

**BİTKİ STRES CEVABINDA ÖNEMLİ SİNYAL
BİLEŞİKLERİNİN BUĞDAY (*Triticum aestivum*)’DA
HÜCRESEL VE APOPLASTİK PROTEİNLERİN
DEĞİŞİMİ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Salim ÇERİĞ

**Yüksek Lisans Tezi
Biyoloji Anabilim Dalı
Prof. Dr. Ökkeş ATICI
2011**

Her hakkı saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**BİTKİ STRES CEVABINDA ÖNEMLİ SİNYAL BİLEŞİKLERİN
BUĞDAY (*Triticum aestivum*)’DA HÜCRESEL VE APOPLASTİK
PROTEİNLERİN DEĞİŞİMİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Salim ÇERİĞ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ERZURUM

2011

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

Bitki Stres Cevabında Önemli Sinyal Bileşiklerinin Buğday (*Triticum aestivum*)'da Hücresel ve Apoplastik Proteinlerin Değişimleri Üzerine Etkilerinin Araştırılması

Prof. Dr. Ökkeş ATICI danışmanlığında, Salim ÇERİĞ tarafından hazırlanan bu çalışma 10/08/2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından, Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak ~~oybirliği/oy çokluğu (.../...)~~ ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Ökkeş ATICI

İmza :

Üye : Doç. Dr. Şükrü BEYDEMİR

İmza :

Üye : Yrd. Doç. Dr. Serkan ERDAL

İmza :

(imza)

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Ömer AKBULUT

Bu çalışma BAP projeleri kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: 2011/110

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

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BİTKİ STRES CEVABINDA ÖNEMLİ SİNYAL BİLEŞİKLERİNİN BUĞDAY (*Triticum aestivum*)’DA HÜCRESEL VE APOPLASTİK PROTEİNLERİN DEĞİŞİMİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Salim ÇERİĞ

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ökkeş ATICI

Bu araştırmada, bitkilerde önemli sinyal bileşiklerinden salisilik asit, nitrik oksit, putresin, absisik asit, etilen ve östrojenin buğday (*Triticum aestivum* cv. Doğu-88) yapraklarında apoplastik ve hücrel antioksidan enzimler (katalaz, peroksidaz, süperoksid dismutaz), reaktif oksijen bileşikleri (hidrojen peroksit ve süperoksit anyonu), lipid peroksidasyonu ve apoplastik ile hücrel protein profilleri üzerine etkileri araştırılmıştır. Bitkiler 18/20 °C kontrollü normal şartlarda toplam 15 gün büyütülmüşlerdir. Bitki yapraklarına 12. gün, 0.1 ve 1 mM salisilik asit (SA), nitrik oksit (NO) ve putresin (Put), 50 ve 100 µM absisik asit (ABA), 50 ve 100 ppm etafon (Etp), 10^{-6} ve 10^{-8} M östrojen (Öst) uygulanmış ve uygulamadan 3 gün sonra bitki yaprakları deney materyali olarak kullanılmıştır. Uygulamalar sonucu elde edilen bulgular kontrol ile karşılaştırılmıştır.

SA, NO, Put, ABA, Etp ve Öst uygulamalarının; apoplastik peroksidaz (POX) aktivitesini artırdığı, apoplastik süperoksid dismutaz (SOD) aktivitesini azalttığı belirlenmiştir. Hücrel katalaz (CAT) aktivitesini, SA, 1 mM NO, Put ve Öst’ün artırdığı, ABA ve Etp’un azalttığı, SOD aktivitesini, SA, Put, ABA ve Öst’ün artırdığı, NO ve Etp’un azalttığı, POX aktivitesini, 10^{-6} M Öst hariç tüm uygulamaların artırdığı belirlenmiştir. Reaktif oksijen türlerinden hidrojen peroksit (H_2O_2) miktarını, SA, NO, 0,1 mM Put, ABA, Etp ve 10^{-8} M Öst’ün azalttığı, 1 mM Put ve 10^{-6} M Öst’ün artırdığı, süperoksit anyonu ($O^{\cdot-}$) miktarını tüm uygulamaların azalttığı belirlenmiştir. Lipid peroksidasyonu (LPO) seviyesini, SA, 1 mM Put ve 10^{-8} M Öst’ün azalttığı, NO, 0,1 mM Put, ABA ve 10^{-6} M Öst’ün artırdığı, Etp’un ise değiştirmedığı belirlenmiştir. Apoplastik ve hücrel proteinlerin polipeptid profilleri SDS-PAGE (Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi)’ de incelendiğinde, SA, NO, Put, ABA, Etp ve Öst uygulamalarıyla elde edilen polipeptidlerin 6 ile 66 kilodalton (kDa) arasında olduğu belirlenmiştir.

2011, 109 sayfa

Anahtar Kelimeler: Apoplast, antioksidan enzimler, lipid peroksidasyonu, reaktif oksijen türü, *Triticum aestivum*, buğday, elektroforez, salisilik asit, nitrik oksit, putresin, absisik asit etilen, östrojen.

ABSTRACT

Master Thesis

INVESTIGATION OF EFFECTS OF IMPORTANT SIGNALING COMPOUNDS IN PLANT STRESS RESPONSE ON VARIATION OF CELLULAR AND APOPLASTIC PROTEINS IN WHEAT (*Triticum aestivum*)

Salim ÇERİĞ

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

Supervisor: Prof. Dr. Ökkeş ATICI

In this work, effects of important signal compounds found in plants (salicylic acid, nitric oxide, putrescine, abscisic acid, ethylene and estradiol) were investigated on the activities of apoplastic and cellular antioxidant enzymes (catalase, peroxidase and superoxide dismutase), the levels of reactive oxygen compounds (hydrogen peroxide and superoxide anion) and lipid peroxidation, and the profiles of apoplastic and cellular proteins in wheat (*Triticum aestivum* cv. Doğu-88). The plants were grown under controlled conditions (18/20 °C) for 15 days. Day 12, on the plant leaves were applied as independent 0.1 and 1 mM solutions of salicylic acid (SA), sodium nitroprussid (SNP) as a donor of nitric oxide (NO) and putrescine (Put), 50 and 100 µM solution of abscisic acid (ABA), 50 and 100 ppm solution of ethephon (Etp) as a donor of ethylene, and 10^{-6} and 10^{-8} M solution of estradiol (Est). After 3 days of this application (day 15), the plant leaves were used as experimental material. Obtained findings were compared with that of control applications.

All applications of the signal compounds increased apoplastic peroxidase (POX) activity while reduced apoplastic superoxide dismutase (SOD) activity. SA, 1 mM SNP, Put and Est applications increased while was decreased by ABA ve Etp the activities of cellular catalase (CAT), cellular SOD activity, was increased by the applications of SA, Put, ABA and Est while was decreased by applications SNP and Etp, however, the all applications increased the activities of cellular peroxidase (POX) except 10^{-6} M Est. The endogenous level of hydrogen peroxide (H_2O_2) was decreased by SA, SNP, 0.1 mM Put, ABA, Etp and 10^{-8} M Est applications while was increased by 1 mM Put and 10^{-6} M Est. All applications of the signal compounds decreased the endogenous level of superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$). The level of malondialdehyde (MDA), an indicator of lipid peroxidation (LPO), was decreased by SA, 1 mM Put and 10^{-8} M Est, while was increased by SNP, 0.1 mM Put, ABA, Etp and 10^{-6} M Est applications, however wasn't changed by Etp application. As the polypeptide profiles of apoplastic and cellular proteins were examined by SDS-PAGE, molecular masses of obtained polypeptides by the applications of the signal compounds were in the range from 6 to 66 kDa.

2010, 109 Pages

Keywords: Apoplast, antioxidant enzymes, lipid peroxidation, reactive oxygen species, *Triticum aestivum*, wheat, electrophoresis, salicylic acid, nitric oxide, putrescine, abscisic acid, ethylene, estrogen.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmada her an bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, çalışmalarım süresince yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof Dr. Ökkeş ATICI'ya en içten teşekkürlerimi sunarım.

İlgi,yardım ve desteğini gördüğüm Sayın Yrd. Doç.Dr. Serkan ERDAL'a, Sayın Y.Ziraat Mühendisi Muhammed Recai TASTEPE' ye, Sayın Biyolog Muhammed Emin ÇÖĞENDER'e, Sayın Biyolog Mesud Mete ÇİFTÇİ' ye, Sayın Arş.Gör. Muhammed Hanifi SELVİ'ye, tüm hocalarıma ve arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca her an maddi ve manevi desteğini esirgemeyen aileme ve sevdiklerime şükranlarımı sunarım.

Salim ÇERİĞ

Temmuz 2011

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	19
3. MATERYAL ve YÖNTEMLER.....	30
3.1. Çalışmada kullanılan alet ve cihazlar	30
3.2. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanış Şekiller.....	31
3.3. Yöntemler	35
3.3.1. Bitkilerin büyütülmesi	35
3.3.2. Apoplastik proteinlerin ekstraksiyonu ve izolasyonu	36
3.3.3. Hücresel proteinlerin ekstraksiyonu	37
3.3.4.a. Katalaz aktivitesinin belirlenmesi	38
3.3.4.b. Peroksidaz aktivitesinin belirlenmesi	39
3.3.4.c. Süperoksit dismutaz aktivitesinin belirlenmesi	40
3.3.5. Lipid peroksidasyon aktivitesinin belirlenmesi.....	40
3.3.6. Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) miktarının belirlenmesi	41
3.3.7. Süperoksit anyonu (O ₂ ⁻) miktarının belirlenmesi.....	42
3.3.8. Sodyum dodesil sülfat jel elektroforezi (SDS-PAGE)	43
3.4. İstatistik Analiz.....	45
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	46
4.1. Apoplastik Enzim Aktivitesi Sonuçları	46
4.1.1. Peroksidaz Aktivitesi Sonuçları	46
4.1.2 Süperoksit Dismutaz Aktivitesi Sonuçları	50
4.2. Apoplastik Proteinlerin SDS–Poliakrilamid Jel Elektroforezi Sonuçları.....	54
4.3. Hücresel Enzim Aktivitesi Sonuçları	60
4.3.1 Katalaz Aktivitesi Sonuçları.....	60
4.3.2 Peroksidaz Aktivitesi Sonuçları	64
4.3.3 Süperoksit Dismutaz Aktivitesi Sonuçları	68

4.4. Hücresel Proteinlerin SDS–Poliakrilamid Jel Elektroforezi Sonuçları	71
4.5. Lipid Peroksidasyonu (LPO) Seviyesi Sonuçları	77
4.6. Hidrojen peroksit (H_2O_2) Miktarı Sonuçları	80
4.7. Süperoksit Anyonu (O_2^-) Miktarı Sonuçları	83
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	86
5.1. SA uygulamalarından elde edilen sonuçların değerlendirilmesi	87
5.2. NO uygulamalarından elde edilen sonuçların değerlendirilmesi	88
5.3. Put uygulamalarından elde edilen sonuçların değerlendirilmesi:	90
5.4. ABA uygulamalarından elde edilen sonuçların değerlendirilmesi	91
5.5. Etp uygulamalarından elde edilen sonuçların değerlendirilmesi	92
5.6. Öst uygulamalarından elde edilen sonuçların değerlendirilmesi	93
KAYNAKLAR	96
ÖZGEÇMİŞ	110

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABA	: Absisik asit
AFP	: Antifriz proteini
CAT	: Katalaz
EDTA	: Etilendiamin tetra asetik asit
E.C.	: Enzim kod numarası
E.Ü.	: Enzim ünitesi
Etp	: Etafon
HCl	: Hidroklorik asit
kDA	: Kilo dalton
KCN	: Potasyum siyanat
LPO	: Lipid peroksidasyon
MDA	: Malondialdehid
Mm	: Milimolar
μ M	: Mikromolar
ml	: Mikrolitre
NBT	: Nitroblue tetrazolium klorür
NO	: Nitrik Oksit
OH^-	: Hidroksil radikali
Öst	: Östrojen
POD	: Peroksidaz
Put	: Putresin
PVP	: Polivinilpirrolidon
ROT	: Reaktif oksijen türleri
Rpm	: Devir/dakika
SA	: Salisilik asit
SNP	: Sodyum nitroprussid
SOD	: Süperoksit dismutaz
TBA	: Tiobarbutirik asit
TCA	: Trikloro asetik asit
Xg	: Yerçekimi ivmesinin katı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Absisik asidin genel yapısı	3
Şekil 1.2. Salisilik asidin genel yapısı	5
Şekil 1.3. Nitrik oksid'in genel yapısı	6
Şekil 1.4. Sodyum nitroprussid'in genel yapısı	6
Şekil 1.5. Putresinin genel yapısı	8
Şekil 1.6. Etilenin genel yapısı	8
Şekil 1.7. Etefonun genel yapısı	9
Şekil 1.8. Östradiolün genel yapısı	9
Şekil 3.1. Katalaz aktivitesi ölçümünde kullanılan standart grafik.	39
Şekil 3.2. Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) miktarını belirlemede kullanılan standart grafik.	42
Şekil 3.3. Süperoksit anyonu (O ₂ ⁻) miktarını belirlemede kullanılan standart grafik.	43
Şekil 4.1. Normal şartlarda yetiştirilen, SA, NO ve Put uygulanmış kışlık buğday yapraklarından elde edilen apoplastik POX aktivitesi	48
Şekil 4.2. Normal şartlarda yetiştirilen, ABA, Etp ve Öst uygulanmış kışlık buğday yapraklarından elde edilen apoplastik POX aktivitesi	49
Şekil 4.3. Normal şartlarda yetiştirilen, SA, NO ve Put uygulanmış kışlık buğday yapraklarından elde edilen apoplastik SOD aktivitesi	52
Şekil 4.4. Normal şartlarda yetiştirilen ABA, Etp ve Öst uygulanmış kışlık buğday yapraklarından elde edilen apoplastik SOD aktivitesi	53
Şekil 4.5. Normal şartlarda yetiştirilen, SA uygulanmış kışlık buğday yapraklarından elde edilen apoplastik proteinlerin SDS - PAGE fotoğrafı).	54
Şekil 4.6. Normal şartlarda yetiştirilen, NO uygulanmış kışlık buğday yapraklarından elde edilen apoplastik proteinlerin SDS - PAGE fotoğrafı.	55
Şekil 4.7. Normal şartlarda yetiştirilen, Put uygulanmış kışlık buğday yapraklarından elde edilen apoplastik proteinlerin SDS - PAGE fotoğrafı.	56
Şekil 4.8. Normal şartlarda yetiştirilen, ABA uygulanmış kışlık buğday yapraklarından elde edilen apoplastik proteinlerin SDS - PAGE fotoğrafı	57
Şekil 4.9. Normal şartlarda yetiştirilen Etp uygulanmış kışlık buğday yapraklarından elde edilen apoplastik proteinlerin SDS - PAGE fotoğrafı.	58

Şekil 4.10. Normal şartlarda yetiştirilen Öst uygulanmış kışlık buğday yapraklarından elde edilen apoplastik proteinlerin SDS - PAGE fotoğrafı. .59	59
Şekil 4.11. Normal şartlarda yetiştirilen SA, NO ve Put uygulanmış kışlık buğday yapraklarından elde edilen hücrel CAT aktiviteleri.....62	62
Şekil 4.12. Normal şartlarda yetiştirilen ABA, Etp ve Öst uygulanmış kışlık buğday yapraklarından elde edilen hücrel CAT aktiviteleri63	63
Şekil 4.13. Normal şartlarda yetiştirilen SA, NO ve Put uygulanmış kışlık buğday yapraklarından elde edilen hücrel POX aktivitesi.....66	66
Şekil 4.14. Normal şartlarda yetiştirilen, ABA, Etp ve Öst uygulanmış kışlık buğday yapraklarından elde edilen hücrel POX aktivitesi.....67	67
Şekil 4.15. Normal şartlarda yetiştirilen SA, NO ve Put uygulanmış kışlık buğday yapraklarından elde edilen hücrel SOD aktivitesi69	69
Şekil 4.16. Normal şartlarda yetiştirilen ABA, Etp ve Öst uygulanmış kışlık buğday yapraklarından elde edilen hücrel SOD aktivitesi70	70
Şekil 4.17. Normal şartlarda yetiştirilen, SA uygulanmış kışlık buğday yapraklarından elde edilen hücrel proteinlerin SDS - PAGE fotoğrafı.71	71
Şekil 4.18. Normal şartlarda yetiştirilen, NO uygulanmış kışlık buğday yapraklarından elde edilen hücrel proteinlerin SDS - PAGE fotoğrafı72	72
Şekil 4.19. Normal şartlarda yetiştirilen, Put uygulanmış kışlık buğday yapraklarından elde edilen hücrel proteinlerin SDS - PAGE fotoğrafı.73	73
Şekil 4.20. Normal şartlarda yetiştirilen, ABA uygulanmış kışlık buğday yapraklarından elde edilen hücrel proteinlerin SDS - PAGE fotoğrafı.74	74
Şekil 4.21. Normal şartlarda yetiştirilen, Etp uygulanmış kışlık buğday yapraklarından elde edilen hücrel proteinlerin SDS - PAGE fotoğrafı75	75
Şekil 4.22. Normal şartlarda yetiştirilen, Öst uygulanmış kışlık buğday yapraklarından elde edilen hücrel proteinlerin SDS - PAGE fotoğrafı76	76
Şekil 4.23. Normal şartlarda yetiştirilen SA, NO ve Put uygulanmış kışlık buğday yapraklarından elde edilen lipid peroksidasyonu seviyesi78	78
Şekil 4.24. Normal şartlarda yetiştirilen ABA, Etp ve Öst uygulanmış kışlık buğday yapraklarından elde edilen lipid peroksidasyonu seviyesi79	79
Şekil 4.25. Normal şartlarda yetiştirilen SA, NO ve Put uygulanmış kışlık buğday yapraklarından elde edilen H ₂ O ₂ miktarı81	81

Şekil 4.26. Normal şartlarda yetiştirilen ABA, Etp ve Öst uygulanmış kışlık buğday yapraklarından elde edilen H_2O_2 miktarı.....	82
Şekil 4.27. Normal şartlarda yetiştirilen, SA, NO ve Put uygulanmış kışlık buğday	84
Şekil 4.28. Normal şartlarda yetiştirilen, ABA, Etp ve Öst uygulanmış kışlık buğday yapraklarından elde edilen süperoksit anyonu miktarı.....	85

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Normal şartlarda yetiştirilen, kontrol ve kesimden 3 gün önce SA, NO, Put, ABA, Etp ve Öst uygulanmış kışlık buğday yapraklarından elde edilen apoplastik POX aktivitesi değerleri.	47
Çizelge 4.2. Normal şartlarda yetiştirilen, kontrol ve kesimden 3 gün önce SA, NO, Put, ABA, Etp ve Öst uygulanmış kışlık buğday yapraklarından elde edilen apoplastik SOD aktivitesi değerleri.	51
Çizelge 4.3. Normal şartlarda yetiştirilen, kontrol ve kesimden 3 gün önce SA, NO, Put, ABA, Etp ve Öst uygulanmış kışlık buğday yapraklarından elde edilen hücrel CAT aktivitesi değerleri.	61
Çizelge 4.4. Normal şartlarda yetiştirilen, kontrol ve kesimden 3 gün önce SA, NO, Put, ABA, Etp ve Öst uygulanmış kışlık buğday yapraklarından elde edilen hücrel POX aktivitesi değerleri.	65
Çizelge 4.5. Normal şartlarda yetiştirilen, kontrol ve kesimden 3 gün önce SA, NO, Put, ABA, Etp ve Öst uygulanmış kışlık buğday yapraklarından elde edilen hücrel SOD aktivitesi değerleri.	68
Çizelge 4.6. Normal şartlarda yetiştirilen, kontrol ve kesimden 3 gün önce, SA, NO, Put, ABA, Etp ve Öst uygulanmış kışlık buğday yapraklarından elde edilen hücrel lipid peroksidasyonu değerleri.	77
Çizelge 4.7. Normal şartlarda yetiştirilen, kontrol ve kesimden 3 gün önce, SA, NO, Put, ABA, Etp ve Öst uygulanmış kışlık buğday yapraklarından elde edilen hücrel H ₂ O ₂ miktarı değerleri.	80
Çizelge 4.8. Normal şartlarda yetiştirilen, kontrol ve kesimden 3 gün önce, SA, NO, Put, ABA, Etp ve Öst uygulanmış kışlık buğday yapraklarından elde edilen Süperoksit anyonu miktarı değerleri.	83

1. GİRİŞ

Bitkilerde büyüme ve gelişme, bitkinin kendi içyapısı (metabolizması, genetik özellikleri, hormonları vb.) ile onu kuşatan dış ortam faktörlerinin (su, ışık, sıcaklık, toprak, nem vb.) ortak etkileri sonucu meydana gelmektedir. Esasında bitkinin büyüme, gelişme ve hangi yönde farklılaşacağı genetik yapısında belirlenmiş olmasına rağmen, bu olaylarda iç faktörlerin yanı sıra dış faktörler de önemli oranda etki göstermektedirler. Çevreden kaynaklanan abiyotik (su, kuraklık, sıcaklık, ışık, tuz vb.) ve biyotik faktörler (patojenler vb.) bitkilerin metabolizmasında önemli değişikliklere yol açarak bu programı geciktirme veya erkene alma şeklinde etki ederler. Çevre şartları olarak da adlandırılan dış faktörler optimum sınırlar içinde büyümeyi olumlu yönde etkilerken, bu sınırların dışında bitkilerin büyümesini engelleyip, bitkinin strese girmesine hatta ölmesine neden olabilirler (Kocaçalışkan 2004; Erdal 2009).

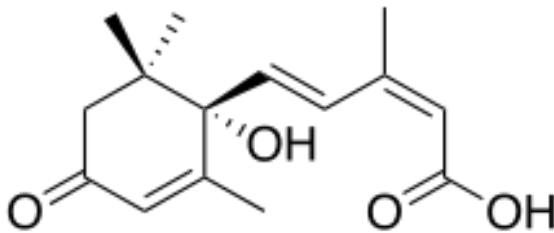
Stres, önemli fizyolojik ve metabolik değişimlere yol açarak bitkilerde büyüme ve gelişmeyi olumsuz şekilde etkilerken, üründe nitelik ve nicelik kaybına (ürün kalitesinin ve miktarının azalmasına), bitkinin ve ya organlarının ölümüne yol açabilmektedir. Strese dayanıklılık mekanizması bitkilerde iki şekilde etkili olmaktadır. Bitkiler ya geliştirdikleri önleyici mekanizmalarla stres faktörlerinin etkinliğini önlemekte ya da tolerans mekanizmalarıyla karşı koymakta ve yaşamlarını sürdürmektedirler. Bunun dışında stres, toprak ve iklimin bitki türlerinin dağılışını nasıl sınırlandığının anlaşılmasını sağlar. Bu nedenle stresin oluşturduğu zarar bitkilerin çevresel streslere adaptasyonu ve alışma mekanizmalarının altında yatan biyokimyasal ve fizyolojik işlemlerin anlaşılması hem tarım hem de çevre açısından büyük önem taşır (Taiz and Zeiger 2006). Günümüzde tarımsal faaliyetler, su baskını, kuraklık, sıcaklık, tuzluluk ve patojenite gibi birçok olumsuz faktör tarafından etkilenmektedir. Zor şartlarda dayanıklı tarım ürünlerinin üretimi için hem biyotik hem de abiyotik faktörlerden sorumlu bitki genlerinin sinyal iletim yollarının anlaşılması gerekmektedir. Bu konuda daha az dayanıklı türlerde çalışılması veya değişik çevresel etkinin bitkide meydana getirdiği kompleks mekanizmaların anlaşılması konusuna ağırlık verilmesi gerektiği bilinmektedir (Swami *et al.* 1999).

Bitkisel hormonlar; bitkiler tarafından oluşturulan ya da bitkiye dışardan verilen ve çok küçük miktarlarda dahi (on milyonda bir) bitkide büyüme, gelişme ve diğer fizyolojik olayları olumlu yada olumsuz yönde etkileyebilen, meydana geldikleri yerlerde olduğu gibi diğer bitki kısımlarına taşınarak orada da etkinlik gösterebilen organik maddelerdir (Baktır *et al.* 1994; Dobrew *et al.* 2005). Bitki hormonlarının hücre içerisindeki temel işlevleri; genel olarak bitkinin hücre bölünmesi, hücre farklılaşması, organ oluşumu, tohum dormansisi ve çimlenmesi, yaprak ve organ senesensi ile absisyonu gibi temel gelişme basamaklarını düzenlemeleridir (Davies 1995). Bitki hormonları 5 gruba ayrılırlar. Bunlardan oksin, giberellin ve sitokininler bitki büyümesini teşvik ederken, etilen ve absisik asit (ABA) ise büyümeyi inhibe edici etki gösterirler (Kadıoğlu 1999). Bitki hormonlarının keşfedilip kimyasal yapılarının aydınlatılmasından sonra, bu hormonlara yapıca benzeyen kimyasal maddeler sentetik yolla üretilmeye başlanmıştır. Bu sentetik maddelerin bitkilere dıştan uygulandıklarında bitki hormonu gibi etki gösterdikleri belirlenmiş, büyüme ve gelişme olaylarındaki etkilerinden ve düzenleyici rollerinden dolayı bitki hormonları ile birlikte bu maddelerin hepsine birden ‘Bitki Büyüme Maddeleri’ ya da ‘Bitki Büyüme Düzenleyicileri’ (PGR) olarak adlandırılmışlardır (Bayraş 2005). Günümüzde bu bileşikler içerisinde salisilik asit (SA), jasmonik asit, brassinosteroidler, nitrik oksit (NO) ve poliaminler bulunmaktadır (Salisbury and Ross 1992; Kocaçalışkan 2004; Taiz and Zeiger 2005). Diğer taraftan, stres şartları altındaki bitkilerde stres ve stres çeşidinin algılanması, belirli hedeflere iletilmesi ve strese cevap oluşturulmasında PGR içerisinde en önemli rolleri olanlar ve günümüzde yoğun çalışmalar yapıldığı bileşikler ise ABA, etilen, SA, NO, poliaminlerden putresin (Put) ve son yıllarda memeli cinsiyet hormonlarıdır (Asthir *et al.* 2009; Atıcı *et al.* 2009; Shengchun Xu *et al.* 2010; Erdal and Dumlupınar 2010; Bingru Huang and Jane Larkindale 2004; Weiguan Li *et al.* 2009; Higgins and Wang 2006).

Absisik asit (ABA) bitkinin dinlenme fazına girişinden sorumlu bir düzenleyici olup, uyku halini (dormansi) teşvik eder ve tohumun çimlenmesini engeller. Yaprak, çiçek ve meyve dökülmesini hızlandırır ve stomaların kapanmasına neden olur. Yüksek konsantrasyonda bu özelliği ile ABA kurak dönemlerde hücreleri korur (Karakuş *et al.*

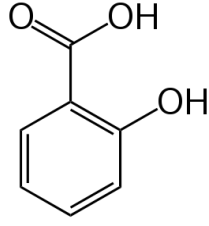
2008; Unyayar *et al.* 2002; Kireççi *et al.* 2006). Absisik asit temelde bir büyüme inhibitörü olarak bilinir. Fakat bu hormonun, bir bitkinin hayat döngüsü sırasında çeşitli rollere sahip diğer bitki hormonları gibi olduğu bitki fizyologlarının üzerinde hem fikir olduğu bir durumdur. Absisik asitin yapısı 1965'li yıllardan beri bilinmesine rağmen yüksek bitkilerde ABA sentezinin ayrıntıları henüz tam olarak anlaşılabilmiş değildir. Bu konudaki çalışmalar iki yol üzerinde odaklanmıştır. Bu yollardan ilki farnesil pirofosfat (FPP) modifikasyonu ile oluşan direkt yol, ikincisi ise violoksantin gibi karotenoid katabolizması tarafından oluşturulan indirekt yoldur. Bunlardan hangisinin diğerine göre daha önemli olduğu tam olarak bilinmemektedir. Fakat yüksek bitkilerde her iki yolun aynı anda gerçekleşmesinin mümkün olduğu ve her iki yolda da mevalonik asitin öncül bileşik olduğu rapor edilmiştir (Zeevaart and Creelman 1988).

ABA bitkilerin özellikle kuraklığa karşı koymasını sağlayan asıl iç sinyaldir. Bir bitki solmaya başlayınca yapraklarda ABA birikerek stomaların hızla kapanmasını sağlar. Bunun sonucu transpirasyon azalır ve su kaybı önlenir. ABA bekçi hücrelerinin plazma zarındaki dışa doğru yönelmiş potasyum kanallarının açılmasını artırır. Bunu, kalsiyum gibi ikinci mesaj taşıyıcılarını etkileyerek yapar. Potasyum kanallarının açılmasıyla, bekçi hücrelerinden büyük miktarda potasyum çıkışı olur. Suyun osmotik olarak kaybı, bekçi hücrelerin turgorunun azalmasına ve stoma deliğinin küçülmesine yol açar. Bazı durumlarda, su kıtlığı kök sistemini gövde sisteminden daha önce baskı altına alır. Köklerden yapraklara taşınan ABA erken uyarı sistemi olarak iş görür. Solgunluğa özellikle duyarlı olan mutantlar genelde ABA üretmezler (Poschenrieder, Gunse, B. and Barcelo, 1989).



Şekil 1.1. Absisik asidin genel yapısı

Salisilik asit (SA) veya diğer adıyla *orto*-hidroksi benzoik asit, bitki fenolikleri grubundan bir bileşiktir. Son çalışmalar, SA'nın çevresel streslere karşı, bitki savunma cevabı oluşmasında kullanılan, hormon benzeri doğal bir sinyal molekül olduğunu göstermektedir. Bunun yanında, bazı araştırmacılar SA'nın doğal bir bitki hormonu olduğunu da kabul etmektedirler. Çünkü SA bitki dokularında çok düşük konsantrasyonlarda sentezlenir ve bitkinin diğer dokularına taşınarak fizyolojik cevapların oluşumunu sağlar (Kocaçaliskan 2004). 1828'de Münih'te ilk kez salisilin, söğütten izole edilmiş ve sonra söğüt ağacının Latince ismi olan *Salix*'ten dolayı salisilik asit olarak isimlendirilmiştir (Mutlu 2005). SA bitkide aktif bir şekilde taşınabilir ve metabolizmaya katılır. Hem de dışsal uygulama noktasından bitkinin farklı dokularına kolaylıkla yayılabilir (Raskin 1992 a,b). Modern analitik teknikler kullanılarak, pek çok önemli bitki türünün salisilatları sentezledikleri bulunmuştur. SA'nın en yüksek seviyesi patojen istilasına uğramış bitki doku ve nekrozlarında belirlenmiştir (Raskin 1992 a,b; Durner *et al.* 1997; Mani and Metraux 1998). Birçok araştırmacı, SA'nın ultraviyole ışığı, kuraklık, soğuk ve tuz stresi gibi birçok çevresel streslerde bitki cevabını düzenlediğini göstermiştir (Sakhabutdinova *et al.* 2004; Atıcı and Nalbantoğlu 2003; Taşgın *et al.* 2003, 2006). Buna ek olarak, soğuk şartları altındaki bitkilere dışsal SA uygulaması, direk veya dolaylı olarak antioksidan enzim aktivitelerini değiştirebilmektedir (Taşgın *et al.* 2006). SA'nın antioksidan enzim aktiviteleri üzerine etkisi, H₂O₂ metabolizmasını düzenlemek ile ilişkili olduğu öne sürülmüştür (Janda *et al.* 2003). SA, zayıf bir deterjan özelliği gösterdiği ve hücre yüzeyinin elektrik yükünü değiştirdiğinden, hücre içerisindeki bazı antioksidan enzimlerin hücre dışına sekresyonunda rol oynadığı yönünde görüşler de bulunmaktadır (Minibaeva and Gordon 2003a). Ancak, SA'nın yukarıda belirtilen pek çok fizyolojik ve biyokimyasal etkilerine rağmen, içsel SA'nın bu mekanizmadaki düzenleyici rolü henüz tam olarak anlaşılamamıştır (Janda *et al.* 2003; Taşgın *et al.* 2006).



Şekil 1.2. Salisilik asidin genel yapısı

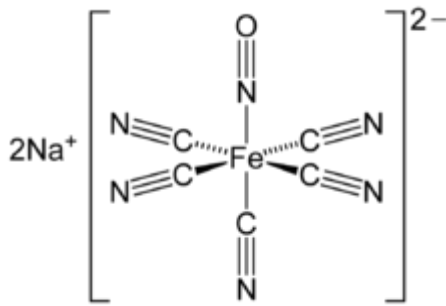
Uzun yıllardan beri canlılarda varlığı bilinen **nitrik oksit (NO: azot monoksit)**, son yıllarda hem memelilerde hem de bitkilerde anahtar bir sinyal molekül olarak dikkatleri üzerine çekmiştir. NO'nun bitkiler tarafından salındığı ve bitki büyümesi üzerine olan etkileri ancak 1970'lerin başında anlaşılmıştır (Anderson and Mansfield 1979; Klepper 1979). 1998 yılında NO'nun bitki savunma sinyali olarak tanımlanmasından sonra NO ve bitki biyolojisi ile ilgili çalışmalarda kayda değer bir artış olmuştur (Neill *et al.* 2002, 2003).

NO'nun bitki büyüme ve gelişmesinde, biyotik ve abiyotik stres koşullarında muhtemel rolleri günümüze kadar yapılan çalışmaların başlıca konuları arasındadır. Birçok biyolojik süreçte görev alan NO hem bitki savunma mekanizmasında bir sinyal molekül olarak hem de büyüme ve gelişmede hormonal özelliklere sahip bir bileşik olarak rol oynamaktadır (Dellodenne *et al.* 1998; Beligni and Lamattina 1999a). NO yaprak genişlemesi, tohum çimlenmesi ve deetiyolasyonu teşvik ederken, hipokotil ve internod uzamasını inhibe etmektedir (Beligni and Lamattina 2000). Bitki büyümesi üzerindeki etkide NO'nun konsantrasyonunun son derece önemli olduğu vurgulanmıştır (Anderson and Mansfield 1979). NO'nun yüksek konsantrasyonlarının (40-80 ppm) domates, marul ve bezelye bitkisinde büyümeyi inhibe ettiği, düşük konsantrasyonlarının (0-20 ppm) ise büyümeyi teşvik ettiği ileri sürülmüştür (Takahashi and Yamasaki 2002). Kuraklık, tuzluluk, düşük ve yüksek sıcaklık gibi çeşitli abiyotik stres koşulları altında da NO'nun etkileri araştırılmıştır. Bu tip stres koşulları altında reaktif oksijen türleri (ROT; Reactive Oxygen Species) açığa çıkmakta ve hücrelerde birçok oksidatif yıkım olayı başlamaktadır. Stres koşulları altında sinyal iletim yolunda görev alan NO aktif oksijen türleri ile karşılıklı etkileşim halindedir. NO tarafından lipid peroksidasyonunun

inhibisyonu, NO'nun potansiyel antioksidan rolünü işaret etmektedir (Beligni and Lamattina 1999b). Eksojen olarak uygulanan NO'nun, ayrıca bitkilerde katalaz, peroksidaz ve akonitaz enzimlerinin inhibisyonunda (Clark *et al.* 2000), hücre çeperi lignifikasyonunda (Ferrer and Ros Barcelo 1999), bekçi hücrelerinde iyon kanallarının düzenlenmesinde (Garcia Mata *et al.* 2003), kloroplast ve mitokondri fonksiyonlarında (Yamasaki *et al.* 2001), hücre ölümü (Pedroso *et al.* 2000a), senesens ve yaralanma sinyalinde (Leshem 1996; Leshem and Haramaty 1996; Hung and Kao 2003) önemli roller üstlendiği belirtilmiştir. NO gaz halinde bir bileşik olduğu için, araştırmalarda eksojen NO uygulamalarında kontrollü bir uygulama yapılamadığından, NO'nun yerine suda kolayca çözünebilen ve bitkide metabolize olduğunda NO üreten bir bileşik olan **sodyum nitroprussid (SNP)** kullanılmaktadır. Bu nedenle SNP'ye **NO donörü** de denilmektedir (Higgins and Wang 2006).



Şekil 1.3. Nitrik oksid'in genel yapısı



Şekil 1.4. Sodyum nitroprussid'in genel yapısı

Bir aminoasit türevi olan **poliaminlerin; putresin (Put)**, kadaverin (Cad), spermidin (Spd) ve sermin (Spm) olarak 4 tipi bulunmaktadır. Bunlardan putresin ve kadaverin bir diammin, spermidin bir triamin ve spermin ise bir tetraamindir (Smith 1979; Liu *et al.*

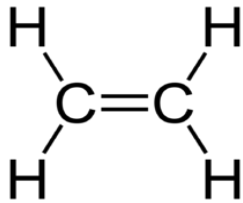
2000). Poliaminler bitki bünyesinde serbest olarak ya da fenolik asitlere, protein, nükleik asit gibi makromoleküllere veya diğer düşük molekül ağırlı bileşiklere bağlı olarak bulunurlar (Evans and Malmberg 1989; Bagni and Tassoni 2001). Poliaminler hücre farklılaşması, gelişmesi ve bölünmesine düşük konsantrasyonlarda etki ederler (Gallardo *et al.* 1996). Poliaminlerin çeşidinin dokuya ve gelişim evrelerine göre farklılık gösterdiği ve bağlı aminlere sadece kökte rastlandığı bilinmektedir (Bonneau *et al.* 1994). Çalışmalarda poliaminlerin hücre duvarı kesitlerinde, vakuollerde, mitokondri ve kloroplastlarda bulunduğu ortaya konmuştur (Torrigiani 1987; Serafini-Fracassini *et al.*, 1991; Tiburcio 1994). Poliaminler somatikembriyogenez de dahil olmak üzere sap veya gövde kalınlaşmasını, çiçeklenmeyi, kök büyümesi ve gelişmesini, yumru gelişimini, meyve olgunlaşmasını düzenlemektedirler (Hanzawa *et al.* 2000; Antognoni *et al.* 20002; Fos *et al.* 2003; Couée *et al.* 2004). Bitki dokularında poliaminlerden putresin genellikle en yüksek oranda bulunandır. Bazı çalışmalarda portakal, portakal suyu, mandalin, greyfurt suyu, ketçap, donmuş yeşil bezelye ve fermente soya sosu gibi test edilen besinlerin kilogramında 40 mg putresin bulunmuştur. Spermidin ise sperminden daha yüksek oranda bulunur. Baklagiller, armut, soya, karnabahar ve brokoli gibi besinlerde spermidin kilogramda 30 mg olarak bulunduğu tespit edilmiştir (Kalac and Karusava 2004).

Poliaminlerin seviyelerindeki artış özellikle potasyum eksikliğinde, su eksikliği, tuz stresi, asit stresi, oksijensizlik ve çevresel streslere karşı yanıt olarak ortaya çıkar (Flores *et al.* 1989). Çünkü poliaminler aminoasitdekarboksilaz reaksiyonuyla H tüketerek intrasellüler pH'ı ayarlar (Flores *et al.* 1995). Genel olarak poliamin miktarı meristematik ve aktif büyüme özelliğindeki dokularda yüksek oranda bulunurken senesensli dokularda düşük oranda bulunur (Neves *et al.* 2002). Poliaminler kısaca, doğrudan ornitin dekarboksilaz tarafından ornitinden veya dolaylı olarak arjinin dekarboksilaz tarafından arjininden sentez edilir (Sannazzaro *et al.* 2003).



Şekil 1.5. Putresinin genel yapısı

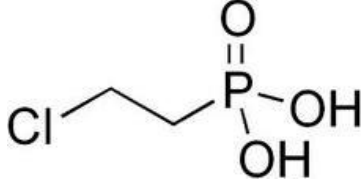
Etilenalken sınıfına giren bir gazdır ve doymamış bir hidrokarbon olup, karbonları arasında, çift bağ içerir (Şekil 1.6.) (Arshad and Frankenberger 2002). Etilenin kapalı formülü C_2H_4 'tür ve açık formülü $H_2C=CH_2$ şeklinde gösterilebilir. Etilenin IUPAC (Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği) adı 'eten'dir (Tüzün 1996). Etilen renksiz, yanıcı bir gazdır ve tatlı bir kokuya sahiptir. Etilen kaynama noktası - 103.71 °C, erime noktası -169.15 °C, donma noktası -181 °C ve molekül ağırlığı 28.05 olan bir gazdır (Zimmermann and Walzl 2009). Yoğunluğu 0,978 g/dm³ olan etilen lipidlerde suya oranla yaklaşık 14 kat daha yüksek derecede çözünebilir (Arshad and Frankenberger 2002). Pek çok bitki dokusunda etilen tamamen karbondioksit oksitlenebilir. Yüksek bitkilerin yaklaşık tüm organları etilen üretebilir. Ayrıca, üretim hızı doku tipine ve gelişim evresine bağlıdır. Bununla birlikte, meyve olgunlaşması, yaprak absisyonu ve çiçek senesensi sırasında da etilen üretimi artar. Ayrıca aşırı su, donma, hastalık ve sıcaklık veya kuraklık stresi gibi fizyolojik stresler ve yaralanma da etilen biyosentezini uyarır (Anonim 2003). Burg and Thimann (1959) etileni gaz kromatografisi ile incelemişler ve bu inceleme sonucunda etileni fizyolojik özellikleri bakımından bitki büyüme düzenleyicisi olarak adlandırmışlardır. Adam and Yang 1979 yılında etilen biyosentez yolunu keşfetmişlerdir.



Şekil 1.6. Etilenin genel yapısı

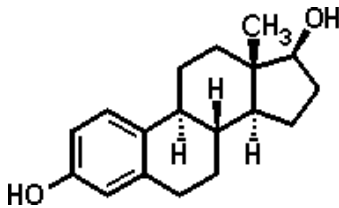
Etilen gaz halinde bir bileşik olduğu için, araştırmalarda eksojen etilen uygulamalarında kontrollü bir uygulama yapılamadığından, araştırmalarda etilen yerine suda kolayca

çözünebilen ve bitkide metabolize olduğunda etilen üreten bir bileşik olan **Etafon (Etaphone)** kullanılmaktadır. Bu nedenle etafona **etilen donörü** de denilmektedir (Saito *et al.* 1998). Ethephon, bitki tarafından absorbe edilen ve bitkinin gelişimini engelleyen etilenin hücreler arasında serbest kalmasını sağlamaktadır. Ethephon değişik bitki gelişim dönemlerinde uygulanarak bitkilerin büyüme ve gelişmelerini düzenlemektedir. Bitki tarafından absorbe edilen ethephon büyümeyi engelleyerek olgunlaşmayı hızlandırmaktadır. Aynı zamanda ticari olarak meyve ve sebzelerin olgunlaştırılmasında da kullanılmaktadır (Anonim 2003).



