

**KİTOSANIN MISIRDA (*Zea mays* L.) METİLGLİOKSAL  
TOKSİSİTESİ ÜZERİNDE KORUYUCU  
ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

**Gamze KARACA**

**Yüksek Lisans Tezi  
Biyoloji Anabilim Dalı  
Botanik Bilim Dalı  
Prof. Dr. Ökkeş ATICI  
2020**

**Her hakkı saklıdır**

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**KİTOSANIN MISIRDA (*Zea mays* L.) METİLGLİOKSAL  
TOKSİSİTESİ ÜZERİNDE KORUYUCU ROLÜNÜN  
ARAŞTIRILMASI**

**Gamze KARACA**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
Botanik Bilim Dalı**

**ERZURUM  
2020**

**Her hakkı saklıdır**



T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

**KİTOSANIN MISIRDA (*Zea mays* L.) METİLGİOKSAL TOKSİSİTESİ  
ÜZERİNDE KORUYUCU ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

Prof. Dr. Ökkeş ATICI danışmanlığında **Gamze KARACA** tarafından hazırlanan bu çalışma, 21/01/2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı-Botanik Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oy birliği** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Ökkeş ATICI

İmza :

Üye : Prof. Dr. Rahmi DUMLUPINAR

İmza :

Üye : Doç. Dr. Nevzat ESİM

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu **07./02./2020** tarih ve **06./...66**..... nolu kararı ile onaylanmıştır.

**Prof. Dr. Mehmet KARAKAN**  
Enstitü Müdürü

**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

### KİTOSANIN MISIRDA (*Zea mays* L.) METİLGİOKSAL TOKSİSİTESİ ÜZERİNDE KORUYUCU ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

Gamze KARACA

Atatürk Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı  
Botanik Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ökkeş ATICI

Bu çalışmada, mısır (*Zea mays* L. cv. Arifiye) bitkilerinde ekzojen metilglioksal (MG) toksisitesinin yatıştırılmasında kitosan uygulamasının fizyolojik ve biyokimyasal etkileri araştırılmıştır. Çalışmada steril mısır tohumları, sıcaklık (24/20°C, gündüz/gece), ışık (450  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; 16 saat fotoperiyot) ve nem kontrolü (%65) olan bir iklim odasında hidroponik ortamda çimlendirildi. Gelişen fidelerin bazılarının yapraklarına 9. gün kitosan (%0.05 ve %0.1) ve bundan 1 gün sonra MG (50 ve 100 mM) uygulandı. MG uygulamasından 3 gün sonra (13. gün) fideler hasat edildi. Kontrol dahil fidelerin kök ve gövde (sürgün) kısımları fizyolojik ve biyokimyasal parametrelerin değerlendirilmesi için kullanıldı. Tek başına MG uygulamaları, fidelerde kök uzunluğu, kuru ağırlığı, fotosentetik pigment miktarı ve protein içeriğini düşürmüş, ancak kitosan+MG uygulamaları bu parametreleri artırmıştır. Yine MG uygulamaları, fidelerde içsel MG, iyon sızıntısı ve süperoksit anyon radikali ( $\text{O}_2^-$ ) ile hidrojen peroksit radikali ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) gibi reaktif oksijen türlerinin (ROS) miktarını artırırken, kitosan+MG uygulamaları düşürmüştür. Kitosan+MG uygulamaları lipid peroksidasyon seviyesi (MDA olarak) üzerinde anlamlı azalış yaparken, hücrelerde MG'yi süpüren glioksalaz-I ve glioksalaz-II enzim aktivitelerini tek başına MG uygulamasına göre artırmıştır. MG uygulamaları süperoksit dismutaz, katalaz, peroksidaz ve glutatyon redüktaz aktivitelerini genelde düşürürken, Kitosan+MG uygulamaları ile bu enzim aktiviteleri artmıştır. Bulgulara göre, mısır bitkisinde MG toksisitesi koşullarında kitosan uygulamasının, fotosentetik pigment ve protein içeriğini, glioksalaz sistem ve antioksidan enzim aktivitelerini artırarak, buna karşılık ROS, lipid peroksidasyon ve membran iyon sızıntısı seviyelerini düşürerek bir koruma sağlayabildiği ileri sürülmüştür.

2020, 90 sayfa

**Anahtar Kelimeler:** Metilglioksal, kitosan, mısır, antioksidan, glioksalaz, reaktif oksijen

## ABSTRACT

MS Thesis

### INVESTIGATING PROTECTIVE ROLE OF CHITOSAN ON METHYLGLYOXAL TOXICITY IN MAIZE (*Zea mays* L.)

Gamze KARACA

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

Supervisor: Prof. Dr. Ökkeş ATICI

In this work, the physiological and biochemical effects of chitosan application on the mitigation of exogenous methylglyoxal (MG) toxicity in maize (*Zea mays* L. cv. Arifiye) plants were investigated. In the study, sterilized maize seeds were germinated in a plant growth chamber with temperature (24/20°C, day/night), light (450  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; 16 h photoperiod) and humidity control (65%) in hydroponic conditions. On the 9th day, chitosan (0.05% and 0.1%) was applied to the leaves of the growing seedlings, followed by MG (50 and 100 mM) after 1 day. Then seedlings were harvested 3 days after the MG application (day 13). Root and stem parts of the seedlings, including the control, were used for the evaluation of physiological and biochemical parameters. The MG applications alone reduced root length, dry weight, photosynthetic pigment amount, and protein content in the seedlings, but the chitosan+MG applications increased these parameters. The MG applications increased the amount of endogenous MG, ion leakage and reactive oxygen species (ROS) such as  $\text{O}_2^{\cdot-}$  and  $\text{H}_2\text{O}_2$ , while the chitosan+MG applications decreased. The chitosan+MG applications decreased significantly the lipid peroxidation level (as MDA) but increased the activity of glyoxalase-I and glyoxalase-II enzymes, which scavenge MG in the cells, compared to MG applications alone. The MG applications generally decreased superoxide dismutase, catalase, peroxidase, and glutathione reductase activities while chitosan+MG applications increased these enzyme activities. According to the findings, it is suggested that the chitosan application in maize plants under MG toxicity conditions can provide protection by increasing photosynthetic pigment and protein content, and glyoxalase system and antioxidant enzyme activities, and in addition decreasing ROS, lipid peroxidation and membrane ion leakage levels.

**2020, 90 pages**

**Keywords:** Methylglyoxal, chitosan, maize, antioxidant, glyoxalase, reactive oxygen

## TEŞEKKÜR

Çalışmamız süresince bilgi ve tecrübelerini içtenlikle paylaşan, fikirleriyle ve önerileriyle rehberlik eden tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Ökkeş ATICI'ya teşekkürlerimi sunarım. Çalışmamalarımda desteğini esirgemeyen laboratuvar arkadaşlarım, Ayşe Gülden YÜKSEL, İhsan YİĞİT, Maşuka SAKLI, Elif GÜNEY, Ümran KARAYEL'e ayrı ayrı teşekkür ederim.

Maddi manevi yanımda olan Gözde YAMAN BÜLBÜL, Aycan BÜLBÜL, Neslihan KURAL, Servet ERDEM, Özlem GÜLMEZ, Deniz TIRYAKI'ye teşekkür ederim. Destek aldığım Ferhat Metehan AKPINAR, Kaan VARYER, Hülya TÜRK, Nisa Selin DOĞAN, ayrıca Saliha YÜKSEL ve Mehmet Azmi YÜKSEL çifti ile Nazlı AKPINAR, Sedat AKPINAR çiftine teşekkürü bir borç bilirim.

Beni benden daha çok düşünen maddi manevi her zaman yanımda olan yaşamı anlamlı kılan varlıklarına sonsuz şükür ettiğim üzerimde hakkı ve emeği büyük olan babam Kadir KARACA ve annem Dilber KARACA'ya minnettarım. Canım aile bireylerime teşekkür ederim.

**Gamze KARACA**

**Ocak, 2020**

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iv
ABSTRACT .....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xii
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. KAYNAK ÖZETLERİ .....</b>	<b>19</b>
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM.....</b>	<b>27</b>
3.1. Kullanılan Alet ve Cihazlar .....	27
3.2. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanmaları.....	27
3.3. Yöntemler .....	31
3.3.1. Bitki tohumlarının çimlenmesi ve fide büyümesi .....	31
3.3.2. Antiokasidan enzim aktivitelerinin belirlenmesi.....	32
3.3.2.a. Katalaz aktivitesinin belirlenmesi .....	33
3.3.2.b. Askorbat peroksidaz aktivitesinin belirlenmesi .....	34
3.3.2.c. Glutasyon redüktaz aktivitesinin belirlenmesi .....	34
3.3.2.d. Süperoksid dismutaz aktivitesinin belirlenmesi .....	35
3.3.2.e. Guaiakol peroksidaz aktivitesinin belirlenmesi.....	36
3.3.3. İçsel metilgliksal (MG) içeriğinin belirlenmesi .....	36
3.3.4. Gliksalaz I ve gliksalaz II enzim aktivitelerinin belirlenmesi .....	37
3.3.4.a. Gliksalaz I.....	37
3.3.4.b. Gliksalaz II .....	37
3.3.5. Lipid peroksidasyonu (MDA olarak) içeriğinin belirlenmesi .....	37
3.3.6. Hidrojen peroksit (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) miktarının belirlenmesi .....	38
3.3.7. Süperoksid anyonu miktarının belirlenmesi.....	39
3.3.8. Protein tayini .....	40
3.3.9. Klorofil içeriğinin belirlenmesi .....	40
3.3.10. İstatistik analiz.....	41

<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI .....</b>	<b>42</b>
4.1. Kök ve Gövde Uzunluklarına Ait Bulgular.....	43
4.2. Yaş ve Kuru Ağırlıklarına Ait Bulgular .....	44
4.3. Hücre Zarındaki Elektrolit Sızıntısına Ait Bulgular (Canlılık Testi).....	45
4.4. Çözünebilir Protein Miktarına Ait Bulgular.....	47
4.6. İçsel MG Miktarına Ait Bulgular .....	49
4.7. Gly I Enzim Aktivitesine Ait Bulgular.....	51
4.8. Gly II Enzim Aktivitesine Ait Bulgular .....	52
4.9. LPO (MDA olarak) İçeriğine Ait Bulgular .....	53
4.10. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> İçeriğine Ait Bulgular .....	55
4.11. Süperoksit Anyonu (O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) İçeriğine Ait Bulgular .....	56
4.12. SOD Enzim Aktivitesine Ait Bulgular .....	57
4.13. CAT Enzim Aktivitesine Ait Bulgular .....	59
4.14. APX Enzim Aktivitesine Ait Bulgular .....	61
4.15. GPX Enzim Aktivitesine Ait Bulgular .....	62
4.16. GR Enzim Aktivitesine Ait Bulgular .....	64
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....</b>	<b>66</b>
KAYNAKÇA.....	80
ÖZGEÇMİŞ .....	90

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

·OH	: Hidroksil radikali
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	: Singlet oksijen
AGE	: Glikasyon Son Ürünleri
APX	: Askorbat peroksidaz
CAT	: Katalaz
DHAP	: Dihidroksiaseton fosfat
DHAR	: Dehidroaskorbat redüktaz
E.C	: Enzim kod numarası
EDTA	: Etilendiamin tetra asetik asit
ETS	: Elektron taşıma zinciri
EU	: Enzim ünitesi
Fd	: Ferredoksin
GAP	: Gliseraldehid-3-fosfat
Gly I	: Glioksalaz I (Lactoylglutathionelyase)
Gly II	: Glioksalaz II (Hidroksiasilglutathionehydrorolase)
GPX	: Guaikol Peroksidaz
GR	: Glutasyon redüktaz
GSH	: Glutasyon (indirgen)
GSSG	: Glutasyon Disülfit (okside)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	: Hidrojen peroksit
Kitosan	: C
MDHAR	: Monodehidroaskorbat redüktaz
MG	: Metilglioksal
mM	: Milimolar
NAD	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NADP(H)	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NBT	: Nitroblue tetrazolium klorür
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	: Süperoksit anyonu
RCS	: Reaktif Karbonil Bileşikler

ROOH	: Organik hidroperoksitler
ROS	: Reaktif oksijen türleri
RuBP	: Ribuloz-1,5-bifosfat
SOD	: Süperoksit Dismutaz
$\mu\text{L}$	: Mikrolitre
$\mu\text{M}$	: Mikromolar



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Canlı organizmalarda en yaygın RCS'ler.....	8
Şekil 1.2. Canlılarda MG sentezi yolları.....	10
Şekil 1.3. Glioksalaz yolu reaksiyonları ile MG detoksifikasyonu .....	11
Şekil 1.4. Kitinin deasetilasyonu ve kitosanın oluşumu .....	14
Şekil 3.1. CAT aktivitesi ölçümü için kullanılan standart grafik .....	34
Şekil 3.2. İçsel MG içeriği için kullanılan standart grafik.....	36
Şekil 3.3. Hidrojen peroksit (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) miktarını belirlemede kullanılan standart grafik ...	39
Şekil 3.4. Süperoksit anyon (O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) içeriğini belirlemede kullanılan standart grafik .....	39
Şekil 3.5. Çözünebilir protein miktarı tayini için kullanılan standart grafik .....	40
Şekil 4.1. MG uygulanmış fidelerin yaprak görünüşleri.....	42
Şekil 4.2. Bitki boy uzunluklarının şekil üzerinde gösterilmesi .....	43
Şekil 4.3. MG ve kitosan uygulanmış bitkilerin genel görünümü .....	46
Şekil 4.4. Hücre zarındaki elektrolit sızıntısı verilerinin şekil üzerinde gösterilmesi ....	46
Şekil 4.5. Protein miktarına ait bulguların şekil üzerinde ifadesi .....	48
Şekil 4.6. İçsel MG kök verilerinin şekil üzerinde gösterilmesi.....	50
Şekil 4.7. Gly I enzim aktivitesine ait bulguların şekil üzerinde gösterimi.....	51
Şekil 4.8. Gly II enzim aktivitesine ait bulguların şekil üzerinde ifadesi .....	53
Şekil 4.9. LPO (MDA olarak) içeriğine ait bulguların şekil üzerinde sunumu .....	54
Şekil 4.10. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> içeriğine ait bulguların şekille ifade edilmesi .....	55
Şekil 4.11. Süperoksit anyonu (O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) içeriğine ait bulguların şekille ifadesi .....	57
Şekil 4.12. SOD enzim aktivitesine ait bulguların şekille ifadesi .....	58
Şekil 4.13. Kök ve gövdede CAT enzim aktivitesine ait bulgularının şekille ifadesi ....	60
Şekil 4.14. Kök ve gövdede APX enzim aktivitesine ait bulguların şekil üzerinde sunumu .....	61
Şekil 4.15. GPX enzim aktivitesine ait bulguların şekil üzerinde sunulması .....	63
Şekil 4.16. GR enzim aktivitesine ait bulguların şekille ifadesi .....	64

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Kitin ve kitosanın kullanım alanları .....	16
Çizelge 4.1. Kök ve gövde uzunluklarına ait bulgular.....	44
Çizelge 4.2. Bitki kuru ve yaş ağırlıklarına ait bulgular .....	45
Çizelge 4.3. Hücre zarındaki elektrolit sızıntısı (canlılık testi) .....	47
Çizelge 4.4. Kök ve gövdede protein miktarına ait bulgular .....	48
Çizelge 4.5. Toplam pigment miktarına ait bulgular .....	49
Çizelge 4.6. İşsel MG ( $\mu\text{M}$ ) miktarına ait bulgular .....	50
Çizelge 4.7. Gly I enzim aktivitesine ait bulgular .....	52
Çizelge 4.8. Gly II enzim aktivitesine ait bulgular .....	53
Çizelge 4.9. Kök ve gövde LPO (MDA olarak) içeriğine ait bulgular .....	54
Çizelge 4.10. Kök ve gövdede $\text{H}_2\text{O}_2$ içeriğine ait bulgular .....	56
Çizelge 4.11. Kök ve gövdede süperoksit anyonu ( $\text{O}_2^-$ ) içeriğine ait bulgular .....	57
Çizelge 4.12. Kök ve gövdede SOD enzim aktivitesine ait bulgular .....	59
Çizelge 4.13. Kök ve gövdede CAT enzim aktivitesine ait bulgular .....	60
Çizelge 4.14. Kök ve gövdede APX enzim aktivitesine ait bulgular .....	62
Çizelge 4.15. Kök ve gövdede GPX enzim aktivitesine ait bulgular .....	63
Çizelge 4.16. Kök ve gövdede GR enzim aktivitesine ait bulgular .....	65

## 1. GİRİŞ

Ekosistemde bitkilerin en önemli rolü birincil üretici basamağında yer alıp canlı hayatının sürdürülebilirliği için olmazsa olmazların başında gelmesidir. Işık vasıtasıyla inorganik maddeden organik madde sentezi gerçekleştirirken hem kendi besinini hem de diğer canlıların besin ihtiyacını karşılayıp, aynı zamanda havadaki karbondioksit ve oksijen dengesinin ayarlanmasında önemleri oldukça büyüktür (Mahajan and Tuteja 2005). Bu nedenle canlı yaşamın sürdürülebilirliği için inanılmaz özelliklere sahip olan bitkilerin yaşamlarını sağlıklı olarak sürdürmeleri gerekmektedir. Ancak günümüzde gittikçe artan olumsuz çevresel etmenler bitkilerin yaşam döngülerini ciddi bir şekilde sınırlamaktadır. Bu da bitkilerin büyüme, gelişme ve verimliliğinde mutlak bir düşüşe neden olmaktadır (Gallego *et al.* 1996). Bitkiler de diğer canlılar gibi buldukları çevreyle devamlı etkileşim içerisinde. Çevre koşulları kötüleşince bulunduğu ortama adaptasyonu azalarak strese maruz kalmaktadır. Stres, bitkilerde büyüme, gelişmeyi, biyokimyasal ve fizyolojik olayları, potansiyel verimliliği olumsuz etkilemektedir (Bray *et al.* 2000). Bitkilerde strese sebep olan faktörler, Levitt (1980) tarafından fizikokimyasal faktörler (abiyotik) ve biyotik faktörler olarak iki gruba ayırmıştır. Bitkinin stresten etkilenmesi de stresin süresine, şiddetine, bitkinin adaptasyon yeteneğine, dokunun çeşidine, gelişim dönemine ve strese verdiği cevap mekanizmalarının başarısına göre değişebilmektedir (Atkinson and Urwin 2012). Abiyotik stres etkenleri ve bitkiler arasındaki etkileşim karmaşıktır; sonuçta, bazı bitkilerin çevresel olarak indüklenen stres altında büyümesini ve gelişmesini sağlayan, çeşitli derecelerde adaptasyona yol açabilecek çok sayıda morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler değişiklikler meydana gelir. İlgili metabolik yolların sayısı ve düzenlemelerinin uygunluğu nedeniyle, araştırmacıları bitkilerin abiyotik stres tepkilerini stresin şiddetine, özelliğine göre değerlendirmektedir (Sharma *et al.* 2013). Abiyotik etmenlerden veya biyotik etmenlerden dolayı stres altında kalan bitkiler, iç dengelerini korumak ve strese dayanmak adına metabolik reaksiyonlarını kontrol eden cevap mekanizmaları bulundurlar. Stres esnasında bitkilerde bozulan homeostasi ve metabolik yollarda düzensizlikler, hücrede aşırı miktarda oksidatif hasara neden olan bazı reaktif (veya serbest radikal) bileşiklerin

seviyelerinde artış meydana getirir. Bunlardan en önemlileri ve Reaktif Oksijen Türleri (ROS) Reaktif Karbonil Türleridir (RCS) (Apel and Hirt 2004).

Moleküler oksijen ( $O_2$ ), atmosferimize yaklaşık 2.7 milyar yıl önce  $O_2$  üreten fotosentetik organizmalar tarafından salınmaya ve bunun bir sonucu olarak ROS canlılarda aerobik metabolizmanın kaçınılmaz bir yan ürünü olarak ortaya çıkmaya başlamıştır (Halliwell 2006). ROS yüksek oranda reaktiftir ve kloroplastlar, mitokondri ve peroksizomlar gibi bitkilerin farklı hücresel bölümlerinde yüksek oranda üretilir. Bitki hücreleri, farklı metabolik yollarda üretilen ROS olarak adlandırılan oksijenin yüksek enerji potansiyelli bileşiklerinin tahrip edici etkisiyle sürekli karşılaşır (Navrot *et al.* 2007). Normal çevre koşulları altında ROS molekülleri, bir dizi antioksidan mekanizma tarafından sürekli olarak temizlenirken herhangi bir hasara neden olma yeteneğine sahip değildir (Foyer and Noctor 2005). Ancak, ROS üretimi ile antioksidanlar tarafından atılmaları arasındaki hassas denge, tuzluluk, su kıtlığı, UV radyasyonu, ağır metaller, aşırı sıcaklık, besin eksikliği, pestisitler ve patojenlerin enfeksiyonu gibi farklı biyotik ve abiyotik stres faktörleri tarafından bozulmaktadır. Bu olumsuz durumlar, hücresel komponentlerde ciddi hasara neden olabilecek ROS üretiminin artmasına neden olur. Bitki hücreleri tarafından  $O_2$  tüketiminin yaklaşık %2-3'nün hücrelerde ROS oluşumuna yol açtığı bildirilmiştir. ROS'lar kararsız yapıda olup, elektron alış-verişine kolay girebilen, yarı ömürlü bir ya da birden çok yörüngede eşleşmemiş elektron bulunduran moleküllerdir (Scandalios 2001). ROS'lar çoğu bitki metabolizmasında özellikle fotosentez olayları esnasında (kloroplastta), sitrik asit döngüsünde (mitokondride), diğer plastid ve peroksizomlarda meydana gelen serbest radikallerdir. Başlıca ROS çeşitleri, hücrelerdeki etki mekanizmaları ve detoksifikasyon sistemleri aşağıda sunulmuştur.

ROS hem serbest radikal ( $O_2^{\cdot-}$ , süperoksit radikal;  $OH^{\cdot}$ , hidroksil radikal;  $HO_2^{\cdot}$ , perhidroksil radikal;  $RO^{\cdot}$ , alkoksi radikalleri) ve radikal olmayan (moleküler) oksijen formlarını ( $H_2O_2$ , hidrojen peroksit ve  $^1O_2$ , singlet oksijeni) içerir. Bu reaktif ara ürünler çok toksiktir ve protein, DNA ve lipidler gibi biyomoleküllerde büyük hasara neden olur ve sonunda hücre ölümüne yol açar (Apel and Hirt 2004; Foyer and Noctor 2005). Stresli ortamlarda, artan ROS seviyeleri, bitkinin süperoksit dismutaz (SOD), askorbat

peroksidaz (APX), Glutasyon-S-transferaz (GST) ve katalaz (CAT) ve enzimatik olmayan metabolitler olarak askorbik asit (AA) a-tokoferol, karotenoidler, fenolikler, prolin ve flavonoidler. Hücresel bölümlerin çoğunda antioksidan bileşiklerin varlığı, ROS detoksifikasyonunun önemini ortaya koymaktadır (Khan and Khan 2017).

Singlet oksijen ( $^1O_2$ ): Oksijenin fazla enerjili olması durumudur. Fotosentetik Elektron Taşıma Sistemi (ETS)'de rol alan oksijen molekülündeki elektron kendi yörüngesinin ters bir yönde, başka bir yörüngeye yer değiştirmesiyle gerçekleşir.  $^1O_2$  radikali aynı zamanda nitrik oksitle (NO) ve  $H_2O_2$ 'nin hipoklorit ( $ClO^-$ ) ile tepkimesi sonucunda da oluşabilir. Birden fazla biyolojik bileşiğin yapısına benzemesinden dolayı reaksiyona girebilme kolaylığına sahiptir. Singlet oksijen tepkimelere karbon–karbon çift bağlarıyla katılır. Triptofan, sistein, histidin, metionin gibi amino asitler yapılarında çift bağdan dolayı fazla elektron bulundurma ya da kükürt kısımları nedeniyle singlet oksijen ile oksidasyona uğraması kaçınılmaz bir sonudur (Büyük vd 2012; Khan and Khan 2017).

Süperoksit radikali ( $O_2^{\cdot-}$ ): Kararsız bir yapıya sahip olan süperoksit radikali hemen hemen tüm aerobik organizmalarda bulunan moleküller oksijenin bir elektron transferi sonrası indirgenmesiyle oluşur. İndirgenmiş olan geçiş metallerinin otooksidasyonu sağlaması ve hidrojen peroksidin kaynağı olması bakımından önemlidir. Moleküller oksijen ferrodoksin (Fd) sayesinde indirgenerek süperoksit radikalini oluşturur. Süperoksit radikali hem indirgeyici hem oksitleyici özelliğe sahiptir. Aldığı elektronu hücresel koşullarda ferrisitokrom-c'ye veya başka bir radikale vererek yeniden oksijen molekülüne oksitlenir. Oksijenden oldukça fazla oksitleyici potansiyeli olan süperoksit radikali bir tane elektron alarak peroksid anyonuna indirgenir. Düşük pH'da daha reaktif olan süperoksit radikali önce oksidan perhidroksi radikalini oluşturmak için protonlanır, daha sonra perhidroksi radikali ile tepkimeye girince biri indirgenir biri de okside olur. Dismutasyon reaksiyonlarıyla kendiliğinden gerçekleştiği gibi süperoksit radikali hidrojen peroksitte katalitik aktivesi yüksek olan SOD (süperoksit dismutaz) enzimi tarafında da katalizlenir. SOD enzimi süperoksit radikalinin hücrelerde birikmesine izin vermeyecek derecede yüksek katalitik etkiye sahiptir. Fakat hücre yoğun strese uğrayacak bir durum olunca süperoksit yapımı çoğalarak kendine has tepkimelere girmeye

başlayacaktır. Böylece protein salınımına sebep olacak metal iyonlarını indirgenmesine sebep olur. Kofaktörlerin oksidasyon düzeylerini tahrip eder (Büyük vd 2012).

Hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ): Süperoksitin dismutasyon tepkimesiyle iki tane süperoksit molekülü iki tane proton alarak hidrojen peroksit ve oksijen molekülünü oluşturur. Dismutasyon reaksiyonları (enzimatik olmayan reaksiyonlar); tepkime sonucunda radikal olmayan ürünlerin oluşmasıdır. Süperoksitin enzimatik reaksiyonlarına göre düşük pH'lar da daha hızlıdır. Süperoksitlerin enzimatik olarak katalitik etkisi oldukça fazla olan SOD enzimi hidrojen peroksit oluşumunu katalizler. Serbest bir radikal olmamasına rağmen ROS'lar arasında oldukça büyük öneme sahiptir. Hidrojen peroksit oksitleyici özelliğini bakır, demir gibi metal iyonları kullanarak  $OH^*$  radikalinin öncüsü gibi davranır. Hidrojen peroksit proteinlerdeki HEM grubunda yer alan  $Fe^{+2}$  iyonu ile reaksiyona girip yüksek oksidasyona sahip reaktif demir iyonları oluşturur. Bu iyonlar oldukça güçlü oksitleyici nitelikte olup hücre zarında bazı radikal tepkimelerin başlamasını sağlayabilirler (örneğin lipid peroksidasyonlar gibi) (Büyük vd 2012; Khan and Khan 2017).

Hidroksil radikali ( $OH^*$ ): Aile üyeleri arasında en reaktif ve en ölümcül ROS'dur. Ancak yarılama ömrü çok kısadır. Haber-Weiss (  $Cu^+$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$ ,  $Fe^{+3}$  ) veya Fenton ( $Fe^{+2}$  ve diğer geçiş metalleri (Co, Mo, Cu, Mn, Zn, Ni, Cr) ile reaksiyon sonucunda hidrojen peroksitler oluşmaktadır. Bulunduğu yerde yağ asitlerine veya tiyoller gibi bir takım molekülden birer proton kopararak çeşitli radikaller oluşumunu sağlar. Böylelikle hücre hasarlarına sebep olur (Büyük vd 2012). Özellikle DNA, protein ve lipidler gibi biyomoleküllerle reaksiyon verme ve zarar verme potansiyeline sahiptir. Bu son derece toksik ROS'un atılması için herhangi bir enzimatik sistemin bulunmadığından, artan birikimi hücre ölümüne yol açmaktadır (Khan and Khan 2017).

Düşük seviyelerdeki ROS'lar hücre içerisinde savunma mekanizması olan antioksidan sistemini harekete geçiren sinyal moleküller olarak görev alabilmektedirler (Siddiqui *et al.* 2010). Bitki hücreleri, ROS miktarını kontrol altına almak ve toksisitesinden korunmak için bazı antiokasidan bileşikler üretirler. Bu antioksidan moleküller enzimatik

ve enzimatik olmayan (askorbat ve glutatyon gibi) olarak iki grupta incelenmektedir. Enzimatik antioksidan moleküller ROS'ları sıralı bir şekilde toksisitesini azaltarak bitkiyi stresten korumaktadır (Vaahtera *et al.* 2014; Considine *et al.* 2015; Mignolet-Spruyt *et al.* 2016). Bu enzimlerin en önemliler aşağıda sunulmuştur.

Süperoksit dismutaz (SOD; EC.1.15.1.1), metaloenzim (metaloprotein) ailesine aittir ve evrensel olarak tüm aerobik organizmalarda bulunur. Stres koşulları altında SOD, ROS kaynaklı hasarlara karşı birincil savunma hattını oluşturan hayati bir rol oynar. SOD,  $O_2^-$ 'nin  $O_2$  ve  $H_2O_2$ 'ye ayrıştırılması yoluyla ortadan kaldırılmasını katalize eder, böylece metal katalizli Haber-Weiss reaksiyonu ile  $OH^-$  oluşumu tehlikesini azaltılır. SOD, aktif oksijen üreten ve ROS kaynaklı oksidatif strese karşı hassas olan subselular kompartmanların çoğunda bulunur. İçerdikleri metal kofaktörlerin varlığına dayanarak, SOD'lar üç izozime ayrılır. Bunlar Mn-SOD (mitokondri ve peroksizomlarda lokalize), Fe-SOD (daha çok kloroplastlarda) ve Cu/Zn-SOD (sitozolde, peroksizomlarda ve kloroplastlarda lokalize) olarak ayrılır. SOD'un üç izoformunun tümünü kodlayan genler, bitki hücrelerinin çekirdeğinde bulunur ve çekirdekte oluşturulduktan sonra tüm bu izoformlar, bir amino-terminal hedefleme sekansı ile ilgili alt hücre bölümlerine taşınır (Sairam Srivastava 2000; Khan and Khan 2017). Çeşitli stres türleri koşullarında SOD'ların artması, bitkinin yaşaması için oksidatif stresin yatıştırılmasında önemli rol oynar. SOD aktivitesindeki bir artış  $H_2O_2$  üretiminin artması anlamına da gelebilir. SOD aktivitesinin, tuz, kuraklık, pestisit ve metal stresi gibi çeşitli çevresel streslere maruz kalan bitkilerde arttığı bildirilmiştir. SOD'un artan aktivitesi genellikle bitkinin çeşitli çevresel streslere karşı artan toleransına bağlanır. Örneğin SOD'ları aşırı ifade eden transgenik bitkilerin, çeşitli abiyotik streslere karşı toleranslı olduğu gösterilmiştir (Khan and Khan 2017).

Askorbat peroksidaz (APX; EC.1.1.11.1), askorbat-glutatyon (ASA-GSH) döngüsünün önemli bir bileşenidir ve sitozol ile kloroplastta üretilen  $H_2O_2$  suya dönüşümünü sağlayan enzimdir (Noctor and Foyer 1998). Bu reaksiyon sonucunda askorbat iki molekül monodehidroaskorbata (MDHA) dönüşür. MDHA da monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR) tarafından tekrar askorbata dönüştürülür (Kumar *et al.* 2011). Bitki

hücrelerinde APX tilakoid zarda, mitokondride, sitoplazmada, stomamda ve apoplastta bulunmaktadır (Yamaguchi 1995; Noctor and Foyer 1998). Askorbata olmadığı durumlarda APX oldukça kararsızdır (Miyake and Asada 1996). Askorbat peroksidazlar yaygın şekilde çalışılan guaiakol peroksidazlara benzemesine rağmen H<sup>+</sup> vericisi olarak askorbata olan yüksek afinitelerinden dolayı aralarında farklılık vardır (Nakano and Asada 1987;). APX, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> için CAT ile karşılaştırıldığında daha yüksek bir afiniteye sahiptir; bu nedenle, stresli koşullarda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'yi elimine etmede daha etkilidir. APX'in kuraklık, tuzluluk, düşük sıcaklık, metal toksisitesi, yüksek pestisit oranları ve UV ışınımı gibi çeşitli abiyotik streslere cevap olarak artan aktivitesi birçok çalışan tarafından bildirilmiştir (Noctor and Foyer 1998; Khan and Khan 2017)

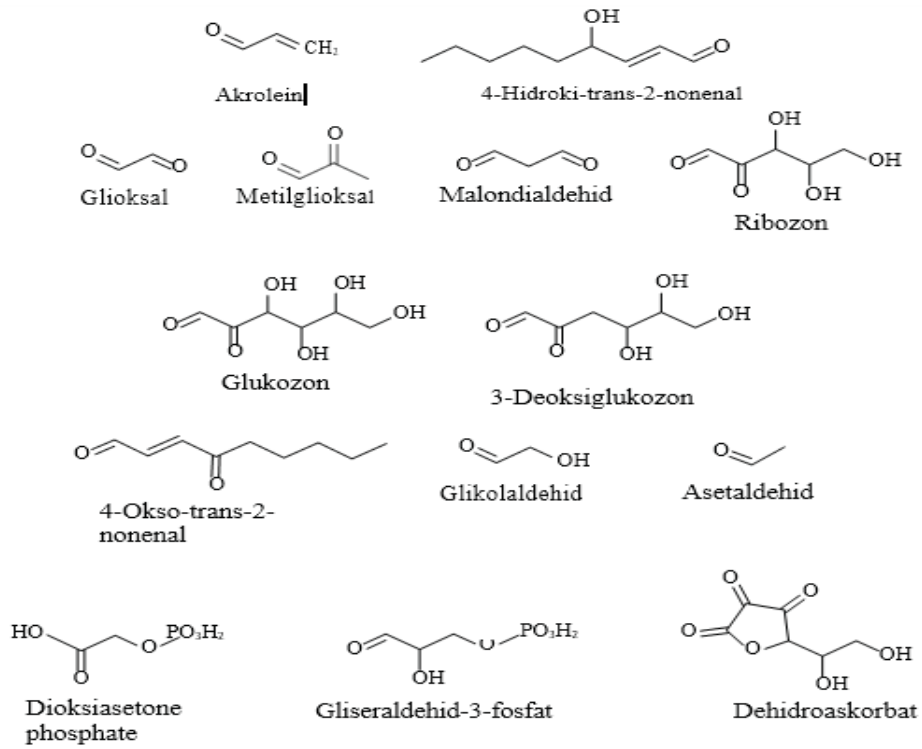
Katalaz (CAT; EC.1.11.1.6), antioksidan enzimler arasında keşif ve karakterize edilme bakımında ilk enzimdir. Bitkilerde, omurgasız ve omurgalı hayvanlarda, mantar ve aerobik mikroorganizmalarda bulunan hidrojen peroksidi H<sub>2</sub>O ve O<sub>2</sub>'ye dönüştüren önemli bir enzimdir (Bergmeyer and Grabl 1983). CAT, aktif bölgesinde Fe<sup>+3</sup> atomuyla birlikte hem grubu ihtiva eden, yüksek molekül ağırlığına sahiptir (Patykowski and Urbanek 2003). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> için yüksek bir afiniteye sahiptir, ancak organik peroksitlere (R-O-O-R) daha az özgülüğü vardır. Çok yüksek bir turnover oranına sahiptir ve hücrel bir indirgeme eşdeğeri (kofaktör) olmadan çalışabildiği için antioksidan enzimler arasında istisnai bir yeri vardır. Peroksizomlar, yağ asitlerinin β-oksidasyonu, fotorespirasyon ve pürin bazlarının katabolizması nedeniyle H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oluşumunun ana bölgeleridir. Bununla birlikte, CAT'in aynı zamanda sitosol, kloroplast ve mitokondri gibi diğer hücre altı organellerinde de mevcut olduğu bildirilmektedir, ancak bu bölümlerdeki CAT aktivitesi bugüne kadar bildirilmemiştir. Angiospermler, çeşitli CAT enzim izoformlarına sahiptir. Örneğin, *Zea mays*'ta bu enzimin üç izoformunu kodlayan üç gen bulunur. Peroksizomlarda ve sitozolde bulunan CAT-I polenlerde ve tohumlarda da ifade edilir; CAT-II ayrıca sitozol ve peroksizomlarda lokalizedir ve çoğunlukla yapraklar gibi fotosentetik dokularda, aynı zamanda kök ve tohum gibi dokularda eksprese edilir ve mitokondride lokalize olan CAT-III, tohumlarda ve fidelerde yüksek oranda eksprese edilir (Scandalios 1993; Chaudiere and Ferrari 1999; Khan and Khan 2017).

