir needle callus. *Archives of biochemistry and biophysics*, 208(2), 431-439.
- Stavolone, L., Kononova, M., Pauli, S., Ragozzino, A., de Haan, P., Milligan, S., Hohn, T., (2003). Cestrum yellow leaf curling virus (CmYLCV) promoter: a new strong constitutive promoter for heterologous gene expression in a wide variety of crops. *Plant molecular biology*, 53(5), 703-713.
- Sticher, L., Mauch-Mani, B., Métraux, A. J., (1997). Systemic acquired resistance. *Annual review of phytopathology*, 35(1), 235-270.
- Sukdeo, N., Clugston, S. L., Elisabeth, D. A. U. B., Honek, J. F., (2004). Distinct classes of glyoxalase I: metal specificity of the *Yersinia pestis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Neisseria meningitidis* enzymes. *Biochemical Journal*, 384(1), 111-117.
- Takahashi, S., Murata, N., (2008). How do environmental stresses accelerate photoinhibition?. *Trends in plant science*, 13(4), 178-182.
- Taskin, M., Esim, N., Ortucu, S., (2012). Efficient production of l-lactic acid from chicken feather protein hydrolysate and sugar beet molasses by the newly isolated *Rhizopus oryzae* TS-61. *Food and Bioprocess Technology*, 90(4), 773-779.
- Taşgın, E., Atıcı, Ö., Nalbantoğlu, B., Popova, L. P., (2006). Effects of salicylic acid and cold treatments on protein levels and on the activities of antioxidant enzymes in the apoplast of winter wheat leaves. *Phytochemistry*, 67(7), 710-715.
- Taşgın, E., Atıcı, Ö., Nalbantoğlu, B., (2003). Effects of salicylic acid and cold on freezing tolerance in winter wheat leaves. *Plant Growth Regulation*, 41(3), 231-236.
- Thomas, C. D., Thomas, J. A., Warren, M. S., (1992). Distributions of occupied and vacant butterfly habitats in fragmented landscapes. *Oecologia*, 92(4), 563-567.

- Thomas, C. E., McLean, L. R., Parker, R. A., Ohlweiler, D. F., (1992). Ascorbate and phenolic antioxidant interactions in prevention of liposomal oxidation. *Lipids*, 27(7), 543-550.
- Thornalley, P. J. (1990). The glyoxalase system: new developments towards functional characterization of a metabolic pathway fundamental to biological life. *Biochemical Journal*, 269(1), 1.
- Thornalley, P. J. (1996). Pharmacology of methylglyoxal: formation, modification of proteins and nucleic acids, and enzymatic detoxification-a role in pathogenesis and antiproliferative chemotherapy. *General Pharmacology: The Vascular System*, 27(4), 565-573.
- Thornalley, P. J., Edwards, L. G., Kang, Y., Wyatt, C., Davies, N., Ladan, M. J., Double, J., (1996). Antitumour activity of Sp-bromobenzylglutathione cyclopentyl diester in vitro and in vivo: inhibition of glyoxalase I and induction of apoptosis. *Biochemical pharmacology*, 51(10), 1365-1372.
- Tiryaki, D., Aydın, İ., Atıcı, Ö., (2019). Psychrotolerant bacteria isolated from the leaf apoplast of cold-adapted wild plants improve the cold resistance of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under low temperature. *Cryobiology*, 86, 111-119.
- Uddin, M. I., Rashid, M. H., Khan, N., Perveen, M. F., Tai, T. H., Tanaka, K., (2007). Selection of promising salt tolerant rice mutants derived from cultivar 'Drew' and their antioxidant enzymes activity under salt stress. *Sabara Journal of Breeding and Genetics*, 39(2), 89-98.
- Upadhyaya, C. P., Venkatesh, J., Gururani, M. A., Asnin, L., Sharma, K., Ajappala, H., Park, S. W., (2011). Transgenic potato overproducing L-ascorbic acid resisted an increase in methylglyoxal under salinity stress via maintaining higher reduced glutathione level and glyoxalase enzyme activity. *Biotechnology letters*, 33(11), 2297.
- Veena, Reddy, V. S., Sopory, S. K., (1999). Glyoxalase I from *Brassica juncea*: molecular cloning, regulation and its overexpression confer tolerance in transgenic tobacco under stress. *The Plant Journal*, 17(4), 385-395.
- Wang, H-H., Huang J-J., Bi Rong., (2010). Nitrate reductase-dependent nitric oxide production is involved in aluminum tolerance in red kidney bean roots. *Plant Science*, 281-288.
- Wang, W., Vinocur, B., Altman, A., (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218(1), 1-14.
- Wang, X., Chang, T., Jiang, B., Desai, K., Wu, L., (2007). Attenuation of hypertension development by aminoguanidine in spontaneously hypertensive rats: role of methylglyoxal. *American journal of hypertension*, 20(6), 629-636.
- Wang, Y. S., Yang, Z. M., (2005). Nitric oxide reduces aluminum toxicity by preventing oxidative stress in the roots of *Cassia tora* L. *Plant and Cell Physiology*, 46(12), 1915-1923.
- Wang, Y., Ye, X. Y., Qiu, X. M., Li, Z. G., (2019). Methylglyoxal triggers the heat tolerance in maize seedlings by driving AsA-GSH cycle and reactive oxygen species-/methylglyoxal-scavenging system. *Plant Physiology and Biochemistry*, 138, 91-99.
- Weissman, G. (1991) Aspirin. *Sci. Am.* 264,6440.