Şekil 1.7. Etafonun genel yapısı

Östrojenler, memeli hayvanların dişilerinde mensturasyon döngüsünde önemli rol oynayan bir grup steroid hormondur. Östrojenler hem erkek hem kadınlarda bulunmakla beraber, üreme yaşında kadınlarda seviyeleri çok daha yüksektir. Memelilerde bulunan üç ana östrojen,östradiol, östriol ve östron'dur. Östrojenler büyüme, farklılaşma ve işlevsel yönden hedef dokularda anahtar düzenleyici olarak görev yaparlar. En etkinovaryum östrojeni olan **östradiol**dür. Sonra sırasıyla östriol ve en az etkili olanöstrondur. Bu hormonlar vücutta enzimatik reaksiyonlarla androjenlerden sentezlenirler.



Şekil 1.8. Östradiolün genel yapısı

Memeli cinsiyet hormonlarının bitkilerde de bulunduğunu ve sentezlendiğini ilk olarak 1926 yılında Dohrn *et al.* ileri sürmüşlerdir. Daha sonra 1930'lu yıllarda Butenandt and Jacobi (1933) and Skarzynski (1933)'de bu hormonların bitkilerde varlığını bildirmiştir. Bitkilerde memeli steroid hormonlarını belirlemek için, çok düşük miktarlarda bulunan bu bileşikler belirleyecek ve adlandıracak çok hassas ve güçlü cihazlara ihtiyaç duyulur. Bitkilerde memeli cinsiyet hormonlarını belirlemeye yönelik yapılan ilk çalışmalarda, Bennet *et al.* (1966) hurma ağacı tohumlarından östronu izole ettiler. Rompuy and Zeevaart (1979) kober renk reaksiyonunu adlı analitik metodu kullanarak östrojen benzeri maddeleri belirlediler. Leboeuf *et al.* (1964) *Holarrhena floribunda* yapraklarında, Gawienowski ve Gibbs (1968) ise elma tohumlarında progesteronun varlığını TLC (ince tabaka kromatografisi) ve GC (gaz kromatografisi) metodlarını kullanarak tesbit ettiler. TLC ve GC çok güvenilir bir metod olmadığından daha sonra radioimmunoassay metodu (RIA) kullanılmaya başlanmıştır. RIA kullanılarak 520'den fazla familya ve 128 tür üzerinde yapılan çalışmalarda, milyarda bir seviyesinde hassas belirlemeler yapılmıştır. Simons and Grinwich (1989), çalışılan bitkilerin yaklaşık %80'inde androsteron ve progesteron, %70'inde testosteron ve dihidrotestosteron ve %50'sinde östrojenlerin bulunduğunu bildirmişlerdir. Yapılan çalışmaların sonucunda steroidlerin miktarının bitkinin türüne, organına ve gelişimine bağlı olarak değişebileceği belirlenmiştir. RIA metodunu kullanarak *Gingko biloba*, *Zea mays* ve *Brassica campestris* bitkilerinde ve bu bitkilerin polenlerinde östrojen ve β -östradiol varlığını belirlemişler ve aynı araştırmacılar daha sonra da çiçeklenme sürecinde total östrojen ve β -östradiol konsantrasyonlarındaki değişimi göstermişlerdir (Zhang *et al.* 1991). İlk olarak belirlendikleri 1926 yılından günümüze kadar bitkilerde memeli cinsiyet hormonlarının oluşumu ve fizyolojik fonksiyonları üzerine çok sayıda araştırma yapılmış olmasına rağmen, onların metabolizmaları ve etki mekanizmaları halen tam olarak aydınlatılamamıştır. Özellikle generatif organlarda tespit edilmelerinden dolayı çiçeklenme ve üreme üzerine etkili oldukları düşünülmekte ve bitki büyüme regülatörleri olarak kabul görmemektedirler (Janeczko and Skoczowski 2005; Li *et al.* 2006; Gruz *et al.* 2008; Novak *et al.* 2008, Simerski *et al.* 2009).

Bitkiler hayatları boyunca sıra dışı sıcaklıklar, fazla ışık, hava kirliliği, kuraklık, tuzluluk, patojenler, ağır metaller ve çeşitli kimyasallar gibi pek çok elverişsiz çevre şartlarına maruz kalırlar (Shim *et al.* 2003; Gratao *et al.* 2005). Tüm bu olumsuz faktörler bitki hücrelerinde oksidatif strese neden olur. Oksidatif stres altında bitki bünyesine zarar veren **reaktif oksijen türleri (ROS)** üretilir (Minibaeva and Gordon 2003). Oksidatifstres de singlet oksijen ($^1\text{O}_2$), hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit anyonu (O_2^-) ve hidroksil radikallerini ($\cdot\text{OH}$) içeren reaktif oksijen türlerinin zarar veren içsel konsantrasyonlara yükselmesine neden olur. Süperoksit gruplarından hızlı bir şekilde oluşan singlet oksijen, hücre zarlarının glikolipid, fosfolipid, sterol ve gliserid yapısındaki doymamış yağ asitleri ile reaksiyona girerek peroksitler, aldehitler, hidroksi yağ asitleri ve pentan gibi çeşitli lipid peroksidasyon ürünlerini oluştururlar. **Süperoksit anyonu (O_2^-)**, oksijene bir elektronun aktarılmasıyla oluşur. Bu reaksiyonenzimatik olarak çeşitli organellerde meydana gelebilir. Moleküler oksijenin, oksidatiffosforilasyon esnasında NADPH-oksidaz veya ksantin-oksidaz gibi enzimlerinkatalizörlüğünde süperoksit radikali meydana gelir (Stahland Sies 2002). Hidrokinonlar, flavinler, tiyoller, katekolaminler, ferrodoksinler gibi yüzlerce molekül aerobik ortamda oksitlenirken süperoksit oluşumuna neden olurlar. Çeşitli dehidrogenazlar ve oksidazlar olmak üzere yüzlerce enzimin katalitik etkisi sırasında ürün olarak süperoksit radikali oluşabilir. Plazma membranlarında da süperoksit üreten NAD(P)H oksidaz enziminin varlığı belirlenmiştir(Vionella and Macri 1991).Süperoksit radikali oldukça reaktiftir ve lipidlerin yanı sıra diğer biyokimyasal bileşenlerin de oksidasyonuna sebep olur. Bu radikalin lipid peroksidasyonu, membran hasarı, hücresele toksisite ve DNA'daki tek zincir kırıklarıyla ilişkisi olduğu belirtilmiştir (Fridovich 1995). Ayrıca süperoksit radikali, hidrojen peroksitle reaksiyona girerek çok daha toksik bir molekül olan hidroksil radikalini üretebilir. Haber-Weiss reaksiyonu olarak bilinen bu reaksiyon demir ve bakır gibi metallerin katalizörlüğünde oldukça hızlı gerçekleşir. Süperoksit radikali, yüksek katalitik etkiye sahip süperoksit dismutaz (SOD) enziminin etkisiyle dismutasyona girerek konsantrasyonu azalır. SOD tarafından katalizlenen bu reaksiyon dismutasyon tepkimesi olarak adlandırılır (Halliwell 1984).**Hidroksil radikali ($\cdot\text{OH}$)**, en aktif ve en toksik oksijen radikali olup üretildiği her yerde birçok molekül ile reaksiyon verir. Hidroksil radikali, iyonlaştırıcı radyasyonun (x-ışınları) etkisiyle su moleküllerinin homolitik kırılması sonucunda

oluştugu gibi hidrojen peroksit molekülünün metaller ile reaksiyonu sonucunda eksik indirgenmesi ile de oluşabilir (Stahl and Sies 2002). Hidroksil radikalının sebep olduğu en önemli hasar, lipid peroksidasyonu olarak bilinen serbest radikal zincir reaksiyonudur. $\cdot\text{OH}$ 'ın başlıca hedefi yağ asitleri olup zar lipidlerinin peroksidasyonu zarın yapısını bozar ve geçirgenliğini artırıp hücre ölümüne sebep olabilir (Nishiyama *et al.* 1998). **Hidrojen peroksit (H_2O_2)**, oksijenin enzimatik olarak iki elektron ile indirgenmesiyle ya da süperoksitlerin enzimatik veya enzimatik olmayan dismutasyon tepkimeleri sonucu oluşur. Süperoksitin oluştuğu yerlerde önemli miktarda H_2O_2 'de üretilir. Fotosentetik elektron transport zinciri H_2O_2 'nin üretiminden sorumludur. H_2O_2 'nin üretildiği başka bir kaynak fotorespirasyonla glikolatın oksidasyonunun meydana geldiği, peroksizomlardır. Ayrıca biyokimyasal olarak oksijenin iki elektronlu indirgenmesinin gerçekleştiği solunum işlemleri sırasında ve genellikle flavoproteinlerle gerçekleştirilen reaksiyonlarla da oluşturulur (Slesak *et al.* 2007). Yapısında paylaşılmamış elektron içermediğinden radikal özellik taşımaz. H_2O_2 'nin oksitleyici bir tür olarak bilinmesinin nedeni demir ve bakır gibi metal iyonlarının varlığında hidroksil radikalının öncülü olarak davranmasıdır. H_2O_2 özellikle proteinlerdeki hem grubunda bulunan demir ile tepkimeye girerek yüksek oksidasyon düzeyindeki reaktif demir formlarını oluşturur. Bu formdaki demir çok güçlü oksitleyici özelliklere sahip olup, hücre zarlarında lipid peroksidasyonu gibi radikal tepkimeleri başlatabilir. Oksitleyici özelliği nedeniyle biyolojik sistemlerde oluşan H_2O_2 'nin ortamdan uzaklaştırılması gerekir. Bu görevi hücrelerdeki önemli antioksidan enzimler olan katalaz ve peroksidaz yerine getirir (Halliwell 1984).

Organizmadaki serbest radikal oluşumunun artışına veya antioksidan savunma sisteminin yetersizliğine bağlı olarak oksidan-antioksidan dengesinin radikaller lehine bozulması sonucunda, hücre içerisinde biyomoleküller ile serbest radikaller kolaylıkla reaksiyona girerler ve zincirleme reaksiyonları başlatarak yeni serbest radikal oluşumuna neden olurlar (Augustin *et al.* 1997). Oluşan serbest radikaller, biyolojik sistemlerde çeşitli anormalliklere ve çok önemli biyokimyasal-fizyolojik hasarlara neden olduğu belirlenmiştir. Bu serbest radikaller; proteinler, lipidler, karbohidratlar ve nükleik asitlerin doğal yapılarının bozulmasına sebep olabilmektedirler (Şimşek 1999;

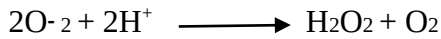
Kuru 2007). ROS seviyesini kontrol etmek için bitkiler birkaç enzimatik ve non-enzimatik antioksidant sistemleri geliştirirler. Bazı stres şartları altında antioksidant kapasitesi oksidatif hasarların zararlı etkilerini azaltmaya yeterli olmayabilir. Bu stresi yasayan bitkiler, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), peroksidaz (POX) vb. antioksidant enzimlerin aktivitelerini düzenleyen bir mekanizmaya sahiptir (Gechev *et al.* 2002; Gratao *et al.* 2005).

Serbest radikallerin uyardığı hücre yıkımında önemli bir mekanizma da doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımı olan lipid peroksidasyonudur (LPO). **Lipid peroksidasyonu** membran bütünlüğünün yok olmasına, hücrenin elektrolitlere geçirgenliğinin artmasına neden olur. Özellikle Ca ve Na iyonlarının hücre içerisine kontrolsüz geçişi, hücrenin enerji oluşturan mekanizmalarını etkileyebilir. İntrasellüler Ca iyonlarındaki artış; protein ve lipidlerde daha fazla hasara neden olabilecek proteaz ve fosfolipazı aktive eder. Bu aynı zamanda DNA'da yapısal hasara ve hücre ölümüne neden olabilecek enzim inaktivasyonuna neden olabilir (Halliwell 1994). ROT'lar direkt hasara neden olabildikleri gibi birbirlerini etkileyerek, en reaktif radikal olan hidroksil radikalini ($\cdot\text{OH}$) oluşturmakta ve doymamış yağ asitlerine etki etmektedirler (Wood and Smith 1991). Çoklu doymamış (poliansatüre) yağ asitlerinin oksidatif yıkımı, lipid peroksidasyonu olarak bilinir ve oldukça zararlıdır. Çünkü kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler. Lipid peroksidasyonu ile oluşan membran hasarı geri dönüşümsüzdür (Akkus 1995). Doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonunda, malondialdehid (MDA) meydana gelir (Yılmaz *et al.* 2003). MDA yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü değildir, fakat lipid peroksidasyonunun derecesi ile iyi bir korelasyon gösterir. Bu sebeple organizmada oluşan LPO düzeyini ölçmek için MDA seviyelerinin ölçümü, araştırmalarda sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. MDA, tiyobarbitürik asit ile pembe renkli bir kompleks oluşturmakta ve oluşan bu çözeltinin absorbans değerlerinden LPO'nun derecesi saptanmaktadır (Yılmaz *et al.* 2003; Kuru 2007).

Antioksidan terimi, zararlı bir forma dönüşmeksizin Reaktif oksijen türleri (ROS)'ni temizleyebilen bileşikler için kullanılmaktadır. Bitki dokuları normal ve stres

koşullarında hücreleri ROS etkisinden korumak için, bazı enzimler (SOD, CAT ve POX gibi) ve düşük moleküler ağırlıklı antioksidanlar (glutasyon, askorbat, karotenoidler, tokoferoller) ihtiva ederler. Antioksidan enzimler koordineli bir şekilde ROS'ları temizlerler veya onları daha az toksik olan bileşiklere metabolize ederler. Bitkiler apoplastik bölge dahil bütün hücre alt yapılarında antioksidan sisteme sahiptirler (Srivalli *et al.* 2003; Jung 2004; Ramachandra *et al.* 2004; Pinheiro *et al.* 2004).

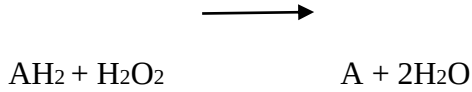
Bitki hücrelerinde bulunan önemli bir antioksidan **süperoksid dimutaz** (SOD; E.C 1.15.1.1) enziminin, süperoksid radikalini, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene çevirebildiği anlaşılmıştır (Sairam and Srivastava 2000; Eyidoğan *etal.* 2003; Minibaeva and Gordon 2003).



SOD'un biri sitoplazmada, diğeri mitokondride olmak üzere iki izoenzimi vardır. Ökaryotlardaki mitokondriyal SOD, karakteristik Mn^{++} muhtevası ve amino asit dizilisi bakımından birçok bakterininkine benzer. Buna karşılık sitoplazmadaki ise tamamen farklı yapıya sahiptir ve Cu^{++} ile Zn^{++} iyonu ihtiva eder. Bu enzimler oldukça yüksek konsantrasyonda ve aktif bulunur. Çünkü mitokondride kullanılan oksijenin %1 ile 5 arası süperokside dönüşmekte ve ancak yüksek bir SOD aktivitesi tarafından bertaraf edilebilmektedir. Birçok çevresel ve biyotik streslerde gerek apoplastik gerekse toplam hücrel SOD miktarının üretiminde artış olduğu belirlenmiştir (Hernandez *et al.* 2001; Minibaeva and Gordon 2003a; Eyidoğan *et al.* 2003; Mutlu *et al.* 2009).

Peroksidaz (POX; E.C 1.11.1.7), H_2O_2 'yi kullanarak fenoller ve hidrokinonlar gibi çok sayıda aromatik bileşenlerin dehidrojenasyonunu katalizleyen (Bergmeyer and Grabl 1983) ve *HEM* prostetik grubuna sahip bir proteindir (Banci 1997; Kim *et al.* 2000). Çoklu moleküler formlara ve geniş bir hücre altı dağılımına sahip olan POX, bitkilerde büyük oranda bulunur. POX, elverişsiz çevresel faktörler altında üretilen zararlı oksijen radikallerinin seviyesini düzenler ve bitki hücresinin en önemli koruyucu enzimlerinden

birisidir (Bakardjieva and Christov 1996). Molekül ağırlıkları 35-100 kDa arasında değişmektedir. POX'lar aşağıdaki reaksiyonu katalizlerler.

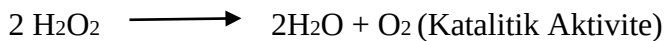


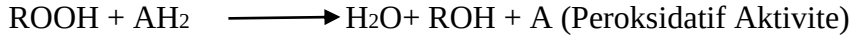
POX'ların spesifik aktivite, substrat ilgisi, kofaktörler, inhibitörlere hassasiyet ve optimum pH gibi biyokimyasal özellikleri farklı olan çok sayıda izoenzimleri bulunur. POX'lar organizmaya bağlı olmakla birlikte 3 sınıfa ayrılabilirler (Banci 1997).

1. Hücre içi (simplastik) peroksidazlar
2. Hücre dışı (apoplastik) peroksidazlar
3. Salgılanan bitki peroksidazları

Düşük sıcaklık, tuzluluk, parazit enfeksiyonu, patojenler, UV-ışık tesirleri gibi çeşitli stres faktörlerinden yüksek seviyede etkilenen POX aktivitesi, bu enzimin stres enzimi olarak anılmasına sebep olmuştur (Kerby and Somerville 1992; Bakardjieva and Christov 1996; Chanda and Singh 1997; Lee and Lin 1996a,b; Kim *et al.* 2000; Taşgın *et al.* 2006).

Katalaz (CAT; E.C 1.11.1.6) bitki dokularında çok yüksek dağılım göstermektedir. Aerobik organizmaların hepsinde omurgalılarda, omurgasızlarda, bitkilerde ve mantarlarda bulunmaktadır (Bergmeyer and Grabl 1983). CAT yüksek konsantrasyondaki H_2O_2 'nin 2 elektronunu kullanarak su ve oksijene indirgenmesini katalizleyen demir porfirin içeren tetramerik ve yüksek molekül ağırlığına sahip bir enzimdir (McChung 1997; Chaudiere and Ferrari 1999). Aynı zamanda CAT, düşük H_2O_2 konsantrasyonlarında alkoller, askorbat ve fenol içeren indirgenmiş substratları kullanarak peroksidatif aktivite gösterebilir (Chaudiere and Ferrari 1999). CAT'ın görev aldığı reaksiyonlar aşağıdaki gibidir.





Pek çok bitki hücresinde enzimin büyük bir kısmı, H_2O_2 'nin yüksek olduğu peroksizomlarda bulunur. CAT çok az miktarda mitokondri matriksinde de bulunur. CAT'ın bitki dokusunda H_2O_2 'nin uzaklaştırılmasında önemli rol oynadığı belirtilmiştir (Patkowski and Urbanek 2003). CAT'ın temel fonksiyonu, moleküler O_2 mevcudiyetinde metabolizmanın bazı kademelerinde sentezlenen radikal karakterli H_2O_2 'nin ve ROOH gibi bir peroksitin radikalliğini gidererek özellikle membranlarda oluşabilecek geri dönüşümsüz hasarları engellemektedir. Zira H_2O_2 , singlet oksijen ve hidroksil radikallerinin potansiyel kaynağıdır (Scandalios 1993; Chaudiere and Ferrari 1999).

Apoplast (ekstraselular alan) hücre çeperini de içine alan bitki hücrelerinin ekstraprotoplastik matriksi olarak tanımlanır (Dietz 1997). Apoplast, bitkinin içsel bir çevresidir. Bizim vücudumuz lenf ve doku sıvısı gibi içsel bir çevreye sahip olmasıyla benzer şekilde, bütün bitki hücreleri de apoplast (ekstarselular ve interselular alanlar) adı verilen sıvı bir ortamla kuşatılır. Apoplast, gelişme, beslenme, sinyal iletimi ve savunma gibi pek çok olayın meydana geldiği dinamik bir bölgedir. Bizim vücudumuzdaki içsel çevrenin çok önemli fonksiyonlarına karşılık, apoplastın dinamik fonksiyonu da bitki hayatının devamında pek çok şeyden önce gereklidir (Kim *et al.* 2000; Atıcı and Nalbantoğlu 1999, 2003; Taşgın *et al.* 2006).

Apoplastik matriks birçok enzimatik ve enzimatik olmayan bileşenleri içerir (Dietz, 1997; Atıcı and Nalbantoğlu 1999, 2003; Taşgın *et al.* 2006). Bunlar iyonlar, şekerler, aminoasitler, fenolik bileşikler ve organik asitler, proteinler (peroksidazlar ve hidrolazlar gibi) ve hücre çeperi bileşenlerini (sellulaz, pektin ve glikoproteinler gibi) içine alır. Apoplastik enzim aktiviteleri büyüme şartlarına bağlı olarak değişir (Brune *et al.* 1994; Blinda *et al.*, 1997; Ramanjulu *et al.* 1999). Apoplastın bitkinin intrasellular alanından (simplast) çok daha düşük miktarda çözünebilir protein ve enzim içeriğine (Dietz 1997) ve oldukça düşük pH(5-6)'ya sahip olduğu düşünülür (Grignon and Sentenac 1991). Apoplastik alanda meydana gelebilecek bir değişiklik simplasta (hücre

içi) zarar verebilir sonuç olarak hücre ölümüne sebep olabilir. Apoplast çevresel sinyalleri algılayan ilk bitki bölümü olmasından dolayı, plazma membranı ile birlikte çeşitli çevresel sinyallerin fark edilmesine ve uyum sağlanmasına, aynı zamanda cevabın oluşmasına da karıştığı ileri sürülmüştür (Gao *et al.* 2004). Tuzlu ortamlarda büyüme şartları, ağır metaller, soğuk stresi, hava kirliliği, patojen saldırıları ve diğer stres faktörlerinin apoplastın protein kompozisyonunu değiştirdiğini göstermiştir (Brune *et al.* 1994; Ramanjulu *et al.* 1999; Atıcı and Nalbantoğlu 1999, 2003; Taşgın *et al.* 2006).

Stres toleransını düzenleyen sinyal moleküllerle yapılan çalışmalar, bitkilerin olumsuz çevrelere nasıl uyum sağladıklarını anlamamıza büyük katkı sağlamaktadır. Ancak, literatürde stres toleransını düzenleyen sinyal bileşiklerle (ABA, etilen, nitrik oksit, salisilik asit vb.) yapılan çalışmalar incelendiğinde, her bir sinyal bileşiği farklı bir bitkide çalışılmış ve o sinyal bileşiğinin çalışıldığı bitkideki düzenleyici mekanizmaları açıklanmaya gidilmiştir. Özetle tek bir bitkide bu bileşikler birlikte çalışılmadığından, bir bitki strese cevap oluştururken sinyal iletim yolları hakkında belirgin bir fikir edinilememektedir. Böyle bir durumda literatürde önemli bir boşluk olduğu görülmekte ve şöyle bir soru akla gelmektedir. Stres toleransını düzenleyen bu sinyal bileşikleri, bir bitkide, aynı sinyal iletim yolunu mu kullanmaktadırlar? Yoksa strese cevap esnasında her biri farklı bir tarzda etki ederek ayrı sinyal iletim yolunu mu kullanmaktadırlar? Bu yüzden bu çalışmada bitkilerde stres toleransını düzenleyen bileşiklerden bazıları (ABA, etilen, nitrik oksit, putresin, salisilik asit ve östrojen) tek bir bitkide çalışılarak, kullandıkları sinyal iletim yolları açıklanmaya çalışılmıştır. Bu amaçla buğday bitkisi (*Triticum aestivum*) kontrollü normal şartlarda yetiştirilmiş ve her seferinde farklı bir sinyal bileşiği kullanılarak, apoplastik ve simplastik antioksidan enzimlerin aktiviteleri, lipid peroksidasyonu ve hidrojen peroksit içeriği ile apoplastik ve simplastik proteinlerin elektroforezi (PAGE) çalışılmış ve elde edilen bulgular kontrolleri ile karşılaştırılmıştır. Böylece çalışmada kullanılan sinyal bileşiklerinin sinyal iletim yolları hakkında edinilen bulgular kullanılarak, ortak sinyal iletim yolu kullananlar ve farklı sinyal iletim yolu kullananlar belirlenmeye çalışılmıştır. Çalışmadan elde edilen

bulguların büyük bir çoğunluğu literatür için yeni olduğundan çalışma özgün ve literatürde önemli bir boşluğu dolduracağı düşünülmektedir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Uzun yıllardan beri insan vücudunda biyokimyasal streslerin belirlenmesinde **hidrojenperoksitin (H_2O_2)** bir biyolojik işaret olarak kullanılması (Halliwell *et al.* 2000) ve oksidatif stresler sırasında miktarının artması, bitkilerle ilgilenen bilim insanları için bitkilerde de bu molekülün stresin bir işareti olduğu fikrini uyandırmıştır (Cheeseman 2006). Mevcut bilgiler, bitkilerdeki önemli sinyal dizinlerinde H_2O_2 'nin var olduğunu göstermektedir. Bu olaylara patojen saldırısını (Wojtaszek 1997; Orozco-Ca'rdenas *etal.* 2001; Kachroo *et al.* 2003), stoma hareketleri (Chen and Gallie 2004), kazanılmış sistemik direnci (Chen *et al.* 1993) ve programlanmış hücre ölümlerini (Levine *et al.* 1994) örnek verebiliriz. Bununla birlikte H_2O_2 'nin hücrelerde hızlı bir şekilde metabolize edilmesi ve dokulardaki gerçek seviyesinin ne olduğu ile ilgili belirsizlikler, strese verilen cevap mekanizmalarını anlamayı zorlaştırmaktadır.

Bitkisel dokularda H_2O_2 konsantrasyonunun düşük olduğunu gösteren birçok çalışma mevcuttur. Örneğin, bezelyelerle yapılan bir çalışmada dışarıdan 6–8 mM H_2O_2 uygulandığında, bitkide doku hasarlarına ve hücre ölümlerine sebep olduğu gibi SO (Bhattacharya *et al.* 2004) ile Rubisco'nun (Badger *et al.* 1980) inhibisyonunu da sağladığı görülmüştür (Levine *et al.* 1994). Diğer taraftan canlıların çoğu gibi bitkilerde de H_2O_2 'yi çarpıcı seviyede metabolize eden mekanizmalar mevcuttur. Örneğin, 10 mM H_2O_2 ile muamele edilen hücre bu miktarı 10 dakikadan daha az sürede metabolize edebilmektedir (Levine *et al.* 1994). Bitkisel dokularda H_2O_2 'nin düşük olması ile ilgili başka çalışmalar da vardır. Bu çalışmalardan birinde tütün (Patykowski and Urbanek 2003) yapraklarında normal şartlarda gram dokuda 0.15 μ mol, şeftali meyve dokusunda 0.35 μ mol (Brennan and Frenkel 1977) ve mangrov bitkisinde 0.067 μ mol (Parida and Das 2005) olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmaların aksine, yaprağın gram dokusundaki H_2O_2 seviyesinin çok daha yüksek olduğunu belirten çalışmaları da görmekteyiz. Örneğin, Chaparzadeh *et al.* (2004), oda şartlarında gelişimini sürdüren kadife çiçeğinde (*Calendula officinalis*) gram dokuda 6 μ mol gibi yüksek H_2O_2 olduğunu rapor etmiştir. Benzer başka bir çalışmada oda şartlarında yetiştirilen *Phragmites australis* bitkisinin yabani formlarının yapraklarında gram dokuda 5 ile 15 μ mol H_2O_2 belirlenmiştir.

(Velikova and Loreto 2005). Bu çalışmalarda H_2O_2 'nin seviyesiyle ilgili farklı değerlerin verilmesi biyolojik çeşitlilikten ziyade, deneylerde kullanılan metodoloji ve deneysel belirsizliklerden kaynaklanmaktadır (Cheeseman 2006). Örneğin, mısırla yapılan çalışmalardan birinde gram dokudaki H_2O_2 miktarı 20 μmol (Tewari *et al.* 2004) bulunurken, başka bir araştırmacı 0.1 μmol (Kim *et al.* 2003) olarak bulmuştur. Her iki araştırmacının çalışmalarına baktığımızda, farklı metotlarla H_2O_2 miktarını belirlediklerini görmekteyiz.

Lipid peroksidasyonu, hücre zarı lipidlerinin serbest radikallerle (süperoksit anyonu, singlet oksijen, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali) etkileşmesi sonucu ortaya çıkar ve sonuçta hücresel zarların bozulmasına yol açar. Bu peroksidasyonun derecesi, hücresel düzeyde stresin sebep olduğu hasarın hem ölçütü hem de yansıması olduğu kabul edilmektedir (De Azevedo Neto *et al.* 2006). Stres şartlarında, doymamış yağ asitlerinin peroksidasyon ürünü olarak ortaya çıkan malondialdehit (MDA) miktarındaki artış, hücre zarlarının yapısal bütünlüğünün bozulduğunu gösteren iyi bir indikatördür (Posmyk *et al.* 2005). Yüksek sıcaklığa maruz bırakılmış arpa yapraklarının membran lipid peroksidasyonu düzeyinde artış belirlenmiştir (Kappen 1981). Bazı ağır metallerin toksik dozlarının bitkilerde lipid peroksidasyonu uyardığı tespit edilmiştir (De Vos *et al.* 1989; 1991; Çakmak *et al.* 1991; Çınar 2005). Tuzluluğa dayanıklılığı farklı iki fasulye çeşidiyle yapılan bir çalışmada, tuz uygulamasıyla hassas varyetede daha fazla olmak üzere iki çeşitte de MDA seviyesinin arttığı belirlenmiştir (Yaşar *et al.* 2008). Bazı asma (*Vitis vinifera*) çeşitlerine uygulanan kuraklık stresinin lipid peroksidasyonda önemli derecede artışa sebep olmuştur (Yağmur 2008). Kuraklık stresıyla ilgili diğer bir çalışmada iki kahve türü (*Coffea arabica* ve *C. liberica*) orta derecedeki kuraklık şiddetinde lipid peroksidasyonu görülmezken, şiddetli kuraklık stresinde, özellikle kuraklığa daha duyarlı olan *C. arabica* türünde, MDA birikiminin daha fazla olduğu gözlenmiştir (Cai *et al.* 2005). Su stresi altında büyütülen buğday fidelerinde lipid peroksidasyonunda büyük bir artışın olduğu kaydedilmiştir (Tatar and Gevrek 2008).

Bitkilerde antioksidan enzim sisteminin önemli bir elamanı olan **katalaz (CAT)** enziminin aktivitesine etki eden faktörler (tuz, patojen, soğuk, sıcaklık, kuraklık ve sustresi) ile ilgili birçok çalışma bulunmaktadır. Üç farklı yulaf çeşidine bir fungalpatojeni muamele edildikten 24 saat sonra, birinde CAT aktivitesi yükselirken, 2. örnekte aktivitenin azaldığı belirlenmiştir (Vanacher *et al.* 1998a). Tuz stresi altındabüyütülen buğday, pirinç ve salatalık ile yapılan çalışmalarda, her üç bitkide de CATaktivitesinin düştüğü gözlenmiştir (Keles and Öncel 2002; Shim *et al.* 2003). Ancak, tuzstresi altında yapılan diğer bir çalışmada, Sinameki (*Cassia angustifolia*) ve soya fasulyesi bitkilerinde CAT aktivitesi önemli derecede yüksek olduğu gözlenmiştir (Agarwal and Pandey 2004; Ghorbanli *et al.* 2004). Tuz stresine toleransları farklı iki çeşit dut bitkisiyle yapılan bir çalışmada ise, CAT aktivitesinin tuza dayanıklı varyetede daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Sudhakar *et al.* 2001). Kuraklık, yüksek sıcaklık ve su stresine maruz bırakılmış buğday bitkisinde CAT aktivitesinde çok büyük bir düşüş tespit edilmiştir (Keles *et al.* 2002). Kuraklık stresi uygulanan mercimek bitkisinde kökdokusunda CAT aktivitesinde artış gözlenmiştir (Öktem *et al.* 2008).

Bitkilerde antioksidan enzim sisteminin diğer bir elamanı olan **peroksidaz (POX)** aktivitesine etki eden faktörlerle (tuz, patojen, soğuk, sıcaklık, kuraklık, ozon, besin ve su stres) ilgili birçok çalışma bulunmaktadır. Fasulye bitkisi, asit yağmuru, asit yağmuru + spermidin veya asit yağmuru + spermin muamelesinde, ilk saatlerde POXaktivitesi yüksekken, ilerleyen saatlerde aktivitenin düştüğü görülmüştür (Velikova *etal.* 2000). Ladin ağacı yapraklarının apoplastında POX aktivitesinin yüksek olduğutest edilmiştir (Otter *et al.* 1997), ancak kuraklık stresi ve ozon muamelesi uygulandığında, hücresel ve apoplastik POX aktivitesinin düştüğü belirlenmiştir (Kronfuss *et al.* 1996). Yüksek ve düşük nitrat uygulamalarında, genç ve olgun buğday bitkilerinin hücresel ve apoplastik POX aktivitesi karşılaştırıldığında, her iki durumdada, hücresel POX aktivitesinin apoplastik POX aktivitesinden yüksek olduğubulunmuştur (Padu 1999). Yulaf bitkisi, fungal bir patojen ile enfekte olduğundahücresel ve apoplastik POX aktivitelerinin düştüğü (Vanacker *et al.* 1998), bunakarşılık patojen ile enfeksiyonlu buğday ve arpada apoplastik POX aktivitesinin arttığı gözlenmiştir (Bishop 2002). Başka bir çalışmada, domates bitkileri patojenle

muamele edildiğinde, apoplastik POX aktivitesinin yükseldiği belirlenmiştir (Patykowski *et al.* 2003). Kışlık arpa yapraklarında ise apoplastik POX aktivitesinin hücrel aktiviteye göre oranının %394 gibi yüksek bir değerde olduğu ileri sürülmüştür (Baet *et al.* 2000). Hindiba (*Cichorium intybus*) bitkisiyle yapılan bir çalışmada ışık-karanlık periyodunda apoplastik POX aktivitesi, ışıktayken, karanlıkta düştüğü görülmüştür (Boeuf *et al.* 1999; 2001). Buğday, çeltik, sinameki (*Cassia angustifolia*) bitkisi ve soya fasulyesinde POX aktivitesi tuz stresi ile önemli derecede artmıştır (Lin and Kao 2000; Sakhabutdinova *et al.* 2004; Agarwal and Pandey 2004; Ghorbanli *et al.* 2004). Tuz stresine toleransları farklı iki çeşit dut bitkisiyle yapılan bir çalışmada ise apoplastik POX aktivitesinin tuza dayanıklı varyetelerde daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Sudhakar *et al.* 2001). Son olarak tuz toleransları farklı iki buğday çeşidinde apoplastik POX aktivitesi tuz uygulamaları ile dayanıklı çeşitte artarken, hassas çeşitte düştüğü belirlenmiştir (Mutlu *et al.* 2009).

Bitkilerde antioksidan enzim sistemi içerisinde önemli bir görevi olan **süperoksit dismutaz (SOD)** enzimi aktivitesine etki eden faktörlerle (tuz, patojen, soğuk, sıcaklık, kuraklık, ozon, besin ve su stresi) ilgili de birçok çalışma bulunmaktadır. Oksidatif stres altındaki buğday genotiplerinde SOD aktivitesinde bir değişiklik gözlenmezken (Sairam and Srivastava 2000), yüksek sıcaklık stresi veya tuz stresi altındaki buğday genotiplerinde önemli ölçüde artırdığı belirlenmiştir (Sairam *et al.* 2000; Eyidoğan *et al.* 2003; Sakhabutdinova *et al.* 2004). Tuz stresi altındaki çeltik bitkilerinde de SOD aktivitesinin yüksek olduğu belirlenmiştir (Lin and Kao 2000). Buna ilave olarak, sinameki (*Cassia angustifolia*) ve soya fasulyesi bitkisi ile yapılan çalışmalarda SOD aktivitesi tuz stresi ile artmıştır (Agarwal and Pandey 2004; Ghorbanli *et al.* 2004). Diğer benzer iki çalışmada, tuz stresine dayanıklı ve hassas olan iki çeşit pamuk (Meloni *et al.* 2003) ve şeker pancarı (Bor *et al.* 2003) bitkileriyle yapılan çalışmalarda, hücrel SOD aktivitesinin tuza dayanıklı varyetelerde daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Su taskını stresine maruz kalan arpa bitkilerinde ise kloroplastik SOD aktivitesinin düştüğü gözlenmiştir (Yordanova *et al.* 2004). Literatürde apoplastik SOD aktivitesi üzerine soğuk ve SA'nın birlikte etkilerini açıklayan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak, tuz stresine toleransları farklı iki çeşit bezelye (Hernandez *et al.*

2001) ve iki çeşit dutta (Sudhakar *et al.* 2001) apoplastik SOD aktivitesinin, tuza dayanıklı varyetelerde daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Sonolarak, tuz toleransları farklı iki buğday varyetesiyle yapılan bir çalışmada SA, dayanıklı varyetede SOD aktivitesini düşürürken, hassasta belirgin bir düzensizleşmemiştir (Mutlu *et al.* 2009).

Salisilik asit (SA) ile ilgili yapılan çalışmalarda; Salisilik asidin (SA) lipid peroksidasyonu üzerine etkileri ile ilgili literatür bilgisi kısıtlıdır. *Taxus chinensis* bitkisi patojenle muamele edilmiş ve MDA seviyesinin arttığı belirlenmiş, patojenle birlikte SA uygulandığında ise MDA seviyesinin düştüğü tespit edilmiştir (Yu *et al.* 2001). Bir yıllık üzüm fideleriyle yapılan bir çalışmada yapraklara püskürtülen SA'nın MDA seviyesini düşürdüğü belirlenmiştir (Wang *et al.* 2003). Su stresi altındaki iki buğday çeşidiyle yapılan bir çalışmada yapraklara püskürtülen SA'nın LPO aktivitesini düşürdüğü bulunmuştur (Agarwal *et al.* 2005). Fasulye ile yapılan çalışmada tek başına verilen SA lipid peroksidasyonunu etkilemezken, tuz verilmesiyle artan LPO miktarını SA uygulamasının önemli derecede düşürdüğü bulunmuştur (Palma *et al.* 2009). SA'nın SOD üzerine etkisini inceleyen çalışmalarda, SOD aktivitesinin SA uygulamasından önemli ölçüde etkilendiğini ortaya koymuştur. Örneğin, tuz stresi altındaki buğdaylarda hücrel SOD aktivitesinin eksogen (dışarıdan) SA uygulaması ile arttığı belirlenmiştir (Sakhabutdinova *et al.* 2004). Buna karşılık, su stresi altındaki buğdaylarda SOD aktivitesi yükselirken, SA uygulaması ile düştüğü belirlenmiştir (Singh and Usha 2003). Muz fideleriyle yapılan diğer bir çalışmada ise SOD aktivitesi düşük sıcaklık ve SA uygulamasıyla artmıştır (Kang *et al.* 2003). Tuz stresi altındaki domateslerde, tuzlu koşullar içsel (endojen) SA miktarını artırmıştır. Ancak, belirli bir süre tuza akliye edilmiş domateslerde içsel SA miktarı daha düşük bulunmuştur. Aynı bitkilerde, hem tuz hem SA uygulaması SOD aktivitesini artırmış fakat, yine tuza adapte edilmiş bitkilerde SOD aktivitesi daha düşük bulunmuştur (Molina *et al.* 2002). Mısır ve havyar bitkisinde yapılan çalışmalarda, SA uygulaması POX'un aktivitesini artırmıştır (Dat *et al.* 1998; Padu 1999; Horvath *et al.* 2002; Yee *et al.* 2002). Ancak, *Cuscuta reflexa* ve bezelye bitkisinde ise SA'nın POX aktivitesini inhibe ettiği gözlenmiştir (Aebi 1974; Srivastava *et al.* 2001). Muz meyvesi olgunlaşma süresince SA uygulanmış ve POX aktivitesi ilk günlerde düşmesine rağmen ilerleyen günlerde tekrar yükselmeye başladığı

gözlenmiştir (Srivastava *et al.* 2000). Soğuk şartlarda (2.5°C) SA uygulanmış salatalık ve mısır bitkisinde yaprak, kök ve kotiledonlarda POX aktivitesinin kontrol değerleri ile aynı olduğu bulunmuştur (Kang *et al.* 2002). Muz bitkisi soğukta yetiştirilip SA uygulandığında, soğuk ve SA kontrole göre POX aktivitesini artırmıştır (Kang *et al.* 2003). Kışlık buğdayla yapılan bir çalışmada soğuk stresi+SA uygulamasının apoplastik POX'ü artırdığı belirlenmiştir (Taşgın *et al.* 2006). Farklı iki buğday çeşidiyle yapılan bir çalışmada ise tuzlu koşullar altında SA uygulaması, apoplastik POX aktivitesini dayanıklı çeşitte artırırken, hassas çeşitte değiştirmedigi gözlenmiştir (Mutlu *et al.* 2009).

Nitrik oksit (NO) ile ilgili yapılan çalışmalarda; Eksojen olarak uygulanan NO patojen (Durner *et al.* 1998; Delledonne 1998), ışık (Beligni and Lamattina 2000), yerçekimi (Pedrosa and Durzan 2000) ve oksidatif strese (Beligni and Lamattina 1999a) karşı bitki cevaplarını etkilemektedir. Durner *et al.* (1998) bitki aşırı duyarlılık cevaplarının (ADC; Hypersensitive Response=HR) tetiklenmesi sürecinde, NO in anahtar sinyal rolüne dair kanıtlar elde etmişlerdir. Aşırı duyarlılık cevabına neden olan tütün mozaik virüsü (TMV) ile enfekte olmuş tütün bitkisinde NOS aktivitesi teşvik olmuştur ve bu aktivite NOS inhibitörleri tarafından inhibe edilmiştir. Ayrıca, NO savunma ile ilgili PR-1 geninin anlatımını ve salisilik asit (SA) biyosentezini teşvik etmektedir (Draper, 1997). Patojen enfeksiyonu sırasında aşırı duyarlılık cevabı ile ilgili maddelerden biri olan fitoaleksinlerin birikimi NO vericisi ile muamele edilmiş patates tuberlerinde artış göstermektedir (Noritake *et al.* 1996). Bitki hücrelerinde çeşitli türdeki yaralanmalar ile meydana gelen nekrozdan farklı, genetik olarak belirlenmiş ve bazı metabolik olayların sonucunda programlanmış hücre ölümü (PHÖ; Programmed Cell Death=PCD) gerçekleşmektedir. Programlanmış hücre ölümünde NO in rolü ayrıntılı olarak incelenmiştir. Örneğin, *P. syringae* pv *maculicola* mantarı ile enfekte olmuş *Arabidopsis* (tere otu) hücrelerinde NO programlanmış hücre ölümünü teşvik etmektedir (Clarke *et al.* 2000).