Guaiakol peroksidaz (GPX; EC.1.11.1.7), stres koşullarının yanı sıra normalde fazla miktarda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'yi temizleyen *HEM* içeren bir enzimdir (Foyer and Noctor 2005). Lignin sentezinde yardımcı olur ve ayrıca indoleasetik asidi (IAA) parçalayarak ve bu proste H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tüketerek bitkileri biyotik strese karşı korur. GPX, indirgen ajan olarak guaiakol ve pyrogallol gibi aromatik bileşikler kullanır. GPX, sitosol ve vakuollerde ve ayrıca hücre duvarlarında aktif rol oynadığından, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin giderilmesinde önemli bir enzim olarak kabul edilir (Khan and Khan 2017).

Glutasyon redüktaz (GR; EC.1.6.4.2), GSSG'yi GSH'ye düşürmek için elektron verici olarak NADPH'yi kullanan bir flavoprotein oksidoredüktazdır. Hücrel ortamda miktarı azalan glutasyon (GSH) daha sonra ASA'yı MDHA ve DHA'dan yenilemek için kullanılır ve onun oksitlenmiş formuna (GSSG) geri dönüşür. Genellikle, GR, yaprak dokularındaki kloroplastlarda bulunur. Bununla birlikte, az miktarda sitozol, mitokondri, glisoksisomlar ve peroksizomlarda da bulunur. APX gibi, GR, askorbat-glutasyon döngüsünde, glutasyonun verimli bir şekilde geri dönüşümünün GR tarafından temin edildiği ve yüksek indirgenmiş (GSH)/oksitlenmiş (GSSH) bir glutasyonu koruyarak oksidatif stres sırasında kloroplastların korunmasında kilit bir rol oynadığı ana enzimlerden biridir (Hossain *et al.* 2011).

Bitki strese maruz kaldığında, ROS gibi RCS'ler de hücrelerde birikir. RCS, çeşitli organizma gruplarında, bakterilerden insana hemen bütün canlı gruplarında sürekli olarak üretilen ve esas olarak zarar verici etkileri ile bilinen bir veya daha fazla karbonil grubuna sahip çok sayıda biyolojik bileşiklerdir. İçsel RCS konsantrasyonu belirli bir aralıkta tutulmalıdır ve homeostazi teorisine göre hücrede diğer parametrelere benzer şekilde dalgalanma gösterebilir. Bununla birlikte, RCS seviyesi, RCS üretiminde ve/veya eliminasyonunda meydana gelen değişikliklerden dolayı seviyesi artabilir. Kararlı durumdaki reaktif karbonillerin seviyesindeki bir artış, karbonil stres denilen olgunun ve konsantrasyonlardaki varlığı gen ekspresyon düzenlenmesinde ve hücrel sinyal iletiminin önemli bir parçası olarak değerlendirilmektedir. Bu nedenle, diğer reaktif türler gibi, RCS de *in vivo* olarak etkileri doza ve zamana bağlı gibi görünen ikili bir rol oynar. Reaktif karboniller, biyolojik yaşam boyunca yaygın olarak bulunan bileşiklerdir ve

endojen veya eksojen olarak türetilirler. Biyolojik örneklerde 20'den fazla RCS tanımlanmıştır. Şekil 1.1, canlı organizmalarda tespit edilen en yaygın doymuş ve doymamış RCS'yi göstermektedir (Semchyshyn 2014). Bazı reaktif karboniller (örneğin, akrolein, krotonaldehit, glisokal, aseton ve formaldehit), hücreye kolayca ortamdan girebilen her yerde bulunan endüstriyel kirleticilerdir. Diğer eksojen RCS kaynakları organik farmasötik kimya, sigara dumanı, gıda katkı maddeleri ve kızarmış gıda ürünleridir.

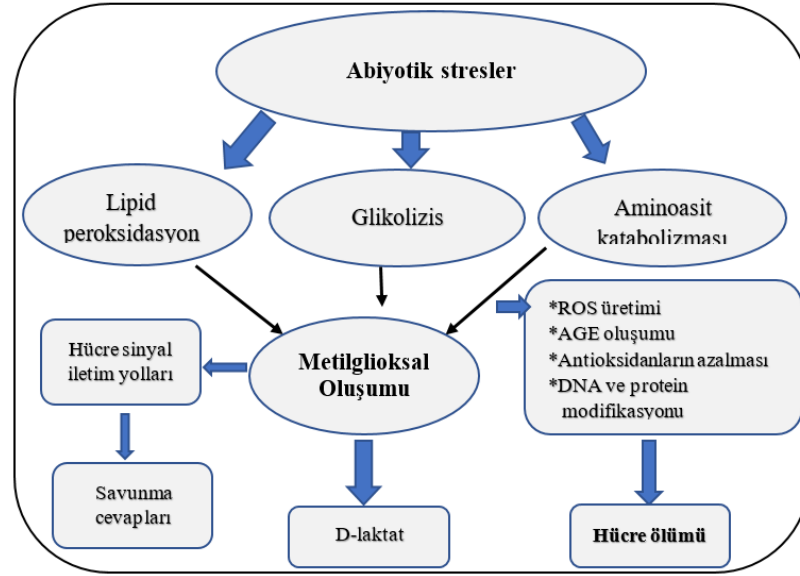


**Şekil 1.1.** Canlı organizmalarda en yaygın RCS'ler (Semchyshyn 2014)

Lipid peroksidasyonunun (LPO) önemli bir özelliği, membranların kolesterol esterlerinde, fosfolipidlerde ve trigliseridlerde çoklu doymamış yağ asidi kalıntılarının serbest radikal zincir parçalanmasına ve bunun da malondialdehit (MDA), metilgliksal (MG) ve 4-hidroksi-2-nonenal gibi geniş bir RCS çeşidinin üretilmesine neden olmasıdır. Treonin ve glisin gibi amino asitler ise oksidatif modifikasyon sırasında RCS'e (örneğin, MG) veya bunların öncüllerine (örneğin aminoaseton ve süksinil asetat) dönüştürülebilir (Semchyshyn 2014). Genel olarak, RCS'nin biyolojik etkileri ROS'unkine biraz benzer,

bu nedenle her iki reaktif grubun fizikokimyasal özelliklerinin de benzer olması beklenebilir. Ancak, RCS, ROS'un aksine nispeten uzun bir yarı ömür ve daha yüksek stabiliteye sahiptir. Örneğin, reaktif karbonillerin dakikalardan saatlere kadar ortalama bir yarı ömrü varken, bazı ROS'ların yarı ömrü  $10^{-9}$  ile  $10^6$  saniye arasında değişmektedir.  $H_2O_2$  ve  $HO_2\cdot$  gibi yüklenmemiş ROS'ların biyolojik zarları geçip hücre içi ortamda nispeten uzun mesafeler boyunca yayılabildiği iyi bilinmektedir. Yüklenmemiş RCS'nin yüksek kararlılığı ise onların hücreden kaçmalarına ve üretildikleri alanlardan daha uzak hedeflerle etkileşime girmelerine neden olur (Semchyshyn 2014).

MG, bitki hücrelerinde RCS'ler arasında en önemlilerinden birisidir. RCS'lerin bitkilerde biyosentezi, biyokimyasal, moleküler ve fizyolojik etkileri üzerinde çok sayıda araştırma yapılmış olmasına rağmen, MG toksisitesine karşı fizyolojik ve moleküler cevaplar hakkındaki bilgimiz oldukça sınırlıdır (Kumar and Yadav 2009; Hossain *et al.* 2011). MG, hem prokaryot hem ökaryot organizmalarda bulunan üç karbonlu bir metabolit olup (Şekil 1.1), hücrelerde çeşitli metabolik reaksiyonlar (glikoliz, lipid peroksidasyonu, protein yıkımı ve fotosentez vb. gibi) sonucu yan ürün olarak üretilen güçlü bir sitotoksindir (Muskan Jain *et al.* 2018). MG, keton ve aldehit grubu içeren oldukça reaktif bir  $\alpha$ - $\beta$  dikarbonil bileşiktir. Yapısında aldehit grubu keton grubundan daha aktiftir. Kimyasal olarak MG sarı renkli olup keskin bir kokuya sahiptir. MG, hayvanlarda karbohidratların metabolik ara ürünlerinden, protein ve lipid metabolizmasından endojen oluşumunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Kumar and Yadav 2009; Hossain *et al.* 2011). Fakat bitki sistemlerinde MG'nin endojen üretimi ile ilgili çok az çalışma yapılmıştır. MG bitkilerde enzimatik ve enzimatik olmayan yollarla üretilmektedir. MG bitkilerde, glikolizden ve fotosentez ara bileşiklerinden, gliseraldehit-3-fosfat (GA3P) ve dihidroksiaseton fosfattan (DHAP) fizyolojik koşullar altında enzimatik olmayan mekanizmalarla kendiliğinden oluşabilir (Espantero *et al.* 1995; Yadav *et al.* 2005). Bu üretimin en büyük kısmı glikoliz yoluyla gerçekleşir. Bu aşama sonucunda oluşan GAP ve DHAP trifosfat izomeraz (TPI) enzimi ile hidroliz ederek yapısındaki fosfatları uzaklaştırarak MG üretimini sağlar (Yadav *et al.* 2005). Bu nedenle, kendiliğinden MG üretimi, stres sırasındaki glikoliz yolunun kaçınılmaz bir sonucudur (Pompliano *et al.* 1990). Ayrıca protein ve lipid metabolizması sonucunda da MG oluşabilir (Hossain *et al.* 2011). Şekil 1.2'de MG üretimi şematize edilmiştir.



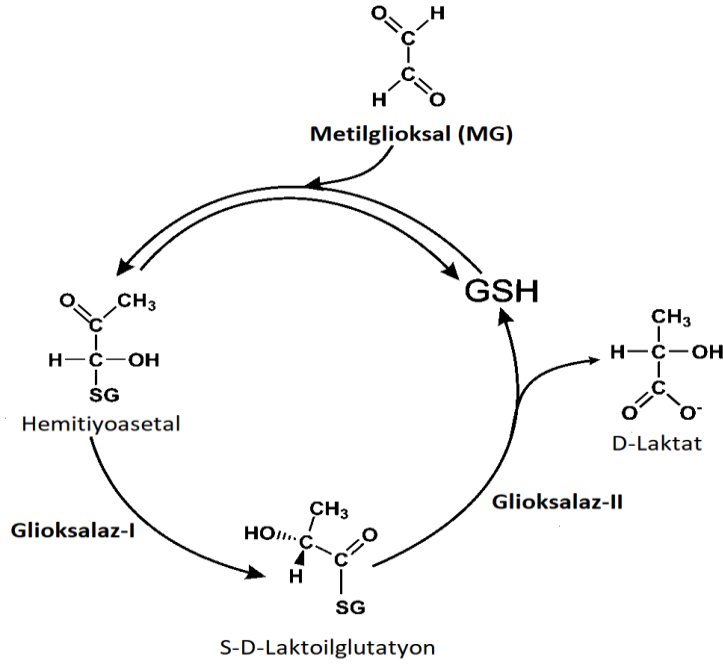
**Şekil 1.2.** Canlılarda MG sentezi yolları (Mostofa *et al.* 2018'den değiştirilerek)

Canlılarda MG hem bir sitotoksik hem de bir mutajenik ajan olarak görev yapar. Yüksek hücrel konsantrasyonda, hücre çoğalmasını inhibe eder (Ray *et al.* 1994) ve bu inhibisyon protein yapılarının bozulması ve protein sentezini engelleyerek gerçekleştirir. Bunun yanı sıra antioksidan savunma sistemini olumsuz etkiler (Wu and Juurlink 2002; Hoque *et al.* 2010). Aynı zamanda DNA zincir kopmalarını indükler ve nokta mutasyonlarını artırarak kardeş kromatitlerin duplikasyonuna sebep olur (Chaplen 1998). Çeşitli abiyotik veya biyotik streslere maruz kalan bitkilerde aşırı üretilen MG'nin detoksifikasyonu, bitki stres toleransının en önemli uygulama stratejilerinden biridir.

Glioksalaz sistemi, hücrelerin ve hücrel organellerin, özellikle mitokondrinin sitozolunda bulunan canlı sistemlerde MG'nin hücrel katabolizmasının (detoksifikasyonunun) temel yoludur. Glioksalaz yolunun işlevi, özellikle kanser, diyabet ve hipertansiyon gibi klinik bozukluklarla olan olası ilişkisi nedeniyle hayvanlarda yoğun olarak çalışılmıştır (Chang and Wu 2006; Desai *et al.* 2010). Glioksalaz sistemi temel olarak iki enzimden oluşur: glioksalaz I (Gly I; laktoilglütatyon liyaz; E.C.4.4.1.5) ve glioksalaz II (Gly II; hidroksiglütatyon hidrolaz; E.C.3.1.2.6). Bu enzimler, iki aşamalı bir reaksiyonda kofaktör olarak glutatyon (GSH) kullanarak MG ve diğer 2-

oksoaldehidleri 2-hidroksi asitlere dönüştürmek için koordineli olarak hareket eder (Thornalley 1990).

GSH ve MG arasındaki kendiliğinden oluşan reaksiyon hemitioasetali oluşturur, bu daha sonra Gly I tarafından SD-laktoilglutayona (SLG) dönüştürülür. İkinci reaksiyon, SLG'nin Gly II ve GSH tarafından katalize edilen D-laktata hidrolizidir. Bu nedenle MG detoksifikasyonu, hücresel GSH'ın mevcudiyetine kuvvetle bağlıdır. GSH eksikliği, hemitioasetal üretimini sınırlayarak MG birikimine neden olur. Glioksalaz sistemi tarafından katalizlenen reaksiyonlar geri döndürülemez (Şekil 1.3).



**Şekil 1.3.** Glioksalaz yolu reaksiyonları ile MG detoksifikasyonu (Miranda *et al.* 2008)

Bitkilerde yapılan son araştırmalar, stres toleransına glioksalaz sisteminin dâhil edilmesinde ve oksidatif savunma sistemlerine katılımında yeni gelişmeler getirmiştir. Glioksalaz sisteminin biyolojik fonksiyonuna dair başka görüşler, ilgili genlerin moleküler klonlanmasından elde edilmiştir. Bitkiler dâhil canlı sistemlerde MG'nin detoksifiye edilebileceği başka enzimatik sistemler de vardır. MG, oksitlenebilen veya indirgenebilen iki fonksiyonel grup içerdiğinden, okside indirgemelerinde yer alan enzimler, MG'nin asetol veya laktaldehite dönüşümünü katalize edebilir (Kalapos 1999; Saxena *et al.* 2005, Yadav *et*

*al.* 2008). Redüktaz enzimi ailesi arasında, aldoz/aldehid redüktaz (ALR) veya aldo-keto redüktaz (AKR), NADPH kullanarak MG'yi asetol ve laktaldehite dönüştürdüğü için büyük ilgi çekmektedir. Abiyotik streslerin ALR genini aktifleştirerek bitki toleransının artırabildiği ileri sürülmüştür (Oberschall *et al.* 2000; Hegedus 2004). Yüksek bitkiler dâhil olmak üzere tüm biyolojik sistemlerde endojen MG üretimi rapor edilmiştir. Memelilerde, mayalarda ve bakteri sistemlerinde stres ve hastalıklarda MG seviyesinin arttığı, 1990'da belirlenmiştir (Kalapos *et al.* 1992; Wu and Juurlink 2002). Aynı zamanda stres koşullarında bitki sistemlerinde MG düzeyinde hızlı bir artış tespit edilmiştir (Yadav *et al.* 2005; Singla-Pareek *et al.* 2006; Hossain *et al.* 2009; Banu vd 2010 ).

MG'nin artan hücresel seviyesi, bitkiler dâhil olmak üzere çeşitli hücrelerde oksidatif strese sebep olduğuna ait deliller bulunmaktadır. Peroksinat, NO, mitokondriyal  $O_2^-$  oluşumunu artıran MG, hücrede mitokondriyal strese neden olur. MG; MnSOD ve ETS'de Kompleks III aktivitelerini önemli ölçüde düşürür. Mitokondride MnSOD, sitokrom-c ubikinon ve kompleks III'ün MG tarafından inhibe edilmesi, elektron kaçaklarına yol açar ve  $O_2^-$  meydana gelmesiyle oksidatif strese sebep olur. Bu da ETS'yi bozabilir (Wang *et al.* 2009; Desai *et al.* 2010). MG'nin lizin, arginin ve sistein gibi amino asitleri çok sayıda içeren enzimlerin yapılarında değişimler yaparak inhibe ettiği de belirlenmiştir (Thornalley 1996 ). MG ayrıca ileri glikasyon son ürünlerinin (AGE'ler), geri dönüşü olmayan kimyasal modifikasyonların ve proteinlerdeki çapraz bağların oluşması yoluyla dolaylı olarak oksidatif strese neden olabilir (Desai *et al.* 2010). Bazı CAT, Gly I ve II ve GSH enzim aktiviteleri bir şekilde azalttığı buna zıt olarak da lipid peroksidasyonunun arttırdığı gözlenmiştir (Choudhary *et al.* 1997; Wu and Juurlink 2002). MG'nin (100 ile 500  $\mu$ M), GR ve GPX gibi antioksidan enzimleri etkisiz hale getirerek ve okside olmuş glutatyon (GSSG) içeriğinde yüksek bir artışla oksidatif strese yol açtığını da bulmuştur. GR ve GPX'in MG kaynaklı bozukluğu da oksidatif strese neden olacaktır, çünkü GR, GSSG'yi GSH'ye indirgeyerek önemli bir rol oynar, oysa GPX, çok reaktif serbest radikallere dönüştürülebilen GSH'yi kullanarak peroksitleri temizler. GR ve GPX aktivitesinde MG'nin indüklediği bozulma, inaktive olmuş glikasyondur; çünkü bu proteinlerin, glikasyon aktivasyonuna karşı duyarlı olduğu bilinmektedir. Ancak, çok sınırlı çalışma tütün (*Nicotiana tabacum* L.) hücrelerinde

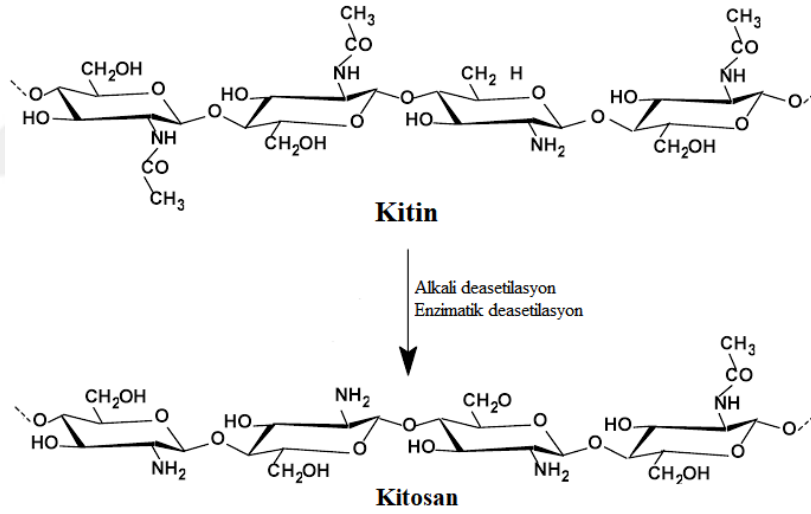
eksojen MG uygulamasının (0.5 ila 10 mM) GST aktivitesini inhibe ettiğini, oysa GSH'ın ekzojen uygulamasının bu fenomeni tersine çevirebildiğini göstermiştir. Genel olarak değerlendirildiğinde, MG'nin düşük konsantrasyonlarında hücreler arasında MG detoksifikasyon sistemlerini harekete geçirilmesinde sinyal bir bileşik olarak görev yaparken, yüksek seviyelerde ise hücrede toksik etkilere neden olmaktadır. Yüksek seviyelerde endojen veya eksojen olarak hem sitotoksik hem de genotoksik etkiye sahiptir. Yani hücrelerin büyüme ve gelişme dönemlerinde MG miktarının artması genetik ve hücrel hasara sebep olmaktadır.

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda bitki hücrelerinde özellikle stres koşullarında MG seviyesinin nasıl düzenlendiği araştırılmıştır. Bu çalışmalara ilave olarak, eksojen veya endojen MG toksisitesinin yatıştırılmasında birçok düzenleyici kullanılmıştır. Örneğin, nitrik oksit, selenyum, glutatyon gibi düzenleyiciler bunlar arasında en yaygın olanlardır. Ancak yapılan literatür incelemelerine göre kitin türevlerinden olan kitosanın bitkilerde birçok iyileştirici etkisi belirlenmesine rağmen, MG toksitesinin yatıştırılmasında rolü üzerine herhangi bir çalışma belirlenmemiştir.

Kitin, yapıtaşı olarak N-asetil D-glukozamin temel birimlerini içeren selülozdan sonra doğada oldukça yaygın olan, böcekler ve kabuklular dâhil olmak üzere birçok canlı grubunda bulunan sert, beyaz yapıya sahip bir polisakkarittir (Fernandez-Kim 2004). Mantarlar üzerinde çalışma yürütürken kitini sülfürik asitle çözmeye çalışan Henri Bracannot ilk kez 1811'de kitin ifadesini kullanmıştır. Fakat istediği başarıyı elde edememiş, 1894'de Hoppe-Seyler, kitini potasyum hidroksit içerisinde 180°C'de deasetilasyonu ile asetil içeriği düşürerek kitosan ürünü oluşturmuştur. Sonra 1934 yılında Clark ve Smith tarafından çok amaçlı kitosan lifi üretilmiştir. En kapsamlı şekilde kitin ve kitosan için ilk yayın 1977 yılında Muzarelli tarafından oluşturulmuştur (Guang 2002; Akbulut 2014). Kitin, böceklerin dış iskeletlerinde ve deniz ürünlerinden istakoz, yengeç, karides gibi kabukluların temel bileşenlerinde olup mantarların ve bazı planktonların hücre duvarının yapısına katılır. En önemli türevlerinden biri kitosandır. Kitosan bu kabukların ekstrakte edilmesi ile oluşturulabilir. Kabuklulardan üretilen kitosan ekonomik açıdan ve çevre dostu olması bakımından yararlı ve önemlidir (Akbulut

2014). Dünyaya bakıldığı zaman kitin üretiminde baş sıralarda %56 ile karides, %32'si diğer kabuklulardan %23'ü istiridyelerden elde edilmektedir (Guang 2002; Olcay 2015).

Kitosan,  $\beta$ -(1-4) bağlı 2-amino-2-deoksi- $\beta$ -D-glikopiranoz, asetamid gruplarının primer amino gruplarına dönüştürülmesiyle elde edilen N-deasitlenmiş bir poliaminosakkarittir (Farnandez-Kim 2004). Kitinden kitosan üretiminin bir yolu alkali ortamdan kitinin deasetilasyonu sonucu oluşturulmasıdır (Guang 2002; Olcay 2015). Kitin ve kitosan polisakkaridleri, kimyasal olarak selüloza benzemekle birlikte kendi aralarında birtakım farklılıklar göstermektedir. Selülozda, ikinci karbon atomuna bağlı hidroksil (-OH) grubu bulunurken, kitinde asetamid (-NHCOCH<sub>3</sub>), kitosanda ise amin (-NH<sub>2</sub>) grubu bulunmaktadır (Struszczyk *et al.* 2001) (Şekil 1.4).



**Şekil 1.4.** Kitinin deasetilasyonu ve kitosanın oluşumu (Junior 2016).

Kitin ve kitosan yapıları arasındaki en önemli fark kitinde asetamid (-NHCOCH<sub>3</sub>) kitosanda ise amin (-NH<sub>2</sub>) grubunun bulunmasıdır. Bundan dolayı kitinde bulunan aminoasetil yapısından asetil yapısının uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu uzaklaştırma işlemini yapılırken kitinin belli derecede deasetillenmesi (%60 ve üzeri) gerekmektedir ve bunun sonucu kitosan oluşmaktadır (Jonathan *et al.* 1999; Vilchez *et al.* 2005). Kitosanın kitine göre avantaj duruma getiren birçok kimyasal tepkimede yer alan serbest amino gruba sahip olmasıdır. Kitosan yapısı kabuklu canlı grubuna ve üretim şekline göre

değişim gösterebilir. Doğal ve sentetik polimerlere göre kitosan uygulamasında molekül ağırlığı önemli bir parametredir. Kitosanın molekül ağırlığı, sıcaklık, NAOH konsantrasyonları, zaman gibi deasetilasyon şartlarının yanı sıra hangi kaynaktan elde edildiğine göre de değişim göstermektedir. Çözünmüş oksijenin bulunduğu ortamda kitosan parçalanmakta ve moleküler ağırlığı azalmaktadır. Eğer çok yüksek sıcaklık altında ise kitosan bu durumdan olumsuz etkilenir. Örneğin; sıcaklığın 280°C ve üzerinde olduğu durumlarda kitosan sıcaklık etkisiyle parçalanır yapıdaki polimer zincirler kırılır ve molekül ağırlık azalır (Agboh and Qin 1997; Lecate *et al.* 2013). Demineralizasyon süresinin artmasıyla viskozitesi azalmaktadır. Tahminen 4°C'de depolanan kitosan çözeltisi en iyi viskoziteye sahip olduğu gözlenmiştir (Akbulut 2014).

Kitosan ve kitini çözme işleminde farklılıklar vardır ve bu farklılıklarda yine kitosanın kitine göre çok avantajlıdır. Çünkü kitini çözme işleminde toksik (lityum klorür ve dimetilasetamid gibi) çözücüler kullanılırken, kitosanı çözme işleminde inorganik asitler çözücü olarak kullanılır. Özellikle laktik asit, formik asit ve asetik asit gibi sık kullanılan çözücülerden en iyi asetik asitte çözünür. En önemli avantajı da bu inorganik asitlerin toksik özelliğinin olmamasıdır (Demir ve Seventekin 2009; Akbulut 2014). Kitosanın çok çeşitli yararları olmasına rağmen, hala bazı dezavantajları olan bir polimerdir, en önemli zorunluluk nötr pH'da çözünürlüğünün düşük, viskozitesinin artmasıdır. Bu dezavantajların bir sonucu olarak, kitosanın depolimerizasyonu ile elde edilen kitosan oligosakaritler (COS) olarak bilinen kitosan bazlı ürünler geliştirilmiş ve bunların pH 7.0'da kullanımı sağlanabilir. COS, kitosanın kimyasal, enzimatik veya radyasyonla bozunması ile elde edilen küçük moleküler ağırlıklı bileşiklerdir. Yapı ve fizikokimyasal özellik, kitosanın ve oligosakaritlerinin biyoaktivitesini büyük ölçüde belirler. Kitosanın hem fizikokimyasal özellikleri hem de biyolojik işlevleri, polimerizasyon derecelerine ve asetilasyon derecelerine güçlü bir şekilde bağımlı oldukları ortaya konmuştur. Kitosan günümüzde tıptan gıdaya, ziraattan kozmetiğe, eczacılıktan atık su arıtımına ve tekstil sektörüne kadar sayısız alanda kullanılabilir (Montazer and Afjeh 2007; Ahmed *et al.* 2020)). Kitosan çeşitli ülkelerde büyük ölçüde kullanılmasına karşın ülkemizde bu oran daha düşüktür. Kullanım alanları Çizelge 1.1'de sunulmuştur.

**Çizelge 1.1.** Kitin ve kitosanın kullanım alanları (Elibol 2008)

Antimikrobiyal madde olarak	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bakteri ve küf gelişimini engeller.</li> <li>• Tarımsal hammaddelerde küf kontaminasyonu önlemektedir.</li> </ul>
Gıda endüstrisinde	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gıda ve çevre arasında nem transferinin kontrolü</li> <li>• Antimikrobiyal bileşiklerin açığa çıkma kontrolü</li> <li>• Antioksidatif katkı maddesi olarak</li> <li>• Besleyici maddelerin, tatlandırıcıların ve ilaçların ortaya çıkışının kontrolü</li> <li>• Oksijenin kısmen basıncını azaltma</li> <li>• Solunum oranını kontrol etme</li> <li>• Meyvelerde enzimatik kararmayı kontrol etme</li> <li>• Şarap gibi ürünlerin arıtımında</li> <li>• Gıda kaplama malzemesi</li> </ul>
Katkı maddesi olarak	<ul style="list-style-type: none"> <li>• İçeceklerin ve meyvelerin asitlendirilmesi</li> <li>• Meyve sularının durultulmasında ve asiditesinin kontrolünde, gıda proseslerinde atık durumuna gelen suyun içerisindeki materyalin geri kazanılmasında kullanılmaktadır</li> <li>• Doğal tatlandırıcıları artırma</li> <li>• Kas yapısı kontrol maddesi</li> <li>• Kalınlaştırıcı ve stabilize edici madde</li> <li>• Renk sabitleştirici</li> </ul>
Besinsel kalite	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Yüksek kolesterolü azaltıcı etkisi</li> <li>• Diyet yardımcısı olarak kullanılmaktadır. Kolesterolü düşürücü etkisinin olması ve vücuttaki depo yağla birleşerek sindirim yoluyla atılmasını sağlamaktadır</li> <li>• Kabuklu ve balık beslenmesinde katkı maddesi</li> <li>• Yağ absorpsiyonunu azaltma</li> <li>• Gastriti önleyici madde</li> <li>• Bebek besin içeriğinde</li> </ul>
Suyun saflaştırılması	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Metal iyonlarının, pestisitlerin, fenollerin tutulmasında</li> <li>• Renklendiricilerin uzaklaştırılmasında</li> <li>• Alkol ve suyun ayrıştırılması gibi işlemlerde kullanılabilir. Sahte bağlar meydana gelmektedir.</li> </ul>
Diğer uygulamalar	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Enzim aktivasyonu</li> <li>• Hayvan yemi olarak kullanılabilir. Hayvan yem tüketimini azaltırken, karkas ağırlığını artırır.</li> <li>• Kâğıt bazlı kartonlar gibi bazı paket materyallerinin fonksiyonel özelliklerinin artırılması özelliğine sahiptir.</li> <li>• İnsan sağlığı açısından ise, doğal olması, toksik olmaması, tümör oluşumunu engelleyebilmesi, serum kolesterol seviyesini düşürebilmesi gibi yararlı etkilerinin olması oldukça önemlidir.</li> <li>• Yara iyileşmesinde düşük asetilasyon derecesine sahip kitosan filmlerinin yarada, keratinoit çoğalmasını desteklediği böylece epidermis rejansiyonuna katkı sağladığı bildirilmiştir.</li> <li>• Kabuklu deniz ürünlerinin yapısında bulunan kitosan, atık su arıtımı için en etkili malzemelerden biridir.</li> </ul>

Kitosan, toksik olmayan ve biyolojik olarak parçalanabilen bir bitki büyüme destekleyicisi olarak günümüzde özellikle çevreye dost organik tarımın gelişmesinde, önemli bir kaynak olarak değerlendirilmektedir. Kitosan bitkiye hem *in vivo* hem de *in vitro* koşullarda uygulanabilir, ayrıca bitki yaprakları gibi toprak üstü organlarına da uygulanabilir. Kitosanın yapraktan uygulanması bitki boyu, yaprak sayısı, meyve ağırlığı ve verimini artırır. Bitki büyümesini uyardığı ve hastalıklarla mücadelenin artırılmasındaki rolü artık bilinmektedir. Kitosan ve oligosakaritleri uygulanması, bitki büyümesini, tohum çimlenmesini, klorofil içeriğini, kloroplast ultrastrüktürünü, azot fiksasyonu ve besin emilimini artırabilir. Hem doğal hem de degrade formda kitosan (oligosakaritler) bitkilerde bir büyüme promotörü gibi davranabilir ve primer ve sekonder metabolizma ile ilişkili mekanizmalara cevapta rol alabilir. Kitosan ve ondan türevlenen oligosakaritler, bitkide karbon ve azot metabolizması bazı enzimlerinin aktivitelerini ve fotosentezin ışık ve karbon reaksiyonlarını aktive ederek fotosentez verimini artırır. Fotosentezde ışık tepkimelerini düzenleyerek fotosentetik makinelerin regülasyonunda rol alır. Ayrıca stoma sınırlamalarının üstesinden gelir ve karbon fiksasyon reaksiyonlarda karbon fiksasyon verimini artırır ve dolayısıyla karbohidrat sentezini artırır. Kitosan ve oligosakaritleri, sekonder metabolitlerin enzimlerini ve onların içeriğini de uyarır (Ahmed *et al.* 2020).

Yeryüzünde en yaygın olarak yetiştirilen *Poaceae* (*Gramineae*) familyasından önemli bir tahıl ürünü olan mısır (*Zea mays* L.), insanlığın kültüre aldığı en eski tarla bitkilerinden biridir (Kaya 2008). Tahıl bitkilerden buğday ve arpadan sonra en çok ekim alanına sahip mısır Türkiye tarımda oldukça önemli olup Karadeniz ve Marmara Bölgesi'nde daha çok yetiştirilmektedir (Süzer 2004). Besin değeri yüksek ve verimliliği oldukça fazla olan mısır bitkisi hem hayvan hem de insan beslenmesinde önemli olan bir üründür. Günümüzde giderek önem kazanan birçok kullanım alanına sahip mısır, ekonomik açıdan önemli olan ve tanesinden elde edilen glikoz, nişasta, mısır özü yağının ham maddesi olarak kullanılmaktadır (Süzer 2004).

Günümüze kadar yapılan çalışmalarda MG toksitesi konusunda hayvansal organizmalarda daha yoğun çalışmalar yapılmış ve detoksifikasyon mekanizması daha

geniş açıdan değerlendirilmiştir. Fakat literatürü incelediğimizde, MG toksitesinin bitki glioksalaz sistem yolunda Gly I ve Gly II enzimlerinin bitki metabolizmasındaki rolü üzerinde sınırlı çalışmalar bulunmaktadır. Bitkilerde yapılan çalışmalarda stres koşullarında daha çok ROS'lar üzerine yoğunlaşarak hücrelerde neden oldukları oksidatif stres cevapları değerlendirilmiştir. Kitosanın ise ROS gibi oksidatif strese neden olan MG toksisitesi üzerinde etkisini açıklayan hemen hiçbir bilgi bulunmamaktadır. Bu nedenle çalışmamızda, MG toksisitesine maruz kalan mısır (*Zea mays* cv. Arifiye.) bitkisinde kitosan uygulamasının hem ROS hem de MG detoksifikasyonunda rol alan parametreler üzerine etkileri değerlendirilmiştir. Çalışmada uygulama yapılmış ve yapılmamış fidelerde bitki büyüme parametrelerine ilave olarak ROS parametreleri (LPO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve O<sub>2</sub><sup>-</sup>), ROS'ları süpüren antioksidan enzimlerin (SOD, APX, CAT, GR ve GPX) ve MG detoksifikasyonunda rol alan Gly I ve Gly II enzimlerin aktiviteleri çalışıldı.



## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Bu bölümde çalışmamızda MG ve kitosanın bitkiler üzerinde etkilerini değerlendiren çalışmalar özetlenmiştir.