- Yadav, S. K., Singla-Pareek, S. L., Sopory, S. K., (2008). An overview on the role of methylglyoxal and glyoxalases in plants. *Drug Metabolism and Drug Interactions*, 23(1-2), 51-68.
- Yadav, S. K., Singla-Pareek, S. L., Kumar, M., Pareek, A., Saxena, M., Sarin, N. B., Sopory, S. K., (2007). Characterization and functional validation of glyoxalase II from rice. Protein expression and purification, 51(1), 126-132.
- Yadav, S. K., Singla-Pareek, S. L., Ray, M., Reddy, M. K., Sopory, S. K., (2005). Methylglyoxal levels in plants under salinity stress are dependent on glyoxalase I and glutathione. *Biochemical and biophysical research communications*, 337(1), 61-67.
- Yadav, S. K., Singla-Pareek, S. L., Ray, M., Reddy, M. K., Sopory, S. K., (2005a). Methylglyoxal levels in plants under salinity stress are dependent on glyoxalase I and glutathione. *Biochemical and biophysical research communications*, 337(1), 61-67.
- Yadav, S. K., Singla-Pareek, S. L., Reddy, M. K., Sopory, S. K., (2005b). Transgenic tobacco plants overexpressing glyoxalase enzymes resist an increase in methylglyoxal and maintain higher reduced glutathione levels under salinity stress. *FEBS letters*, 579(27), 6265-6271.
- Yamasaki, H., Sakihama, Y., (2000). Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase: in vitro evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. *FEBS letters*, 468(1), 89-92.
- Yordanova, R. Y., Christov, K. N., Popova, L. P., (2004). Antioxidative enzymes in barley plants subjected to soil flooding. *Environmental and Experimental Botany*, 51(2), 93-101.
- Zhang, H., Hu, L. Y., Hu, K. D., He, Y. D., Wang, S. H., Luo, J. P., (2008). Hydrogen sulfide promotes wheat seed germination and alleviates oxidative damage against copper stress. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50(12), 1518-1529.
- Zottini, M., Formentin, E., Scattolin, M., Carimi, F., Schiavo, F.L., Terzi, M., (2002). Nitric oxide affects plant mitochondrial functionality *in vivo*. *FEBS Lett*, 515, 75-78.

ÖZGEÇMİŞ

1993 yılında Ağrı’da doğdu. İlk orta öğrenimini Ağrı, lise öğrenimini Kocaeli’de tamamladı. 2011 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Erzurum Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nden 2015 yılında mezun oldu. Aynı yıl başladığı Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimine devam etmektedir.