Çevresel stres koşulları altında, düşük konsantrasyonlarda NO uygulanması bitkilerde dayanıklılığın artmasına neden olmaktadır. Stres cevaplarında NO in birbirleriyle ilişkili

iki farklı mekanizma ile etkili olduğu önerilmektedir. Bu mekanizmalardan birinde NO, farklı stres koşulları tarafından oluşturulan aktif oksijen türlerine karşı doğrudan antioksidan etki göstermektedir. NO hızlı bir şekilde süperoksit radikalleri ile reaksiyona girerek peroksinitriti oluşturmaktadır. Peroksinitrit ve peroksinitritin protonlanmış formları okside edici ajanlar olmakla beraber, bu formlar peroksidlerden daha az toksiktir, böylece sınırlı sayıda hücre yaralanması gerçekleşmektedir (Wink *et al.*1993). Bir başka şekilde, peroksinitrit H₂O₂ ile reaksiyona girerek ürün olarak nitrit iyonlarını ve oksijeni vermektedir (Martínez *et al.* 2000). Soya embriyonik süspansiyon kültürlerinde NO'nun süperoksit oranını kayda değer ölçüde azalttığı gösterilmiştir (Caro and Puntarulo 1998) halindedir. NO tarafından lipid peroksidasyonunun inhibisyonu, NO in potansiyel antioksidan rolünü işaret etmektedir (Beligni and Lamattina 1999a,b). Ciddi kuraklık stresine karşı toleransı arttıran NO in tek başına çalışmadığı, örneğin *Arabidopsis*' de stoma kapanmasında H₂O₂ ile birlikte çalıştıkları bulunmuştur (Garcia-Mata and Lamattina 2001). Ayrıca yapılan çalışmalarda NO in sıcaklık ve soğuk stresindeki cevapları da rapor edilmiştir. Yonca bitkisinde kısa süreli sıcaklık stresi NO sentezinin artmasına, domates, buğday ve mısırdaki dıştan NO vericilerinin uygulanması soğuk direncinin oluşmasına neden olmaktadır (Lamattina *et al.*2003; Leshem 1996). Bitkilerde abiyotik stres etmeni olan kadmiyumun (Cd) oluşturduğu oksidatif strese karşı ayçiçeği bitkisinde NO in koruyucu rol oynadığı Laspina *et al.* (2005) tarafından rapor edilmiştir. Soğuk ve sıcak stresini ardışık, NO uygulanması ile yüksek düzeyde aktif oksijen türlerinin birikiminin baskılanması, NO in antioksidan özelliğini göstermektedir (Neill *et al.*2002). Diğer Son yıllarda NO'in buğday fidelerinde kuraklıktan kaynaklanan oksidatif strese karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir (Garcia Mata and Lamattina 2001).

Putresin (Put) ile ilgili yapılan çalışmalarda; (Costa and Bagni 1983), 10⁻⁴M ve 10⁻⁵M konsantrasyonlarda putresin, spermin ve spermidinin meyve ağaçlarının üzerine püskürtüldükten 9 gün sonra meyve verimi ve ürünün attığını gözlemlemişlerdir. Bu çalışmada poliaminlerin hücre bölünmesini etkileyerek ürün artışını sağladığı belirtilmiştir. Bagni (1986), poliaminleri membranların fosfolipitlerine ayrıca nükleik asitlere sıkıca bağlanan ve sıcaklık denaturasyonuna karşı DNA'yı stabilize eden

organik maddeler olarak ifade etmiştir. Yine aynı araştırmacı *Helianthus tuberosus* L. (yer elması) dormant tuberlerinin labaratuvar kültürüne 10-100µM düzeylerinde eksojen poliamin uygulandığında başka bir büyüme hormonuna ihtiyaç duyulmaksızın kültürde hücre bölünmesi ve büyümenin sağlandığını bildirmiştir. Sinska ve Lewandawska (1991), embriyonal dormansi gösteren *Malus domestica* (elma) tohumlarıyla yaptıkları çalışmada putresin ve spermidinin 0.1 ve 1 mM gibi düşük konsantrasyonlarının çimlenmeyi stimüle ettiğini ancak 5 mM gibi yüksek düzeylerinin çimlenmede etkisiz kaldığını ve hatta inhibe edici olduğunu belirtmişlerdir. Aynı çalışmada spermidinin ise bütün konsantrasyonlarda çimlenmeyi engellediği ve güçlü inhibisyon etkisinin ise en yüksek konsantrasyonda olduğu kaydedilmiştir. Sharma *et al.* (1996), çalışmalarında patlıcan bitkisinin (*Solanum melongela*) kök gelişimi ve farklılaşmasına poliaminlerin etkisiyle ilgili yaptıkları çalışmalarında, bitkiye poliaminlerden başka dışsal fitohormon vermeksizin poliaminlerin etkisini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda 0.5 ve 1 mM putresin konsantrasyonlarının bitkinin kök gelişimini olumsuz yönde etkilediğini, 0.5 ve 1 mM Spermidin uygulamalarının ise kök gelişimini, kök boyunu ve lateral köklerin sayısını önemli derecede artırdıklarını bildirmişlerdir.

Absisik asit (ABA) ile ilgili yapılan çalışmalarda; Bakır ve nikel kirliliğinin absisik asit seviyesini artırdığı rapor edilmiştir (Monniet *al.* 2001). Kobalt, nikel ve çinko stresi altındaki fasulye bitkilerinde absisik asit birikimi görülmüştür (Rauserand Dumbroff 1981). Bitkilerde strese yol açan faktörlerin (düşük sıcaklık, yüksek sıcaklık, kuraklık, tuzluluk) absisik asit üretimini artırdığı konusunda çok sayıda çalışma yapılmıştır. ABA, çeşitli streslere karşı bitkinin adaptasyonu arttırdığından dolayı bir stres hormonu olarak isimlendirilmiştir. Donma toleransının hem bitkilerin kendilerinde (Chen *et al.* 1983; Lalk *et al.* 1985) hem de hücre kültürlerinde (Chen, *et al.* 1993) ABA tarafından artırıldığı rapor edilmiştir. Ayrıca donma sertleşmesi esnasında, bitkilerin ABA içeriğinde geçici bir artış görüldüğü ve ABA'nın donma stresine karşı adaptasyonunun bir endojen düzenleyicisi olabileceği ileri sürülmüştür (Chen *et al.* 1983). Strese girmiş yapraklarda absisik asit, prolin ve diğer stres metabolitlerinin biriktiği not edilmiştir (Steward *et al.* 1987). Stresin meydana getirdiği absisik asit birikiminin temelde su eksikliğinden kaynaklandığı ve turgor eksikliğinin ABA biyosentezini başlatan hücre su

döngüsünün kritik parametreleri olduğu bilinmektedir. Su potansiyelindeki azalmanın stomaların kapanmasına sebep olduğu ve bu duruma maruz kalmış bir yaprakta ABA içeriğinin 10 kat artabileceği (Jackson, M.B. and Hall, K.C, 1987) rapor edilmiştir. Plazmolizis (turgorun zarar)'in ABA üretimini kendiliğinden teşvik ettiği konusunda çok sayıda rapor mevcuttur (Creelman, R.A. and Zeevaart, J.A.D, 1985). Kök ve gövdelerin büyümesinde ABA'nın karşılıklı etkisi ile stres şartları altında bitkilerin hayatta kalma şanslarını arttırdığı kaydedilmiştir (Zeevaart, J.A.D. and Creelman, R.A. 1988).

Etafon (Etp) ile ilgili yapılan çalışmalarda; Ducker *et al.*(1991) kışlık kolzada ilkbaharda ethephon uygulamanın bitki boyunu %3.2-8.4 oranında azalttığını, hasatta tane kaybını azalttığını ve tane verimini önemsiz olmasına rağmen %1.0-3.4 artırdığını ; (Destro *et al.* 1993) ethephon ve gibberelik asidin ayçiçeğinde erkek kısırlılığı üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmalarında ethephonun gamet öldürücü özelliği bulunmadığını; (Scott 1990) pamukta %60 çiçeklenme döneminde uygulanan ethephonun ilk hasattaki kütlü verimini artırdığını; (Zade *et al.*1994) 50 ppm ethephon dozunun ayçiçeğinde dormansiye kırmada etkili olduğunu ve tohumun çimlenme, çıkış ve gücünü artırdığını; (Musnicki *et al.* 1996) 2lt/ha ethephon dozunun ayçiçeğinin bitki boyunu azalttığını, tohum verimi, tabla çapını, bitkide tohum verimini, 1000 tohum ağırlığını değiştirmediğini ve ham yağ oranını azalttığını, (Tobola and Musnicki 1998)ayçiçeğinde ethephonun etkinliğinin uygulama zamanı, dozu ve uygulamadan sonraki hava şartlarına bağlı olduğunu; ayrıca yüksek hava sıcaklığının ethephonun bitki boyunun kısaltmasındaki etkisini artırdığını; (Gregory *et al.* 1995) ethephon uygulamalarının iki sıralı arpada bitki boyunu kısalttığını, başaklanmayı geciktirdiğini, çeşitlere göre verimi kurak şartlarda %15 oranında artırdığını ve 240 g/ha'dan fazla uygulanacak ethephonun özellikle verimi azalttığını bildirmişlerdir. (Takahashi and Jaffe 1984), hıyarlarda hormon kontrollü cinsiyet oluşumunun rolünü saptamaya yönelik olarak yaptıkları çalışmada, AgNO₃ (etilen sinyal inhibitörü)' ün, IAA, ACC (etilen sentezi sırasında anahtar olan enzim) veya etafonun neden olduğu dişi çiçek oluşumunu kısmen veya tamamen engellediğini tespit etmişlerdir. *Ceratoides lanata* (Beyaz adaçayı) bitkisinin tohumları dormansi göstermeyip, tuzlu olmayan kontrollü

şartlarda %90 çimlenme gösterdikleri belirlenmiştir. Ortamda tuzluluğun artışıyla (900 mmol/l NaCL) çimlenme oranının yaklaşık olarak %10 azaldığı belirlenmiştir. Çalışmada uygulanan GA'nın tuzluluğun etkisini düzeltmediği ancak kinetin ve fusicoccin maddelerinin tuzluluğun etkisini önemli ölçüde hafiflettiği, etafon maddesini ise tuzluluğun olumsuz etkisini tamamen ortadan kaldırdığı saptanmıştır (Khan *et al.* 2004).

Östrojen (Öst) ile ilgili yapılan çalışmalarda; Dogra and Thukral (1991a), buğday tohumlarını 24 saat süresince 10^{-4} ile 10^{-8} M arasında hazırlanmış farklı solüsyonlar içerisinde (östron, 17 β -östradiol, androstenedion, testosteron, 17 hidroksi progesteron, pregnenolon asetat, hidrokortizon, hidrokortizon asetat, indolasetik asit, gibberellik asit ve kinetin) çimlendirmiş ve daha sonra 10 gün sürekli ışığa maruz bırakarak, bu 10 günlük periyodun sonrasında tohum çimlenmesinin, steroidler tarafından 10^{-6} ve 10^{-8} M konsantrasyonlarda önemli derecede artırıldığını, kök ve gövde uzunluklarının tüm solüsyonların 10^{-6} M konsantrasyonları tarafından maksimum seviyeye ulaştığını ve çimlenme yüzdesinin indol asetik asit uygulanan tohumlarda en düşük seviyede olduğunu belirlemişlerdir. Bu araştırmacılar elde ettikleri bulgulardan hareketle, steroidlerin bitki hormonlarından daha etkili olduklarını bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar başka bir çalışmada buğday fidelerinde bazı enzim aktiviteleri, protein ve nükleik asit içerikleri üzerine steroidlerin ve bitki hormonlarının etkilerini araştırmışlar ve 10^{-6} - 10^{-8} M konsantrasyonlarda tüm hormonların protein içeriğini, nükleik asit içeriğini ve katalaz, peroksidaz, alkalın ve asit fosfataz aktivitelerini önemli oranda artırdıklarını bildirmişlerdir (Dogra and Thukral 1991).

Dogra and Thukral bazı steroid hormonların (östron, testosteron, pregnenolon ve hidroocortizon) mısır (1994) ve buğday (1996) bitkilerinin protein içerikleri, nükleik asit içerikleri ve bazı enzim aktiviteleri (peroksidaz, katalaz, asit ve alkalın fosfataz) üzerine etkilerini araştırmışlar ve çalışılan parametrelerin bu hormonların tüm konsantrasyonlar tarafından artırılmakla birlikte, düşük konsantrasyonların (10^{-6} ve 10^{-8} M) daha etkili olduklarını rapor etmişlerdir. Dogra and Kaur (1994) çimlenen buğday tohumlarının bazı büyüme ve biyokimyasal parametreleri üzerine östron, progesteron ve 17-alfa-

hidroksi progesteronun etkilerini araştırmışlar ve bu hormonların kök ve gövde uzunluğu, kök ve gövde kuru ağırlıkları, kök sayısı ve çimlenme yüzdesi gibi morfolojik parametreleri uyardıklarını, ayrıca protein içeriği, α -amilaz, peroksidaz ve katalaz aktivitelerini de artırdıklarını rapor etmişlerdir. Ayrıca bu araştırmacılar, uygulanan memeli cinsiyet hormonlarının düşük konsantrasyonlarda (10^{-6} ve 10^{-8} M) yüksek konsantrasyonlara oranla daha iyi sonuç verdiklerini rapor etmişlerdir. Janeczko (2000) östrojen ve progesteronun $1\mu\text{M}$ konsantrasyonda kışlık buğday fidelerinin kök ve yaprak büyümesini uyardığını, fakat aynı hormonların $10\mu\text{M}$ konsantrasyonda büyümeyi inhibe ettiğini bildirmiştir. ROT'ların toksisitesinin giderilmesi için bitkiler hem enzimatik hem de enzimatik olmayan bileşenlerden oluşan antioksidan savunma sistemine sahiptirler. Optimal koşullarda bu savunma sistemi yeterli korumayı sağlamasına karşın, stres şartlarında organizmadaki serbest radikal oluşumunun artışına veya antioksidan savunma sisteminin yetersizliğine bağlı olarak, oksidan-antioksidan dengesinin radikaller lehine bozulması sonucunda, hücre içerisinde biyomoleküller ile serbest radikaller kolaylıkla reaksiyona girmekte ve zincirleme reaksiyonları başlatarak yeni serbest radikallerin oluşumuna neden olmaktadır (Augustin *et al.* 1997).

Oluşan serbest radikallerin biyolojik sistemlerde çeşitli anormalliklere sebep olduğu ve çok önemli biyokimyasal ve fizyolojik hasarlara neden olduğu bilinmektedir. Bu serbest radikaller proteinler, lipidler, karbohidratlar ve nükleik asitlerin doğal yapılarının bozulmasına sebep olabilmektedirler (Kuru 2007). Bu durum oksidatif stres olarak adlandırılmaktadır. Oksidatif strese karşı bitkileri daha toleranslı hale getirmek veya oksidatif stresin meydana getirdiği olumsuz etkileri minimuma indirebilmek için yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmaların bir kısmında antioksidan enzimler veya antioksidan maddeleri fazla miktarda oluşturan transgenik bitkiler üretilirken, diğer çalışmalarda ise bitkilere büyümeyi düzenleyici maddeler gibi birtakım kimyasallar uygulanarak strese karşı daha dirençli hale gelmeleri amaçlanmaktadır (Bowler *et al.* 1992; Creissen *et al.* 1994).

3. MATERYAL ve YÖNTEMLER

3.1. Çalışmada kullanılan alet ve cihazlar

Buzdolabı	: Arçelik, TÜRKİYE, 8190NF
Spektrofotometre	: Shimadzu UVmini- 1240, JAPAN
Derin Dondurucu (-30 °C)	:Arçelik, TÜRKİYE
Derin Dondurucu (-80 °C)	: Harris, İNGİLTERE
İklim dolabı	: Sanyo, Japonya ve Jeno Tech, KORE
Soğutmalı santrifüj	: Hettich Micro 22 R
Masa santrifüjü	: Hettich EBA 21
Elektroforez	: Thermo Scientific, OWL Easycast B1
Otomatik pipetler	: Socorex ve Nichipet EX
Otoklav	: Hirayama, HVE 5, JAPAN
Saf Su Cihazı	: GFL mbh D-30938, GERMANY
Manyetik karıştırıcı	: Chiltem HS31
Sıcak Su Banyosu	: Dedeoğlu, TURKEY
Vakum pompası	: Edwards, İNGİLTERE
Hassas terazi	: Shimadzu AY220, JAPAN
Çalkalayıcı	: Gallenkamp
pH Metre	: WTW unilab
Karıştırıcı	: Fisons Whirlmixer

3.2. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanış Şekilleri

Araştırma süresince kullanılmış çözeltilerin kullanıldığı yerler ve hazırlanış şekilleri aşağıda sunulmuştur. Çalışmalarımızda kullandığımız kimyasal maddeler Fuluka ve Sigma şirketlerinden temin edilmiştir.

1. 0,1 mM salisilik asit çözeltisi: 0.01381 g salisilik asit 900 ml saf suda çözülmüş, 1 N NaOH ile pH: 5.5'e kadar titre edilmiş ve son hacim saf su ile 1L'ye tamamlanmıştır.
2. 1mM salisilik asit çözeltisi: 0.1381g salisilik asit 900 ml saf suda çözülmüş, 1 N NaOH ile pH: 5.5'e kadar titre edilmiş ve son hacim saf su ile 1L'ye tamamlanmıştır.
3. 0.1 mM nitrik oksit çözeltisi: 1 mM NO çözeltisinden 100 ml alınıp hacim saf su ile 1 L'ye tamamlanmıştır.
4. 1 mM nitrik oksit çözeltisi: 0,29795 gr nitrik oksit tartılıp bir miktar alkolde çözüldükten sonra hacmi 1L'ye tamamlanmıştır.
5. 0.1 mM putresin çözeltisi: 1mM putresin çözeltisinden 100 ml alınıp toplam hacim 1L'ye tamamlanmıştır.
6. 1 mM putresin çözeltisi: 0,08815 g putresin tartıldıktan sonra hacmi 1L olacak şekilde saf suda çözülmüştür.
7. 50 μ M absisik asit çözeltisi: 0,013215 g Absisik asit bir miktar asetonda çözüldükten sonra hacmi saf su ile 1L'ye tamamlanmıştır.
8. 100 μ M absisik asit çözeltisi: 0,02643 g Absisik asit bir miktar asetonda çözüldükten sonra hacmi saf su ile 1L'ye tamamlanmıştır.
9. 10^{-4} Möstrojen çözeltisi: 0,0287 g β -östradiol tartılıp küçük bir miktar metanolde çözüldükten sonra üzeri saf su ile 1 L' ye tamamlanmıştır.
10. 10^{-6} M östrojen çözeltisi: 10^{-4} M' lık β -östradiol çözeltisinden 10 ml alınıp üzeri saf su ile 1 L' ye tamamlanmıştır.
11. 10^{-8} M östrojen çözeltisi: 10^{-6} M' lık β -östradiol çözeltisinden 10 ml alınıp üzeri saf su ile 1 L' ye tamamlanmıştır.
12. 50 ppm etafon çözeltisi: 0.05 gr etafon suda çözüldükten sonra hacmi saf su ile 1 L ye tamamlanmıştır.

13. 100 ppm etafon çözeltisi: 0.1 g etafon da çözüldükten sonra hacmi saf su ile 1 L ye tamamlanmıştır.
14. 20 mM Askorbik asit+20 mM CaCl_2 çözeltisi (Total apoplastik proteinlerin ekstraksiyonu için kullanılan çözelti): 7.4 g askorbik asit ve 5.28 g CaCl_2 bir miktar saf suda çözülmüş ve hacim saf su ile 2 L'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
15. 0.1 M KH_2PO_4 (pH: 7.0), %1 PVP, 1mM EDTA (Simplastik antioksidan enzimlerin homojenizasyon tamponu): 2.72 g KH_2PO_4 180 ml saf suda çözülmüş, 1 N NaOH ile pH 7.0'ye kadar titre edildikten sonra saf su ile 200 ml'ye tamamlanmış ve 0.5 g PVP ve 0.04 g EDTA ilave edilerek hazırlanmıştır.
16. 103.5 mM KH_2PO_4 , pH: 7.5 (Katalaz aktivitesi ölçümünde kullanılan tampon): 1.4 g KH_2PO_4 , 80 mL saf suda çözülmüş, 1 N NaOH ile pH: 7.5'e kadar titre edilmiş ve son hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.
17. 40 mM H_2O_2 çözeltisi (Katalaz aktivitesi ölçümünde kullanılan substrat çözeltisi): 408 μL %30'luk H_2O_2 hacmi saf su ile 100mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
18. 5 mM H_2O_2 çözeltisi (Katalaz aktivitesi ölçümünde standart grafik hazırlamak için kullanılan): 41 μL %30'luk H_2O_2 hacmi saf su ile 100mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
19. 0.1 M Na_2HPO_4 , pH: 5.5 (Peroksidazın aktivitesi ölçümünde kullanılan tampon çözeltisi): 3.55 g Na_2HPO_4 alınarak 200 mL saf suda çözülmüş ve pH: 5.5'e ayarlandıktan sonra toplam hacim 250 mL'ye tamamlanmıştır.
20. Peroksidaz aktivitesi ölçümünde kullanılan substrat çözeltisi: 54 μL quairol ve 15 μL H_2O_2 dan ($d=1.13$ g/mol) 5 mM olacak şekilde 100 mL 0.1 M fosfat tamponu (pH: 5.5) içinde çözülerek hazırlanmıştır.
21. 50 mM K_2HPO_4 (pH: 7.8) (Süperoksit dismutaz aktivitesi ölçümünde kullanılan tampon): 2.9 g K_2HPO_4 200 mL saf suda çözülmüş ve son hacmi 250 mL'ye tamamlanmıştır.
22. %5 lik TCA(trikloroasetik asit)(Lipid peroksidasyon aktivitesi homojenat çözeltisi): 100 mL saf su içerisine 5 g TCA ilave edilir. TCA tam olarak çözünene kadarkarıştırılarak hazırlanır.
23. %0.5 lik TBA(tiobarbutirik asit) (Lipid peroksidasyon aktivitesi reaksiyon çözeltisi): 100 mLsaf su içine 20 gram TCA çözülür ve içerisine % 0.5 g TBA ilave edilir ve iyicekarıştırılarak hazırlanır.

24. %5'lik $\text{Ti}(\text{SO}_4)_2$ (titanyum disülfat çözeltisi) (H_2O_2 miktarının belirlenmesinde kullanılır): 1 gram $\text{Ti}(\text{SO}_4)_2$ 20 mL saf suda çözülerek hazırlanmıştır.
25. %19'luk NH_4OH (H_2O_2 miktarının belirlenmesinde kullanılır): 4.16 mL NH_3 20 mL saf suda çözülmesiyle hazırlanmıştır.
26. 2 M'lık H_2SO_4 (H_2O_2 miktarının belirlenmesinde kullanılır): 40 mL %98'lik H_2SO_4 alınmış 160 mL saf su içerisine ilave edildikten sonra 200 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
27. 13 mM metionin çözeltisi (Süperoksit dismutaz aktivitesi ölçümünde kullanılır): 0.485 g metionin, 250 mL, 50 mM K_2HPO_4 (pH:7.8) tamponu içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.
28. 75 μM NBT (Nitroblue Tetrazolium Klorür) (Süperoksit dismutaz aktivitesi ölçümünde kullanılır): 0.015 g NBT, 250 mL, 50 mM K_2HPO_4 (pH: 7.8) tamponu içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.
29. 0.1 mM EDTA (Etilen Daimin Tetra Asetik asit) (Süperoksit dismutaz aktivitesi ölçümünde kullanılır): 0.075 g EDTA, 250 mL, 50 mM K_2HPO_4 (pH: 7.8) tamponu içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.
30. 2 mM riboflavin(Süperoksit dismutaz aktivitesi ölçümünde kullanılır): 0.038 g riboflavin, 1 L saf suda çözülmüş, bu çözeltiden 2 mM oluşturmak için, bundan 60 mL alınmış ve 3 mL'lik reaksiyon karışımına pipetlenmiştir.
31. 65 mM K_2HPO_4 , pH: 7.8 (Süperoksit anyonu miktarının belirlenmesinde kullanılan tampon): 1,132 g K_2HPO_4 70 mL saf su da çözülmüş pH: 7.8'e ayarlandıktan sonra saf su ile 100 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
32. 10 mM Hydroxilamine (Süperoksit anyonu miktarının ölçülmesinde kullanılır): 0,0069 g hydroxilamine alınmış 10 ml saf suda çözdürülerek hazırlanmıştır.
33. 17 mM amonyum benzono sülfonik asit (ABSA) (Süperoksit anyonu miktarının ölçülmesinde kullanılır): 0,1472 g alınmış ve 50 ml saf suda çözüldürülerek hazırlanmıştır.
34. 17 mM 1-Naftilamine (Süperoksit anyonu miktarının ölçülmesinde kullanılır): 0,243 g 1- Naftilamine alınmış 10 ml asetonda çözülmüş ve son hacmi saf su ile 100 ml ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

35. 1 M Tris-HCl (pH:6.8) (Elektroforezde jel hazırlamak için kullanılan tampon): 12.1 g Tris bir miktar saf suda çözüldükten sonra pH'sı 6.8'e ayarlanmış ve toplam hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.
36. 1 M Tris-HCl (pH: 8.8) (Elektroforezde jel hazırlamak için kullanılan tampon): 12.1 g Tris bir miktar saf suda çözüldükten sonra pH'sı 8.8'e ayarlanmış ve toplam hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.
37. %10'luk SDS (Elektroforezde jel hazırlamak için kullanılan çözelti): 1 g SDS üzerine 9 ml saf su ilave edilerek çok hafif ısıtmak suretiyle, şeffaflaşmaya kadar karıştırılmıştır.
38. %30'luk akrilamid çözeltisi (Elektroforez ayırma jelinin hazırlanmasında kullanılan): 30g akrilamid ve 0.8 g bis-akrilamid saf su ile iyice çözüldükten toplam hacim 100 mL'ye tamamlanmış, kullanım dışında renkli şişede 4°C'de saklanmıştır.
39. %10'luk akrilamid çözeltisi (Elektroforez yığma jelinin hazırlanmasında kullanılan): 10 g akrilamid ve 2.5 g bis-akrilamid saf su ile iyice çözüldükten sonra üzerine 87.5 ml saf su ilave edilmiş, kullanım dışında renkli şişede 4°C'de saklanmıştır.
40. SDS-PAGE'de kullanılan yürütme tamponu: 1.5 g Tris ile 7.2 g glisin yaklaşık 50 mL saf suda iyice çözülmüş ve üzerine 5 mL % 10'luk SDS ilave edilerek hacmi saf su ile 500 ml'ye tamamlanmıştır.
41. %0.1'lik brom timol mavisi: 0.1 g indikatör boya, 16 ml 0.1 N NaOH içerisinde çözüldükten sonra su ile hacmi 100 ml'ye tamamlanmıştır.
42. SDS-PAGE'de kullanılan numune tamponu: 0.65 mL 1 M Tris-HCl pH: 6.8, 3 mL %10'luk SDS, 1mL %100'lük gliserin ve 1 mL %0.1'lik brom timol mavisinden karıştırılarak toplam hacimleri 10 mL'ye tamamlanarak hazırlanmış ve bu tampona kullanmadan hemen önce 50 µL β-merkaptoetanol ilave edilmiştir.
43. Fixing çözeltisi (Jeldeki proteinleri, boyama öncesi sabitleştirmek için kullanılan): 40ml saf su üzerine 10 g TCA ilave edilerek iyice çözüldükten sonra, 50 ml izopropil alkolün yavaş yavaş ilavesiyle 100 ml'ye tamamlanmıştır.
44. Boyama çözeltisi (Elektroforez sonrası jeldeki proteinlerin boyanmasında kullanılan): 10 g TCA 58 mL saf suda iyice çözüldükten sonra üzerine 15 g amonyum sülfat ilave edilerek bununda çözünmesi sağlanmış ve daha sonra bu karışımın üzerine 15 ml izopropil alkol konulduktan sonra şeffaflaşmaya kadar magnetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Daha sonra ayrı bir beherde 6 ml fosforik asit üzerine 0.6 g Coomassie

G-250 azar azar eklenerek iyice çözülmüş üzerine daha önce hazırlanan çözelti yavaş yavaş ilave edilerek karıştırılmış ve toplam hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.

45. Yıkama çözeltisi (Boyama sonrası jeldeki fazla boyayı uzaklaştırmak için kullanılan): 100 ml asetik asit üzerine 500 mL metanol 400 saf su ilave edilerek toplam hacim 1L'ye tamamlanmıştır.

3.3. Yöntemler

3.3.1. Bitkilerin büyütülmesi

Araştırmamızda her türlü iklim ve toprak koşullarında yetişebilecek çok sayıda çeşitlere sahip, gerek dünyada gerekse ülkemizde en fazla yetiştirilen tarım ürünü olan ve bölgemizde ekimi yapılan, monokotil bir bitki olan buğdayın (*Triticum aestivum*) soğuğa dirençli bir varyetesi (Doğu-88) kullanılmıştır. Buğday tohumları Doğu Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden temin edilmiştir. Tohum sterilizasyonu için, kuru tohumlar çeşme suyu ile birkaç kez yıkandıktan sonra %10'luk ticari çamaşır suyunda 10 dk bekletilmiş ve son olarak saf su ile iyice yıkanmıştır. Bitkimiz (1/1) oranında kum + torf kültüründe yetiştirilmiştir. Yetiştirme aşamaları için, farklı gruplarda ve aynı şartlar sağlanarak, her bir saksıya eşit miktarda 1/1 oranında kum + torf konularak, her bir saksı için 20 gr buğday tohumu ekilmiştir. Temin edilen kum önce musluk suyuyla birkaç kez daha sonra saf suyla 5 kez yıkanmıştır. Torf (nemli ve çok yağış alan yaz sıcaklarının düşük olduğu yörelerde bataklık ve benzeri su altındaki arazilerde yetişen bitkilerin kısmen çürümesi ve kalın yataklar meydana getirmesi sonucu oluşur. Asit reaksiyonludur. Ph'sı 3.5-4.5 tur. Azot dışında besin maddelerince fakirdir. Su tutma kapasitesi çok yüksektir). Bitkiler bir iklim dolabında 22/20 °C ve 16/8 saat ışık-karanlık periyodunda (20.000 lüks, %70 nem) hazır temin edilmiştir. Her saksı on beşinci güne kadar günlük eşit miktarda çeşme suyu ile sulanmıştır. On ikinci gün konsantrasyonları belirlenmiş ve hazırlanmış her bir sinyal bileşiği bir atomizer yardımıyla yapraklara püskürtülmüştür (onikinci gün bitkilerin ihtiyacına göre su verimine ara verilmiştir). İşleme bütün yaprakların yıkandığından emin oluncaya kadar devam edilmiştir. On beşinci gün yapraklar deney materyali olarak kullanılmıştır;

- a) yapraklardan elde edilen **apoplastik** proteinlerden **antioksidan enzim aktiviteleri**,
- b) yapraklardan elde edilen **hücrel** proteinlerden **antioksidan enzim aktiviteleri**,
- c) yapraklarda **lipid peroksidasyon seviyesinin** belirlenmesi (**LPO**),
- d) yapraklarda **hidrojen peroksit (H₂O₂) miktarı**,
- e) yapraklarda **süperoksit anyonu(O₂⁻) miktarı**,
- f) **Apoplastik proteinlerin** sodyum dodesilsülfat jel elektroforezi (**SDS- PAGE**) ile yapraklardan elde edilen apoplastik proteinlerin çeşitliliği belirlenmiştir.
- g) **Hücrel proteinlerin** sodyum dodesilsülfat jel elektroforezi (**SDS- PAGE**) ile yapraklardan elde edilen hücrel proteinlerin çeşitliliği belirlenmiştir.

Yukarıdaki deneylerde ilk önce en etkili sinyal bileşiği konsantrasyonları belirlenmiş ve diğer uygulamalarda belirlenen bu konsantrasyonlarda çalışmalar yürütülmüştür.

3. 3. 2. Apoplastik proteinlerin ekstraksiyonu ve izolasyonu

Apoplastik proteinlerin ekstraksiyonu için buğday yapraklarından bir bisturiyle yaklaşık 1 cm uzunlukta dikkatlice kesilerek oluşturulan yaprak kesitleri (7g), kesilen bölgelerinden gelebilecek hücrel protein kontaminasyonunu önlemek için en az 6 kez bol su ile iyice yıkanmıştır (Hon *et al.* 1994; Atıcı and Nalbatoğlu 1999a,b). Hazırlanan 7 g yaprak kesiti, içerisinde 20 mM askorbik asit ve 20 mM CaCl₂ çözeltisi bulunan vakumlanabilir bir desikatöre yerleştirilmiş ve desikatör bir vakum pompası ile 20 dakika vakumlanmıştır. Vakumlanan yapraklar 20 mL'lik enjektörlere dikkatlice yerleştirildikten sonra, enjektörler birer santrifüj tüpüne konulmuş ve 2000 xg'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminin bitiminde, tüplerin dip kısmında biriken apoplastik ekstrakt, apoplastik proteinlerin elde edilmesi için kullanılmıştır (Atıcı and Nalbatoğlu 1999a,b; Mutlu 2005). Enjektörde kalan ve apoplastik sıvısı uzaklaştırılan yapraklar ise, simplastik antioksidan enzim aktivitelerini belirlemek için -28°C'de saklanmıştır.

Apoplastik proteinlerin izolasyonu için, apoplastik ekstraktlara hacimlerinin 1.5 katı soğuk (-28°C aseton ilave edilmiş ve karışım -28°C'de 1 gece bekletilmiştir. İkinci gün,

örnekler 3500 $\times g$ 'de 20 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra apoplastik protein peleti elde edilmiştir. Pelet, önce %96'lık sonra %70'lik etanol ile birer kez dikkatlice yıkanarak oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Tamamen kurumuş pelet, apoplastik enzim aktivitelerinin belirleneceği zamana kadar, -28°C'de saklanmıştır (Griffith *et al.* 1992; Hon *et al.* 1994; Atıcı and Nalbatoglu 1999a, b; Taşgın *et al.* 2003).

Enzim aktivitesi ölçümü yapılacağı zaman, apoplastik protein peletleri, 1 mL 0.2 M (pH: 7.5) sodyum fosfat tamponu içinde iyice çözölmüş ve apoplastik antioksidan enzim aktiviteleri ölçümü için hazır hale getirilmiştir.

3.3.3. Hücresel proteinlerin ekstraksiyonu

Hücresel proteinlerin ekstraksiyonu için, yapraklardan 1 g alınıp soğuk bir havan içine konulmuş ve üzerine sıvı azot ilave edilerek toz haline gelinceye kadar öğütölmüştür. Sonra üzerine 5 mL soğuk homojenat tamponu (%1 PVP ve 1 mM EDTA ihtiva eden 0.1 M KH_2PO_4 pH: 7.0) ilave edilmiş ve karışım bir sanstrifüj tüpüne aktararak 15000 $\times g$ ve +4°C'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonucunda elde edilen süpernatant hücresel antioksidan enzimlerin aktivite ölçümleri için kaynak olarak kullanılmıştır (Angelini *et al.* 1990; Angelini and Federico 1989; Mutlu 2005) .

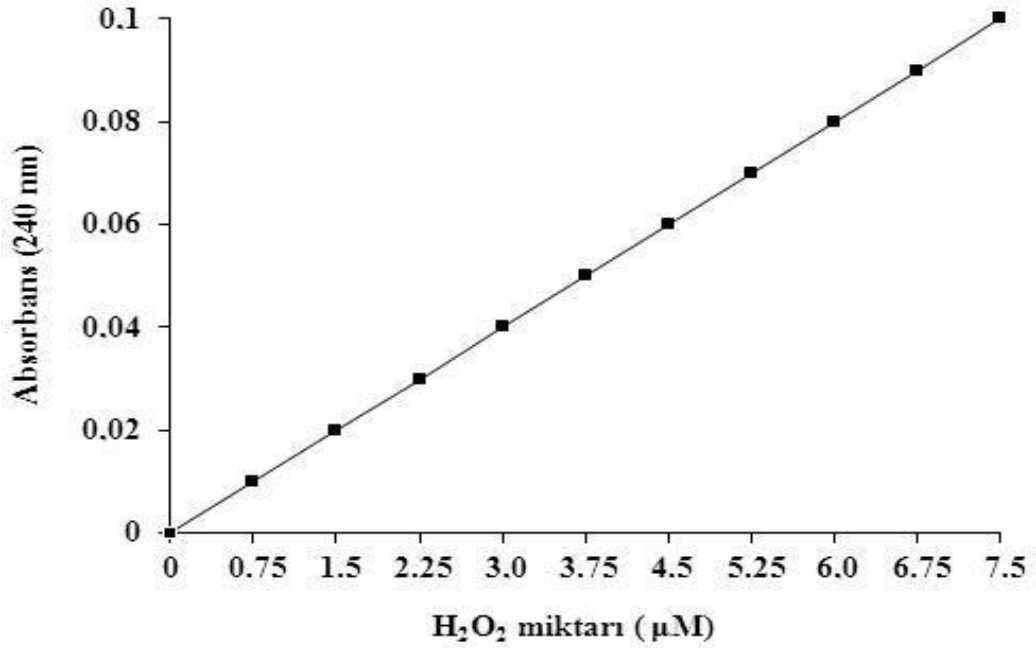
3.3.4. Yapraklarda Apoplastik ve hücresel antioksidan enzim aktivitelerinin belirlenmesi

Yukarıda belirtildiği gibi elde edilen apoplastik proteinler fosfat tamponunda (pH: 6.5) çözünerek spektrofotometrik yöntemlerle enzimlerin aktiviteleri belirlenmiştir. Her bir antioksidan enzim için kullanılan kimyasallar ve yöntemler farklıdır.

3.3.4.a. Katalaz aktivitesinin belirlenmesi

Katalazın (CAT) aktivite tayini için kullanılan yöntem, Havir ve Mchale'nin (1987) Luck'e (1965) dayandırarak uyguladığı yöntemdir. Bu metotla aktivite ölçümü, CAT aktivite ölçüm ortamındaki H_2O_2 'nin O_2 ve H_2O 'ya dönüşümünü sağlarken meydana gelen absorbans azalmasının 240 nm'de izlenmesi esasına dayanır (Havir *et al.* 1987). Reaksiyonda azalan H_2O_2 miktarını belirlemede kullanılan olan H_2O_2 standart grafiği önceden hazırlanmıştır. Bunun için, 5 mM H_2O_2 çözeltisinden 3 mL'lik spektrofotometre tüpüne sırasıyla; 0.15, 0.3, 0.45, 0.6, 0.75, 0.9, 1.05, 1.2, 1.35 ve 1.5 mL konulmuştur. Tüpün hacmi saf su ile 1.5 mL'ye tamamlanmış ve her tüpe 1.47 mL, 103.5 mM KH_2PO_4 ve 30 μ L su ilave edilmiştir. Küvet spektrofotometreye yerleştirildikten sonra 240 nm'de absorbans köre karşı okunmuştur. Absorbans değerlerine karşılık gelen μ M H_2O_2 değerleri kullanarak standart grafik elde edilmiştir. 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 μ L enzim ekstraktı ilave edilmiştir. Küvet spektrofotometreye yerleştirildikten sonra 240 nm'de 3 dakika boyunca 1 dakika aralıklarla köre karşı absorbansı okunmuştur. Ölçümlerde absorbansın doğrusal olarak azaldığı aralıktan dakika başına absorbans azalması hesaplanmıştır. Bu ortalama absorbans değerleri, standart grafik yardımıyla μ mol cinsinden H_2O_2 miktarına dönüştürülmüştür. 25 °C'de, 1 dakika içinde, absorbansı 1 μ mol azaltan enzim miktarı 1 enzim ünitesi olarak kabul edilmiş ve sonuçlar g yaprak başına düşen enzim ünitesi (EU/g yaprak) olarak sunulmuştur (Gong *et al.* 2001; Mutlu 2005).



Şekil 3.1. Katalaz aktivitesi ölçümünde kullanılan standart grafik.

3.3.4.b. Peroksidaz aktivitesinin belirlenmesi

Peroksidaz (POX) aktivite tayini, guaikol ve H₂O₂'nin substrat olduğu reaksiyonun ürünü olan renkli bileşiğin meydana getirdiği absorbans artışının 470 nm'de izlenmesi esasına dayanmaktadır (Angelini *et al.* 1989).

Aktivite ölçümü için spektrofotometre küvetine; 100 mL 0.1 M, NaH₂PO₄ (pH: 5.5) ve 5 mM guaikol içeren substrat çözeltisinden 3 mL konulduktan sonra, üzerine 10 μL enzim ekstraktı ilave edilmiştir. 470 nm'de 5 dakika boyunca absorbans artışı 1 dakika aralıklarla kaydedilmiş ve absorbansın doğrusal olarak arttığı kısımdaki absorbans artışı 1 dakikaya oranlanmıştır. 25 °C'de 1 dakikada, absorbansı 0.01 artıran enzim miktarı 1 enzim ünitesi olarak kabul edilmiş ve sonuçlar g yaprak başına düşen enzim ünitesi (EU/g yaprak) olarak sunulmuştur (Ye *et al.* 2002; Mutlu 2005).

3.3.4.c. 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 belirlenmesi esasına dayanır (Agarwal and Pandey 2004; Yordanova *et al.* 2004).