Birçok çalışmada MG'nin hem prokaryot hem de ökaryot hücrelerde çeşitli metabolik reaksiyonların bir yan ürünü olarak üretilen güçlü bir sitotoksin olduğu ileri sürülmüştür (Pompliano *et al.* 1990; Espartero *et al.* 1995; Kalapos 1999; Kumar and Yadav 2009; Nahar *et al.* 2016; Jain *et al.* 2018). İlk olarak Yadav vd (2005), çeşitli abiyotik streslere cevap olarak pirinç, tütün ve Brassica fidelerinin tuz, kuraklık ve soğuk stresi koşullarına cevap olarak MG seviyelerinin 2 ile 6 kat kadar arttığını ileri sürdüler. Bitkilerde MG'nin çeşitli abiyotik, hormonal ve kimyasal streslere cevap olarak etkisinin olup olmadığını araştırmak için, kuraklık, tuzluluk, soğuk, yüksek sıcaklık, ağır metale maruz kalan fidelerdeki MG seviyeleri belirlenmiştir. MG; 2,4-D, ABA ve yüksek beyaz ışık stresine maruz fidelerde, kontrollerine göre, MG seviyelerinin arttığı ifade edilmiştir. Bulgulara göre, MG seviyesinde en yüksek artış beyaz ışıkta ( $60 \mu\text{mol foton m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) (2.21 kat), ardından tuzluluk (1.77 kat), MG uygulaması (1.69 kat), kuraklıkta (1.63 kat), ağır metal (1.55 kat) ve ABA (1.37 kat) uygulamalarında olduğu belirlenmiştir (Hossain *et al.* 2009). MG'nin ayrıca *Aspergillus flavus* mantarı ile enfekte olmuş bir mısır genotipinde de (2.5 kat) arttığı bildirilmiştir (Chen *et al.* 2004). İlave olarak Banu vd (2010), 200 mM NaCl stresine cevap olarak tütün BY-2 hücrelerinde MG seviyesinin önemli ölçüde (2 kat) arttığını göstermiştir. Farklı streslerden dolayı bitkilerde MG seviyesindeki hızlı artış, bunun genel bir stres tepkisi olduğunu açıkça göstermektedir. Bu nedenle, MG'nin bitkilerin strese cevap vermesi için bir sinyal olarak hareket edebilme olasılığı konusunda önemli bir konsensüs vardır.

Bitkiler de dahil olmak üzere çeşitli canlı hücrelerde MG kaynaklı oksidatif strese dair önemli kanıtlar vardır. MG, mitokondrial  $\text{O}_2^-$ , NO ve peroksinitrit oluşumunu artırarak mitokondriyal oksidatif strese neden olur. Örneğin MG, MnSOD ve mitokondriyal kompleks III'ün aktivitelerini önemli ölçüde inhibe eder. MnSOD, mitokondride  $\text{O}_2^-$ 'yi dismutaze eden birinci hat enzimdir ve kompleks III ubikinondan sitokrom c'ye elektron

transfer eder. Kompleks III'ün MG tarafından inhibe edilmesi, elektron taşıma zincirini bozar, bu da  $O_2^-$  oluşturmak üzere sızan elektronlara yol açabilir (Wang *et al.* 2009). MG'nin proteinlerin yapısında arginin, lizin ve sistein kalıntılarını değiştirdiği ve çok sayıda enzimi inhibe ettiği bulunmuştur. MG ayrıca ileri glikasyon son ürünlerinin (AGE'ler), geri dönüşümsüz kimyasal modifikasyonların ve proteinlerdeki çapraz bağların oluşması yoluyla da dolaylı olarak oksidatif strese neden olabilir (Desai *et al.* 2010). Benzer olarak SOD, GST, CAT, Gly I ve II aktiviteleri ve GSH içeriği sıçan karaciğer hücrelerine eksojen MG uygulanmasını takiben zamana ve doza bağlı bir şekilde azalırken, lipid peroksidasyonunun (LPO) arttığı görülmüştür (Choudhary *et al.* 1997). Ayrıca MG'nin (100 ila 500 mM), GR ve GPX gibi antioksidan enzimleri etkisiz hale getirerek ve okside olmuş glutatyon (GSSG) içeriğinde önemli bir artışla oksidatif strese yol açtığını da buldu. MG'nin AGE'leri, AGE'lerin (RAGE) reseptörlerini aktive edebileceğini ve böylece  $O_2^-$  üretimini artırdığını öne sürülmüştür (Wu *et al.* 2002). GR ve GPX'in MG kaynaklı inhibisyonu da oksidatif strese neden olacaktır, çünkü GR, GSSG'yi GSH'ye indirgeyerek önemli bir rol oynar, oysa GPX GSH'yi kullanarak çok reaktif serbest radikallere dönüştürülebilen peroksitleri temizler. MG'nin indüklediği GR ve GPX aktivitesindeki bozulma, inaktive olmuş bir glikasyon olayıdır, çünkü bu enzimlerin, glikasyona karşı oldukça duyarlı olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte, yüksek bitkilerde antioksidan savunma sistemlerinde eksojen MG'nin etkisi konusunda çok sınırlı çalışma yapılmıştır. Sınırlı sayıda bazı çalışmalarda tütün (*Nicotiana tabacum* L.) hücrelerinde eksojen MG uygulamasının (0.5 ila 10 mM) GST aktivitesini inhibe ettiğini, oysa GSH'nin eksojen uygulamasının bu fenomeni tersine çevirebildiğini göstermiştir (Hoque *et al.* 2010). Bu çalışmalara göre MG'nin antioksidan enzimleri inhibe ettiği ve bu enzimlerin aktivitelerinde ve yapılarındaki değişimler oksidatif strese katkıda bulunabilir. Kuşkusuz, MG-süpürme sistemlerinin bitki stres toleransındaki rolü, gen transfer teknolojisi kullanılarak artmıştır. Bazı çalışmalar, bitkilerde MG-detoksifikasyon sistemlerinin indüklenmesinin oksidatif hasardan kısmen koruma sağladığını açıkça göstermiştir. Transgenik bitkilerde glioksalaz yolu genlerinin aşırı ekspresyonunun, stres koşulları altında MG ve ROS seviyelerini kontrol ettiği, glutatyon homeostazisini düzenlediği, transgenik bitkilerin çeşitli abiyotik oksidatif stresler altında hayatta kalmalarına ve büyümelerine izin verdiği bulunmuştur (Yadav *et al.* 2005; Bhomkar *et al.* 2008).

MG'nin mayada birkaç sinyal iletim yolunu aktive ettiği tespit edilmesine rağmen, yüksek bitkilerde MG'nin sinyal iletim rollerine ilişkin bilgi azdır. MG, bazı transkripsiyon faktörlerini aktive eder ve *Saccharomyces cerevisiae*'de bir Hog1 mitojenle aktifleştirilen protein (MAP) kinaz kaskadını tetikler. Hogl'in MG tarafından aktivasyonu ile ilgili olarak, histidin kinaz aktivitesine sahip bir ozmosensör olan Sln1, bir MG sensörü olarak işlev görür (Takatsume *et al.* 2006). Buna rağmen MG'nin yine yüksek bitkilerdeki sinyal rolüne dair bilgilerimiz oldukça sınırlıdır. Ancak, gliksalaz transgenik bitkilerin kritik analizi, bunların MG'yi belirli bir seviyede tuttıklarına işaret eder.

Ağır metallerden biri olan Cd'un maş fasulyesi (*Vigna radiata* L.) üzerinde oluşturduğu stres parametreleri değerlendirmiştir. Araştırmacılar Cd stresine karşı iyileştirici olarak prolin ve nitrik oksit (NO) uygulamışlardır. Bulgularına göre Cd stresi altında içsel MG, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve diğer stres parametreleri artmış, buna ilave olarak NO ve proline uygulamasında da antioksidan enzimlerin (SOD, CAT, GPX, APX vb.) aktiviteleri artmıştır. MG ve diğer stres parametrelerinin antioksidan enzimlerin aktivitelerini azalttığını ve araştırma sonuçlarına göre NO ve prolinin Cd stersine karşı kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Nahar vd (2014) de yaptıkları çalışmada sıcaklık stresinde artış gösteren MG toksisitesine karşı endojen GSH uygulaması üzerine çalışmışlardır. Yaptıkları çalışmada MG, MDA, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> süperoksit anyonu ve prolin miktarlarında artış, klorofil miktarlarında ise bir azalış görmüşlerdir. Endojen GSH uygulamasında ise Gly I, CAT, GR, APX ve Gly II aktivitelerinde belirgin bir artış gözlenmiş ve çalışma sonucunda maş fasulyesi üzerindeki sıcaklık stresinin sebep olduğu MG toksifikasyonunu endojen GSH uygulamasıyla azaltılacağını ileri sürmüşlerdir.

Yukarıdaki çalışmalara benzer olarak bir çalışmada Cd stresine maruz kalmış kanola (*Brassica napus*) bitkisi kullanılmıştır ve selenyumun antioksidan defans sistemi ve MG detoksifikasyonu üzerine etkileri araştırılmıştır (Hasanuzzaman *et al.* 2012). Cd uygulanan bitkilerde MDA, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> artmıştır ve AsA, GSH, GSSG, GPX miktarları önemli derecede azalmıştır. Selenyum uygulanan bitkilerde ise enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar; CAT, Gly I, Gly II, GPX, APX, GR, GST, GSH ve AsA önemli derecede artış gözlenmiştir. Bu artışla beraber MDA ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seviyesinde azalış belirlenmiştir. Bu

sonuçlara göre Cd sebep olduğu oksitatif hasar eksojen olarak uygulanan selenyum ile giderilebilir ve MG detoksifikasyonu üzerine önemli bir katkısı olduğu ileri sürülebilir. Transgenik patates (*Solanum tuberosum* L.) bitkisine L-askorbik (AsA) asit uygulayarak tuz stresi altında artan MG düşürülmesi için bir çalışma yapılmıştır (Upadhyaya, *et al.* 2011). Çalışma sonucunda GSH miktarı L-Askorbik asitle artmış ve diğer antioksidan enzimlerde de artış gözlemlenmiştir. Bunun sonucunda tuz stresi toksisitesi yatıştırılmış ve MG konsantrasyonu azaltan Gly I ve Gly II aktivitelerini artıran bir sonuç gözlenmiştir.

Maş fasulyesinde (*Vigna radiata*) tuz stresinin artırdığı oksitatif stresin ile MG artışının eksojen glisinbetain ve prolin uygulayarak bu streslere cevapta rolleri araştırılmıştır (Hossain and Fujita 2010). Çalışma bulguları GPX, Gly II, GST enzim aktivitelerinin 48 saat boyunca arttığını, ancak GR, Gly I aktivitelerinin ilk 24 saatte içinde stimüle edildiği ve 24 saatten sonra azaldığını ortaya koymuştur. Tuz stresinde artan ROS, MG ve LPO içerikleri, eksojen uygulanan glisinbetain ve prolin ile antioksidan savunma sistemi ve MG detoksifikasyon sistemi uyarılarak azaltılmıştır. Araştırmacılar, çalışmanın sonucuna dayanarak tuz stresine karşı glisinbetain ve prolinin bir koruyucu ajan olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Çeşitli bitkilerde 30-75  $\mu$ M aralığında MG konsantrasyonu, tuzluluk, kuraklık ve soğuk stres koşullarında MG seviyelerini 2-6 kat artırdığını gösterilmiştir (Yadav *et al.* 2005). Transgenik tütün bitkisinin Glioksalaz I'i aşırı ekspre edenlerin MG seviyeleri, transgenik olmayan bitkilere kıyasla strese yanıt olarak artmamıştır. Ayrıca eksojen GSH uygulaması ile hem transgenik bitkilerde hem de transgenik olmayan bitkilerde MG seviyelerinde bir düşüş olmuştur. Eksojen GSH uygulamasında yabancı tütün bitkilerinde MG seviyeleri %50'ye düşürürken, transgenik bitkilerde 5 kat bir azalma göstermiştir. Yapılan bu çalışmada abiyotik ve normal stres koşullarında bitkilerde MG seviyelerinin korunmasında GSH konsantrasyonu yanı sıra glioksalaz I'in de önemli rol oynadığı ileri sürülmüştür (Yadav *et al.* 2005).

Kitosan, bitkilerde biyotik ve abiyotik stresler ile ilgili çok sayıda savunma cevap mekanizmalarını uyarır. İklim koşullarındaki değişme ve sentetik kimyasalların sürdürülemez kullanımıyla artan gıda talebiyle, bir elisatör olarak kitosan uygulaması, abiyotik ve biyotik stres adaptasyonu ile ilgili meseleleri ele almak için geniş bir

potansiyele sahiptir. Kitosan uygulaması ilk olarak Allan ve Hadwiger (1979) tarafından çalışılmıştır. Çalışmada kitosanın mantarlarda farklı hücre duvarı kompozisyonları üzerindeki etkileri belirlendi. Kitosanın antifungal, anti-bakterisit ve antiviral özellikleri nedeniyle bilim insanlarını tarafından tarımsal sistemlerde kullanılması teşvik edilmiştir. Kitosan ve oligokitosan gibi türevlerinin hasat öncesi ve sonrası hastalıkları etkin bir şekilde kontrol ettiği ileri sürülmüştür. Kitosan, selülozdan sonra en bol miktarda karbohidrat polimeri olan deniz kitin'den elde edilmektedir. Önceki çalışmalarda, *Botrytis cinerea* gibi bazı önemli mantar patojenlerinin büyümesini doğrudan engelledikleri bildirilmiştir. Benzer şekilde, oligokitosanın hidrojen peroksit üretimini kontrol altında tutmak için fenilalanin amonyum liyaz (PAL) ve peroksidaz (POD) aktivitesini artırmada etkili olduğu gösterilmiştir (Ma *et al.* 2012; Hidangmayum *et al.* 2019).

Kuraklık veya sıcaklık stresi, *Aspergillus flavus* ve *Fusarium moniliforme* gibi mantarların enfeksiyonu hızlandırır ve sonuç olarak mikotoksin üretimini artırır. Diğer taraftan kitosanın bitki dokusunda fitoaleksinin birikimini indüklediği rapor edilmiştir. Kitosanın pirinçte tohumlara uygulaması, pirinç verimini önemli ölçüde artırmıştır, ancak konuda mısırdaki bilimsel veri bulunmamaktadır. Mısırla yapılan çalışmada kitosan ile muamele edilmiş fidelerin bu mantarlara karşı önemli iyileşme sağlandığı belirtilmiştir (Lizárraga-Paulín *et al.* 2011).

Yapılan diğer bir çalışmada kuraklık stresinin arpa bitkilerinin biyokütle, enzim aktivitesi, yaprak rengi, hasat indeksi, verim ve verim bileşenlerini etkilediğini gösterilmiştir. Oysa kitosan nanopartiküllerin (NP), özellikle 60 ve 90 ppm kullanılması, kuraklık stresinin zararlı etkilerini azaltmıştır. Bununla birlikte, kitosan NP'lerinin daha iyi büyüme ve üretimi sağlamanın yanında bitkilerde daha fazla su kullanım etkinliği oluşturduğu belirlenmiştir. Dolayısıyla, kitosan NP'lerinin arpa bitkilerine istenen sonuçları elde etmek için sulama rejiminde farklı dozlarda toprak veya yaprak uygulaması yoluyla arpa bitkilerine uygulanabileceği ileri sürülmüştür (Behboudi *et al.* 2018).

Kitosanın hasat sonrası kurşuni küf (*Botrytis cinerea*) ve maviküfe (*Penicillium expansum*) karşı kivi yetiştiriciliğinde direnci artırma kabiliyeti araştırıldığı bir

çalışmada 5 gr/L'de kitosanın, 25 ve 4°C'de saklanan kivi meyvesinde kurşuni küf ve maviküfü önemli ölçüde inhibe ettiği gösterilmiştir (Zheng *et al.* 2017). Bu çalışmada kitosan, CAT, SOD ve APX gen ekspresyonunu önemli ölçüde indüklediği ayrıca enzim aktivitesini de arttırdığı belirlenmiştir. Ayrıca, kitosan, kivi meyvelerinde toplam fenolik bileşiklerin içeriğini belirgin şekilde arttırmıştır. Önemli olarak, kitosan meyve kalitesi üzerinde de yararlı etkiler göstermiştir. Birlikte ele alındığında, kitosanın depolanmış kivi karışımında küfü azaltma kabiliyeti, konukçu savunma yanıtının ortaya çıkması ile ilişkilendirilebilir. Bu sonuçlar, hasat sonrası kayıpları azaltmak için kitosan uygulamasının pratik etkileri olduğunu göstermektedir.

Kitosanın kuraklık stresine karşı etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, Zohreh *et al.* (2017) kuraklık stresinin *Thymus daenensis* (zencefil) bitkisinde sekonder metabolit olan uçucu yağ miktarında azalış, LPO ve prolin miktarlarında ise artışa sebep olduğunu, ancak bu parametreler üzerinde kitosan uygulamasıyla herhangi bir iyileştirici etki belirlememişlerdir. Araştırma sonucunda kitosanın kuraklık stresine karşı iyi bir iyileştirici olduğunu bulmuşlardır. Mahdavi ve Rahimi (2013), kitin türevi olan kitosanın abiyotik strese karşı iyileştirici etkisinin olması, ürün verimliliğinin artırması büyüme ve gelişmeyi olumlu yönde etkilemesini baz alarak, kitosanın çimlenme üzerinde tuz stresi altında iyileştirici etkisinin olup olmadığına araştırmışlardır. Araştırma sonucu uygulanan tüm kitosan konsantrasyonlarını çimlenme yüzdesi, kök gövde uzunluğu ve kuru madde miktarında artış olduğu gözlemlenmiştir. Çalışmada, tuz stresine karşı kitosan uygulamasının iyileştirici bir ajan olarak uygun olduğu ileri sürülmüştür. Muriefah (2013)'de yaptığı çalışmada baklagillerden olan fasulye bitkisinin aşırı su stresinde besin elementlerini ve fotosentetik pigmentlerinin, protein ve karbonhidrat konsantrasyonlarının azaldığını gözlemlemiştir. Aşırı su stresine karşı kitosan uygulamış ve uygulamasında yukarıda bahsedilen parametrelerin hepsinde belirgin bir şekilde artış gözlemleyerek kitosanın stresi azaltmak için kullanılan ümit verici bir materyal olabileceği önerilmiştir. Romandan and Farouk (2012)'de börülce bitkisi üzerinde su stresi çalışması yapmışlardır. Su stresinin bitkideki verimliliği, bitki kalitesi, iyon yüzdesi, karbonhidrat konsantrasyonunu, klorofil miktarını düşürdüğü belirtmişlerdir. Stres altındaki börülce bitkisini yaprağına uygulanan kitosan özellikle 250 mg/l'de daha iyi bir sonuç verdiğini

belirlemişlerdir. Kitosan uygulaması sonrası bitkide fizyolojik şartların yanı sıra bitki büyümesi ve verimliliği artırmıştır.

Nusrat ve Ahmad (2012)'de tuz stresi altındaki Aspir ve Ayçiçek tohumlarına çeşitli konsantrasyonlarda eksojen olarak kitosan uygulaması yapılarak iyileştirici etkisi olup olmadığına değerlendirilmiştir. Tuz stresine maruz bırakılan bitkide; ozmotik ayarlama, iyon sekresyonu, metabolik denge, antioksidan savunma gibi birçok genin koordineli hareket mekanizmasını olumsuz etkilemektedir. İndüklenmiş tuzluluk stresinde; çimlenme yüzdesini, çimlenme oranını, protein içeriğinde azaltma; MDA, katalaz (CAT) ve peroksidaz (APX) aktivitesi artış meydana gelmiştir. Kontrol bitkilerine kıyasla farklı kitosan konsantrasyonları arasında düşük kitosan konsantrasyonları CAT ve POX aktivitesini artırmıştır. Tuz stresinin artmasıyla, düşük konsantrasyonlarda uygulanan kitosan çimlenme yüzdesini artırırken MDA içeriği, CAT ile POX aktivitesini ve prolin içeriğini azaltmıştır. ROS üretimi normal şartlarda ve antioksidan enzimlerin aktivitesinde kaçınılmazdır. Bitkinin maruz kaldığı tuz stresinde ROS oluşumları bakımından değişiklik gösterebilir. Tuz stresi altındaki bitkide stresin indirgenmesi için düşük konsantrasyonda uygulanan kitosan oksidatif stresi azalttığı sonucuna ulaşmışlardır. Lizárraga-Paulín *et al.* (2011)'de yaptıkları çalışmada abiyotik stres şartlarında mısır bitkisinde kitosan uygulamasının etkileri çalışılmıştır. Çalışma parametreleri kuraklık, nem, asidik pH, alkali pH olup ölçümler yaparak (kök gövde uzunluğu, total uzunluk, yaprak genişliği ) kitosanın mısır bitkisinde abiyotik strese sebep olan faktörlere karşı iyileştirici etkisi olduğu tespit edilmiştir.

Kitosan ağır metal stresine cevapta ta bitki toleransını artırmada etkili olmuştur. Örneğin, Farouk *et al.* (2011)'de turp bitkisi (*Raphanus sativus*, L. cv. *sativus*) üzerinde Cd'nin bitki büyümesinde ve bitkilerdeki bazı fizyolojik süreçleri üzerindeki zararlı etkilerini azaltmak için hümik asit ve kitosanı kullanarak çalışma yapmışlardır. Hümik asit ve kitosandan elde edilen 100 ve 200 mg/kg kuru toprağın Cd seviyelerinin (100 ve 150 mg/kg kuru toprak) turp bitkisinin büyümesi ve bazı fizyolojik karakterler üzerindeki zararlı engellemedeki rolünü incelemek için deneyler yapıldı. Sonuçlar değerlendirildiğinde Cd 100 ve 150 mg/kg topraklarda her iki mevsimde bitki başına

düşen yaprak sayısı, sürgün ve kök sistemlerine, taze ve kuru ağırlıklarına bakılmıştır ve önemli ölçüde bu parametrelerde azalma meydana gelmiştir. Klorofil, toplam şeker içeriği, azot, fosfor, potasyum, bağıl su içeriği, su eksikliği yüzdesi ve çözünür proteinlerin yanı sıra toplam amino asit içerikleri de azalmıştır ve bitki dokularında Cd konsantrasyonu artış göstermiştir. Diğer taraftan 100 ya da 200 mg/kg konsantrasyonunda toprak ilavesi olarak kitosan ve hümik asit uygulamasında yukarıda belirtilen bütün parametreler artırmış ve bitki dokularında Cd konsantrasyonunu azaltmıştır. Turp bitkisinin gelişimini engelleyen Cd stresini önlemekte kullanılan kitosan ve hümik asit uygulamasında her iki şelatör, özellikle 200 mg/kg kuru topraktaki kitosan Cd şelatlama nedeniyle ağır metali baskı altına alarak turp bitkisinin hayatta kalma kapasitesini artırdığını belirtmişlerdir.

Son yıllarda kitosanın bitkide sinyal iletiminde de öncül bir rol oynayabileceği ileri sürülmüştür. Örneğin, kitosan molekülü tarafından uyarılan sinyal iletimi spesifik resöptörler bulundurur, bunlar sinyali daha sonra reaktif oksijen türleri (ROS), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Ca<sup>+2</sup>, nitrik oksit (NO) gibi sekonder habercilere ve hücre içindeki fitohormonlara aktarır. Kitosan uygulaması ile süperoksit anyonu ve lipit içermeyen radikaller gibi radikallerin inhibe edici etkisi daha önce rapor edilmiştir (Behboudi *et al.* 2018).

Yukarıda sunulan literatür özetine göre ROS gibi stres koşullarında artan ekzojen MG toksisitesine karşı kitosan uygulamasının biyokimyasal, fizyolojik ve moleküler temelleri hakkında yeterli literatür bilgisi bulunmamaktadır. Bu nedenle çalışmamızdan elde edilen veriler literatürde önemli bir boşluğu dolduracaktır.

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Kullanılan Alet ve Cihazlar

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

#### 3.2. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanmaları

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler Sigma ve Fluka şirketlerinden sağlandı. Çözeltilerin kullanıldığı yerler ve hazırlanış şekilleri aşağıda sunulmuştur.

1. Antioksidan enzimlerin homojenizasyon tamponu (0.1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH: 6,75, %1 PVP, 1 mM EDTA): 2.72 gr  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  180 ml saf suda çözüldükten sonra, hacim saf su ile 200 ml'ye tamamlanmış ve üzerine 0.5 gr PVP ve 0.04 gr EDTA ilave edilmiştir.

2. CAT aktivitesi ölçüm tamponu (103.5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.5): 2.804 gr  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 150 ml saf suda çözülmüş, 1 N NaOH ile pH: 7.5'e ayarlanmış ve hacim saf su ile 200 ml'ye tamamlanmıştır.
3. CAT aktivitesi ölçümü substrat çözeltisi (40 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  çözeltisi): 816  $\mu\text{l}$  %35'lik  $\text{H}_2\text{O}_2$  alınıp hacmi saf su ile 250 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
4. APX aktivitesi için tampon çözeltisi (50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH: 7.0): 0.17 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  alınarak 150 ml saf suda çözülmüş ve pH: 7.0'ye ayarlandıktan sonra hacim saf su ile 250 ml'ye tamamlanmıştır.
5. APX aktivitesi için substrat çözeltisi (0.5 mM askorbik asit): 0.0225 gr askorbik asit tartılarak 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 7.0) içerisine eklenerek çözülmüştür.
6. APX aktivitesi ölçümünde kullanılan substrat çözeltisi (2 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ ): 13  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  (%37) daha önce hazırlanan 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 7.0) içerisine eklenmiştir.
7. APX aktivitesi ölçümünde kullanılan substrat çözeltisi (0.1 mM EDTA): 0.0147 gr EDTA tartılıp daha önce hazırlanan 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 7.0) içerisine eklenmiştir.
8. SOD aktivitesi için tampon çözelti (50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.8): 2.9 gr  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  200 ml saf suda çözülmüş, pH: 7.8'e ayarlandıktan sonra ve son hacim saf su ile 250 ml'ye tamamlanmıştır.
9. SOD aktivitesi reaksiyon karışımı için 13 mM metiyonin: 0.485 gr metiyonin alınır ve 10. maddede hazırlanmış olan 250 ml 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  tamponu içerisine ilave edilerek çözülür.
10. SOD aktivitesi için 75  $\mu\text{M}$  NBT-nitroblue tetrazolium klorür): 0.015 gr NBT alınır. 10. maddede hazırlanmış olan 250 ml 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  tamponu içerisine ilave edilerek çözülür.
11. SOD aktivitesi için 1 mM EDTA: 0.075 gr EDTA alınır ve 10. maddede hazırlanmış olan 250 ml 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  tamponu içerisine ilave edilerek çözülür.
12. SOD aktivitesi için 2  $\mu\text{M}$  riboflavin: 0.019 gr riboflavin, 500 ml saf suda çözülerek hazırlandı.
13. Oksitlenmiş glutatyon (1 mM GSSG; GR aktivitesi için): 0.007 gr GSSG, 10 ml saf su içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.
14. 50 mM Tris-HCl (GR aktivitesi için): 0.06 gr Tris bir miktar saf su içerisinde çözülür, sonra pH 7.8'e ayarlanır ve son hacim 10 ml'ye tamamlanır.

15. 1 mM EDTA (GR aktivitesi için): 0.0014 gr EDTA bir miktar saf suda çözüldürüldükten sonra 50 mM Tris-HCl içerisine ilave edilmiştir.
16. 0.2 mM NADPH (GR aktivitesi için): 0.0022 gr NADPH bir miktar saf suda çözüldürüldükten sonra 50 mM Tris-HCl içerisine ilave edilmiştir.
17. 0.1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (GPX aktivitesi): 2.13 gr  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  tartılıp bir miktar saf suda çözüldürüldükten sonra pH 7.0'a ayarlanıp son hacmi 150 ml'ye tamamlanmıştır.
18. 5 mM Guaicol (GPX aktivitesi): 81  $\mu\text{l}$  guaicol pipetle 0.1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  içerisine eklenmiştir.
19. 15 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  (GPX aktivitesi ): 22.5  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  pipetle 0.1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  içerisine eklenmiştir.
20. 0.1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH: 6.75) (Protein tayini için): 3.4 gr  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  200 ml saf suda çözülmüş, 1 N NaOH kullanılarak pH 6.5'e ayarlandıktan sonra hacim saf su ile 250 ml'ye tamamlanmıştır.
21. BCA reaktifi (protein tayini için): 15 ml BCA ile 0.3 ml  $\text{FeCl}_3$  ile karıştırılır.
22. 0.1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Gly I ve Gly I I homojenizasyon çözeltisi ): 0.780 gr  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  bir miktar saf suda çözüldükten sonra pH 7.0'a ayarlanarak son hacmi 50 ml'ye tamamlanır.
23. 16 mM  $\text{MgSO}_4$  (Gly I ve Gly II homojenizasyon çözeltisi): 0.211 gr  $\text{MgSO}_4$  bir miktar saf suda çözüldükten sonra 0.1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  içerisine eklenir.
24. 0.2 mM PMSF (Gly I ve Gly II homojenizasyon çözeltisi ): 0.0017 gr PMSF tartılıp bir miktar saf suda çözüldükten sonra 0.1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  içerisine eklenir.
25. %5 Glycerol (Gly I ve Gly II homojenizasyon çözeltisi): 2.5 ml gliserol 0.1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  içerisine eklenir.
26. %0.2 PVP (Gly I ve Gly II homojenizasyon çözeltisi): 0.1 gr PVP bir miktar saf suda çözüldükten sonra 0.1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  içerisine eklenir.
27. 0.1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Gly I aktivitesi): 1.87 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  bir miktar saf suda çözüldükten ve daha sonra pH 7.5'e ayarlanarak son hacmi 120 ml'ye tamamlanır.
28. 3.5 mM MG (Gly I aktivitesi): 64.45  $\mu\text{l}$  MG 0.1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  içerisine eklenir.
29. 1.7 mM GSH (Gly I aktivitesi): 0.0626 gr tartılıp bir miktar saf suda çözüldükten sonra 0.1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  içerisine eklenir.
30. 16 mM  $\text{MgSO}_4$  (Gly I aktivitesi): 0.507 gr  $\text{MgSO}_4$  tartılıp bir miktar saf suda çözüldükten sonra 0.1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  içerisine eklenir.

31. 50 mM Tris-HCl (Gly II aktivitesi): 1.029 gr Tris bir miktar saf suda çözüldükten sonra pH'ı 7.5'e ayarlanarak son hacmi 85 ml'ye tamamlanmıştır.
32. 16 mM MgSO<sub>4</sub> (Gly II aktivitesi): 0.359 gr MgSO<sub>4</sub> tartılıp bir miktar saf suda çözüldükten sonra 50 mM Tris-HCl içerisine eklenir.
33. 300 µM SLG (Gly II aktivitesi): 0.0096 gr SLG tartılıp bir miktar saf suda çözüldükten sonra 50 mM Tris-HCl içerisine eklenir.
34. 3.5 mM MG (Gly II aktivitesi): 45.65 µl MG pipetle 50 mM Tris-HCl içerisine eklenmiştir.
35. 0.5 M perkloroik asit (içsel MG'nin belirlenmesi): 2.600 ml perklorik asit bir miktar saf suya pipetlendirildikten sonra son hacmi 60 ml'ye tamamlandı.
36. 7.2 mM 1.2-diaminobenzene (içsel MG içeriğini belirlenmesi): 0.0155 gr 1.2-diaminobenzene bir miktar saf suda çözüldükten sonra son hacmi 20 ml'ye tamamlanmıştır.
37. 5 M perkloroik asit (içsel MG içeriğini belirlenmesi): 4.317 ml perkloroik asit bir miktar saf suya pipetlenip daha sonra son hacmi 10 ml'ye tamamlanmıştır.
38. %5 TCA (lipid peroksidasyon için) :80 ml saf su içerisine 5 gr TCA ilave edilerek çözülür ve son hacim 100 ml yapılır.
39. %0.5 TBA (lipid peroksidasyon için): 80 ml saf su içine 20 gr TCA çözülür ve daha sonra içerisine %0.5 TBA ilave edilerek iyice çözünmesi sağlanır ve daha sonra son hacmi 100 ml'ye tamamlanmıştır.
40. 65 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (süperoksit anyonu için): 2.653 gr KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> bir miktar saf suda çözüldükten sonra pH 7.8'e ayarlanarak son hacim 300 ml'ye tamamlanır.
41. 65 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (süperoksit anyon içeriği): 170 ml homojenizasyon tamponundan alınıp kullanılmıştır.
42. 10 mM hidroksilamin (süperoksit anyon içeriği): 0.0138 gr hidroksilamin 20 ml saf su içerisinde çözülür.
43. 17 mM aminobenzene sülfanik asit (süperoksit anyon içeriği): 0.294 g4 aminobenzene sülfanik acid 100 ml saf suda çözülür.
44. 17 mM naftilamin (süperoksitanyon içeriği): 0.243 gr naftilamin 100 ml saf su içerisinde çözülür.
45. %5 Ti(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarının belirlenmesi): 1.5 gr Ti(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 200 ml saf suda çözülerek hazırlanmış ve son hacim 30 ml yapılmıştır.

**46.** %19 NH<sub>4</sub>OH (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> belirlenmesi): 10.4 ml NH<sub>3</sub> 40 ml saf suda çözülerek son hacmi 50 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

**47.** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarının belirlenmesinde kullanılan çözelti (2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>): 40 ml %98'lik H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> alınmış ve 50 ml saf su içerisine ilave edildikten sonra son hacim 200 ml'ye tamamlanmıştır.

### **3.3. Yöntemler**

#### **3.3.1. Bitki tohumlarının çimlenmesi ve fide büyümesi**

Bu araştırma için monokotil bir bitki olan mısır (*Zea mays* cv. Arifiye) kullanılmıştır. Bitkiye ait tohumlar, May Tohumculuk AŞ'den temin edilmiştir. Mısır tohumları önce %10'luk çamaşır suyu ile 5 dk ve daha sonra %70'lik alkolle 5 dk steril edildikten sonra saf su ile iyice yıkanarak sterilizasyon işlemi yapıldı. 8 saat şişmeye bırakılan tohumlar 3 gün iklim kabininde çimlendirilmeye bırakıldı. Çimlenen tohumlar, hidroponik sistemde her sepete çimlenmeye müteakib 7. gün Arnon ve Hoagland'ın 1/2 besi ortamına ayarlandı ve 9. gün asetik asitte çözünen kitosan (%0.050 ve %0.100 µM) yapraklara püskürtme yoluyla uygulandı. Uygulamadan 1 gün sonra aynı fide yapraklarına MG (50 ve 100 mM) uygulaması yapıldı. Bu konsantrasyonlar ön denemelerle belirlenmiştir. Kontrol bitkilerine sadece aynı oranda asetik asit içeren saf su uygulaması yapıldı. Bitkilerin kök ve gövde dokuları 13. gün hasat edildi. Alınan doku örnekleri -80°C şartlarında kullanılmak üzere saklandı.

Arnon ve Hoagland'ın tam besin reçetesi hazırlanışı aşağıdaki gibi yapılmıştır.

#### **Hoagland İçeriği;**

#### **Makro Besin Elementleri (100 mL stok için)**

Aşağıda verilen stok çözelti 100 mL hacimde hazırlanır. Bunun için;

- a.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : Gerekli miktar, 2.3 gr
- b.  $\text{KNO}_3$ : Gerekli miktar, 6 gr
- c.  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ : Gerekli miktar, 4.9 gr
- d.  $\text{MgSO}_4$ : Gerekli miktar, 4.9 gr

Yukarıdaki maddeler tartılarak 80 mL saf suda çözüldü ve son hacim 100 ml'ye tamamlandı. 1 L tam besin çözeltisi hazırlamak için bu stok çözeltiden 10 ml kullanılır.

#### **Mikro Besin Elementleri (100 mL stok için)**

- e.  $\text{H}_3\text{BO}_3$  : Gerekli miktar, 0.286 gr
- f.  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  : Gerekli miktar, 0.181 gr
- g.  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  : Gerekli miktar, 0.022 gr
- h.  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  : Gerekli miktar, 0.008 gr
- j.  $\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  : Gerekli miktar, 0.009 gr

Yukarıdaki maddeler tartılarak 80 mL saf suda çözüldü ve son hacim 100 ml'ye tamamlandı. 1 L tam besin çözeltisi hazırlamak için bu stok çözeltiden 1 ml kullanılır.

#### **Demir stok çözeltisi hazırlama**

Bu stok çözeltiyi hazırlamak için 0.74 gr Fe-EDTA alındı ve 40 ml saf suda hafif ısıtılarak çözüldü ve son hacmi 50 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan bu stok çözeltiden 1 L tam besin çözeltisi için 0.5 mL kullanılır (0.5 mL/1 L).