Reaksiyon karışımı (3 mL); 50 mM KH₂PO₄ (pH: 7.8), 13 mM metiyonin, 75 µM NBT, 2µM riboflavin ve 0.1 mM EDTA içermektedir. Aktivite ölçümü için 3 mL spektrofotometre küvetine yukarıdaki riboflavin içermeyen reaksiyon karışımından 2.84 ml alınmış ve üzerine 100 µL enzim ekstraktı pipetlenmiştir. Reaksiyon, tüp üzerine 100 µM'lık riboflavin çözeltisinden 60 µL pipetlenip karıştırıldıktan hemen sonra, beyaz bir ışık kaynağı önüne yerleştirmek suretiyle başlatılmıştır. Tüp, ışık kaynağının karşısında 15 dk. tutulmuş ve reaksiyon ışık kaynağının kapatılmasıyla durdurulmuştur. 15 dk. içerisinde NBT'nin renk açılma yoğunluğu 560 nm'de köre karşı okunmuştur. Kör; aynı işlemin enzimsiz örneğinden oluşmaktadır. SOD aktivitesinin 1 ünitesi, 560 nm'de gözlenen NBT indirgenmesinin % 50 inhibisyonuna neden olan enzim miktarı, 1 enzim ünitesi olarak kabul edilmiş ve değerler EU/g yaprak olarak sunulmuştur (Mutlu 2005).

3.3.5. Lipid peroksidasyon aktivitesinin belirlenmesi

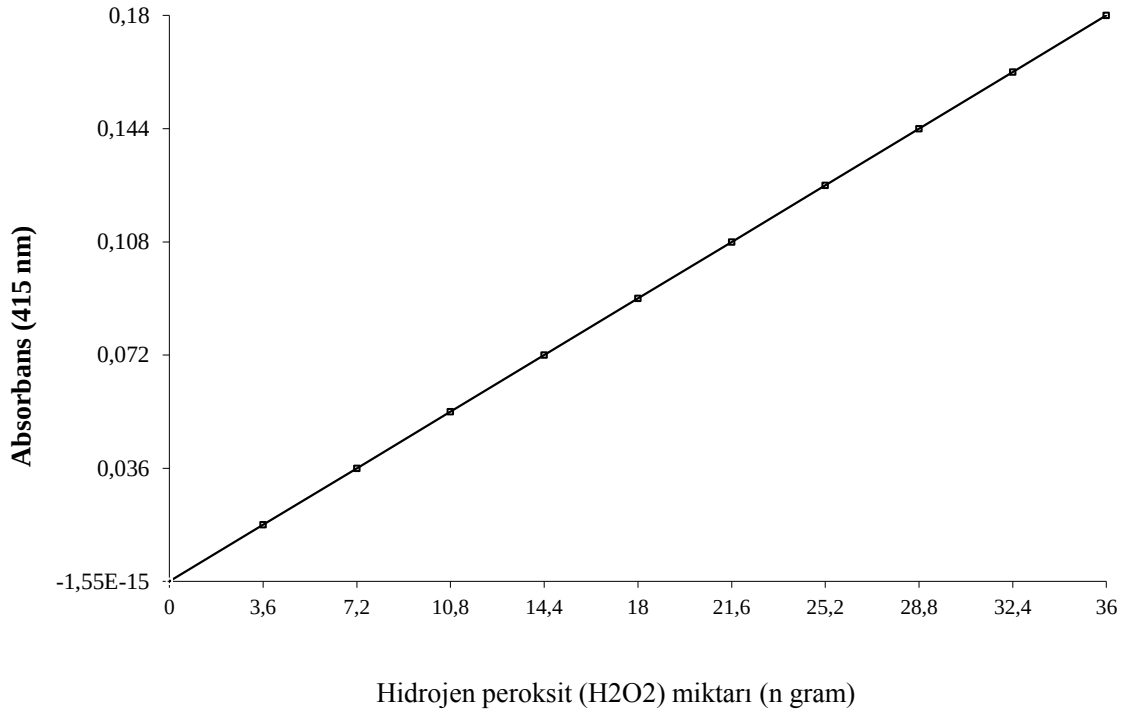
Lipid peroksidasyonu için 0.5 g yaprak alınarak 5 mL %5'lik TCA içinde homojenize edildikten sonra elde edilen homojenat 10.000 x g'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Tüpün süpernatant kısmından 4 mL alınarak üzerine 1 mL %0.5 lik TBA çözeltisi ilave edilmiştir. Reaksiyon karışımı kaynar suda 30 dakika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

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

3.3.6. Hidrojen peroksit (H₂O₂) miktarının belirlenmesi

Hidrojen peroksit (H₂O₂) miktarının belirlenmesi için; 0.5 gram arpa yaprağı alınarak 10 mL soğuk aseton içinde homojenize edildikten sonra homojenat 10.000 xg’de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra elde edilen süpernatantın 1.5 mL’si 0.15 mL % 5’lik Ti(SO₄)₂ (titanyum disülfat) ve 0.3 mL %19’luk NH₄OH (amonyum hidroksit) ile karıştırılmıştır. Çökelek oluştuktan sonra karışım 10.000 xg’de 10 dakika daha santrifüj edilmiştir. Tüpün süpernatant kısmı uzaklaştırıldıktan sonra elde edilen pelet 3 mL 2 M’lık H₂SO₄ (sülfürik asit) içinde çözölmüş ve 415 nm’de absorbansı ölçölerek kaydedilmiştir. Bu ortalama absorbans değeri, daha önceden hazırlanmış standart grafik yardımıyla nanogram cinsinden H₂O₂ miktarına dönüştürölmüştür. Sonuçlar g yaprak başına düşen H₂O₂ miktarı (ngram /g yaprak) olarak sunulmuştur.

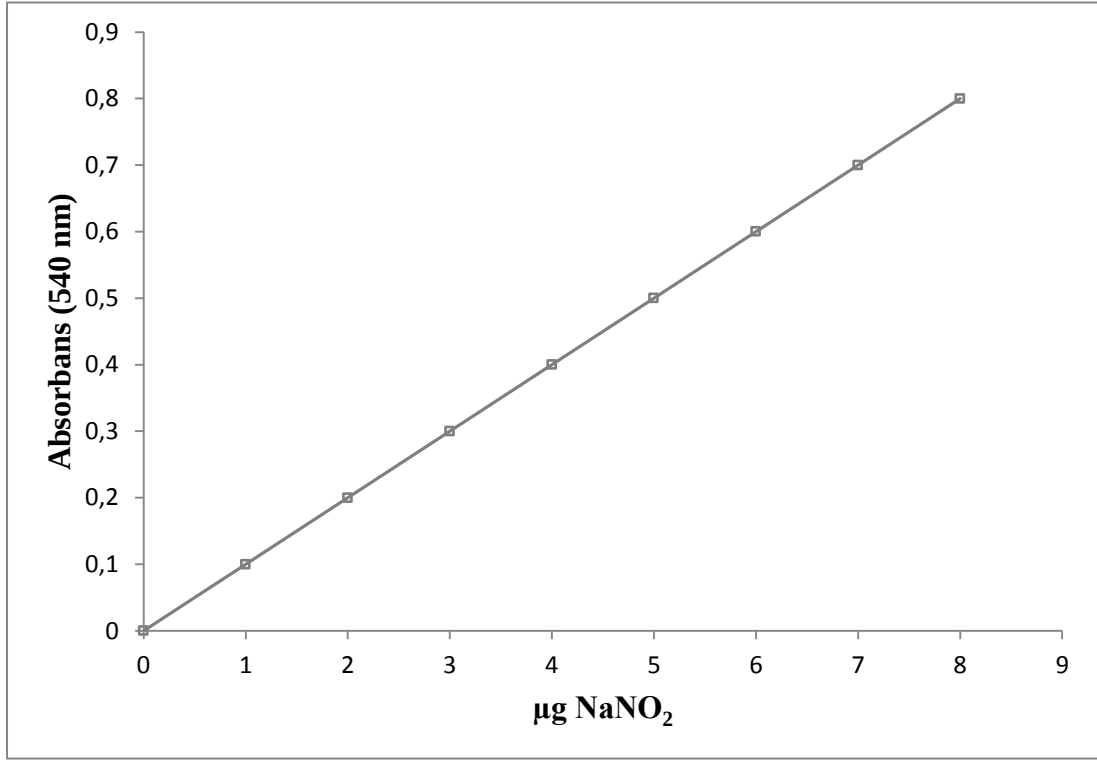
H₂O₂ miktarını belirlemede kullanılan H₂O₂ standartı için, %35’lik H₂O₂ çözeltisinden hazırlanan 3mM’lık stok çözeltiden eppendorf tüplerine sırasıyla; 3.6, 7.2, 10.8, 14.4, 18, 21.6, 25.2, 28.8, 32.4 ve 36 nanogram olacak şekilde konulmuştur. Tüpün hacmi aseton ile 1.5 mL’ye tamamlanmış ve her tüpe 0.15 mL %5’lik Ti(SO₄)₂ ve 0.3mL %19’luk NH₄OH ilave edilmiştir. Çökelek oluştuktan sonra karışım 10.000 x g’de 5 dakika daha santrifüj edilmiştir. Tüpün süpernatant kısmı uzaklaştırıldıktan sonra elde edilen pelet 3 mL 2 M’lık H₂SO₄ içinde çözölmüş ve küvet spektrofotometreye yerleştirildikten sonra 415 nm’de absorbans köre karşı okunmuştur. Absorbans değeri, karşılık gelen nanogram H₂O₂ değeri kullanarak standart grafik elde edilmiştir.



Şekil 3.2. Hidrojen peroksit (H₂O₂) miktarını belirlemede kullanılan standart grafik.

3.3.7. Süperoksit anyonu (O₂⁻) miktarının belirlenmesi

0.5 g yaprak sıvı azot ile toz haline getirildikten sonra üzerine 2 mL 65 mM (Ph: 7.8) fosfat tamponu ile homojenize edilir. Homojenat 5000 x g de 10dk + 4 °C de santrifüj edilir. Süpernatantın 1 mL si 10 mM hydroxilaminenden 0.1 mL ve aynı fosfat tamponundan 0.9 mL alınır karıştırılır ve 25 °C de 20 dk inkübe edilir. İnkübasyona bırakılan karışımın 1 ml alınır üzerine 1 mL 17 mM aminobenzene sülfonik asit ve 1 mL 17 mM 1-naftilamin eklenir ve tekrardan 25 °C de 20 dk inkübe edildikten sonra spektrofotometre de 530 nm'de ölçülür. Sonuçlar NaNO₂ standart grafiğine bakılarak değerlendirilir.



Şekil 3.3. Süperoksit anyonu (O_2^-) miktarını belirlemede kullanılan standart grafik.

3.3.8. Sodyum dodesil sülfat jel elektroforezi (SDS-PAGE)

Bu araştırmada yapraklardan elde edilen apoplastik ve hücrel proteinlerdeki değişim, Laemmli(1970) tarafından anlatıldığı şekilde elektroforezle kontrol edilmiştir.

Apoplastik proteinler 100 µL numune tamponu içinde çözüldükten sonra elektroforeze hazırlanmıştır. Elektroforez için %4–14 kesikli sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jeli hazırlanmıştır. Ayırma jelini hazırlamak için, bir behere %30'luk akrilamid-%0.8'lik bisakrilamid çözeltisinden 25 mL alınmış ve üzerine sırasıyla 1 M'lık Tris-HCl (pH:8.8)'den 22.5 mL, %10'luk SDS'den 0.9 mL, 0.6 mL %5'lik TEMED ve 9 mL saf su konularak karıştırılmıştır. Bu karışımın üzerine en son olarak 15 mg (1.2 mL) amonyum persülfat hızlıca pipetlenmiştir. Yığma jelini hazırlamak için, bir behere %30'luk akrilamid-%0.8'lik bisakrilamid çözeltisinden 2 mL alınmış ve üzerine sırasıyla 0.5 M'lık Tris-HCl (pH:6.8)'den 2.48 mL, %10'luk SDS'den 0.2 mL, %5'lik 5 µL TEMED ve 15.6 mL saf su konularak karıştırılmıştır. Bu karışımın üzerine günlük

hazırlanmış %1.5'lük amonyum persülfattan 0.4 mL ilave edilmistir. Elektroforez islemi su sekilde yapılmıştır. Elektroforez cam tabakaları önce saf su ve sonra alkol ile yıkanmıştır. Plakaları birlestiren aralık koruyucu mikalara, sızmayı önlemek için vazelin sürölüp iki cam plaka arasına lastik seritler konularak camlar birlestirilmistir. Daha sonra plastik elektroforez torbalarına konulan cam plakalar kısıkaçlar ile tutturularak jel hazırlama cihazına monte edilmistir. Ayırma jeli hazırlandıktan hemen sonra ince bir pipet yardımıyla pipetlenmiş ve bunun üzerine jelin üstünün pürüzsüz olması için hemen bütanol bir miktar dökülmüştür.

Ayırma jeli katılasıncaya kadar yaklaşık iki saat beklenmistir. Katılama sonrası jelin üzerindeki izopropil dökölerek tekrar jelin üzeri saf su ile doldurulup, serin bir yerde 1 gece bekletilmistir. İkinci gün yağma jeli hazırlanmış ve ayırma jelinin üzerine dökölüp tarak yerlestirilerek yaklaşık 2-3 saat sonra tarak jelden dikkatli bir sekilde çıkarılmıştır.

Hazırlanan plakaların kuyuları önce saf su ile sonra yürütme tamponu ile yıkanıp, elektroforez tankına yerlestirilmistir (Tasğın 2004). Protein numuneleri, toplam hacim 100 µL olacak sekilde tüplerde hazırlanıp 3 dakikakaynar suda inkübe edilmiş ve oda sıcaklığına kadar soğutulmustur. Nümuneler birmikroenjektörle jelin kuyularına tatbik edilmistir. Molekül ağılıkları bilinen standartproteinlerde 100 µL tamponda çözölerek numunelerle birlikte jele yüklenmistir. Tankkapağı kapatılarak elektroforez tankının alt ve üst kısmına yeterince yürütme tamponukonulmuş ve elektrik bağılantıları yapılmıştır. Daha sonra numuneler ayırma jelinin hizasına kadar 80 voltta yürütölmüştür. Ayırma jelinden sonra 150 voltta yaklaşık 4-5saat yürütmeye devam edilmistir. Yürüme islemi bittiğinde akım kesilerek jel, camlararasından dikkatlice çıkarılmış ve sabitleme çözeltisinde hafif tempoda 45 dakikaçalkalanmıştır. Yürütme tamponu tekrar kullanılmak üzere özel kabına konulmustur. Daha sonra, jel boyama çözeltisine alınmış ve iki saat tekrar çalkalamış, daha sonraboyama çözeltisinden alınarak protein bantları iyice görölünceye kadar yıkamaçözeltisinde yıkanmıştır. Belirli zaman periyotlarında değıstirilmek suretiyle jelin zeminrengi açılıp, protein bantları belirginlesinceye kadar bu çözelti içinde çalkalanmıştır. Yıkama çözeltisi aktif karbondan geçirilerek tekrar

kullanılmıştır. Jel, yıkamaçözeltisinden çıkarıldıktan sonra fotoğrafı çekilmiştir (Taşgın 2004).

3.4. İstatistik Analiz

Tez içerisinde sunulan sonuçlar, her bir uygulamadan üç örnek (3 paralel) ve her bir örnekten 2 tekerrür yapıldıktan sonra elde edilen 3 değerin ortalamasıdır. Sonuçların karşılaştırılması, SPSS 18.0 paket programı kullanılarak tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile yapılmış ve istatistik anlamlar, 0.05 hata seviyesinde Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma Testi kullanılarak belirlenmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu kısımda kışlık buğdayın (*Triticum aestivum* cv. Doğu-88) yapraklarındaki apoplastik (peroksidaz ve süperoksit dismutaz enzim aktiviteleri, SDS elektroforezleri) ve hücrel (katalaz, peroksidaz ve süperoksit dismutaz enzim aktiviteleri, lipid peroksidasyonu, hidrojen peroksitve süperoksit anyonu miktarı ve SDS elektroforezleri) proteinlere ait bulgular verilmiştir. Bitkilere ekim gününe göre 12. gün, 0.1 ve 1 mM salisilik asit (SA), sodyum nitroprussid (SNP) ve putresin (Put), 50 ve 100 μ M absisik asit (ABA), 50 ve 100 ppm etafon(Etp), 10^{-6} ve 10^{-8} M östrojen(Öst) uygulanmış ve uygulamadan 3 gün sonra bitki yaprakları deney materyali olarak kullanılmıştır. Her parametre için elde edilen değerler kontrol bitkileriyle kıyaslanmıştır. Bulgular çizelgelerle ayrıntılı olarak verilmiş, ayrıca farklı yaklaşımların ve değerlendirmelerin yapılabilmesi için şekillerle de sunulmuştur.

4.1. Apoplastik Enzim Aktivitesi Sonuçları

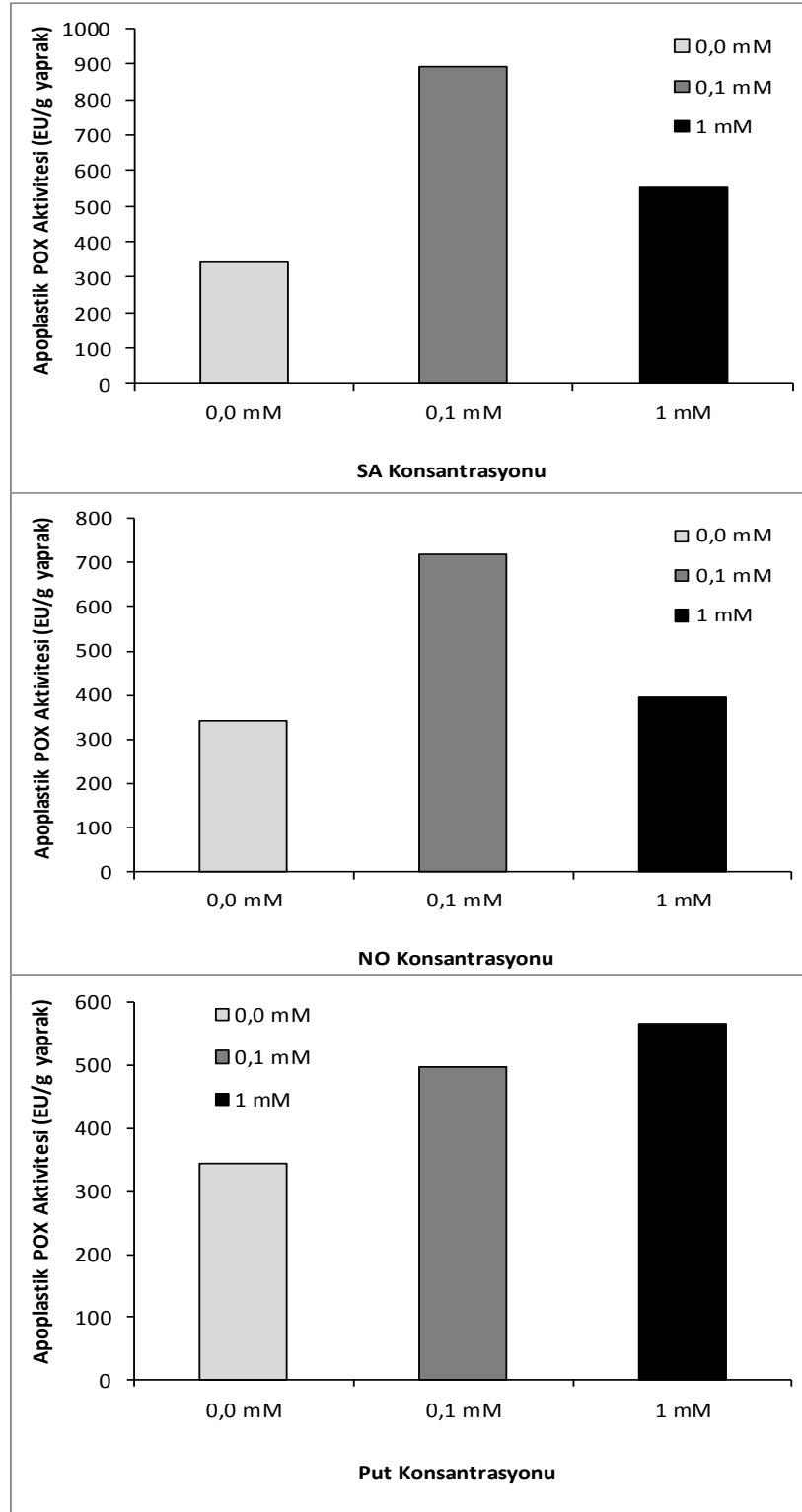
4.1.1. Peroksidaz Aktivitesi Sonuçları

0,1 ve 1 mM SA, NO ve Put, 50 ve 100 μ M ABA, 50 ve 100 ppm Etp ve 10^{-6} ve 10^{-8} M Öst uygulanmış bitki yapraklarında, apoplastik POX aktivitesinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli sonuçlar elde edilmiştir (Çizelge 4.1, Şekil 4.1,2).Uygulanan tüm sinyal bileşikleri değişken seviyelerde kontrole göre apoplastik POX aktivitesini artırmıştır.0.1 mM SA % 160, 1mM SA % 62, 0.1m NO %110, 1mM NO % 15, 0.1mM Put. % 45, 1mM Put. % 65, 50 μ M ABA % 70, 100 μ M ABA % 127, 50 ppm Etp % 182, 100 ppm Etp % 197, 10^{-6} M Öst %167, 10^{-8} M Öst % 350 oranlarında POX aktivitesini artırmışlardır. 1mM SA ile 1mM Put. Diğer taraftan 0,1 mM SA ile 10^{-6} M Öst POX aktivitesini birbirine yakın seviyelerde artırmışlardır. En fazla POX aktivitesi 10^{-8} M Öst’ de görülürken, en az aktivite 1mM NO’ da görülmüştür. SA ve NO hariç diğer uygulamalarda düşük konsantrasyonlar düşük aktivite, yüksek konsantrasyonlar yüksek aktivite göstermiştir.

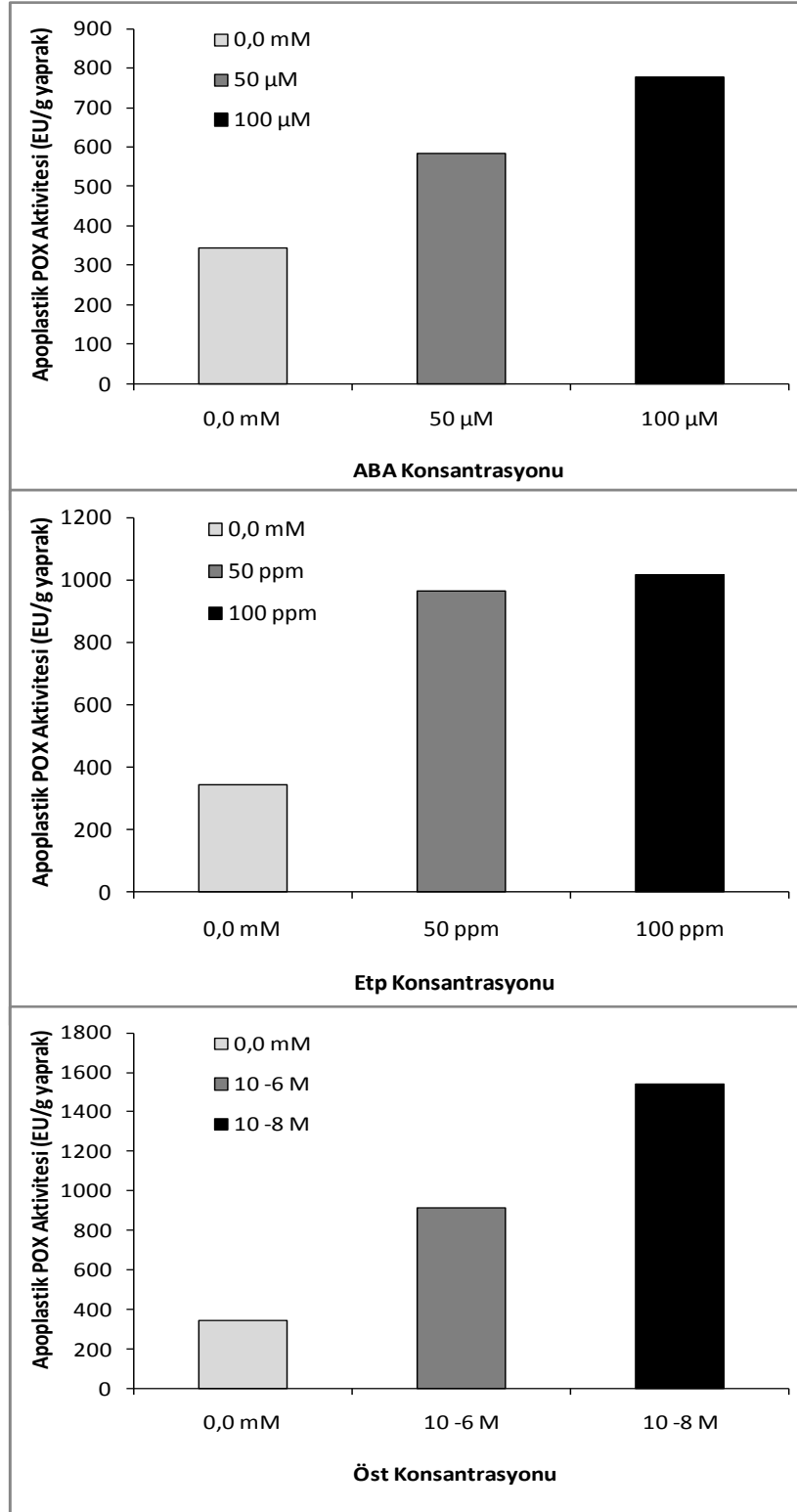
Çizelge 4.1. Normal şartlarda yetiştirilen, kontrol ve kesimden 3 gün önce SA, NO, Put, ABA, Etp ve Öst uygulanmış kışlık buğday yapraklarından elde edilen apoplastik POX aktivitesi değerleri.

		$\Delta A/ 10\mu L$	EU/ 10 μL	EU/ g yaprak	% Aktivite
Kontrol		0,06	6	342,9 ^m	100
SA	0,1 mM	0,156	15,6	891,5 ^e	260
	1 mM	0,097	9,7	554,3 ^j	162
NO	0,1 mM	0,126	12,6	720 ^g	210
	1 mM	0,069	6,9	394,3 ^l	115
Put	0,1 mM	0,087	8,7	497,1 ^k	145
	1 mM	0,099	9,9	565,7 ⁱ	165
ABA	50 μM	0,102	10,2	582,9 ^h	170
	100 μM	0,136	13,6	777,1 ^f	227
Etp	50 ppm	0,169	16,9	965,7 ^c	282
	100 ppm	0,178	17,8	1017,1 ^b	297
Öst	10 ⁻⁶ M	0,16	16	914,3 ^d	267
	10 ⁻⁸ M	0,27	27	1542,9 ^a	450

*Aynı harfi bulunduran gruplar arasındaki fark önemsizdir (P<0.05).



Şekil 4.1. Normal şartlarda yetiştirilen, SA, NO ve Put uygulanmış kışlık buğday yapraklarından elde edilen apoplastik POX aktivitesi



Şekil 4.2. Normal şartlarda yetiştirilen, ABA, Etp ve Öst uygulanmış kışlık buğday yapraklarından elde edilen apoplastik POX aktivitesi

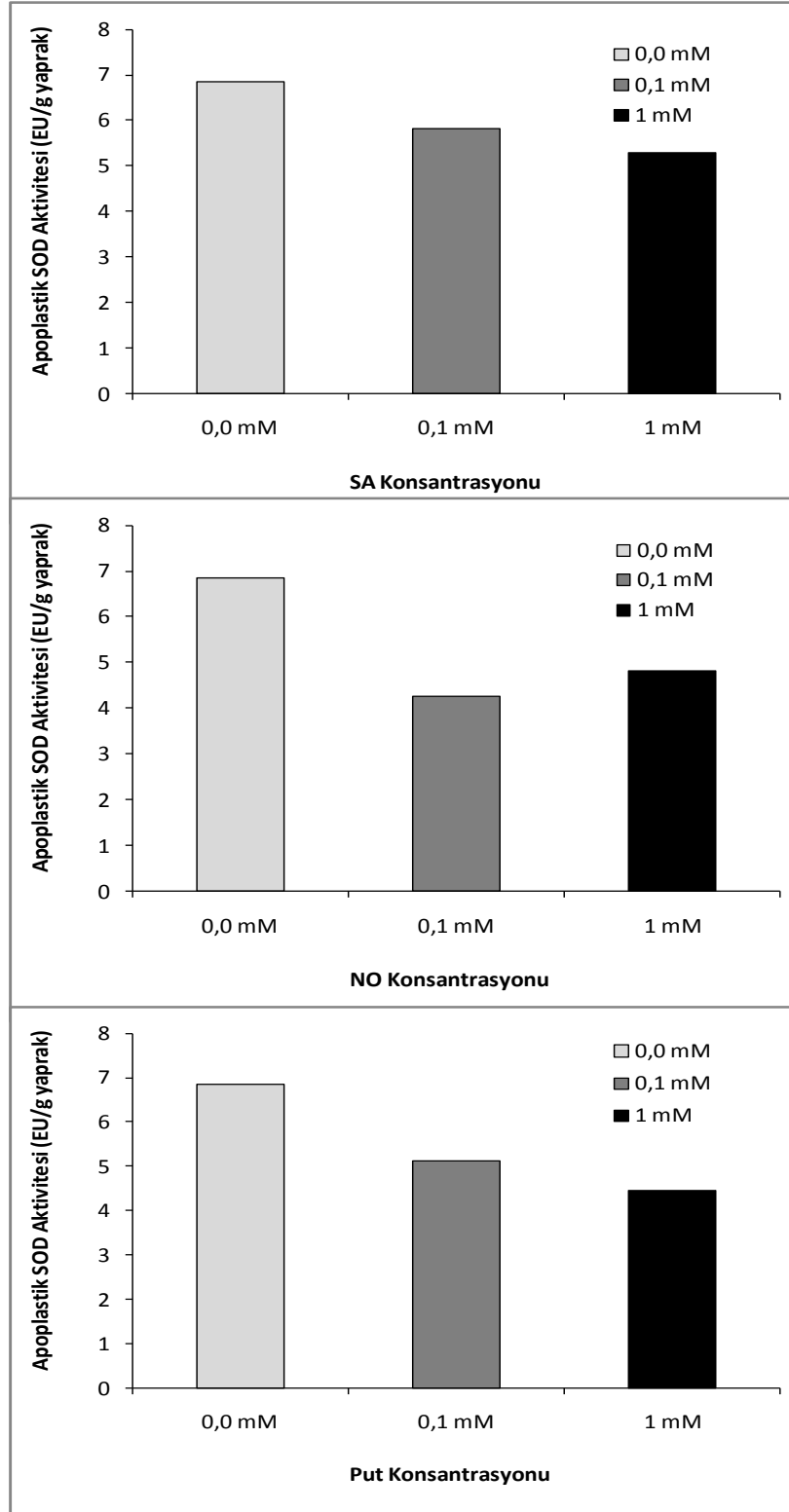
4.1.2 Süperoksit Dismutaz Aktivitesi Sonuçları

0,1 ve 1 mM SA, NO ve Put, 50 ve 100 μ M ABA, 50 ve 100 ppm Etp ve 10^{-6} ve 10^{-8} M Öst uygulanmış bitki yapraklarında, apoplastik SOD aktivitesinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli sonuçlar elde edilmiştir (Çizelge 4.2, Şekil 4.3,4). Uygulanan tüm sinyal bileşikleri kontrole göre apoplastik SOD aktivitesini azaltmıştır. 0.1 mM SA % 15, 1 mM SA % 23, 0.1 mM NO % 38, 1mMSNP % 30, 0.1 mM Put % 25, 1mM Put % 35, 50 μ M ABA % 59, 100 μ M ABA % 40, 50 ppm Etp % 45, 100 ppm Etp % 36, 10^{-6} M Öst % 29, 10^{-8} M Öst % 7 oranlarında SOD aktivitesini azaltmışlardır. 1mM SA 0,1 mM Put, 0,1m NO-1mM Put-100 ppm Etp ve 1mM NO- 10^{-6} M Öst aktiviteyi yakın seviyelerde azaltmışlardır. SOD aktivitesini en çok azaltan 50 μ M ABA iken en az etkileyen 10^{-8} M Öst'dir. SA ve Put hariç diğer uygulamalarda düşük konsantrasyonlar SOD aktivitesini yüksek konsantrasyonlara göre daha fazla düşürmüştür.

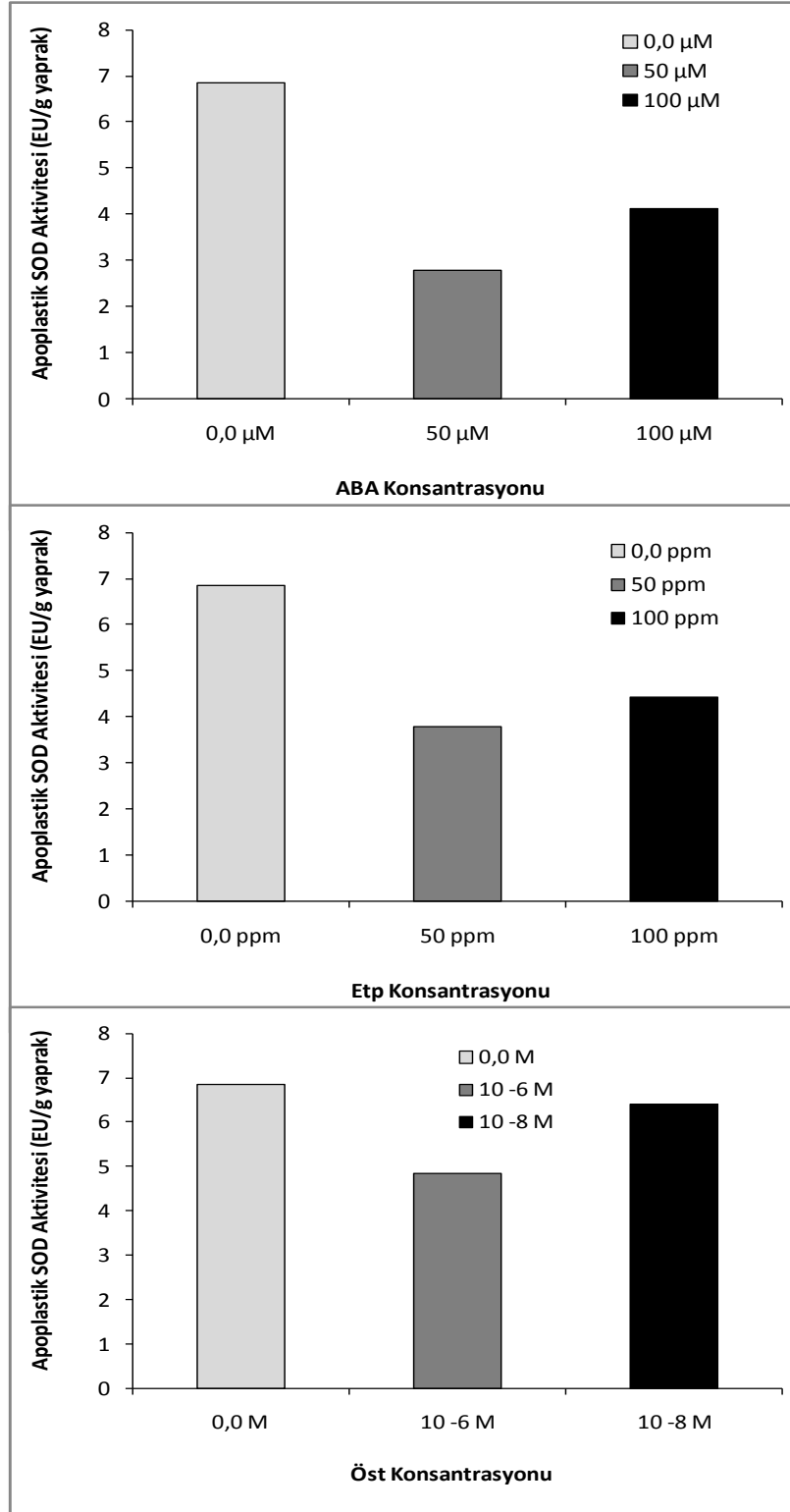
Çizelge 4.2. Normal şartlarda yetiştirilen, kontrol ve kesimden 3 gün önce SA, NO, Put, ABA, Etp ve Öst uygulanmış kışlık buğday yapraklarından elde edilen apoplastik SOD aktivitesi değerleri.

		Ortalama Absorbans Artışı $\Delta A / 100\mu L$	EU/ 100 μL	EU/ g yaprak (EU / 0,0175)	% Aktivite
Kontrol		0,222	1,2	6,86 ^a	100
SA	0,1 mM	0,188	1,02	5,81 ^c	85
	1 mM	0,171	0,92	5,3 ^d	77
NO	0,1 mM	0,138	0,75	4,27 ^h	62
	1 mM	0,156	0,84	4,82 ^f	70
Put	0,1 mM	0,168	0,91	5,12 ^e	75
	1 mM	0,144	0,78	4,45 ^g	65
ABA	50 μM	0,09	0,49	2,78 ^k	41
	100 μM	0,133	0,72	4,11 ⁱ	60
Etp	50 ppm	0,123	0,66	3,8 ^j	55
	100 ppm	0,143	0,77	4,42 ^g	64
Öst	10 ⁻⁶ M	0,157	0,85	4,85 ^f	71
	10 ⁻⁸ M	0,207	1,12	6,40 ^b	93

* Aynı harfi bulunduran gruplar arasındaki fark önemsizdir (P < 0.05).

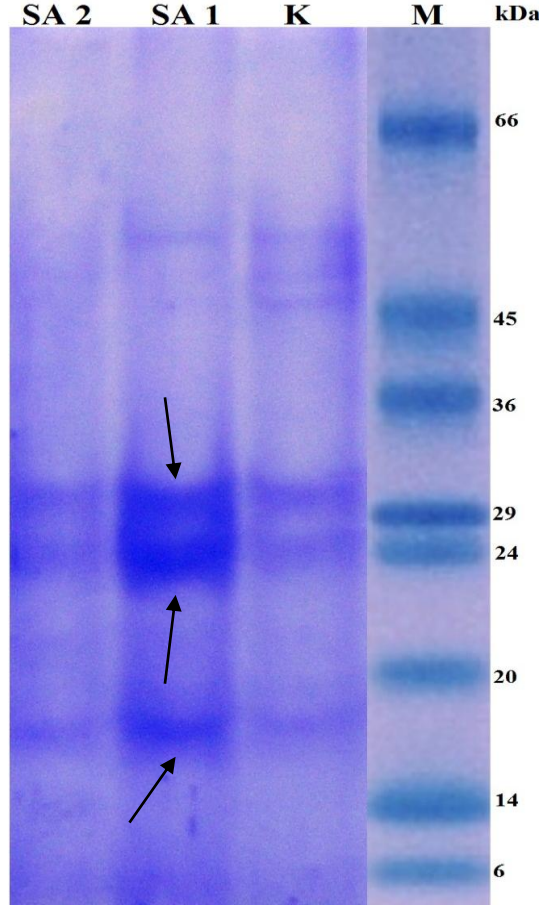


Şekil 4.3. Normal şartlarda yetiştirilen, SA, NO ve Put uygulanmış kışlık buğday yapraklarından elde edilen apoplastik SOD aktivitesi



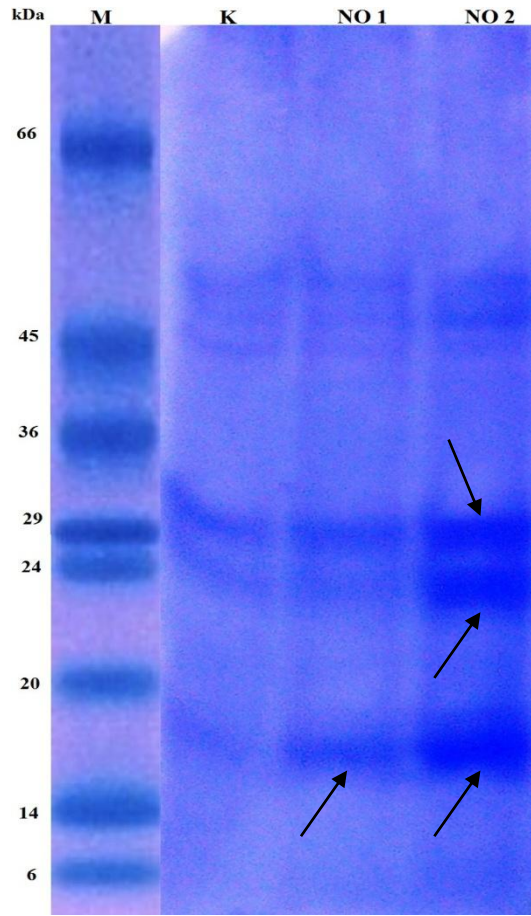
Şekil 4.4. Normal şartlarda yetiştirilen ABA, Etp ve Öst uygulanmış kışlık buğday yapraklarından elde edilen apoplastik SOD aktivitesi

4.2. Apoplastik Proteinlerin SDS–Poliakrilamid Jel Elektroforezi Sonuçları



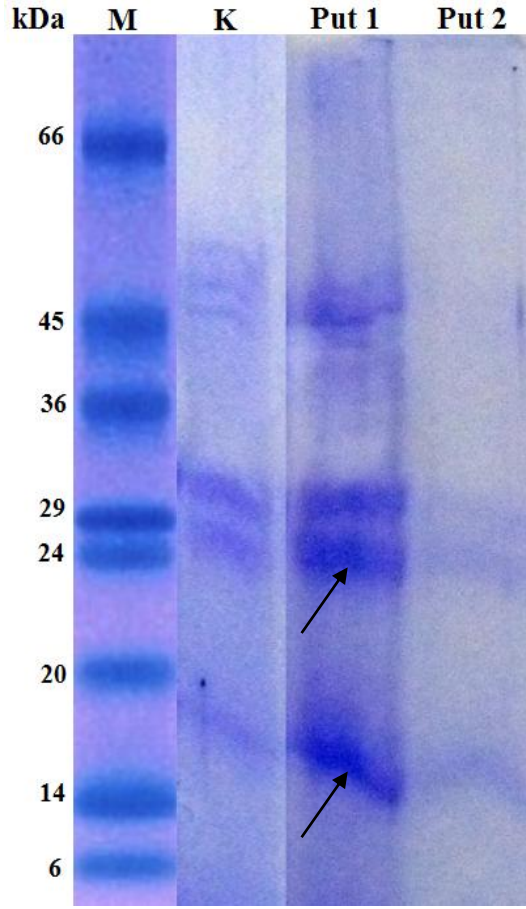
Şekil 4.5. Normal şartlarda yetiştirilen, SA uygulanmış kışlık buğday yapraklarından elde edilen apoplastik proteinlerin SDS - PAGE fotoğrafı (**kDa**:Kilodalton, **M**:Standart proteinler, **K**:Kontrol, **SA1**:0.1 mM SA, **SA2**:1 mM SA).

Sekil 4.13’de Kışlık buğday yapraklarının apoplastlarından elde edilen proteinlerin SDS-PAGE sonuçlarında standart proteinlerle kıyaslandığında, polipeptidlerin büyüklüklerinin yaklaşık 6 ile 66 kDa arasında olduğu görülmektedir. Ayrıca 14 ile 20 kDa arasındaki, 24, 29 kDa civarındaki, kısmen 45 ile 60 kDa civarındaki polipeptidlerde belirgin bantlar göze çarpmaktadır. 14 ile 20 kDa arasındaki ve 24 ile 29 kDa civarındaki bantların (kısmen daha şiddetli) 0,1mM SA uygulamasıyla şiddetinin arttığı, 45 ile 60 kDa civarındaki bantlarda her iki SA uygulamalarında da kontrole göre bant şiddetinin azaldığı görülmektedir. Ayrıca 1 mM SA’da bant şiddetlerinin korunduğu görülmektedir.



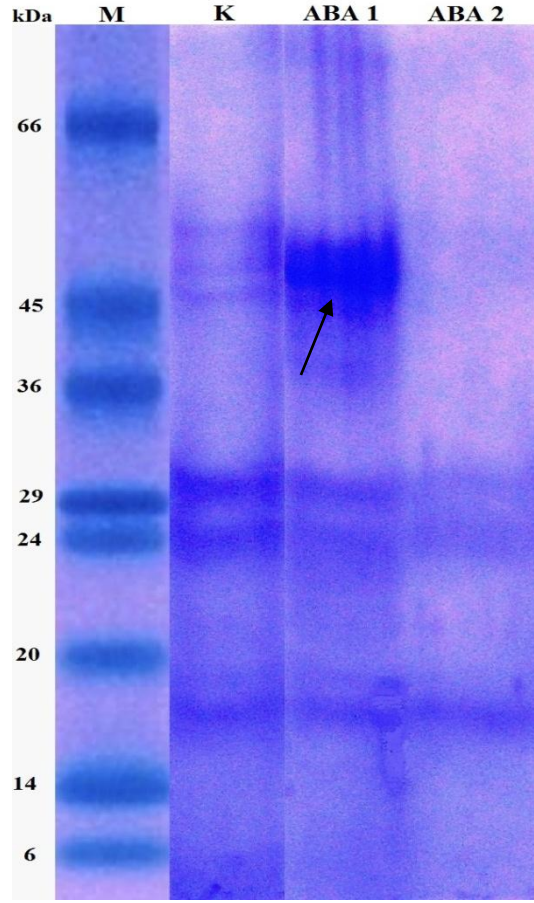
Şekil 4.6. Normal şartlarda yetiştirilen, NO uygulanmış kışlık buğdayyapraklarından elde edilen apoplastik proteinlerin SDS - PAGE fotoğrafı (**kDa**:Kilodalton, **M**:Standart proteinler, **K**:Kontrol, **NO1**:0.1 mM NO, **NO2**:1 mM NO).

Sekil 4.6.'da Kışlık buğday yapraklarının apoplastlarından elde edilen proteinlerin SDS-PAGE sonuçlarında standart proteinlerle kıyaslandığında, polipeptidlerin büyüklüklerinin yaklaşık 6 ile 66 kDa arasında olduğu görülmektedir. Ayrıca 14 ile 20 kDa arasındaki, 24, 29 kDa civarındaki, kısmen 45 ile 60 kDa civarındaki polipeptidlerde belirgin bantlar göze çarpmaktadır. 14 ile 20 kDa arasındaki ve 24 ile 29 kDa civarındaki bantların 1mM NO uygulamasıyla şiddetinin arttığı, yine 14 ile 20 kDa arasındaki bantlarda 0.1 mM NO nun diğer konsantrasyona göre az kontrole göre daha çok şiddetli olduğu görülmektedir. 45 kDa civarındaki bantın ise her iki uygulamada kontrole göre kaybolduğu görülmektedir.



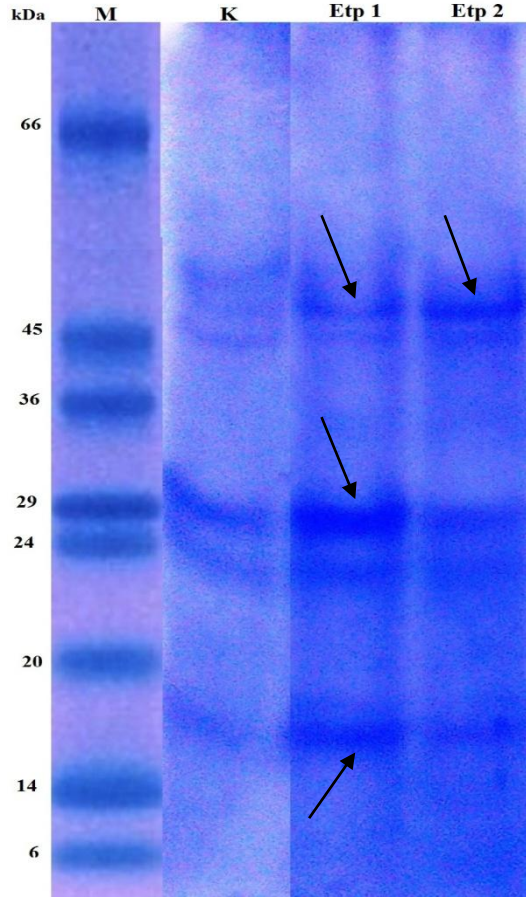
Şekil 4.7. Normal şartlarda yetiştirilen, Put uygulanmış kışlık buğday yapraklarından elde edilen apoplastik proteinlerin SDS - PAGE fotoğrafı(**kDa**:Kilodalton, **M**:Standart proteinler, **K**:Kontrol, **Put1**:0.1 mM Put, **Put2**:1 mM Put).

Sekil 4.7.'de Kışlık buğday yapraklarının apoplastlarından elde edilen proteinlerin SDS-PAGE sonuçlarında standart proteinlerle kıyaslandığında, polipeptidlerin büyüklüklerinin yaklaşık 6 ile 66 kDa arasında olduğu görülmektedir. Ayrıca 14 ile 20 kDa arasındaki, 24, 29 kDa civarındaki ve 45 ile 60 kDa civarındaki polipeptidlerde belirgin bantlar göze çarpmaktadır. 14 ile 20 kDa arasındaki ve 24 ile 29 kDa civarındaki bantların 0.1 mM Put uygulamasıyla şiddetinin arttığı. Yine 45 ile 50 kDa arasındaki bantlarda 0.1 mM Put' un daha şiddetli olduğu görülmektedir. 14 ile 20 kDa arasındaki ve 24, 29 kDa civarındaki polipeptidlerde bantların kontrole göre 1mM Put uygulamasıyla zayıfladığı ve 45 ile 60 kDa civarındaki bantların ise yine 1mM Put uygulamasıyla kaybolduğu görülmektedir.



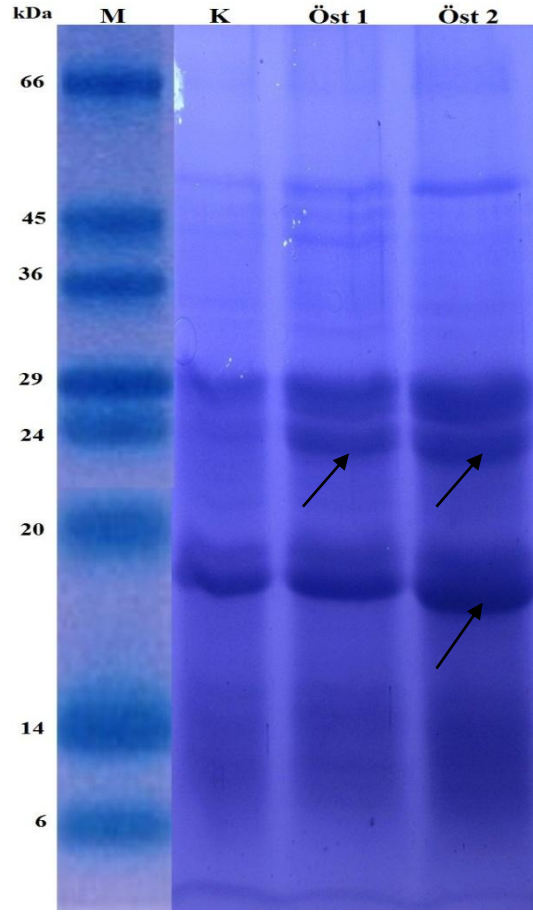
Şekil 4.8. Normal şartlarda yetiştirilen, ABA uygulanmış kışlık buğday yapraklarından elde edilen apoplastik proteinlerin SDS - PAGE fotoğrafı (**kDa**:Kilodalton, **M**:Standart proteinler, **K**:Kontrol, **ABA1**:50 μ M ABA, **ABA2**:100 μ M ABA).

Sekil 4.8.'de Kışlık buğday yapraklarının apoplastlarından elde edilen proteinlerin SDS-PAGE sonuçlarında standart proteinlerle kıyaslandığında, polipeptidlerin büyüklüklerinin yaklaşık 6 ile 66 kDa arasında olduğu görülmektedir. Ayrıca 45 ile 60 kDa civarındaki polipeptidlerde 50 μ M ABA uygulamasında şiddeti yüksek belirgin bantlar göze çarpmaktadır. 45 ile 60 kDa civarındaki bantların kontrole göre 100 μ M ABA uygulamasıyla kaybolduğu görülmektedir. 24-29 kDa civarındaki bantlarda ise her iki ABA uygulamasında bantlarda bant şiddetinin azaldığı ve özellikle 100 μ M ABA uygulamasında diğer uygulamaya göre bantşiddette daha fazla azalma olduğu görülmektedir.



Şekil 4.9. Normal şartlarda yetiştirilen Etp uygulanmış kışlık buğday yapraklarından elde edilen apoplastik proteinlerin SDS - PAGE fotoğrafı (**kDa**:Kilodalton, **M**:Standart proteinler, **K**:Kontrol, **Etp1**:50 ppm Etp, **Etp2**:100 ppm Etp).

Sekil 4.9.'de Kışlık buğday yapraklarının apoplastlarından elde edilen proteinlerin SDS-PAGE sonuçlarında standart proteinlerle kıyaslandığında, polipeptidlerin büyüklüklerinin yaklaşık 6 ile 66 kDa arasında olduğu görülmektedir. Ayrıca 14 ile 20 kDa arasındaki, 24-29 kDa ve 45-60 kDa civarındaki polipeptidlerde belirgin bantlar, göze çarpmaktadır. 14 ile 20 kDa arasındaki, 24 ile 29 kDa ve 45-60 kDa civarındaki bantlarda 50 ppm Etp uygulamasıyla bant şiddetinin arttığı görülmektedir. Yine 45-60 kDa civarındaki bantlarda 100 ppm uygulamasının diğer konsantrasyona göre bant şiddetini daha fazla artırdığı görülmektedir. 60 kDa civarındaki bandın her iki uygulamada da kontrole göre kaybolduğu, 14 ile 20 kDa arasındaki bantlarda 100 ppm Etp uygulamasının 50 ppm'den daha zayıf bant ortaya çıkardığı ve yine 24-29 kDa civarındaki bantların 100 ppm Etp uygulamasıyla zayıfladığı görülmektedir.



Şekil 4.10. Normal şartlarda yetiştirilen Öst uygulanmış kışlık buğdayyapraklarından elde edilen apoplastik proteinlerin SDS - PAGE fotoğrafı (**kDa**:Kilodalton, **M**:Standart proteinler, **K**:Kontrol, **Öst1**: 10^{-6} M Öst, **Öst2**: 10^{-8} M Öst).

Sekil 4.18’de Kışlık buğday yapraklarının apoplastlarından elde edilen proteinlerin SDS-PAGE sonuçlarında standart proteinlerle kıyaslandığında, polipeptidlerin büyüklüklerinin yaklaşık 6 ile 66 kDa arasında olduğu görülmektedir. Ayrıca 14 ile 20 kDa arasındaki, 24, 29 kDa civarındaki, kısmen 45 ile 60 kDa civarındaki polipeptidlerde belirgin bantlar göze çarpmaktadır. 14 ile 20 kDa arasındaki ve 24 ile 29 kDa civarındaki bantların 10^{-6} M Öst uygulamasıyla şiddetinin arttığı, 10^{-8} M Öst uygulamasıyla daha da şiddetlendiği görülmektedir. Yine 45 ile 60 kDa civarındaki bantların kontrole göre 10^{-6} M Öst uygulamasıyla az derecede şiddetinin arttığı, özellikle 60 kDa civarındaki bantta ise 10^{-8} M Öst uygulamasının bant şiddetini artırdığı görülmektedir. 45-55 kDa civarındaki bantların kontrole göre 10^{-8} M Öst uygulamasıyla kaybolduğu görülmektedir.

4.3. Hücresel Enzim Aktivitesi Sonuçları

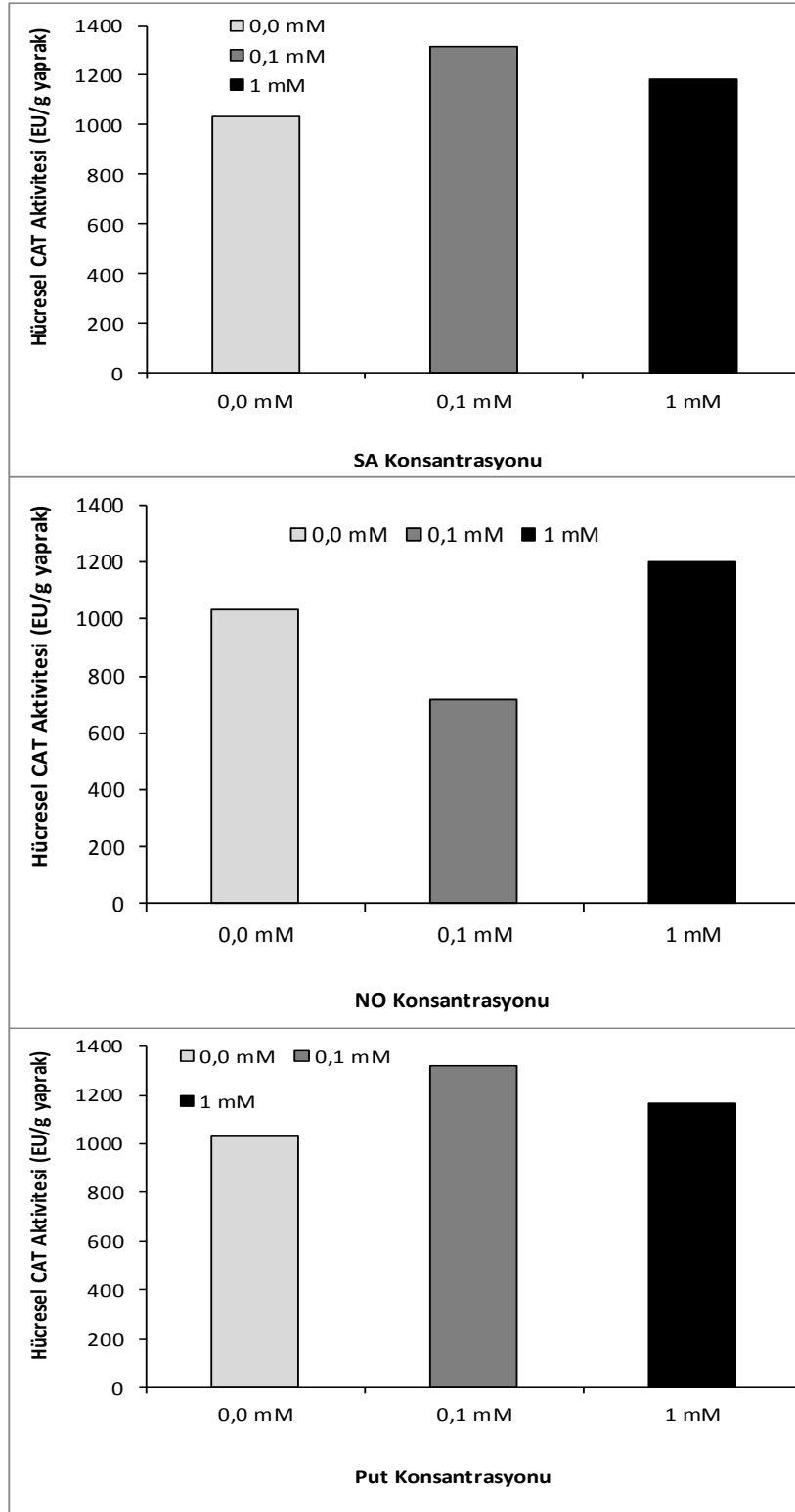
4.3.1 Katalaz Aktivitesi Sonuçları

0.1 ve 1 mM SA, NO ve Put, 50 ve 100 μ M ABA, 50 ve 100 ppm Etp ve 10^{-6} ve 10^{-8} M Öst uygulanmış bitki yapraklarında, hücresel CAT aktivitesinde önemli sonuçlar elde edilmiştir (Çizelge 4.3, Şekil 4.11,12). 0.1 mM SA % 28, 1mM SA % 15, 0.1 mM Put % 28, 1 mM Put % 13, 10^{-6} M Öst % 11, 10^{-8} M Öst % 26 oranlarında hücresel CAT aktivitesini artırırken, 0.1 mM NO % 30, 50 μ M ABA % 7, 100 μ M ABA % 23,50 ppm Etp % 5, 100 ppm Etp % 19 oranlarında hücresel CAT aktivitesini azaltmıştır. Yine 50 ppm Etp, 10^{-6} M Öst ve 10^{-8} M Öst birbirine yakın aktiviteler göstermişlerdir. CAT aktivitesinde en fazla artış birbirine yakın değerlerde olmakla beraber 0.1 mM SA, 0.1 mM Put ve 10^{-8} M Öst' de belirlenmiştir. Yine CAT aktivitesini en fazla azatan uygulama 0.1 mM NO iken, en az azaltan uygulamalar 50 ppm Etp ve 50 μ M ABA olarak belirlenmiştir.

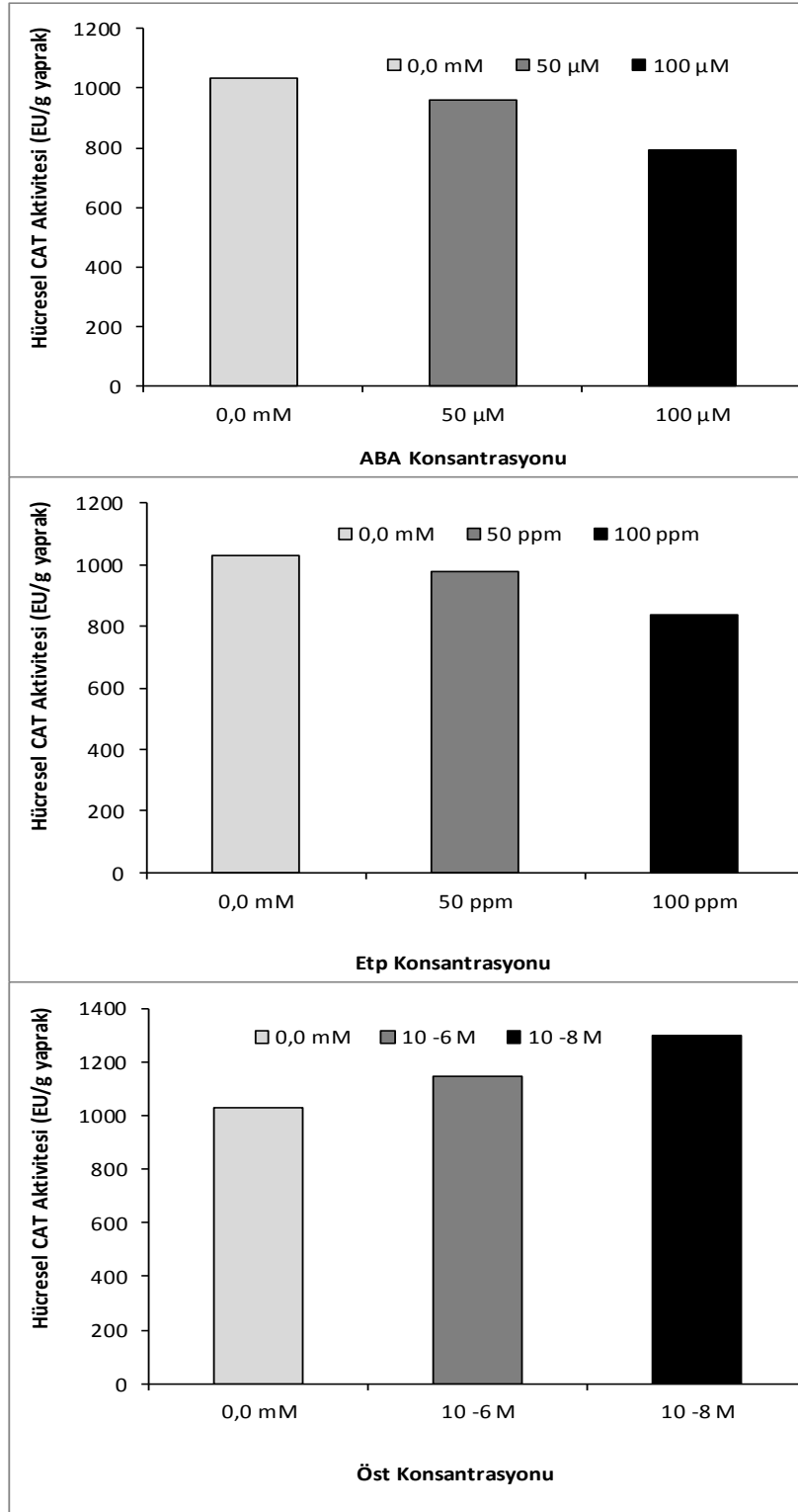
Çizelge 4.3. Normal şartlarda yetiştirilen, kontrol ve kesimden 3 gün önce SA, NO, Put, ABA, Etp ve Öst uygulanmış kışlık buğday yapraklarından elde edilen hücresel CAT aktivitesi değerleri.

		Ortalama Absorbans Azalışı (ΔA_{240}) 25 μ L	Ortalama EU/25 μ L	EU/ g yaprak	% Aktivite
Kontrol		0,043	2,58	1032 ^g	100
SA	0,1 mM	0,055	1,26	1316 ^a	128
	1 mM	0,049	1,74	1182 ^d	115
NO	0,1 mM	0,03	1,8	720 ⁱ	70
	1 mM	0,05	3	1200 ^c	116
Put	0,1 mM	0,055	1,8	1320 ^a	128
	1 mM	0,049	2,1	1168 ^e	113
ABA	50 μ M	0,04	2,4	960 ⁱ	93
	100 μ M	0,033	1,98	792 ^k	77
Etp	50 ppm	0,041	2,45	976,8 ^h	95
	100 ppm	0,035	2,1	840 ^j	81
Öst	10 ⁻⁶ M	0,048	2,34	1150 ^f	111
	10 ⁻⁸ M	0,054	2,46	1300 ^b	126

*Aynı harfi bulunduran gruplar arasındaki fark önemsizdir(P <0.05).



Şekil 4.11. Normal şartlarda yetiştirilen SA, NO ve Put uygulanmış kışlık buğday yapraklarından elde edilen hücresel CAT aktiviteleri



Şekil 4.12. Normal şartlarda yetiştirilen ABA, Etp ve Öst uygulanmış kışlık buğday yapraklarından elde edilen hücresel CAT aktiviteleri

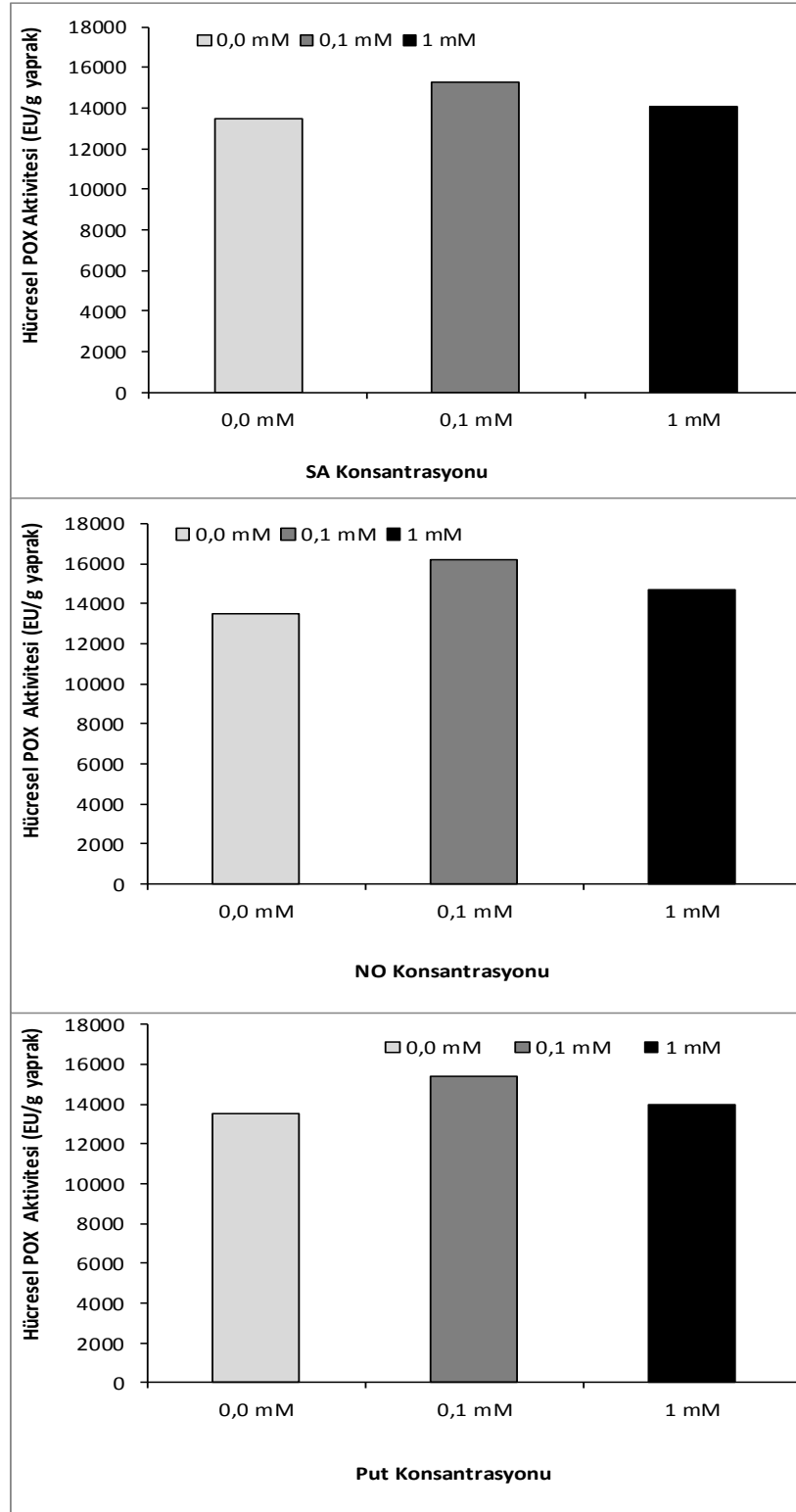
4.3.2 Peroksidaz Aktivitesi Sonuçları

0.1 ve 1 mM SA, NO ve Put, 50 ve 100 μ M ABA, 50 ve 100 ppm Etp ve 10^{-6} ve 10^{-8} M Öst uygulanmış bitki yapraklarında, hücrel POX aktivitesinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli sonuçlar elde edilmiştir(Çizelge 4.4, Şekil 4.13,14). 10^{-6} M Öst hariç diğer tüm uygulamalar hücrel POX aktivitesini artırmıştır. 0.1 mM SA % 13, 1 mM SA % 5, 0.1 mM NO % 20, 1 mM NO % 9, 0.1 mM Put % 14, 1 mM Put % 4, 50 μ M ABA % 24, 100 μ M ABA % 41, 50 ppm Etp % 42, 100 ppm Etp % 38 ve 10^{-8} M Öst % 75 oranlarında hücrel POX aktivitesini artırırken, 10^{-6} M Öst uygulamasının % 15 oranında hücrel POX aktivitesini azalttığı belirlenmiştir. Hücrel POX aktivitesini en fazla 10^{-8} M Öst uygulaması artırmışken, en az 1 mM Put ve 1mM SA uygulamaları artırmıştır. 0.1 mM Put ile 0.1 mM SA ve 100 μ M ABA ile 50 ppm Etp uygulamalarının aktiviteyi birbirine yakın oranlarda etkilediği belirlenmiştir.

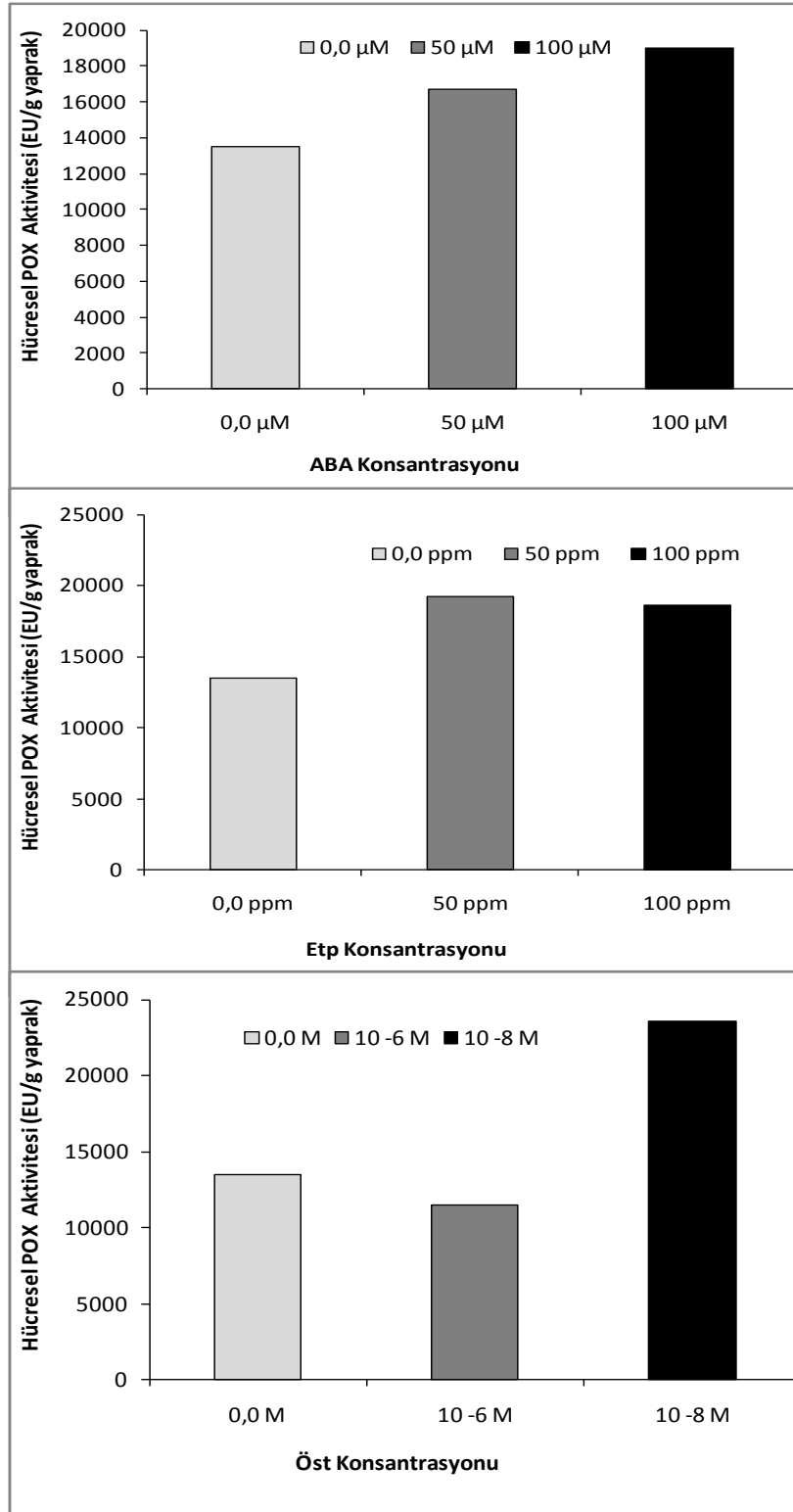
Çizelge 4.4. Normal şartlarda yetiştirilen, kontrol ve kesimden 3 gün önce SA, NO, Put, ABA, Etp ve Öst uygulanmış kışlık buğday yapraklarından elde edilen hücrel POX aktivitesi değerleri.

		$\Delta A/ 25\mu L$	EU/ 25 μL	EU/ g yaprak	% Aktivite
Kontrol		0,135	13,5	13500 ^l	100
SA	0,1 mM	0,153	15,3	15300 ^h	113
	1 mM	0,141	14,1	14100 ^j	105
NO	0,1 mM	0,162	16,2	16200 ^f	120
	1 mM	0,147	14,7	14700 ⁱ	109
Put	0,1 mM	0,154	15,4	15400 ^g	114
	1 mM	0,14	14	14000 ^k	104
ABA	50 μM	0,167	16,7	16700 ^e	124
	100 μM	0,19	19	19000 ^c	141
Etp	50 ppm	0,192	19,2	19200 ^b	142
	100 ppm	0,186	18,6	18600 ^d	138
Öst	10 -6 M	0,115	11,5	11500 ^m	85
	10 -8 M	0,236	23,6	23600 ^a	175

*Aynı harfi bulunduran gruplar arasındaki fark önemsizdir(P<0.05).



Şekil 4.13. Normal şartlarda yetiştirilen SA, NO ve Put uygulanmış kışlık buğday yapraklarından elde edilen hücrel POX aktivitesi



Şekil 4.14. Normal şartlarda yetiştirilen, ABA, Etp ve Öst uygulanmış kışlık buğday yapraklarından elde edilen hücrel POX aktivitesi

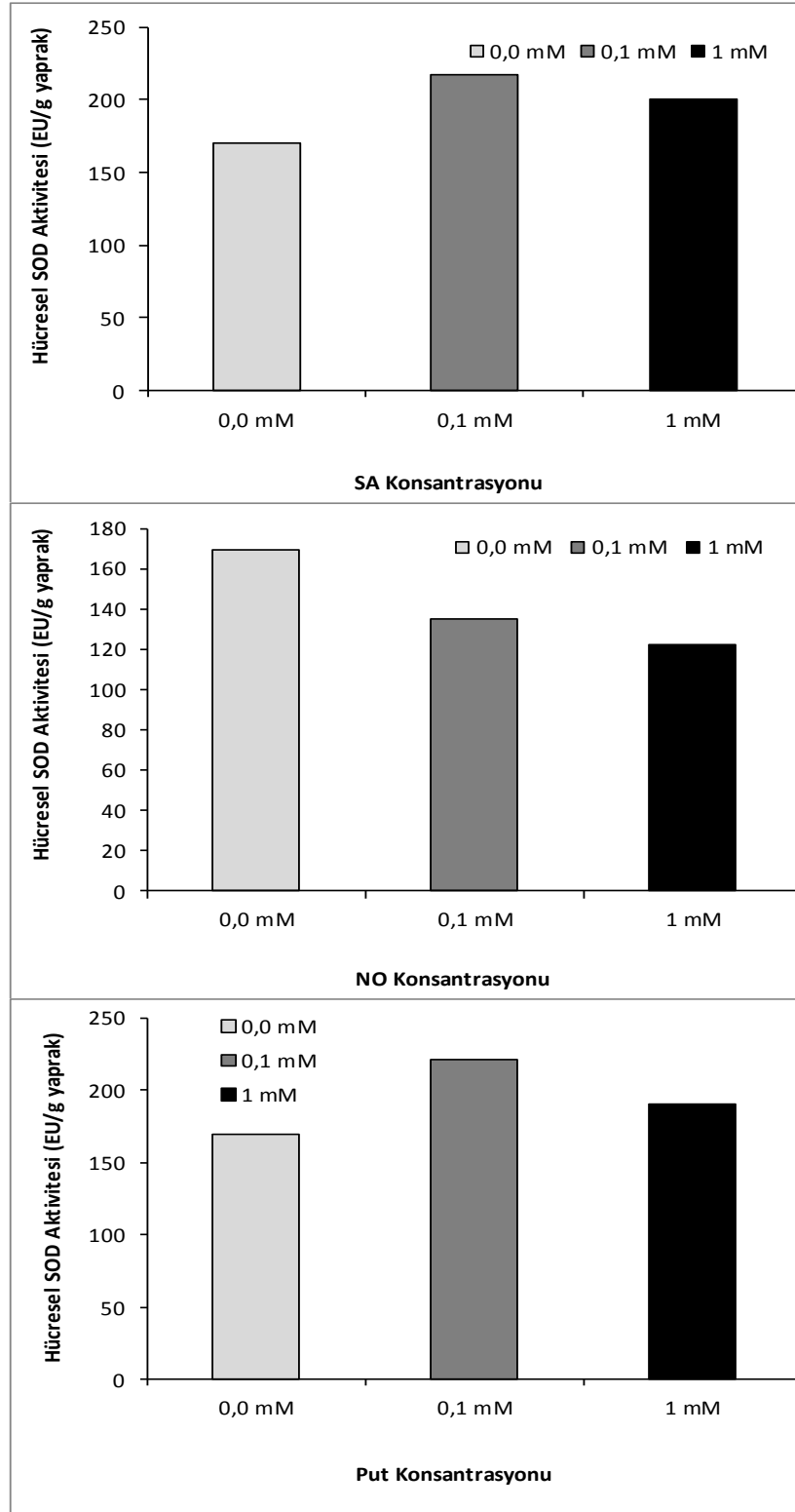
4.3.3 Süperoksit Dismutaz Aktivitesi Sonuçları

0.1 ve 1 mM SA, NO ve Put, 50 ve 100 μ M Absisik asit, 50 ve 100 ppm Etp ve 10^{-6} ve 10^{-8} M Öst uygulanmış bitki yapraklarında, hücrel SOD aktivitesinde önemli sonuçlar elde edilmiştir (Çizelge 4.5, Şekil 4.15,16). 0.1 mM SA % 28, 1 mM SA % 18, 0.1 mM Put % 30, 1 mM Put % 13, 50 μ M ABA % 16, 100 μ M ABA % 5, 10^{-6} M Öst % 12, 10^{-8} M Öst % 26 oranlarında hücrel SOD aktivitesini artırırken, 50 ppm Etp % 64, 100 ppm Etp % 78, 0.1 mM NO % 20, 1mM NO % 28 oranlarında hücrel SOD aktivitesini azalttığı belirlenmiştir. Hücrel SOD aktivitesini en fazla 0.1 mM Put, 0.1 SA ve 10^{-8} M Öst artırmışken, en az 100 μ M ABA artırmıştır. 10^{-6} M Öst ve 1 mM Put hücrel SOD aktivitesini aynı oranda artırmışlardır. Yine hücrel SOD aktivitesini en fazla 100 ppm Etp azaltmıştır.

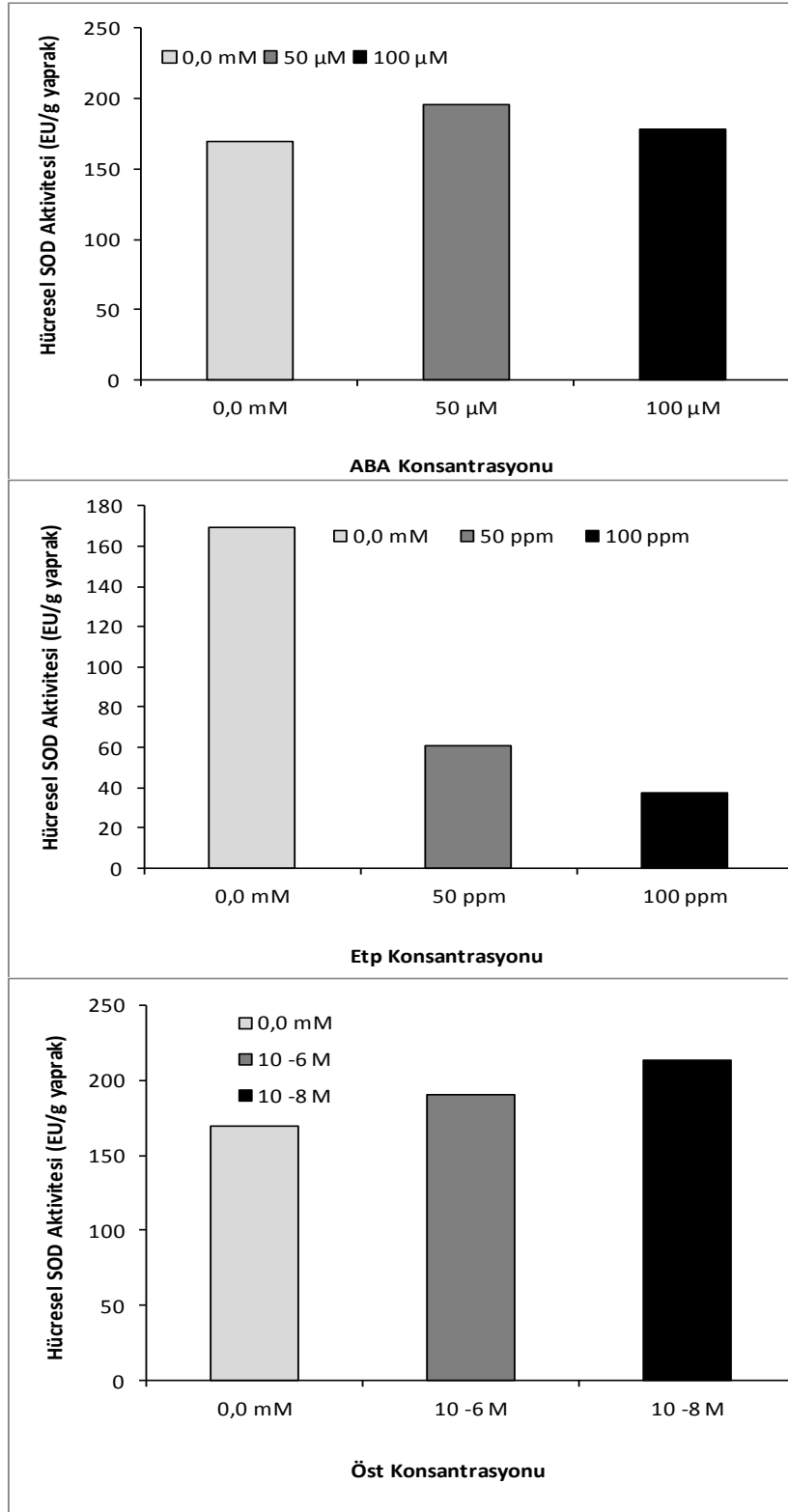
Çizelge 4.5. Normal şartlarda yetiştirilen, kontrol ve kesimden 3 gün önce SA, NO, Put, ABA, Etp ve Öst uygulanmış kışlık buğday yapraklarından elde edilen hücrel SOD aktivitesi değerleri.