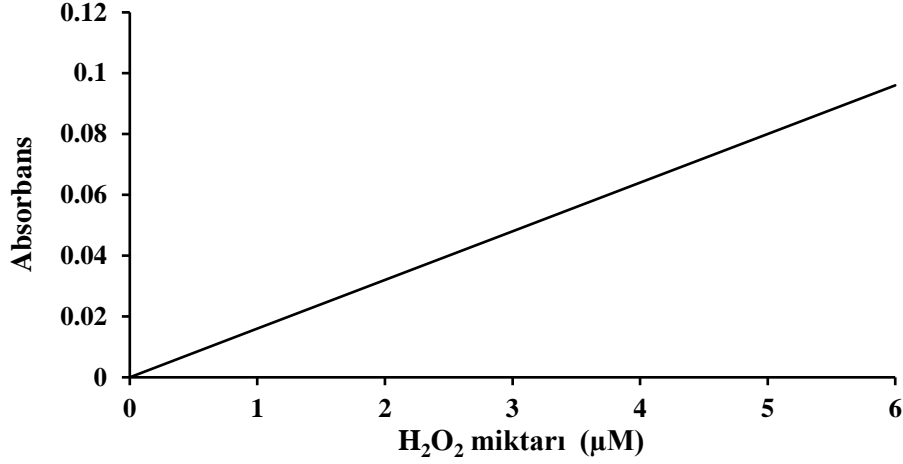
#### **3.3.2. Antiokasidan enzim aktivitelerinin belirlenmesi**

Mısır bitki dokularına ait örnekler (0.5 gr) önce soğuk bir porselen havanda sıvı azot ile un haline gelinceye kadar homojenize edilmiştir. Daha sonra üzerine 5 ml homojenizasyon tamponu (0.1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.0) ilave edilmiş ve doku örneklerinin

iyice parçalanması sağlanmıştır. Elde edilen ekstrakt +4°C’de 15000 rpm’de 15 dk süre ile santrifüj edildikten sonra süpernatant alınmıştır. Aşağıda sunulan tüm antioksidan enzimlerin aktivite deneyleri için bu süpernatant enzim kaynağı kullanılmıştır.

### 3.3.2.a. Katalaz aktivitesinin belirlenmesi

Katalazın (CAT) aktivite tayini için Gong *et al.* (2001) tarafından önerilen metot kullanıldı. Bu metot, CAT’ın ortamdaki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>’nin oksijen ve suya dönüşümü esnasında meydana gelen absorbans değişiminin 240 nm’de belirlenmesi esasına dayanır. Aktivite ölçümü için spektrofotometre küvetine (3 ml), 103 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tamponundan 1.475 ml ve 40 mM’lık H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> substrat çözeltisinden 1.5 ml konulduktan sonra üzerine 25 µl enzim ekstraktı ilave edildi. Spektrofotometrede 240 nm’de 3 dakika boyunca 1 dakika aralıklarla köre karşı absorbans okundu ve absorbansın doğrusal olarak azaldığı aralıktan dakika başına absorbans azalması hesaplandı. Ortalama absorbans değerleri, standart grafik yardımıyla µmol cinsinden H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarına dönüştürüldü. 25°C’de, 1 dakika içinde, absorbansı 1 µmol azaltan enzim miktarı 1 enzim ünitesi olarak kabul edildi ve sonuçlar mg protein başına düşen enzim ünitesi (EU.mg<sup>-1</sup> protein) olarak sunuldu. Standart grafik (Şekil 2.1) hazırlamak için, 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisinden 3 ml’lik spektrofotometre küvetlerine sırasıyla; 0.15, 0.3, 0.45, 0.6, 0.75, 0.9, 1.05, 1.2, 1.35 ve 1.5 ml ilave edildi ve tüplerin hacimleri saf su ile 1.5 ml’ye tamamlandıktan sonra her tüpe 1.47 ml 103.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ve 30 µl saf su ilave edildi. Hazırlanan karışımın absorbansı 240 nm’de spektrofotometrede köre karşı okundu ve absorbans değerlerine karşılık gelen µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> değerleri kullanarak standart grafik elde edildi.



**Şekil 3.1.** CAT aktivitesi ölçümü için kullanılan standart grafik

### 3.3.2.b. Askorbat peroksidaz aktivitesinin belirlenmesi

Aktivite için reaksiyon karışımı (3 ml), 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tamponu (pH 7.0) içinde 0.5 mM askorbik asit (ASA), 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0.1 mM EDTA içermelidir. Spektrofotometre küvetine reaksiyon karışımından 2.90 ml pipetlenir ve üzerine 50 µl enzim özütü eklenerek reaksiyon başlatıldı. Reaksiyonda absorbansı, 1 dakika aralıklarla 3 dakika süresince 290 nm'de takip edildi. Bir ünite APX aktivitesi 25°C'de 1 dk içinde 1 µmol askorbik asidi oksitlemek için gerekli enzim miktarı olarak tanımlanır (Wang *et al.* 2010). APX aktivitesi için spesifik aktivite aşağıdaki formüle göre hesaplanır.

Spesifik aktivite (µmol dehidroaskorbat/mg protein/dk) = ( $[\Delta A_{290 \text{ nm}}/2.8]/\text{mg protein}$ ).  
Sonuçlar EU.mg<sup>-1</sup> protein olarak ifade edildi. Formülde 2.8 enzim eksitinksiyon katsayısıdır.

### 3.3.2.c. Glutasyon redüktaz aktivitesinin belirlenmesi

Glutasyon redüktaz (GR) aktivitesi Foyer ve Halliwell (1976)'e göre spektrofotometrik olarak belirlendi. Enzim substratı olarak 1 mM oksitlenmiş glutasyon (GSSG) ve 0.25 mM NADPH kullanılmıştır. GSSG'nin enzim ile indirgenmesinde indirgeyici güç olarak NADPH kullanılır. Enzim aktivitesinin belirlenmesinde, 50 mM Tris-HCl (pH 7.8)

tamponu içinde 200 µl 0.5 mM EDTA, 500 µl NADPH ve 250 µl GSSG içeren reaksiyon karışımına (2.95 ml) 50 µl enzim özütü pipetlendi. Ortamda NADPH'ın oksidasyonu 340 nm'de 5 dakika süreyle absorbans azalması ölçülerek belirlenir. GR aktivitesi EU.mg<sup>-1</sup> protein olarak ifade edildi. Enzim ünitesi aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\text{EU/ml} = [(\text{Ortalama OD/dk}) \times 3] / (6.22 \times 0.1) \quad (3.1)$$

OD : Ölçülen absorbans

6.22: Eksitinksiyon katsayısı

0.1 : Doku örneği

3 : Total hacim

### 3.3.2.d. Süperoksid dismutaz aktivitesinin belirlenmesi

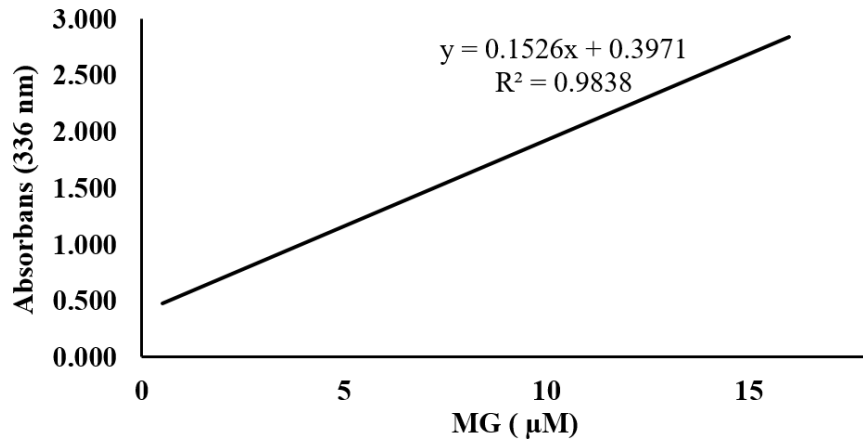
SOD aktivitesi, nitro blue tetrazoliumun (NBT) süperoksit radikalleri ile mavi renkli formazona fotokimyasal olarak indirgenmesi reaksiyonunun SOD enzimi tarafından engellenmesinin belirlenmesi temeline dayanır (Yordanova *et al.* 2004). Reaksiyon karışımında (3 ml); 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.8), 13 mM metiyonin, 75 µM NBT, 2 µM riboflavin ve 0.1 mM EDTA bulunmaktadır. Aktivite ölçümü için 3 ml spektrofotometre küvetine yukarıdaki riboflavin içermeyen reaksiyon karışımından 2.58 ml alınıp üzerine 30 µl enzim ekstraktı ilave edildi. Reaksiyon, tüp üzerine 100 µM'lık riboflavin çözeltisinden 60 µl pipetlenip karıştırıldıktan sonra, beyaz bir ışık kaynağı (30 W) önüne yerleştirmek suretiyle başlatıldı. Tüp, ışık kaynağında 15 dk bekletilir ve reaksiyon ışık kaynağının kapatılmasıyla durdurulur. Sonunda 15 dk içerisinde NBT'nin renk açılma yoğunluğu 560 nm'de köre karşı okunur. SOD aktivitesinin 1 ünitesi, 560 nm'de gözlenen NBT indirgenmesinin %50 inhibisyonuna neden olan enzim miktarı, 1 enzim ünitesi olarak kabul edildi ve değerler EU.mg<sup>-1</sup> protein olarak sunulmuştur.

### 3.3.2.e. Guaiakol peroksidaz aktivitesinin belirlenmesi

Aktivite için reaksiyon karışımı 2.90 ml 0.1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7) tamponu içinde 5 mM guaikol ve 15 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içermelidir. Reaksiyon enzim özütünden 10 µl eklenerek başlatılır. Reaksiyonun absorbansı, 470 nm'de 5 dakika boyunca absorbans artışı olarak kaydedilir. Hesaplama için doğrusal artışın gerçekleştiği aralık kullanılır ve 1 dk boyunca 25 °C'de absorbans seviyesini 0.01 arttıran enzim miktarı, 1 enzim ünitesi olarak kabul edilir ve elde edilen sonuç EU/mg proteini olarak verilir (Ye *et al.* 2002).

### 3.3.3. İçsel metilglioksal (MG) içeriğinin belirlenmesi

Taze bitki dokusu (0.5 gr) sıvı azotla bir havan içinde iyice öğütülür. Ekstrakt içine 2.5 ml 0.5 M perklorik asit ilave edilir ve 4°C'de santrifüjlenir (12000 rpm). Ekstrakt 15 dk oda sıcaklığında tutulur ve tekrar aynı şartlarda santrifüjlenir. Süpernatant bir tüpe alınır ve MG ölçümü için hazırlanır. Reaksiyon karışımı, 250 µl-7.2 mM 1,2-diaminobenzene, 100 µl-5 M perklorik asit ve 650 µl süpernatanttan oluşur. Oda sıcaklığında 30 dk sonra karışımın absorbansı 336 nm de okunur (Kalapos 1999).



Şekil 3.2. İçsel MG içeriği için kullanılan standart grafik

### **3.3.4. Glioksalaz I ve glioksalaz II enzim aktivitelerinin belirlenmesi**

#### **3.3.4.a. Glioksalaz I**

Taze bitki örnekleri (0.5 gr) sıvı azotla bir havan içinde iyice öğütülür. Ekstraksiyon, pH 7.0 olan 2.5 ml 100 mM sodyum fosfat tamponu (%50 gliserol, 16 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.2 mM PMSF ve %0.2 PVP'den içermelidir) içinde iyice homojenize edilerek tamamlanır. Elde edilen özüt 4°C'de santrifüjlenir (12000 rpm). Süpernatant aktivite ölçümü için kullanılır. Reaksiyon karışımı, pH 7.5 olan 100 mM sodyum fosfat (mono bazik) tamponundan (tampon 3.5 mM MG, 1.7 mM GSH, 16 mM MgSO<sub>4</sub>'den içermelidir) oluşmaktadır. Karışımın absorbanı 240 nm'de köre karşı ölçülür (Kalapos 1999).

#### **3.3.4.b. Glioksalaz II**

Taze bitki örnekleri (0.5 gr) sıvı azotla bir havan içinde iyice öğütülür. Özüt üstüne pH 7.0 olan 2.5 ml 100 mM sodyum fosfat tamponu (%50 gliserol, 16 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.2 mM PMSF ve %0.2 PVP içermelidir) eklenerek iyice homojenize edilir ve 4°C'de santrifüjlenir (12000 rpm). Reaksiyon karışımı, 3 ml 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) tamponundan (3.5 mM MG, 300 µM SLG, 16 mM MgSO<sub>4</sub> içermelidir) oluşmaktadır. Karışımın absorbanı 240 nm'de ölçülür (Kalapos 1999).

### **3.3.5. Lipid peroksidasyonu (MDA olarak) içeriğinin belirlenmesi**

Lipid peroksidasyonu seviyesinin belirlenmesi için 0.5 gr doku 5 ml %5 TCA içinde homojenize edildikten sonra elde edilen homojenat 12000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilir. Tüpün süpernatant kısmından 4 ml alınarak üzerine 1 ml %0.5 TBA çözeltisi ilave edilir. Reaksiyon karışımı kaynar su banyosunda 30 dakika inkübe edilir ve reaksiyon tüplerin buz banyosuna alınmasıyla sonlandırılır. Örnekler tekrar 10000 rpm'de 10 dk santrifüj edilir. Örneklerin süpernatant kısmı alınarak absorbanı 532 nm'de okunur ve daha sonra 600 nm'deki non-spesifik absorpsiyon için absorbanı değeri belirlenir.

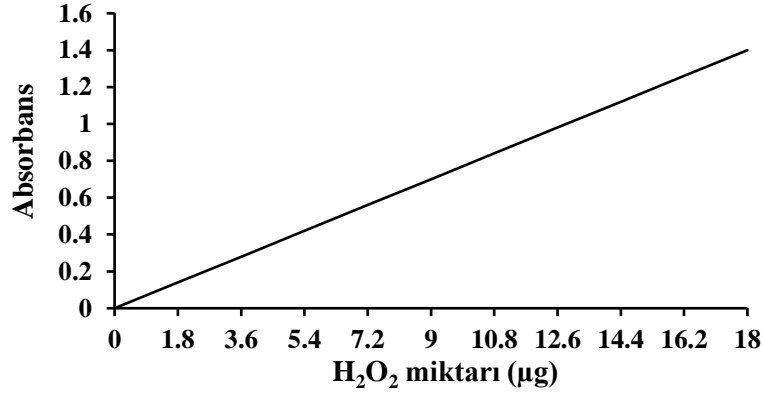
Sonuçlar MDA (nmol/ml) şeklinde verilir (Ananieva *et al.* 2002). MDA miktarının belirlenmesinde aşağıdaki formül kullanılır.

$$\text{MDA (nmol/ml): } [ [(A532-A600)-(A440-A600) \times (0.0571) ] ] / 157000 ] \times 10^6 \quad (3.2)$$

### 3.3.6. Hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) miktarının belirlenmesi

Taze bitki dokularından 0.5 gr doku örneği sıvı azotla bir porselen havanda iyice homojenize edilir. Daha sonra homojenizasyon 5 ml soğuk aseton (-20°C) ile tamamlanır. Homojenat ependorf tüplere alınarak +4°C'de 12000 rpm'de 15 dk santrifüj edilir. Santrifüj sonrası süpernatanttan 1.5 ml alınarak üzerine sırayla %5'lik Ti(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>'dan 0.15 ml ve %19'luk NH<sub>4</sub>OH'dan 0.3 ml ilave edilerek iyice karıştırılmıştır. Pelet oluştuktan sonra karışım +4°C'de 8500 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı dikkatli bir şekilde atıldıktan sonra kalan pelet üzerine 2 M'lık H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çözeltisinden 3 ml eklenip karıştırılır ve çözülen peletin absorbanı 415 nm'de ölçülür (Xu

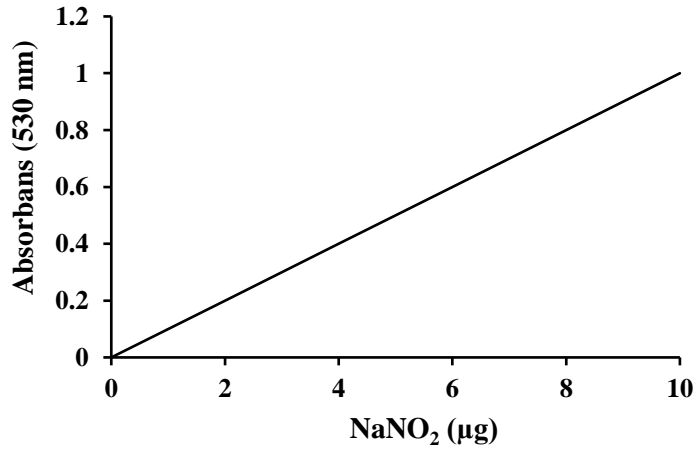
*et al.* 2006). Hesaplama için standart grafik hazırlamak için 3 mM'lık %35'lik H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stok çözeltisi kullanıldı. Stok çözeltiden tüplere sırasıyla 3.6, 7.2, 10.8, 14.4, 18, 21.6, 25.2, 28.8, 32.4 ve 36 ng H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeren hacimler alınmış ve üzerleri soğuk aseton ile 1.5 ml'ye tamamlandı. Bundan sonra, karışıma 0.15 ml %5'lik Ti(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> ve 0.3 ml %19'luk NH<sub>4</sub>OH ilave edilmiştir. Tüp içide çökelek oluştuktan sonra +4°C'de 8.500 rpm'de 15 dk daha santrifüj edilmiştir. Süpernatantı atılan tüplerdeki peletin üzerine 3 ml 2 M'lık H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> eklenip çözüldükten sonra absorbanı 415 nm'de köre karşı okunmuştur. Her bir absorbansa karşılık gelen µg H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> değerlerinden faydalanarak standart grafik oluşturulur.



**Şekil 3.3.** Hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) miktarını belirlemede kullanılan standart grafik

### 3.3.7. Süperoksit anyonu miktarının belirlenmesi

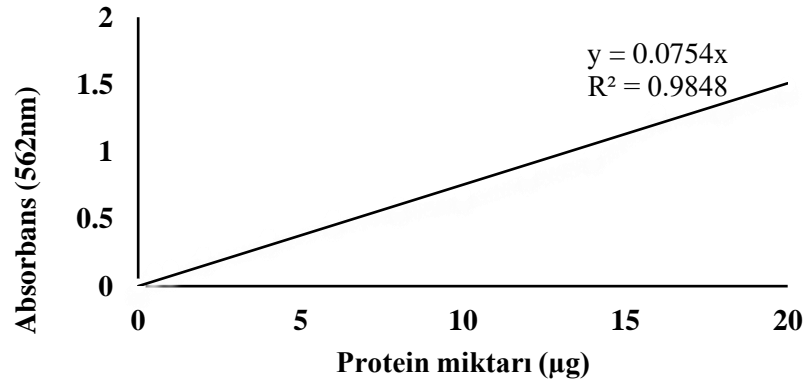
Mısır fidelerine ait taze doku örnekleri (0.5 gr) 2 ml 65 mM soğuk fosfat tamponunda (pH 7.8) homojenize edilir. Homojenat 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir. Reaksiyon karışımı, 1 ml süpernatant üzerine 0.9 ml fosfat tamponu ve 0.1 ml 10 mM hidroksilamin hidroklorid eklenir. Çözelti iyice karıştırılır ve 20 dakika 25°C'de inkübe edilir. Daha sonra bu karışımdan 1 ml üzerine 1 ml 17 mM aminobenzen sulfonik asid ve 1 ml 17 mM 1-naphtylamme eklenir karıştırılır. Örnekler 20 dakika 25°C'de inkübe edilir ve üzerine 3 ml n-butilalkol eklendikten sonra absorbansları bir UV-spektrofotometrede 530 nm'de belirlenir. Standart grafik için farklı miktardaki NO<sub>2</sub>'nin 530 nm'deki absorbansı belirlenerek yapılır (Şekil 3.3).



**Şekil 3.4.** Süperoksit anyon (O<sub>2</sub><sup>\*</sup>) içeriğini belirlemede kullanılan standart grafik

### 3.3.8. Protein tayini

Yapraklar (0.5 gr) sıvı azotla bir havanda iyice öğütüldükten sonra 2.5 ml 100 mM fosfat tamponunda (pH 6.75) iyice homojenize edildi ve homojenat 15.000 rpm'de 15 dk boyunca santrifüj edildi. Protein tayini için elde edilen berrak süpernatant kullanıldı. Bu süpernatanttan 20 µl alınıp, 200 µl BCA (Bicinchoninic asit+CuSO<sub>4</sub>) reaktifiyle karıştırıldı ve 60°C'de 15 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası oda ısısına gelen örneklerin absorbansları 562 nm'de köre karşı okundu. Örneklerdeki protein miktarını hesaplamak için gerekli standart grafik şöyle hazırlandı; 1 ml'sinde 1 mg saf protein içeren standart sığır albümin (BSA) çözeltisinden 5-20 µg protein içeren hacimler bir mikro pleyt kuyucuklarına yüklendi ve bütün tüplerin hacimleri saf su ile 20 µl'ye ayarlandı. Tüplerin her birine 200 µl BCA reaktifi ilave edilip karıştırıldı. Kör numune olarak 200 µl BCA reaktifi ve 20 µl saf su kullanıldı kullandı. Hazırlanan pleyt 60°C'de 15 dk inkübe edildi ve sonra örneklerin absorbansları 562 nm'de köre karşı okundu. Yapılan ölçümler sonunda, 562 nm'deki absorbans değerlerine karşılık gelen protein miktarları kullanılarak standart grafik elde edildi (Şekil 3.4).



Şekil 3.5. Çözünabilir protein miktarı tayini için kullanılan standart grafik

### 3.3.9. Klorofil içeriğinin belirlenmesi

Buğday bitkisinin yapraklarında ki klorofil a, klorofil b, karotenoid ve toplam pigment miktarlarını belirlemek için Witham *et al.* (1971) tarafından verilen prosedür uygulandı.

Buğday bitkisinden alınan yaprak örnekleri 1'er gram olacak şekilde tartıldı ve %80'lik soğuk aseton içerisinde son hacim 10 ml olacak şekilde homojenize edildi. Daha sonra homojenat filtre kağıdından süzülerek elde edilen ekstrakt 3000 rpm 'de 5 dk. santrifüj edildi. Daha sonra süpernatantlar alınarak 450, 645 ve 663 nm 'de absorbans değerleri kaydedildi. Süpernatantların üç farklı dalga boyunda kaydedilen absorbans değerleri aşağıda verilen eşitliklerde yerine konulmasıyla bitki yaprak dokusunun 1 g 'da bulunan klorofil a, klorofil b, total klorofil ve karotenoid miktarları mg/doku olarak hesaplandı.

$$\text{mg/klorofil a/g doku} = ((12,7 * (D663) - 2,69 * (D645)) * (V/1000 * W)) \quad (3.3)$$

$$\text{mg klorofil b/g doku} = ((22,9 * (D645) - 4,68 * (D663)) * (V/1000 * W)) \quad (3.4)$$

$$\text{mg toplam klorofil/g doku} = ((20,2 * (D645) + 8,02 * (D663)) * (V/1000 * W)) \quad (3.5)$$

$$\text{mg toplam karotenoid / g doku} = (4,07 * D450) - (0,0435 * \text{kl a miktarı} + 0,367 * \text{kl b miktarı}) \quad (3.6)$$

Eşitliklerde;

D: Klorofil ekstraktının belirtilen dalga boylarındaki absorbans değerini,

V: %80'lik asetonun son hacmini,

W: Ekstre edilen dokunun gram olarak yaş ağırlığını göstermektedir.

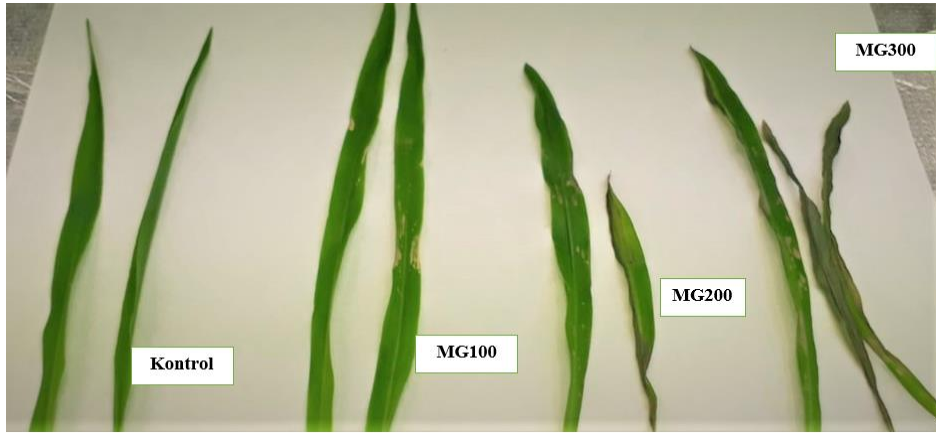
### 3.3.10. İstatistik analiz

Çalışmada sunulan veriler, her bir uygulama grubunda üç bağımsız örnek (3 paralel) ve her bir örnekten 2 tekrar yapıldıktan sonra elde edilen 6 değerlerin ortalamasıdır. Verilerin karşılaştırılması, SPSS 18 paket programı kullanılarak tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile yapılmış ve gruplar arasındaki farklılıklar  $p < 0.05$  hata seviyesinde Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma Testi kullanılarak belirlenmiştir.

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Çalışmada kullanılan MG ve kitosan konsantrasyonları yapılan ön deneme çalışmalarına göre belirlenmiştir. Bunun için mısır tohumları, MG'nin 0.1, 0.25, 0.50, 1, 3, 4, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 200, 300 mM ve kitosanın %0.015, %0.05, %0.1 konsantrasyonlarında ayrı ayrı bir hidroponik ortamda çimlenme ve büyümeleri sağlandı. Bu deney sonunda 13.gün kök ve gövdeleri (sürgünün tamamı) hasat edildi. Bu örneklerden kök gövde uzunluğu, klorofil, LPO (MDA olarak) bazı önemli fizyolojik parametrelere göre, MG için 50 ve 100 mM; kitosan için %0.05 ve %0.1 (w/v) konsantrasyonlar belirlendi. Çalışmada aşağıdaki deneme deseni oluşturulmuştur.

Kontrol	: Genel kontrol
C <sub>0.05</sub>	: %0.05 kitosan uygulaması
C <sub>0.1</sub>	: %0.1 kitosan uygulaması
MG <sub>50</sub>	: 50 mM MG uygulaması
MG <sub>100</sub>	: 100 mM MG uygulaması
C <sub>0.05</sub> + MG <sub>50</sub>	: %0.05 kitosan ve 50 mM MG uygulaması
C <sub>0.05</sub> + MG <sub>100</sub>	: %0.05 kitosan ve 100 mM MG uygulaması
C <sub>0.1</sub> + MG <sub>50</sub>	: %0.1 kitosan ve 50 mM MG uygulaması
C <sub>0.1</sub> + MG <sub>100</sub>	: %0.1 kitosan ve 100 mM MG uygulaması

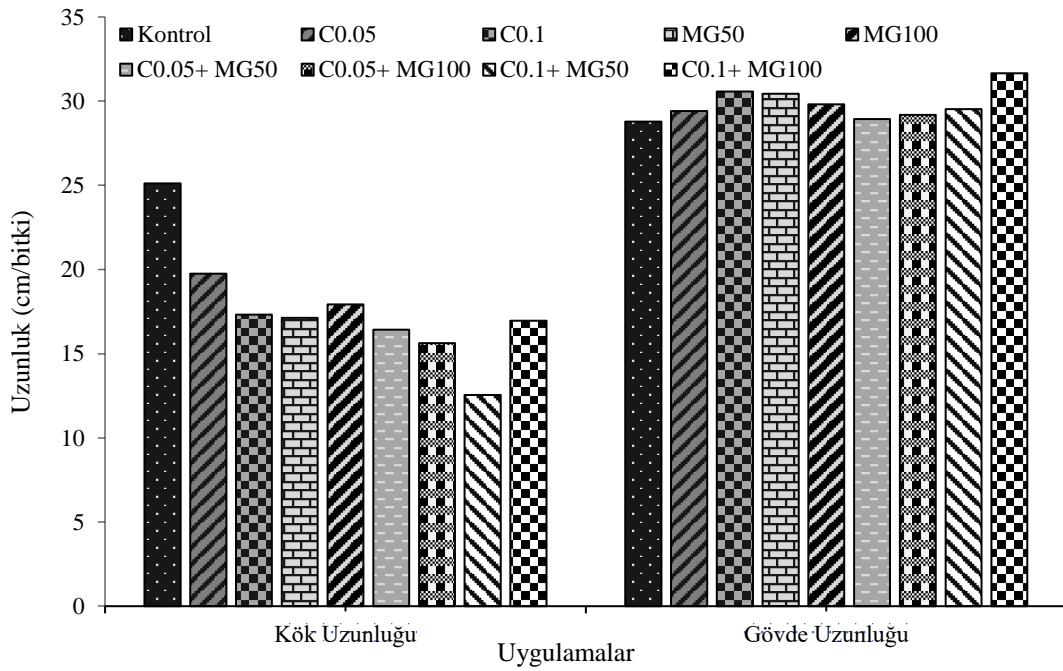


**Şekil 4.1.** MG uygulanmış fidelerin yaprak görünüşleri

#### 4.1. Kök ve Gövde Uzunluklarına Ait Bulgular

Bitki boy uzunlukları  $C_{0.05}$  ve  $C_{0.1}$  uygulama grupları kontrole göre kökte azalmış gövdede ise artmıştır. Tek başına MG konsantrasyonları kontrole göre kökte boy uzunluğunu anlamlı azaltırken, gövdede artırmıştır.  $C_{0.05}+MG_{50}$  ve  $C_{0.1}+MG_{50}$  uygulamaları  $MG_{50}$  konsantrasyonuna göre kökte ve gövdede boy uzunluğunu önemli derecede azalmıştır ( $p<0.05$ ).  $C_{0.05}+MG_{100}$  ve  $C_{0.1}+MG_{100}$  konsantrasyonları  $MG_{100}$  uygulamasına göre kökte boy uzunluklarını anlamlı azalmıştır. Gövde de ise en önemli artışı  $C_{0.1}+MG_{100}$  uygulaması yapmıştır (Şekil 4.2 ve 4.3).

Çalışmamızda tek başına kitosan ve MG uygulamaları boy uzunluklarını kökte azaltmış gövdede artırmıştır.



Şekil 4.2. Bitki boy uzunluklarının şekil üzerinde gösterilmesi

**Çizelge 4.1.** Kök ve gövde uzunluklarına ait bulgular

Uygulamalar	Kök (cm/bitki)	Gövde (cm/bitki)
Kontrol	25.12 ± 0.06 <sup>a</sup>	28.79 ± 0.14 <sup>e</sup>
C <sub>0.05</sub>	19.77 ± 0.04 <sup>b</sup>	29.41 ± 0.36 <sup>cde</sup>
C <sub>0.1</sub>	17.32 ± 0.05 <sup>d</sup>	30.58 ± 0.99 <sup>b</sup>
MG <sub>50</sub>	17.13 ± 0.75 <sup>e</sup>	30.44 ± 0.14 <sup>b</sup>
MG <sub>100</sub>	17.93 ± 0.38 <sup>c</sup>	29.81 ± 0.11 <sup>c</sup>
C <sub>0.05</sub> +MG <sub>50</sub>	16.42 ± 0.64 <sup>g</sup>	28.95 ± 0.46 <sup>de</sup>
C <sub>0.05</sub> +MG <sub>100</sub>	15.63 ± 0.68 <sup>h</sup>	29.18 ± 0.58 <sup>cde</sup>
C <sub>0.1</sub> +MG <sub>50</sub>	12.55 ± 0.5 <sup>i</sup>	29.53 ± 0.35 <sup>cde</sup>
C <sub>0.1</sub> +MG <sub>100</sub>	16.96 ± 0.4 <sup>f</sup>	31.66 ± 0.16 <sup>a</sup>

Aynı harflerle gösterilen değerler arasındaki fark Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma Testine göre P<0.05 hata seviyesinde önemsizdir. ± standart hatayı gösterir.

#### 4.2. Yaş ve Kuru Ağırlıklarına Ait Bulgular

Tek başına kitosan uygulamalarından C<sub>0.05</sub> kontrole göre yaş ağırlığı gövdede önemli bir seviyede azaltmış, kökte artmıştır (p<0.05). Yaş ağırlık C<sub>0.1</sub> uygulamasında ise gövdede ve kökte artmıştır. Kontrole göre MG<sub>50</sub> uygulaması hem kökte hem de gövdede anlamlı artışa neden olmuştur. MG<sub>100</sub> uygulaması ise yaş ağırlık gövdede azalırken, kökte artmıştır (p<0.05). C<sub>0.05</sub>+MG<sub>50</sub>, C<sub>0.1</sub>+MG<sub>50</sub> uygulamaları MG<sub>50</sub> konsantrasyonuna göre yaş ağırlıkları kökte düşürmüş, gövdede artmıştır (p<0.05). C<sub>0.1</sub>+ MG<sub>100</sub> ve C<sub>0.05</sub>+ MG<sub>100</sub> uygulamaları yaş ağırlıkları MG<sub>100</sub> konsantrasyonuna göre gövdede ve kökte artmıştır.

Kuru ağırlık verileri incelendiğinde (Çizelge 4.2), C<sub>0.05</sub> ve C<sub>0.1</sub> uygulamaları kontrole göre kuru ağırlıkları gövdede önemsiz (p>0.05) kökte önemli (p<0.05) seviyede azaltmıştır. Tek başına MG<sub>50</sub> uygulaması kontrole göre kuru ağırlığı gövdede artırmış, ancak kökte düşürmüştür. MG<sub>100</sub> uygulamasında, kontrole göre kuru ağırlık kök ve gövdede azalmıştır. Kuru ağırlık, C<sub>0.1</sub>+MG<sub>50</sub> ve C<sub>0.1</sub>+MG<sub>50</sub> uygulamalarında, MG<sub>50</sub> uygulamasına göre, gövdede düşmüştür. Kökte ise C<sub>0.05</sub>+MG<sub>50</sub> uygulamasında artmış ancak C<sub>0.1</sub>+MG<sub>50</sub> uygulamasında düşmüştür. Buna karşılık, C<sub>0.05</sub>+MG<sub>100</sub> ve C<sub>0.1</sub>+MG<sub>100</sub> uygulamalarında

MG<sub>100</sub> uygulamasına göre kökte artmıştır. Gövdede ise C<sub>0.1</sub> MG<sub>100</sub> uygulaması önemsiz artışa neden olurken, C<sub>0.1</sub>+MG<sub>50</sub> uygulamasında önemli artış belirlenmiştir (p<0.05) (Çizelge 4.2).

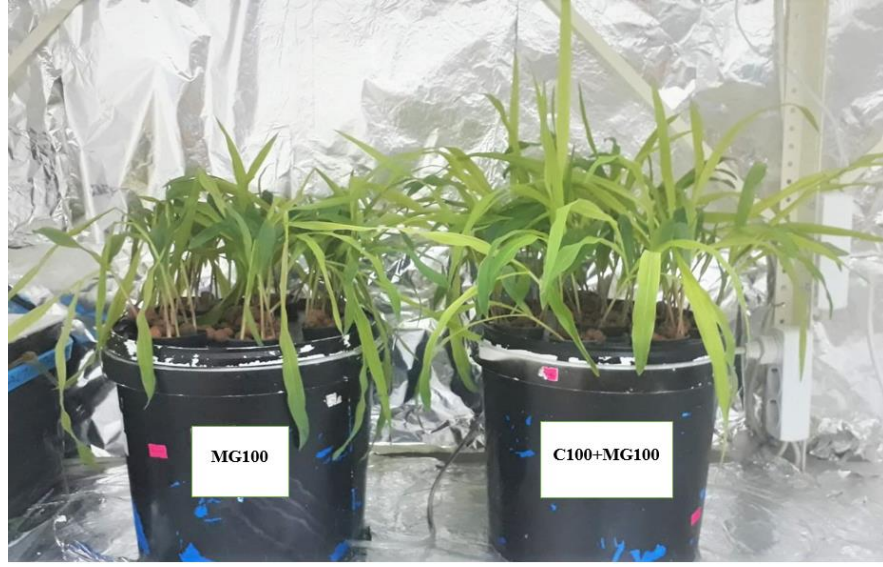
**Çizelge 4.2.** Bitki kuru ve yaş ağırlıklarına ait bulgular

Uygulamalar	Yaş Ağırlık (gr/bitki)		Kuru Ağırlık (gr/bitki)	
	Gövde	Kök	Gövde	Kök
Kontrol	0.792±0.0014 <sup>bc</sup>	0.213±0.0014 <sup>h</sup>	0.058 ± 0.0005 <sup>b</sup>	0.043 ± 0.0003 <sup>a</sup>
C <sub>0.05</sub>	0.685±0.0028 <sup>f</sup>	0.306±0.0006 <sup>g</sup>	0.054 ± 0.0003 <sup>cd</sup>	0.041 ± 0.0005 <sup>b</sup>
C <sub>0.1</sub>	0.806±0.0036 <sup>b</sup>	0.413±0.0001 <sup>d</sup>	0.056 ± 0.0010 <sup>bc</sup>	0.031 ± 0.0005 <sup>d</sup>
MG <sub>50</sub>	0.855±0.0022 <sup>a</sup>	0.396±0.0088 <sup>e</sup>	0.061 ± 0.0003 <sup>a</sup>	0.028 ± 0.0005 <sup>e</sup>
MG <sub>100</sub>	0.711±0.0041 <sup>e</sup>	0.392±0.0088 <sup>f</sup>	0.052 ± 0.0005 <sup>e</sup>	0.028 ± 0.0005 <sup>e</sup>
C <sub>0.05</sub> +MG <sub>50</sub>	0.813±0.0012 <sup>b</sup>	0.450±0.0025 <sup>b</sup>	0.044 ± 0.0005 <sup>f</sup>	0.034 ± 0.0005 <sup>e</sup>
C <sub>0.05</sub> +MG <sub>100</sub>	0.777±0.0012 <sup>cd</sup>	0.486±0.0088 <sup>a</sup>	0.057 ± 0.0011 <sup>b</sup>	0.041 ± 0.0008 <sup>ab</sup>
C <sub>0.1</sub> +MG <sub>50</sub>	0.765±0.0015 <sup>d</sup>	0.444±0.0020 <sup>e</sup>	0.052 ± 0.0008 <sup>de</sup>	0.022 ± 0.0008 <sup>f</sup>
C <sub>0.1</sub> +MG <sub>100</sub>	0.732±0.0014 <sup>e</sup>	0.442±0.0005 <sup>c</sup>	0.062 ± 0.0005 <sup>a</sup>	0.031 ± 0.0008 <sup>e</sup>

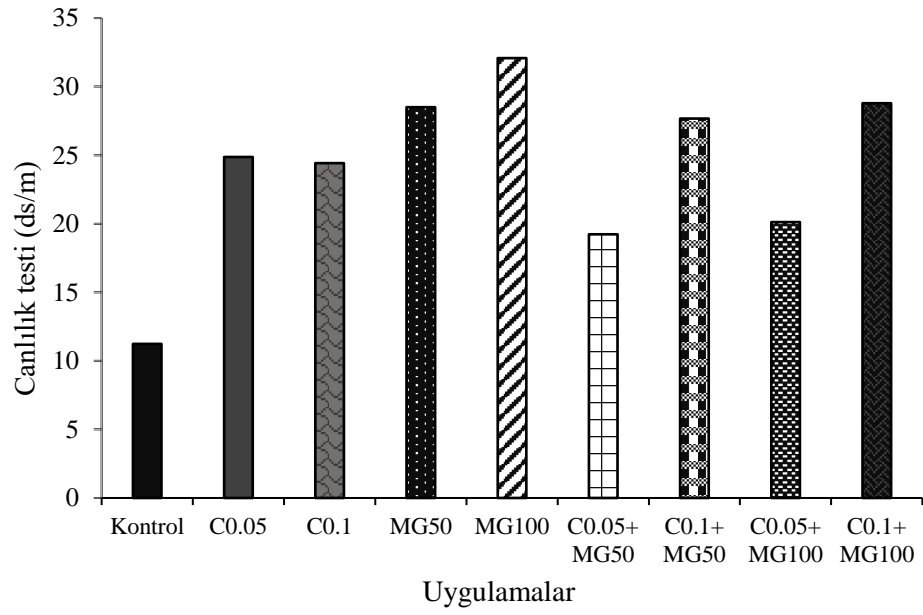
Aynı harflerle gösterilen değerler arasındaki fark Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma Testine göre P<0.05 hata seviyesinde önemsizdir. ± standart hatayı gösterir.

### 4.3. Hücre Zarındaki Elektrolit Sızıntısına Ait Bulgular (Canlılık Testi)

Hücre zarından elektrolit sızıntısı, kontrole göre tek başına kitosan ve MG uygulamalarında artmıştır. C<sub>0.05</sub>+MG<sub>50</sub> ve C<sub>0.1</sub>+MG<sub>50</sub> uygulamaları MG<sub>50</sub> konsantrasyonuna göre elektrolit sızıntısı azalmıştır (p<0.05). C<sub>0.05</sub>+MG<sub>100</sub> ve C<sub>0.1</sub>+MG<sub>100</sub> uygulamaları MG<sub>100</sub> uygulamasına göre hücre zarından elektrolit sızıntısı düşmüştür (Şekil 4.3, 4.4 ve Çizelge 4.3).



Şekil 4.3. MG ve kitosan uygulanmış bitkilerin genel görünümü



Şekil 4.4. Hücre zarındaki elektrolit sızıntısı verilerinin şekil üzerinde gösterilmesi

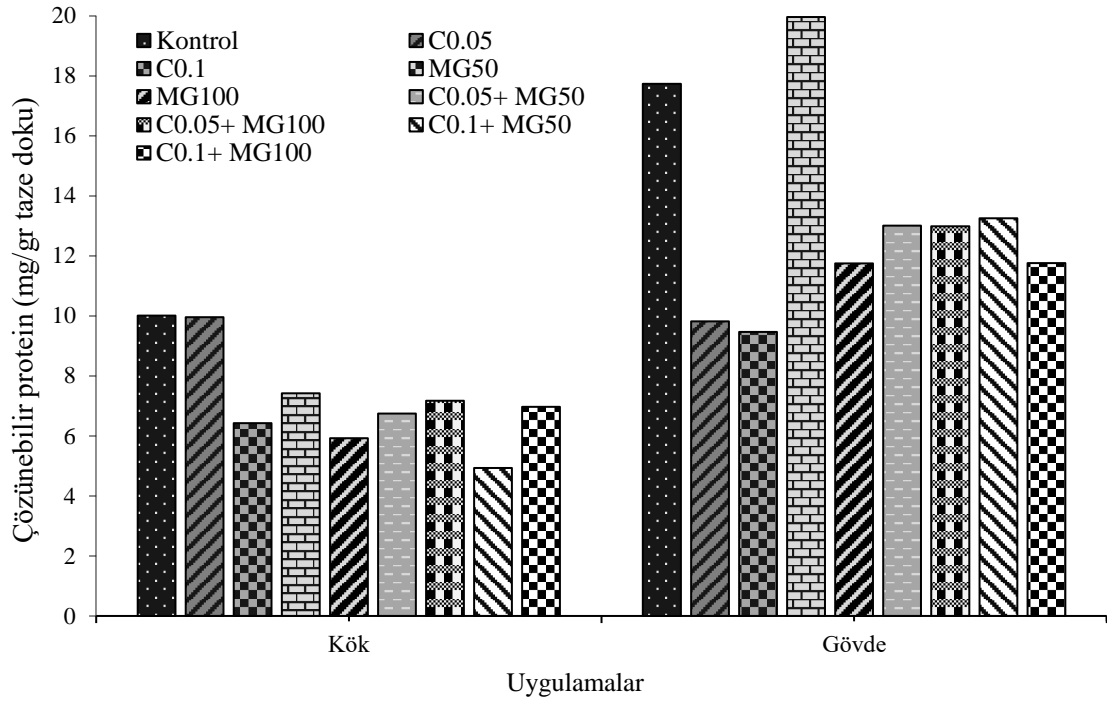
**Çizelge 4.3.** Hücre zarındaki elektrolit sızıntısı (canlılık testi)

Uygulamalar	Gövde (ds/m)
Kontrol	11.24 ± 0.0260 <sup>h</sup>
C <sub>0.05</sub>	24.87 ± 0.291 <sup>d</sup>
C <sub>0.1</sub>	24.42 ± 0.064 <sup>e</sup>
MG <sub>50</sub>	28.50 ± 0.050 <sup>b</sup>
MG <sub>100</sub>	32.08 ± 0.080 <sup>a</sup>
C <sub>0.05</sub> +MG <sub>50</sub>	19.23 ± 0.012 <sup>g</sup>
C <sub>0.05</sub> +MG <sub>100</sub>	27.67 ± 0.040 <sup>c</sup>
C <sub>0.1</sub> +MG <sub>50</sub>	20.12 ± 0.025 <sup>f</sup>
C <sub>0.1</sub> +MG <sub>100</sub>	28.79 ± 0.017 <sup>b</sup>

Aynı harflerle gösterilen değerler arasındaki fark Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma Testine göre P<0.05 hata seviyesinde önemsizdir. ± standart hatayı gösterir.

#### 4.4. Çözünebilir Protein Miktarına Ait Bulgular

Kontrole göre, C<sub>0.05</sub> uygulaması kökte önemsiz bir artış gövdede ise önemli bir azalış göstermiştir. C<sub>0.1</sub> uygulaması kökte %37-38 gövdede ise %46-47 azaltmıştır. MG<sub>50</sub> kökte anlamlı azalırken gövdede ise anlamlı artış göstermiştir (p<0.05). MG<sub>100</sub> uygulaması kontrole göre kökte nerdeyse yarı yarıya bir azalma gövdede önemli oranda azalış göstermiştir. C<sub>0.05</sub>+MG<sub>50</sub> ve C<sub>0.1</sub>+ MG<sub>50</sub> uygulamaları MG<sub>50</sub> ile kıyasla hem kökte hem de gövdede önemli azalış göstermiştir (p<0.005). C<sub>0.05</sub>+ MG<sub>100</sub> ve C<sub>0.1</sub>+ MG<sub>100</sub> uygulamaları ise MG<sub>100</sub> göre C<sub>0.05</sub>+ MG<sub>100</sub> uygulaması kökte azalmış gövdede artmıştır. C<sub>0.1</sub>+ MG<sub>100</sub> uygulaması ise kökte artmış gövdede ise değişmemiştir.



Şekil 4.5. Protein miktarına ait bulguların şekil üzerinde ifadesi

Çizelge 4.4. Kök ve gövdede protein miktarına ait bulgular

Uygulama	Kök (mg/gr doku)	Gövde (mg/gr doku)
Kontrol	10.01 ± 0.124 <sup>a</sup>	17.73 ± 0.145 <sup>a</sup>
C <sub>0.05</sub>	9.96 ± 0.857 <sup>a</sup>	9.82 ± 0.956 <sup>d</sup>
C <sub>0.01</sub>	6.43 ± 0.448 <sup>e</sup>	9.46 ± 0.477 <sup>e</sup>
MG <sub>50</sub>	7.42 ± 0.545 <sup>b</sup>	19.96 ± 0.881 <sup>b</sup>
MG <sub>100</sub>	5.92 ± 0.721 <sup>f</sup>	11.75 ± 0.144 <sup>c</sup>
C <sub>0.05</sub> +MG <sub>50</sub>	6.74 ± 0.144 <sup>d</sup>	13.01 ± 0.726 <sup>b</sup>
C <sub>0.1</sub> +MG <sub>50</sub>	7.17 ± 0.093 <sup>c</sup>	12.99 ± 0.052 <sup>b</sup>
C <sub>0.05</sub> +MG <sub>100</sub>	4.93 ± 0.003 <sup>g</sup>	13.25 ± 0.125 <sup>b</sup>
C <sub>0.1</sub> +MG <sub>100</sub>	6.97 ± 0.042 <sup>cd</sup>	11.76 ± 0.702 <sup>c</sup>

Aynı harflerle gösterilen değerler arasındaki fark Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma Testine göre  $P < 0.05$  hata seviyesinde önemsizdir.  $\pm$  standart hatayı gösterir.

#### 4.5. Toplam Pigment Miktarına Ait Bulgular

Tek başına kitosan ve MG uygulamaları kontrole oranla toplam klorofil miktarı ve toplam karotenoid miktarı azalmıştır. C<sub>0.05</sub>+ MG<sub>50</sub> ve C<sub>0.1</sub>+ MG<sub>50</sub> uygulamaları MG<sub>50</sub> uygulamasına göre toplam klorofil ve toplam karotenoid miktarını önemli oranda artırmıştır. C<sub>0.05</sub>+ MG<sub>100</sub> ve C<sub>0.1</sub>+ MG<sub>100</sub> uygulamaları ise MG<sub>100</sub> toplam karotenoid miktarını önemli artırmıştır (p<0.05). Fakat C<sub>0.05</sub>+ MG<sub>100</sub> toplam klorofil miktarında önemsiz bir azalma göstermiştir (Çizelge 4.5).

**Çizelge 4.5.** Toplam pigment miktarına ait bulgular

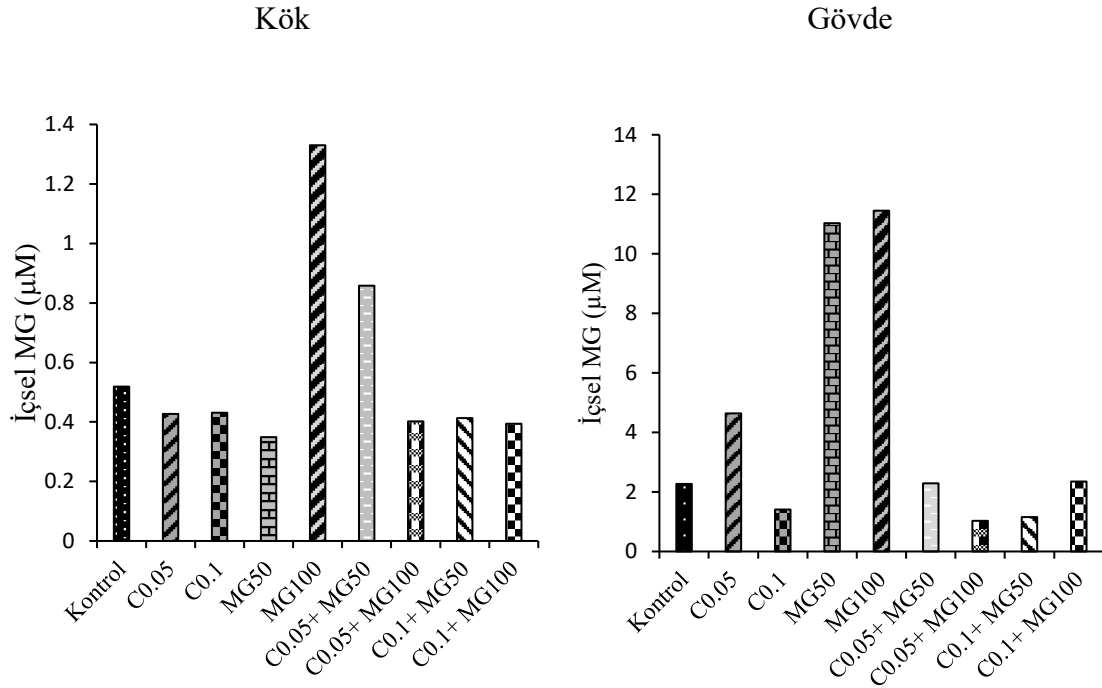
Uygulamalar	Toplam Klorofil (mg/gr)	Toplam Karotenoid (mg/gr)
Kontrol	0.350 ± 0.057 <sup>a</sup>	3.496 ± 0.008 <sup>a</sup>
C <sub>0.05</sub>	0.220 ± 0.057 <sup>d</sup>	2.596 ± 0.014 <sup>e</sup>
C <sub>0.1</sub>	0.235 ± 0.028 <sup>c</sup>	2.350 ± 0.028 <sup>f</sup>
MG <sub>50</sub>	0.236 ± 0.033 <sup>c</sup>	2.556 ± 0.029 <sup>e</sup>
MG <sub>100</sub>	0.253 ± 0.003 <sup>b</sup>	2.603 ± 0.012 <sup>e</sup>
C <sub>0.05</sub> + MG <sub>50</sub>	0.260 ± 0.057 <sup>b</sup>	2.600 ± 0.005 <sup>e</sup>
C <sub>0.05</sub> + MG <sub>100</sub>	0.246 ± 0.033 <sup>bc</sup>	2.950 ± 0.003 <sup>c</sup>
C <sub>0.1</sub> + MG <sub>50</sub>	0.340 ± 0.057 <sup>a</sup>	3.400 ± 0.012 <sup>b</sup>
C <sub>0.1</sub> + MG <sub>100</sub>	0.260 ± 0.001 <sup>b</sup>	2.756 ± 0.034 <sup>d</sup>

Aynı harflerle gösterilen değerler arasındaki fark Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma Testine göre P<0.05 hata seviyesinde önemsizdir. ± standart hatayı gösterir.

#### 4.6. İçsel MG Miktarına Ait Bulgular

Kontrolle göre içsel MG miktarı, MG uygulamasının her iki konsantrasyonunda da özellikle gövdede ciddi bir artış göstermiştir (Şekil 4.6 ve Çizelge 4.6). İçsel MG miktarı, MG<sub>50</sub> uygulamasında kökte kontrole göre azalırken, MG<sub>100</sub> uygulamasında kontrole göre üç kat artmıştır. MG uygulamalarını kendi aralarında karşılaştırınca MG<sub>100</sub> konsantrasyonu hem kök hem gövdede anlamlı bir artışa neden olmuştur (p<0.05). Kitosan uygulamalarında, C<sub>0.05</sub> kontrole kıyasla içsel MG miktarında kökte azalış gövdede ise iki kat artış göstermiştir. C<sub>0.1</sub> uygulamasında ise kök ve gövdede azalmıştır.

Kitosanın MG ile kombinasyonlarında en fazla içsel MG artışı gövdede C<sub>0.05</sub>+MG<sub>50</sub> ile C<sub>0.1</sub>+MG<sub>100</sub> uygulamalarında rastlansa da MG<sub>50</sub> ve MG<sub>100</sub> uygulamalarına göre ciddi bir azalış göstermektedir (p<0.05). Genel olarak kitosanın MG uygulanmış fidelerin kök ve gövdelerinde içsel MG miktarını düşürdüğü söylenebilir.



Şekil 4.6. İçsel MG kök verilerinin şekil üzerinde gösterilmesi

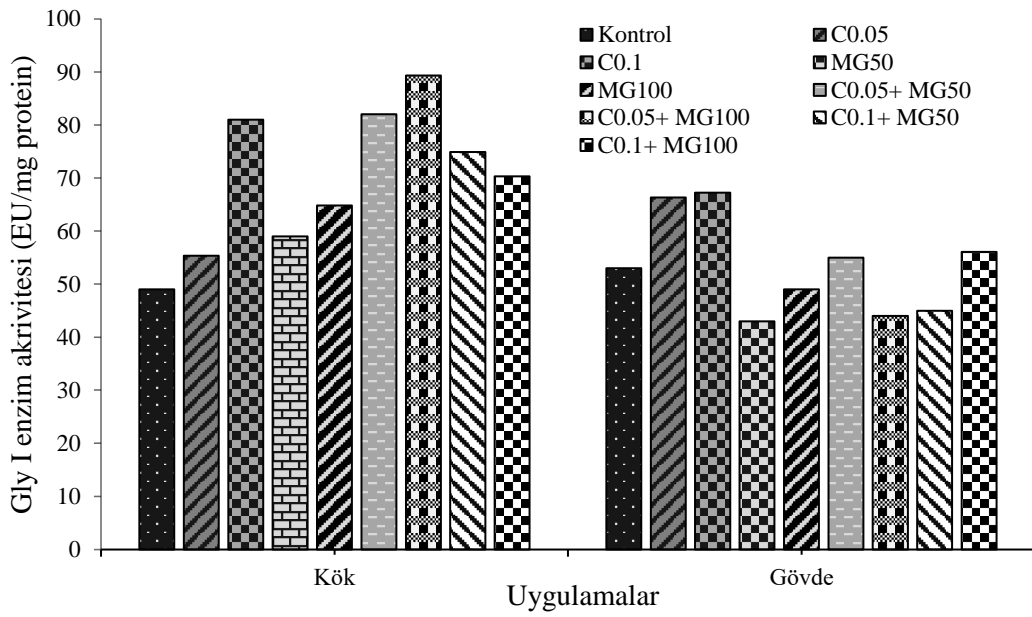
Çizelge 4.6. İçsel MG (µM) miktarına ait bulgular

Uygulamalar	Kök	Gövde
Kontrol	0.519 ± 0.002 <sup>c</sup>	2.27 ± 0.006 <sup>d</sup>
C <sub>0.05</sub>	0.427 ± 0.007 <sup>d</sup>	4.64 ± 0.105 <sup>c</sup>
C <sub>0.1</sub>	0.431 ± 0.003 <sup>d</sup>	1.41 ± 0.005 <sup>e</sup>
MG <sub>50</sub>	0.349 ± 0.001 <sup>e</sup>	11.03 ± 0.058 <sup>b</sup>
MG <sub>100</sub>	1.330 ± 0.073 <sup>a</sup>	11.45 ± 0.040 <sup>a</sup>
C <sub>0.05</sub> +MG <sub>50</sub>	0.858 ± 0.007 <sup>b</sup>	2.29 ± 0.020 <sup>d</sup>
C <sub>0.05</sub> +MG <sub>100</sub>	0.402 ± 0.001 <sup>d</sup>	1.03 ± 0.001 <sup>f</sup>
C <sub>0.1</sub> +MG <sub>50</sub>	0.413 ± 0.034 <sup>d</sup>	1.156 ± 0.016 <sup>f</sup>
C <sub>0.1</sub> +MG <sub>100</sub>	0.394 ± 0.002 <sup>d</sup>	2.35 ± 0.010 <sup>d</sup>

Aynı harflerle gösterilen değerler arasındaki fark Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma Testine göre P<0.05 hata seviyesinde önemsizdir. ± standart hatayı gösterir.

#### 4.7. Gly I Enzim Aktivitesine Ait Bulgular

Kontrole göre tek başına kitosan uygulamaları Gly I enzim aktivitesi hem kök hem gövdede önemli oranda artırmıştır ( $p<0.05$ ) (Çizelge 4.7 ve Şekil 4.7). Aktivite, MG<sub>50</sub> ve MG<sub>100</sub> uygulamalarında ise kökte kontrole kıyasla önemli derece artmış ( $p<0.05$ ), MG<sub>50</sub> ve MG<sub>100</sub> uygulamalarında ise gövdede azalmıştır. Diğer taraftan C<sub>0.05</sub>+MG<sub>50</sub> uygulamasında Gly I aktivitesi kök ve gövdede artış göstermiştir. Bu artış özellikle kökte %40 oranında olmuştur ( $p<0.05$ ). Gly I enzim aktivitesinin, kitosanın MG ile kombinasyonları ile hem kök hem de gövdede önemli oranda artış gösterdiği ileri sürülebilir (Çizelge 4.6).



Şekil 4.7. Gly I enzim aktivitesine ait bulguların şekil üzerinde gösterimi

**Çizelge 4.7.** Gly I enzim aktivitesine ait bulgular

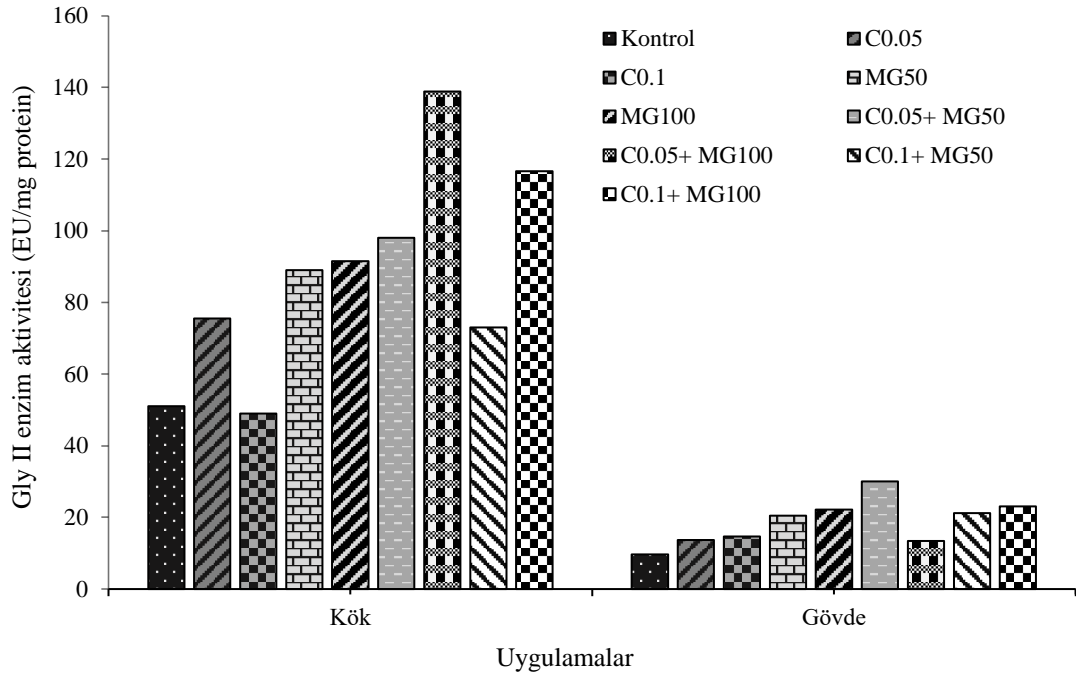
Uygulamalar	Kök (EU/mg protein)	Gövde (EU/mg protein)
Kontrol	49.0 ± 0.001 <sup>g</sup>	53.0 ± 2.64 <sup>bc</sup>
C <sub>0.05</sub>	55.33 ± 1.76 <sup>f</sup>	66.33 ± 2.66 <sup>a</sup>
C <sub>0.1</sub>	81.0 ± 0.00 <sup>b</sup>	67.23 ± 0.00 <sup>f</sup>
MG <sub>50</sub>	59.0 ± 1.73 <sup>f</sup>	43.0 ± 0.00 <sup>f</sup>
MG <sub>100</sub>	64.80 ± 1.90 <sup>e</sup>	49.0 ± 1.0 <sup>cd</sup>
C <sub>0.05</sub> +MG <sub>50</sub>	82.0 ± 2.00 <sup>b</sup>	55.0 ± 1.73 <sup>b</sup>
C <sub>0.05</sub> +MG <sub>100</sub>	89.30 ± 0.33 <sup>a</sup>	44.0 ± 1.00 <sup>f</sup>
C <sub>0.1</sub> +MG <sub>50</sub>	74.91 ± 1.04 <sup>c</sup>	45.0 ± 1.00 <sup>ef</sup>
C <sub>0.1</sub> +MG <sub>100</sub>	70.33 ± 0.66 <sup>d</sup>	56.07 ± 1.07 <sup>b</sup>

Aynı harflerle gösterilen değerler arasındaki fark Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma Testine göre P<0.05 hata seviyesinde önemsizdir. ± standart hatayı gösterir.

#### 4.8. Gly II Enzim Aktivitesine Ait Bulgular

Kontrole göre Gly II enzim aktivitesinde C<sub>0.05</sub> kökte %30 gövdede ise %40 oranında arttırmıştır. C<sub>0.1</sub> kökte azaltmış, gövdede ise arttırmıştır. MG<sub>50</sub> ve MG<sub>100</sub> konsantrasyonları kontrole göre hem kök hem gövdede anlamlı bir artış göstermektedir (p<0.05). Kökte kitosanla MG kombinasyonlarına bakıldığı zaman üç uygulamada artış gözlemlenirken C<sub>0.1</sub>+ MG<sub>50</sub> konsantrasyonunda azalış görülmektedir.

Gövde de tek başına kitosan uygulamaları kontrole kıyasla hem kök hem de gövde de artış gösterirken, sadece kökte C<sub>0.1</sub> uygulamasında azalış görülmüştür. Aynı şekilde tek başına MG uygulamaları kontrole kıyasla hem kök hem de gövde de Gly II aktivitesini önemli oranda arttırmıştır. Gövdede kitosanın MG kombinasyonları değerlendirildiği zaman C<sub>0.05</sub>+ MG<sub>100</sub> uygulaması MG<sub>50</sub> uygulamasına kıyasla azalış göstermektedir (Çizelge 4.8 ve Şekil 4.8).



**Şekil 4.8.** Gly II enzim aktivitesine ait bulguların şekil üzerinde ifadesi

**Çizelge 4.8.** Gly II enzim aktivitesine ait bulgular

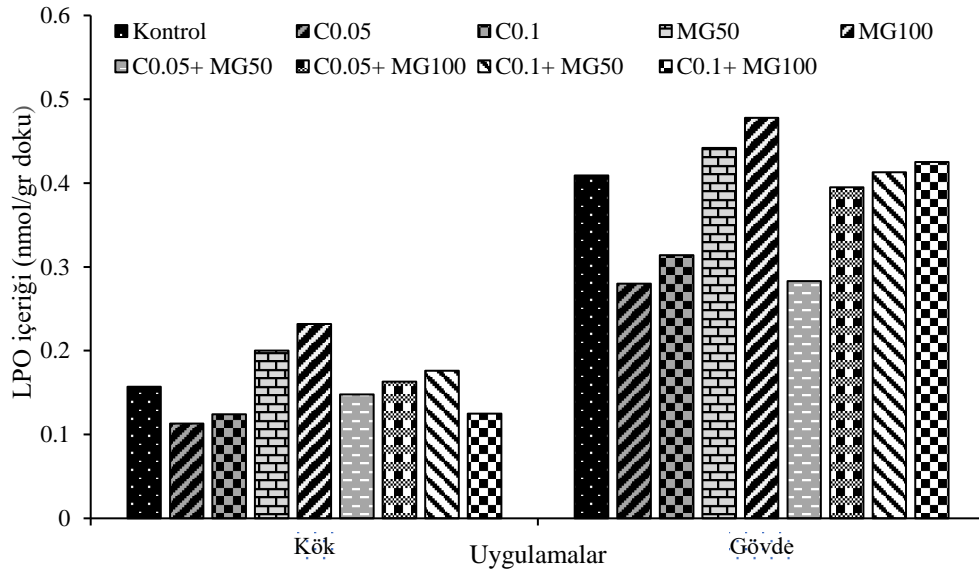
Uygulamalar	Kök (EU/mg protein)	Gövde (EU/mg protein)
Kontrol	51.0 ± 0.57 <sup>f</sup>	9.63 ± 0.67 <sup>g</sup>
C <sub>0.05</sub>	75.50 ± 0.28 <sup>e</sup>	13.73 ± 0.13 <sup>ef</sup>
C <sub>0.1</sub>	49.0 ± 0.57 <sup>f</sup>	14.66 ± 0.16 <sup>e</sup>
MG <sub>50</sub>	89.0 ± 0.57 <sup>d</sup>	20.45 ± 0.46 <sup>de</sup>
MG <sub>100</sub>	91.50 ± 0.28 <sup>d</sup>	22.22 ± 0.61 <sup>bc</sup>
C <sub>0.05</sub> +MG <sub>50</sub>	98.0 ± 0.57 <sup>c</sup>	30.02 ± 0.4 <sup>a</sup>
C <sub>0.05</sub> +MG <sub>100</sub>	138.83 ± 1.94 <sup>a</sup>	13.40 ± 0.50 <sup>f</sup>
C <sub>0.1</sub> +MG <sub>50</sub>	73.05 ± 0.12 <sup>e</sup>	21.21 ± 0.81 <sup>cd</sup>
C <sub>0.1</sub> +MG <sub>100</sub>	116.66 ± 1.20 <sup>b</sup>	23.10 ± 0.10 <sup>b</sup>

Aynı harflerle gösterilen değerler arasındaki fark Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma Testine göre  $P < 0.05$  hata seviyesinde önemsizdir.  $\pm$  standart hatayı gösterir.

#### 4.9. LPO (MDA olarak) İçeriğine Ait Bulgular

LPO miktarı, kitosan uygulamalarında kontrole göre gövdede ve kökte azalmıştır (Şekil 4.9 ve Çizelge 4.9). Tek başına uygulanan MG'nin her iki konsantrasyonunda LPO

miktarı kontrole göre hem kök hem gövdede artmıştır. C<sub>0.05</sub>+MG<sub>50</sub> ve C<sub>0.1</sub>+MG<sub>50</sub> uygulamaları hem gövdede hem de kökte LPO miktarını MG<sub>50</sub> konsantrasyonuna göre azaltmıştır. C<sub>0.05</sub>+MG<sub>100</sub> ve C<sub>0.1</sub>+MG<sub>100</sub> uygulamalarında LPO miktarı, MG<sub>100</sub> uygulamasına göre, hem gövde hem de kökte azalmıştır (p<0.05).



Şekil 4.9. LPO (MDA olarak) içeriğine ait bulguların şekil üzerinde sunumu

Çizelge 4.9. Kök ve gövde LPO (MDA olarak) içeriğine ait bulgular

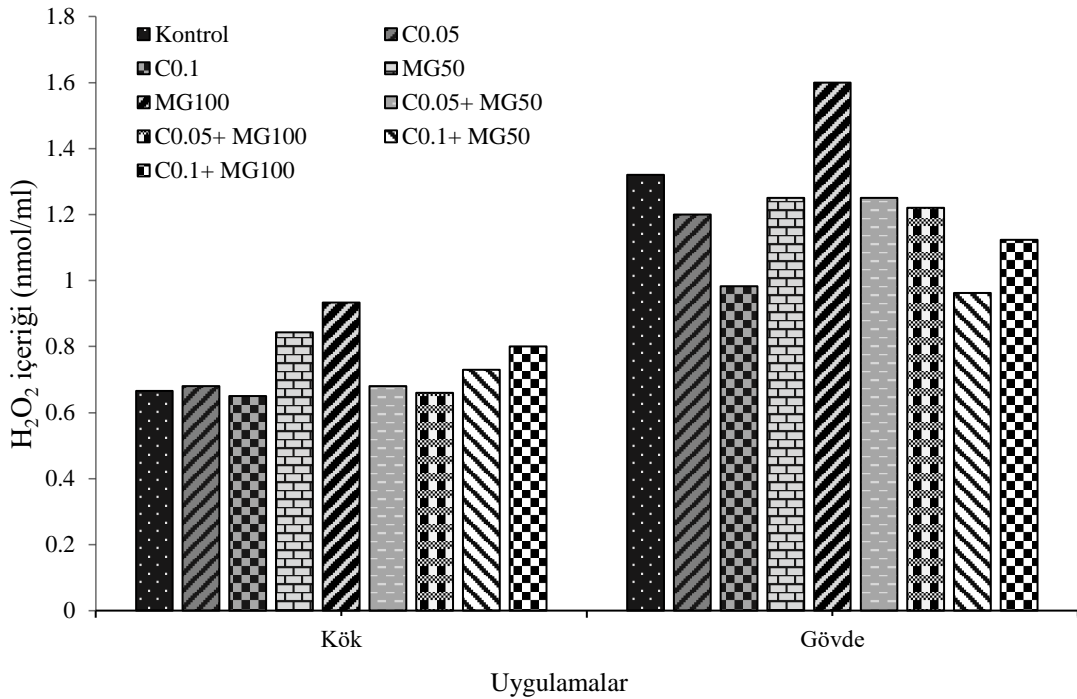
Uygulama	Kök (nmol/gr dokü)	Gövde (nmol/gr dokü)
Kontrol	0.157 ± 0.0015 <sup>d</sup>	0.409 ± 0.0011 <sup>d</sup>
C <sub>0.05</sub>	0.113 ± 0.0015 <sup>g</sup>	0.280 ± 0.0028 <sup>g</sup>
C <sub>0.1</sub>	0.124 ± 0.0020 <sup>f</sup>	0.314 ± 0.0020 <sup>f</sup>
MG <sub>50</sub>	0.200 ± 0.0026 <sup>b</sup>	0.442 ± 0.0014 <sup>b</sup>
MG <sub>100</sub>	0.232 ± 0.0044 <sup>a</sup>	0.478 ± 0.0017 <sup>a</sup>
C <sub>0.05</sub> +MG <sub>50</sub>	0.148 ± 0.0032 <sup>e</sup>	0.283 ± 0.0017 <sup>g</sup>
C <sub>0.05</sub> +MG <sub>100</sub>	0.163 ± 0.0006 <sup>d</sup>	0.395 ± 0.0029 <sup>e</sup>
C <sub>0.1</sub> +MG <sub>50</sub>	0.176 ± 0.0010 <sup>c</sup>	0.413 ± 0.0015 <sup>d</sup>
C <sub>0.1</sub> +MG <sub>100</sub>	0.125 ± 0.0020 <sup>f</sup>	0.425 ± 0.0023 <sup>c</sup>

Aynı harflerle gösterilen değerler arasındaki fark Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma Testine göre P<0.05 hata seviyesinde önemsizdir. ± standart hatayı gösterir.