		Ortalama Absorbans Artışı $\Delta A/100\mu L$	EU/ 100 μ L	EU/ g yaprak	% Aktivite
Kontrol		0,314	1,697	169,7 ^h	100
SA	0,1 mM	0,403	2,176	217,6 ^b	128
	1 mM	0,371	2,004	200,4 ^d	118
NO	0,1 mM	0,251	1,357	135,7 ⁱ	80
	1 mM	0,226	1,222	122,2 ^j	72
Put	0,1 mM	0,409	2,209	220,9 ^a	130
	1 mM	0,353	1,908	190,8 ^f	113
ABA	50 μ M	0,363	1,962	196,2 ^e	116
	100 μ M	0,330	1,786	178,6 ^g	105
Etp	50 ppm	0,112	0,605	60,5 ^k	36
	100 ppm	0,069	0,373	37,3 ^l	22
Öst	10^{-6} M	0,352	1,9	190 ^f	112
	10^{-8} M	0,394	2,13	213 ^c	126

Aynı harfi bulunduran gruplar arasındaki fark önemsizdir ($P < 0.05$).

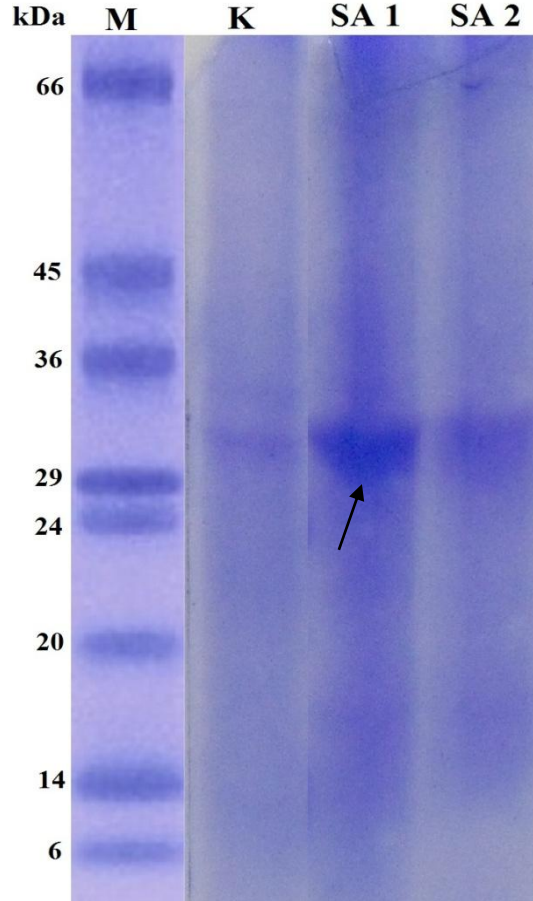


Şekil 4.15. Normal şartlarda yetiştirilen SA, NO ve Put uygulanmış kışlık buğday yapraklarından elde edilen hücrel SOD aktivitesi



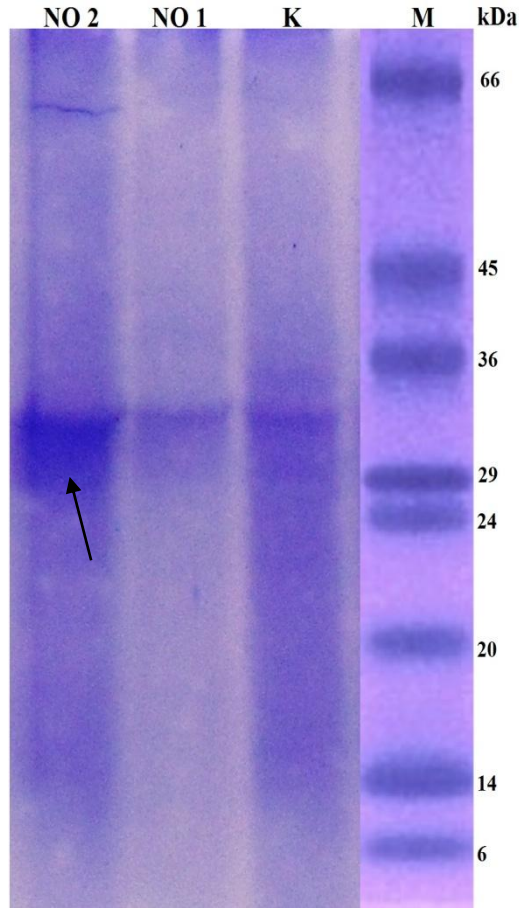
Şekil 4.16. Normal şartlarda yetiştirilen ABA, Etp ve Öst uygulanmış kışlık buğday yapraklarından elde edilen hücresel SOD aktivitesi

4.4.Hücresel Proteinlerin SDS–Poliakrilamid Jel Elektrofözezi Sonuçları



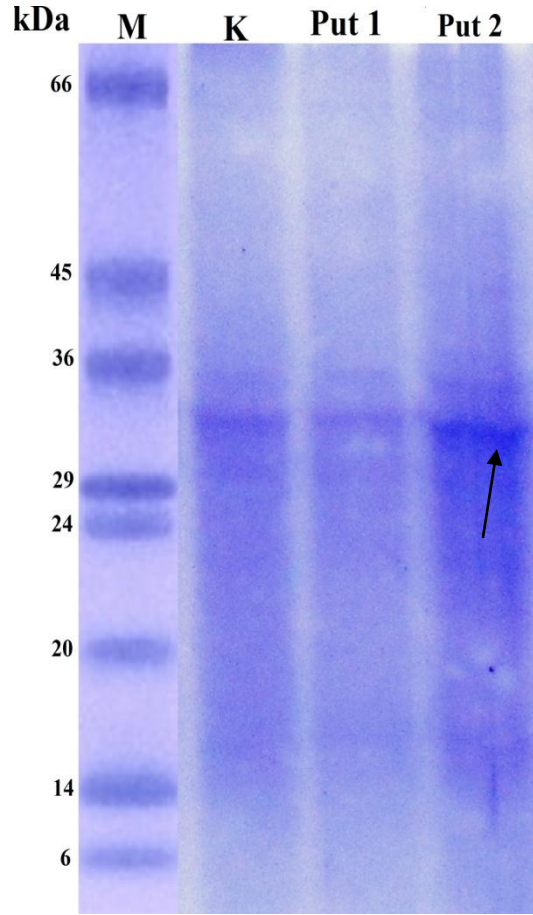
Şekil 4.17. Normal şartlarda yetiştirilen, SA uygulanmış kışlık buğday yapraklarından elde edilen hücresel proteinlerin SDS - PAGE fotoğrafı (**kDa**:Kilodalton, **M**:Standart proteinler, **K**:Kontrol, **SA1**: 0,1mM SA, **SA2**: 1mM SA).

Sekil 4.17’de kışlık buğday yapraklardan elde edilen hücresel proteinlerin SDS-PAGE sonuçlarında standart proteinlerle kıyaslandığında, polipeptidlerin büyüklüklerinin yaklaşık 6 ile 66 kDa arasında olduğu görölmektedir. Ayrıca 29 ile 36 kDa arasındaki polipeptidlerde belirgin bantlar göze çarpmaktadır. 0.1 mM SA’nın 29 ile 36 kDa arasındaki bantlarda şiddeti oldukça artırdığı, yine 29 ile 36 kDa arasındaki bantlarda 1 mM SA’nın kontrole göre fazla diğer uygulamaya göre az şiddetle bant verdiği görölmektedir.



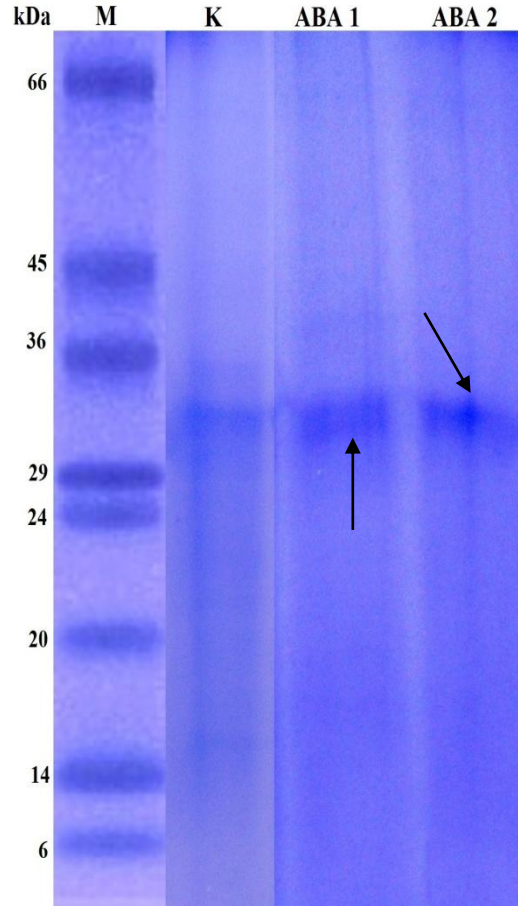
Şekil 4.18. Normal şartlarda yetiştirilen, NO uygulanmış kışlık buğday yapraklarından elde edilen hücresel proteinlerin SDS - PAGE fotoğrafı (**kDa**:Kilodalton, **M**:Standart proteinler, **K**:Kontrol, **NO1**:0.1 mM NO, **NO2**:1 mM NO).

Sekil 4.18’de kışlık buğday yapraklardan elde edilen hücresel proteinlerin SDS-PAGE sonuçlarında standart proteinlerle kıyaslandığında, polipeptidlerin büyüklüklerinin yaklaşık 6 ile 66 kDa arasında olduğu görülmektedir. Ayrıca 29 ile 36 kDa arasındaki polipeptidlerde belirgin bantlar göze çarpmaktadır. 1 mM NO’nun 29 ile 36 kDa arasındaki bantlarda şiddeti oldukça artırdığı, yine 29 ile 36 kDa arasındaki bantlarda 0.1 mM NO’nun kontrole göre bantların şiddetini azalttığı görülmektedir.



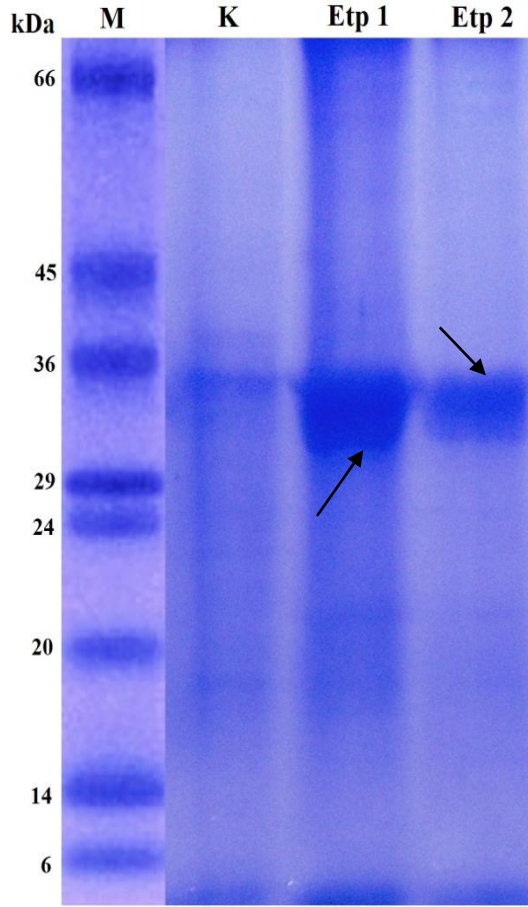
Şekil 4.19. Normal şartlarda yetiştirilen, Put uygulanmış kışlık buğday yapraklarından elde edilen hücresel proteinlerin SDS - PAGE fotoğrafı (**kDa**:Kilodalton, **M**:Standart proteinler, **K**:Kontrol, **Put1**:0.1 mM Put, **Put2**:1 mM Put).

Sekil 4.19’da kışlık buğday yapraklardan elde edilen hücresel proteinlerin SDS-PAGE sonuçlarında standart proteinlerle kıyaslandığında, polipeptidlerin büyüklüklerinin yaklaşık 6 ile 66 kDa arasında olduğu görülmektedir. Ayrıca 29 ile 36 kDa arasındaki polipeptidlerde belirgin bantlar göze çarpmaktadır. 1mM Put’un 29 ile 36 kDa arasındaki bantlarda şiddeti artırdığı, yine 29 ile 36 kDa arasındaki bantlarda 0.1 mM Put’un kontrole göre bant şiddetini azalttığı görülmektedir.



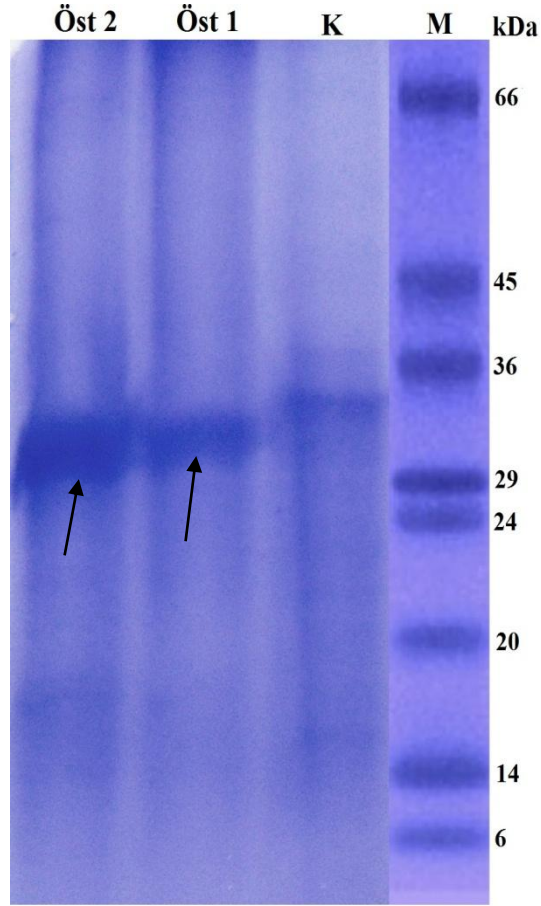
Şekil 4.20. Normal şartlarda yetiştirilen, ABA uygulanmış kışlık buğday yapraklarından elde edilen hücresel proteinlerin SDS - PAGE fotoğrafı (**kDa**:Kilodalton, **M**:Standart proteinler, **K**:Kontrol, **ABA1**:50 µM ABA, **ABA2**:100 µM ABA).

Sekil 4.20' de kışlık buğday yapraklardan elde edilen hücresel proteinlerin SDS-PAGE sonuçlarında standart proteinlerle kıyaslandığında, polipeptidlerin büyüklüklerinin yaklaşık 6 ile 66 kDa arasında olduğu görülmektedir. Ayrıca 29 ile 36 kDa arasındaki polipeptidlerde belirgin bantlar göze çarpmaktadır. 50 µM ve 100 µM ABA'nın 29 ile 36 kDa arasındaki bantlarda şiddeti artırdığı görülmektedir.



Şekil 4.21. Normal şartlarda yetiştirilen, Etp uygulanmış kışlık buğday yapraklarından elde edilen hücresel proteinlerin SDS - PAGE fotoğrafı (**kDa**:Kilodalton, **M**:Standart proteinler, **K**:Kontrol, **Etp1**:50 ppm Etp, **Etp2**:100 ppm Etp).

Sekil 4.21' de kışlık buğday yapraklardan elde edilen hücresel proteinlerin SDS-PAGE sonuçlarında standart proteinlerle kıyaslandığında, polipeptidlerin büyüklüklerinin yaklaşık 6 ile 66 kDa arasında olduğu görülmektedir. Ayrıca 29 ile 36 kDa arasındaki polipeptidlerde belirgin bantlar göze çarpmaktadır. 50 ppm Etp'un 29 ile 36 kDa arasındaki bantlarda şiddetinin oldukça artırdığı, yine 29 ile 36 kDa arasındaki bantlarda 100 ppm Etp'un kontrole göre fazla diğer uygulamaya göre az şiddetle bant verdiği görülmektedir.



Şekil 4.22. Normal şartlarda yetiştirilen, Öst uygulanmış kışlık buğdayyapraklarından elde edilen hücresel proteinlerin SDS - PAGE fotoğrafı (**kDa**:Kilodalton, **M**:Standart proteinler, **K**:Kontrol, **Öst1**: 10^{-6} M Öst, **Öst2**: 10^{-8} M Öst).

Sekil 4.22' de kışlık buğday yapraklardan elde edilen hücresel proteinlerin SDS-PAGE sonuçlarında standart proteinlerle kıyaslandığında, polipeptidlerin büyüklüklerinin yaklaşık 6 ile 66 kDa arasında olduğu görülmektedir. Ayrıca 29 ile 36 kDa arasındaki polipeptidlerde belirgin bantlar göze çarpmaktadır. 10^{-8} M Öst'ün 29 ile 36 kDa arasındaki bantlarda şiddeti oldukça artırdığı, yine 29 ile 36 kDa arasındaki bantlarda 10^{-8} M Öst'ün kontrole göre fazla diğer uygulamaya göre az şiddetle bant verdiği görülmektedir.

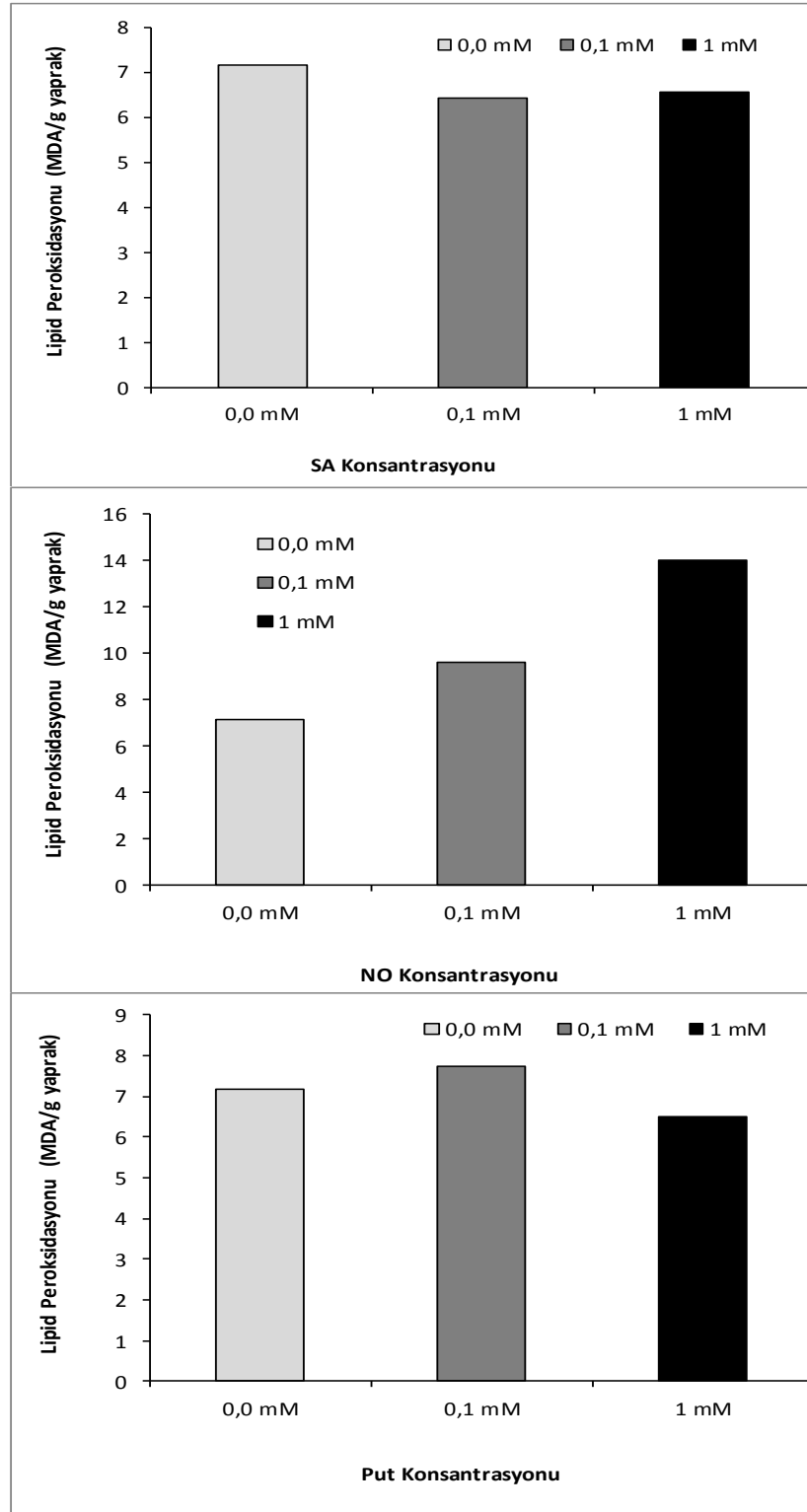
4.5. Lipid Peroksidasyonu (LPO) Seviyesi Sonuçları

0.1 ve 1 mM SA, NO ve Put, 50 ve 100 μ M ABA, 50 ve 100 ppm Etp ve 10^{-6} ve 10^{-8} M Öst uygulanmış bitki yapraklarında, Lipid peroksidasyonu (LPO) seviyesinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli sonuçlar elde edilmiştir (Çizelge 4.6, Şekil 4.23,24). 0.1 mM SA % 10, 1mM SA % 8, 1mM Put % 9 ve 10^{-8} M Öst % 22 oranlarında LPO seviyesini azalttığı, 0.1 mM NO % 34, 1mMNO % 96, 0.1 mM Put % 8, 50 μ M ABA % 48, 100 μ M ABA % 50, 50 ppm Etp % 0.2, 100 ppm Etp % 0.3, 10^{-6} M Öst % 32 oranlarında LPO seviyesini artırdığı belirlenmiştir. Etp uygulamasının LPO seviyesini istatistiksel açıdan önemli derecede etkilemediği belirlenmiştir. LPO seviyesini en fazla 10^{-8} M Öst uygulaması azaltmıştır. Yine LPO seviyesini en fazla 1 mM NO uygulaması artırmıştır.

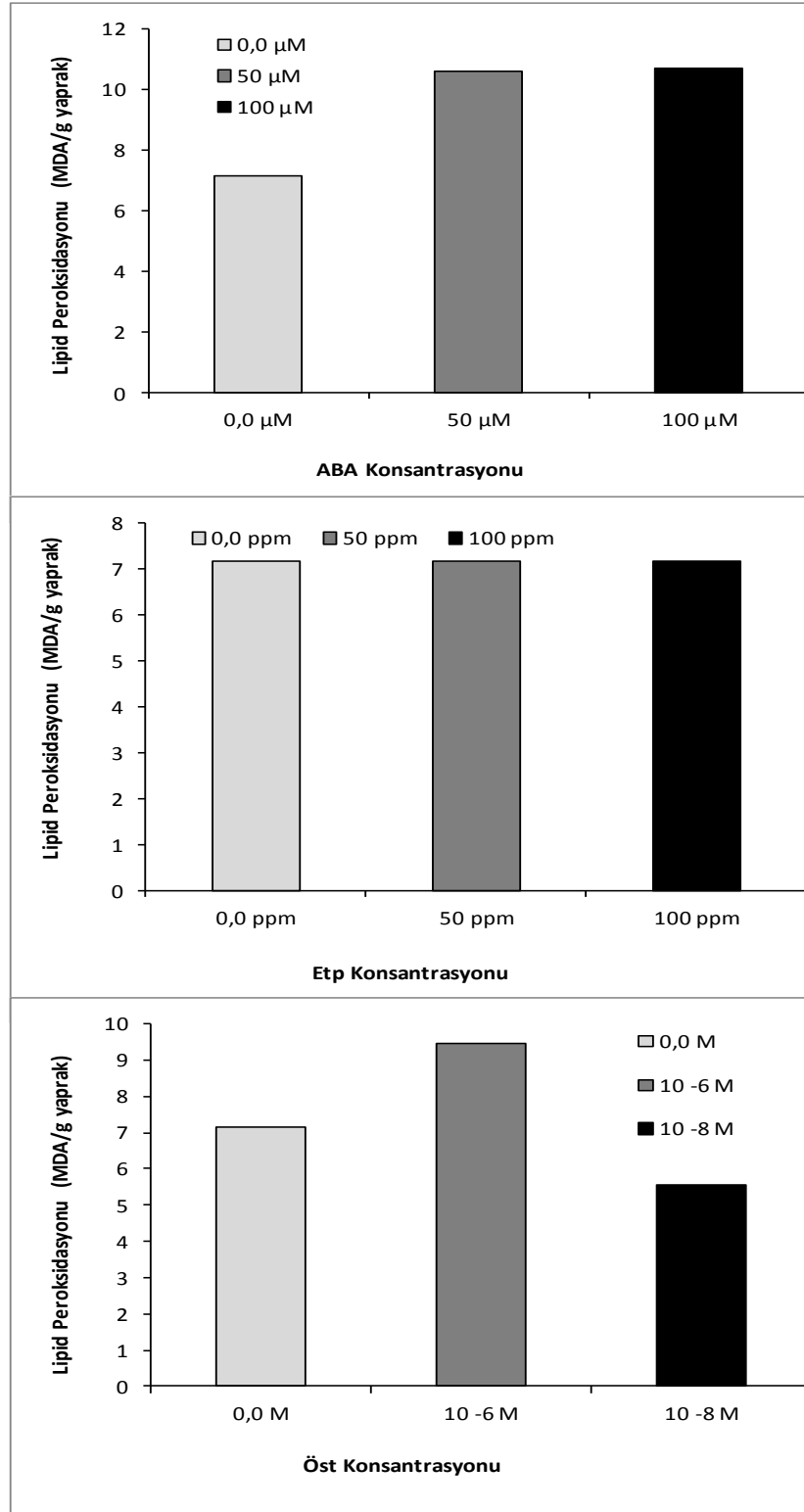
Çizelge 4.6. Normal şartlarda yetiştirilen, kontrol ve kesimden 3 gün önce, SA, NO, Put, ABA, Etp ve Öst uygulanmış kışlık buğday yapraklarından elde edilen hücrel lipid peroksidasyonu değerleri.

		A (532 - 600)	A (532 - 600)/155000 X 10^6 (1ml'deki)	MDA/gram yaprak	% Değişim
Kontrol		0,222	1,432	7,16 ^e	100
SA	0,1 mM	0,199	1,284	6,42 ^f	90
	1 mM	0,203	1,31	6,55 ^f	92
NO	0,1 mM	0,297	1,916	9,58 ^c	134
	1 mM	0,434	2,8	14 ^a	196
Put	0,1 mM	0,24	1,548	7,74 ^d	108
	1 mM	0,202	1,303	6,515 ^f	91
ABA	50 μ M	0,329	2,123	10,615 ^b	148
	100 μ M	0,332	2,142	10,71 ^b	150
Etp	50 ppm	0,222	1,435	7,175 ^e	100,2
	100 ppm	0,223	1,436	7,18 ^e	100,3
Öst	10 -6 M	0,293	1,89	9,45 ^c	132
	10 -8 M	0,172	1,112	5,56 ^g	78

*Aynı harfi bulunduran gruplar arasındaki fark önemsizdir (P<0.05).



Şekil 4.23. Normal şartlarda yetiştirilen SA, NO ve Put uygulanmış kışlık buğday yapraklarından elde edilen lipid peroksidasyonu seviyesi



Şekil 4.24. Normal şartlarda yetiştirilen ABA, Etp ve Öst uygulanmış kışlık buğday yapraklarından elde edilen lipid peroksidasyonu seviyesi

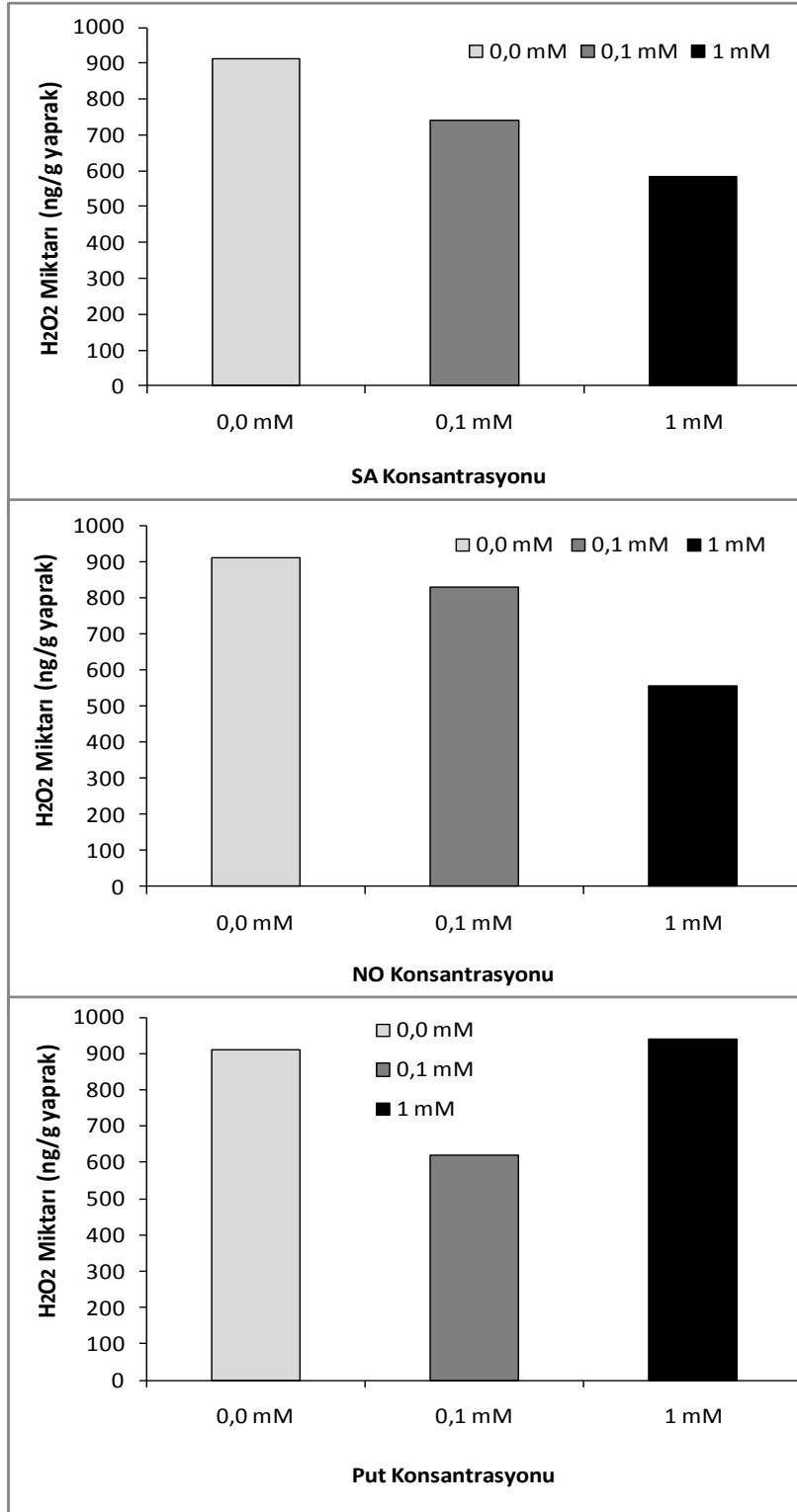
4.6. Hidrojen peroksit (H₂O₂) Miktarı Sonuçları

0.1 ve 1 mM SA, NO ve Put, 50 ve 100 µM ABA, 50 ve 100 ppm Etp ve 10⁻⁶ ve 10⁻⁸ M Öst uygulanmış bitki yapraklarında, H₂O₂ miktarı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli sonuçlar elde edilmiştir (Çizelge 4.7, Şekil 4.25,26). H₂O₂ miktarınının, 0.1 mM SA % 19, 1 mM SA % 36, 0.1 mM NO % 9, 1 mM NO % 39 0.1mM Put %32, 50 µM ABA % 6, 100 µM ABA % 29, 50 ppm Etp % 37, 100 ppm Etp % 45 ve 10⁻⁸M Öst % 3 oranlarında azalttığı, 1mM Put % 3 ve 10⁻⁶M Öst % 1 oranlarındaarttığı belirlenmiştir.H₂O₂ miktarını en fazla 100 ppm Etp uygulaması azaltmıştır.H₂O₂ miktarını en fazla azaltan 100 ppm Etp iken, en az azaltan 10⁻⁸M Öst olmuştur. 1mM Put ve 10⁻⁶ M Öst uygulamaları H₂O₂ miktarını istatistiksel açıdan önemsiz derecede artırmışlardır.

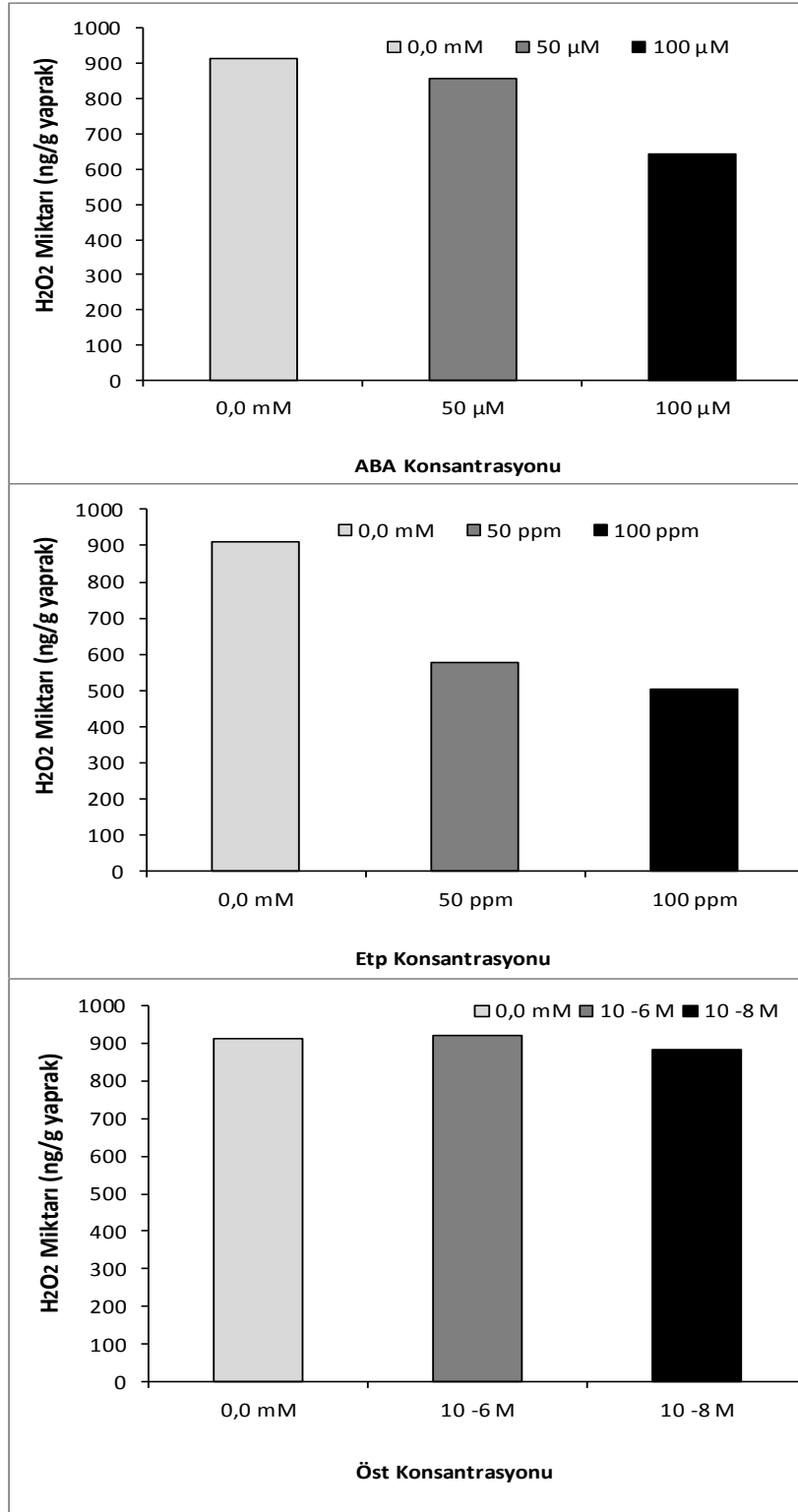
Çizelge 4.7. Normal şartlarda yetiştirilen, kontrol ve kesimden 3 gün önce, SA, NO, Put, ABA, Etp ve Öst uygulanmış kışlık buğday yapraklarından elde edilen hücresel H₂O₂ miktarı değerleri.

		ABS (415 nm)	H ₂ O ₂ miktarı (ng) 1,5 ml deki (ABS x 200)	H ₂ O ₂ miktarı (ng/g yaprak)	% Değişim
Kontrol		0,684	136,8	912 ^c	100
SA	0,1 mM	0,556	111,2	741 ^g	81
	1 mM	0,437	87,4	583 ^j	64
NO	0,1 mM	0,624	124,8	832 ^f	91
	1 mM	0,417	83,4	556 ^l	61
Put	0,1 mM	0,464	92,8	619 ⁱ	68
	1 mM	0,705	141	940 ^a	103
ABA	50 µM	0,643	128,6	857 ^e	94
	100 µM	0,483	96,6	644 ^h	71
Etp	50 ppm	0,432	86,4	576 ^k	63
	100 ppm	0,378	75,6	504 ^m	55
Öst	10 ⁻⁶ M	0,691	138,2	921 ^b	101
	10 ⁻⁸ M	0,664	132,8	885 ^d	97

*Aynı harfi bulunduran gruplar arasındaki fark önemsizdir(P<0.05).



Şekil 4.25. Normal şartlarda yetiştirilen SA, NO ve Put uygulanmış kışlık buğday yapraklarından elde edilen H_2O_2 miktarı



Şekil 4.26. Normal şartlarda yetiştirilen ABA, Etp ve Öst uygulanmış kışlık buğday yapraklarından elde edilen H_2O_2 miktarı

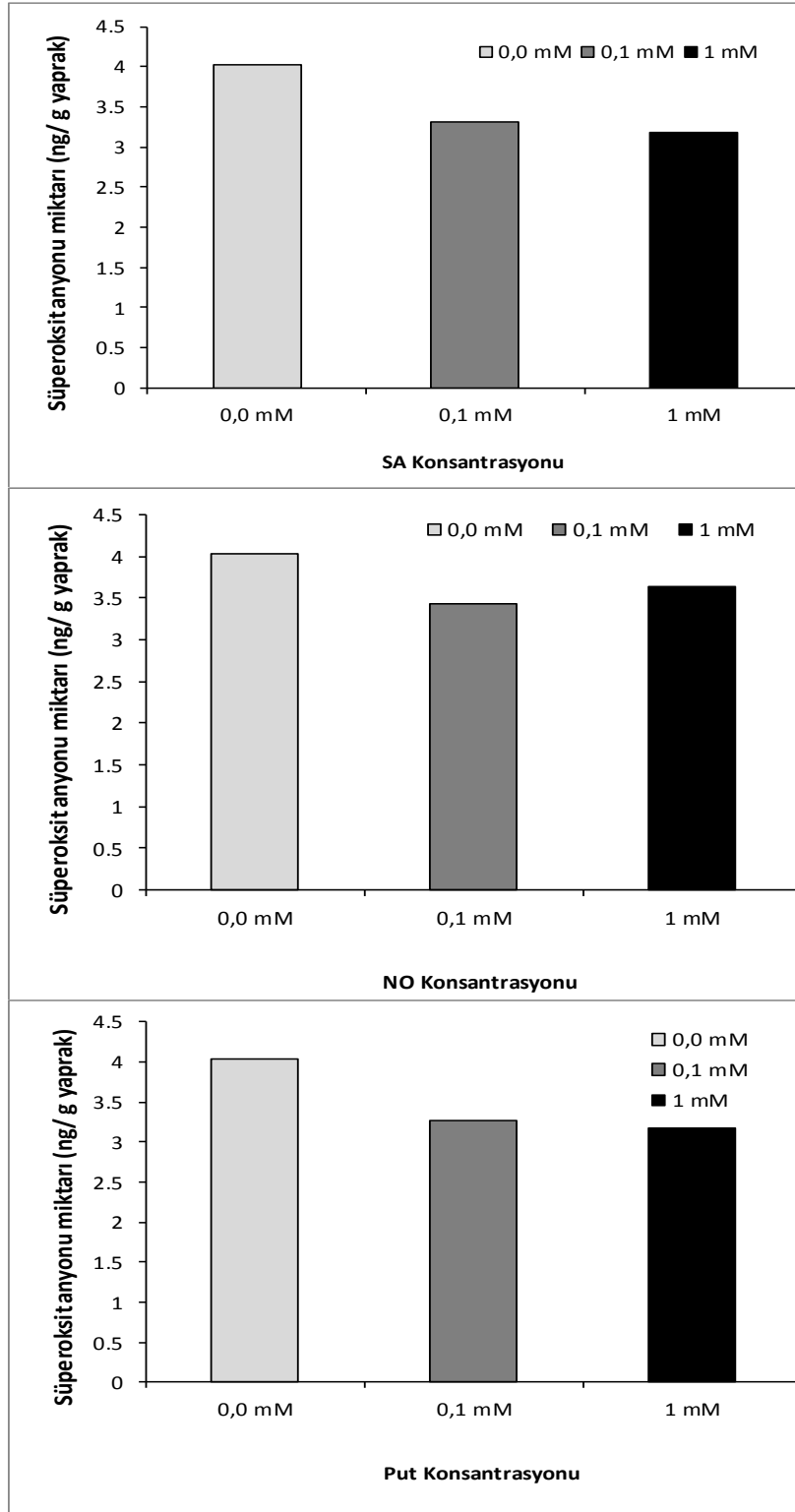
4.7. Süperoksit Anyonu (O_2^-) Miktarı Sonuçları

0.1 ve 1 mM SA, NO ve Put, 50 ve 100 μ M ABA, 50 ve 100 ppm Etp ve 10^{-6} ve 10^{-8} M Öst uygulanmış bitki yapraklarında, süperoksit anyonu (O_2^-) miktarı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli sonuçlar elde edilmiştir (Çizelge 4.8, Şekil 4.27,28).Tüm uygulamalar düşük oranlarda O_2^- miktarını azaltmıştır. 0.1 mM SA % 18, 1 mM SA % 21, 0.1 mM NO % 15, 1mMNO % 10, 0.1mM Put % 19, 1mM Put. % 21, 50 μ M ABA % 1, 100 μ M ABA % 21, 50 ppm Etp % 10, 100 ppm Etp % 15 ve 10^{-6} M Öst % 8, 10^{-8} M Öst % 10 oranında birbirlerine yakın değerlerde O_2^- miktarını azaltmıştır. O^- Miktarını en fazla azaltan 1mM SA, 1 mM Putve 100 μ M ABA iken en az azaltan 50 μ M ABA olmuştur.