#### 4.10. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> İçeriğine Ait Bulgular

Çizelge 4.10 incelendiğinde, C<sub>0.05</sub> ve C<sub>0.1</sub> uygulamaları kökte kontrole göre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeriğini önemsiz seviyede artırırken, gövde azaltmıştır. Tek başına MG<sub>50</sub> ve MG<sub>100</sub> uygulamaları H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeriğini kontrole kıyasla kökte ve gövdede önemli seviyede artırmıştır. Ancak C<sub>0.05</sub>+MG<sub>50</sub> ve C<sub>0.1</sub>+MG<sub>50</sub> uygulamaları MG<sub>50</sub> uygulamasına göre, kökte ve gövdede azaltmıştır. C<sub>0.05</sub>+MG<sub>100</sub> ve C<sub>0.1</sub>+MG<sub>100</sub> uygulamaları da MG<sub>100</sub> uygulamasına göre hem kök hem de gövdede H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeriğini önemli seviyede azaltmıştır (Çizelge 4.10, ve Şekil, 4.10.).

Yukarıdaki veriler genel olarak değerlendirildiğinde, MG<sub>50</sub> uygulaması gövdeye göre kökte daha anlamlı bir artış gösterirken, MG<sub>100</sub> uygulaması hem kökte hem de gövdede H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeriğini önemli oranda artırmıştır. Buna karşılık kitosanın+MG kombinasyonlarında hem kökte hem de gövdede genel olarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeriği düşmüştür.



Şekil 4.10. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeriğine ait bulguların şekille ifade edilmesi

**Çizelge 4.10.** Kök ve gövdede H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeriğine ait bulgular

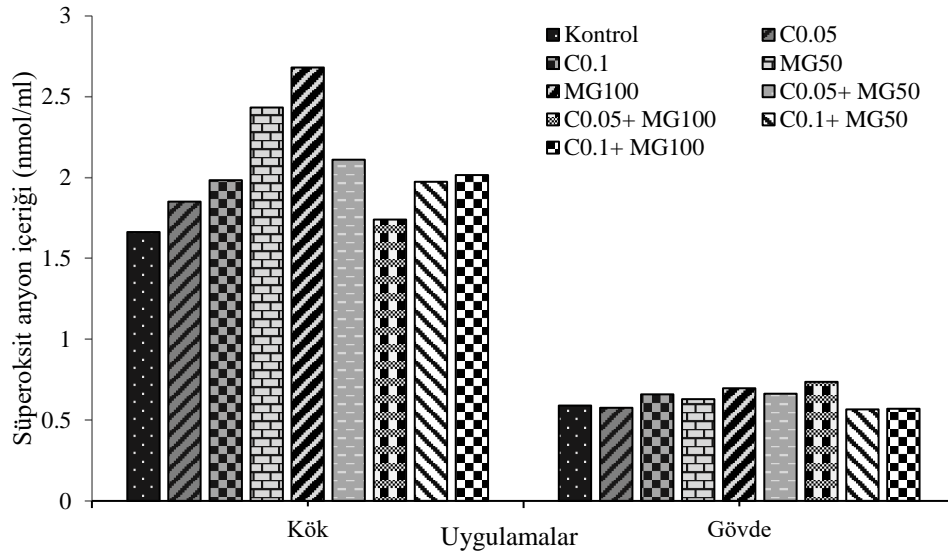
Uygulama	Kök (nmol/ml)	Gövde (nmol/ml)
Kontrol	0.666 ± 0.120 <sup>ef</sup>	1.32 ± 0.578 <sup>b</sup>
C0.05	0.680 ± 0.100 <sup>ef</sup>	1.20 ± 0.300 <sup>cd</sup>
C0.01	0.650 ± 0.001 <sup>f</sup>	0.983 ± 0.491 <sup>e</sup>
MG50	0.843 ± 0.260 <sup>b</sup>	1.25 ± 0.371 <sup>bc</sup>
MG100	0.933 ± 0.088 <sup>a</sup>	1.60 ± 0.360 <sup>a</sup>
C0.05+MG50	0.680 ± 0.106 <sup>e</sup>	1.250 ± 0.115 <sup>bc</sup>
C0.1+MG50	0.660 ± 0.057 <sup>ef</sup>	1.220 ± 0.500 <sup>bcd</sup>
C0.05+MG100	0.730 ± 0.057 <sup>d</sup>	0.962 ± 0.236 <sup>e</sup>
C0.1+MG100	0.800 ± 0.057 <sup>c</sup>	1.123 ± 0.366 <sup>d</sup>

Aynı harflerle gösterilen değerler arasındaki fark Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma Testine göre P<0.05 hata seviyesinde önemsizdir. ± standart hatayı gösterir.

#### 4.11. Süperoksit Anyonu (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) İçeriğine Ait Bulgular

Verilerimize göre tek başına kitosan uygulamalarının her ikisi süperoksit anyon içeriğini, kökte artırırken, gövdede sadece C<sub>0.1</sub> uygulaması bir artışa neden olmuştur (Çizelge 4.11 ve Şekil 4.11). MG<sub>50</sub> ve MG<sub>100</sub> uygulamaları kontrolle oranla kökte ve gövdede süperoksit anyon içeriğini ciddi oranda artırmıştır (p<0.05). Ancak C<sub>0.05</sub>+MG<sub>50</sub> ve C<sub>0.1</sub>+MG<sub>50</sub> uygulamaları MG<sub>50</sub>'ye göre süperoksit anyon içeriğini azaltmıştır. Gövdede ise C<sub>0.1</sub>+MG<sub>50</sub> uygulaması süperoksit anyon içeriğini düşürmede daha başarılı olmuştur. C<sub>0.05</sub>+MG<sub>100</sub> ve C<sub>0.1</sub>+MG<sub>100</sub> uygulamaları, MG<sub>100</sub> dozuna kıyasla kökte içeriği düşürmüştür. Gövdede ise aynı uygulamalardan C<sub>0.1</sub>+MG<sub>100</sub> uygulaması süperoksit anyon içeriğini düşürmede başarılı olmuştur (Çizelge 4.11).

Genel bir değerlendirme yapıldığında, MG<sub>50</sub> ve MG<sub>100</sub> uygulamaları hem kök hem de gövdede süperoksit anyon içeriğinde artış göstermiştir. Süper oksit anyon içeriği, MG ve kitosan kombinasyonlarında kökte ve gövdede genel olarak düşmüştür.



Şekil 4.11. Süperoksit anyonu ( $O_2^-$ ) içeriğine ait bulguların şekille ifadesi

Çizelge 4.11. Kök ve gövdede süperoksit anyonu ( $O_2^-$ ) içeriğine ait bulgular

Uygulamalar	Kök (nmol/ml)	Gövde (nmol/ml)
Kontrol	1.663 ± 0.218 <sup>g</sup>	0.590 ± 0.115 <sup>de</sup>
C <sub>0.05</sub>	1.850 ± 0.115 <sup>e</sup>	0.576 ± 0.233 <sup>e</sup>
C <sub>0.1</sub>	1.983 ± 0.141 <sup>d</sup>	0.660 ± 0.057 <sup>bc</sup>
MG <sub>50</sub>	2.433 ± 0.088 <sup>b</sup>	0.630 ± 0.173 <sup>cd</sup>
MG <sub>100</sub>	2.680 ± 0.057 <sup>a</sup>	0.696 ± 0.003 <sup>ab</sup>
C <sub>0.05</sub> +MG <sub>50</sub>	2.110 ± 0.513 <sup>c</sup>	0.663 ± 0.145 <sup>bc</sup>
C <sub>0.05</sub> +MG <sub>100</sub>	1.740 ± 0.052 <sup>f</sup>	0.736 ± 0.133 <sup>a</sup>
C <sub>0.1</sub> +MG <sub>50</sub>	1.973 ± 0.321 <sup>d</sup>	0.566 ± 0.185 <sup>e</sup>
C <sub>0.1</sub> +MG <sub>100</sub>	2.016 ± 0.176 <sup>d</sup>	0.570 ± 0.208 <sup>e</sup>

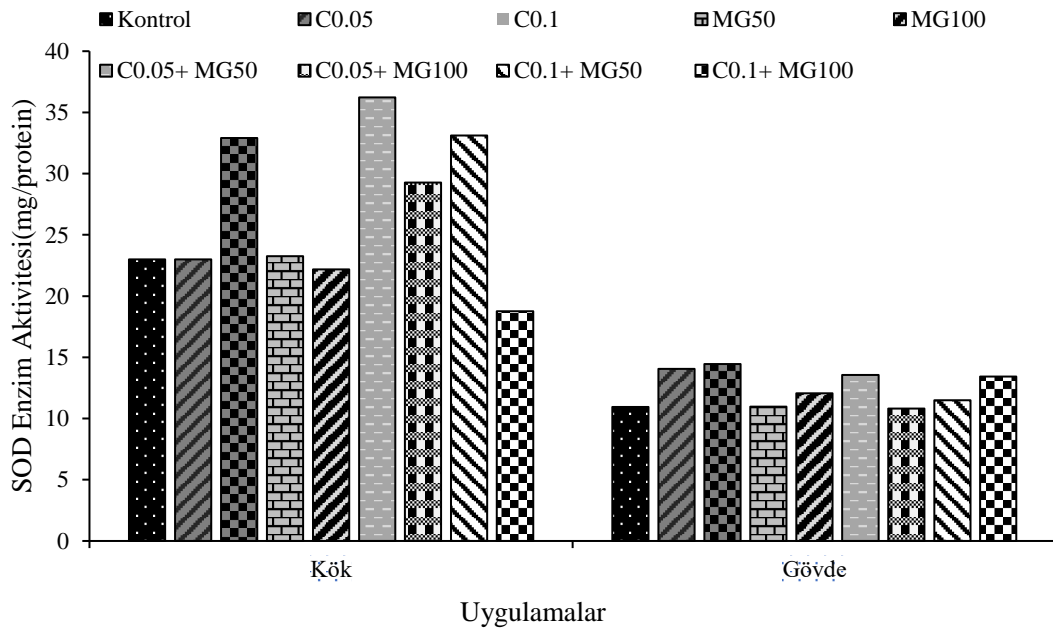
Aynı harflerle gösterilen değerler arasındaki fark Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma Testine göre  $P < 0.05$  hata seviyesinde önemsizdir.  $\pm$  standart hatayı gösterir.

#### 4.12. SOD Enzim Aktivitesine Ait Bulgular

Kontrole göre, C<sub>0.05</sub> uygulaması kökte SOD enzim aktivitesini değiştirmemiştir. Gövdede ise %30 oranında artmıştır. C<sub>0.1</sub> uygulaması hem kökte hem gövdede SOD enzim aktivitesinin artırmıştır. Aktivitede MG<sub>50</sub> ve MG<sub>100</sub> konsantrasyonları kök ve gövdede

anlamli bir değişikliğe neden olmamıştır ( $p>0.05$ ).  $C_{0.05}+MG_{50}$  ve  $C_{0.1}+MG_{50}$  uygulamaları kök ve gövdede SOD enzim aktivitesini artırırken,  $C_{0.05}+MG_{100}$  uygulaması kökte anlamli artışa, gövdede ise azalmaya neden olmuştur.  $C_{0.1}+MG_{100}$  uygulaması ise kökte azalma, gövdede artışa neden olmuştur (Şekil 4.12 ve Çizelge 4.12).

Genel bir değerlendirme yapıldığında, MG'nin her iki konsantrasyonu kontrolle göre SOD enzim aktivitesinde hem kök hem de gövdede önemsiz bir artış oluşturmıştır ( $p>0.05$ ). Kitosan+MG kombinasyonlarında genel olarak kök ve gövdede SOD enzim aktivitesini artırmıştır. Kitosanın her iki konsantrasyonu,  $MG_{50}$  ile kombinasyonunda SOD enzim aktivitesini hem kök hem de gövdede stimüle edilmiştir.



**Şekil 4.12.** SOD enzim aktivitesine ait bulguların şekille ifadesi

**Çizelge 4.12.** Kök ve gövdede SOD enzim aktivitesine ait bulgular

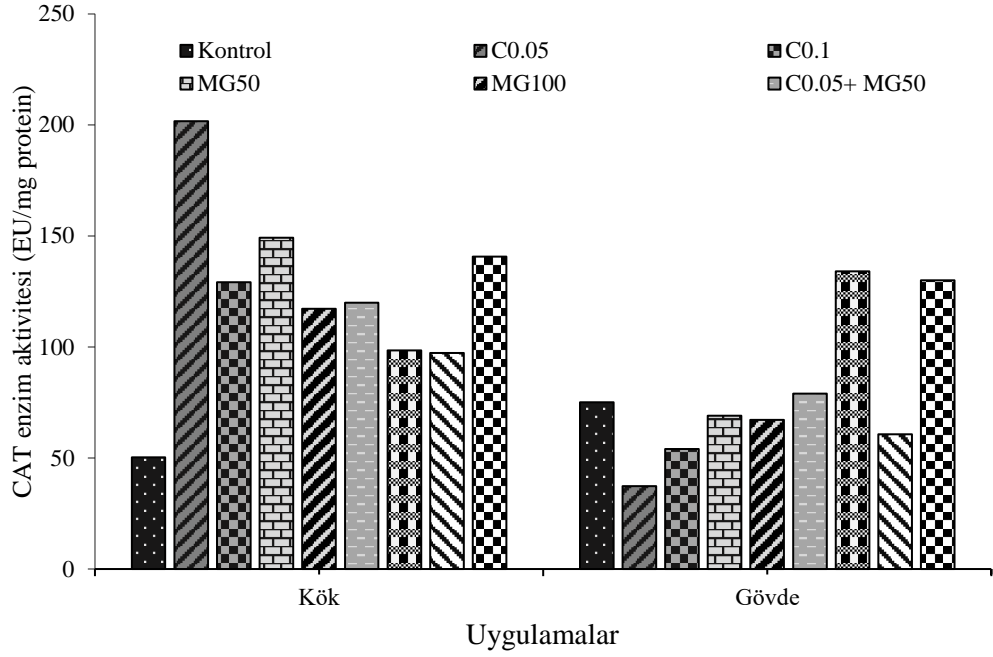
Uygulamalar	Kök (EU/mg protein)	Gövde (EU/mg protein)
Kontrol	23.0 ± 0.46 <sup>c</sup>	10.94 ± 0.14 <sup>c</sup>
C <sub>0.05</sub>	23.0 ± 1.49 <sup>c</sup>	14.06 ± 0.71 <sup>a</sup>
C <sub>0.1</sub>	32.91 ± 0.37 <sup>ab</sup>	14.45 ± 0.66 <sup>a</sup>
MG <sub>50</sub>	23.26 ± 1.17 <sup>c</sup>	10.98 ± 0.54 <sup>c</sup>
MG <sub>100</sub>	22.18 ± 0.51 <sup>c</sup>	12.06 ± 0.55 <sup>abc</sup>
C <sub>0.05</sub> +MG <sub>50</sub>	36.24 ± 3.18 <sup>a</sup>	13.55 ± 0.92 <sup>ab</sup>
C <sub>0.05</sub> +MG <sub>100</sub>	29.26 ± 1.22 <sup>b</sup>	10.82 ± 0.96 <sup>c</sup>
C <sub>0.1</sub> +MG <sub>50</sub>	33.12 ± 2.28 <sup>ab</sup>	11.49 ± 0.85 <sup>bc</sup>
C <sub>0.1</sub> +MG <sub>100</sub>	18.77 ± 0.91 <sup>c</sup>	13.44 ± 0.89 <sup>ab</sup>

Aynı harflerle gösterilen değerler arasındaki fark Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma Testine göre P<0.05 hata seviyesinde önemsizdir. ± standart hatayı gösterir.

#### 4.13. CAT Enzim Aktivitesine Ait Bulgular

Veriler incelendiğinde (Şekil 4.13 ve Çizelge 4.13), C<sub>0.05</sub> ve C<sub>0.1</sub> uygulamaları kontrole göre kökte CAT enzim aktivitesini ciddi bir şekilde artırmış, gövdede ise önemli bir azaltmıştır (p<0.05). MG'nin her iki konsantrasyonu kökte kontrolden daha yüksek bir aktivite gösterirken, gövdede ise tam tersi bir etki göstermiştir. C<sub>0.05</sub>+MG<sub>50</sub> ve C<sub>0.1</sub>+MG<sub>50</sub> uygulamaları MG<sub>50</sub> uygulamasına göre kökte CAT enzim aktivitesini önemli seviyede azaltmış, gövdede C<sub>0.05</sub>+MG<sub>100</sub> ve C<sub>0.1</sub>+MG<sub>50</sub> uygulamalarında anlamlı bir etki görülmemiştir (p>0.05). C<sub>0.05</sub>+MG<sub>100</sub> ve C<sub>0.1</sub>+MG<sub>100</sub> kombinasyonları gövdede ciddi bir artışa neden olmuştur. Kökte ise aktivitede C<sub>0.05</sub>+MG<sub>100</sub> uygulamasında azalış, C<sub>0.1</sub>+MG<sub>100</sub> uygulamasında artış görülmektedir (Çizelge 4.13).

Genel olarak CAT enzim aktivitesini kök ve gövdede değerlendirdiğimizde kökte tek başına uygulanan kitosan ve MG'nin her iki konsantrasyonlarında ciddi bir artışa sebep olurken gövdede azalış gözlenmiştir. Kitosanın+MG kombinasyonlarında kökte genel olarak azalış, gövdede ise artış görülmüştür. Özellikle C<sub>0.1</sub>+MG<sub>100</sub> uygulaması hem kökte hem de gövdede yüksek CAT aktivitesini göstermiştir.



**Şekil 4.13.** Kök ve gövdede CAT enzim aktivitesine ait bulgularının şekille ifadesi

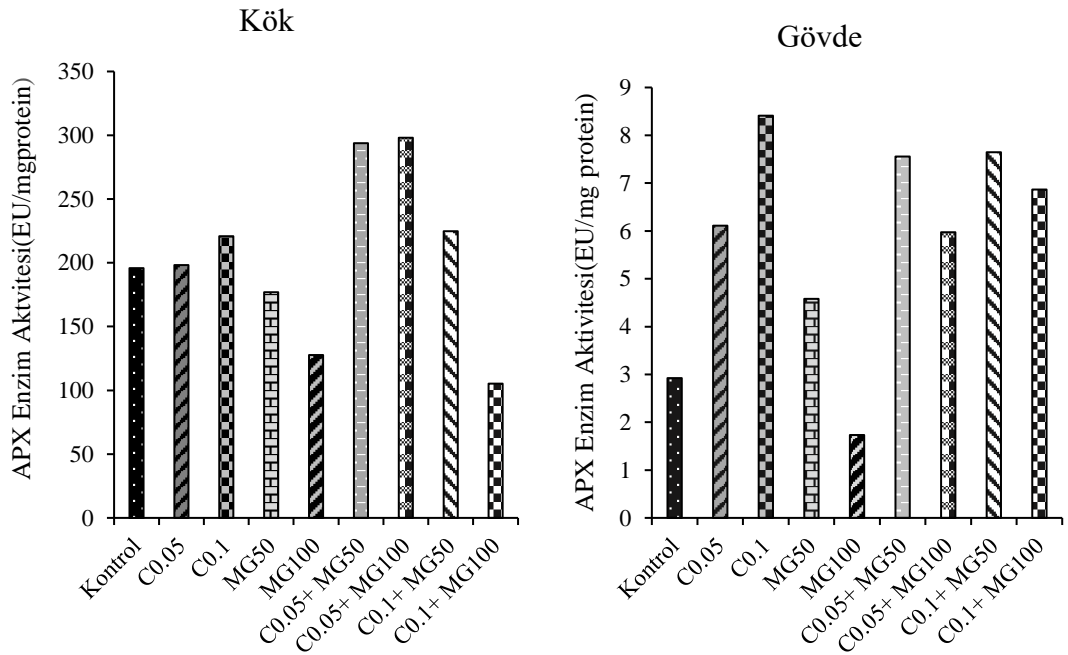
**Çizelge 4.13.** Kök ve gövdede CAT enzim aktivitesine ait bulgular

Uygulamalar	Kök (EU/mg protein)	Gövde (EU/mg protein)
Kontrol	50.27 ± 4.13 <sup>f</sup>	75.13 ± 3.061 <sup>bc</sup>
C <sub>0.05</sub>	201.70 ± 00.1 <sup>a</sup>	37.33 ± 1.20 <sup>e</sup>
C <sub>0.1</sub>	129.13 ± 0.66 <sup>cd</sup>	54.00 ± 3.46 <sup>d</sup>
MG <sub>50</sub>	149.23 ± 0.33 <sup>b</sup>	69.00 ± 3.00 <sup>bcd</sup>
MG <sub>100</sub>	117.20 ± 0.01 <sup>d</sup>	67.19 ± 0.02 <sup>bcd</sup>
C <sub>0.05</sub> +MG <sub>50</sub>	119.86 ± 0.44 <sup>d</sup>	79.0 ± 4.001 <sup>b</sup>
C <sub>0.05</sub> +MG <sub>100</sub>	98.40 ± 0.001 <sup>e</sup>	134.0 ± 0.001 <sup>a</sup>
C <sub>0.1</sub> +MG <sub>50</sub>	97.34 ± 0.001 <sup>e</sup>	60.73 ± 2.333 <sup>cd</sup>
C <sub>0.1</sub> +MG <sub>100</sub>	140.60 ± 0.01 <sup>bc</sup>	130.0 ± 13.00 <sup>a</sup>

Aynı harflerle gösterilen değerler arasındaki fark Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma Testine göre  $P < 0.05$  hata seviyesinde önemsizdir.  $\pm$  standart hatayı gösterir.

#### 4.14. APX Enzim Aktivitesine Ait Bulgular

Çalışmada C<sub>0.05</sub> ve C<sub>0.1</sub> uygulamaları APX aktivitesi üzerinde kontrole göre kök ve gövdede anlamlı artış göstermiştir ( $p < 0.05$ ). Tek başına MG uygulama grubunda MG<sub>50</sub> uygulaması aktiviteyi kökte düşürmüş, gövdede ise %57 yakın artışa neden olmuştur (Şekil 4.14 ve Çizelge 4.14). MG<sub>100</sub> hem kökte hem de gövdede ciddi bir azalmaya neden olmuştur. Kitosanın+MG uygulamasıyla aktivite genel olarak kök ve gövdede artmaktadır. Sadece C<sub>0.1</sub>+MG<sub>100</sub> uygulamasında kökte önemli azalış meydana gelmiştir (Çizelge 4.14).



Şekil 4.14. Kök ve gövdede APX enzim aktivitesine ait bulguların şekil üzerinde sunumu

**Çizelge 4.14.** Kök ve gövdede APX enzim aktivitesine ait bulgular

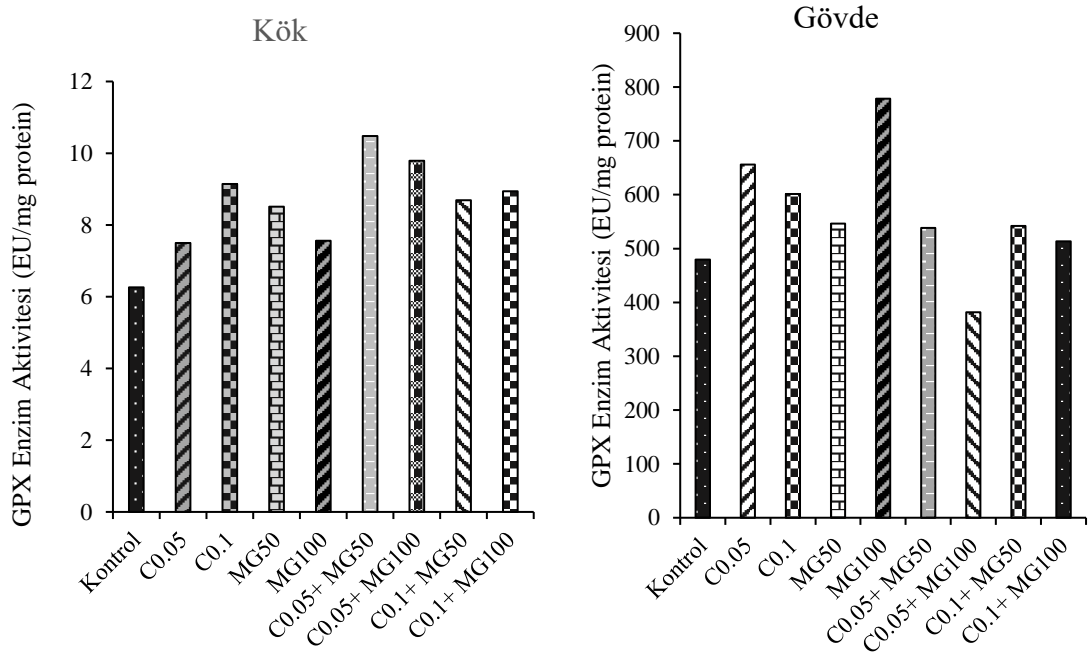
Uygulamalar	Kök (EU/mg protein)	Gövde (EU/mg protein)
Kontrol	195.80 ± 0.006 <sup>f</sup>	2.923 ± 0.003 <sup>h</sup>
C <sub>0.05</sub>	198.21 ± 0.0 <sup>e</sup>	6.110 ± 0.0 <sup>e</sup>
C <sub>0.1</sub>	220.84 ± 1.033 <sup>d</sup>	8.410 ± 0.100 <sup>a</sup>
MG <sub>50</sub>	176.93 ± 1.547 <sup>g</sup>	4.580 ± 0.0 <sup>g</sup>
MG <sub>100</sub>	127.69 ± 1.000 <sup>h</sup>	1.733 ± 0.015 <sup>i</sup>
C <sub>0.05</sub> + MG <sub>50</sub>	293.76 ± 0.721 <sup>b</sup>	7.556 ± 0.021 <sup>c</sup>
C <sub>0.05</sub> + MG <sub>100</sub>	298.04 ± 0.318 <sup>a</sup>	5.973 ± 0.021 <sup>f</sup>
C <sub>0.1</sub> + MG <sub>50</sub>	224.76 ± 0.720 <sup>c</sup>	7.646 ± 0.006 <sup>b</sup>
C <sub>0.1</sub> + MG <sub>100</sub>	105.26 ± 0.001 <sup>i</sup>	6.866 ± 0.008 <sup>d</sup>

Aynı harflerle gösterilen değerler arasındaki fark Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma Testine göre P<0.05 hata seviyesinde önemsizdir. ± standart hatayı gösterir.

#### 4.15. GPX Enzim Aktivitesine Ait Bulgular

Kitosanın ve MG'nin tek başına uygulamalarında hem kök hem gövdede kontrole göre GPX aktivitesi önemli artış göstermiştir (p<0.05). İlave olarak C<sub>0.05</sub>+MG<sub>50</sub> ve C<sub>0.05</sub>+MG<sub>100</sub> uygulamaları da aktivitede kök ve gövdede genel olarak artışa neden olmuştur (Şekil 4.15 ve Çizelge 4.15). C<sub>0.05</sub>+MG<sub>100</sub> ve C<sub>0.1</sub>+MG<sub>100</sub> uygulamalarında ise aktivitede gövdede önemli azalış görülürken, kökte artış sağlanmıştır (Çizelge 4.15).

Bulgular genel olarak değerlendirildiğinde, çalışmamızda kitosan+MG uygulamalarının her ikisi, MG grubuna göre kıyaslandığında köklerde GPX aktivitesini artırmış, gövdelerde ise önemli oranda düşürmüştür (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. GPX enzim aktivitesine ait bulguların şekil üzerinde sunulması

Çizelge 4.15. Kök ve gövdede GPX enzim aktivitesine ait bulgular

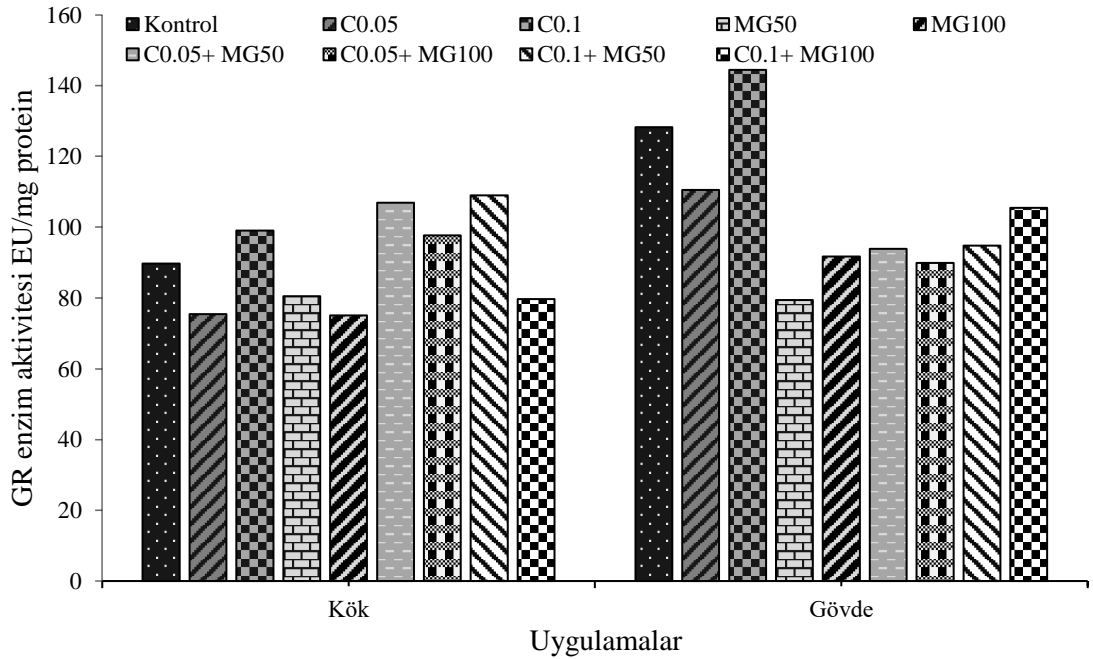
Uygulamalar	Kök (EU/mg protein)	Gövde (EU/mg protein)
Kontrol	6.261 ± 0.79 <sup>e</sup>	479.33 ± 12.333 <sup>d</sup>
C <sub>0.05</sub>	7.498 ± 0.57 <sup>f</sup>	656.0 ± 23.643 <sup>b</sup>
C <sub>0.1</sub>	9.143 ± 0.14 <sup>bc</sup>	601.33 ± 35.55 <sup>bc</sup>
MG <sub>50</sub>	8.51 ± 0.066 <sup>c</sup>	546.33 ± 22.100 <sup>cd</sup>
MG <sub>100</sub>	7.56 ± 0.063 <sup>d</sup>	778.33 ± 23.35 <sup>a</sup>
C <sub>0.05</sub> +MG <sub>50</sub>	10.48 ± 0.33 <sup>a</sup>	538.33 ± 11.57 <sup>cd</sup>
C <sub>0.05</sub> +MG <sub>100</sub>	9.79 ± 0.36 <sup>ab</sup>	381.66 ± 41.36 <sup>e</sup>
C <sub>0.1</sub> +MG <sub>50</sub>	8.69 ± 0.10 <sup>c</sup>	542.0 ± 0.001 <sup>cd</sup>
C <sub>0.1</sub> +MG <sub>50</sub>	8.94 ± 0.42 <sup>c</sup>	513.33 ± 26.078 <sup>d</sup>

Aynı harflerle gösterilen değerler arasındaki fark Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma Testine göre  $P < 0.05$  hata seviyesinde önemsizdir.  $\pm$  standart hatayı gösterir.

#### 4.16. GR Enzim Aktivitesine Ait Bulgular

Elde edilen veriler incelendiğinde (Şekil 4.16 ve Çizelge 4.16), kökte ve gövdede kontrole oranla tek başına C<sub>0.05</sub> uygulaması aktiviteyi düşürmüştür. Ancak, C<sub>0.1</sub> uygulaması ise aktiviteyi yükselmiştir. MG'nin tek başına olan her iki uygulaması hem kökte hem gövdede aktiviteyi kontrole göre azaltmıştır. C<sub>0.05</sub>+MG<sub>50</sub> ve C<sub>0.1</sub>+MG<sub>50</sub> uygulamaları MG<sub>50</sub> uygulamasına göre hem kökte hem de gövdede aktivite üzerinde önemli bir artış göstermiştir (p<0.05). C<sub>0.05</sub>+MG<sub>100</sub> ve C<sub>0.1</sub>+MG<sub>100</sub> uygulamaları özellikle kökte artış göstermiştir. C<sub>0.05</sub>+MG<sub>100</sub> uygulaması aktiviteyi gövdede düşürürken, C<sub>0.1</sub>+MG<sub>100</sub> uygulaması ise artışa neden olmuştur.

Bu bulgular genel olarak değerlendirildiğinde, tek başına MG uygulamaları, kontrole göre GR aktivitesini kök ve gövdede önemli seviyede düşürmüştür (Çizelge 4.16). Diğer taraftan çalışmamızda kitosan+MG uygulamalarının her ikisi, MG grubuna göre kıyaslandığında kök ve gövdede GR aktivitesini önemli seviyede artırmıştır (Çizelge 4.16).



Şekil 4.16. GR enzim aktivitesine ait bulguların şekille ifadesi

**Çizelge 4.16.** Kök ve gövdede GR enzim aktivitesine ait bulgular

Uygulamalar	Kök (EU/mg protein)	Gövde (EU/mg protein)
Kontrol	89.77 ± 0.073 <sup>e</sup>	128.29 ± 0.215 <sup>b</sup>
C <sub>0.05</sub>	75.45 ± 0.083 <sup>h</sup>	110.54 ± 0.346 <sup>c</sup>
C <sub>0.1</sub>	99.07 ± 0.001 <sup>c</sup>	144.45 ± 1.606 <sup>a</sup>
MG <sub>50</sub>	80.48 ± 0.040 <sup>f</sup>	79.380 ± 0.0 <sup>h</sup>
MG <sub>100</sub>	75.08 ± 0.001 <sup>i</sup>	91.74 ± 0.003 <sup>f</sup>
C <sub>0.05</sub> + MG <sub>50</sub>	106.93 ± 0.030 <sup>b</sup>	93.92 ± 0.020 <sup>e</sup>
C <sub>0.05</sub> + MG <sub>100</sub>	97.65 ± 0.004 <sup>d</sup>	89.88 ± 0.020 <sup>g</sup>
C <sub>0.1</sub> + MG <sub>50</sub>	109.03 ± 0.243 <sup>a</sup>	94.75 ± 0.046 <sup>e</sup>
C <sub>0.1</sub> + MG <sub>100</sub>	79.67 ± 0.046 <sup>g</sup>	105.51 ± 0.352 <sup>d</sup>

Aynı harflerle gösterilen değerler arasındaki fark Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma Testine göre P<0.05 hata seviyesinde önemsizdir. ± standart hatayı gösterir.

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Metilglioksal (MG), bitki hücrelerinde özellikle stresli koşullarda karbohidrat, lipid ve protein katabolizmasının bir yan ürünü olarak yüksek seviyede üretilir. Hücrelerde MG'nin yüksek dozları, hem mutagenik hem de genotoksik etkilere neden olur (Yadav *et al.* 2008). Örneğin stres koşullarında glikoliz yolağı ara ürünlerinin aşırı birikiminden dolayı, MG yüksek hücresel konsantrasyona ulaşır. Böyle düzeylerde MG'nin hücre proliferasyonunu inhibe ettiği, proteinlerin denetasyonuna ve antioksidatif mekanizmanın inaktivasyonuna neden olduğu bilinmektedir. MG toksisitesi hayvansal organizmalarda yoğun çalışılmış olmasına rağmen, bitkilerde özellikle eksojen MG'nin detoksifikasyonu, biyokimyasal ve fizyolojik etkileri konusunda yeterli araştırma bulunmamaktadır (Kaur *et al.* 2016; Hoque *et al.* 2016). Diğer taraftan, son yıllarda bir kitin türevi olan kitosanın bitki aktivatörü olarak davrandığı ve bitki stres cevabının düzenlenmesine katkı sağlandığı ileri sürülmektedir (Montazer and Afjeh 2007; Elibol 2008; Ahmed *et al.* 2020). Örneğin, kitosan ve türevlerinin, biyotik stres altındaki bitkide hem enfeksiyon bölgeleri çevresinde lokal olarak hem de bitkinin sağlıklı kısımlarını uyarmak için sistemik olarak bir dizi bitki cevabını artıran güçlü indükleyiciler olarak işlev gördüğü bilinmektedir. Bunlar erken sinyal olaylarının yanı sıra fitoaleksinler ve PR-proteinleri gibi savunmayla ilgili metabolitlerin ve proteinlerin birikmesini de içerir (El Hadrami *et al.* 2010). Bitkilerde kitosanın etki mekanizması henüz tam olarak anlaşılammıştır. Bununla birlikte, kitosanın bitkilerde bir dizi savunma cevabını indüklediğini gösteren birçok rapor vardır. Bilindiği gibi mantar hücre çeperlerinde bulunan kitine özgü spesifik reseptörler, bitki hücre zarlarında bulunur ve patojenlere karşı güçlü savunma cevapları sağlar. Bitkiye kitosan gibi kitin türevli bir uygulama, kitin içeren organizma ile ilgili bileşikler taklit ettikleri için savunma mekanizmalarını aktive eder (Hidangmayum *et al.* 2019). Mevcut araştırmada, kontrollü laboratuvar koşullarındaki hidroponik sistemde yetiştirilen mısır (*Zea mays* cv. Arifiye) bitkilerinde eksojen MG toksisitesinin yatıştırılmasında eksojen kitosan uygulamasının fizyolojik ve biyokimyasal etkileri araştırılmıştır.

Çalışmamızda mısır bitkisinde MG toksisitesinin kitosan uygulamaları ile iyileştirilmesi belirlenirken, öncelikle bitki kök-gövde uzunluğu ve yaş-kuru ağırlık gibi fizyolojik parametreler değerlendirilmiştir. Bunlara ilave olarak MG'yi hücresele düzeyde süpüren ve MG detoksifikasyonunda temel rolü olan glioksalaz sistemi enzim (glioksalaz-I ve glioksalaz-II) aktiviteleri ölçülmüştür. Bu iki enzim aktivitesinin artması, MG'nin aşamalı olarak toksik etkisini ortadan kaldırmada büyük öneme sahiptir. Ayrıca, MG gibi stres esnasında hücrelerde aşırı üretilen ROS bileşiklerinin değişimi de stres cevabının belirlenmesinde önemlidir. ROS'lar hücre membranlarına saldırır ve fosfolipidlerin oksidasyonunu artırarak hücresele hasara sebep olur. Böyle bir durumda membranların oksidasyon derecesi ölçülerek bitkinin stresten korunup korunamadığı hakkında fikir sahibi de olunabilmektedir. Hücre membranlarında fosfolipidlerin en önemli oksidasyon ürünü malondialdehittir (MDA). Bu bileşiğin artması stres zararının yükseldiğine işaret eder ve membranlarda hasarın bir ölçütü olarak kullanılır. Ayrıca stres zararının azaltılmasında ROS bileşiklerinin hücrelerden temizlenmesinde katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APX), glutatyon redüktaz (GR) ve guaiakol peroksidaz (GPX) gibi antioksidan enzim aktivitelerinin artışı da önemlidir (Foyer and Noctor 2005; Kaur *et al.* 2016; Hoque *et al.* 2016). Çalışmada bu parametreler ayrı ayrı ve birlikte değerlendirilerek kitosanın MG stresini yatıştırmada etkisi tartışılmıştır.

Çalışmada, model bir organizma olarak mısır fide yapraklarına (9 günlük) önce kitosanın %0.05 ve %0.1 konsantrasyonları uygulanmış ve bundan 1gün sonra (10. gün) aynı fideler MG'nin 50 ve 100 mM MG dozlarına maruz bırakılmıştır. MG uygulamasından 3 gün sonra (13. gün) fideler hasat edilmiştir. Literatürde de çalışmamızdaki gibi bazı bitkilerinde benzer şekilde uygulama yapılarak kitosanın etkisinin denendiği araştırmalar bulunmaktadır (Özdemir 2014; Shahri 2018). Ayrıca kitosanın yapraktan uygulaması birçok bitki sisteminde ve çeşitli amaçlarla bildirilmiştir. Örneğin, bir kitosan pentamerinin yapraktan uygulanması, uygulamadan bir gün sonra soya fasulyesi ve mısırın birçok fizyolojik parametreyi etkilemiştir (El Hadrami *et al.* 2010).

MG toksisitesinin bitkilerde sürgün (gövde) ve kök uzunluğunu etkileyerek bitki büyüme ve gelişimini önemli derecede etkilediği bazı araştırmalarda rapor edilmiştir (Paulus *et al.* 1993; Kaur *et al.* 2016). Bu nedenle çalışmamızda da öncelikle hem tek başına kitosanın hem de MG'nin farklı farklı dozları ile bunların kombinasyonlarının mısır fidelerinde kök ve gövde (sürgün) uzunluklarında meydana gelen değişimler çalışılmıştır. Bulgulara göre tek başına kitosan ve MG uygulamaları kontrole göre kök uzunluklarını düşürmüştür (Çizelge 4.1). Kitosan+MG uygulamaları tek başına MG uygulamasına göre kök uzunluklarını artırmada başarılı olamamış ve kök uzunluklarını düşürmüştür. Aynı uygulamalar mısır gövdelerinde değerlendirildiğinde köklerde elde edilen bulgulara ters bir etki belirlenmiştir (Çizelge 4.1). Bir çalışmada kitosan uygulamasının frenk kimyonu bitkisinde (*Carum copticum*) çimlenme yüzdesi, kök gövde uzunluğu ve kuru madde miktarında artışa neden olduğu ileri sürülmüştür (Mahdavi and Rahimi 2013). Ancak mısır bitkisinde %0.01 kitosan uygulamasının köklerde hafif bir artışa neden olurken, gövde üzerinde anlamlı bir etki yapmadığı belirlenmiştir (Shahri 2018). İlave olarak, bir kitosan pentamerinin yaprakтан uygulanması, mısır ve soya fasulyesi bitki boyunun, kök uzunluğunu, yaprak alanını ve toplam kuru kütleyi etkilemediği ileri sürülmüştür (El Hadrami *et al.* 2010). Bu bulgular çalışılan konsantrasyonun önemini göstermektedir. Diğer taraftan tek başına kitosan ve MG uygulamaları kontrole göre gövdelerde artışa neden olurken, bunların kombinasyonlarında tek başına MG uygulamasına göre genelde anlamlı bir fark ( $P>0.05$ ) belirlenememiştir. Grafik incelendiğinde sadece C<sub>0.1</sub>+MG<sub>100</sub> uygulaması gövde uzunluğunu artırmıştır.

MG toksisitesinin bitkilerde yaş ve kuru ağırlığı etkileyerek bitki büyüme ve gelişimini önemli derecede etkilediği bazı araştırmalarda rapor edilmiştir (Paulus *et al.* 1993; Kaur *et al.* 2016). Çalışmamızda tek başına kitosan ve MG uygulamaları kök ve gövdelerde yaş ağırlıkları genelde artırmıştır (Çizelge 4.2). Kitosan+MG uygulamaları da tek başına MG uygulamasına göre yaş ağırlıkları genelde artırmıştır (Çizelge 4.2). Bu verilere göre tek başına kitosan ve MG uygulamaları yaş ağırlığı artırmış ve ilave olarak bu iki bileşiğin kombinasyonu bu artışı daha fazla ilerletmiştir. Literatürde turp bitkisi (*Raphanus sativus*) üzerinde yapılan bir çalışmada kitosanın bitki yaş ağırlıklarını artırdığı ileri sürülmüştür (Mosa *et al.* 2011). Tek başına MG uygulamasının da belirli bir

konsantrasyona kadar bitki yaş ağırlık üzerinde olumlu etki yaptığı ileri sürülmüştür (Li *et al.* 2017). Shahri 2018 de mısır bitkilerinde %0.01 kitosan uygulamasının bitki yaş ağırlığını hafif derecede stimüle ettiğini rapor etmiştir. Bazı çalışmalarda, kitosanın yapraklara uygulandıktan sonra fasulye bitkilerindeki terlemeyi azaltabildiği açıklandı. Yazarlar, bu aktivitenin, uygulanan yapraklardaki absisik asit (ABA) içeriğindeki artış sayesinde gerçekleştiğini göstermiştir. Tarama elektron mikroskopisi ve diğer histositokimya tekniklerini kullanarak, ABA içeriğindeki artış üzerine kısmi bir stomatal kapanmanın meydana geldiğini ve su buharı ve genel terleme hızında bir azalmaya yol açtığı gösterildi (El Hadrami *et al.* 2010). Çalışmamızda kitosan+MG uygulamasının etkisinde yaş ağırlığının artışı bu nedenle sürpriz olmayabilir. Bu etki hem kitosan hem de MG'nin bitkide stomaların kapanmasına ve bu nedenle de dokularda bağıl su tutulumunun artmasından kaynaklanabilir. Bu önerinin desteklenmesi için daha ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır. Çalışmamızda bitki kök-gövde kuru ağırlık verileri değerlendirildiğinde (Çizelge 4.2), kitosan uygulamasının kök ve gövde kuru ağırlıklarını hafif derecede düşürürken, MG uygulamaları, özellikle de 100 mM MG, kuru ağırlığı her iki dokuda olumsuz etkilemiştir. Kitosan+MG uygulamalarında ise özellikle %0.1 kitosan her iki MG uygulamasında azalan kuru ağırlığı iyileştirebilmiştir (Çizelge 4.2). Bu verilere göre bitkiye MG uygulamasından önce uygulanan kitosan, MG etkisiyle azalan bitki kuru ağırlığını iyileştirebilmiştir.

Stres koşullarında hücrel membranlarda hasar olduğundan membran geçirgenliği bozulur ve hücrelerden iyon sızıntısı artar (canlılık azalır). Bu iyon sızıntısı seviyesi ölçülerek stres derecesi hakkında önemli veriler elde edilir (Taşgın *et al.* 2003). Çalışmamızda kitosan ve MG uygulamaları mısır fideleri yapraklarında iyon sızıntısını artırmıştır (Çizelge 4.3). MG uygulamasında iyon sızıntısının kontrole göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Buna karşılık MG uygulanmış fidedelerde kitosan uygulaması yapraklarda MG etkisiyle artan iyon sızıntısını düşürmüştür, yani canlılığı artırmıştır (Çizelge 4.3). Literatürde kitosan ve MG uygulamalarında iyon sızıntısı miktarı değerlendirilmediğinden bu veriler başka bitkilerde de test edilmeye ihtiyaç duymaktadır.

Stres koşullarında dokularda çözünebilir protein miktarı değerlendirilerek bitkinin stres cevabı hakkında önemli bir veri sağlanabilmektedir. Çalışmamıza tek başına kitosan ve MG uygulamaları birbirinden bağımsız olarak kontrole göre kök ve gövdede toplam çözünebilir protein içeriğini genelde düşürmüştür (Çizelge 4.4). Ancak kitosan+MG uygulama gruplarında tek başına MG grubuyla kıyaslandığında, protein içeriği özellikle köklerde önemli ( $P<0.05$ ) seviyede artmıştır. MG'nin tek başına bitkilerde protein içeriğini düşürdüğüne ait bazı kanıtlar bulunmaktadır (Wu and Juurlink 2002; Hoque *et al.* 2010). Kitosanın ise polimer büyüklüğüne ve konsantrasyona bağlı olarak bitkide protein içeriğini artırabildiği veya etkilemediği ileri sürülmüştür (Acemi and Acemi 2019; Muley *et al.* 2019). Elde ettiğimiz verilere göre, MG toksisitesinin arttığı koşullarda kitosan uygulamasının protein içeriğinde iyileşme sağladığı ileri sürülebilir.

Oksidatif stres koşullarında bitkide fotosentetik pigmentlerin içeriği en hızlı etkilenen parametreler arasındadır. Bu sebeple klorofil ve karotenoid içeriği MG ve ROS düzeyleri artışında sıklıkla değerlendirilmektedir. Çalışmamızda tek başına kitosan ve MG uygulamaları kontrole göre toplam klorofil (klorofil a+b) ve karotenoid içeriğini genelde düşürmüştür (Çizelge 4.5). Ancak kitosan+MG uygulama gruplarında tek başına MG grubuyla kıyaslandığında hem toplam klorofil hem de karotenoid içeriği önemli ( $P<0.05$ ) seviyede artmıştır. MG ve kitosanın klorofil ve karotenoid içeriğini tek başına uygulandıklarında düşürdüklerini gösteren bazı çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin iki fesleğen (*Ocimum ciliatum* ve *O. basilicum*) türü üzerinde yapılan çalışmada kitosan uygulamasının klorofil içeriğini hafif düşürdüğünü ancak karotenoid içeriğini anlamlı olarak etkilemediği belirlenmiştir (Pirbalouti *et al.* 2017). Buna karşılık kitosanın klorofil içeriğini artırdığını gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (Mosa *et al.* 2011; Romandan and Farouk 2012). İlave olarak, bir kitosan pentamerinin yapraktan uygulanması, uygulamadan bir gün sonra soya fasulyesi ve mısırın net fotosentetik oranını etkilemiştir. Bu, stomatal iletkenlik ve terleme oranındaki artışlarla korelasyon göstermekteydi. Ancak, kitosan yaprak uygulamasının hücreler arası CO<sub>2</sub> konsantrasyonu üzerinde herhangi bir etkisi olmamıştır. Özetle, net fotosentetik oran üzerinde gözlenen etkinin, yüksek molekül ağırlıklı kitosanın yapraktan uygulanmasından sonra, mısır ve soya fasulyesinde genel olarak yaygın olduğu, diğer taraftan, mısır veya soya fasulyesi bitki

yüksekliğini, kök uzunluğunu, yaprak alanını ve toplam kuru kütleyi etkilemediği ileri sürülmüştür (El Hadrami *et al.* 2010). Bizim bulgularımızda ise kitosan uygulamasından sonra MG uygulanmış mısır fidelerinde klorofil ve karotenoid içeriğinin artırılması literatür için yeni bir veri olmuştur.

Çalışmada bütün uygulama gruplarında içsel MG içeriği de değerlendirilmiştir. Böylece kitosan uygulamasının içsel MG seviyesi üzerine etkisi belirlenmiş ve MG seviyeleri gliksalaz enzim aktiviteleri ile karşılaştırılmıştır. İçsel MG verileri incelendiğinde, tek başına kitosan uygulama gruplarında MG içeriği kontrole göre düşmüştür (Çizelge 4.6). Ancak MG uygulamalarının her ikisi (50 ve 100 mM) mısır fidelerinin kök ve gövdelerinde MG içeriğini kontrol bitkilere göre artırmıştır. İlave olarak gövdedeki MG artışı köklere göre çok daha yüksek olmuştur (Çizelge 4.6). Bu bulgu yapraklara uygulanan MG'nin daha çok yapraklarda biriktiği ve köklere olan mobilizasyonunun düşük olduğunu gösterir. Buna karşılık çimlenen mısır fidelerinde yapılan bir çalışmada çimlenme ortamına uygulanan MG'nin daha çok köklerde biriktiği belirlenmiştir (Yığıt 2019). Çalışmamızda kitosan+MG uygulama gruplarının hemen hepsinde kontrollerine göre (tek başına MG uygulaması) artan içsel MG miktarı, hem kök hem de gövdede önemli ( $P<0.05$ ) oranda düşürülmüştür (Çizelge 4.6). Bu da mısır fidelerinde MG stresinden önce uygulanan kitosanın fidelerde MG seviyesini düşürebilmektedir.

Gliksalaz yolağındaki enzimler (Gly I ve Gly II) bitkilerde birçok hücrel fonksiyonlarda rol almakla birlikte bu sistemin en önemli rolü stres cevabında görülmektedir (Kaur *et al.* 2014). Strese maruz bitkilerde içsel MG miktarını gliksalaz sistemi enzimleri düzenler ve hücrede GSH'ın yeniden sentezine katkı yapar. Oksidatif stres cevabının düzenlenmesi için hücrede yüksek GSH/GSSG oranının bulunması sağlanmalıdır (Yadav *et al.* 2005; Noctor *et al.* 2012). Ayrıca yüksek GSH; glutatyon S-transferaz, GPX ve APX gibi bazı antioksidan enzimlerin çalışması için sağlanmalıdır (Yadav *et al.* 2008). Bazı çalışmalar, gliksalaz ve antioksidan sistemin bitkilerde koordineli çalıştığını ve gliksalaz sisteminin ROS'ların süpürülmesine doğrudan katkı yaptığını belirtmişlerdir (Yadav *et al.* 2005; Upadhyaya *et al.* 2011; Mostofa *et al.* 2014, 2015). Bitkilerde birçok farklı faktöre cevap olarak gliksalaz enzim aktivitelerinin

stimüle edildiği ileri sürülmüştür (Hossain and Fujita 2009). Çalışmamızda kitosan uygulaması mısır fidelerinin kök ve gövdelerinde kontrole göre glioksalaz-I (Gly I) aktivitesini artırmıştır (Çizelge 4.7). Tek başına MG uygulaması ise Gly I aktivitesini kökte artırırken gövdede düşürmüştür. Kitosan+MG uygulamalarında ise hem kök hem de gövdelerde Gly I aktivitesi kontrolüne göre önemli ( $P<0.05$ ) seviyede artmıştır. Aktivitedeki artışlar her iki kitosan uygulamasında köklerde gövdeye göre daha yüksek olmuştur (Çizelge 4.7). Buna ilave olarak tek başına kitosan ve MG uygulamalarına cevap olarak Gly II aktivitesi kontrole göre kök ve gövdelerde artmıştır (Çizelge 4.8). Kitosan+MG uygulama gruplarının tümünde tek başına MG grubuna göre Gly II aktivitesi önemli oranda ( $P<0.05$ ) uyarılmıştır. Bu artışlar köklerde oransal olarak daha yüksek olmuştur (Çizelge 4.8). Bu verilere göre kitosan uygulaması Gly I ve Gly II aktivitelerini artırarak glioksalaz sistemini stimüle etmiştir. Bu durum kitosanın her iki konsantrasyonunda belirlenmiştir. Bu veriler aynı uygulamalarda belirlenen içsel MG verileri (Çizelge 4.6) ile anlamlı bir uyum görünmektedir. Şöyle ki; MG toksisitesine maruz mısır fidelerinde kitosan uygulaması içsel MG içeriğini düşürmüştür. Bu düşüşün en önemli sebebi, kitosanın hücresel sistemde Gly I ve Gly II aktivitesini stimüle etmesine dayandırılabilir. Çünkü artan bu enzimlerin aktivitesi ortamda MG'yi süpürerek seviyesini düşürecektir. Literatürde kitosanın MG seviyesi ve glioksalaz enzim aktiviteleri üzerine etkisini gösteren her hangi bir çalışma bulunmamaktadır, ancak ekzojen MG uygulamasında glioksalaz enzim sisteminin mısır fidelerinde arttığını gösteren çalışma bulunmaktadır (Yığıt 2019). Yine *Arabidopsis thaliana*'da 1 mM MG uygulamasının Gly I aktivitesini artırdığı gösterilmiştir (Hoque *et al.* 2017). Literatürde kitosanın Gly I ve II aktivitesi üzerinde etkisini gösteren herhangi bir çalışma bulunmadığından mevcut çalışma verileri gelecek araştırmalar için önemli bir veri sunacaktır.

Hücre membranlarında lipidlerin peroksidasyonu (LPO) doymamış (poliansature) yağ asitlerinin oksidatif yıkımı olarak bilinir. Hücre membranlarındaki yağ asitleri ve sterollerin doymamış bağları, ROS'larla hızlıca reaksiyon vererek lipid peroksidasyon ürünlerinin oluşmasına neden olur. Sonuçta, membran geçirgenliği ve özellikleri bozulur ve membranlarda elektrolit sızıntısı artar. Bu durum hücrelerde önemli hasarlara neden

olur. Stres koşullarında LPO seviyesi belirlenerek, hücresele düzeyde stresin sebep olduğu hasarın derecesi hakkında bilgi sağlanabilir. Stres koşullarında, doymamış yağ asitlerinin bozulmasıyla son ürün olarak çok sayıda aldehit bileşikleri oluşur. Bunlar içerisinde en yaygını MDA'dır. Hücrelerde MDA içeriğindeki artış doğrudan LPO miktarını göstermekten ziyade, onun hücresele seviyesi hakkında bir bilgi vermektedir. Dolayısıyla MDA içeriğindeki artış, hücresele membranların yapısal bütünlüğünün bozulduğunun ve LPO seviyesinin önemli bir indikatörüdür (Apel and Hirt 2004; Esim and Atıcı 2013). Bizim çalışmamızda tek başına kitosan uygulamaları kontrole göre MDA içeriğini hem kökte hem de gövdede düşürmüştür. MG uygulamaları kontrole göre kök ve gövdede MDA içeriğini artırmıştır (Çizelge 4.9). Kitosan+MG uygulamaları MDA içeriğini hem kök hem de gövdede düşürmüştür. Mısır bitkisiyle yapılan çalışmada tek başına kitosan uygulamasının MDA içeriğini hem kök hem de gövdede düşürdüğü belirlenmiştir (Shahri 2018). Ancak kitosan+MG uygulaması ile ilgili herhangi bir çalışma olmadığından bizim verilerimiz literatür için yeni olup başka çalışmalarla desteklenmeye ihtiyacı vardır.

Bitkilerde, abiyotik stres koşullarında ROS ( $H_2O_2$  ve  $O_2^{\cdot-}$  gibi) üretimi artar ve oksidatif stresin başlamasına neden olur (Kaur *et al.* 2014; Wang *et al.* 2019). Son yıllarda, kitosanın yapısı itibariyle antioksidan özelliğine giderek artan bir ilgi görülmektedir. Suda çözünür kitosanın, hidroksil radikallerinin,  $H_2O_2$  ve süperoksit anyonunun güçlü bir süpürücüsü olduğu gösterilmiştir. ROS'lar için süpürme oranı uygulanan kitosan konsantrasyonları ile bağlantılıdır. Çalışmalarda süperoksit anyonu ve hidroksil radikallerine karşı en düşük temizleme yeteneği yüksek moleküler ağırlığa sahip oligomer kitosanlar ile kaydedildi. Ancak, düşük molekül ağırlıklı kitosan oligomerleri daha iyi bir antioksidan aktivite sergilemiştir (El Hadrami *et al.* 2010). Çalışmamızda tek başına MG uygulamasının her ikisi genelde  $H_2O_2$  içeriğini kontrole kıyasla kök ve gövdede önemli ( $P<0.05$ ) seviyede artırmıştır (Çizelge 4.10). Buna karşılık tek başına kitosan uygulaması kontrol fidelerine göre kök ve gövdelerde  $H_2O_2$  içeriğini düşürmüştür (Çizelge 4.10). Bu olumlu etkide %0.1 kitosan uygulamasının daha etkili olduğu belirlenmiştir. Literatürde MG uygulamasının içsel  $H_2O_2$  içeriğini artırdığına (Hossain and Fujita 2010; Kaur *et al.* 2014) ve tek başına kitosan uygulamasının da  $H_2O_2$  içeriğini düşürdüğüne ait veriler bulunmaktadır (Behboudi *et al.* 2018; Hidangmayum *et al.* 2019). Çalışmamızda ilave

olarak kitosan+MG uygulamaları tek başına MG uygulamasına göre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeriğini kök ve gövdelerde düşürmüştür (Çizelge 4.10). Bu verilere göre MG uygulamasının kök ve gövdelerde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeriğini artırdığı, ancak bu olumsuz etkinin kitosan uygulamasıyla düşürüldüğü görülmektedir. Bu da kitosanın H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> süpürücü etkisiyle hücrelerde ROS artışını baskıladığına işaret eder.

Çalışmamızda tek başına MG uygulamaları O<sub>2</sub><sup>-</sup> içeriğini kontrole kıyasla kök ve gövdede önemli (P<0.05) seviyede artırmıştır (Çizelge 4.11). Tek başına kitosan uygulaması da kontrol fidelerine göre daha çok köklerde O<sub>2</sub><sup>-</sup> içeriğini artırmıştır. Ancak gövde üzerinde kitosanın düşük dozda O<sub>2</sub><sup>-</sup> içeriğini düşürdüğü, yüksek dozda (%0.1) ise artırmıştır (Çizelge 4.11). Literatürde MG uygulamasının içsel O<sub>2</sub><sup>-</sup> içeriğini artırdığına (Hossain and Fujita 2010; Kaur *et al.* 2014) ve tek başına kitosan uygulamasının da O<sub>2</sub><sup>-</sup> içeriğini düşürdüğüne ait veriler bulunmaktadır (Behboudi *et al.* 2018; Hidangmayum *et al.* 2019). Çalışmamızda ilave olarak kitosan+MG uygulamaları tek başına MG uygulamasına göre O<sub>2</sub><sup>-</sup> içeriğini kök ve gövdelerde düşürmüştür (Çizelge 4.11). İstisna olarak düşük dozda kitosan gövdede O<sub>2</sub><sup>-</sup> içeriğini düşürememiştir. Bu verilere göre MG uygulamasının kök ve gövdelerde O<sub>2</sub><sup>-</sup> içeriğini artırdığı, ancak bu olumsuz etkinin kitosan uygulamasıyla düşürüldüğü görülmektedir. Bu da kitosanın O<sub>2</sub><sup>-</sup> süpürücü etkisiyle hücrelerde ROS artışını kontrol ettiğini gösterir.

MG, yüksek dozlarda hücreler için sitotoksik olmakla birlikte düşük dozlarda sinyal bileşik olarak işlev görür. Sitotoksik dozlarda, gelişmiş glikasyon son ürünlerinin (AGE'ler) etkisiyle SOD, CAT, GPX, APX, GST ve GR gibi antioksidan savunma enzimlerini etkisizleştirebilir (Hoque *et al.* 2012; Kaur *et al.* 2014; Hossain *et al.* 2016). Hücrelerde SOD enzimi ROS'lara karşı ilk savunma enzimidir ve O<sub>2</sub><sup>-</sup>'nin hücrel komparmanlardan süpürülmesini sağlar. Bizim bulgularımızda tek başına kitosanın her iki konsantrasyonu kontrole göre kök ve yapraklarda SOD aktivitesini artırmıştır (Çizelge 4.12). MG uygulamaları ise kontrole göre SOD aktivitesini köklerde düşürmüş, ancak gövde 50 mM MG'de düşerken, 100 mM MG'de artmıştır. Literatürde mısır fidelerinde, düşük dozlarda (50 ile 150 mM) MG uygulamasının kök ve yaprakta SOD aktivitesini değiştirmedeği ileri sürülmüştür (Wang *et al.* 2019). Buna karşılık çim (*Lolium*

*multiflorum*) üzerinde yapılan bir çalışmada tek başına kitosan uygulamasının SOD aktivitesini hafif derecede artırdığı ileri sürülmüştür (Zhao *et al.* 2019). Diğer taraftan, çalışmamızda kitosan+MG uygulamaları tek başına MG grubuna göre kıyaslandığında SOD aktivitesini genelde artırmıştır (Şekil 4.10). Artışlar köklerde gövdeye göre daha belirgin olmuştur. Bu bulgu, kitosanın fidelerde MG etkisiyle düşen SOD aktivitesinin iyileşmesine önemli bir katkı yaptığına ve bu yüzden de süperoksit anyonu seviyesini düşürdüğünü gösterir. Çünkü çalışmamızda kitosanın bu etkisi süperoksit anyonu içeriğiyle (Çizelge 4.12) iyi derecede örtüşmektedir.

Bitki hücrelerinde en fazla kloroplast, peroksizom ve glioksizomlarda yerleşik olan ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'yi süpürmede güçlü antioksidan enzimlerden birisi de katalazdır (CAT). Oksidatif stres şartlarında CAT aktivitesinin regülasyonu hücre içi ROS içeriğinin düşürülmesi için büyük önem arz etmektedir (Purev *et al.* 2010; Esim and Atıcı 2016). Çalışmamızda tek başına kitosanın her iki konsantrasyonu kontrole göre köklerde CAT aktivitesini artırırken, gövdelerde düşürmüştür (Çizelge 4.13). MG uygulamaları da benzer olarak kontrole göre CAT aktivitesini köklerde artırmış, gövde düşürmüştür (Çizelge 4.13). Hem kitosan hem de MG'nin CAT aktivitesi üzerinde ayrı ayrı olarak benzer bir etki yapması ilginç karşılanmıştır. Wang *et al.* (2019), çimlenen mısır fidelerinde MG uygulamasının CAT aktivitesini uyardığını ileri sürmüşlerdir. Benzer olarak, bir çeşit çim (*Lolium multiflorum*) üzerinde yapılan bir çalışmada tek başına kitosan uygulamasının CAT aktivitesini artırdığı belirlenmiştir (Zhao *et al.* 2019). Bu veriler bizim çalışmamızda kökler ile uyumlu iken, gövdelerden elde edilen verilerle uyuşmamaktadır. Bizim verilerimize göre, MG köklerde düşük konsantrasyonda yapraklarda ise daha yüksek dozda biriktiği görülmektedir (Çizelge 4.6). Çalışmamızda hem kitosan hem de MG, yapraklara uygulandığından bu iki maddenin yapraklarda yüksek dozda birikerek CAT aktivitesinin düşmesine, köklerde ise düşük dozda biriken bu bileşikler CAT aktivitesinin artmasına sebep olmuş olabilirler. Ancak bu verilerin daha ayrıntılı test edilmelidir. Diğer taraftan çalışmamızda kitosan+MG uygulamaları verileri incelendiğinde (Çizelge 4.13), kitosan+MG grubu köklerinde CAT aktivitesi düşerken, gövdede ise genelde CAT aktivitesinde bir artış belirlenmiştir. Bu veriler, MG toksisitesindeki fidelerde kitosan

MG'nin CAT aktivitesi üzerindeki etkisini neredeyse tam ters olarak değiştirdiğini göstermektedir.

APX indirgeyici ajan olarak 2 molekül askorbik asidi kullanarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'yi süpüren peroksidaz grubu bir enzimdir. Bitki hücrelerinde kloroplastın stromasında, tilakoit membranlarda, sitoplazmada, glioksizom ve mitokondride bulunabilmektedir (Apel and Hirt 2004). Oksidatif stres koşullarında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'yi süpüren CAT ve GPX enzimlerine ilave olarak APX aktivitesinin değerlendirilmesi önemlidir. Bu araştırmada tek başına kitosan uygulamaları APX aktivitesini kontrole göre kök ve gövdede önemli (P>0.05) artırmıştır (izelge 4.14). Bu artışların kökte daha belirgin olduğu görülmektedir. Buna karşılık tek başına MG uygulamaları, kontrole göre APX aktivitesini kök ve gövdede önemli (P<0.05) seviyede düşürmüştür (izelge 4.14). Son yıllarda yabani im (*Lolium multiflorum*) zerinde yapılan bir çalışmada da tek başına kitosan uygulamasının APX aktivitesini artırdığı gösterilmiştir (Zhao *et al.* 2019). Literatürde bu konuda tek bir çalışma bulunmuş ve bu çalışmada da MG ile muamele edilmiş imlenen mısır fidelerinde APX aktivitesinin arttığı belirlenmiştir (Wang *et al.* 2019). Diğer taraftan çalışmamızda kitosan+MG uygulamalarının her ikisi, MG grubuna göre kıyaslandığında kök ve gövdede APX aktivitesini önemli seviyede artırmıştır (izelge 4.14). Bu veriler, MG toksisitesi altındaki fidelere kitosan uygulandığında, MG'nin APX aktivitesi üzerinde olumsuz etkisini değiştirerek aktiviteyi artırmıştır. Bu artış H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin süpürülmesini hızlandırdığına işaret eder. Çünkü alışmamızda MG toksisitesine maruz fidelerde kitosan uygulaması H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeriğini düşürmüştür (şekil 4.10). Bu iki deneysel parametre birbirini desteklemektedir.

POX'lar, bitkilerde farklı dokularda ve farklı hücre alanlarında bulunan büyük bir enzim ailesini temsil eder. Örneğin prostetik grup olarak *HEM* içeren GPX güçlü antioksidatif bir enzim olup substrat olarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'yi kullanarak fenoller ve hidrokinonları içine alan önemli sayıda aromatik bileşiklerin dehidrojenasyonunu kataliz eder. Farklı stres faktörlerinden yüksek seviyede etkilenmelerinden dolayı, POX'ların stres indikatör enzimleri olarak tanımlanmalarına neden olmuştur (Apel and Hirt 2004). Çalışmamızda tek başına kitosanın iki konsantrasyonu GPX aktivitesini kontrole göre kök ve gövdede

artırmıştır (Çizelge 4.15). Bu artışların kökte daha belirgin olduğu görülmektedir. Tek başına MG uygulamaları da GPX aktivitesini kontrol grubuna göre kök ve gövdede önemli ( $P<0.05$ ) seviyede artırmıştır (Çizelge 4.15). Mısır fidelerinde MG uygulamasının GPX aktivitesini artırdığı belirlenmiştir (Wang *et al.* 2019). Farklı bir bitki olarak çim (*Lolium multiflorum*) üzerinde yapılan bir çalışmada da tek başına kitosan uygulamasının GPX aktivitesini artırdığı gösterilmiştir (Zhao *et al.* 2019). Bu iki farklı çalışmada elde edilen veriler bizim bulgularımızla örtüşmektedir. Diğer taraftan çalışmamızda kitosan+MG uygulamalarının her ikisi, MG grubuna göre kıyaslandığında köklerde GPX aktivitesini artırmış, gövdelerde ise önemli oranda düşürmüştür (Çizelge 4.15).

Antioksidan enzimler arasında glutasyon redüktaz (GR), okside glutasyonun (GSSG) redükte glutatyona (GSH) indirgenmesini katalize eden güçlü bir antioksidatif enzimdir. İlave olarak GR, hücrelerin GSH düzeylerini koruyan GSH redoks döngüsü için kilit bir görev üstlenir. GSH, oksidatif strese cevapta önemli olup serbest radikallerle ve organik peroksitlerle reaksiyona giren bir antioksidan, amino asit taşınmasında ve radikal peroksitler ile ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda glutasyon S-transferazlar için bir substrat olarak çalışır. Bu nedenle oksidatif stres altındaki bitkilerde GR aktivitesinin değerlendirilmesi önemli veriler sağlayabilmektedir (Apel and Hirt 2004). Bu çalışmada tek başına kitosan uygulamalarından düşük doz (%0.05) GR aktivitesini kontrole göre kök ve gövdede önemli ( $P>0.05$ ) düşürürken, yüksek doz (%0.1) artırmıştır (Çizelge 4.16). Buna karşılık tek başına MG uygulamaları, kontrole göre GR aktivitesini kök ve gövdede önemli ( $P<0.05$ ) seviyede düşürmüştür (Çizelge 4.16). Diğer taraftan çalışmamızda kitosan+MG uygulamalarının her ikisi, MG grubuna göre kıyaslandığında kök ve gövdede GR aktivitesini önemli seviyede artırmıştır (Çizelge 4.16). Literatürde gerek tek başına MG veya kitosan veya kitosan+MG uygulamasına ait herhangi bir veri belirlenememiştir. Ancak verilerimiz MG toksisitesi altındaki mısır fideleri kitosan uygulandığında, MG'nin GR aktivitesi üzerinde olumsuz etkisini değiştirerek aktiviteyi artırmıştır. Bu sonuçlar kitosanın MG stresi boyunca mısır fidelerini koruduğuna işaret edebilir.