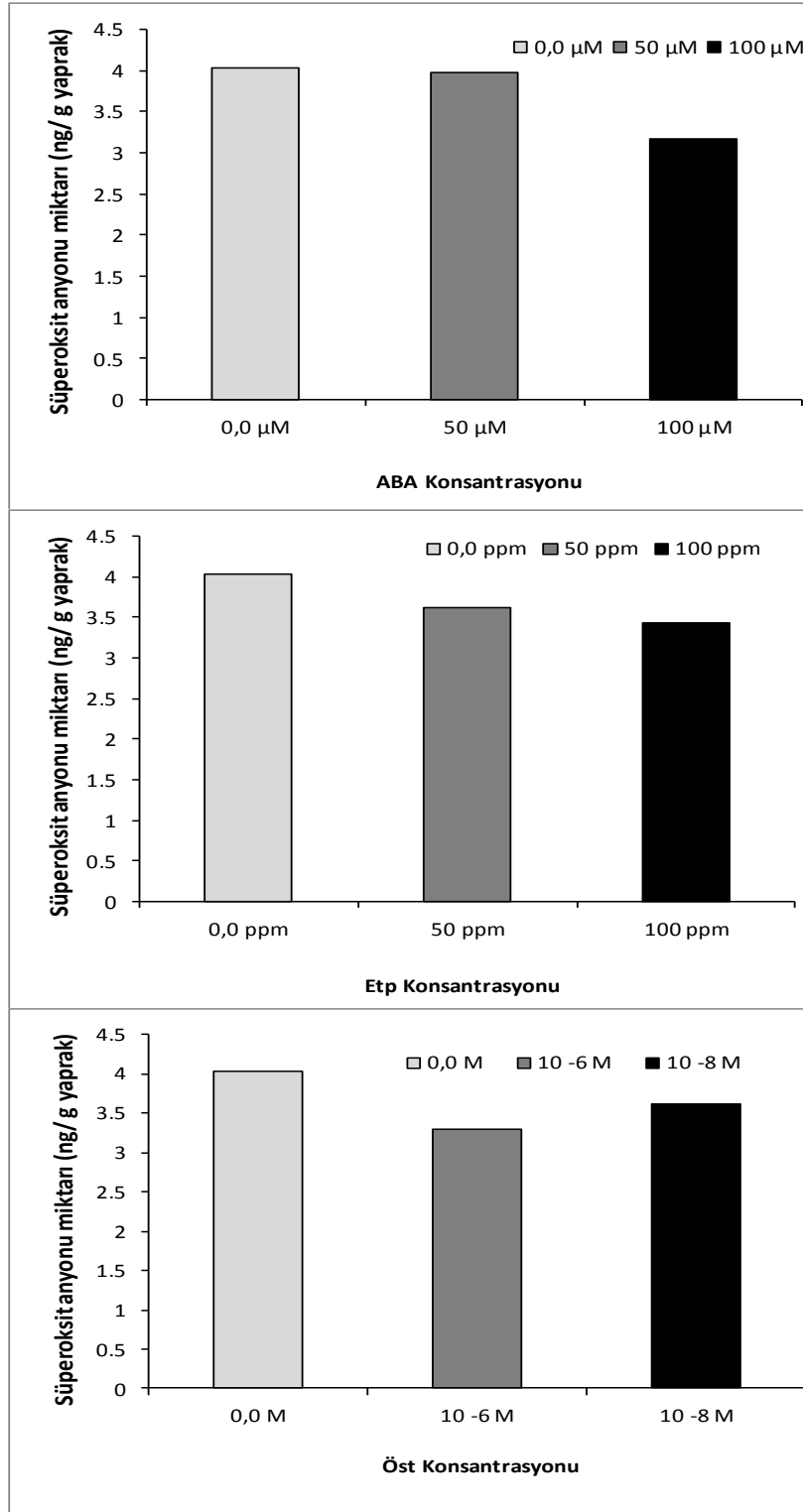
Çizelge 4.8. Normal şartlarda yetiştirilen, kontrol ve kesimden 3 gün önce, SA, NO, Put, ABA, Etp ve Öst uygulanmış kışlık buğday yapraklarından elde edilen Süperoksit anyonu miktarı değerleri.

		A(530)	EU (X 8,13)	EU/gr yaprak	% Değişim
Kontrol		0,248	2,016	4,032 ^a	100
SA	0,1 mM	0,204	1,658	3,316 ^e	82
	1 mM	0,196	1,594	3,188 ^g	79
NO	0,1 mM	0,211	1,715	3,430 ^d	85
	1 mM	0,224	1,821	3,642 ^c	90
Put	0,1 mM	0,201	1,634	3,268 ^f	81
	1 mM	0,195	1,585	3,170 ^g	79
ABA	50 μ M	0,245	1,991	3,982 ^b	99
	100 μ M	0,195	1,585	3,170 ^g	79
Etp	50 ppm	0,223	1,813	3,626 ^c	90
	100 ppm	0,211	1,715	3,430 ^d	85
Öst	10 -6 M	0,202	1,642	3,284 ^{ef}	82
	10 -8 M	0,222	1,805	3,610 ^c	90

*Aynı harfi bulunduran gruplar arasındaki fark önemsizdir (P<0.05)



Şekil 4.27. Normal şartlarda yetiştirilen, SA, NO ve Put uygulanmış kışlık buğday yapraklarından elde edilen süperoksit anyonu miktarı



Şekil 4.28. Normal şartlarda yetiştirilen, ABA, Etp ve Öst uygulanmış kışlık buğday yapraklarından elde edilen süperoksit anyonu miktarı

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Literatürde bitkilerdeki stres toleransını düzenleyen ve bu araştırmada kullanılan sinyal bileşiklerle yapılan birçok çalışmada, bu bileşiklerinin hücrede etkili oldukları sinyal iletim yolları hakkında net bir bilgi alınamamaktadır. Kısacası bu bileşikler, benzer veya aynı sinyal iletim yollarını mı? Yoksa farklı biyokimyasal prosesleri etkileyerek farklı sinyal yollarını mı? Kullandıkları tam olarak bilinmemektedir. Birçok çalışmada aynı sinyal bileşiğin aynı biyokimyasal süreçler üzerinde zıt etkilerine ulaşılabilmektedir. Örneğin nitrik oksit ile ilgili çalışmalara baktığımızda, pirinçle yapılan bir çalışmada nitrik oksit, CAT, POX ve SOD enzimlerinin aktivitelerinde düşmeye sebep olurken (Hsu *et al.* 2004), aynı bileşik ayçiçeğinde ise üç enzimin aktivitesini artırmıştır (Laspina *et al.* 2005). Buna benzer sonuçların ortaya çıkmasında en önemli sebeplerinden birisinin her bir sinyal bileşiğinin farklı şartlarda, farklı konsantrasyonlarda ve farklı bitkiler üzerinde çalışılmasından kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür (Gratao *et al.* 2005). Çünkü farklı bitkilerin sinyal bileşiklerine verdikleri tepkiler farklı farklı olabilmektedir. Bu problemin çözümüne yapılacak en önemli katkılardan birisinin, tek bir bitkide bu sinyal bileşiklerinin çalışılması ve belirlenen biyokimyasal etki mekanizmalarını karşılatılarak, sinyal bileşiklerinin sinyal iletim yolları hakkında daha detaylı bilgi elde edilebileceğidir. Bu sebeplerden çalışmamızda, bitkilerde stres toleransını düzenleyen bileşiklerden absisik asit (ABA), etafon olarak uygulanmış etilen (Eth), sodyum nitroprusid (SNP) olarak uygulanmış nitrik oksit (NO), putresin (Put), salisilik asit (SA) ve östradiol (Öst), buğday yapraklarına uygulanarak, bu bileşiklerin apoplastik ve simplastik olmak üzere antioksidan sistem elamanlarının değişimi ve proteinlerin profilleri üzerindeki düzenleyici rolleri araştırılmıştır. Bu amaçla kontrollü şartlarda yetiştirilmiş buğday (*Triticum aestivum* cv. Doğu-88) fidelerine her seferinde farklı bir sinyal bileşik uygulandıktan sonra, bitki yapraklarında apoplastik ve hücresel antioksidan enzimlerin aktiviteleri, lipid peroksidasyonu, içsel süperoksid anyonunu ve hidrojen peroksit içeriği ile apoplastik ve simplastik proteinlerin elektroforezi (SDS-PAGE) çalışılmış ve elde edilen bulgular kontrolleri ile karşılaştırılmıştır. Böylece çalışmada kullanılan sinyal bileşiklerin sinyal iletim yolları hakkında edinilen bulgulara göre, ortak sinyal iletim yolu kullananlar ve

farklı sinyal iletim yolu kullananlar belirlenmeye çalışılmıştır. Çalışmadan elde edilen bulguların büyük bir çoğunluğu literatür için yeni olduğundan çalışma özgün ve literatürde önemli bir boşluğu dolduracağı düşünülmektedir.

5.1. SA uygulamalarından elde edilen sonuçların değerlendirilmesi

Çalışmalarımızda buğday yapraklarına uygulanan SA, her iki konsantrasyonda da (0.1 ve 1 mM) apoplastik POX aktivitesini artırırken, SOD aktivitesini ise azaltmıştır (Şekil 4.1,3). Apoplastik CAT enzimi ise yapraklarda çalışılmasına rağmen, aktivitenin belirlenebilecek ve değerlendirilebilecek seviyelerden çok düşük olmasından dolayı bütün uygulamalarda değerlendirilmeye alınmamıştır. Bazı araştırmacılar da apoplastik CAT aktivitesini belirleyemediklerini rapor etmişlerdir (Frugoli *et al.* 1996; Garc-a-Limones *et al.* 2009). Aynı enzimlerin hücrel aktivitelere bakıldığında, SA uygulamaları üç enzimin aktivitesini de artırmıştır (Şekil 4.11,13,15). Görüldüğü gibi, SA özellikle POX aktivitesini hem apoplast hem de hücrelde artırırken, SOD enziminde ise farklı olarak apoplastik POX'u düşürmüş, hücrel POX'u artırmıştır. Buğdayla yapılan bir çalışmada SA uygulaması yapılmış iki buğday varyetesi (tuz stresine tolerant ve hassas) arasında apoplastik enzimlerin aktivitesinde farklılıklar belirlenmiştir (Mutlu *et al.* 2009). Çalışmada, tuza tolerant varyetede SA, POX ve SOD enzimlerin aktivitelere düşüşlere neden olabilirken, aksine tolerant varyetede her iki enzim aktivitesi de artmıştır. Bu sonuçlar gösteriyor ki farklı tür bitki değil, aynı türün varyeteleri arasında bile sinyal bileşikleri farklı etkilere sebep olabilmektedirler. Arpayla yapılan bir çalışmada ise bitkiye uygulanan SA'nın hücrel SOD, POX ve CAT aktivitelerini artırdığı ve bu artışa bağlı olarak bitkinin antioksidan sistemini yükselttiği ileri sürülmüştür (Janda *et al.* 1999; Shim *et al.* 2003; Ananieva *et al.* 2004). Bu sonucun çalışmamızla uyumlu olduğu görülmektedir. SA uygulamasıyla bu antioksidan enzimlerin aktivitelerinin arttığı ile ilgili başka kaynaklar da bulmak mümkündür (Singh and Usha 2003; Sairam *et al.* 2004; Imran *et al.* 2007). Bu sonuçlara göre SA'nın buğdayda özellikle hücrel antioksidan enzimlerin aktivitelerini artırdığı ileri sürülebilir. Diğer taraftan SA uygulamalarının hücrelerde oksidatif hasara yol açan reaktif oksijen bileşikleri (ROT) üzerindeki etkileri incelendiğinde, SA, H₂O₂ ve O₂⁻

anyonu içsel seviyelerini düşürmüştür (Şekil 4.25,27), buna paralel olarak da hücrelerde lipid peroksidasyonunun (LPO) bir göstergesi olan malondialdehid (MDA) miktarının azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 4.23). ROT bileşiklerinin hücrelerde düşürülmesi ve buna paralel olarak MDA miktarının azalması, SA'nın antioksidan enzimler üzerindeki etkilerini desteklemektedir. Çünkü ROT bileşiklerinin hücre ortamında temizlenmesinde antioksidan enzimlerin büyük rolleri bulunmaktadır (Gratao *et al.* 2005). SA uygulamasıyla ROT bileşiklerinin içsel miktarında düşüş olduğunu destekleyen bazı çalışmalar bulabilmek mümkündür (Kang *et al.* 2003; Larkindale and Huang 2004; Imran *et al.* 2007).

Aynı uygulamanın SDS-PAGE ile apoplastik ve hücre proteinlerinin profilleri incelendiğinde (Şekil 4.5,17); 0.1 mM SA uygulamasının, kontrole göre, yaklaşık 17, 23 ve 30 kDa büyüklüğündeki apoplastik polipeptidlerin miktarını artırdığı, buna 47 ve 49 kDa'luk iki polipeptidin miktarını ise düşürdüğü belirlenmiştir. 1 mM SA ise bütün polipeptidlerin miktarını düşürmüştür (Şekil 4.5). Kışlık buğdayla yapılan bir çalışmada, bu sonuçlarımızı destekler nitelikte sonuçlar elde edilmiş ve sonuçta 0.1 mM SA'nın apoplastik polipeptidlerinden bazılarını artırdığı belirlenmiştir (Taşgın *et al.* 2006). Görüldüğü gibi SA'nın düşük seviyesi apoplastik proteinlerin birikimi üzerinde olumlu etki yapmaktadır. Hücre proteinlerinin profillerinde ise benzer bir sonuç gözlenmesinin yanında çok az sayıda bant belirlenmesi değerlendirmenin sağlıklı olmayacağını ortaya koymaktadır (Şekil 4.17).

5.2. NO uygulamalarından elde edilen sonuçların değerlendirilmesi

NO gaz halinde bir sinyal bileşik olduğu için bitkiye uygulamasında karşılaşılan zorluklardan dolayı, bitki tarafından alındığında parçalanarak NO üreten bir bileşik olan sodyum nitroprussid (SNP), NO yerine kullanılmıştır. Literatürde de NO çalışmalarında SNP'nin tercih edildiğini görmekteyiz (Laspina *et al.* 2005). Çalışmalarımızda buğday yapraklarına uygulanan SNP (bir NO donörü), her iki konsantrasyonda da (0.1 ve 1 mM) apoplastik POX aktivitesini artırırken, SOD aktivitesini ise azaltmıştır (Şekil 4.1-3). Hücre antioksidan aktivitelerinde, aynı SNP uygulamaları POX aktivitesini

artırmıştır, ancak SOD aktivitesini ise düşürmüştür. CAT aktivitesi ise SNP'nin düşük konsantrasyonunda düşerken, yüksek konsantrasyonunda yükselmiştir (Şekil 4.11,13,15). Görüldüğü gibi, NO özellikle POX aktivitesini hem apoplast hem de hücrelerde artırırken, SOD enziminde ise farklı olarak her iki bölgede de düşürmüştür. Ayçiçeği ile yapılan bir çalışmada bu sonucu destekleyecek veriler belirlenmiştir (Laspina *et al.* 2005). Diğer taraftan NO uygulamalarının hücrelerde oksidatif hasara yol açan reaktif oksijen bileşikleri (ROT) üzerindeki etkileri incelendiğinde, NO, H₂O₂ ve O₂⁻ anyonu içsel seviyelerini düşürmüştür (Şekil 4.25,27), fakat hücrelerde LPO'nun bir göstergesi olan MDA miktarının SNP'nin her iki konsantrasyonu ile arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.23). ROT bileşiklerinin hücrelerde düşürülmesi ve buna paralel olarak MDA miktarının azalması, literatüre göre beklenen bir sonuçtur (Wang and Higgins 2006) Bu çalışmada ise NO, LPO seviyesini artırmıştır. Bunun olası en önemli sebebinin bitki farklılığı veya uygulanan SNP'nin konsantrasyonu olabilir. SNP'nin bu seviyelerinin buğday için yüksek geldiğini düşünüyoruz. Bitki büyümesi üzerine NO'nun etkilerinde konsantrasyonun son derece önemli olduğu vurgulanmıştır (Pedroso *et al.* 2000; Zottini *et al.* 2002). NO'nun yüksek konsantrasyonlarının (40-80 ppm) domates, marul ve bezelye bitkisinde büyümeyi inhibe ettiği, düşük konsantrasyonlarının (0-20 ppm) ise büyümeyi teşvik ettiği ileri sürülmüştür (Hufton *et al.* 1996; Leshem and Haramaty 1996).

Aynı uygulamanın SDS-PAGE ile apoplastik ve hücre proteinlerinin profilleri incelendiğinde (Şekil 4.6,18); 0.1 ve 1 mM SNP uygulamaları, kontrole göre, yaklaşık 17, 23, 30 ve 47 kDa büyüklüğündeki apoplastik polipeptidlerin miktarını artırdığı belirlenmiştir. SNP konsantrasyonları kendi aralarında karşılaştırıldığında, 1 mM SNP bu polipeptidlerin miktarını artırmada 0.1 mM SNP'den daha etkili olmuştur (Şekil 4.6). Literatürde NO ile bu paralelde yapılan bir araştırma belirlenememiştir. Ancak bizim çalışmamızda NO'nun apoplastik proteinlerin birikimi üzerinde olumlu etki açıktır. Hücre proteinlerinin profillerinde ise benzer bir sonuç gözlenmesinin yanında çok az sayıda bant belirlenmesi değerlendirmenin sağlıklı olmayacağını ortaya koymaktadır (Şekil 4.18).

5.3. Put uygulamalarından elde edilen sonuçların değerlendirilmesi:

Çalışmalarımızda buğday yapraklarına uygulanan Put, her iki konsantrasyonda da (0.1 ve 1 mM) apoplastik POX aktivitesini artırırken, SOD aktivitesini ise düşürmüştür (Şekil 4.1-3). Aynı enzimlerin hücrel aktivitelere bakıldığında, Put uygulamaları üç enzimin aktivitesini de artırmıştır.(Şekil 4.11,13,15). Put uygulamalarının hücrelerde oksidatif hasara yol açan ROT bileşiklerindeki etkileri incelendiğinde, Put uygulamalarının her ikisi de $\text{O}_2^{\cdot-}$ anyonu içsel seviyelerini düşürmüştür (Şekil 4.25,27). İlave olarak, 0.1 mM Put uygulamasının H_2O_2 miktarını düşürdüğü fakat 1 mM Put bu bileşik üzerinde artırma yönünde bir etki yapılmıştır. MDA seviyesi ise özellikle 1 mM Put'ta düşürülmüştür (Şekil 4.23). Genel olarak değerlendirildiğinde Put uygulamalarının bu parametreleri düşürdüğü ileri sürülebilir. ROT bileşiklerinin hücrelerde düşürülmesi ve buna paralel olarak MDA miktarının azalması, Put'un antioksidan enzimler üzerindeki etkilerini desteklemektedir. Put bütün bitkisi tohumlarına uygulandığında, CAT, POX ve SOD aktivitelerinin arttığı, H_2O_2 miktarının azaldığı ve LPO seviyesinin kontrole yakın değere çekildiği belirlenmiştir (Shengchun Xu *et al.* 2010). *Pinus virginiana*'da osmotik strese antioksidanların rolüne yönelik çalışmada kallus kültürlerinde farklı poliamin uygulamaları sonucunda putresin'in POX, glutatyon redüktaz (GR) ve SOD aktivitelerinin artmasında spermidin (Spd) ve spermin (Spm)'den daha etkili olduğu belirtilmiştir. Buna ilave olarak, Put, Spd ve Spm uygulamaları sonucunda yapılan deneylerde Put'un uygulamasının ortamdaki H_2O_2 miktarının azalmasında önemli rolü olduğu belirtilmiştir (Weiguan *et al.* 2009).

Aynı uygulamanın SDS-PAGE ile apoplastik ve hücrel proteinlerin profilleri incelendiğinde (Şekil 4.7,19); 0.1 mM Put uygulamasının, kontrole göre, yaklaşık 17, 23 ve 30 ve 47 kDa büyüklüğündeki apoplastik polipeptidlerin miktarını artırdığı belirlenmiştir. 1 mM Put ise bütün polipeptidlerin miktarını düşürmüştür (Şekil 4.7). Literatürde Put ile bu paralelde yapılan bir araştırma belirlenememiştir. Ancak bizim çalışmamızda Put'nun apoplastik proteinlerin birikimi üzerinde olumlu etki açıktır. Hücrel proteinlerin profillerinde ise benzer bir sonuç gözlenmesinin yanında çok az

sayıda bant belirlenmesi değerlendirmenin sağlıklı olmayacağını ortaya koymaktadır (Şekil 4.19).

5.4. ABA uygulamalarından elde edilen sonuçların değerlendirilmesi

Çalışmalarımızda buğday yapraklarına uygulanan ABA, her iki konsantrasyonda da (50 μ M ve 100 μ M) apoplastik POX aktivitesini artırırken, SOD aktivitesini ise düşürmüştür (Şekil 4.2,4). Bitkilerde ABA'nın apoplastik antioksidan enzimleri üzerine etkileri çalışılmamıştır. Aynı enzimlerin hücrel aktivitelere bakıldığında, ABA, CAT aktivitesini düşürürken, POX ve SOD aktivitesini artırmıştır (Şekil 4.12,14,16). Buğdayda yapılan bir çalışmada buğdayda SOD, POX, CAT aktivitelerinin ABA uygulamalarıyla arttığı belirtilmiştir (Sairam *et al.* 2004). Bizim çalışmamızda bu çalışmadan farklı olarak ABA'nın CAT'ı düşürdüğü belirlenmiştir. Diğer taraftan ABA uygulamalarının hücrelerde oksidatif hasara yol açan reaktif oksijen bileşikleri (ROT) üzerindeki etkileri incelendiğinde, ABA uygulaması, H_2O_2 ve $O_2^{\cdot-}$ anyonu içsel seviyelerini düşürmüş (Şekil 4.26,28), fakat hücrelerde LPO'nun bir göstergesi olan MDA miktarının ABA'nın her iki konsantrasyonu ile arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.24). ROT bileşiklerinin hücrelerde düşürülmesi ve buna paralel olarak MDA miktarının azalması, literatüre göre beklenen bir sonuçtur (Wang and Higgins 2003). Bu çalışmada ise ABA, MDA düzeyinde bakıldığında LPO seviyesini artırmıştır. Bunun olası en önemli sebebinin bitki farklılığı veya uygulanan ABA'nın konsantrasyonu olabilir. Bazı çalışmalarda bulgularımızı destekleyen verilere ulaşılmışlardır. Örneğin, Roychoudhury *et al.* (2009) pirinç bitkilerine 48 saat süresince uygulanan 100 μ M ABA'nın MDA düzeylerini arttırdığı rapor etmiştir. Diğer bir çalışmada ise, Jiang and Zhang (2001) mısır bitkilerinde, ABA uygulamasının 12. saatinde lipid peroksidasyon düzeyinde önemli bir değişime neden olmadığını, ancak 24. saatinde lipid peroksidasyonun arttığı saptanmıştır. Başka bir çalışmada sıcaklık stresi altındaki kamış (*Phragmites communis*) bitkisinin iki çeşidine ABA uygulamasının SOD, CAT ve POX aktivitelerini artırdığı, H_2O_2 miktarı ve MDA seviyesini azalttığı belirtilmiştir (Ding *et al.* 2010). Bu veriler topluca değerlendirildiğinde, ABA'nın konsantrasyona bağlı kalmak koşulu ile

antioksidan enzimlerin aktivitelerini artırdığı ve bu paralelde artan içsel ROT bileşiklerinin miktarının düşürüldüğü ileri sürülebilir.

Aynı uygulamanın SDS-PAGE ile apoplastik ve hücrel proteinlerin profilleri incelendiğinde (Şekil 4.8,20); özellikle 100 μ M ABA uygulamasının, kontrole göre, yaklaşık 46 ve 47 kDa büyüklüğündeki apoplastik polipeptidlerin miktarını artırdığı belirlenmiştir. 17, 23 ve 30 kDa büyüklüğündeki polipeptidlerin miktarını ise düşürmüştür (Şekil 4.8). Görüldüğü gibi ABA apoplastik proteinler üzerinde SA, NO ve Put'tan farklı bir etki sergilemiştir. Bu ABA'nın aynı proteinler üzerinde farklı etkileri olduğunu gösterebilir. Literatürde ABA'nın apoplastik proteinler üzerinde etkisini paralelde çalışan bir araştırma belirlenememiştir. Ancak bizim çalışmamız ABA'nın apoplastik proteinlerin birikimi üzerinde düzenleyici bir etkisine işaret eder. Hücrel proteinlerin profillerinde ise benzer bir sonuç gözlenmesinin yanında çok az sayıda bant belirlenmesi değerlendirmenin sağlıklı olmayacağını ortaya koymaktadır (Şekil 4.20).

5.5. Etp uygulamalarından elde edilen sonuçların değerlendirilmesi

Etilen gaz halinde bir hormon olduğu için bitkiye uygulamasında karşılaşılan zorluklardan dolayı, bitki tarafından alındığında parçalanarak etilen üreten bir bileşik olan etafon (Etp) etilen yerine kullanılmıştır. Literatürde de etilen çalışmalarında etafonun tercih edildiğini görmekteyiz (Nandwal 2005). Çalışmamızda buğday yapraklarına uygulanan Etp, her iki konsantrasyonda da (50 ve 100 ppm) apoplastik POX aktivitesini artırırken, SOD aktivitesini ise düşürmüştür (Şekil 4.2,4). Bitkilerde Etp'nin apoplastik antioksidan enzimleri üzerine etkileri çalışılmamıştır. Aynı enzimlerin hücrel aktivitelerine bakıldığında, Etp uygulaması CAT ve SOD aktivitesini düşürürken, POX aktivitesini artırmıştır (Şekil 4.12,14,16). Bir çalışmada yapılan uygulama çalışmamızla birebir örtüşmese de sonuçlarımızı destekleyen bulgular belirlenmiştir (Larkindale and Huang 2004). Etp uygulaması, H_2O_2 ve $O_2^{\cdot-}$ anyonu içsel seviyelerini düşürmüştür (Şekil 4.26,28), fakat hücrelerde LPO'nun bir göstergesi olan MDA miktarında Etp'nin her iki konsantrasyonu ile istatistiksel anlamda önemli ($P<0.05$) bir değişim belirlenememiştir (Şekil 4.24). ROT bileşiklerinin hücrelerde

düşürülmesi ve buna paralel olarak MDA miktarının azalması, literatüre göre beklenen bir sonuçtur (Wang and Higgins 2006). Bu çalışmada ise Etp, MDA düzeyinde bakıldığında LPO seviyesi üzerinde etkili olamamıştır.

Aynı uygulamanın SDS-PAGE ile apoplastik ve hücrel proteinlerin profilleri incelendiğinde (Şekil 4.9,21); 50 ve 100 ppm Etp uygulamaları, kontrole göre, yaklaşık 17, 23, 30 ve 47 kDa büyüklüğündeki apoplastik polipeptidlerin miktarını artırdığı belirlenmiştir. Etp konsantrasyonları kendi aralarında karşılaştırıldığında, 50 ppm Etp bu polipeptidlerin miktarını artırmada 100 ppm'den daha etkili olmuştur (Şekil 4.9). Literatürde Etp ile bu paralelde yapılan bir araştırma belirlenememiştir. Ancak bizim çalışmamızda Etp'nin apoplastik proteinlerin birikimi üzerinde olumlu etki açıktır. Hücrel proteinlerin profillerinde ise benzer bir sonuç gözlenmesinin yanında çok az sayıda bant belirlenmesi değerlendirmenin sağlıklı olmayacağını ortaya koymaktadır (Şekil 4.21).

5.6. Öst uygulamalarından elde edilen sonuçların değerlendirilmesi

Çalışmalarımızda buğday yapraklarına uygulanan Öst, her iki konsantrasyonda da (10^{-6} ve 10^{-8} M) apoplastik POX aktivitesini artırırken, SOD aktivitesini ise düşürmüştür (Şekil 4.2,4). Bitkilerde Öst'ün apoplastik antioksidan enzimleri üzerine etkileri çalışılmamıştır. Aynı enzimlerin hücrel aktivitelere bakıldığında, Öst'ün her iki uygulaması da CAT aktivitesini artırmıştır. POX aktivitesini 10^{-6} M azaltmışken, 10^{-8} M artırmıştır ve SOD aktivitesini her iki uygulama artırmıştır (Şekil 4.12,14,16). Bitkilerde antioksidan enzim aktiveleri üzerine memeli cinsiyet hormonlarının etkileri ile ilgili sınırlı sayıda bir literatür bilgi mevcuttur; Dogra and Thukral (1991a) steroid hormonların buğday fidelerinin antioksidan enzim aktiveleri üzerine etkilerini çalışmış ve bu hormonların düşük konsantrasyonlarda (10^{-6} - 10^{-8} M) uygulandıkları zaman CAT ve POX aktivitelerini artırdıklarını belirlemişlerdir. Aynı araştırmacılar farklı çalışmalarında östron, testosteron ve progesteronun mısır ve buğday bitkilerinde düşük konsantrasyonlarda POX ve CAT enzim aktivitelerini uyarıp, yüksek konsantrasyonlarda (10^{-4}) ise inhibe ettiklerini ve maksimum aktivite için 10^{-6} ve 10^{-8} M

konsantrasyonlarda elde edildiğini bildirmişlerdir (Dogra and Thukral 1994,1996). Bizim çalışmamızda POX aktivitesinde düşük konsantrasyonun aktiviteyi azaltması dışında örtüşmektedir. Diğer taraftan Öst uygulamalarının hücrelerde oksidatif hasara yol açan reaktif oksijen bileşikleri (ROT) üzerindeki etkileri incelendiğinde, Öst uygulaması, 10^{-6} M H_2O_2 içsel seviyesini artırmışken, 10^{-8} M Östazaltmıştır ve yine Öst'ün her iki konsantrasyonu $O_2^{\cdot-}$ anyonu içsel seviyelerini düşürmüştür (Şekil 4.26,28). Hücrelerde LPO'nun bir göstergesi olan MDA miktarının Öst'ün 10^{-6} M konsantrasyonu ile arttığı, 10^{-8} M konsantrasyonu ile azaldığı belirlenmiştir (Şekil 4.24).

Aynı uygulamanın SDS-PAGE ile apoplastik ve hücrel proteinlerin profilleri incelendiğinde (Şekil 4.10,22); Öst'ün her iki konsantrasyonunun, kontrole göre, yaklaşık 17, 23 ve 30 kDa büyüklüğündeki apoplastik polipeptidlerin miktarını artırdığı, 17 kDa büyüklüğündeki polipeptitlerde 10^{-8} M Öst'nin miktarı aha fazla artırdığı belirlenmiştir. Yine 10^{-8} M Öst 47 kDa luk bantlarda polipeptitlerin şiddetini artırmıştır (Şekil 4.10). Literatürde Öst ile bu paralelde yapılan bir araştırma belirlenememiştir. Ancak bizim çalışmamızda Öst'ün her iki konsantrasyonunun, özellikle düşük konsantrasyonu apoplastik proteinlerin birikimi üzerinde olumlu etkisi açıktır. Hücrel proteinlerin profillerinde ise benzer bir sonuç gözlenmesinin yanında çok az sayıda bant belirlenmesi değerlendirmenin sağlıklı olmayacağını ortaya koymaktadır (Şekil 4.22).

Bu çalışmadan elde edilen önemli Sonuçlar ve Öneriler

1. Apoplastik peroksidaz (POX) aktivitesinin, tüm uygulamalar ile arttığı, apoplastik süperoksid dismutaz (SOD) aktivitesinin ise tüm uygulamalar ile azaldığı,
2. Hücrel katalaz (CAT) aktivitesini, SA, Put, 1 mM NO ve Öst uygulamalarının artırdığı, ABA ve Etp uygulamalarının azalttığı, hücrel SOD aktivitesini SA, Put, ABA ve Öst uygulamalarının artırdığı, NO ve Etp uygulamalarının azalttığı, hücrel POX aktivitesini 10^{-6} M Öst hariç diğer tüm uygulamalarının artırdığı,

3. Reaktif oksijen türlerinden hidrojen peroksit (H_2O_2) içsel seviyesini, SA, NO, 0.1 mM Put, ABA, Etp, 10^{-8} M Öst uygulamalarının düşürdüğü, 1 mM Put ve 10^{-6} M Öst uygulamalarının arttırdığı ve süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$) miktarını tüm uygulamaların, azalttığı belirlenmiştir. Lipid peroksidasyonu (LPO)'nun bir göstergesi olan malondialdehit (MDA) miktarının, SA, 1 mM Put ve 10^{-8} M Öst uygulamalarının azalttığı, NO, 0.1 mM Put, ABA ve 10^{-6} M Öst uygulamalarının arttırdığı, Etp uygulamasının ise istatistiki anlamda önemli bir şekilde değiştirmedığı belirlenmiştir.

4. Apoplastik ve hücrel proteinlerin polipeptid profilleri SDS-PAGE'de, 0.1 mM SA, 1 mM NO, 0.1 mM Put, 50 ppm Etp, 10^{-6} ile 10^{-8} M Öst uygulamalarında 17, 23 ve 30 kDa'luk apoplastik polipeptidlerin miktarının kontrole göre arttığı, ancak 1 mM Put ve 100 μ M ABA'da ise azaldığı belirlenmiştir. 45 ve 60 kDa'luk polipeptidlerin miktarı 0.1 ve 1 mM SA ile azaldığı ancak 0.1 mM Put, 50 μ M ABA, 50 ile 100 ppm Etp ve 10^{-6} ile 10^{-8} M Öst uygulamalarında arttığı belirlenirken, aynı bantların 1 mM Put ve 100 μ M ABA'da kaybolduğu belirlenmiştir. İlave olarak, 45 ve 55 kDa'luk polipeptidlerin 10^{-8} M Öst'de, 45 kDa'luk olanın ise 0.1 ve 1 mM NO'da kaybolduğu ve 24 kDa ağırlığındaki polipeptidin 100 ppm Etp'da azaldığı belirlenmiştir. Hücrel SDS-PAGE'de; 29 ile 36 kDa arasındaki polipeptidlerin, 0.1 mM SA, 1 mM NO, 1 mM Put, 50 ile 100 μ M ABA, 50 ile 100 ppm Etp ve 10^{-6} ile 10^{-8} M Öst'de arttığı, buna karşılık 0.1 mM NO ve Put uygulamalarında azaldığı belirlenmiştir.

Antioksidan enzim aktivileri, reaktif oksijen türlerindeki miktar değişiklikleri ve SDS-PAGE analizlerinin genel incelenmesi ışığında, konsantrasyonları göz önünde bulundurularak, Etp ile ABA'nın bitkide biyokimyasal süreçte aynı sinyal iletim yolunu kullandıkları, yine konsantrasyonlar göz önünde tutularak SA, NO, Put, Etp ve Öst'ün birbirine yakın veya benzer sinyal iletimi yollarında sürece katıldıkları düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Aebi, H., 1974. Catalase, in: H.U. Bergmeyer (Ed), Methods of enzymatic analysis, Varley, Chemie/ Academic Pres, Weinheim/ New York, 680.
- Agarwal, S. and Pandey V., 2004. Antioxidant enzyme responses to NaCl stress in *Cassia angustifolia*. *Biologia Plantarum*, 48(4), 555-560.
- Agarwal, S., Sairam R.K., Srivastava G.C. and Meena R.C., 2005. Changes in antioxidant enzymes activity and oxidative stress by abscisic acid and salicylic acid in wheat genotypes. *Biologia Plantarum*, 49(4), 541-550.
- Akkus, İ., 1995. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkiler, Mimoza Yayınları, Konya.
- Ananieva, E.A., Alexieva V.S., Popova L.P., 2002. Treatment with salicylic acid decreases the effects of paraquat on photosynthesis. *J. Plant Physiol.*, (159), 685-693.
- Ananieva, E.A., Christov K.N. and 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), 319-328.
- Anderson, L.S. ve Mansfield, T.A., 1979, The effects of nitric oxide pollution on the growth of tomato, *Environmental Pollution*, 20 (2), 113-121.
- Angelini, R. and Federico R., 1989. Histochemical evidence of polyamine oxidation and generation of hydrogen peroxide in the cell wall. *J. Plant Physiol.*, (135), 212-217.
- Angelini, R., Manes F. and Federico R., 1990. Spatial and functional correlation between diamine-oxidase and peroxidase activities and their dependence upon deetilation and wounding in chick-pea. *Planta*, (182), 89-96.
- Antognioni, F., Ghatt, F., Mazzucato, A., Franceschetti, M. And Bagni, N. 2002. Polyamine pattern during flower development in the parthenocarpic fruit (*pat*) mutant of tomato, *Physiol. Plant.* (116), 539-547.
- apoplast of winter wheat leaves. *Phytochemistry*, (67), 710-715.
- Arshad, M., Frankenberger, W.T., 2002. Ethylene. Kluwer Academic/Plenum Publishers, 337p. New York.
- Atıcı, Ö. and Nalbantoğlu B., 2003. Antifreeze proteins in higher plants. *Phytochemistry*, (64), 1187-1196
- Atıcı, Ö. and Nalbantoğlu B. 1999a. Apoplastic proteins associated with the cold acclimation process in leaves. *Bio-Sci. Res. Bull*, (15), 55-60.
- Atıcı, Ö., Nalbantoğlu B., 1999b. Effect of apoplastic proteins on freezing tolerance in leaves. *Phytochemistry*, (50), 755-761.
- Augustin, W., Wiswedel I., Noack H., Reinheckel T. and Reichelt O., 1997. Role of endogenous antioxidants in the defence against functional damage and lipid peroxidation in rat liver mitochondria, *Molecular and cellular biochemistry*, (174), 199-205.
- Badger M., Andrews T., Calvin D., Lorimer G., 1980. Interactions of hydrogen peroxide with ribulose biphosphate carboxylase oxygenase. *Journal of Biological Chemistry*, (25), 7870-7875.

- Baet, S.H., Kwan I.S., Part T.I., Yun S.J., Kim J.K. and Chai K.G., 2000. Activities and isozyme profiles of antioxidant enzymes in intercellular compartment of overwintering barley leaves. *J. Biochem. Mol. Biol.*, 33(5), 385-390.
- Bagni N., Tassoni A., 2001, Biosynthesis, oxidant and conjugation of aliphatic polyamines in higher plants. *Amino Acids*, (20), 301-317
- Bagni, N., 1986. The Function and Metabolism of Polyamines in Plant, *Acta Hort.*, (179), 95-103.
- Bakardjieva, N., and Christov K., 1996. Effect of calcium and zinc ions on the sensitivity of peroxidase from moses (*Mnium* sp.) and ferns (*Polydium vulgare*) to high temperature. *Can. J. Bot.*, (74), 1665-1670.
- Baktır, İ., Erdemir, S., Göktaş, Ö., 1994. Süs bitkilerinde hormon kullanımı. Lisans Semineri. Akdeniz Üniv. Zr. Fak. 15s. Antalya.
- Banci, L., 1997. Structural properties of peroxidase. *J. Biotech.*, (53), 253-263.
- Bavita Asthir, Satvir Kaur, Satwinder, K.Mann, (2009) Effect of salicylic and abscisic acid administered through detached tillers on antioxidant system in developing wheat grains under heat stress. *Acta Physiol Plant* (31), 1091–1096
- Bayraş, F.N., 2005. Bitki büyüme regülatörlerinin *Lens esculenta* (mercimek)'da tohum çimlenmesi, kök uzaması ve mitoz bölünmeye etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Beligni, M.V. ve Lamattina, L., 1999a, Nitric oxide counteracts cytotoxic processes mediated by reactive oxygen species in plant tissues, *Planta*, (208), 337–344.
- Beligni, M.V. ve Lamattina, L., 1999b, Is nitric oxide toxic or protective?, *Trends Plant Sci.*, (4), 299–300.
- Beligni, M.V. ve Lamattina, L., 2000, Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation and inhibits hypocotyl elongation, three light inducible responses in plants, *Planta*, (210), 215–221.
- Bennett, R.D., Ko, S.T., Heftmann, E., 1966. Isolation of Estrone and cholesterol from the date palm, *Phoenix dactylifera*. *Phytochemistry*, (5), 31.
- Bergmeyer, J. and Grabl M., 1983. *Methods of Enzymatic Analysis* (Third Edition), 190-302, Germany.
- Bhattacharya, J., GhoshDastidar K., Chatterjee A., Majee M., Majumder A.L., 2004. Synechocystis Fe superoxide dismutase gene confers oxidative stress tolerance to *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, (316), 540–544.
- Bingru Huang, Jane Larkindale, (2004) Thermotolerance and antioxidant systems in *Agrostis stolonifera*; Involvement of salicylic acid, abscisic acid, calcium, hydrogen peroxide and ethylene. *J. Plant Physiol.* (161), 405-413
- Bishop, D.L., 2002. Gene expression of vacuolar peroxidase with stress-induced pathogenesis in wheat sheaths. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, (61), 65-71. to permeability barrier in roots of *Silene cucubalus*, (135), 165-169.
- Blinda, A., Koch, B., Ramanjulu, S., Dietz, K.J., 1997. De novo synthesis and accumulation of apoplastic proteins in leaves of heavy metal-exposed barley seedlings. *Plant Cell and Environment*, 20(8), 969-981.
- Boeuf, G., Legnard B. and Rambour S., 1999. Influence of light conditions on development, apoplastic peroxidase activities and peroxidase activities and peroxidase isoenzymes in chicory root explants. *Physiol. Plant*, (106), 331-336.