## Sonuçlar

1. Tek başına kitosan ve MG uygulamaları, kök uzunluklarını düşürmüştür. Kitosan+MG uygulamaları kök uzunluklarını artırmada başarılı olamadığı, ancak gövde üzerinde olumlu etki yaptığı bulunmuştur.
2. Tek başına kitosan ve MG uygulamaları, fidelerde yaş ağırlığı artırmıştır. Kitosan+MG uygulamalarında bu artış, daha fazla uyarılmıştır.
3. Mısır fidelerine MG uygulaması fide kuru ağırlığını düşürürken, uygulanan kitosan, MG etkisiyle azalan bitki kuru ağırlığını iyileştirebilmiştir.
4. MG uygulamaları, kök ve gövdede toplam çözünebilir protein içeriğini genelde düşürmüştür. Ancak kitosan+MG uygulama protein içeriği özellikle köklerde önemli seviyede artmıştır. MG toksisitesinin arttığı koşullarda kitosan uygulamasının protein içeriğinde iyileşme sağladığı bulunmuştur.
5. Tek başına MG uygulamaları toplam klorofil (klorofil a+b) ve karotenid içeriğini genelde düşürmüştür. Ancak kitosan uygulanmış ve MG etkisi altındaki mısır fidelerinde klorofil ve karotenoid içeriğinin arttığı belirlenmiştir.
6. MG uygulaması mısır fide yapraklarında iyon sızıntısını artırmıştır. Diğer bir ifadeyle canlılığı düşürmüştür. Buna karşılık MG toksisitesine maruz fidelerde kitosan uygulaması, yapraklarda MG etkisiyle artan iyon sızıntısını düşürmüştür.
7. MG stresinden önce uygulanan kitosanın, fidelerde içsel MG seviyesini düşürebildiği bulunmuştur.
8. Kitosan+MG uygulamalarının MDA içeriğini (dolayısıyla LPO seviyesi) hem kök hem de gövdede düşürüldüğü bulunmuştur.
9. MG uygulamasının kök ve gövdelerde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeriğini artırdığı, ancak bu olumsuz etkinin kitosan uygulamasıyla düşürüldüğü bulunmuştur.
10. Tek başına MG uygulamaları O<sub>2</sub><sup>-</sup> içeriğini kök ve gövdede artırmıştır. Kitosan+MG uygulamaları ise O<sub>2</sub><sup>-</sup> içeriğini kök ve gövdelerde düşürmüştür.
11. Tek başına MG uygulaması, Gly I aktivitesini kökte artırırken, gövdede düşürmüştür. Kitosan+MG uygulamalarında ise hem kök hem de gövdede Gly I aktivitesi önemli seviyede artmıştır.

12. MG uygulamalarına cevap olarak Gly II aktivitesi kök ve gövdelerde artmıştır. Kitosan+MG uygulama gruplarının tümünde Gly II aktivitesi önemli oranda artmıştır. Kitosan uygulaması, Gly I ve Gly II aktivitelerini artırarak glioksalaz sistemini stimüle etmiştir.
13. MG uygulamalarının SOD aktivitesini köklerde düşürdüğü, kitosan+MG uygulamalarının ise genelde artırdığı bulunmuştur.
14. Tek başına kitosan ve MG uygulamaları, ayrı ayrı olarak, CAT aktivitesini köklerde artırırken, gövdelerde düşürmüştür. Kitosan+MG uygulamaları ise CAT aktivitesi köklerinde düşürürken, gövdede artırmıştır.
15. Tek başına MG uygulamaları, GPX aktivitesini kök ve gövdede artırmıştır. Kitosan+MG uygulamaları GPX aktivitesini kökte artırmış, gövdede düşürmüştür.
16. MG uygulamaları, APX aktivitesini kök ve gövdede düşürmüştür. Kitosan+MG uygulamaları ise APX aktivitesini önemli seviyede artırmıştır.
17. Tek başına MG uygulamaları, GR aktivitesini kök ve gövdede düşürmüştür. Kitosan+MG uygulamaları ise GR aktivitesini önemli seviyede artırmıştır.

## Öneriler

Bu çalışma bulgularından yola çıkarak mısır bitkisinde MG toksisitesi koşullarında kitosan uygulaması, özellikle fotosentetik pigment ve protein içeriğini, glioksalaz sistem ve antioksidan enzim aktivitelerini artırarak, buna ilave olarak ROS seviyelerini ve membran iyon sızıntısını düşürerek bir koruma sağlayabildiği kanaatine ulaşılmıştır. Bu bulgular, mısır fidelerinde kitosan uygulamasının doğrudan ABA ve stoma iletkenliğiyle veya bundan bağımsız olarak çalışılan enzimlerin gen seviyelerinin düzenlenmesiyle gerçekleşebileceği fikirlerini doğurmuştur. Ancak bu hipotezlerin aynı ve farklı bitkilerde ayrı ayrı test edilmesi gerekmektedir. Bundan sonraki çalışmalarda, benzer koşullarda ABA sentezinden sorumlu enzimlerle glioksalaz enzimlerinin ifade düzeyleri, stoma iletkenliği ile karşılıklı olarak test edilebilir. Diğer taraftan bitkiye uygulanan kitosanın etki mekanizması ve bitkide son akıbeti konusunda da hiçbir bilgi olmadığından bu konular üzerinde de çalışmaların yapılması önemli veriler sağlayabilecektir.

## KAYNAKÇA

- Abu-Muriefah, S.S., 2013. Effect of chitosan on common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants grown under water stress conditions. *International Research Journal of Agricultural Science and Soil Science*, 3(6), 192-199.
- Acemi, R.K. and Acemi, A., 2019. Polymerization degree-dependent changes in the effects of in vitro chitosan treatments on photosynthetic pigment, protein, and dry matter contents of *Ipomoea purpurea*. *The Eurobiotech Journal*, 3(4), 197-202.
- Ahmed, K.B.M., Khan, M.M.A., Siddiqui, H., Jahan, A., 2019. Chitosan and its oligosaccharides, a promising option for sustainable crop production-a review. *Carbohydrate Polymers*, 115331.
- Ahmed, K.B.M., Khan, M.M.A., Jahan, A., Siddiqui, H., Uddin, M., 2020. Gamma rays induced acquisition of structural modification in chitosan boosts photosynthetic machinery, enzymatic activities and essential oil production in citronella grass (*Cymbopogon Winterianus* Jowitt). *International Journal of Biological Macromolecules*, 145, 372-389.
- Ahuja, I., De-Vos, R.C., Bones, A.M., Hall, R.D., 2010. Plant molecular stress responses face climate change. *Trends in Plant Science*, 15(12), 664-674.
- Akbulut, Y., 2014. *Tekstil Baskıcılığında Kullanılan Bazı Kıvamlaştırıcıların Tarıma Uygulanabilirliği Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, (Y. Lisans Tezi), Isparta.*
- Akkuş, İ., 1995. *Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza Yayınları. Konya.*
- Ananieva, E.A., Alexieva, V.S., Popova, L.P., 2002. Treatment with salicylic acid decreases the effects of paraquat on photosynthesis. *Journal of Plant Physiology*, 159(7), 685-693.
- Apel, K., Hirt, H., 2004. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55, 373-399.
- Aranaz, I., Mengibar, M., Harris, R., Paños, I., Miralles, B., Acosta, N., Gemma, G., Heras, Á., 2009. Functional Characterization of Chitin and Chitosan. *Curr Chem Biol* 3(2):203–230.
- Agboh, O.C., Qin, Y., 1997. Chitin and chitosan fibers. *Polymers for Advanced Technologies*, 8(6), 355-365.
- Atkinson, N.J., Urwin, P.E., 2012. The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *Journal of experimental botany*, 63(10), 3523-3543.
- Banu, M.N.A., Hoque, M.A., Watanabe-Sugimoto, M., Islam, M.M., Uraji, M., Matsuoka, K., Murata, Y., 2010. Proline and glycinebetaine ameliorated NaCl stress via scavenging of hydrogen peroxide and methylglyoxal but not superoxide or nitric oxide in tobacco cultured cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1010012170-1010012170.
- Bhomkar, P., Upadhyay, C.P., Saxena, M., Muthusamy, A., Prakash, N.S., Pooggin, M., Sarin, N.B., 2008. Salt stress alleviation in transgenic *Vigna mungo* L. *Hepper* (Blackgram) By overexpression of the glyoxalase I gene using a novel cestrum yellow leaf curling virus (CmylcV) Promoter. *Molecular Breeding*, 22(2), 169-181.

- Beaulieu, C., 2005. Chitin and chitosan, <http://www.plasticstrends.net>. Erisim Tarihi:11/11/2006.
- Behboudi, F., Tahmasebi-Sarvestani, Z., Kassaei, M.Z., Sanavi, M., Mohamad, S.A., Sorooshzadeh, A., Ahmadi, S.B. 2018. Evaluation of chitosan nanoparticles effects on yield and yield components of barley (*Hordeum vulgare* L.) under late season drought stress. *Journal of Water and Environmental Nanotechnology*, 3(1), 22-39.
- Bistgani, Z.E., Siadat, S.A., Bakhshandeh, A., Pirbalouti, A.G., Hashemi, M., 2017. Interactive effects of drought stress and chitosan application on physiological characteristics and essential oil yield of thymus daenensis celak. *The Crop Journal*, 5(5), 407-415.
- Bray, E.A., 2000. Response to abiotic stress. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, 1158-1203.
- Burtis, Ca., Ashwood, Er., 1999. Tietz textbook of clinical chemistry. W.B. Saunderscompany. Philadelphia, Pennsylvania.
- Büyük, İ., Soydam-Aydın, S., Aras, S., 2012. Bitkilerin stres koşullarına verdiği moleküler cevaplar. *Turkish Bulletin of Hygiene Experimental Biology/Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji*,69(2),97-110.
- Chang, S.H., Lin, H.T.V., Wu, G.J., Tsai, G.J., 2015. Ph effects on solubility, zeta potential, and correlation between antibacterial activity and molecular weight of chitosan, *Carbohydrate Polymers*, 134, 74-81.
- Chaudière, J., Ferrari-Iliou, R., 1999. Intracellular antioxidants: From chemical to biochemical mechanisms. *Food and Chemical Toxicology*, 37(9-10), 949-962.
- Choudhary, D., Chandra, D., Kale, R.K., 1997. Influence of methylglyoxal on antioxidant enzymes and oxidative damage. *Toxicology Letters*, 93(2-3), 141-152
- Considine, M.J., María-Sandalio, L., Helen-Foyer, C., 2015. Unravelling how plants benefit from ros and no reactions, while resisting oxidative stress. *Annals of Botany*, 116(4), 469-473.
- Chaplen, F.W., 1998. Incidence and potential implications of the toxic metabolite methylglyoxal in cell culture: A Review. *Cytotechnology*, 26(3), 173-183.
- Choudhury, F.K., Rivero, R.M., Blumwald, E., Mittler, R., 2017. Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *The Plant Journal*, 90(5), 856-867.
- Desai, K.M., Chang, T., Wang, H., Banigesh, A., Dhar, A., Liu, J., Wu, L., 2010. Oxidative stress and aging: Is methylglyoxal the hidden enemy. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 88(3), 273-284.
- Demir, A., Seventekin, N., 2009. Kitin, kitosan ve genel kullanım alanları. *Electronic Journal of Textile Technologies*. 3, 2, (92-103).
- El Hadrami, A., Adam, L.R., El Hadrami, I., Daayf, F., 2010. Chitosan in plant protection. *Marine Drugs*, 8(4), 968-987.
- Elibol, M., 2008, Kabuklu katı deniz ürünleri artıklarından kitin, kitosan ve türevlerinin üretimi, TÜBİTAK Proje No. 106M241, İzmir.
- Espartero, J., Sánchez-Aguayo, I., Pardo, J. M., 1995. Molecular characterization of glyoxalase-I from a higher plant; upregulation by stress. *Plant Molecular Biology*, 29(6), 1223-1233.
- Esim, N., and Atıcı, Ö., 2016. Relationships between some endogenous signal compounds and the antioxidantsystem in response to chilling stress in maize (*Zea mays* L.) seedlings. *Turkish Journal of Botany*, 40(1), 37-44.

- Esim, N., Tiryaki, D., Karadagoglu, O., Atici, O., 2013. Toxic effects of boron on growth and antioxidant system parameters of maize (*Zea mays* L.) roots. *Toxicology and Industrial Health*, 29(9), 800-805.
- Fernandez-Kim, S.O., 2004. Physicochemical and functional properties of crawfish chitosan as affected by different processing protocols.
- Farouk, S., Amany, A. R. 2012. Improving growth and yield of cowpea by foliar application of chitosan under water stress. *Egyptian Journal of Biology*, 14(1), 14-16.
- Farouk, S., Mosa, A.A., Taha, A.A., El-Gahmery, A.M., 2011. Protective effect of humic acid and chitosan on radish (*Raphanus sativus*, L. Var. *sativus*) plants subjected to cadmium stress. *Journal of Stress Physiology and Biochemistry*, 7(2).
- Foyer, C.H., Halliwell, B., 1976. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta*, 133(1), 21-25.
- Foyer, Ch., Noctor, G., 2005. Oxidant and antioxidant signalling in plants: A re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell and Environment*. Volume 28, Issue 8. Pages 1056–1071.
- Gallego, S.M., Benavides, M.P., Tomaro, M.L. 1996. Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: Evidence for involvement of oxidative stress. *Plant Science*, 121(2), 151-159.
- Guang, W.Y., 2002. the effect of chitosan and its derivatives on the dyeability of Silk, Ph. D. Thesis, Hong Kong Polytechnic University
- Górnik, K., Grzesik, M., Romanowska-Duda, B., 2008. The effect of chitosan on rooting of grapevine cuttings and on subsequent plant growth under drought and temperature stress. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 16, 333-343.
- Halliwell, B., 2006. Reactive species and antioxidants. redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol* 141:312–322.
- Hasanuzzaman, M., Hossain, M.A., Fujita, M., 2012. Exogenous selenium pretreatment protects rapeseed seedlings from cadmium-induced oxidative stress by upregulating antioxidant defense and methylglyoxal detoxification systems. *Biological Trace Element Research*, 149(2), 248-261.
- Hegedüs, A., Erdei, S., Janda, T., Tóth, E., Horváth, G., Dudits, D., 2004. Transgenic tobacco plants overproducing alfalfa aldose/aldehydes reductase show higher tolerance to low temperature and cadmium stress. *Plant Sci* 166:1329–1333.
- Hidangmayum, A., Dwivedi, P., Katiyar, D., Hemantaranjan, A., 2019. Application of chitosan on plant responses with special reference to abiotic stress. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 25(2), 313-326.
- Hossain, M. A., Fujita, M., 2010. Evidence for a role of exogenous glycinebetaine and proline in antioxidant defense and methylglyoxal detoxification systems in mung bean seedlings under salt stress. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 16(1), 19-29.
- Hossain, M.A., Burritt, D.J., Fujita, M., 2016. Cross-Stress tolerance in plants: molecular mechanisms and possible involvement of reactive oxygen species and methylglyoxal detoxification systems. *Abiotic Stress Response in Plants*.
- Hossain, M.A., Hasanuzzaman, M., Fujita, M., 2010. Up-Regulation of antioxidant and glyoxalase systems by exogenous glycinebetaine and proline in mung bean confer

- tolerance to cadmium stress. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 16(3), 259-272.
- Hossain, M.A., Hossain, M.Z., Fujita, M., 2009. Stress-Induced changes of methylglyoxal level and glyoxalase I activity in pumpkin seedlings and cDNA cloning of glyoxalase I gene. *Australian Journal of Crop Science*, 3(2), 53.
- Hossain, M.A., Nakano, Y., Asada, K., 1984. Monodehydroascorbate reductase in spinach chloroplasts and its participation in regeneration of ascorbate for scavenging hydrogen peroxide. *Plant And Cell Physiology*, 25(3), 385-395.
- Hossain, M.A., Piyatida, P., Da Silva, J.A.T., Fujita, M., 2012. Molecular mechanism of heavy metal toxicity and tolerance in plants: Central role of glutathione in detoxification of reactive oxygen species and methylglyoxal and in heavy metal chelation. *Journal of Botany*.
- Hossain, M.A., Fujita, M., 2009. Purification of glyoxalase I from onion bulbs and molecular cloning of its cDNA. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 73(9), 2007-2013.
- Hossain, M.A., Fujita, M., 2010. Evidence for a role of exogenous glycinebetaine and proline in antioxidant defense and methylglyoxal detoxification systems in mung bean seedlings under salt stress. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 16(1), 19-29.
- Hossain, M.A., Fujita, M., 2011. Regulatory role of components of ascorbate-glutathione (asa-gsh) pathway in plant tolerance to oxidative stress. in *oxidative stress in plants: Causes, Consequences and Tolerance*, Anjum, N.A., Umar, S., Ahmed, A. (Eds.), Pp 81-147, Ik International Publishing House Pvt. Ltd., Isbn 9789381141021, India.
- Hossain, M.A., Hasanuzzaman, M., Fujita, M., 2011. Coordinate induction of antioxidant defense and glyoxalase system by exogenous proline and glycinebetaine is correlated with salt tolerance in mung bean. *Frontiers of Agriculture in China*, 5, 1, 114, Issn 1673-744.
- Hoque, M.A., Uraji, M., Banu, M.N.A., Mori, I.C., Nakamura, Y., Murata, Y., 2010. The effects of methylglyoxal on glutathione S-transferase from *Nicotiana glauca*. *bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 74(10), 2124-2126.
- Hoque, T.S., Hossain, M.A., Mostofa, M.G., Burritt, D.J., Fujita, M., Tran, L.S.P., 2016. Methylglyoxal an emerging signaling molecule in plant abiotic stress responses and tolerance. *Frontiers in plant science*, 7, 1341.
- Jain, M., Nagar, P., Sharma, A., Batth, R., Aggarwal, S., Kumari, S., Mustafiz, A., 2018. GlyI and D-Ldh play key role in methylglyoxal detoxification and abiotic stress tolerance. *Scientific Reports*, 8(1), 1-9.
- Jabeen, N., Ahmad, R., 2013. The activity of antioxidant enzymes in response to salt stress in safflower (*Carthamus tinctorius* L.) and sunflower (*Helianthus annuus* L.) seedlings raised from seed treated with chitosan. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(7), 1699-1705.
- Jocic, D., Vélchez, S., Topalovic, T., Navarro, A., Jovancic, P., Julia, M.R., Erra, P., 2005. Chitosan/acid dye interactions in wool dyeing system. *Carbohydrate Polymers*, 60(1), 51-59.
- Johnson, A.D., Ray, C.A., 1994. U.S. Patent No. 5,325,880. Washington, Dc: U.S. Patent and Trademark Office.

- Jonathan, Z., Knaul-Samuel, M., Hudson-Katherine, A.M., Creber., 1999. Crosslinking of chitosan fibers with dialdehydes: proposal of a new reaction mechanism, *Journal of Polymer Science: Part B: Polymer Physics*, 37, 1079–1094. Pages 45–51.
- Junior E.N.D.O., 2016. Fungal growth control by chitosan and derivatives. *Fungal Pathogenicity*, 61-81.
- Kalapos, M.P., Garzó, T., Antoni, F., Mandl, J., 1992. Accumulation of s-lactoylglutathione and transient decrease of glutathione level caused by methylglyoxal load in isolated hepatocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (Bba)-Molecular Cell Research*, 1135(2), 159-164.
- Kalapos, M.P., 1998. Methylglyoxal in living organisms: Chemistry, Biochemistry, Toxicology and Biological Implications. *Toxicology Letters*, 110(3), 145-175.
- Karpate, R.R., and Choudhary, A.D., 1997. Effect of thermal power station's waste on wheat. *Journal of Environmental Biology*, 18(1), 1-1.
- Kaur, C., Singla-Pareek, S.L., Sopory, S.K., 2014. Glyoxalase and methylglyoxal as biomarkers for plant stress tolerance. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 33(6), 429-456.
- Kaur, C., Tripathi, A.K., Nutan, K.K., Sharma, S., Ghosh, A., Tripathi, J.K., Pareek, A., Singla-Pareek, S.L., Sopory, S.K., 2016. A nucleus-localized rice glyoxalase I enzyme, OsGLYI-8 functions in the detoxification of methylglyoxal in the nucleus. *The Plant Journal*.
- Kaya, M., Kaya, G., Kaya, M.D., Atak, M., Saglam, S., Khawar, K.M., Ciftci, C.Y., 2008. Interaction between seed size and NaCl on germination and early seedling growth of some Turkish cultivars of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Journal of Zhejiang University Science B*, 9(5), 371.
- Khan, M.I.R., and Khan, N.A., 2017. *Reactive oxygen species and antioxidant systems in plants: Role and regulation under abiotic stress*. Singapore: Springer.
- Kumar, V., Yadav, S.K., 2009. Proline and betaine provide protection to antioxidant and methylglyoxal detoxification systems during cold stress in *Camellia sinensis* (L.) *O. Kuntze*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 31(2), 261-269.
- Kumar, S., Yadav, P., Jain, V., Malhotra S.P., 2011. Oxidative stress and antioxidative system in ripening ber (*Ziziphus mauritiana* Lam.) fruits. *Food Technology and Biotechnology*, 49(4), 453-459.
- Kumar, P., Jain, S., Gurjar, B.R., Sharma, P., Khare, M., Morawska, L., Britter, R. 2013. *New Directions: Can A “Blue Sky” Return to Indian Megacities*. *Atmospheric Environment*, 71, 198-201.
- Leceta, P., Guerrero, I., Ibarburu, M.T., Dueñas, K., De La Caba., 2013. Characterization and antimicrobial analysis of chitosan-based films. *Journal of Food Engineering*, Vol. 116, No.4, Pp. 889-899.
- Levitt, J., 1980. *Responses of plant to environmental stress: Water, radiation, salt and other stresses*. Academic Press, New York, 365.
- Li, Z.G., Duan, X.Q., Xia, Y.M., Wang, Y., Zhou, Z.H., Min, X., 2017. Methylglyoxal alleviates cadmium toxicity in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Reports*, 36(2), 367-370.
- Liu, J., Tian, S., Meng, X., Xu, Y., 2007. effects of chitosan on control of postharvest diseases and physiological responses of tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 44(3), 300-306.

- Lizárraga-Paulín, E.G., Torres-Pacheco, I., Moreno-Martínez, E., Miranda-Castro, S.P., 2011. Chitosan application in maize (*Zea mays*) to counteract the effects of abiotic stress at seedling level. *African Journal of Biotechnology*,10(34), 6439-6446.
- Ma, L., Li, Y., Yu, C., Wang, Y., Li, X., Li, N., Bu, N., 2012. Alleviation of exogenous oligochitosan on wheat seedlings growth under salt stress. *Protoplasma*,249(2), 393-399.
- Mahajan, S., Tuteja, N., 2005. Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 444(2), 139-158.
- Mahdavi, B., Rahimi, A., 2013. Seed priming with chitosan improves the germination and growth performance of ajowan (*Carum copticum*) under salt stress. *Eurasian Journal of Biosciences*, 7.
- Mignolet-Spruyt, L., Xu, E., Idänheimo, N., Hoeberichts, F.A., Mühlenbock, P., Brosché, M., Kangasjärvi, J., 2016. Spreading the news: Subcellular and organellar reactive oxygen species production and signalling. *Journal of Experimental Botany*,67(13), 3831-3844.
- Miranda, H.V., Ferreira, A.E., Quintas, A., Cordeiro, C., Freire, A.P., 2008. Measuring intracellular enzyme concentrations: Assessing the effect of oxidative stress on the amount of glyoxalase I. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 36(2), 135-138.
- Miyake, C., Asada, K., 1996. Inactivation mechanism of ascorbate peroxidase at low concentrations of ascorbate; hydrogen peroxide decomposes compound 1 of ascorbate peroxidase. *Plant and Cell Physiology*,37(4), 423-430.
- Montazer, M., Afjeh, M.G., 2007. Simultaneous X-Linking and antimicrobial finishing of cotton fabric. *Journal of Applied Polymer Science*,103(1), 178-185.
- Mostofa, M.G., Ghosh, A., Li, Z.G., Siddiqui, M.N., Fujita, M., Tran, L.S.P., 2018. Methylglyoxal—A signaling molecule in plant abiotic stress responses. *Free Radical Biology and Medicine*,122, 96-109.
- Muley, A.B., Ladole, M.R., Suprasanna, P., Dalvi, S.G., 2019. Intensification in biological properties of chitosan after  $\gamma$ -irradiation. *International Journal of Biological Macromolecules*,131, 435-444.
- Nahar, K., Hasanuzzaman, M., Alam, M.M., Fujita, M., 2015. Exogenous glutathione confers high temperature stress tolerance in mung bean (*Vigna radiata* L.) By modulating antioxidant defense and methylglyoxal detoxification system. *Environmental and Experimental Botany*,112, 44-54.
- Nahar, K., Hasanuzzaman, M., Alam, M.M., Rahman, A., Suzuki, T., Fujita, M., 2016. Polyamine and nitric oxide crosstalk: antagonistic effects on cadmium toxicity in mung bean plants through upregulating the metal detoxification, antioxidant defense and methylglyoxal detoxification systems. *Ecotoxicology and Environmental Safety*,126, 245-255.
- Nakano, Y., Asada, K., 1987. Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts; its inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. *Plant and Cell Physiology*,28(1), 131-140.
- Navrot, N., Rouhier R., Gelhaye, E., Jacquot, Jp., 2007. Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria. *Physiologia Plantarum* 129: 185–195.
- Noctor, G., Foyer, C.H., 1998. Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Biology*,49(1), 249-279.

- Oberschall, A., Deák, M., Török, K., Sass, L., Vass, I., Kovács, I., Horváth, G.V., 2000. A Novel Aldose/Aldehyde reductase protects transgenic plants against lipid peroxidation under chemical and drought stresses. *The Plant Journal*, 24(4), 437-446.
- Olçay, H., 2015. Kitin ve kitosanın tekstil ve biyomühendislikte uygulamaları/ bioengineering applications of chitin and chitosan. *İstanbul Ticaret Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 14(28), 63.
- Özdemir, B., 2014. Kitosan uygulamasının in vivo ve in vitro olarak yetiştirilen *Mentha spicata* L. ve *Mentha arvensis* L. türlerinde antioksidant enzimler üzerine etkilerinin spektrofotometrik ve elektroforetik olarak saptanması. (Y.Lisans Tezi), Fen Bilimleri Enstitüsü, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Çanakkale.
- Patykowski, J., Urbanek, H., 2003. Activity of enzymes related to h<sub>2</sub>o<sub>2</sub> generation and metabolism in leaf apoplastic fraction of tomato leaves infected with botrytis cinerea. *Journal of Phytopathology*, 151(3), 153-161.
- Pompliano, D.L., Peyman, A., Knowles, J.R., 1990. Stabilization of a reaction intermediate as a catalytic device: definition of the functional role of the flexible loop in triosephosphate isomerase. *Biochemistry*, 29(13), 3186-3194.
- Pirbalouti, A.G., Malekpoor, F., Salimi, A., Golparvar, A., 2017. Exogenous application of chitosan on biochemical and physiological characteristics, phenolic content and antioxidant activity of two species of basil (*Ocimum ciliatum* and *Ocimum basilicum*) under reduced irrigation. *scientia horticulturae*, 217, 114-122.
- Purev, M., Kim, Y.J., Kim, M.K., Pulla, R.K., Yang, D.C., 2010. Isolation of a novel catalase (cat1) gene from panax ginseng and analysis of the response of this gene to various stresses. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(6), 451-460.
- Rao, K.M., Raghavendra, A.S., Reddy, K.J., 2006. *Physiology and molecular biology of stress tolerance in plants*. Springer Science Business Media.
- Ray, S., Dutta, S., Halder, J., Ray, M., 1994. Inhibition of electron flow through complex I of the mitochondrial respiratory chain of Ehrlich ascites carcinoma cells by methylglyoxal. *Biochemical Journal*, 303(1), 69-72.
- Sairam, Rk., Srivastava, Gc., Saxena, Dc., 2000. Yüksek sıcaklıklar altında artan antioksidan aktivite: buğday genotiplerinde ısı stres toleransı mekanizması. *Biologia Plantarum*, 43(2), 245-251.
- Sayyari, M., Aghdam, M.S., Salehi, F., Ghanbari, F., 2016. Salicyloyl chitosan alleviates chilling injury and maintains antioxidant capacity of pomegranate fruits during cold storage. *Scientia Horticulturae*, 211, 110-117.
- Singla-Pareek, S.L., Yadav, S.K., Pareek, A., Reddy, M.K., Sopory, S.K., 2006. Transgenic tobacco overexpressing glyoxalase pathway enzymes grow and set viable seeds in zinc-spiked soils. *Plant Physiology*, 140(2), 613-623.
- Scandalios, Jg., Polidoros, An., Mylona, Pv., 2001. Transgenic tobacco plants expressing the maize CAT2 gene have altered catalase levels that affect plant-pathogen interactions and resistance to oxidative stress. *Transgenic Research*. Volume 10, Issue 6, Pp 555–569.
- Semchyshyn, H.M., 2014. Reactive carbonyl species in vivo: generation and dual biological effects. *The Scientific World Journal*.
- Saxena, M., Bisht, R., Roy, S. D., Sopory, S.K., Bhalla-Sarin, N., 2005. Cloning and characterization of a mitochondrial glyoxalase 11 from brassica juncea that is

- upregulated by NaCl, Zn, and ABA. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 336(3), 813-819.
- Shahri, S.M.K., 2018. Bor Stresine Maruz Bırakılan Mısırdaki (Zea Mays L.) Kitosanın İyileştirici Rolünün Fizyolojik Ve Moleküler Düzeyde Araştırılması. (D. Tezi), Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Sharma, I., Bhardwaj, R., Pati, P.K., 2013. Stress modulation response of 24-epibrassinolide against imidacloprid in an elite indica rice variety pusa basmati-1. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 105(2), 144-153.
- Siddiqui, M.P., Kashyap, V., Kumar, A.A., Al-Khedhairi, J., Musarrat, A.B., 2010. Pant protective potential of trans-resveratrol against 4-Hydroxynonenal induced damage in Pc12 cells toxicol. *In Vitro*, 24Pp.1592-1598.
- Struszczyk, H., Orlikowski, Bl., Skrzypczak, C., 2001. Chitosan In The Control Of Soil-Borne Pathogens. *Chitin Enzymology*; 197-205.
- Süzer, S., 2004. Mısır Tarımı, Tarımsal Enstitüsü Yayınları, Trakya.
- Suzuki, N., Mittler, R., 2006. Reactive oxygen species and temperature stresses: a delicate balance between signaling and destruction. *Physiologia Plantarum Volume 126*.
- Takatsume, Y., Izawa, S., Inoue, Y., 2006. Methylglyoxal as A signal initiator for activation of the stress-activated protein kinase cascade in the fission yeast *schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem*, 281:9086–9092.
- Taşgın, E., Atıcı, Ö., Nalbantoğlu, B., 2003. Effects of salicylic acid and cold on freezing tolerance in winter wheat leaves. *Plant Growth Regulation*, 41(3), 231-236.
- Thornalley, P.J., 1990. The glyoxalase system: New developments towards functional characterization of a metabolic pathway fundamental to biological life. *Biochemical Journal*, 269(1), 1.
- Thornalley, P.J., 1996. Pharmacology of methylglyoxal: Formation, modification of proteins and nucleic acids, and enzymatic detoxification-A role in pathogenesis and antiproliferative chemotherapy. *General Pharmacology: The Vascular System*, 27(4), 565-573.
- Tietz, Nw., 1995. *Clinical guide to laboratory tests*. W.B. Saunders Company. Philadelphia, Pennsylvania.
- Vaahtera, L., Brosché, M., Wrzaczek, M., Kangasjärvi, J., 2014. Specificity in ROS signaling and transcript signatures. *antioxidants and redox signaling*, 21(9), 1422-1441.
- Vilchez, S., Jovancic, P., Manich, A. M., Julia M. R., Erra P., 2005. Chitosan application on wool before enzymatic treatment, *Journal of Applied Polymer Science*, 98, 1938-1946.
- Wu, L., and Juurlink, B.H., 2002. Increased methylglyoxal and oxidative stress in hypertensive rat vascular smooth muscle cells. *Hypertension*, 39(3), 809-814.
- Wang, H., Liu, J., Wu, L., 2009. Methylglyoxal-Induced mitochondrial dysfunction in vascular smooth muscle cells. *Biochemical Pharmacology*, 77(11), 1709-1716.
- Wang, H.H., Huang J.J., Rong, B., 2010. Nitrate reductase-dependent nitric oxide production is involved in aluminum tolerance in red kidney bean roots. *Plant Science*, 281–288.
- Wang, Y., Ye, X.Y., Qiu, X.M., Li, Z.G., 2019. Methylglyoxal triggers the heat tolerance in maize seedlings by driving asgsh cycle and reactive oxygen species-/methylglyoxal-scavenging system. *Plant Physiology and Biochemistry*, 138, 91-99.

- Witham, F. H., Blayles, D.F. and Devlin, R.M., 1971. Experiments in Plant Physiology. Van Nostrand Reinhold Company, 55-56. New York.
- Xu, Q., Mao, C., Liu, N.N., Zhu, J.J., Sheng, J., 2006. Direct electrochemistry of horseradish peroxidase based on biocompatible carboxymethyl chitosan-gold nanoparticle nanocomposite, *Biosensors and Bioelectronics*, 22(5), 768-773.
- Yadav, S. K., Singla-Pareek, S.L., Kumar, M., Pareek, A., Saxena, M., Sarin, N.B., Sopory, S.K., 2007. Characterization and functional validation of glyoxalase II from rice. *Protein Expression and Purification*, 51(1), 126-132.
- Yadav, S.K., Singla-Pareek, S.L., Ray, M., Reddy, M.K., Sopory, S.K. 2005. Methylglyoxal levels in plants under salinity stress are dependent on glyoxalase I and glutathione. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 337(1), 61-67.
- Yadav, S.K., Singla-Pareek, S.L., Ray, M., Reddy, M.K., Sopory, S.K., 2005a. Methylglyoxal levels in plants under salinity stress are dependent on glyoxalase I and glutathione. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 337(1), 61-67.
- Yadav, S.K., Singla-Pareek, S.L., Reddy, M.K., Sopory, S.K., 2005b. Transgenic tobacco plants overexpressing glyoxalase enzymes resist an increase in methylglyoxal and maintain higher reduced glutathione levels under salinity stress. *Febs Letters*, 579(27), 6265-6271.
- Yadav, S.K., Singla-Pareek, S.L., Sopory, S.K., 2008. An overview on the role of methylglyoxal and glyoxalases in plants. *drug metabolism and drug interactions*, 23(1-2), 51-68.
- Yamaguchi, K., Mori, H., Nishimura, M., 1995. A novel isoenzyme of ascorbate peroxidase localized on glyoxysomal and leaf peroxisomal membranes in pumpkin. *Plant and Cell Physiology*, 36(6), 1157-1162.
- Yee, Y., Tam, N.F.Y., Wong, Y.S., Lu, C.Y., 2002. Growth and physiological responses of two mangrove species (*Bruguiera gymnorrhiza* and *Kandelia candel*) to waterlogging. *Environ. Exp. Bot*, 1-13.
- Yang, L., Yan-Ma, Z.H., Kennedy, J.F., Meng, X., 2013. Chitosan and oligochitosan enhance the resistance of peach fruit to brown rot. *Carbohydrate Polymers*, 94(1), 272-277.
- Yığıt, İ., 2019. Bazı Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Çimlenen Mısır (*Zea mays* L.) Tohumlarında Metilglioksal Toksisitesinin Yatıştırılması Üzerindeki Etkileri. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, (Y.Lisans Tezi), Erzurum.
- Zhang, L., Gao, C., Mentink-Vigier, F., Tang, L., Zhang, D., Wang, S., Zhou, Y., 2019. Arabinosyl deacetylase modulates the arabinoxylan acetylation profile and secondary wall formation. *The Plant Cell*, 31(5), 1113-1126.
- Zhang, D., Wang, Y., Liu, H., 2020. Corn silk extract inhibit the formation of N-carboxymethyllysine by scavenging glyoxal/methyl glyoxal in a casein glucose-fatty acid model system. *Food Chemistry*, 309, 125708.
- Zhao, J., Pan, L., Zhou, M., Yang, Z., Meng, Y., Zhang, X., 2019. Comparative physiological and transcriptomic analyses reveal mechanisms of improved osmotic stress tolerance in annual ryegrass by exogenous chitosan. *Genes*, 10(11), 853.

Zheng, F., Zheng, W., Li, L., Pan, S., Liu, M., Zhang, W., Zhu, C., 2017. Chitosan controls postharvest decay and elicits defense response in kiwifruit. *Food and Bioprocess Technology*, 10(11), 1937-1945.

## **ÖZGEÇMİŞ**

1990 yılında Ardahan’da doğdu. 2006 yılında Sungurlu Lisesinde mezun oldu. 2008 yılında başladığı Atatürk Üniversitesi Biyoloji Bölümünden 2012 mezun oldu. 2017 yılında başladığı Atatürk Üniversitesi Fen Bilimler Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı’nda yüksek lisansı eğitimine devam etmektedir.