- Boeuf, G., Legnard B. and Rambour S., 2001. Effect of NAA on the development, apoplastic peroxidase activities, and peroxidase isoenzymes in chicory root explants. *J. Plant Physiol.*, (158), 963-969.
- Bonneu, L., Carre, M., Dreumont, C. And Martin-Tanguy, J., 1994. Polyamine Metabolism During Seedling Development in Rice, *Plant Growth Regulation*, (15), 83-92
- Bor, M., Özdemir F. and Türkan I., 2003. The effect of salt stress on lipid peroxidation in leaves of sugar beet *Beta vulgaris* L. and wild beet *Beta maritima* L. *Plant Science*, (164), 77-84.
- Bowler, C., Van Montague, M. ve Inzè, D., 1992, Superoxide dismutase and stress tolerance, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, (43), 83–116.
- Brennan, T., Frenkel C., 1977. Involvement of hydrogen peroxide in the regulation of senescence in pear. *Plant Physiology*, (59), 411–416.
- Brune, A., Urbach, W., Josef-Dietz, K., 1994. Zinc stress induces changes in apoplasmic protein content and polypeptide composition of barley primary leaves. *J. Exp. Bot.*, (45), 1189-1196.
- Burg, S.P., Thimann, K.V., 1959. The physiology of ethylene formation in apples. *Botany*, (45), 335-343.
- Butenandt, A., Jacobi, H., 1933. Über die Darstellung eines krystallisierten pflanzlichen Tokokinins (Thelykinins) und seine Identifizierung mit dem α -Follikelhormon. Untersuchungen über das weibliche Sexualhormon. *Hoppe Seyler's Z Physiol. Chem.*, (218), 104-112.
- Cai, Z.Q., Chen Y.J., Guo Y.H. and Cao K.F., 2005. Responses of two field-grown coffee species to drought and re-hydration. *Photosynthetica*, 43 (2), 187-193.
- Caro, A. and Puntarulo, S., 1998. Nitric Oxide Decreases Superoxide Anion Generation by Microsomes from Soybean Embryonic Axes, *Physiologia Plantarum*, (104), 357-364.
- Chanda, S.V. and Singh Y.D., 1997. Changes in peroxidase and IAA oxidase activities during wheat grain development. *Plant Physiol. Biochem.*, (35), 245-250.
- Chaparzadeh, N., D'Amico M.L., Khavari-Nejad R.A., Izzo R. and Navari-Izzo F., 2004. Antioxidative responses of *Calendula officinalis* under salinity conditions. *Plant Physiology and Biochemistry*, (42), 695–701.
- Chaudiere, J. and Ferrari-Iliou R., 1999. Intracellular antioxidants from chemical to biochemical mechanism. *Food Chem. Toxicol.*, (37), 949-962.
- Cheeseman, J. M., 2006. Hydrogen peroxide concentrations in leaves under natural conditions. *Journal of Experimental Botany*, (57), 10, 2435–2444.
- Chen Z, Gallie D., 2004. The ascorbic acid redox state controls guard cell signaling and stomatal movement. *The Plant Cell*, (16), 1143–1162.
- Chen, H.H., Li, P.H. and Benner, M.L., 1983, Involvement of abscisic acid in potato cold acclimation, *Plant Physiol.*, (71), 65-362
- Chen, T.H.H. and Gusta, I.V., 1993, Abscic acid-induced freezing resistance in cultured plant cell, *Plant Physiol.*, (83), 27- 423
- Chen, Z., Silva H., Klessig D., 1993. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance induced by salicylic acid. *Science*, (262), 1883–1886.

- Clark, D., Durner, J., Navarre, D.A. ve Klessig, D.F., 2000, Nitric oxide inhibition of tobacco catalase and ascorbate peroxidase, *Mol. Plant Microbe Interact.*, (13), 1380–1384.
- Clarke, A., Desikan, R., Hurst, R.D., Hancock, J.T. and Neill, S.J., 2000. NO Way Back: Nitric Oxide and Programmed Cell Death in *Arabidopsis thaliana* Suspension Cultures, *Plant Journal*, (24), 667-677.
- Costa, G., and Bagni, N., 1983. Effects of Polyamines on Fruit-Set of Apple, *Hort. Science*, 18(1), 59-61.
- Couée, I., Hummel, I., Sulmon, C., Gouesbet, G., El Amrani, A., 2004. Involvement of Polyamines in Root Development. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* (76), 1-10.
- Creelman, R.A. and Zeevaart, J.A.D., 1985, Absisic acid accumulation in spinach leaf slices in the presence of penetrating and non-penetrating solutes, *Plant Physiol.*, (77), 25-28
- Creissen, G., Broadbent, P., Kular, B., Reynolds, H., Wellburn, A., Mullineaux, P., 1994. Manipulation of glutathione-reductase in transgenic plants – implications for plants responses to environmental-stress. *Proceedings of the royal society of edinburgh section b-biological sciences*, (102), 167-175.
- Çakmak, I. and Horst W. J., 1991. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*), *Physiologia Plantarum*, (83), 463-468.
- Çınar, S., 2005. Mangan ve Demir Stresi Uygulanmış Roka (*Eruca sativa*) Bitkisinde Bazı Antioksidan Enzim Aktivitesindeki ve Lipid Peroksidasyon Düzeylerindeki Değişiminin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Manisa.
- Dat, J.F., Lopez-Delgado H., Foyer C.H., and Scott I.M., 1998. Paralel changes in H₂O₂ and catalase during thermotolerance induced by salicylic acid or heat acclimation in mustard seedlings. *Plant Physiol.*, (116), 1351-1357.
- Davies, P.J., 1995. In: Davies, Editor, *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology* (Second ed.) Kluwer, Dordrecht, Netherlands, 1-12.
- De Azevedo Neto, A.D., Prisco J.T., Enéas-Filho J., de Abreu C.E.B., Gomes-Filho E., 2006. Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes, *Environ. Exp. Bot.*, (56), 87–94.
- De Vos, C.H.R., Schat H., Waal M. A. M., Vooijs R. and Ernst W.H.O., 1991. Increased resistance to copper induced damage of the root cell plasmalemma in copper tolerant *Silene cucubalus*, *Physiol. Plant.*, (82), 523-528.
- De Vos, C.H.R., Vooijs R., Schat H. and Ernst W.H.O., 1989. Copper induced damage to permeability barrier in roots of *Silene cucubalus*, (135), 165-169.
- Delledonne, M., Xia, Y., Dixon, R.A. ve Lamb, C., 1998, Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance, *Nature*, (394), 585–588.
- Destro, D., E.R.A. Arias, E. Miglioranza, J.F.F. Toledo, E. Paludzyszyn Filho and J.F.F. De Toledo, Developmental stages suitable for the application of male sterility inducing phytohormones in sunflower. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 23(5), 593-596
- Dietz, K.J., 1997. Functions and Responses of the Leaf Apoplast Under Stress, *Prog. Bot.*, (58), 221-254.

- Dobrev, P.P., Havlicek, L., Vagner, M., Malbeck, J., Kaminek, M., 2005. Purification and Determination of plant hormones Auxin and Absciscic Acid Using SolidPhase Extraction and Two-Dimensional High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography A.*, 1075(1-2), 159 -166.
- Dogra, R. and Kaur, A., 1994. Effect of steroids on some growth and biochemical parameters of *Triticum aestivum* L. during germination. *Crop Research*, (8), 611-620.
- Dogra, R. and Thukral, A., 1991a. Effect of steroid and plant hormones on some germination aspects of *Triticum aestivum* L. In: *New trends in plant physiology Physiology* (Eds. K. K. Dhir, I. S. Dua and K. S. Chark), Today and Tomorrow's Printers and Publishers, New Delhi, 65-70.
- Dogra, R. and Thukral, A.K., 1991b. Variations in the proteins, nucleic acids and some enzymes in seedlings of *Triticum aestivum* L. under influence of steroids and plant hormones. *Proc.Intern. Seed Symposium.*, Jodhpur, India.
Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Draper, J., 1997. Salicylate, Superoxide Synthesis and Cell Suicide in Plant Defence, *Trends in Plant Science*, 2:163-165.
- Ducker, B., G. Kellner and H. H. Hoppe, 1991. Use of growthregulators in winter rape. *Gesunde Pflanzen.*, 43(9), 294-299.
- Durner, J., Shah J., and Klessig D.F., 1997. Salicylic acid and disease resistance in plants. *Trends İn Plant Science*, 2(7), 266-274.
- Durner, J., Wendehenne, D. ve Klessig, D.F., 1998, Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, (95), 10328–10333.
- Erdal, S., 2009. Effects of mammalian sex hormones on antioxidant enzyme activities, H₂O₂ content and lipid peroxidation in germinating bean seeds. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 40 (2), 79-85.
- Evans, P. T. and R. L. Malmberg. 1989. Do polyamines have a role in plan development? *Ann. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.*, (40), 235-269.
- Eyidoğan, F.İ., Öktem H.A. and Yücel M., 2003. Superoxide dismutase activity in salt stressed wheat seedlings. *Acta Physiologia Plantarum*, (25), 263-269.
- Ferrer, M.A. ve Ros Barcelo, A., 1999, Differential effects of nitric oxide onperoxidase and H₂O₂ production by the xylem of *Zinnia elegans*, *Plant, Cell and Environment*, (22), 891–897.
- Flores, H.E., Protocia, C.M., Signs, M.W. 1989. Primary and secondary metabolism of polyamines in plants. In “*Plant Nitrogen Metabolizm*” (JE Poulton, JT Romeo, EE Conn eds), *Rec. Adv. Phytochem.*, Vol 23, Plenum Pres, New York, 329-393
- Flores, H.E., Young, ND., Galston, AW. 1995. Polyamine Metabolizm and Plant stres. In “*Cellular and Molecular Biology of Plant Stres*” (JL key, T kosuge eds), Alan R., Liss., Inc., New York, 93-114
- Fos, M., Proaño, K., Alabadí, D., Nuez, F., Carbonell, J. And García Martínez, J.L. 2003. Polyamine Metabolizm is Altered in Unpollinated Parthenocarpic *Pat-2* Tomato Ovaries. *Plant Physiol.* (131), 359-366.
- Fridovich, I., 1995. Superoxide Radical and Superoxide Dismutases, *Annu. Rev. Biochem.*, (64), 97-112.
- Gallardo, M., Matilla, A., Munõz de Rueda, P. 1996. Role of polyamines in growth and development, *Ars Pharm.* 37(1)., 17-27

- Gao, D., Knight, M.R., Trewavas, A.J., Sattelmacher, B. ve Plieth, C., 2004. Self-Reporting *Arabidopsis* Expressing pH and [Ca²⁺] Indicators Unveil Ion Dynamics in the Cytoplasm and in the Apoplast Under Abiotic Stress, *Plant Physiol.*, (134), 898-908.
- Garcia Mata, C. ve Lamattina, L., 2001, Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress, *Plant Physiol.*, (126), 1196–1204.
- Gawienowski, A.M. and Gibbs, C.C., 1968. Identification of cholesterol and progesterone in apple seeds. *Steroids.*, (12), 545-550.
- Gechev, T., Gadjiev, I., Van Breusegem, F., Inze, D., Dukiandjiev, S., Taneve, V., and Minkov, I., 2002. Hydrogen peroxide protect tobacco from oxidative stress by inducing a set of antioxidant enzymes. *CMLS*, (59), 708-714.
- Gratao, L.P., Polle, A., Lea, P., and Azevedo, A., 2005. Making the life of heavy metal stressed plants a little easier. *Functional Plant Biology*, (32), 481-494.
- Gregory, M. B., R. K. Harold and L. S. Donald, 1995. Timing and rate of ethephon application to two-row and six-row spring barley. *Argon. J.*, (87), 1198-1205.
- Griffith, M., Ala P., Yang D.S.C., Hon W.C., Moffatt B.A., 1992. Antifreeze protein produced endogenously in winter rye leaves. *Plant Physiology*, (100), 593–596
- Grignon, C. ve Sentenac, H., 1991. pH and Ionic Conditions in the Apoplast, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, (42), 103-128.
- Gruz, J., Novak, O., Strnad, M., 2008. Rapid analysis of phenolic acids in beverages by UPLC-MS/MS. *Food Chem.*, (111), 789–794.
- Halliwell, B. 1994. Free radicals and antioxidants: A personal view. *Nutri. Rev.* (52), 253-265.
- 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., Clement M. and Long L., 2000. Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Letters*, (486), 10–13.
- Hanzawa, Y., Takahashi, T., Michael A.J., Burtin, D., Long, D., Pineiro, M., Coupland, G., Komeda, Y., 2000. Acaulis, An *Arabidopsis* Gene Required for Stem Elongation, Encodes a Spermin Synthase. *EMBO J.*, (19), 4248-56.
- Hernandez, J.A., Ferrer M.A., Jimenez A., Barcelo A.R. and Sevilla F., 2001. Antioxidant systems and O₂⁻ / H₂O₂ production in the apoplast of pea leaves. Its relation with salt induced necrotic lesions in minor veins. *Plant Physiology*, (127), 817-831.
- Hon, W-C., Griffith M., Chong P., Yang D.S.C., 1994. Extraction and isolation of antifreeze protein from winter rye (*Secale cereale* L.) leaves. *Plant Physiol.*, (104), 971-980.
- Horvath E., Janda T., Szalia G. and Paldi E., 2002. In vitro salicylic acid inhibition of catalase activity in maize: differences between the isozymes and a possible role in the induction of chilling tolerance. *Plant Sci.*, (163), 1129-1135.
- Hsu YT, Kao CH (2004) Cadmium toxicity is reduced by nitric oxide in rice leaves *Plant Growth Regul.*, (42), 227-238.
- <http://cevre.club.fatih.edu.tr/webbyeni/konfreweb/konu25.pdf>
- Hung, K.T. ve Kao, C.H., 2003, Nitric oxide counteracts the senescence of rice leaves induced by abscisic acid, *J. Plant Physiol.*, 160(8), 871–879.

- Jackson, M.B. and Hall, K.C., 1987, Early stomatal closure in waterlogged pea plants is mediated by abscisic acid in the absence of foliar water deficits, *Plant Cell Environ.*, (10), 121-30
- 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), 175-180.
- Janda, T., Szalai, G., Rios-Gonzales, K., Veisa, O., and Paldi, E., 2003. Comparative study of frost tolerance and antioxidant activity in cereals. *Plant Science*, (164), 301-306.
- Janeczko, A. and Skoczowski, A., 2005. Mammalian sex hormones in plants. *Folia Histochem Cytobiol*, (43), 71-79.
- Janeczko, A., 2000. Influence of selected steroids on plant physiological processes - especially flowering induction (in Polish). PhD Dissertation, Agricultural University, Krakow, Poland.
- Jung, S., 2004. Variation in Antioxidant Metabolism of Young and Mature Leaves of *Arabidopsis thaliana* Subjected to Drought, *Plant Sci.*, (166), 459-466.
- Kachroo, A., He Z, Paktar R., Zhu Q., Zhong J., Li D., Ronald P., Lamb C., Chattoo B., 2003. Induction of H₂O₂ in transgenic rice leads to cell death and enhanced resistance to both bacterial and fungal pathogens. *Transgenic Research*, (12), 577-586.
- Kadıoğlu, A., 1999. Bitki Fizyolojisi, Trabzon.
- Kalac, P. and Krausova, P. 2004. A Review of Dietary Polyamines: Formation, Implications for Growth and Health and Occurrence in Foods. *Food Chemistry*.
- Kang, G., Wang C., Sun G., Wang Z., 2003. Salicylic acid changes activities of H₂O₂ metabolizing enzymes and increases the chilling tolerance of banana seedlings. *Environ. Exp. Bot.*, (00), 1-7.
- Kang, H.M., Saltveit M.E., 2002. Antioxidant enzymes and DPPH-radical scavenging activity in chilled and heat shocked rice (*Oryza sativa* L.) seedlings radicles. *J. Agric. Food Chem.*, (50), 513-518.
- Kappen, L., 1981. Ecological significance of resistance to high temperature, *Physiological*, (12), 439-474.
- Karakuş, C., Köker, R., (2008) "Tarımda Bitki Gelişim Düzenleyicilerin (BGD) Kullanımı ve Hormon Riski"
- Kaur, A. and Thukral, A.K., 1991. Growth of *Brassica campestris* seedlings under the influence of some animal hormones. *Proc. Intern. Seed Symposium*, Jodhpur, India. pp 345-347.
- Keles, Y., Öncel I., 2002. Response of antioxidative defence system to temperature and water stress combinations in wheat seedlings. *Plant Sci.* (163), 783-790.
- Kerby, K. and Somerville S.C., 1992. Purification of an infection-related, extracellular peroxidase from barley. *Plant Physiol.*, (100), 397-402.
- Khan, M.A., B. Gul and D.J. Weber. 2004. Action of plant growth regulators and salinity on seed germination of *Ceratoides lanata*. *Can. J. Bot.*, (82), 37-42.
- Kim, J.S., Yun B.W., Choi J.S., Kim T.J., Kwak S.S., Cho K.Y., 2003. Death mechanisms caused by carotenoid biosynthesis inhibitors in green and in undeveloped plant tissues. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, (78), 127-139.

- Kim, K.Y., Kwon S.Y., Lee H.S., Hur Y., Bang C.W., Choi K.S. and Kwak S.S., 2000. Differential expression of four sweet potato peroxidase genes in response to abscisic acid and ethephon. *Phytochemistry*, (54), 19-22.
- Kireççi, O.A., (2006), Bazı Sentetik Hormonların (Giberellik asit, Spermin, Spermidin, Putresin) Fesleğen (*Ocimum basilicum*) Bitkisi Üzerinde Morfolojik Yapı ve Uçucu Yağ Kalitesine Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Kahramanmaraş, 68.
- Klepper, L.A., 1979, Nitric oxide (NO) and nitrogen dioxide emissions from herbicide-treated soybean plants, *Atmospheric Environment*, (13), 537-542.
- Kocaçaliskan, İ., 2004. Bitki Fizyolojisi. Kütahya
- Kronfuss, G., Wieser G., Havranek W.M., and Polle A., 1996. Effects of ozone and mild drought stress on total and apoplastic guaiacol and lipid peroxidation in current-year needles of young Norway Spruce (*Picea abies* L., Karst). *J. Plant Physiol.*, (148), 203-206.
- Kuru, H.İ., 2007. Arseniğin insan ve bazı canlılarda oksidatif enzimler üzerine etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kütahya.
- Laemmli, D.K., 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the heat sensitive bacteriophage T4. *Nature (London)*, (227), 680-685.
- Lalk, I. And K. Dorffling, 1985, Hardening, abscisic acid, proline in two winter wheat varieties. *Physiol. Plant.*, (63), 287-292
- Lamattina, L., García mata, C., Graziano, M. ve Pagnussat, G., 2003, Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule, *Annu. Rev. Plant Biol.*, (54), 109-136.
- Larkindale J, Huang B (2004) Thermotolerance and antioxidant systems in *Agrostis stolonifera*: involvement of salicylic acid, abscisic acid, calcium, hydrogen peroxide, and ethylene. *J Plant Physiol.*, (161), 405-413
- Laspina, N.V., Groppa, M.D., Tomaro, M.L. and Benavides, M.P., 2005. Nitric Oxide Protects Sunflower Leaves Against Cd-Induced Oxidative Stress, *Plant Science*, 168 (7), 252-260.
- Leboeuf, M., Cave, A., Goutarel, R., 1964. Steroid alkaloids. presence of progesterone in the leaves of *Holarrhena floribunda* (g. don) duer. and schinz. *Compt.Rend.hebd. Seanc. Acad Paris*, (259), 3401-3403.
- Leboeuf, M., Cave, A., Goutarel, R., 1964. Steroid alkaloids. presence of progesterone in the leaves of *Holarrhena floribunda* (g. don) duer. and schinz. *Compt.Rend.hebd. Seanc. Acad Paris*, (259), 3401-3403.
- Lee, T.M. and Lin Y.H., 1996b. Peroxidase activity in ethylene-, ABA-, or MeJA, treated rice (*Oryza sativa* L.) roots. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, (37), 201-207.
- Lee, T.M., and Lin Y.H., 1996a. Peroxidase activity in ethylene-induced rice (*Oryza sativa* L.) coleoptile elongation. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, 37(4), 239-245
- Leshem, Y.Y. ve Haramaty, E., 1996, The characterization and contrasting effects of the nitric oxide free radical in vegetative stress and senescence of *Pisum sativum* L. *Foliage, Journal of Plant Physiology*, (148), 258-263.
- Leshem, Y.Y., 1996, Nitric oxide in biological systems, *Plant Growth Regulation*, (18), 155-169.
- Levine, A., Tenhaken R., Dixon R.A., Lamb C.J., 1994. H₂O₂ from the oxidative burst

- Li, X., Xiong, Z., Ying, X., Cui, L., Zhu, W., Li, F., 2006. A rapid ultraperformance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometric method for the qualitative and quantitative analysis of the constituents of the flower *Trollius ledibouri* Reichb. *Anal Chim Acta*, (580), 170–180.
- Lin, C.C. and Koa C.H., 2000. Effect of NaCl stress on H₂O₂ metabolism in rice leaves. *Plant Growth Regulation*, (30), 151-155.
- Liu, P., and Yang, Y.A., 2000. Effects of molybdenum and boron on membrane lipid peroxidation and endogenous protective systems of soybean leaves. *Acta Botanica Sinica*, 42(5), 461-466
- Martinez, G.R., Di Mascio, P., Bonini, M.G., Augusto, O., Briviba, K., Sies, H., Mauer, P., Rothlisberger, U., Herold, S. and Koppenol, W.H., 2000. Peroxynitrite does not Decompose to Singlet Oxygen and Nitroxyl, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (97), 10307-10312.
- Mauch-Mani, B., and Metraux, J.P., 1998. Salicylic acid and systemic acquired resistance to pathogen attack. *Annals of Botany*, (82), 535-540.
- McClung, C.R., 1997. Regulation of catalases in Arabidopsis. *Free Radical Bio. Med.*, (23), 489-496.
- Meloni, D.A., Oliva M.A., Martinez C.A. and Cambraia J., 2003. Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. *Environ. and Exp. Botany*, (49), 69-76.
- Minibaeva, F., Mika A. and Lühje S., 2003b. Salicylic acid changes the properties of extracellular peroxidase activity secreted from wounded wheat (*Triticum aestivum* L.) roots. *Protoplasma*, (221), 67-72.
- 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.
- Molina, A., Bueno P., Marin M.C., Rodriguez-Rosales M.P., Belver A., Venema K. and Donaire J.P., 2002. Involvement of endogenous salicylic acid content, lipoxygenase antioxidant enzyme activities in the response of tomato cell suspension cultures to NaCl. *New Phytologist*, (156), 409-415.
- Monni, S., Uhling, C., Hansen, E. and Magel, E., 2001, Ecophysiological responses of *Empetrum nigrum* to heavy metal pollution, *Environ. Pollut.*, (112), 121-129.
- Musnicki, C. W., P. Tobola and M. Jodlowski, 1996. Possibilities of sunflower plant height limitation with the aid of growth regulators. *Rosliny Oleiste*, 17 (2), 305-310.
- Mutlu, S., 2005. Tuz stresi ve salisilik asitin buğday yapraklarında apoplastik ve simplastik antioksidan enzimler üzerine etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Mutlu, S., 2005. Tuz stresi ve salisilik asitin buğday yapraklarında apoplastik ve simplastik antioksidan enzimler üzerine etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Mutlu, S., Atici Ö., and Nalbantoglu B., 2009. Effects of salicylic acid and salinity on apoplastic antioxidant enzymes in two wheat cultivars differing in salt tolerance. *Biologia Plantarum*, 53(2), 334-338.
- Neill, S.J., Desikan, R. ve Hancock, J.T., 2003, Nitric oxide signalling in plants, *New Phytol.*, (159), 11–35.

- Neill, S.J., Desikan, R., Clarke, A. ve Hancock, J.T., 2002, Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signalling in stomatal guard cells, *Plant Physiol.*, (128), 13–16.
- Neves, C., Santos, H., Luis, V.B., and Amancio, S. 2002. Involvement of Free and Conjugated polyamines and free Amino acids in the Adventitious Rooting Micropropagated Cork oak and grapevine Shoots. *Plant Physiol. and Biochem.*, 40(12), 1071-1080.
- Nishiyama, Y. Ikeda, H. and Haramaki N., 1998. Oxidative stress is related to exercise in tolerance in patients with heart failure, *Am. Heart. J.*, 135-115.
- Novak, O., Hauserova, E., Amakorova, P., Dolezal, K., Strnad, M., 2008. Cytokinin profiling in plant tissues using ultra-performance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Phytochemistry*, (69), 2214–2224. orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*, (79), 583–593.
- Orozco-Cardenas, M., Narva'ez-Va'squez J. and Ryan C., 2001. Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. *The Plant Cell*, (13), 179–191.
- Otter, T., Polle A., 1997. Characterisation of acidic and basic apoplastic peroxidases from needles of Norway Spruce (*Picea abies*, L., Karsten) with respect to lignifying substrates. *Plant Cell Physiol.*, 38(5), 595-602.
- Ö. Atıcı, B. Nalbantoğlu, S. Mutlu, (2009) Effects of salicylic acid and salinity on apoplastic antioxidant enzymes in two wheat cultivars differing in salt tolerance. *Biologica Plantarum* (53), 334-338
- Öktem, H.A., Eyidogan F., Demirba D., Bayrac A.T., Oz M.T., Ozgur E., Sencuk, F., Yucel, M., 2008. Antioxidant responses of lentil to cold and drought stress. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 17(1), 15-21.
- Padu, E., 1999. Apoplastic peroxidases, ascorbate and lignification in relation to nitrate supply in wheat stem. *J. Plant Physiol.*, (154), 576-583.
- Palma, F., Lluch C., Iribarne C., 2009. Combined effect of salicylic acid and salinity on some antioxidant activities, oxidative stress and metabolite accumulation in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Growth Regul.*, (58), 307–316.
- Parida, A.K., Das A.B., 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, (60), 324–349.
- Patykowski, J. and Urbanek H., 2003. Activity of enzymes related to H₂O₂ generation and metabolism in leaf apoplastic fraction of tomato leaves infected with *Botrytis cinerea*. *Journal of Phytopathology*, (151), 153–161.
- Pedroso M.C. ve Durzan D.J., 2000, Effect of different gravity environments on DNA fragmentation and cell death in *Kalanchoë* leaves, *Ann. Bot.*, (86), 983–994.
- Pinheiro, H.A., DaMatta, F.M., Chaves, A.R.M., Fontes, E.P.B. ve Loureiro, M.E., 2004. Drought Tolerance in Relation to Protection Against Oxidative Stress in Clones of *Coffea canephora* Subjected to Long-Term Drought, *Plant Sci.*, (167), 1307-1314.
- Poschenrieder, Ch., Gunse, B. and Barcelo, J., 1989, Influence of cadmium on water relations, stomatal resistance and abscisic acid content in expanding bean leaves, *Plant Physiol.*, (90), 1365-1371

- Posmyk, M.M., Bailly C., Szafranska K., Janas K.M., Corbineau F., 2005, Antioxidant enzymes and isoflavonoids in chilled soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) seedlings, *J. Plant Physiol.*, (162), 403-412.
- Ramachandra Reddy, A., Chaitanya, K.V., Jutur, P.P. ve Sumithra, K., 2004. Differential Antioxidative Responses to Water Stress Among Five Mulberry (*Morus alba* L.) Cultivars, *Environ. Exp. Bot.*, (52), 33-42.
- Ramanjulu, S., Kaiser, W.M. ve Dietz, K.J., 1999. Salt and Drought Stress Differentially Affect the Accumulation of Extracellular Proteins in Barley, *Z. Nat.*, (54), 337-347.
- Raskin, I., 1992a. Role of salicylic acid in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol Biol.*, (43), 439-463.
- Raskin, I., 1992b. Salicylate, a new plant hormone. *Plant Physiol.*, (99), 799-803.
- Rauser, W.E. and Dumbroff, E.R., 1981, Effects of excess cobalt, nickel and zinc on the water relations of *Phaseolus vulgaris*, *Env. And Exp. Bot.*, (21), 249-255.
- S. Erdal, R. Dumlupinar, (2010) Mammalian sex hormones stimulate antioxidant system and enhance growth of chickpea plants. *Acta Physiol Plant* (33), 1011-1017
- Sairam, R.K. and Srivastava G.C., 2000. Induction of oxidative stress and antioxidant activity by hydrogen peroxide treatment in tolerant and susceptible wheat genotypes. *Biologia Plantarum*, 43(3), 381-386.
- Sairam, R.K., Srivastava G.C. and Saxena D.C., 2000. Increased antioxidant activity under elevated temperatures a mechanism of heat stress tolerance in wheat genotypes. *Biologia Plantarum*, 43(2), 245-251.
- Saito, T., Sawamoto, K., Okano, H., Anderson, D.J., Mikoshiba, K. (1998). Mammalian BarH homologue is a potential regulator of neural bHLH genes. *Dev. Biol.* 199(2), 216-225.
- Sakhabutdinova, A.R., Fatkhutdinova, D.R., and 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, 682, USA.
- Sannazzaro, I.A., Álvarez, L.C., Menéndez, B.A., Pieckenstein, L.F., Albertó, O.E., Ruiz, A.O. 2003. Ornithine and Arginine Decarboxylase Activities and Effect of Some Polyamine Biosynthesis Inhibitors on *Gigasporarosea* Germinating Spores. *FEMS Microbiology Letters*, (11330), 17.
- Scandalios, J.G., 1993. Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiol.*, (101), 7-12.
- Serafini-Fracassini, D., 1991. Cell cycle-dependent changes in plant polyamine metabolism, in: R.D. Slocum, H.E. Flores (Eds), *Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants*, CRC Press, Boca Raton, FL, 159-171.
- Sharma HC, Abraham CV, Vidyasagar P and Stenhouse JW. 1996. Gene action for resistance in sorghum to midge, *Contarinia sorghicola*. *Crop Science* 36:259-265.
- Shengchun Xu, Jin Hu, Yongping Li Wenguang Ma, Yunye Zheng, Shuijin Zhu, (2010) Chilling tolerance in *Nicotiana tabacum* induced by seed priming with putrescine. *Plant Growth Regul* (63), 279-290

- Shim, I.S., Momose Y., Yamamoto A., Kim D.W., and Usui, K., 2003. Inhibition of catalase activity by oxidative stress and its relationship to a salicylic acid accumulation in plants. *Plant Growth Regul.*, (39), 285-292.
- Simersky, R., Novák, O., Morris, D.A., Pouzar, V., Strnad, M., 2009. Identification and quantification of several mammalian steroid hormones in plants by UPLCMS/MS. *J Plant Growth Regul.* (28), 125-136.
- Simons, R.G., Grinwich, D.L., 1989. Immunoreactive detection of four mammalian steroids in plants. *Can J Bot.*, (67), 288-296.
- Sing, B. and Usha K., 2003. Salicylic acid induced physiological and biochemical changes in wheat seedlings under water stress. *Plant Growth Regulation*, (39), 137-141.
- Sinska, I. And Lewandawska, U., 1991. Polyamines and Ethylene in the Removal of Embryonal Dormancy in Apple Seeds, *Physiol. Plant.*, (81), 59-64.
- Skarzynski, B., 1933. An oestrogenic substance from plant material. *Nature*, (131), 766.
- Slesak, I., Libik M., Karpinska B., Karpinski S. and Miszalski Z., 2007. The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signalling in response to environmental stresses, *Acta Biochim. Pol.*, (54), 39-50.
- Smith, T.A., Bagni, N., Fracassini, DS. 1979. The formation of amines and their derivatives in plants (EJ Hewitt, CV Cutting seeds) "Nitrogen Assimilation of Plants", Academic Press, New York, 557-570
- Srivalli, B., Sharma, G. ve Khanna-Chopra, R., 2003. Antioxidative Defences System in Upland Rice Cultivar Subjected to Increasing Intensity of Water Stress Followed by Recovery, *Physiol. Plant.*, (119), 503-512.
- Srivastava, M.K. Dwivedi U.N., 2000. Delayed ripening of banana fruit by salicylic acid. *Plant Sci.* (158), 87-96.
- Srivastava, S. Dwivedi U.N., 2001. Plant regeneration from callus of *Cuscuta reflexa*- an angiospermic parasite-and modulation of catalase and peroxidase activity by salicylic acid and naphthalene acetic acid. *Plant Physiol.* (39), 529-538.
- Stahl, W. ve Sies H., 2002. Introduction: Reactive oxygen species, research monographs, 1-2.
- Steward, C.R. and Voetberg, G., 1987, Abscicic acid accumulation is not required for proline accumulation in wilted leaves, *Plant Physiol.*, (83), 49-747
- Sudhakar, C., Lakshmi A. and Giridarakumar., 2001. Changes in the antioxidant enzyme efficacy in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) under NaCl salinity. *Plant Science*, (161), 613-619.
- Swamy, P.M., and Smith, B.N., 1999, Role of abscisic acid in plant stress tolerance. *Current Science*, (76), 1220-1227.
- Şimşek, F., 1999. Free radicals, antioxidants and lipid peroxidation. *Türkiye Klinikleri. J. Pediatr.* (8), 42-47.
- Taiz and Zeiger, *Bitki Fizyolojisi*, 2005
- Taiz and Zeiger, *Bitki Fizyolojisi*, 2006
- Takahashi, H., and Jaffe, M.J. 1984. Thigmomorphogenesis: the relationship of mechanistic perturbation to elicitor-like activity and ethylene production. *Physiol. Plant.*, (61), 405-411.
- Takahashi, S. ve Yamasaki, H., 2002, Reversible Inhibition of Photophosphorylation in Chloroplasts by Nitric Oxide, *FEBS Letters*, (512), 145- 148.
- Taşgın E., Atıcı Ö., Nalbantoğlu B. Popova LP. 2006. Effects of salicylic acid and cold

- Tasgin, E., 2004. Düşük sıcaklık ve salisilik asidin kışlık buğday yapraklarındaki donma
- Tasgin, E., Atıcı Ö. and Nalbantoğlu B., 2003. Effects of salicylic acid and cold on freezing tolerance in winter wheat leaves. *Plant Growth Regulation*, (41), 231.
- Tatar, O and Gevrek M.N. 2008 Influence of water stress on proline accumulation, lipid peroxidation and water content of wheat. *Asian Journal of Plant Sciences*, 7(4), 409-412.
- Tewari, R., Kumar P., Tewari N., Srivastava S., Sharma P., 2004. Macronutrient deficiencies and differential antioxidant responses: influence on the activity and expression of superoxide dismutase in maize. *Plant Science*, (166), 687–694.
- Tiburcio, A.F., Besford, R.T., Copell, T., Borrell A., Testillano, P.S., Risueno, M.C., 1994. Mechanism of polyamine action during senescence responses induced by osmotic stress, *J. Exp. Bot.*, 45, 1789-1800.
- Tobola, P. and C. W. Musnicki, 1998. Effect of ethephon on growth, development and yielding of oilseed sunflower. *Progress in Plant Protection*, 38 (2), 655-658.
- toleransı, oksidatif enzim aktiviteleri ve apoplastik proteinler üzerine etkileri.
- Torrigiani, P., Altamura, M.M., Pasqua, G., Monacelli, B., Serafini- Fracassini, D. and Bagni, N., 1987. Free and conjugated polyamines during de novo floral and vegetative bud formation in thin cell-layers of tobacco, *Physiol. Plant.*, (70), 453-460
- treatments on protein levels and on the activities of antioxidant enzymes in the
- Tüzün, C., 1996. *Organik Kimya 7. Baskı*. Palme Yayın Dağıtım Palme Yayınları:116, 706s. Ankara.
- Ünyayar, S., (2002). Changes in Absciscic Acid and Indole-3-Acetic Acid Concentrations in *Funaria troglodytes* (Berk.) Bondartsev & Singer and *Phanerochaete chrysosporium* Burds. ME446 Subjected to Salt Stress”. *Turk J. Bot.*, (26), 1-4
- Van Rompuy, L.L.L. and Zeevaert, J.A.D., 1979. Are steroidal estrogens natural plant constituents? *Phytochemistry*, (18), 863-865.
- Vanacker, H., Carver T.L.W., Foyer C.H., 1998a. Pathogen-induced changes in the antioxidants status of the apoplast in barley leaves. *Plant Physiol.*, (117), 1103-1114.
- Vanacker, H., Harbinson J., Ruisch J., Carver T.L.W., Foyer, C.H., 1998. Antioxidant defences of the apoplast., *Protoplasma*, (205), 129-140.
- Velikova, V., Loreto F., 2005. On the relationship between isoprene emission and thermotolerance in *Phragmites australis* leaves exposed to high temperatures and during the recovery from a heat stress. *Plant, Cell and Environment*, (28), 318– 327.
- Velikova, V., Yordanov I., Edreva A., 2000. Oxidative stress and some antioxidant system in acid rain-treated bean plants protective role of exogenous polyamines. *Plant Sci.*, (151), 59-66.
- Verna J.Higgins, Jennifer Wang, (2006) Nitric oxide modulates H₂O₂-mediated defenses in the *Colletotrichum coccodes*-tomato interaction. *Physiological and Molecular Plant Pathology.*, (67), 131-137
- Vionella, A. ve Macri, F., 1991. Generation of Superoxide Anion and Hydrogen Peroxide at Surface of Plant, *Cell. J. Bioenerg. Biomemb.*, (23), 409-423.

- Wang, L.J., Huang W.D., Li J.Y., 2003. Effects of salicylic acid on the peroxidation of membrane-lipid of leaves in grape seedlings. *Scientia Agricultura Sinica* , 36(9),1076-1080.
- Weiguan Li, Wanping Zhang, Biao Jiang, Hui Song, Yongsong Yu, Jinfeng Chen, (2009), Polyamines enhance chilling tolerance of cucumber (*Cucumis sativus* L.) through modulating antioxidative system. *Scientia Horticulturae*. (122), 200-208.
- Wink, D.A., Hanbauer, I., Ishaq, M.C., De Graff, W., Gamson, J. and Mitchell J.B., 1993. Nitric Oxide Protects Against Cellular Damage and Cytotoxicity from Reactive Oxygen Species, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, (90), 9813-9817.
- Wojtaszek, P., 1997. Oxidation burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochemistry*, (322), 681-692.
- Wood, E. S. and Smith C. A., 1991, *Molecular and Cell Biochemistry*. Chapman & Hall, Hong Kong.
- Yağmur, Y., 2008. Farklı Asma (*Vitis vinifera* L.) Çesitlerinin Kuraklık Stresine Karşı Bazı Fizyolojik ve Biyokimyasal Tolerans Parametrelerinin Arastırılması. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. İzmir.
- Yamasaki, H., Shimoji, H., Ohshiro, Y. and Sakihama, Y., 2001. Inhibitory effects of nitric oxide on oxidative phosphorylation in plant mitochondria, *Nitric Oxide Biol. Chem.*, (5), 261-270.
- Yasar, F. Ellialtıoğlu, S. and Yildiz. K. 2008. Effect of salt stress on antioxidant defense systems, lipid peroxidation, and chlorophyll content in green bean. *Russian Journal of Plant Physiology*, 55(6), 782-786.
- Yee, Y., Tam N.F.Y., Wong Y.S. and Lu C.Y., 2002. Growth and physiological responses of two mangrove species (*Bruguira gymnorhiza* and *Kandeliacandel*) to waterlogging. *Environ. Exp. Bot.*, 1-13.
- Yılmaz, S. and Ozan T. S., 2003. Meme kanserli hastalarda lipid peroksidasyonu ve bazı enzim aktiviteleri arasındaki ilişki, *Türk Biyokimya Dergisi*, 28(4), 252-256.
- Yordanova, R.Y., Christov K.N. and Popova L.P., 2004. Antioxidative enzymes in barley plants subjected to soil flooding. *Environ. and Exp. Botany*, (51), 93-101.
- Yu L.J., Lan W.Z., Qin W.M., and Xu H.B., 2001. Effects of salicylic acid on fungal elicitor-induced membrane-lipid peroxidation and taxol production in cell suspension cultures of *Taxus chinensis*. *Process Biochemistry*, (37), 477-482.
- Zade, V. R., N. G. Zode, R. S. Dighe, M. N. Asalmol and S. D.Changade, 1994. Influence of ethrel in breaking seed dormancy in sunflower. *Annals of Plant Physiology.*, 8(2), 195-197.
- Zeevart, J.A.D. and Creelman, R.A., 1988, *Metabolism and Physiology Absisic acid*, *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, (39), 73-439
- Zhang, J.S., Yang, Z.H., Tsao, T.H., 1991. The occurrence of estrogens in relation to reproductive processes in flowering plants. *Sex Plant Reprod.*, 193-196.
- Zimmermann, H., Walzl, R., 2009. Ethylene. <http://media.wiley.com/productdata/excerpt/55/35273038/3527303855.pdf>. Erişim Tarihi: 02.06.2009

ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Erzurum’da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Erzurum’da tamamladı. 2003 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nden 2007 yılında mezun oldu. Aynı yıl Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü’nde yüksek lisans öğrenimine başladı. Şubat 2009’da Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü araştırma görevlisi kadrosuna atandı. Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nde halen araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır.