

**BUĞDAY (*Triticum aestivum* L.) BİTKİLERİNDE
UYARILMIŞ SENESENS SÜRECİNİN Ag⁺
İYONLARI İLE KONTROLÜ**

MERT ÖKTEM

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MERSİN

OCAK – 2016

**BUĞDAY (*Triticum aestivum* L.) BİTKİLERİNDE
UYARILMIŞ SENESENS SÜRECİNİN Ag⁺
İYONLARI İLE KONTROLÜ**

MERT ÖKTEM

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman

Prof. Dr. Yüksel KELEŞ

MERSİN

OCAK - 2016

Mert ÖKTEM tarafından Prof. Dr. Yüksel KELEŞ danışmanlığında “Buğday (*Triticum aestivum* L.) Bitkilerinde Uyarılmış Senesens Sürecinin Ag^+ İyonları İle Kontrolü” başlıklı bu çalışma aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından oy birliği ile Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

İmza

Prof. Dr. Yüksel KELEŞ

Prof. Dr. Serpil ÜNYAYAR

Doç.Dr. Nuray ERGÜN

Yüksel Keleş
Serpil Ünyayar
Nuray Ergün

Yukarıdaki Jüri kararı Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 12/02/2016 tarih ve 2016:6/210 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ayla ÇELİK
Enstitü Müdürü

Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, şekil, çizelge ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hükümlerine tabidir.

BUĞDAY (*Triticum aestivum* L.) BİTKİLERİNDE UYARILMIŞ SENESENS SÜRECİNİN Ag^+ İYONLARI İLE KONTROLÜ

MERT ÖKTEM

ÖZ

Senesens bitkilerin genetik olarak programlanmış yaşlanma sürecidir. Karanlık, abiyotik ve biyotik stresler ve bazı hormonlar tarafından teşvik edilebildiği gibi bazı hormon ya da mineraller tarafından geciktirilebilir. Senesens sürecinin kontrolü bitkisel ürün kalitesi ve raf ömrü gibi parametreler üzerindeki etkisi nedeniyle ekonomik öneme sahiptir. Bu çalışmada *Triticum aestivum* L. (Gün-91) bitkilerinde karanlık ve indol-3 asetik asit (IAA) uygulamalarıyla başlatılan senesens sürecinin gümüş nitrat uygulamaları ile kontrolü amaçlanmıştır. Bu amaçla antioksidan savunma sisteminin bazı bileşikleri, enzim aktiviteleri ve süperoksit dismutaz (SOD) enzimini kodlayan genin ifade düzeyleri araştırılmıştır. Karanlık uygulaması yapılan bitkilerde fide boyları, oransal su içeriği, klorofil-a, klorofil-b, toplam klorofil, β -karoten, ksantofil, toplam antioksidan kapasite, çözünür fenol, toplam çözünür protein, katalaz, süperoksit dismutaz, bakır çinko süperoksit dismutaz (Cu/Zn-SOD), Cu/Zn-SOD geninin ifade düzeyi azalmıştır. IAA uygulamaları sonrasında fide boyları, oransal su içeriği, klorofil-a, klorofil-b, toplam klorofil, β -karoten, ksantofil, toplam antioksidan kapasite, çözünür fenol, toplam çözünür protein düzeyleri azalırken, katalaz, süperoksit dismutaz, Cu/Zn-SOD, Cu/Zn-SOD geninin ifade düzeyleri artmıştır. Yapraklara püskürtülerek uygulanan 200 ppm gümüş nitrat fide boyları, oransal su içeriği, klorofil-a, b, toplam klorofil, β -karoten, ksantofil, toplam antioksidan kapasite, çözünür fenol, toplam çözünür protein, Cu/Zn-SOD geninin ifade düzeyi parametrelerinde artışa yol açarken, katalaz, süperoksit dismutaz, Cu/Zn-SOD enzim aktivitelerinin kontrole göre azalmasına neden olmuştur. Bu araştırmadan elde edilen bulgular senesens sürecinin antioksidan bileşik ve enzimlerin düzeyindeki değişmelerle ilişkili olduğunu göstermiştir. Karanlık ve IAA uygulamalarıyla başlatılan senesens sürecinin gümüş iyonlarının varlığında geciktirilebileceği sonucuna ulaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Karanlık, indol-3asetik asit, gümüş nitrat, antioksidan savunma, gen ifadesi

Danışman: Prof. Dr. Yüksel KELEŞ, Mersin Üniversitesi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı

CONTROL OF INDUCED SENESCENCE PROCESS WITH Ag^+ IONS IN WHEAT (*Triticum aestivum* L.) PLANTS

MERT ÖKTEM

ABSTRACT

It is genetically programmed senescence aging process of plants. Dark, biotic and abiotic stress, some hormones as can be induced while may be delayed by some hormones or minerals. Senescence process control due to impact parameters such as quality and shelf-life are economically important crops. Aim of this study, in *Triticum aestivum* L. (Gün- 91) plants promoting the senescence process of dark and indole-3 acetic acid application and controle of senescence with silver nitrate applications. In this study, certain compounds of the antioxidant defense system in conjunction with delaying enzyme activity and expression levels of genes encoding superoxide dismutase were analysed. Senescence are stimulated darkness application in the plants, seedling lenghts, relative water content, chlorophyll a, chlorophyll b, and total chlorophyll, β -carotene, xanthophylls, total antioxidant capacity, soluble phenol, total soluble protein, catalase, superoxide dismutase and Cu / Zn -SOD levels , Cu / Zn-SOD transcripts expression levels decreased. After IAA application seedling length, relative water content, chlorophyll a, chlorophyll b, and total chlorophyll, β -carotene, xanthophylls, total antioxidant capacity, soluble phenol, total soluble protein levels decreased while catalase, superoxide dismutase and Cu / Zn-SOD, Cu / Zn-SOD transcript levels increased. 200 ppm silver nitrate spray- applied foliar leaf seedling length, relative water content, chlorophyll a, chlorophyll b, and total chlorophyll, β -carotene, xanthophylls, total antioxidant capacity, soluble phenol, total soluble protein, expression of Cu / Zn-SOD transcripts increase while in the level of parameters catalase, superoxide dismutase and Cu / Zn-SOD has caused a decline compared to the control parameters. The results obtained from this study showed that associated with changes in levels of antioxidant compounds and enzymes of the senescence process. Starting with the senescence process were dark and IAA applications can be delayed in the presence of silver ions.

Keywords: Dark, indole-3 acetic acid, silver nitrate, antioxidant defense, gene expression

Advisor: Prof. Dr. Yüksel KELEŞ, Mersin University, Biotechnology Department

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmamın her aşamasında bana destek veren, bilgi, öneri, deneyim ve görüşlerini her zaman benimle paylaşan, saygıdeğer danışman hocam sayın Prof. Dr. Yüksel KELEŞ'e (Mersin Üniversitesi, Eğitim Fakültesi) çok teşekkür ederim.

Çalışmalarım süresince deney bitkilerinin yetiştirilmesi için iklim odası imkanını sağlayan sayın Prof. Dr. Serpil ÜNYAYAR'a (Mersin Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü), laboratuvar imkanlarını kullanmama izin veren ve bilgi, öneri, deneyim ve görüşlerini paylaşan Prof. Dr. Ali ERGÜL'e (Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü), deney aşamalarım da deneyim ve görüşlerini paylaşan Dr. Canan YÜKSEL'e (Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü) teşekkür ederim. Sonuçlarımın istatistiksel değerlendirmesinde emeği olan Uzman Biyolog Umut KİBAR'a teşekkürlerimi sunarım.

BAP 2015-TP2-1045 no'lu proje ile yüksek lisans çalışmama destek sağlayan Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi'ne teşekkür ederim.

Bana her zaman destek olan ve her durumda yanımda olan aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZ	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
1.GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI	6
2.1 SENESENS	6
2.2 BİTKİLERDE ROT OLUŞUMU VE ANTIOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ.....	7
2.2.1 Süperoksit Anyonu	10
2.2.2 Hidrojen Peroksit	10
2.2.3 Singlet Oksijen.....	10
2.3 SENESENS VE OKSİN İLE İLİŞKİSİ	17
2.4 SENESENS İLE GÜMÜŞ İYONLARININ İLİŞKİSİ	19
2.5. SENESENSLE İLİŞKİLİ GENLER (SAG).....	20
2.6 ANTIOKSİDAN GENLER.....	21
2.7 REAL TIME PCR (RT-PCR) (EŞ ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU).....	21
2.7.1. Real Time PCR Döngü Aşamaları.....	22
2.7.2. Real Time PCR Çalışmalarında Kontrol (Housekeeping) Genleri.....	22
2.7.3. Real Time PCR Çalışmalarında Erime Eğrisi (Melting Curve)	22
3. MATERYAL VE YÖNTEM	25
3.1. MATERYAL.....	25
3.2. BİTKİ BOYU	26
3.3. ORANSAL SU MİKTARI (OSİ).....	26
3.4. KLOROFİL MİKTARI	27
3.5. KAROTENOİDLER	27
3.6. TOPLAM SUDA ÇÖZÜNÜR FENOLİKLER.....	27
3.7. TOPLAM ANTIOKSİDAN KAPASİTE.....	28
3.8. ÇÖZÜNÜR PROTEİN MİKTARI.....	28
3.9. ANTIOKSİDAN ENZİMLERİN AKTİVİTESİ.....	29

3.9.1 Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivite Tayini.....	29
3.9.2 Katalaz (KAT) Aktivite Tayini.....	29
3.10. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME	30
3.11. GEN İFADESİ ANALİZLERİ.....	30
3.11.1 RNA izolasyonu.....	30
3.11.2 RNA Örneklerinin Miktar ve Kalitesinin Belirlenmesi.....	30
3.11.3 qRT-PCR (Real Time) Uygulamaları	30
3.11.5 Verilere Ait Analizler	30
3.12. SEKANS ANALİZİ	35
3.12.1 Real- Time Primerleri ile Gen Bölgesinin Çoğaltılması.....	35
3.12.2. PCR ürünlerinin jelde görüntülenmesi	35
3.12.3. PCR Ürünlerinin Pürifikasyonu.....	35
3.12.4. Sekans Analizi:	36
3.12.5. Sekans Ürünlerinin Temizlenmesi.....	37
4. BUGULAR.....	39
4.1. FİDE BOYLARI	39
4.2 ORANSAL SU İÇERİĞİ (OSİ)	40
4.3 KLOROFİL MİKTARLARI VE a/b ORANI	40
4.4. KAROTENOİD MİKTARLARI.....	44
4.5 TOPLAM ANTİOKSİDAN KAPASİTE.....	46
4.6 ÇÖZÜNÜR FENOL MİKTARLARI.....	47
4.7. ÇÖZÜNÜR PROTEİN MİKTARLARI.....	48
4.8. KATALAZ (KAT) AKTİVİTESİ	49
4.9. SÜPEROKSİT DİSMUTAZ (SOD) AKTİVİTESİ	50
4.10. Cu/Zn-SOD GENİNİN İFADESİ	53
4.10.1. RNA İzolasyonu, Miktar ve Kalite Tayini.....	53
4.10.2. cDNA Sentezi	54
4.10.3. Standart Eğri	55
4.10.4. Gerçek Zamanlı Amplifikasyon Eğrileri	56
4.10.5. Erime Eğrisi (Melting Curve)	57
4.10.6. Real Time PCR Normalize Verilerinin Relatif İfade Analizleri.....	57

4.11. Cu/Zn-SOD VE GAPDH GEN BÖLGELERİNİN DİZİLERİNİN (SEKANSLARININ) ÇIKARILMASI	60
4.11.1 DNA İzolasyonu, Miktar ve Kalite Tayini	60
4.11.2. Cu/Zn-SOD ve GAPDH Gen Bölgelerinin Dizileri	60
4.2. TARTIŞMA.....	61
4.2.1. Fide Boyları	62
4.2.2. Oransal Su İçeriği (OSİ)	63
4.2.3. Klorofil miktarları ve klorofil a/b oranı	64
4.2.4. Karotenoid Miktarları	66
4.2.5. Toplam Antioksidan Kapasite	67
4.2.6. Çözünür Fenol Miktarları	67
4.2.7 Çözünür Protein Miktarları	68
4.2.8 Katalaz (KAT) Aktivitesi.....	70
4.2.9 Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi	72
4.2.10 Cu/Zn-SOD Transkriptine Ait Gen İfadesi.....	74
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	76
KAYNAKLAR	78
EKLER.....	97
ÖZGEÇMİŞ.....	102

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 1. Buğday (<i>Triticum aestivum</i> L. kv. Gün-91) bitkilerinin yapraklarına IAA ve AgNO ₃ uygulanması için oluşturulan deneme deseni.	26
Çizelge 2. Revers transkripsiyon karışımının hazırlanması.....	31
Çizelge 3. Real time-PCR primer dizileri (5'-3').....	32
Çizelge 4. GAPDH Primer Optimizasyon Koşulları.....	32
Çizelge 5 Cu/ZnSOD Primer Optimizasyon Koşulları	33
Çizelge 6. Real Time PCR Programı	34
Çizelge 7. Real Time-PCR primer dizileri (5'-3')	35
Çizelge 8. Dizileme Reaksiyonu	37
Çizelge 4.1. RNA'ların Spektrofometrik Ölçümleri	54
Çizelge 4.2. cDNA'ların Spektrofometrik Ölçümleri	55

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Eş zamanlı PCR reaksiyon basamakları [164]	22
Şekil 4.1. Senesensin karanlık, IAA'nın 50 ve 100 ppm 'lik iki farklı konsantrasyonu ile uyarıldığı bitkilerde AgNO ₃ uygulamasının fide boyları üzerindeki etkisi.	39
Şekil 4.2. Senesensin karanlık, IAA'nın 50 ve 100 ppm 'lik iki farklı konsantrasyonu ile uyarıldığı bitkilerde AgNO ₃ uygulamasının OSİ üzerine etkisi.	40
Şekil 4.3. Senesensin karanlık, IAA'nın 50 ve 100 ppm 'lik iki farklı konsantrasyonu ile uyarıldığı bitkilerde AgNO ₃ uygulamasının klorofil-a miktarı üzerindeki etkisi.	42
Şekil 4.4. Senesensin karanlık, IAA'nın 50 ve 100 ppm 'lik iki farklı konsantrasyonu ile uyarıldığı bitkilerde AgNO ₃ uygulamasının klorofil-b miktarı üzerindeki etkisi.	42
Şekil 4.5. Senesensin karanlık, IAA'nın 50 ve 100 ppm 'lik iki farklı konsantrasyonu ile uyarıldığı bitkilerde AgNO ₃ uygulamasının klorofil-a/b miktarı üzerindeki etkisi.	43
Şekil 4.6. Senesensin karanlık, IAA'nın 50 ve 100 ppm 'lik iki farklı konsantrasyonu ile uyarıldığı bitkilerde AgNO ₃ uygulamasının toplam klorofil miktarı üzerindeki etkisi..	43
Şekil 4.7. Senesensin karanlık, IAA'nın 50 ve 100 ppm 'lik iki farklı konsantrasyonu ile uyarıldığı bitkilerde AgNO ₃ uygulamasının β-Karoten miktarı üzerindeki etkisi	45
Şekil 4.8. Senesensin karanlık, IAA'nın 50 ve 100 ppm 'lik iki farklı konsantrasyonu ile uyarıldığı bitkilerde AgNO ₃ uygulamasının Ksantofil miktarı üzerindeki etkisi.	45
Şekil 4.9. Senesensin karanlık, IAA'nın 50 ve 100 ppm 'lik iki farklı konsantrasyonu ile uyarıldığı bitkilerde AgNO ₃ uygulamasının toplam antioksidan kapasite üzerindeki etkisi	46

Şekil 4.10. Senesensin karanlık, IAA'nın 50 ve 100 ppm 'lik iki farklı konsantrasyonu ile uyarıldığı bitkilerde $AgNO_3$ uygulamasının toplam çözünür fenol miktarı üzerindeki etkisi.....	47
Şekil 4.11. Senesensin karanlık, IAA'nın 50 ve 100 ppm 'lik iki farklı konsantrasyonu ile uyarıldığı bitkilerde $AgNO_3$ uygulamasının toplam çözünür protein miktarı üzerindeki etkisi	48
Şekil 4.12. Senesensin karanlık, IAA'nın 50 ve 100 ppm 'lik iki farklı konsantrasyonu ile uyarıldığı bitkilerde $AgNO_3$ uygulamasının KAT aktivitesi üzerindeki etkisi	50
Şekil 4.13. Senesensin karanlık, IAA'nın 50 ve 100 ppm 'lik iki farklı konsantrasyonu ile uyarıldığı bitkilerde $AgNO_3$ uygulamasının SOD aktivitesi üzerindeki etkisi	52
Şekil 4.14. Senesensin karanlık, IAA'nın 50 ve 100 ppm 'lik iki farklı konsantrasyonu ile uyarıldığı bitkilerde $AgNO_3$ uygulamasının Cu/Zn-SOD aktivitesi üzerindeki etkisi.....	52
Şekil 4.15. İzole Edilen RNA'ların agaroz jel görüntüsü (%1.2).....	53
Şekil 4.16. Real Time PCR cihazından alınan GAPDH primerine ait standart eğri grafiği, efficiency ve slope değerleri	56
Şekil 4.17. Real Time PCR cihazından alınan Cu/Zn-SOD primerine ait standart eğri grafiği efficiency ve slope değerleri.....	56
Şekil 4.18. GAPDH primerinde standart ve örneklere ait amplifikasyon eğrileri..	57
Şekil 4.19. Cu/Zn-SOD primerinde standart ve örneklere ait amplifikasyon eğrileri	57
Şekil 4.20. GAPDH primerine ait standart ve örneklerin erime eğrisi grafiği	58
Şekil 4.21. Cu/Zn-SOD primerine ait standart ve örneklerin erime eğrisi grafiği	58
Şekil 4.22. Senesensin karanlık, IAA'nın 50 ve 100 ppm 'lik iki farklı konsantrasyonu ile uyarıldığı bitkilerde $AgNO_3$ uygulamasının Cu/Zn SOD gen ifadesi üzerindeki etkisi.....	59
Şekil 4.23. Kontrol örneklerinden izole edilen DNA'ya ait agaroz jel (%1.2) görüntüsü.	60

EKLER DİZİNİ

	Sayfa
Ek 1. <i>T. aestivum</i> L. (Gün-91) çeşidinin yapılan uygulamalar sonrasındaki fide boylarına ait varyans analizi sonuçları	97
Ek 2. Yapılan uygulamalar sonrasındaki Oransal Su İçeriği (RWC) ait varyans analizi sonuçları.....	97
Ek 3. Yapılan uygulamalar sonrasındaki Klorofil-a miktarına ait varyans analizi sonuçları	97
Ek 4. Yapılan uygulamalar sonrasındaki Klorofil-b miktarına ait varyans analizi sonuçları	98
Ek 5. Yapılan uygulamalar sonrasındaki Klorofil-a/b miktarına ait varyans analizi sonuçları	98
Ek 6. Yapılan uygulamalar sonrasındaki toplam klorofil miktarına ait varyans analizi sonuçları.....	98
Ek 7. Yapılan uygulamalar sonrasındaki B-karoten miktarına ait varyans analizi sonuçları	99
Ek 8. Yapılan uygulamalar sonrasındaki ksantofil miktarına ait varyans analizi sonuçları	99
Ek 9. Yapılan uygulamalar sonrasındaki toplam antioksidan kapasiteye ait varyans analizi sonuçları.....	99
Ek 10. Yapılan uygulamalar sonrasındaki toplam çözünür fenol miktarlarına ait varyans analizi sonuçları	100
Ek 11. Yapılan uygulamalar sonrasındaki toplam çözünür protein miktarlarına ait varyans analizi sonuçları	100
Ek 12. Yapılan uygulamalar sonrasındaki Katalaz enzimi aktivitesine ait varyans analizi sonuçları.....	100
Ek 13. Yapılan uygulamalar sonrasındaki SOD enzimi aktivitesine ait varyans analizi sonuçları.....	101
Ek 14. Yapılan uygulamalar sonrasındaki Cu/Zn SOD enzimi aktivitesine ait varyans analizi sonuçları	101
Ek 15. Yapılan uygulamalar sonrasındaki Cu/Zn SOD geninin ifadesine ait varyans analizi sonuçları	101

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

ROT: Reaktif oksijen türleri

SOD: Süperoksit dismutaz

KAT: Katalaz

Cu/Zn SOD: Bakır Çinko SOD

H₂O₂: Hidrojen peroksit

¹O₂: Tekli oksijen

O₂⁻: Süperoksit radikali

[·]OH: Hidroksil radikali

GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

cDNA: Komplementer DNA

Ct: threshold cycle (eşik döngü değeri)

ACS: 1-aminosiklopropan-1-karboksilik asit sentetaz

ACC: 1-aminosiklopropan-1-karboksilik asit

1.GİRİŞ

Tarımsal ürün kaybının en önemli nedenlerinden biri bitkilerin doğal yaşlanma süreci olan senesensdir. Tohum sayısı ve kalitesi, meyve olgunlaşması ve tohumların çimlenme zamanı vs. gibi birçok farklı tarımsal açıdan önemli özellik senesens tarafından etkilenir. Yaşlanan dokular üzerinde mantar ve diğer mikroorganizmaların gelişmesi besin kalitesini önemli derecede etkileyebilir ve senesensin geciktirilmesi ömrün uzamasını sağlayabilir. Senesens ekstrem iklimsel koşullarda ve abiyotik stresle tetiklenebilir; senesens potansiyel olarak önemli tahılların veriminde % 50'den fazla azalmaya neden olur ayrıca dünya çapında ekin kaybının başlıca nedeni olduğu tahmin edilmektedir. Sebzeler tam olgunlaşmadan önce hasat edildiklerinde enerji ve besin kaynağının aniden kesilmesi sonucunda çok büyük oranda strese maruz kalmaktadır. Kuşkonmaz ve brokoli gibi ürünler depolama sırasında çok hızlı hasat sonrası senesens gösterirler ve çok kısa raf ömrüne sahiptirler. Yeşil sebzelerin depolanması süresince klorofil kaybı, hücresel yapıların zarar görmesi ve sonunda hücre ölümü gibi birçok değişim gözlemlenir, benzer değişimler gelişime bağlı senesens süresince de sergilenir. Yaprak yaşlanması süresince uyarılan genler de depolanan brokolide ifade olabilir [1]. Bu nedenle, ayrıca küresel iklim değişimleri göz önüne alınarak, değişen çevresel koşullarla daha iyi şekilde başa çıkabilecek kültür bitkilerinin geliştirilmesi önemli bir araştırma alanı olacaktır. Yaşlanma programı değiştirilmiş bitkiler, bu amaca ulaşılması için yardımcı araçlar olabilir [2].

Senesens sürecinin önemine rağmen, senesens sürecini düzenleyici mekanizmalar hakkındaki bilgilerimiz hala yeterli düzeyde değildir. Aslında, senesens kaotik bir olay değil, çekirdek genlerinin kontrolü altında normal hücre fonksiyonlarının düzenli bir şekilde kaybıdır. Gen ifadesindeki muazzam değişim yaprak senesensi süresince gözlemlenebilir ve farklı gen ifade analizlerine göre *Arabidopsis* bitkisinde yaprak senesensi süresince genlerin yaklaşık olarak % 12–16'sının ifadesinin değiştiği tahmin edilmektedir [1, 3, 4]. Senesens öncelikle yaşlanan dokularda bulunan besin ve minerallerin bitkinin gelişmekte olan dokularına taşınması olarak tanımlanmaktadır, bu süreçte fotosentezle ilişkili olan

genlerin ifadeleri azalırken makromoleküllerin yıkılması ve taşınmasıyla ilişkili olan genlerin ifadeleri artmaktadır. Farklı özellikleri ile senesensin bir çeşit programlanmış hücre ölümü ya da gelişimsel bir süreç olduğu konusu tartışmalı olsa da her iki bakış açısı için bazı kanıtlar bulunmuştur [5, 6]. Sıcaklıkla uyarılan yaprak senesensi bcl-xL ve ced-9 *Arabidopsis* transgenik bitkilerinde önemli oranda geciktirilmiştir, ve bu bitkilerde muhtemelen oksidatif stresten dolayı yüksek miktarda antosiyanin birikmiştir. Hayvanlardaki apoptoz ve bitkilerdeki senesens arasında ortak düzenleyici mekanizmalar bulunmaktadır bu nedenle, hayvan antiapoptotik genlerinin ifadesinin artması bitkilerin hayatta kalmasını artırıp senesensi geciktirebilmiştir [7]. Ancak, *Nicotiana* yapraklarının hücre ölümüyle bağlantılı olarak yeşil kalma kapasitesinin azalması senesens sonucunda kaçınılmazdır [8, 9].

Yaprak senesensi, yaprak gelişiminin son aşaması olan yüksek derecede organize olmuş ve aktif bir süreçtir. Bitkilerde kotiledon ve yaprakların ömrü sınırlıdır. Olgunlaşmayı takiben birkaç saatte, günde veya haftada kotiledonlarda ve yapraklarda senesens başlayabilir. Yaprak senesensinin başlaması ve ilerlemesi hem içsel örneğin yaş ve hormonlar hem de dışsal faktörler örneğin kuraklık, tuzluluk, besin eksikliği, hastalıklar, yüksek ışık ve yüksek sıcaklık gibi faktörlerle kontrol edilir [10, 11]. Bitkilerde senesens süreci normal koşullar altında reproduktif faza geçişte başlarken, çevresel etkenler senesens sürecini hızlandırabilmekte ya da yavaşlatabilmektedir. Çevresel stresler (düşük ve yüksek sıcaklık, kuraklık, su basması) altında senesens sürecinin engellenmesi veya teşvik edilmesi tarımsal ürünlerin miktar ve kalitesini önemli ölçüde etkilemektedir ve uzun süredir araştırmacıların ilgisini çeken bir çalışma konusu olmuştur. Senesens sürecinin kontrolü ürünlerin hasat zamanlarını düzenlemek ve raf ömürlerini uzatmak amacıyla üzerinde çalışılmakta olan bir konudur. Senesensi engelleyici veya hızlandırıcı olduğu bilinen kimyasal maddeler (bitkisel hormonlar, Aminobanzamid, E64) tarımsal verimliliği artırmak, hasat zamanlarını düzenlemek veya deneysel amaçlar için kullanılabilir.

Bitkilerde gelişme kesintisiz bir işlem olsa da vejetatif gelişim sürecinden reproduktif gelişim sürecine geçişte ani kalitatif değişimler ortaya çıkabilir. Bitkilerde gözlenen bu olgunlaşma süreci erken ya da geç bir evrede senesens ve ölümle sonuçlanır [12]. Senesens yaşa bağımlı olarak hayat döngüsünün sonlanmasıdır. Bitkilerde, senesens görünür bir şekilde sararmış yapraklarla karakterize edilir. Yaşlanan yaprakların sararması klorofil içeriğinin kaybedilmesi, proteinlerin ve RNA'nın degradasyonu ve fotosentetik aktivitenin azalması gibi birçok biyokimyasal süreçle birlikte ilerler.

Yaprak gelişimi süresince 3 aşamadan geçer. İlk olarak tam kapasite fotosentez hızına ulaşıncaya kadar bolca karbon ve azot biriktirir ve hızla protein sentezler. Yaprak olgunlaştığı zaman, protein sentez faaliyetleri düşer. Bu durum dış ve iç koşullar senesensin başlamasına uygun olana kadar devam eder. Yaprak senesensi bitkinin olgunlaşmış yaprak ve diğer kısımlarından gelen azot, karbon ve minerallerin olgunlaşmamış kısımlarına taşınması, fotosentezin durdurulması, kloroplastların parçalanması, yaprak proteinlerinin yıkılması, klorofil ve aminoasitlerin kaybı gibi olaylar bütünüdür [13].

Deneysel olarak yaprak senesensi genellikle klorofil ve proteinlerin azalmasının ölçümü ile izlenmektedir [3, 14]. Bununla birlikte yapraktaki mezofil, ksilem, floem, epiderma gibi değişik dokuların senesensi birbirinden farklı olabilir. Benzer bir farklılık hücrelerin organelleri arasında da gözlenebilir. Protein ve klorofil kaybı bakımından değerlendirildiğinde hücredeki en önemli yıkım yeri kloroplastlardır [15]. Vakuoller ve mitokondriler ise senesens sürecinde oldukça iyi korunurlar. Hücreler ve organeller senesens sürecinde belirli bir düzenle yıkıldığından bu olay genetik olarak programlanmış bir hücre ölüm süreci gibi düşünülebilir [16]. Gelişimsel bir süreç olarak bilinen senesens uygun olmayan çevresel koşullar yüzünden normalden daha erken başlayabilir. Bitkiler uygun olmayan koşullardan kaçınamayacağı zaman, bitkinin tam olarak ölmesini engellemek için bazı organlarında senesensi başlatabilir. Örneğin; mineral besinlerin yetersizliği durumunda yaşlı yaprakların senesensi uyarılarak bu bölgelerden çözülen besinler genç dokulara taşınabilir [1].

Bitki genomu mümkün olduğunca kısa sürede üreme ve hayatta kalmak için organize olmuştur. Genel olarak bitki genomu, kalıtsal bilgiyi 3 ayrı işlevsel sınıfı içerecek şekilde evrimleşmiştir 1) Basit metabolizma ve yaşamın devam ettirilmesi faaliyetleri, örneğin fotosentez, terleme, DNA replikasyonu ve hasarların onarılması, 2) Bitkilerde abiyotik ve biyotik strese karşı savunma mekanizmalarının düzenlenmesi ve 3) Yetişkin bitkilerde üreme ve gelişme programını sağlayacak şekilde düzenlenmiştir [17, 18]. Evrimsel bakış açısına göre genom doğal seçilimin etkisiyle canlının sürekli çoğalmasına olanak sağlayacak şekilde organize olmuştur. Çoğalmadan sonra, doğal seçilimin etkisinin yaş ile artması tüm bitki ve bitki organlarının canlılığını ve yaşam için uygunluğunu kaybetmesine yol açar [16, 19].

Tek yıllık model bitki *Arabidopsis thaliana*'nın çoğalma programı tüm bitkinin ölümü ile paralel olacak şekilde evrimleşmiştir. Yapraklarda senesens başlarken tohumlar üretilmektedir ve bu yolla yapraklarda var olan besinleri etkili bir şekilde tohum oluşturmak için kullanır. Burada, yaşlanmanın evrim teorisine göre yaprak senesensi şöyle açıklanabilir, yaprağın yapısındaki besinin kurtarılması için bir yaprağın imha edilmesi dolaylı bir seçim olarak düşünülmektedir [20]. Aslında seçici hücre ölümü bitki gelişmesi ve savunma cevapları süresince belgelenmiştir. Ksilogenez, erken embriyogenez, polen tüpü büyümesi ve oluşan aşırı hassas cevaplar seçici hücre ölümünün tipik örnekleridir. Buna göre, bitki gövdesinin ve mimarisinin hemen hemen tüm yapısal üniteleri üreme ve hayatta kalma uğruna harcanabilir. Açıkça, yaprak dokularından besinlerin bitkinin diğer kısımlarına taşınması, senesens sendromunun belirgin özelliğidir ve yaprağın ölümüyle sonuçlanan genom optimizasyon programının bir parçasıdır. Bu tartışmalar ışığında, genetik olarak kontrol edildiği düşünülen yaprak senesensi aslında genomun çoğalması için doğal seçilimin bir sonucudur [21].

Doğal (indolasetik asit (IAA), indolbütirik asit (IBA)) ve sentetik (2,4-diklorofenoksiasetik asit (2,4-D), 2,4,5-triklorofenoksiasetik asit (2,4,5-T), naftalenasetik asit (NAA)) oksinler bitki gelişmesini ve bunun yanı sıra hücre bölünmesini ve büyümesini düzenlerler. Doğal oksinler ile arasındaki benzerlikler

nedeniyle 2,4-D düşük konsantrasyonda kallus oluşumu ve somatik embriyogenezi uyarmak için kullanılır. Ancak yüksek konsantrasyonda 2,4-D bitkilerde senesensi uyandır. Oksinlerin 1-aminosiklopropan-1-karboksilik asit (ACC) sentetaz (ACS) geninin ifadesini artırdığı gösterilmiştir [20]. Gümüş (Ag⁺) iyonlarının birçok fizyolojik sistemde etilen bağlanmasını veya bunu takip eden yanıtlarda etilenin etkisini inhibe ettiği bilinmektedir [21]. Etilen yaprak senesensinin düzenlenmesinde anahtar hormon olarak görülmektedir [17].

Bu tez çalışmasında IAA ve karanlık ile uyarılan senesens sürecinde antioksidan bileşiklerin konsantrasyonları ve antioksidan enzimlerin aktivitelerindeki değişim buğday bitkilerinde incelenmiştir. Buğday bitkilerine gümüş (Ag⁺) iyonları uygulanması ile senesens sürecinde antioksidan enzim aktiviteleri ve antioksidan enzimleri kodlayan genlerin ifadelerinde ortaya çıkan değişimler araştırılmıştır. Ag⁺ iyonlarının senesens sürecinin kontrol altına alınabilmesi amacıyla senesens üzerinde etkili olduğu bilinmektedir. Ancak bu uygulamaların antioksidan savunma sistemi üzerindeki etkisi konusunda yeterli çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmaya temel oluşturan hipoteze göre: senesens uyarıcılar oksidatif stresi tetiklerken, senesens geciktiriciler oksidatif stresi baskılamaktadır. Bu durum antioksidan özellikli bileşiklerin ve enzimlerin aktivitesinde ve bunları kodlayan genlerin ifadesindeki değişimler ile belirlenebilir. Bu çalışmadan elde edilen bulgular, senesens - antioksidan ilişkisi gibi bilinmeyenlerle dolu bir konu hakkında bilgi sağlayabileceği gibi; senesens sürecinin kontrolü, tarımsal üretim ve bitki biyoteknolojisi alanında yapılacak araştırmalar için gereken bilgi birikimine değerli bir katkı sağlayabilir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI

2.1 SENESENS

Senesens dışsal ve içsel faktörler tarafından başlatılabilir. Patojen saldırılarının yanı sıra sıcak, soğuk, kuraklık, yüksek ışık gibi bir çok abiotik stres koşulları oksidatif hasara sebep olmaktadır ve bu sebeple senesens sürecinde aktif rol oynadığı bilinmektedir. Yaşlanmayı uyaran en önemli içsel faktörler yaprak, bitki yaşı ve bitkinin gelişim aşamasıdır. Tek yıllık bitkilerin yapraklarında tam büyümeden sonra fotosentez hızında devamlı bir azalma görülür [22,23]. Model bitki olan *Arabidopsis thaliana* son derece hızlı senesense giren yapraklara sahip bitkilere bir örnektir. Yaprak gelişiminin 4-6. günleri arasında sürekli ışık altında fotosentez kapasitesi %50 azalır [23]. Fotosentetik aktivitenin belli bir eşik değerin altına düşmesi senesensi uyarıcı sinyal olarak hareket edebileceği varsayılabilir [24, 25]. Bu hala kanıtlanmayı bekleyen bir soru olmasına rağmen, bu teoriyi destekleyen bazı kanıtlar vardır. Yüksek şeker içeriğinin fotosentezle ilgili genleri baskıladığı bilinmektedir [26]. Buğdayda, bayrak yaprak senesensi tozlaşmadan sonra üreme organlarının kaldırılmasıyla geciktirilir. Buğday bitkilerinde monokarpik senesens süresince üreme organlarının, ortadan yokluğunda oksidatif stres azalmıştır ve daha düşük lipid peroksidasyonu ile birlikte proteinler de korunmuştur, ayrıca oksidatif hasar, protein ve nitrojen düzeyi üreme organları bulunan buğday bitkileriyle karşılaştırıldığında daha fazla korunmuştur. Dolayısıyla, üreme organlarının etkisi azot taşınmasını etkilediğinden artan yüksek reaktif oksijen türlerinin (ROT) seviyesi, proteinlerin zarar görmesini ve proteolitik aktiviteyi etkilemiştir [27]. ROT'ların yaprak yaşlanmasını tetiklediğine dair birçok kanıt vardır [28, 29, 30, 31].

Belirgin bir şekilde, oksidatif stres direnci ile potansiyel yaşam süresi *Caenorhabditis* memelileri gibi birçok organizmada birbiriyle ilişkilidir [32, 33]. Senesensin ilerlemesi sırasında antioksidatif kapasitenin kaybı ayrıca farklı bitkilerde de rapor edilmiştir [34, 35]. Ayrıca birçok aerobik organizma için de genel bir olay olduğu işaret edilmektedir. *A. thaliana*'nın farklı geç çiçeklenen mutantlarının incelenmesiyle *Arabidopsis* bitkilerinin çiçeklenme zamanı ve yaşam süresinin oksidatif stres direnciyle sıkı bir şekilde ilişkili olduğu ortaya konulmuştur [36].

Bununla birlikte, bitkilerde yaşam süresi ve oksidatif stres toleransı arasındaki ilişki hala tam olarak anlaşılamamıştır.

2.2 BİTKİLERDE ROT OLUŞUMU VE ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ

Atomik oksijen; yer kabuğunda çok fazla bulunan bir elementtir. Su ve atmosferde bulunan oksijen (O₂) aerobik hayatın bütün formlarının devamı için zorunludur. Mevcut oksijen rezervi, fotosentezin bir sonucu olarak sudaki oksijenin serbest bırakılmasıyla meydana gelir ve solunumda en son elektron alıcısı olarak kullanılmasıyla devamlılığı sağlanır [37]. Bu süreçte reaktif oksijen türleri (ROT) aerobik yaşamın kaçınılmaz bir parçası olmuştur [38]. Oksijen reaktif bir molekül olmamasına rağmen, normal metabolik faaliyetler sırasında veya çeşitli stres faktörleriyle uyarılmış reaktif formları meydana gelebilir [39].

Yapılarında eşlenmemiş elektron içeren atom veya bileşikler serbest radikaller olarak tanımlanmaktadır [40]. Biyolojik serbest radikaller oldukça dayanıksız ve aynı zamanda reaktif moleküller olup, elektronları hücredeki diğer moleküllerle etkileşime girerek hasar meydana getirirler [40, 41].

Bitkilerde serbest radikaller içsel olarak kloroplastlardaki fotosentez reaksiyonlarında, plastid ve peroksizomlarda, mitokondrilerdeki sitrik asit döngüsünde NADPH oksidaz, hücre duvarı peroksidazları ve amino oksidazlar gibi enzimlerin etkisiyle oluşur [42, 43]. Biyotik ve abiyotik stres faktörleri serbest radikal kaynaklarıdır [44, 45].

Bitkinin daha fazla su kaybetmemek için stomalarını kapatması fotosentez için gerekli CO₂ alımının kısıtlanmasına yol açar. Bu durum fotosentetik reaksiyon merkezlerindeki enerjinin aşırı birikmesine neden olur [46]. Bitki dokularında moleküler oksijenle rekabet eden NADP⁺ nin elektron alarak indirgenmesi ile NADPH birikir. Bu koşullarda bitki dokularında NADP⁺ miktarı azalır ve oksijen alternatif elektron alıcısı olarak görev yapar (Mehler reaksiyonu) [47].

Suyun kısıtlı olduğu dönemlerde, kloroplastta gerçekleşen ışık-klorofil etkileşimleri oksidatif strese neden olur [48]. Oksidatif etki, reaktif oksijen türleri (ROT) olarak adlandırılan (O_2^- , 1O_2 , H_2O_2 , $\cdot OH$) serbest radikallerin oluşumundan kaynaklanır [49, 50]. ROT; lipid peroksidasyonu, hücre zarlarının zarar görmesi, proteinlerin ve DNA'nın yapısının bozulması, enzimlerin etkinliğinin azalması gibi ciddi hücresel ve dokusal hasarlara yol açmaktadır [51, 52, 53]. Süperoksit ile hidrojen peroksitin hidroksil radikalini ($\cdot OH$) oluşturmak üzere tepkimeye girmesi (Haber-Weiss reaksiyonu) sırasında artan Fe^{+3} veya Cu^{+2} gibi geçiş metalleri, bu oksidatif hasarı daha da artırabilir [54].

Yaprak senesensinin başlamasıyla, çok fazla miktarda reaktif oksijen türü (ROT) örneğin, süperoksit anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali ($\cdot OH$), singlet oksijen (1O_2) ve diğer zararlı serbest radikaller ortaya çıkar [55, 56], ve bunların ortaya çıkması membran lipid peroksidasyonuna, hücresel hasara ve programlanmış hücre ölümüne neden olur [57]. Çeşitli enzimatik olmayan bileşenlerin arasında askorbatın miktarı ve azalma durumu oksidatif stresin saptanmasında genel olarak kullanılan belirteçtir [58] ve senesensin ilerlemesinin düzenlenmesinde önemlidir [59]. Buğdayda yaprak senesensinin zamanı ve oranı genotipe bağlıdır ve tahıl verimiyle ilişkilidir [60, 61]. Buğday çeşitlerinde yaprak senesensinin geciktirilmesi veya tane dolumu süresince yeşil kalanlarda yüksek tane verimi elde edilirken [62], erken senesenste fotosentez önemli derecede inhibe olur ve düşük tane verimi elde edilir [63].

Erken yaşlanan çeşitlerde yaşlanması geciken çeşitlere göre önemli derecede antioksidanlar ve/veya antioksidan enzim aktiviteleri azalır bunun yanı sıra lipid peroksidasyon ürünleri artış gösterir. Bayrak yaprak senesensinin anlaşılması için yapılan antioksidan enzim aktiviteleri çalışmaları araştırılan çeşitlerdeki farklı genetik özelliklerden dolayı sadece sınırlı bilgi sağlayabilmektedir [63].

Oksidatif stres arttıkça yeni meydana gelen hücre jenerasyonlarında ROT'ların oluşumunun engellenmesinde dengesizlik meydana gelir, sonunda hücre

ölümüne yol açılır. Bu kritik denge, antioksidanların tükenmesi veya aşırı ROT birikmesi nedeniyle bozulduğunda oksidatif stres meydana gelir. Nerede veya nasıl meydana geldiğine bakılmaksızın, hücre içinde artan oksidantlar iki çok önemli etkiye sebep olurlar: bunlar çeşitli hücre bileşenlerinin zarar görmesi ve özel sinyal yollarının aktivasyonudur, her ikisi de birçok hücrenel süreci etkiler. Ancak, oksidatif hasar bitki dokularında özellikle senesens sürecinde ve aktif oksijen türlerinin metabolizmasında dikkate değer bir artış ile karakterize edilir [64, 65]. *Arabidopsis*'in birbirinden farklı geç çiçeklenen/genişletilmiş-uzun ömürlü mutantların analizleri sonucunda yaşam süresi ve oksidatif stres toleransının birbiriyle sıkı bir şekilde bağlı olduğu ortaya konulmuştur [66]. *Arabidopsis*'in, ore1, ore3 ve ore9 adlı geciktirilmiş yaprak senesensi mutantlarının yaprakları oksidatif stresin çeşitli tiplerine karşı artan tolerans sergilemiştir. Ore1, ore3 ve ore9 mutantlarının oksidatif stresle ilişkili fizyolojik ve moleküler değişimlerin belirlenmesiyle tüm bitki düzeyinde diğer *Arabidopsis* mutantlarına göre oksidatif strese karşı daha toleranslı olduğu görülmüştür. Ancak, bu sonuçlara göre, Ore1, ore3 ve ore9 mutantlarında oksidatif strese karşı artan direnç artan antioksidan enzim aktivitesiyle bağlantılı değildir. Genetik kanıtlara göre bitkilerde oksidatif stres toleransı yaprak yaşam süresi ile kontrol edilir [67].

Bitkiler, ROT'un zararlı etkilerini antioksidan sistemleri ile ortadan kaldırılabirler. Hücreleri oksidatif hasara karşı koruyan enzim yapısında olan ve olmayan çok sayıda savunma mekanizmaları vardır. Enzimatik olmayanlar arasında glutasyon (GSH), askorbat (AsA), sistein, hidrokinonlar, mannitol, tokoferol (vitamin E), flavonoidler, bazı alkaloidler ve β -karoten sayılabilir. Bitkilerdeki enzimatik antioksidanlar ise; süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT), askorbat peroksidaz (AP), glutasyon redüktaz (GR) gibi düşük moleküler ağırlıklı enzimleri içermektedir [68, 69]. Bitkilerde stres etkenleri nedeniyle artan $O_2^{\cdot-}$ ve H_2O_2 içeriğine paralel olarak lipid peroksidasyonun da arttığı belirlenmiştir [70, 71]. Mısır (*Zea mays* L.) bitkisi ile yapılan çalışmalarda kuraklık stresinin SOD ve KAT enzim aktivitesinde önemli bir artışa neden olduğu rapor edilmiştir [71, 72].

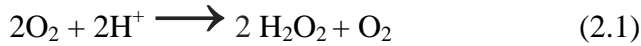
2.2.1 Süperoksit Anyonu

Bitkilerde süperoksit anyonu (O_2^-) kloroplastlar, peroksizomlar, apoplast, mitokondri elektron taşıma zinciri ve plazma zarı gibi farklı hücre kısımlarında oluşur [73, 74]. Süperoksit anyonunun en önemli kaynağı Mehler reaksiyonu sonucunda kloroplastlardır. Bu reaksiyon sırasında O_2 fotosentetik elektron taşıma zincirindeki elektronlar tarafından azaltılır [75]. Oluşturulan O_2^- sonra çoğunlukla Cu/ZnSOD'un faaliyetiyle hidrojen peroksite (H_2O_2) dönüştürülür [76]. Böylece, SOD, O_2^- 'in hücrelerde ve biyokimyasal süreçlerde yer alma olasılığını ve ömrünü belirler. Ayrıca, O_2^- orta derecede reaktiftir, kısa ömürlü bir ROT'tur, yarı ömrü yaklaşık olarak 2-4 mikro saniyedir [77] ve kloroplast zarlarını geçemeyebilir [78]. Yukarıda listelenen nedenlerden dolayı, O_2^- 'nin senesens ve abiyotik stres sırasındaki sinyal görevinin olabileceği görülmektedir. Ancak kloroplastlar O_2^- 'lerin meydana geldiği tek yer değildir. O_2^- , peroksizomlarda 2 farklı kaynaktan meydana gelir; ksantin oksidaz enziminin etkisiyle peroksizomal matrikste [79, 80] ve elektron taşıma zinciri (ETC) tarafından peroksizomal membranda oluşturulur [81]. Peroksizomlar sinyal moleküllerinin önemli bir kaynağı olarak düşünülebilir çünkü bu organel içindeki birçok antioksidanın varlığından dolayı O_2^- ve H_2O_2 'yi hızla üretme ve ortadan kaldırma kapasitesine sahiptir. Son olarak, O_2^- ksantin dehidrogenaz ve aldehit oksidaz enzimlerinin faaliyetiyle sitozolde meydana getirilir [82, 83]. Birçok çalışmaya göre doğal ya da yapay yolla artan O_2^- üretimi senesensi uyarır [84, 85]; ancak, bu uyarılmaya sebep olan özel sinyal rolünün ne olduğunu belirlemek son derece zordur. Çünkü uyarılma birçok durumda diğer ROT'ların üretimine de dayanır ve O_2^- H_2O_2 'ye hızla dönüşür. Bu nedenlerden dolayı senesensi hangi sinyalin uyardığını belirlemek zorlaşmaktadır. ROT'ların fazla miktarda meydana gelmesi önemli hücresel bileşenlerde oksidatif modifikasyonlardan kaynaklanan hücrelerin zarar görmesine yol açabilir, ve sonunda bitki hücresinin ölümüne yol açabilir [86]. Veri analizleriyle abiyotik stres cevaplarında görev alan ve ifadeleri güçlü bir şekilde artan genler arasında, WRKY6'in daha önce senesens sürecinde ve savunmayla ilişkili süreçlerde görev aldığı gösterilmiştir [87]. Barley'de gelişme süresince süperoksit radikalinin arttığı gözlenmiştir, ve senesensin başlangıcından sonra en yüksek seviyeye ulaştığı görülmüştür. Bundan sonra, süperoksit radikalinin üretimi senesens sürecinin sonuna doğru gerilemeye

başlamıştır. Buna, aynı periyot süresince membran akışkanlığındaki artış eşlik eder [88], bu ROT üretimindeki artışı kolaylaştıran bir faktör de olabilir. Bezelyede (*Pisum sativum* L.) kadmiyum stresinden dolayı süperoksit radikalının arttığı gözlemlenmiştir [89]. Kadmiyum (Cd)'ye maruz kalmak oksidatif strese neden olmuştur ve bunun sonucunda antioksidan savunmada bozulma ve NO seviyesinde azalma görülmüştür. Bakla köklerinde NO'nun kadmiyumun zararlı etkisini azaltabileceği gösterilmiştir [90] ve bu baklanın süperoksit radikali yüzünden oksidatif hasar görmesini önlemek için NO'nun süperoksit radikaliyle reaksiyona girerek antioksidan bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir [91]. Bu yolla süperoksit radikali bitkilerin abiyotik strese karşı oluşturdukları tepkilere katkıda bulunabilir.

Stres sonucu bitki hücrelerinde oluşan süperoksit radikalleri SOD enziminin katıldığı reaksiyonla H₂O₂' ye dönüştürülür [92, 93] (2.1). SOD antioksidatif stres savunma mekanizmasının anahtar enzimidir ve O₂⁻ serbest radikalını O₂ ve H₂O₂' ye dönüştürdüğünden O₂⁻ ve H₂O₂'nin hücre içerisindeki derişimlerini doğrudan belirler. SOD enzimi; bakır-çinko (Cu/Zn SOD), demir (Fe SOD) ve manganez (Mn SOD) içeren izoenzimler olarak metal kofaktörlerine göre sınıflandırılırlar [93].

SOD



2.2.2 Hidrojen Peroksit

Hidrojen peroksit bitkilerde stres koşulları altında farklı fizyolojik süreçlerde görev alan bir sinyal molekülü olarak önemli roller oynar [94]. Bunlar senesens sürecinin düzenlenmesi [95], patojen saldırılarına karşı korunma [96], düşük ışık altında stres yoğunluğunun azaltılması [97], ve kuraklık stresinin azaltılmasıdır [98], ve bu süreçlerde yüzlerce genin ifadesini etkilenebilir [99]. Hidrojen peroksit bitkilerde iki olası yolla meydana gelir: SOD enziminin katalizlemesiyle süperoksit radikalının değişmesi [100], ve amino, oksala oksidazlar

gibi oksidazlar yoluyla [101]. Hidrojen peroksit düzeyi hassas ayarlı bir ağ gibi enzimatik yolla ve antioksidanlar tarafından kontrol altında tutulur ve aşırı miktardaki birikimi önlenir [102]. Bitki hücrelerinde hidrojen peroksitin üretilmesi ve yok edilmesi (süpürülmesi) 2.2’de özetlenmiştir. Hücre içerisinde SOD’lar ve farklı hidrojen peroksit süpüren enzimler arasındaki dengenin kararlı haldeki hidrojen peroksit düzeyinin belirlenmesinde önemli olduğu düşünülmektedir [103]. Diğer ROT’larla karşılaştırıldığında hidrojen peroksit en stabil ve en az reaktif olan ROT’tur, ve membranları kolayca geçebilir [104], bu özellikleri hidrojen peroksiti iyi bir sinyal molekülü yapar. Hidrojen peroksit bitkilerde değişken roller oynar; çeşitli biyotik ve abiyotik streslerin düzenlenmesi [104] ve yüksek konsantrasyonlarda, hücre degradasyonuna katkıda bulunduğu zaman [105, 106] hücre ölümü ve senesensin son aşamaları sırasında önemli rollere sahiptir. Hidrojen peroksitin ikili rolü son çalışmalarda doğrulanmıştır, 600 µM hidrojen peroksit uygulanması Oriental × Trumpet hibrit lily “Manissa,” ‘nın vazo ömrünü uzatırken konsantrasyonun 800 ile 1200 µM arasında olması negatif etkilere yol açmaktadır [107]. Hidrojen peroksitin etkilerinin uygulanan doza bağlı olduğunu gösteren daha fazla kanıt saha koşullarında mum elmalarına farklı konsantrasyonlarda uygulanan hidrojen peroksit ile gösterilmiştir [108]. Mum elmalarına haftada bir kez 5 ile 20 mM konsantrasyonlarında uygulanan hidrojen peroksit uygulanması kontrol ve 50 mM en yüksek doz hidrojen peroksit uygulanan bitki ile karşılaştırıldığında daha kaliteli ve verimli meyve büyümesi ve üretimi elde edilmiştir.

Hidrojen peroksit senesens sürecinde önemli rol oynar, farklı bitki türlerinde karmaşık düzenleyici ağın bir parçası olarak senesensi teşvik etmek için bir sinyal olarak kullanılabilirdiği gösterilmiştir [109].

Bitkilerde çiçeklenme başladığında hidrojen peroksitin arttığı görülmüştür, bu aynı zamanda azalan askorbat peroksidaz ifadesiyle de desteklenebilir [105]. Hidrojen peroksit transkripsiyon faktörleri ve senesensle ilgili genlerin ifade olmalarını uyarabilir. Aslında, hidrojen peroksit uygulanmasıyla tuzla tetiklenen 36 genden 14 tane senesensle ilişkili gen ve 15 tane senesensle ilişkili NAC genlerinin

değişen ifadeleri ifade analizleriyle gösterilmiştir [110], Bu hidrojen peroksit uygulanmasıyla uyarılan ORS1 [111], JUB1 [112] ve ATAF1 [113] gibi NAC transkripsiyon faktörleriyle yapılan çalışmalarla ortaya koyulup desteklenmiştir, buna göre NAC transkripsiyon faktörlerinin senesensin ilerlemesinde önemli etkileri olduğu görülmüştür. ORS1 'in aşırı ifade olması senesensle ilişkili genlerin ifadelerini tetikler ve transgenik bitkilerde senesensi hızlandırır, ancak ifadesinin azalması senesensi geciktirir. ORS1 'e zıt olarak JUB1'in aşırı artan ifadesi senesensi güçlü bir şekilde geciktirir, JUB1'in ifadesinin artması hücre içindeki hidrojen peroksit seviyesini baskılayarak çeşitli abiyotik streslere karşı tolerans sağlar. ATAF1'in ifadesinin artması senesensi teşvik eden transkripsiyon faktörü ORE1' aktive ederek ve kloroplastın onarımıyla ilgili olan GLK1 transkripsiyon faktörünü baskılayarak senesensin ilerlemesini teşvik eder. Son çalışmalarda barley bitkisinde senesens ve gelişme süresince hidrojen peroksit üretimi araştırılmıştır. Sonuçlara göre Barley bitkisinin gelişmesinin artmasıyla hidrojen peroksit üretimi de artmıştır, senesensin uyarılmasından sonra hidrojen peroksit üretimi daha da hızlanmıştır ve senesens sürecinin sonunda en yüksek seviyesine ulaşmıştır [105]. Araştırmalar göstermiştir ki yaprak senesensi süresince hidrojen peroksitin iki önemli rolü vardır: bunlar; senesensin uyarılmasında bir sinyal molekülü olması ve senesensin daha sonraki aşamalarında moleküllerin parçalanmasında rol almasıdır.

Yapılan birçok çalışmaya göre hidrojen peroksit bitki gelişimi için önemli olan ve senesens sürecinde etkili olan absisik asit (ABA) ve etilen gibi diğer sinyal molekülleriyle etkileşim içindedir [114].

Farklı abiyotik ve biyotik streslere karşı tolerans kazanmada hidrojen peroksitin önemli rollerini gösteren birçok çalışma vardır [115, 116]. Son zamanlarda, hidrojen peroksit uygulanmasıyla antioksidan enzimlerin aktiviteleriyle yüksek sıcaklık ve düşük ışık ile uyarılan oksidatif strese karşı koruma sağlandığı gösterilmiştir. *Cucumis sativus* cv Lv Feng bitkisinde dışarıdan hidrojen peroksit uygulanması fidanlarda yüksek sıcaklığa karşı toleransı uyarabilir [116]. Salatalık yapraklarına sıcaklık stresi altında hidrojen peroksit uygulanmasıyla antioksidan

enzim aktiviteleri artar, lipit peroksidasyonu düşer, ve böylece kloroplastlar yüksek ısı stresinden korunur. Benzer şekilde, hidrojen peroksitin dıştan uygulanması düşük ışıkla uyarılan oksidatif strese karşı yararlı etkiye sahip olabilir [97]. Düşük ışık oksidatif stresi uyarır [117], böylece ROT'ları artırır ve lipit peroksidasyonuna neden olur. Salatalık yapraklarına dışarıdan hidrojen peroksit uygulanması süperoksit radikali seviyesinin azalmasına neden olur ve malondealdehit antioksidan enzimlerle birlikte lipit peroksidasyonu azaltılarak düşük ışık stresinin etkisi azaltılır. Hidrojen peroksit uygulanması soya yapraklarında strese tepki genlerinin ifadelerini artırarak kuraklık stresine karşı toleransı artırabilir [98]. Hidrojen peroksitin dışarıdan uygulanması bitkide kuraklık stresine karşı tolerasyonunda rol oynadığı bilinen oligosakkaritlerin biyosentezinde görev alan anahtar enzimlerin mRNA seviyelerinde artışa neden olmuştur. Soya bitkisinde kuraklık stresinden kaçınmak için yaprağın solmasını geciktirip yaprağın su içeriğinin korunmasını sağlamıştır. Hidrojen peroksit ayrıca patojenlere karşı korunmada da bitkiye katkı sağlar [118]. Enfekte olan kumkat yaprakları yüksek miktarda hidrojen peroksit biriktirir, bu askorbat peroksidaz aktivitesinin bastırılması ve sonra katalaz aktivitesinin bastırılmasıyla teşvik edilir, askorbat peroksidaz ve katalazın her ikisi de hidrojen peroksitin düşük seviyelerinde tutulmasını sağlar.

KAT, SOD'un katalizlediği reaksiyon sonucunda oluşan ve kuvvetli bir antioksidan olan H₂O₂'nin hücrede birikimini önleyen etkili bir enzimdir [119] (2.2). Katalaz enzimi H₂O₂'yi su ve moleküler oksijene dönüştürmektedir. Bu enzimin, substrata ilgisi düşük olmasına karşın yüksek katalitik aktiviteye sahiptir.

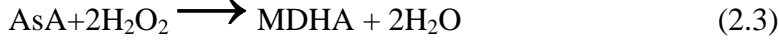
KAT



H₂O₂'nin yıkılmasında alternatif diğer bir yol ise peroksidazların aktivasyonu ile gerçekleştirilmekte ve H₂O₂'nin suya indirgenmesini sağlamaktadır [120]. Askorbat peroksidaz (AP), askorbat-glutasyon döngüsünde hidrojen peroksiti

suya indirgemekle görevlidir. Bu sırada askorbat, monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR) tarafından monodehidroaskorbata (MDHA) okside olur (2,3).

AP



Bununla birlikte MDHA'nın iki molekülü enzimatik olmayan yol ile MDHA'ya ve dehidroaskorbata (DHA) oransız olarak dönüştürülür. DHA, dehidroaskorbat redüktaz (DHAR) ve glutatyon redüktaz (GR) tarafından askorbata (AsA) indirgenir. Bu reaksiyondan sonra ise redükte glutatyon (GSH), DHAR'ın etkisi ile okside glutatyon (GSSG) dönüşür ve GSSG, GR tarafından GSH'ye geri indirgenir [121, 122].

2.2.3 Singlet Oksijen

Singlet oksijen çok yüksek düzeyde reaktiftir, uyarılmış durumda moleküler oksijenin yüksek düzeydeki reaktif formudur oksijen ve klorofilin triplet hali arasındaki bir tepkime ile oluşturulabilir [123]. Hidrojen peroksit ve süperoksit radikalinin oluşumundan farklı olarak, singlet oksijenin oluşumunda oksijene bir elektron taşınması eşlik etmemiştir. Bunun yerine, paylaşılmamış elektronlardan birisi daha yüksek enerjili bir yörüngeye çıkması için teşvik edilmiştir [124]. Singlet oksijen ayrıca farklı abiyotik stresler altında [125, 126] ve senesens süresince de oluşturulur [127]. Diğer ROT'lara benzer olarak singlet oksijen de ikili etkiye sahiptir. Bir oksitleyici ajan olarak çeşitli biyolojik moleküllerle reaksiyona girebilir, zarara sebep olup buna bağlı olarak hücre ölümüne sebep olabilir [128]. Ayrıca, farklı genlerin ifadelerinin aktive edilmesinde sinyal görevi de olabilir [129, 130]. Yüksek reaktivite ve saf su içindeki yarı ömrünün 3,1 ile 3,9 μ s gibi kısa olması [131], sonucu olarak singlet oksijen çoğunlukla yakın çevresindeki moleküllerle etkileşime girebilecek niteliktedir ve bu özelliği bir sinyal molekülü olarak rol oynamasını mümkün kılar.

Singlet oksijen bir toksin olarak hareket etmekten ziyade birçok stres tepki yolunu aktive eden bir sinyal molekülü olarak hareket eder [128]. Son zamanlarda, singlet oksijenin *Arabidopsis* bitkisinde β -siklositralin etkilemesi yoluyla fotooksidatif strese toleransın artmasından sorumlu olabileceği rapor edilmiştir [132]. Singlet oksijenin fotooksidatif strese karşı uyum sürecinde görev aldığına dair *Arabidopsis*in npq1lut2 double mutanında bir çalışma yapılmıştır [125]. Yüksek ışık uygulamasını takiben, singlet oksijen birikimi olur ve kloroplast proteinlerini kodlayan bir grup genin ifadeleri değişir, bu genler kloroplastın bileşeninde ve fonksiyonunda önemli değişimler olmasına yol açar. Yüksek ışık uygulanmasında süperoksit radikali tarafından spesifik transkriptlerin ifadeleri önemli derecede artar, bu da singlet oksijenin yüksek ışığa karşı savunmanın başlamasında önemli rolleri olduğunu göstermektedir.

Senesense gelince, singlet oksijenin sinyalizasyonu üzerindeki bilgiler bu konuda yapılan araştırmaların az olmasından dolayı kısıtlıdır. Genel olarak ROT'ların meydana gelmesi senesens süresince artar [133, 134]. Ancak, singlet oksijendeki artış diğer ROT'larla aynı anda olduğundan bu singlet oksijenin izole edilip rolünün öğrenilmesini zorlaştırmaktadır. Bir rapora göre, adaçayı bitkisinde senesensele ilişkili oksidatif stresin ana sebebi singlet oksijendir [135]. Bununla birlikte, kuraklık stresi altındaki bitkilerde β -karoten ve α -tokoferolun güçlü şekilde bozulduğu gözlenmiştir, bu da singlet oksijenin üretiminin artmış olduğunu göstermektedir. Buna ek olarak, son çalışmalarda, doğal olarak yaşlanan bitkilerde singlet oksijen devamlı olarak düşük seviyede üretilirken, erken aşamalarda hormon tedavisi uygulanan arpalarda singlet oksijenin toplu üretimi ölçüldüğünde ilk önce arttığı ancak daha sonra azaldığı görülmüştür [127]. Son çalışmalara göre, arpa yapraklarında gelişme ve senesens süresince devamlı olarak düşük miktarda singlet oksijen üretimi vardır [115]. Singlet oksijenin diğer bir olası görevi hücre ölümüne neden olarak lipit peroksidasyonunun (LPO) artmasına katkı sağlaması olabilir. Senesens süresince lipit peroksidasyonunda önemli derecede artış olduğu bilinmektedir [136, 137]. Son zamanlarda, *Arabidopsis* yaprak dokularında uygun büyüme koşullarında singlet oksijenin enzimatik olmayan lipit peroksidasyonunun % 80'inden fazlasından sorumlu olduğu rapor edilmiştir [138]. Lipit peroksidasyonu

senesensin teşvik edilmesine neden olan serbest radikallerin oluşmasına yol açar [139]. Bu artış lipid peroksidazlar ve singlet oksijen formlarının daha fazla artmasına neden olan lipoksigenaz aktivitelerinin artmasına yol açar [119], bu da singlet oksijenin aşırı üretilmesine yol açar.

Bitkilerin ROT etkilerini önleyebilmeleri oksidatif strese karşı önemli bir savunma mekanizmasıdır. Antioksidan sistemleri güçlü olan bitkilerin stres koşullarına karşı toleransları artmaktadır [141, 142, 143].

2.3 SENESENS VE OKSİN İLE İLİŞKİSİ

Yaprak senesensi bir oksin türevi olan 2,4-D ile uyarılabilir baklada 2,4-D ile muamele edildiğinde yaprak ve kök gelişimi inhibe olmaktadır. Yaprak senesensi 2,4-D ile uyarıldığında lipid peroksidasyonunun yanı sıra sitotoksik H₂O₂ ve süperoksit O₂⁻ radikalleri artar. Katalaz aktivitesi azalmasına rağmen, peroksidaz, SOD, monodehidroaskorbat redüktaz, dehidroaskorbat redüktaz ve glutatyon redüktaz 2,4-D ile uyarılan yaprak senesensi süresince aktiviteleri artar. Buna ek olarak askorbat düzeyi oksidize askorbat ve glutatyon azalır ancak oksidize glutatyon artmıştır. Artan oksidatif stres (O₂⁻ ve H₂O₂) bakla yapraklarında senesense neden olmaktadır. Dahası, 2,4-D ile uyarılan zararlı ROT'ların bakla hücrelerinde antioksidan enzimler hücreleri korumak için yeterli değildir. Bitki hücrelerinde genel enzimatik olmayan antioksidanlar askorbat ve glutatyondur bunlar ayrıca AA-GSH döngüsünün bileşenleridir [144].

2,4-D uygulanması POX ve SOD gibi birçok antioksidan enzimi ve ayrıca MDHAR, DHAR ve GR gibi AA-GSH döngüsü enzimlerini etkiler ve aktivitelerini artırır [145]. 2,4-D ilavesi kontrole göre POX, SOD, MDHAR, DHAR ve GR aktivitelerini artar. Ancak, bunun karşılığı olarak KAT aktivitesi yaklaşık olarak %50 azalır. AA-GSH döngüsü aracılığıyla askorbat (AsA), oksidize askorbat (DHA), azalan glutatyon (GSH ve oksidize glutatyon (GSSG) senesens süresince H₂O₂ ve O₂⁻'yi ortadan kaldıran antioksidanlardır. 2,4-D uygulanması AsA, DHA ve GSH'ta %40, 48 ve 35'lik önemli azalmaya neden olur buna karşın GSSG içeriğinde azalma olur [144].

Doğal ve sentetik oksinin yüksek konsantrasyonları çeşitli bitki türlerinde büyüme bozukluklarına, büyümenin azalmasına ve klorofil kaybına sebep olmaktadır. 500 μ M 2,4-D uygulanması bakla fidelerinin gelişiminde yapraklarında, gövdesinde, yaprak ayasında ve klorofil içeriğinde kontrol bitkileriyle karşılaştırıldığında azalmaya neden olmuştur [144].

Bitkilere oksin uygulanması ACS (1-aminosiklopropan-1-karboksilik asit sentetaz) aktivitesini uyarır ve daha sonra hücre içinde artan etilen ve ACC büyümenin azalması ve senesensin uyarılmasına sebep olur [145]. Grossmann vd. [146] raporuna göre 2,4-D ilavesi ile birlikte ABA ilavesi ve etilen ilavesi H_2O_2 miktarını artırır ve doku hasarı ile birlikte hücre ölümüne sebep olur. 2,4-D uygulanması ACS aktivitesi ve lipit peroksidasyonu artırır ayrıca ROT'ların ortaya çıkmasıyla oksidatif hasar da artar tüm bunlar baklada yaprak senesensinin başladığının işaretidir. Oksinler ACS sentezini uyarır ve spesifik ACS genlerinin ifadesini artırır [143].

H_2O_2 ve O_2^- hücresel sinyal sürecinde ikincil habercidir. yaprak senesensinde birçok gen ve proteinin ifade olmasını uyarırlar bunun yanı sıra hem de temel ROT döngüsünü oluştururlar. 2,4-D ile muamele edilen bakla yapraklarında ROT metabolizmasındaki değişiklikler lipit peroksidasyonu ve klorofil degradasyonundan sorumlu olabilir. Birçok araştırmacı tarafından bitkilerde oksin ve ROT metabolizması arasındaki ilişki rapor edilmiştir [147].

Aktivitesi artan SOD, POX ve GR 2,4-D ile uyarılan yaprak senesensi süresince O_2^- ve H_2O_2 'nin ortadan kaldırılmasında rol oynar. Artan SOD, POX ve GR aktivitelerine rağmen yaprak senesensi süresince KAT aktivitesi düşük olmaktadır ve bakla hücrelerinde antioksidan sistem önemli derecede aktive olmasına rağmen artan H_2O_2 ve O_2^- 'ye karşı korunmada yetersiz olmaktadır. 2,4-D ile uyarılan yaprak senesensi süresince KAT aktivitesi azalır çünkü KAT, H_2O_2 radikaline karşı hassastır ve senesens süresince H_2O_2 artar. KAT genellikle yeşil yapraklarda hücre

içinde peroksisomun içerisinde bulunur. Senesensle uyarılan H_2O_2 hücrel sinyal iletim yolağında da görev alabilir [144].

AA-GSH döngüsü bitki hücrelerinde H_2O_2 'nin ortadan kaldırılması için en önemli antioksidan sistemdir. Stres koşullarında diğer antioksidan enzimlerin aktiviteleri ile birlikte MDHAR ve DHAR aktiviteleri de artar. Benzer şekilde, MDHAR ve DHAR bezelye, salatalık ve mısırdaki yapraklarda oksidatif hasar arttıkça artar. 2,4-D enzimatik olmayan AsA, DHA, GSH Ve GSSG birikiminde önemli derecede azalmaya neden olur [144].

GSH biyosentezi 2,4-D ile uyarılan yaprak senesensi süresince artar. Oksinle uyarılan yaprak senesensi bitkiler için öldürücüdür. $AgNO_3$ ve AgNPs ile 2,4-D birlikte uygulandığında bu öldürücülük baskılanır aynı zamanda nDNA degradasyonu ve DNase aktivitesi de baskılanır [144].

2,4-D ile senesense uğraması için uyarılan bitkilerde antioksidatif mekanizmanın yanı sıra AA-GSH döngü sistemi de bitkinin 2,4-D'ye karşı savunma sistemine katkıda bulunur. 2,4-D ile uyarılan değişimler, hücrel ve antioksidatif enzimler, AA-GSH döngüsü ve nDNA degradasyonunun çalışılması ve değerlendirilmesi oksinle uyarılan yaprak senesensinin anlaşılmasını sağlar [144].

2.4 SENESENS İLE GÜMÜŞ İYONLARININ İLİŞKİSİ

Ag^+ iyonları $AgNO_3$ ve gümüş nanopartikülleri (AgNPs) formunda uygulandığında baklada senesens inhibe olmaktadır. Ag^+ iyonları normalde etilenin bağlandığı bölgeye bağlanarak, bitki dokularında etilenin etkisinin inhibe olmasına neden olur [128, 148]. 2,4-D ile uyarılan yapraklarda AgNPs ilave edildiğinde $AgNO_3$ ile karşılaştırıldığında, senesens daha fazla inhibe olur. İkisi arasındaki bu farklılık nanomateryallerde daha iyi iyon salımından dolayı olabilir. Ayrıca, AgNPs 2,4-D ile uyarılan yaprak senesensinde $AgNO_3$ ile karşılaştırıldığında artan katalitik özellikleri yüzünden senesensin inhibe edilmesinde daha etkilidir. Hücreler ile

AgNPs'lerin etkileşimi yapraklarda yeni ve büyük porların oluşmasını uyarabilir. Sonuç olarak iletim dokuları vs. tarafından alınan ve hücre duvarından hücre içine geçen AgNPs'ler artar. $AgNO_3$ 'teki Ag^+ iyonları enzimlerle kompleks oluşturur ancak AgNPs'ler oluşturmaz. Bu sebeple hücre duvarını daha kolay geçerler ve $AgNO_3$ 'e göre daha etkilidirler. Yani AgNPs'ler enzimler ile kompleks oluşturmadıkları için daha kolaylıkla hücreye taşınabilirler [148].

Gümüş nitrat [149], ve gümüş thiosülfat [150] gibi etilen inhibitörlerinin eklenmesi, sürgün oluşumunu ve yaşlanmayı geciktirerek artırmıştır.

2.5. SENESENSLE İLİŞKİLİ GENLER (SAG)

Senesens programlanmış bir süreçtir ve son aşamasında nükleik asitler, proteinler, karbonhidratlar, lipit ve membranlar kısacası programlanmış hücre ölümünü temsil eden tüm elemanlar degrades olur [131, 151]. Tüm bu olaylar, farklı aşamalarda yönetilen çevresel, gen transkripsiyon ve translasyonunda meydana gelen önemli değişimlerle oluşan hormonal sinyallerle kontrol edilen metabolik değişimlerle yönetilirler. PCR temelli hibridizasyon, mikrodizin teknolojisi ve EST analizleriyle bir çok gen ile ifadesi artan ve azalan genler *Narcissus* [152], *Alstroemeria* [154], *Iris* [155], *Rosa*[135, 156] ve *Mirabilis jalapa* [136, 157]'te tanımlanmıştır. SAG (Senesensle İlişkili Gen)'ler makromolekül yıkılması, ROT detoksifikasyonu, etilen biyosentezi, besinlerin geri dönüşümü ve tekrar kullanılması gibi çeşitli fonksiyonlarda kullanılan proteinleri kodlarlar. SAG'lar lipid metabolizmasındaki (glutasyon- S- transferaz, allen oksit sentetaz, açıl CoA oksidaz, zincir içindeki yağlı asit hidroksilaz ve yağlı asit elongaz) enzimleri; hücre duvarı parçalanmasında rol oynayan hidroksilazlar (beta-glukosidaz, beta-galaktosidaz, pektin asetilesteraz) enzimleri, membran dönüşümü ve biyosentezinde rol aldığı varsayılan karboksi PEP mutaz ile etilen biyosentezinden sorumlu enzimler (Sadenosilmetionin sentetaz, 1-aminosiklopropan-1-karboksilik asit (ACC) ve 1-aminosiklopropan-1-karboksilik asit oksidaz) gibi enzimleri kodlarlar [158, 159].

2.6 ANTİOKSİDAN GENLER

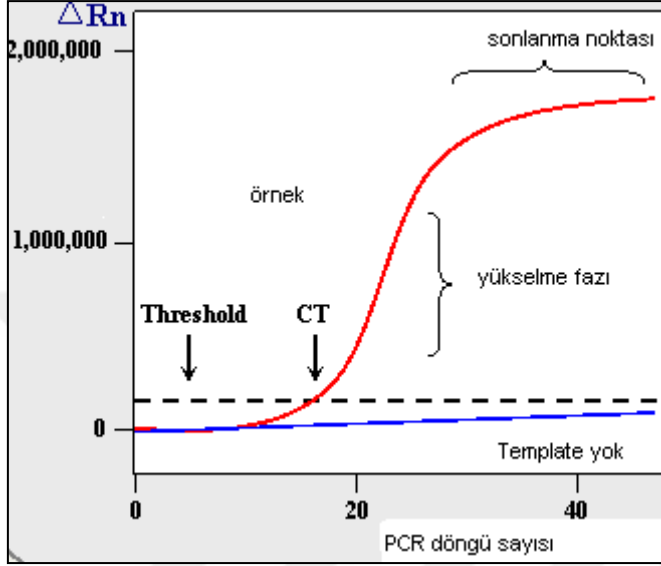
Antioksidan ya da ROT susturucu genler bitki büyümesi, strese karşı oluşan cevaplar ve organ senesensi gibi bitki gelişiminin farklı aşamalarında ROT seviyesinin kontrol edilmesinde önemli rollere sahiptir. Yaşlanan yapraklarda ve petallerde reaktif oksijen türlerinin seviyesindeki artışla birlikte, ROT'lara karşı korunmada görev alan genler farklı şekilde düzenlenir. Transkriptom çalışmalarına göre *Arabidopsis* mutantlarının yapraklarında örneğin *immutans* (*im*)(çok renkli mutant) [160], görülmüştür ki oksidatif strese karşı Cu-ZnSOD'lar, FeSOD, KAT1, ferritin1, POD'lar, glutatyon peroksidaz (GPX2/GPX7), stromal APX, GR ve alternatif oksidaz (AOX) genlerinin ifadeleri artarken, FeSOD1, KAT3, tilakoit APX ve DHAR genlerinin ifadeleri azalmıştır [161].

2.7 REAL TIME PCR (RT-PCR) (EŞ ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU)

Real Time PCR, nükleik asit amplifikasyonunun eş zamanlı olarak gözlenmesine olanak sağlayan ve temeli PCR teknolojisine dayanan analiz teknolojisidir. Bu teknolojiye ortamdaki DNA sarmalına bağlanan ve floresan ışımaya yapan özel boyalar (SYBR Green, SYTO9 gibi) kullanılarak, sinyal oluşturan prob dizileri yardımı ile ortamdaki amplifikasyon miktarı tespit edilebilmektedir. Her PCR döngüsü sonrasında, ortamda oluşan çift zincirli ürünün bu sayede miktarı belirlenebilmekte ve kantitatif analizleri yapılabilmektedir [162, 163]. Real Time PCR; çok sayıda örneğin aynı zamanda analizine olanak sağlaması, amplifikasyonun erken evrelerde saptanabilmesi, agaroz jelle gerek duyulmaması ve agaroz jelle rezolüsyondan dolayı ayırt edilemeyen ifade farklılıklarının rahatlıkla saptanabilmesi gibi çok sayıda avantajlara sahip bir yöntemdir.

RT PCR reaksiyonları; exponensiyal faz (yükselme fazı), linear faz (yüksek farklılık) ve plato faz (sonlanma noktası) olmak üzere 3 temel basamaktan oluşmaktadır (Şekil 2.1). Exponensiyal fazda tüm reaksiyon içerikleri ortamda yeterli miktarda bulunduğundan etkinlik %100 olup, bu nedenle PCR ürün miktarı her

döngüde iki katına çıkmaktadır. Linear fazda ise yavaş yavaş reaksiyon komponentleri azalmaya başlar bu nedenle PCR ürünlerinin oluşumunda azalma gözlemlenmektedir. Plateu fazda ise PCR ürün oluşumu tamamen sonlanmaktadır [164].



Şekil 2.1. Eş zamanlı PCR reaksiyon basamakları [164]

2.7.1. Real Time PCR Döngü Aşamaları

Real Time PCR'da; hibridizasyon prob lar, hidroliz prob lar ve SYBR green olmak üzere 3 çeşit prob (floresan ışımada görevli) kullanılmaktadır. Bunlardan hibridizasyon prob larının, 3' ucu (530 dalga boyu) floresan işaretli olup, 5' ucunda (640 dalga boyu) ise başka bir prob bağlıdır. 3'ucu normalde aldığı enerjiyi geri salmaktadır. Reaksiyon sırasında bu iki prob bir araya gelince (maksimum iki baz uzaklıkta) 3' ucundaki probun saldığı enerjiyi 5' ucundaki prop alır ve 640 dalga boyunda ışımaya (FRET-floresans rezonans enerji transferi) gerçekleşmektedir. Hidroliz prob ları ise dizi spesifik prob larıdır. Ortamda Quenter (söndürücü) ve reporter (haberci) olmak üzere iki prob bulunmaktadır [164]. Hibridizasyon proplarından farklı olarak ışımaya gerçekleşmesi için bu iki probun bir arada olmaması gerekmektedir. Reaksiyon sırasında uzama başlayıp Quenter (söndürücü) parçalandığı zaman reporter (haberci) prob ışımaya yaparak analize olanak

sağlamaktadır. SYBER green ise diziye spesifik olmayıp, ortamda çift zincir DNA'nın minör grooveye bağlanarak ışığa gerçekleştirilmektedir [164].

Real Time PCR analizlerinde temel parametre eşik döngü değeri (threshold cycle = Ct)' dir. Bu değer gerçekleşen amplifikasyon sırasında tespit edilen floresan ışınımının eşik çizgisini kestiği noktadır. Başka bir ifade ile eşik döngü değeri reaksiyonda ilk anlamlı artışın gerçekleştiği noktayı (yükselme fazına ilk geçiş) belirtmektedir. Başlangıçtaki hedef DNA miktarı ne kadar fazla ise ilk anlamlı artış o kadar erken olacaktır. PCR ürünleri yükselme fazına o kadar erken girecektir [166]. Böylece Real time PCR sırasında farklı örneklerde oluşan ürün miktarı Ct değerleri ile karşılaştırılabilmektedir [167]. Ayrıca analizler sırasında standart tanımlama çalışmasında kullanılacak kontrol örneklerine ihtiyaç vardır. Kontrol gruplarından ifadesi olan bir örnek, seri dilüsyonları yapılarak, standart olarak tanımlanabilmektedir. Burada önemli olan standartlar arasındaki kalıp oranının tekrarlanabilir ve ölçülebilir olmasıdır. Bu tip çalışmalara göreceli kantitasyon (relative quantitation) adı verilmektedir [166]. Yapılan standart dilüsyonlar varsayılan konsantrasyon miktarları içermektedir. Bu nedenle bu standartlar kullanılarak konsantrasyonlara karşılık gelen dilüsyonların Ct değerleri belirlenerek, kantitasyon için gerekli olan regresyon eğrisi çizilmektedir. Bu eğri standart eğri olarak da ifade edilmektedir. Reaksiyonu gerçekleşen örneklerin Ct değerlerinin standart eğri üzerinde önceki yapılan dilüsyonlardaki hangi konsantrasyonu temsil ettiklerine bakılarak göreceli miktar tayini belirlenmektedir [164].

2.7.2. Real Time PCR Çalışmalarında Kontrol (Housekeeping) Genleri

Real time PCR çalışmalarında analiz edilen tüm örneklerin normalizasyonu için, çeşitli koşullarda ifade düzeyinin değişmediği bilinen (en az etkilenen) bir referans gene ihtiyaç vardır [166]. Analizler sırasında ilgilenen genin ifade düzeyi, referans gen olarak seçilen housekeeping genin ifade düzeyine oranlanır. Böylece başta örneklere ait RNA'lardan elde edilen cDNA miktarlarının örnekler arası başlangıç farklılıkları ve deney aşamalarında meydana gelen farklılıklar normalize

edilmektedir. Real time PCR çalışmalarında seçilecek housekeeping genin ifade düzeyinin değişim göstermemesi analizin doğruluğunu yükseltmektedir.

2.7.3. Real Time PCR Çalışmalarında Erime Eğrisi (Melting Curve)

Real Time PCR analizlerinde, primerlerde dimer varlığının kontrolü ve özgün olmayan amplifikasyon ürünlerinin tespitinde ‘erime eğrisi’ (melting curve) analizi yapılabilmektedir. Her çift zincirli DNA kendine özgün bir ‘erime eğrisi (T_m)’ yani çift zincirli DNA’nın %50’sinin tek zincirli hale geçmesi için gerekli olan sıcaklığa sahiptir. Gerçekleştirilen amplifikasyon sonrası sıcaklık yavaş yavaş yükseltilerek belirli aralıklar ile floresans miktarı tespit edilmektedir. Bu sırada çift zincirli DNA denatüre olmaya başlar ve boya (SYBR Green) serbest kaldığı için ölçülen floresan miktarı da azalmaya başlamaktadır. Buradan elde edilen erime eğrisinden yararlanılarak amplifikasyonun özgünlüğü tespit edilmektedir [167].

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. MATERYAL

Araştırmada kullanılan materyal ekmeklik buğday (*Triticum aestivum* L.)'un Gün-91 çeşididir. Bu çeşit soğuğa, kışa ve kuraklığa dayanıklıdır, İç Anadolu ve Geçit Bölgeleri ile benzeri yörelerin yarı taban ve taban alanları ile özellikle yüksek alanlarına yetiştirilmesi tavsiye edilir. Buğday tohumları Ankara Yenimahalle Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsünden temin edilmiştir. Türkiye'de ve dünyada en çok yetiştirilen ekonomik önemi olan tarım ürünlerinden biri olduğu için çalışmada buğday tercih edilmiştir. Kuraklığa dayanıklı Gün-91 çeşidi ise bulunduğumuz bölgenin iklimsel ve coğrafik özelliklerine uygun bir çeşit olması bakımından seçilmiştir.

Buğday (*Triticum aestivum* L. Gün-91) tohumları petri kutusunda ıslatılmış filtre kağıdında çimlendirildikten sonra içinde 2 Kg toprak/torf/gübre (2/1/1 oranında) karışımı bulunan saksılara aktarılmıştır. Bitkiler iklim odasında ve kontrollü şartlar altında; 16/8 gün/gece ışık periyodu, 26±2°C gün ve 18±2°C gece sıcaklığında, 480 µmol m⁻²s⁻¹ ışık şiddeti, % 65±5 bağıl nem ortamında yetiştirildi. Fideler üç hafta büyütüldükten sonra, her birinde 25 adet fide bulunan, 40 adet saksı beşerli sekiz gruba ayrıldı. Bu gruplara aşağıdaki uygulamalar gerçekleştirildi.

1. Grup: 5 adet saksı kontrol grubu olarak 14 gün boyunca her gün düzenli olarak su verilmiş, ayrıca yapraklara 100 ml saf su püskürtülerek aydınlıkta bekletilmiştir.
2. Grup: 5 adet saksı 14 gün boyunca her gün 200 ppm'lik 100 ml AgNO₃ püskürtülerek aydınlıkta bekletilmiştir.
3. Grup: 5 adet saksı hiçbir uygulama yapılmadan 14 gün boyunca karanlıkta bekletilmiştir.
4. Grup: 5 adet saksı gün aşırı 200 ppm 100 ml AgNO₃ püskürtülerek karanlıkta bekletilmiştir.
5. Grup: 5 adet saksı gün aşırı 50 ppm 100 ml indol-3 asetik asit (IAA) püskürtülerek aydınlıkta bekletilmiştir.
6. Grup: 5 adet saksı gün aşırı 50 ppm IAA diğer günlerde 200 ppm AgNO₃ uygulanıp aydınlıkta bekletilmiştir.

7. Grup: 5 adet saksı gün aşırı 100 ppm 100ml IAA uygulanarak aydınlıkta bekletilmiştir.
8. Grup: 5 adet saksı gün aşırı 100 ppm IAA diğer günlerde 200 ppm $AgNO_3$ püskürtülerek aydınlıkta tutulmuştur.

Çizelge 1. Buğday (*Triticum aestivum* L. cv. Gün-91) bitkilerinin yapraklarına IAA ve $AgNO_3$ uygulanması için oluşturulan deneme deseni.

Uygulamalar	$AgNO_3$ (200 ppm)	Saksı Sayısı	Bitki Sayısı	Grup No
Işık (kontrol)	-	5	25	1
	Ag^+	5	25	2
Karanlık	-	5	25	3
	Ag^+	5	25	4
IAA (50 ppm)	-	5	25	5
	Ag^+	5	25	6
IAA (100 ppm)	-	5	25	7
	Ag^+	5	25	8
TOPLAM		40	200	40

Bitkiler tüm uygulamalar yapıldıktan sonra 14. günün sonunda bekletilmeden fide boyları ve oransal su miktarı (OSİ) ölçümleri yapıldı. Bitki yaprakları daha sonra analizlerde kullanılmak üzere sıvı azotla dondurulduktan sonra alüminyum folyoya sarılarak $-80^{\circ}C$ 'ta saklanmıştır.

3.2. BİTKİ BOYU

Yeterince uzamış 5 adet fide seçildikten sonra hasat edilmiş ve boyları ölçülmüştür.

3.3. ORANSAL SU MİKTARI (OSİ)

Tam hidrate olmuş dokudaki suyun yüzdesi olarak orijinal örnekteki suyu ifade eder. Doku örneğinin yaş ağırlığı (ya) belirlenir, 2 saat saf suda yüzer durumda bekletilerek doyuncaya kadar su absorbe etmesine izin verilir, filtre kağıdı ile yüzeyi

kurulandıktan sonra turgorlu ağırlığı ölçülür (ta) ve 85-90 °C'lık bir etüvde kurutulduktan sonra kuru ağırlık (ka) ölçülür.

OSİ = 100. [(ya- ka) / (ta-ka)] formülüyle hesaplanır.

3.4. KLOROFİL MİKTARI

Klorofil a, b ve a/b oranı [168]'ye göre belirlenmiştir. 0,2 g taze yaprak dokusu 8 ml %80'lik aseton ilavesiyle homojenize edildi. Elde edilen ekstrakt 4°C'ta 5000 rpm'de santrifüj edildi. Sonra spektrofotometre %80'lik asetonla 750 nm' de sıfırlandıktan sonra örnekler 664 ve 647 nm'lik dalga boylarında 2 tekrarlı olarak ölçülür ve Klorofil a, b ve a/b oranları hesaplanır.

3.5. KAROTENOİDLER

Antosiyanın tayini (β-karoten ve ksantofil) oranları [169]'e göre belirlenmiştir. 0,5 g taze yaprak dokusu 8 ml etil alkol kullanılarak homojenize edilmiştir. Daha sonra 4°C'ta 5000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Ekstrakt evaporatör balonlarına konular, vakum açılarak üst sıvı uçurularak yoğunlaştırılan örnekler 1ml kloroformda çözülerek 1,5 ml'lik ependorf tüplerine alınır. Örnekler hazır silika plate'ye mikropipetle 100µl yüklenir. Silika pleyt 30 kısım aseton, 90 kısım dietil eter, 60 kısım n_hexan'dan oluşan çözelti içerisine yerleştirilir 1- 1,5 saat yürütülerek bantlar tamamen ayrıştırılır. β -karoten ve ksantofil bantları ayrıştırılıp 5ml aseton içerisine alınır ve 4°C'ta 5000 rpm'de santrifüj yapılır. Spektrofotometre 450 nm'de asetonla sıfırlandıktan sonra 450 nm'de okumalar yapılarak β-karoten ve ksantofil miktarları hesaplanır.

3.6. TOPLAM SUDA ÇÖZÜNÜR FENOLİKLER

Suda çözünür fenoliklerin miktarları [170]'a göre belirlenmiştir. 1g taze yaprak dokusu 10 ml %80'lik etanol içerisinde homojenize edilir, 15 dakika boyunca kaynatılır, 4°C'ta 7000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir, süpernatant evaporatörde buharlaştırılır, örnekler 10 ml saf su içinde çözülür. Bu ekstraktın 0,2 ml'lik alikotu 2

ml su bulunan bir tüpe eklenir, üzerine 2ml %10'luk Na_2CO_3 ilave edilir, sonra 1:1 oranında seyreltilmiş Folin-Ciocalteu'dan 0,5 ml ilave edilerek karıştırılır. Oda sıcaklığında 30 dakika bekletildikten sonra spektrofotometrede 725 nm'deki absorbans değerleri okunur ve klorogenik asit standartı kullanılarak hesaplama işlemi yapılır.

3.7. TOPLAM ANTIOKSİDAN KAPASİTE

Toplam antioksidan kapasite [171]'e göre belirlenmiştir. 0,2 g taze bitki dokusu %96'lık 5 ml metanol içerisinde homojenize edilir. Ekstrakt 4^0C 'ta 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilir. İçerisinde 0,6 M H_2SO_4 , 28mM sodyum fosfat ve 4 mM amonyum molibdat bulunan belirteç çözelti hazırlanır. Ekstraktan 300µl belirteç çözülden ise 2700µl karıştırılır. Toplam antioksidan kapasitenin karşılaştırılabilmesi için standart oluşturmak için 0, 20, 40, 60, 80, 100 ppm'lik askorbik asit (C vitamini) çözeltileri hazırlanır. Hazırlanan standartlardan da 300 µl'si ile 2700µl belirteç çözelti karıştırıldıktan sonra hepsi birlikte 95^0C 'ta 90 dakika ısıtılır sonra oda sıcaklığında soğutulur. Spektrofotometre 695 nm'de kör çözelti ekstrakt yerine 300 µl metanol ilave edilen çözelti ile sıfırlandıktan sonra 695 nm'de okumalar yapılır. C vitamini standardı oluşturulduktan sonra toplam antioksidan kapasite hesaplanır.

3.8. ÇÖZÜNÜR PROTEİN MİKTARI

Çözünür protein miktarı, Lowry metodu ile ölçüldü [172]. 0,5 g taze yaprak dokusu 5 mL %80'lik aseton ile homojenize edildi daha sonra vortekslendi. Saf ekstrakt 4^0C 'de, 10 dk, 16 000 g'de santrifüj edildi ve süpernatant ölçümler için kullanıldı. 1 mL örnek 50^0C 'de su banyosuna alındı ve 10 dk. bekletildi. Üzerine 0,9 mL A solüsyonu (100 mL distile suda 0,2 g sodyum-potasyum tartarat ile 10 g $NaCO_3$ çözülmüştür) eklendi ve 50^0C 'de su banyosunda 10 dk bekletildi. Bu sürenin sonunda tüpler su banyosundan çıkarıldı ve oda sıcaklığına kadar karanlıkta soğutuldu. Üzerine 0,1 mL B solüsyonu (100 mL distile suda 0,2 g sodyum-potasyum tartarat ile 1 g $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$ çözülmüştür) eklendi ve karıştırıldı. Daha

sonra 10 dk oda sıcaklığında bekletildi. Üzerine 3 mL C Solüsyonu (Folin-Ciocolteu'nun 1 mL'si 15 mL distile su ile seyreltilmiştir) eklenip karıştırıldı ve 50°C'de su banyosunda 10 dk inkübe edildi. Tüpler su banyosundan çıkarılıp oda sıcaklığına kadar soğutuldu. Ultra saf su ile hazırlanmış köre karşı spektrofotometrik olarak 650 nm'de spektrofotometrede ölçüm yapıldı. Örneklerdeki protein miktarları Bovine Serum Albumine (BSA) ile hazırlanmış standart eğriden hesaplandı.

3.9. ANTİOKSİDAN ENZİMLERİN AKTİVİTESİ

3.9.1 Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivite Tayini

SOD aktivitesi Beyer ve Fridovich [173]'e göre yapıldı. Bunun için 1 g yaprak dokusu 5 mL fosfat tamponu ile homojenize edildi. Tampon 0,1 mM EDTA ve 100 mg PVP içermektedir. Saf ekstrakt +4°C'de, 5 dk, 16 000 g'de santrifüj edildi ve süpernatant ölçümler için kullanıldı. 2,4 mL fosfat tamponu, 1 mL sodyum karbonat, 200 µL L-Methionin, 200 µL nitro blue tetrazolium (NBT), 150 µL enzim ve 150 µL ribofilavin eklenerek reaksiyon başlatıldı. Örnekler 10 dk süreyle 25 °C ışık altında tutuldu. Spesifik enzim aktivitesi U/mg-1 protein olarak belirlendi. Bir birim SOD aktivitesi 560 nm'de spektrofotometrede ölçülen NBT redüksiyon hızının % 50 inhibisyonuna neden olan enzim miktarı olarak belirlendi. Bir birim (Unit), 25 °C'de 1 dk 1 µmol substratı ürüne dönüştüren enzim (SOD) miktarını göstermektedir. Cu/Zn SOD aktivitesi için deney aynı şekilde fosfat tamponu içerisine KCN ilavesi yapılarak gerçekleştirilmiştir.

3.9.2 Katalaz (KAT) Aktivite Tayini

Katalaz aktivitesi, Aebi vd. [174]'ne göre yapıldı. 1 g yaprak dokusu 5 mL potasyum fosfat tamponu (pH:7 ve 0,1 mM EDTA) ile 100 mg PVP eklenerek homojenize edildi. Reaksiyon 2.8 mL potasyum fosfat tamponu (pH:7 EDTA içermez), 80 µL H₂O₂ (0.5M) ve 120 µL enzim ekstraktının karıştırılması ile başlatıldı. Katalaz aktivitesi 240 nm'de 30 sn içindeki absorbansın azalması ile tespit edildi ve sonuçlar H₂O₂ dk⁻¹mg⁻¹ protein olarak hesaplandı.

3.10. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Yapılan uygulamaların karşılaştırılmasında tekrarlanan ölçümlü varyans analizi uygulandı. Işık, karanlık, IAA ve gümüş nitrat etkileşimleri anlamlı olduğu için ileri analizler ile 1. gün ve 7. gün ölçümleri arasındaki farklar alınarak türler ve uygulamalar karşılaştırıldı. Uygulamalar arasındaki farklılık karşılaştırılırken Anova testi kullanıldı.

3.11. GEN İFADESİ ANALİZLERİ

3.11.1 RNA izolasyonu

Örnekler sıvı azotda ezilir. 2 ml lik tüpe 1 ml trizol eklenir. Üzerine 300-500 mg örnek eklenir(1ml pipet ucu kullan). Elle tüp kuvvetli bir şekilde sallanarak karışım sağlanır, vortekslenir ve örnekler oda sıcaklığında 10 dk bekletilir. Üzerine 250 µl kloroform eklenir, karıştırılır. Oda sıcaklığında 10 dk bekletilir. 14.000 rpm de 4⁰C de 10 dk. santrifüj edilir ve üst sıvı yeni tüpe aktarılır. Üzerine 250 µl 1.2M NaCl, 250 µl 0.8 M Na-citrate ve 250 µl isopropanol eklenir. 10 dk. oda koşullarında (tercihen -20⁰C de 10 saat) bekletilir. 14.000 rpm de 4⁰C de 10 dk santrifüj edilir, üst sıvı atılır (pellet bu aşamada tüp dibinde görülmelidir). Pellet %70 EtOH ile yıkanır ve dikkatlice kurutulur. 20-50 µl DEPC muamele edilmiş suda çözülür.

3.11.2 RNA Örneklerinin Miktar ve Kalitesinin Belirlenmesi

Agaroz jelve spektrofotometrik olarak; izole edilen RNA'lar pürifikasyon öncesi ve pürifikasyon sonrasında %1.2'lik agaroz jelle yüklenerek 1,5 saat yürütülmüştür. Ayrıca kalite ve miktar tayini için spektrofotometrik ölçümleri (ND-1000) yapılmıştır.

3.11.3 qRT-PCR (Real Time) Uygulamaları

Real time PCR (RT-PCR) metodu iki aşamalı olarak gerçekleştirilmiştir. İlk basamak için First Strand cDNA sentez kiti (Roche) ile aşağıda işlem basamakları verildiği şekilde cDNA sentezi yapılmıştır.

RNA-Primer karışımının hazırlanması:

İçerik	Hacim
RNA (2 µg)	Değişken
Random Hekzamer Primer (50 pmol/µl)	1 µl
Su (PCR grade)	Değişken
Toplam	13 µl

Termal cycler’da (Biorad marka) 65°C’de 10dk denatüre edilip hemen buza alınan karışıma aşağıda verildiği şekilde hazırlanan Revers Transkripsiyon karışımı eklenerek, belirtilen reaksiyon koşullarında revers transkripsiyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 2. Revers transkripsiyon karışımının hazırlanması

İçerik	Hacim (µl)	Reaksiyon Koşulları
Transcriptor Reverse Transkriptaz	4	
Reaksiyon tamponu (5X)		
RNaz İnhibitör (40 u/µl)	0.5	25 °C / 10 dk
DNTP karışımı (10 mM)	2	55 °C / 10 dk
Transkriptör Reverse Transkriptaz Enzimi (20 u/µl)	0.5	85 °C / 5 dk
Toplam	7	

cDNA sentezi sonrası Nanodrop ND–1000 spektrofotometre ile elde edilen cDNA miktarı ölçülerek miktar tayini yapılmıştır. RT-PCR aşamasını takip eden ikinci aşamada ise SYBR Green I (Roche) master kiti kullanılarak aşağıda işlem basamakları verildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

Hedef gene ait CT/CP değerlerinin normalizasyonu için Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) kontrol geni kullanılmıştır. Validasyon için

seçilen primerlere ve kontrol (house keeping) genine ait dizi bilgileri Çizelge 3. 'te verilmiştir.

Çizelge 3. Real time-PCR primer dizileri (5'-3')

Gen	Geri Primer	İleri Primer
Cu/ZnSOD	CTTCCACCAGCATTTCAGT	TCCTTTGACTGGCCCTAATG
GAPDH	AAATGCCCTTGAGGTTTCCC	TTAGACTTGCGAAGCCAGCA

Her bir primere ait örnekleri içeren cDNA'lar ile SYBR Green I (Roche) Master Kit içerikleri karışımı alete ait 384'lük pleyte yerleştirilerek 1500 rpm' de 2 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında Roche Light Cycler Sealing folyo ile kaplanan plate Roche Light Cycler 480 cihazında her bir primer için optimize edilen sıcaklıklar seçilerek örnekler koşturulmuştur.

Çizelge 4. GAPDH Primer Optimizasyon Koşulları

GAPDH primer optimizasyon koşulları (TM 57 °C)	
cDNA	2 µl
İleri primer (10 pmol)	1 µl
Geri primer (10 pmol)	1 µl
Syber Green	5 µl
ddH ₂ O	1 µl
Toplam hacim	10 µl

Çizelge 5 Cu/ZnSOD Primer Optimizasyon Koşulları

Cu/ZnSOD primer optimizasyon koşulları (TM 60 °C)	
cDNA	2 µl
İleri primer (10 pmol)	1 µl
Geri primer (10 pmol)	1 µl
Syber Green	5 µl
ddH ₂ O	1 µl
Toplam hacim	10 µl

Her primer için optimize edilen koşullara göre hazırlanan karışım eklenerek Roche Light Cycler-LC 480 cihazına protokole uygun PCR programı koşullarında amplifikasyon reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonlar sırasında housekeeping gen olarak; GAPDH geni kullanılmıştır.

Real Time PCR reaksiyonları hazırlanırken, standart eğrilerin çizilebilmesi amacıyla kontrol cDNA' lardan 6 logaritmik konsantrasyon olmak üzere; 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000 ve 1/100000 oranlarında seri dilüsyonlar hazırlanmış ve ölçümlerin değerlendirilmesi aşamasında Real Time PCR cihazına ait analiz programı ile her bir primer için ayrı ayrı standart eğriler (en az 1 logaritmik konsantrasyonun eğri üzerinden geçen, efficiency değeri 1.7 ile 2 arasında ve slope değeri ise -3.3' e yakın olacak şekilde) çizilmiştir.

Çizelge 6. Real Time PCR Programı

Program					
Program	Döngüler		Analiz Modu		
Pre inkübasyon	Acquisition Mode	Döngü	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate	
	None	1	00:10:00	4.8	
Amplification	Acquisition Mode	Döngü	Hold(hh:mm:ss)	Ramp Rate	Quantification
95 °C	None	45	00:00:10	4.8	
TM °C	None		00:00:10	2.5	
72 °C	Single		00:00:05	4.8	
Melting	Acquisition Mode	Cycle	Hold(hh:mm:ss)	Ramp Rate	Melting Curve
95 °C	None	1	00:00:30		
TM °C	None		00:00:30		
99 °C	Continuoues		-		
Cooling	Acquisition Mode	Cycle	Hold(hh:mm:ss)	Ramp Rate	
40°C	None	1	00:00:10	0.11	None

3.11.5 Verilere Ait Analizler

Real Time PCR işlemi sonrasında, örneklerde analiz edilen her gen için, uygulamalar ve kontrollere ait örneklerin pik profilleri belirlenmiştir. Pik profillerinden yararlanarak Ct (Cycle Threshold) değerleri oluşturulmuştur. Örneklerle ait Real Time PCR sonuçlarına göre elde edilen Ct değerleri kullanılarak $2^{-\Delta\Delta CT}$ metoduna göre relatif ifade değerleri hesaplanmıştır. Cu/Zn-SOD genlerinin ifade seviyelerine ilişkin bu sonuçlar $2^{-\Delta\Delta CT}$ metoduyla [175], GAPDH genine göre normalize edilerek elde edilmiştir. Relatif ifade seviyesindeki değişiklikler, uygulama için 3 tekrara ait ddCt değerleri ile bu tekrarlara ait kontrol ddCt değerlerine göre tek yönlü ANOVA testine göre istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

3.12. DİZİ (SEKANS) ANALİZİ

3.12.1 Real- Time Primerleri ile Gen Bölgesinin Çoğaltılması

Çizelge 7'deki primerler kullanılarak gen bölgeleri PCR ile çoğaltılmıştır. PCR protokolü aşağıdaki gibidir;

- Başlangıç denatürasyonu 95 °C'de 1-3 dk
- Denatürasyon 94-95 °C'de 0,5-2 dk
- Primer bağlanma sıcaklığını hesaplamak için önce erime sıcaklığı hesaplanmıştır. Bu sıcaklık değeri primerde yer alan nükleotid sayısı kullanılarak $4(G+C)+2(A+T)$ °C formülünden hesaplanarak bulunmuştur. Bağlanma değeri olarak en düşük erime sıcaklığından 5 °C düşük olan sıcaklık kullanılmıştır. Bağlanma için 40°C-65 °C arasında bir sıcaklıkta 0,5-2 dk arasında tutulmuştur.
- Uzatma sıcaklığı 70-75 °C arasında 1-3 dk
- Son uzatma sıcaklığı 72 °C'de 5-15 dk 25-40 arasında döngü yapılmıştır.

En iyi sonuç veren PCR programı baz alınarak, primerlerle PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 7. Real time-PCR primer dizileri (5'-3')

Gen	Geri Primer	İleri Primer
Cu/ZnSOD	CTTCCACCAGCATTTCCAGT	TCCTTTGACTGGCCCTAATG
GAPDH	AAATGCCCTTGAGGTTTCCC	TTAGACTTGCGAAGCCAGCA

3.12.2. PCR ürünlerinin jelde görüntülenmesi

Elde edilen PCR ürünleri, %1,2 agaroz jel kullanılarak 100V'da yaklaşık 1 saat koşturularak, jeldeki bantlar görüntüleme sistemi yardımıyla görüntülenmiştir.

3.12.3. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

PCR yoluyla ilgili bölgenin çoğaltılmasından sonra istenilen büyüklükte olan bantlar seçilerek jelden kesilmiştir ve saflaştırılması yapılmıştır. Jel

saflaştırılması için Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) kullanılmıştır. Protokol aşağıda belirtildiği şekilde uygulanmıştır;

1. 25 µl PCR ürünü %2'lik agaroz jelde 60-90 dk süreyle yürütülür.
2. UV ışını altında istenilen bölge kesilip, ağırlıkları ölçülür.
3. Üzerlerine 1,1 oranında (ağırlık: hacim) Membran Binding Solüsyonu eklenir ve 65 °C 'de eritilir.
4. Klonlar temiz tüpe takılır ve üzerlerine örnekler yüklenip 1 dk bekletilir.
5. 14000 rpm'de, oda sıcaklığında 1 dk. santrifüj yapılır.
6. Alt solüsyon uzaklaştırılır ve kolonlara 700 µl Membran Wash Solüsyonu eklenir.
7. 14000 rpm'de, oda sıcaklığında 1 dk. santrifüj yapılır ve alt solüsyon uzaklaştırılır.
8. Membran Wash Solüsyonundan 500 µl eklenir ve 14000 rpm'de, oda sıcaklığında 5 dk. santrifüj yapılır.
9. Kolonlar temiz tüplere takılır ve membrana değmeyecek şekilde kolonun ortasına 25 µl Nuclease Free su eklenip, 1 dk bekletilir.
10. 14000 rpm'de, oda sıcaklığında 1 dk. santrifüj yapılır.
11. Elde edilen cDNA'ların miktar ve saflığı Nanodrop Spektrofotometrede (ND-1000) ölçülür.

3.12.4. Dizi Analizi:

Sekans analizinde Dye Terminator Cycle Sequencing Kit, (Beckman Coulter) kullanılarak Beckman CEQ 8800 Dizi analizi cihazı yardımıyla analizi yapılmıştır. Dizi Analizi PCR Protokolü aşağıdaki şekildedir;

Çizelge 8 Dizileme reaksiyonu

Plazmid	5 µl (100-300 ng)
Dizi primeri (1.6 pmol/µL)	2.0 µl
**Dizi Premiksi	11 µl
ddH ₂ O	x.x µL
Toplam	20.0 µl

**Premiks (Dye Terminator Cycle Sequencing Kit)

Dizi analizi için uygulanacak PCR programı ise; 96° C' de 3dk, 96°C'de 20 sn, 55°C 'de 20 sn ve 60°C'de 4 dk olmak üzere toplam 34 döngü olacak şekilde ayarlanmıştır.

3.12.5. Dizi Ürünlerinin Temizlenmesi

Dizi ürünleri Agencourt Clean CEQ (Beckman Coulter) kit ile temizlenmiştir. Temizleme protokolü aşağıdaki gibidir;

- PCR'dan alınan örnekler 1500 rpm'de 2dk santrifüj edilmiştir.
- Seal açıldıktan sonra 20µl Agencourt Clean CEQ eklenmiştir.
- %85'lik etanolden 62µl eklenip ve 7–8 kez pipetaj yapılmıştır.
- SPRI pleyt üzerinde 10 dk üzerine bastırılarak beklenmiştir.
- SPRI pleyt üzerinde alkol uzaklaştırılmıştır.
- 100µl %85'lik alkolden eklenir. Bu kez 3 dk. SPRI pleyt üzerinde, üzeri bastırılarak beklenilmiştir.
- SPRI pleyt üzerinde alkol uzaklaştırılmıştır.
- AB Gene Pleyt SPRI plate üzerinden alınmış ve ters çevrilerek 10 dk. oda koşullarında kurutma gerçekleştirilmiştir.
- 40µl Sample Loading Solution (SLS-Beckman Coulter) eklenmiştir.
- Kuyuların içi iyice temizlenene dek pipetaj yapılarak, örneğin çözünmesi sağlanmıştır.
- Çözünen örnekler AB Gen Pleyt' ten Beckman sample pleyte' e aktarılmıştır.

Son olarak dizi analizi işlemi Beckman CEQ 8000 Otomatik Dizi Analizi sisteminde gerçekleştirilmiştir.

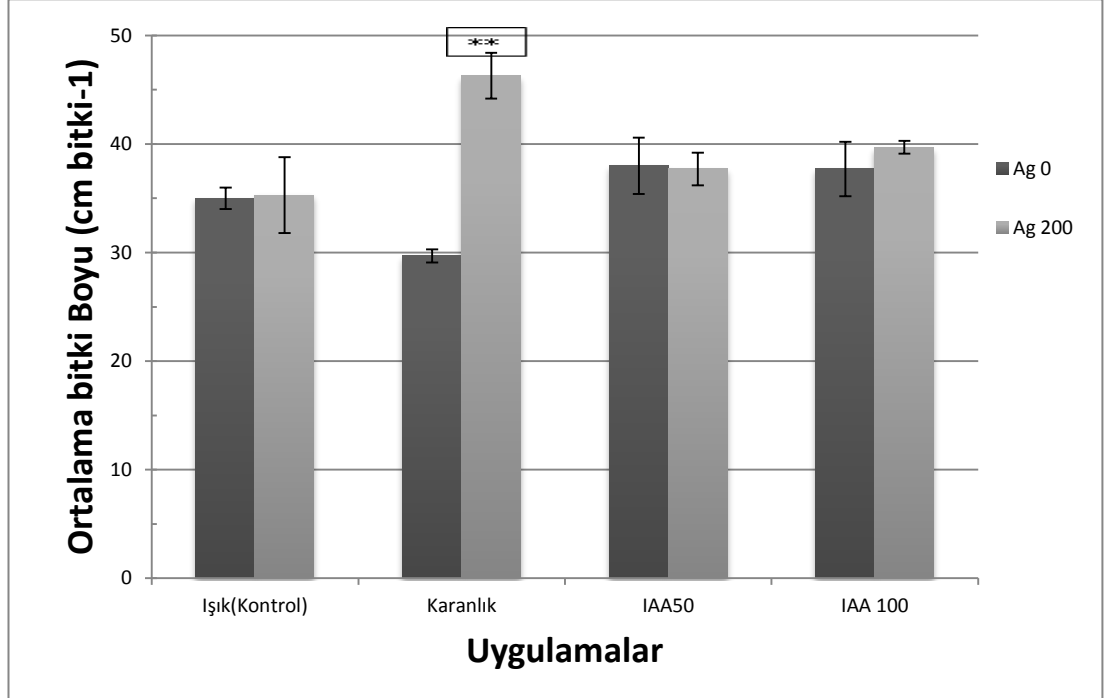


4. BUGULAR

4.1. FİDE BOYLARI

Kontrol grubu olarak ışıkta yetiştirilen fideler ile karşılaştırıldığında karanlık uygulaması fide boyunda önemli ölçüde azalmaya neden olmuştur. Senesens teşvik edici olarak yapraklara püskürtülen 50 ve 100 ppm İndol-3 asetik asit (IAA) uygulamaları fide boyunda artışa neden olmuştur.

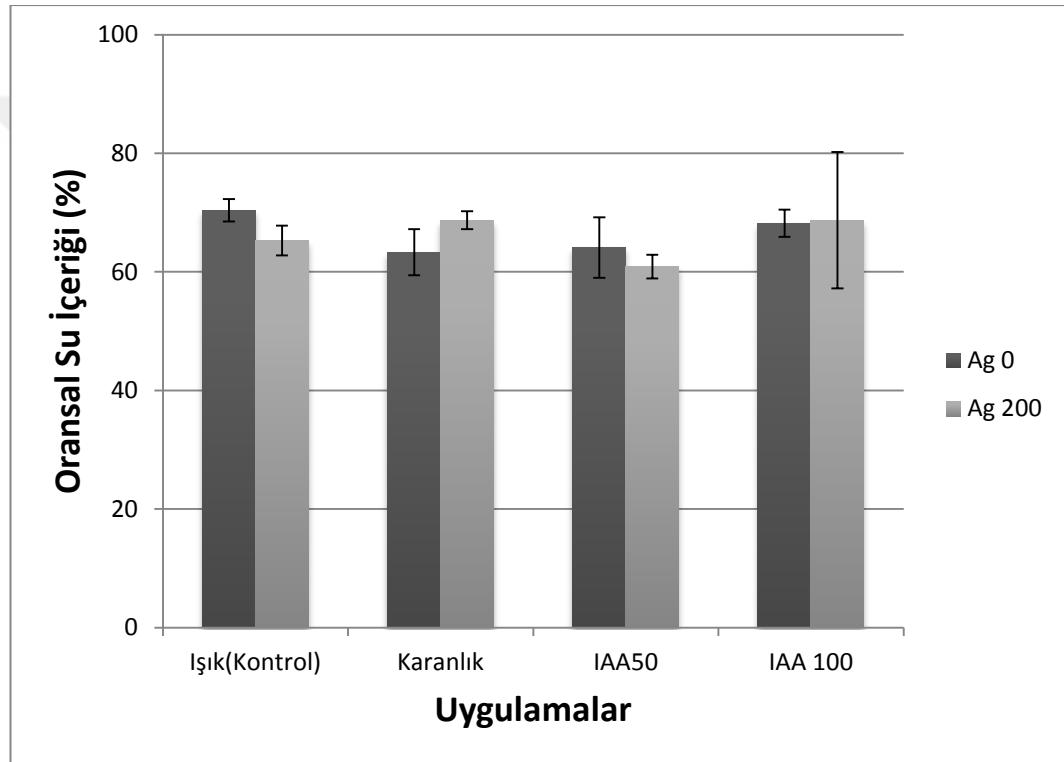
Işıktaki yetişen buğday fidelerinde 200 ppm gümüş nitrat (AgNO₃) fide boylarında önemli bir etki değişikliğe neden olmamıştır. Karanlık uygulaması ile senesense girmesi için teşvik edilen fidelerde 200 ppm AgNO₃ uygulaması fide boyunun önemli ölçüde artışına neden olmuştur. Karanlıkta AgNO₃ uygulaması kontrol gruplarından daha yüksek fide boyu değerlerine ulaşılmasını sağlamıştır (şekil 4.1). 50 ve 100 ppm IAA uygulaması yapılan fidelerde ise AgNO₃ uygulaması ise fide boyunda önemli bir etkiye sahip değildir. Fide boyu bakımından senesensi teşvik edici uygulamalar ile AgNO₃ uygulamaları arasındaki etkileşim istatistik olarak önemli bulunmuştur (p≤0,05).



Şekil 4.1. Senesensin karanlık, IAA'nın 50 ve 100 ppm 'lik iki farklı konsantrasyonuyla uyarıldığı buğday bitkilerinde AgNO₃ uygulamasının fide boyları üzerindeki etkisi. (İstatistikler uyarıcılar p≤0,05*, gümüş p≤0,01**, uyarıcı x gümüş p≤0,01**).

4.2 ORANSAL SU İÇERİĞİ (OSİ)

Oransal su içeriği değerleri tüm uygulamalarda %61 ile %72 arasında sınırlı bir değişiklik göstermiştir. En yüksek OSİ değeri ışıktaki yetişen ve herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol grubu bitkilerinde ölçülürken, en düşük değer 50 ppm IAA+200 ppm $AgNO_3$ uygulaması yapılan bitkilerde bulunmuştur. OSİ değerleri bakımından $AgNO_3$ uygulaması yapılanlarla yapılmayanlar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Kontrol grubu ile senesens uyarıcıların uygulandığı gruplar arasındaki farklılıklar da önemli değildir.



Şekil 4.2. Senesensin karanlık, IAA'nın 50 ve 100 ppm 'lik iki farklı konsantrasyonu ile uyarıldığı buğday bitkilerinde $AgNO_3$ uygulamasının OSİ üzerine etkisi. (İstatistikler uyarıcılar, gümüş, uyarıcı x gümüş anlamsız).

4.3 KLOOROFİL MİKTARLARI VE a/b ORANI

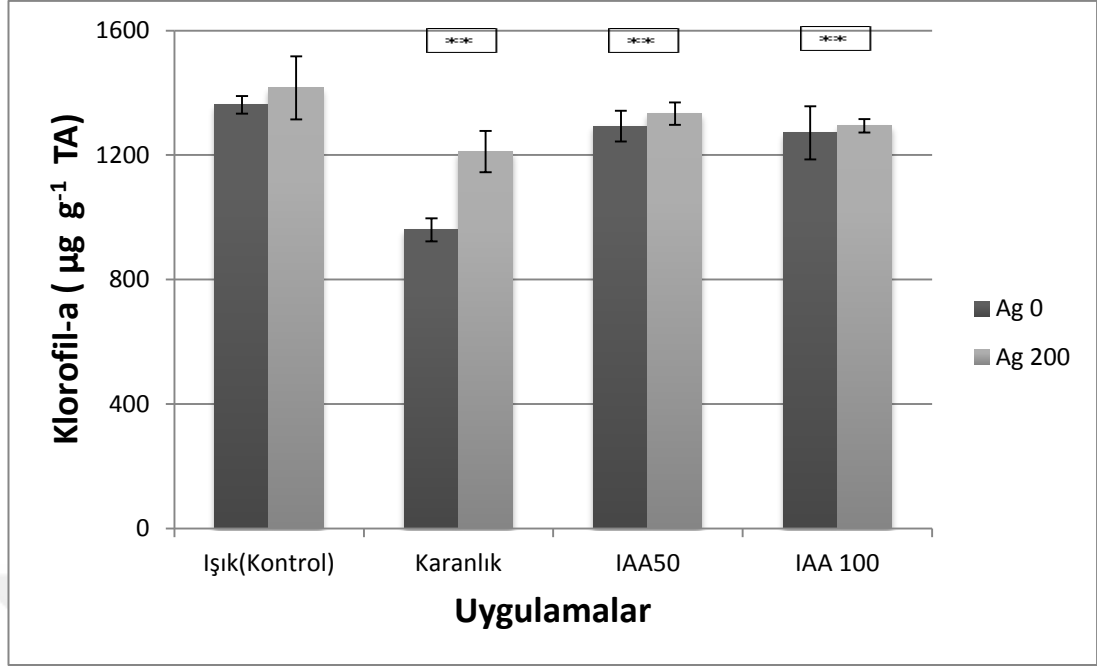
Kontrolle karşılaştırıldığında karanlık ve IAA uygulaması yapılan fidelerde klorofil-a, b ve toplam klorofil değerleri bakımından önemli farklılıklar belirlenmiştir. Işıktaki yetişen kontrol bitkileri ile karşılaştırıldığında karanlıkta ve IAA uygulamalarında toplam klorofil miktarı önemli ölçüde azalmıştır (Şekil 4.6). En

önemli azalma karanlık uygulamalarında bulunmuştur. Yapraklara püskürtülen IAA konsantrasyonu arttıkça klorofil kaybı da artmıştır. Karanlık uygulamaları klorofil a dan fazla klorofil b kaybına neden olmuştur. Karanlıkta klorofil a kaybı % 27 iken klorofil b kaybı %50 düzeyindedir (Şekil 4.4). IAA uygulamalarına da klorofil b klorofil a dan daha duyarlı bulunmuştur. Bu durum klorofil a/b oranının karanlık uygulamalarında yüksek çıkmasına neden olmuştur. Karanlıkta klorofil a/b oranları ışıkta büyüyenlere göre yaklaşık %50 daha yüksektir (şekil 4.5).

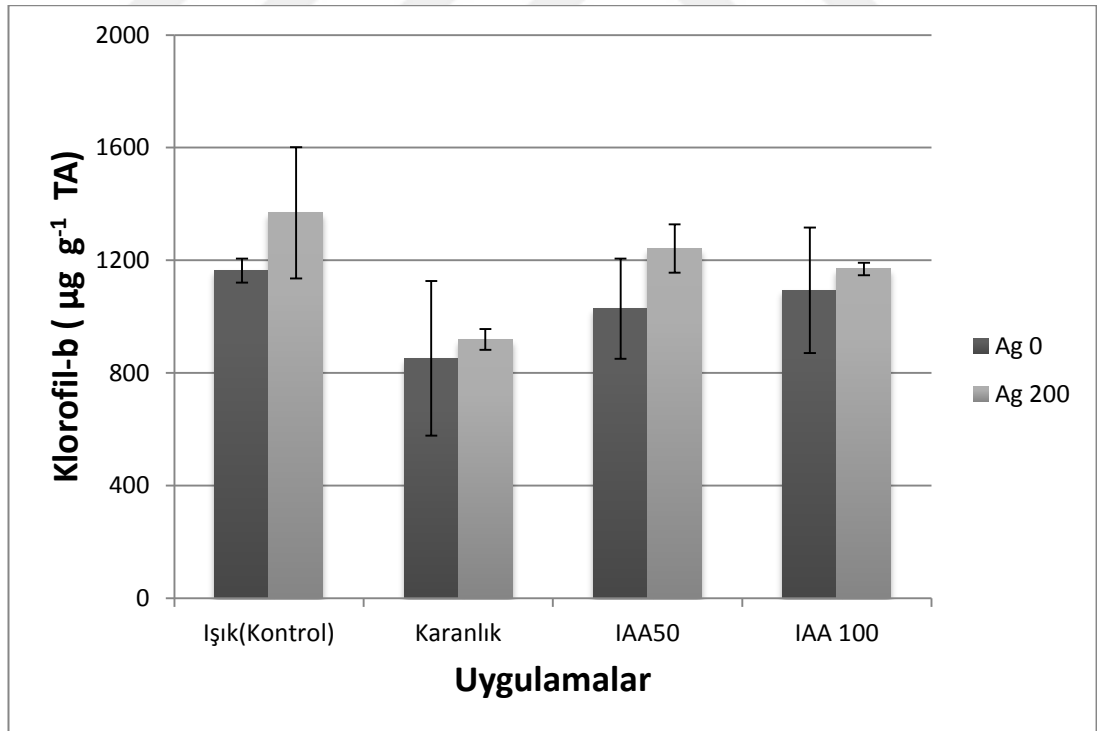
Karanlık uygulaması klorofil a miktarında önemli ölçüde azalmaya neden olurken, IAA uygulamasının klorofil a kaybı üzerindeki etkisi daha sınırlı olmuştur. IAA' nın klorofil a kaybı üzerindeki etkisi dozundan bağımsız görülmektedir (şekil 4.3).

Buğday yapraklarına 200 ppm AgNO₃ püskürtülmesi tüm gruplarda klorofil kaybını geri çevirmiştir. Karanlıkla birlikte AgNO₃ uygulanması yapılan fidelerde klorofil-a miktarı sadece karanlık uygulananlara göre %26 artış göstermiştir. Bununla birlikte, en yüksek klorofil-a miktarı ışıkta tutulup AgNO₃ uygulanan fidelerde görülmüştür. IAA'nın 50 ve 100 ppm'lik konsantrasyonu uygulanan fidelerde AgNO₃ uygulanması klorofil-a miktarında artışa neden olmuştur (şekil 4.3).

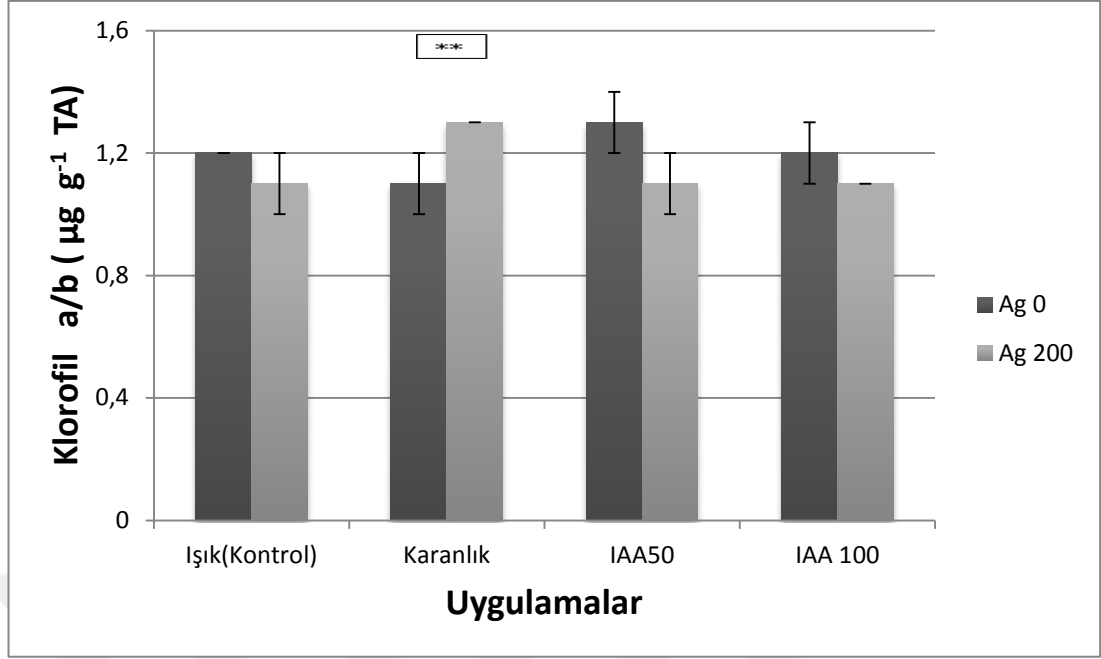
Işıktaki yetişen ve IAA uygulanan fidelerin yapraklarına AgNO₃ uygulaması yapılması klorofil b düzeylerinde önemli ölçüde artışa neden olmuştur. Bu artışın bir sonucu olarak klorofil a/b oranı bu gruplarda azalma bulunmuştur (şekil 4.5).



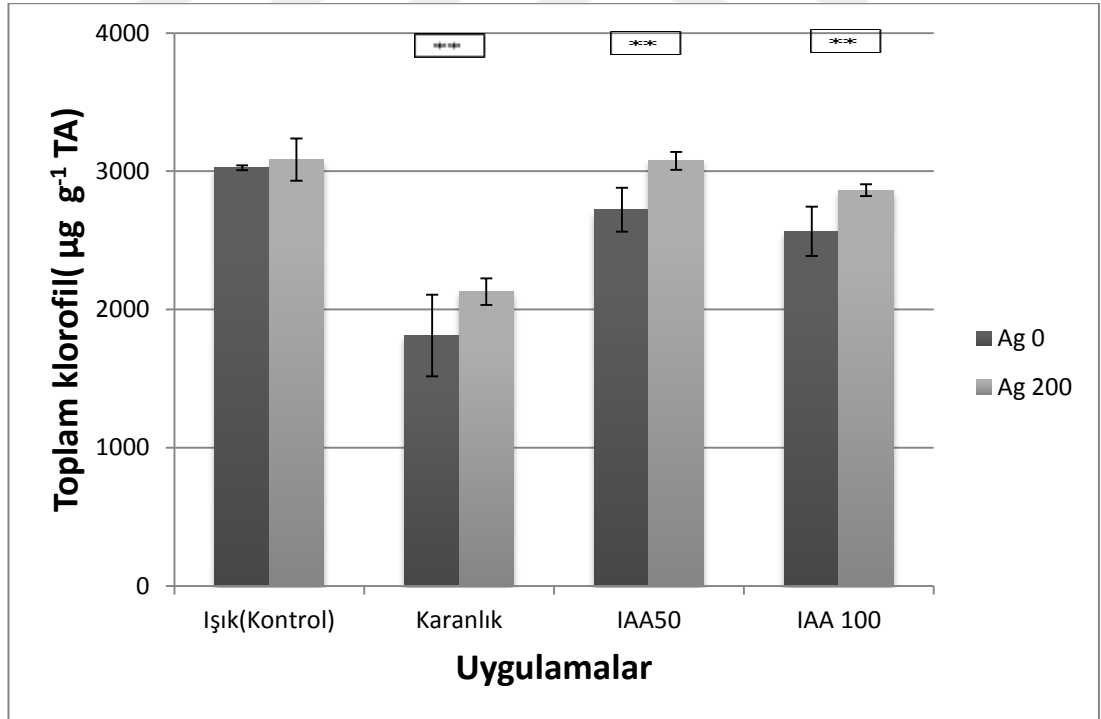
Şekil 4.3. Senesensin karanlık, IAA'nın 50 ve 100 ppm 'lik iki farklı konsantrasyonu ile uyarıldığı buğday bitkilerinde AgNO₃ uygulamasının klorofil-a miktarı üzerindeki etkisi. (İstatistikler uyarıcılar p≤0,01**, gümüş p≤0,01**, uyarıcı x gümüş p≤0,05*).



Şekil 4.4. Senesensin karanlık, IAA'nın 50 ve 100 ppm 'lik iki farklı konsantrasyonu ile uyarıldığı buğday bitkilerinde AgNO₃ uygulamasının klorofil-b miktarı üzerindeki etkisi. (İstatistikler uyarıcılar, gümüş uyarıcı x gümüş anlamsız)



Şekil 4.5. Senesensin karanlık, IAA'nın 50 ve 100 ppm 'lik iki farklı konsantrasyonu ile uyarıldığı buğday bitkilerinde $AgNO_3$ uygulamasının klorofil-a/b miktarı üzerindeki etkisi. (İstatistikler uyarıcılar anlamsız, gümüş $p \leq 0,01$ **, uyarıcı x gümüş anlamsız).

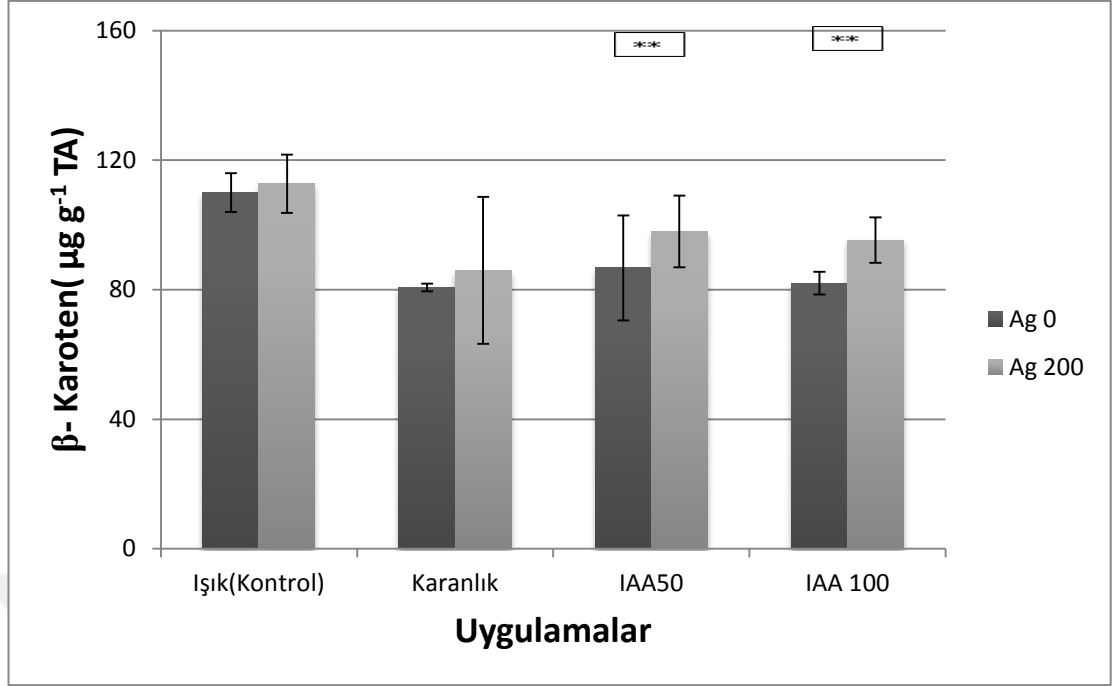


Şekil 4.6. Senesensin karanlık, IAA'nın 50 ve 100 ppm 'lik iki farklı konsantrasyonu ile uyarıldığı buğday bitkilerinde $AgNO_3$ uygulamasının toplam klorofil miktarı üzerindeki etkisi. (İstatistikler uyarıcılar $p \leq 0,01$ **, gümüş $p \leq 0,01$ **, uyarıcı x gümüş anlamsız).

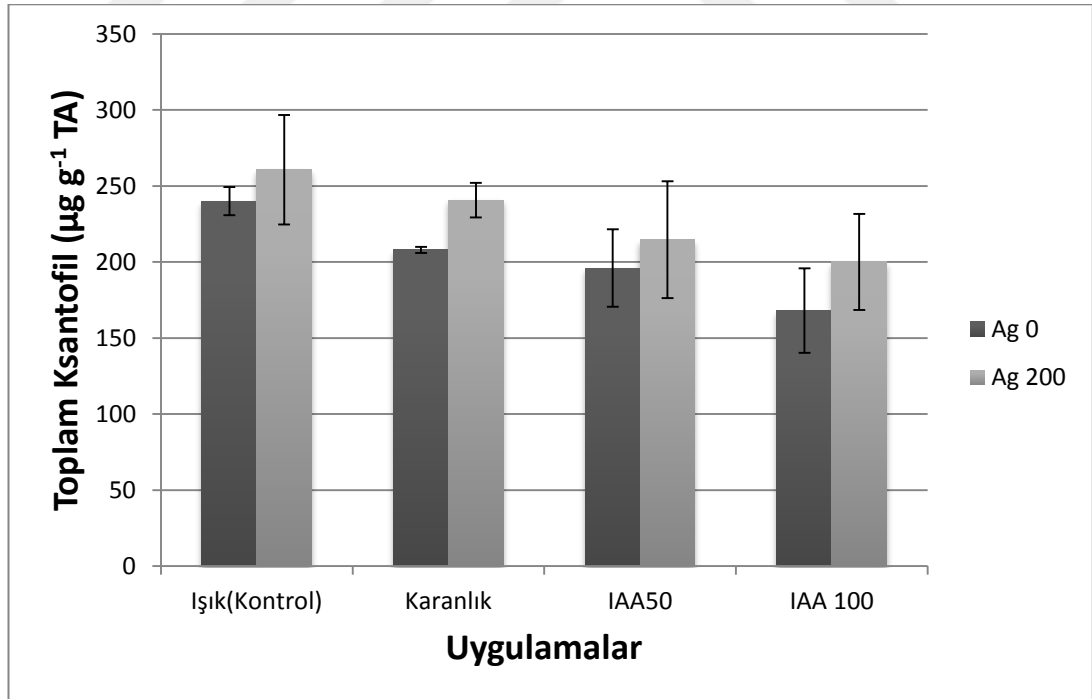
4.4. KAROTENOİD MİKTARLARI

Işıktaki yetiştirilen kontrol bitkileri ile karşılaştırıldığında β -Karoten miktarları senesens uyarıcılar ile azaldığı belirlenmiştir. Karanlık uygulaması ile β -karoten kaybı % 27, 50 ppm IAA uygulamasında % 21 ve 100 ppm IAA uygulamasında % 25 oranında gerçekleşmiştir. Kontrolle karşılaştırıldığında IAA ve karanlık uygulaması yapılan fidelerde β -Karoten miktarı bakımından istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar görülmüştür ($p \leq 0,01$). AgNO₃ uygulamaları tüm gruplarda β -Karoten miktarında artışa neden olurken en önemli artış 50 ppm IAA uygulamasında gözlenmiştir. Bununla birlikte β -Karoten değerleri bakımından AgNO₃ uygulaması yapılan ve yapılmayan gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4.7).

Toplam ksantofil değerleri karanlık ve IAA uygulaması yapılan gruplarda ışıktaki yetiştirilen kontrol gruplarına göre daha düşük bulunmuştur. 100 ppm IAA uygulanan gruplarda buğday bitkilerinin toplam ksantofil kaybı %30 düzeyindedir. AgNO₃ uygulamaları bütün gruplarda toplam ksantofil miktarlarını artırmıştır. Artış oranları karanlıkta ve 100 ppm uygulaması yapılan gruplarda daha fazladır. AgNO₃ uygulamaları ile toplam ksantofil miktarlarında gözlenen artış % 9-16 arasında değişmektedir (şekil 4.8).



Şekil 4.7. Senesensin karanlık, IAA'nın 50 ve 100 ppm 'lik iki farklı konsantrasyonu ile uyarıldığı buğday bitkilerinde $AgNO_3$ uygulamasının β -karoten miktarı üzerindeki etkisi (İstatistikler uyarıcılar anlamsız gümüş $p \leq 0,01^{**}$, uyarıcı x gümüş anlamsız).

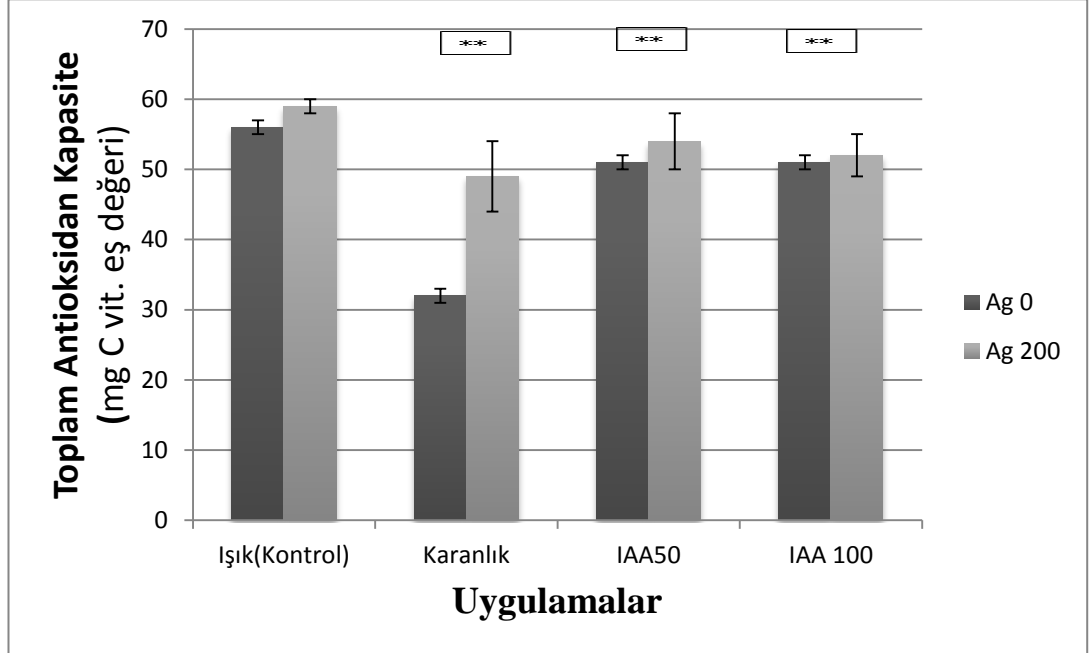


Şekil 4.8. Senesensin karanlık, IAA'nın 50 ve 100 ppm 'lik iki farklı konsantrasyonu ile uyarıldığı buğday bitkilerinde $AgNO_3$ uygulamasının Ksantofil miktarı üzerindeki etkisi. (İstatistikler uyarıcılar, gümüş, uyarıcı x gümüş anlamsız).

4.5 TOPLAM ANTIÖKSİDAN KAPASİTE

Toplam antioksidan kapasite karanlık ile uyarılan senesens koşullarında önemli ölçüde azalmıştır. Karanlıkta bırakılan buğday bitkilerinde toplam antioksidan kapasite ışıktaki yetiştirilen bitkilere göre % 43 oranında daha düşük bulunmuştur. IAA uygulamalarının antioksidan kapasite üzerindeki etkisi daha sınırlıdır. Kontrolle karşılaştırıldığında IAA ve karanlık uygulaması yapılan fidelerde toplam antioksidan kapasite bakımından istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar görülmüştür ($p \leq 0,01$).

AgNO₃ uygulaması kontrol ve IAA uygulaması yapılan gruplarda toplam antioksidan kapasitenin sınırlı bir ölçüde azalmasına sebep olmuştur. Karanlıkta tutulup AgNO₃ uygulaması yapılan fideler antioksidan kapasite uygulama yapılmayan ve karanlıkta bırakılan kontrol bitkilerine göre %53 oranında göstermiştir. (Şekil 4.9). IAA'nın 50 ve 100 ppm'lik iki farklı dozunda birbirleriyle karşılaştırıldığında toplam antioksidan kapasitenin benzer seviyede olduğu görülmüştür.

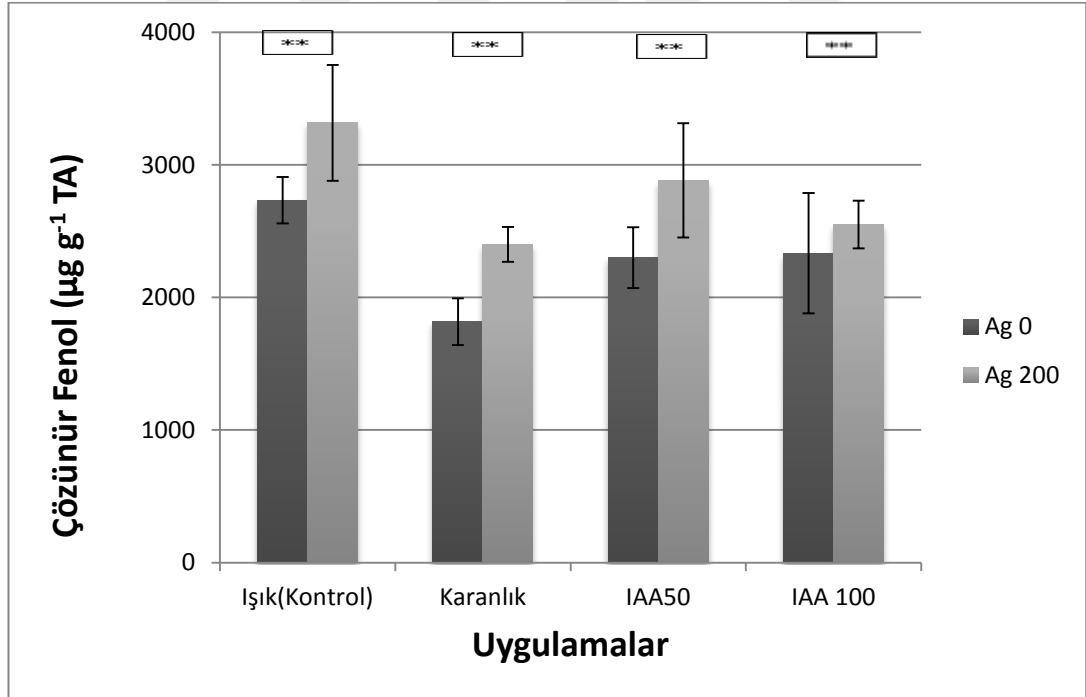


Şekil 4.9. Senesensin karanlık, IAA'nın 50 ve 100 ppm 'lik iki farklı konsantrasyonu ile uyarıldığı bitkilerde AgNO₃ uygulamasının toplam antioksidan kapasite üzerindeki etkisi (İstatistikler uyarıcılar $p \leq 0,01^{**}$, gümüş $p \leq 0,01^{**}$, uyarıcı x gümüş $p \geq 0,05^*$).

4.6 ÇÖZÜNÜR FENOL MİKTARLARI

Buğday bitkilerinde çözünür fenolik madde içeriği karanlık ve IAA uygulamalarında kontrole göre azalma göstermiştir. Azalma karanlık uygulamasında % 34 iken 50 ppm IAA uygulamasında %16 ve 100 ppm IAA uygulamasında % 15 düzeyinde gerçekleşmiştir. Çözünür fenol miktarlarındaki azalma istatistik testlerde anlamlı bir farklılık göstermektedir ($p \leq 0,01$).

Gümüş nitrat uygulamalarının çözünür fenol miktarı üzerinde önemli ölçüde etkili olduğu gözlenmiştir. Işıktaki yetişen kontrol örnekleri ile karanlıkta bırakılan ve IAA uygulanması ile senesense uğrayan bitkilerin tümünde AgNO₃ uygulaması çözünür fenol düzeylerini, uygulama yapılmayanlara göre önemli ölçüde artırmıştır ($p \leq 0,01$). AgNO₃ uygulamalarının çözünür fenol düzeylerini artırıcı etkisi ışıktaki %21, karanlıkta %32, 50 ppm IAA uygulamasında %25 ve 100 ppm IAA uygulamasında %9 oranında gerçekleşmiştir (Şekil 4.10).

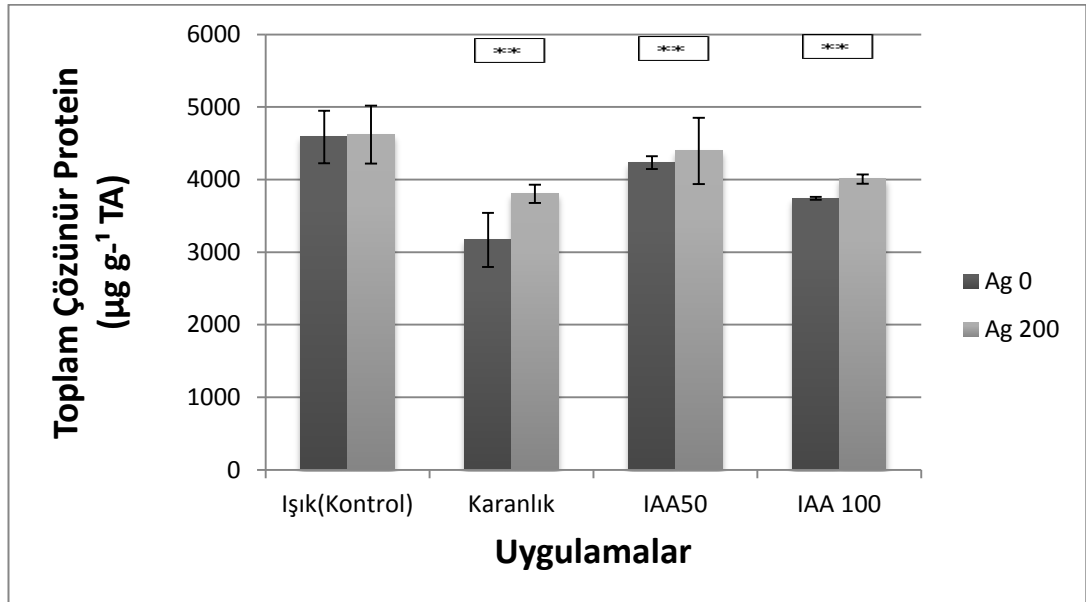


Şekil 4.10. Senesensin karanlık, IAA'nın uygulamaları buğday bitkilerinde AgNO₃ uygulamasının toplam çözünür fenol miktarı üzerindeki etkisi (İstatistikler uyarıcılar $p \leq 0,01$ **, gümüş $p \leq 0,01$ **, uyarıcı x gümüş $p \leq 0,05$ *).

4.7. ÇÖZÜNÜR PROTEİN MİKTARLARI

Buğday bitkilerinin yaprak dokularında toplam çözünür protein miktarları bakımından en önemli değişim karanlık uygulamaları ile gerçekleşmiştir. Karanlık uygulaması altında çözünür protein miktarı ışıkta yetişen bitkilere göre % 45 oranında azalmıştır. Yapraklara IAA uygulandığında çözünür protein düzeyinde azalma görülmüş olup, bu azalmanın IAA konsantrasyonuna bağlı olduğu görülmektedir. 50 ppm IAA uygulaması ile % 8 olarak gerçekleşen azalma 100 ppm IAA uygulaması ile %23 olarak gerçekleşmiştir. Uygulamalar arasında belirlenen farklılıklar istatistik olarak anlamlıdır ($p \leq 0,01$).

AgNO₃ uygulaması ışıkta yetişen kontrol bitkilerinin çözünür protein düzeyini önemli oranda etkilemezken karanlık ve IAA uygulaması yapılan gruplarda çözünür protein düzeylerindeki azalmayı önemli ölçüde geriletmiştir. Çözünür protein düzeyindeki iyileşme en yüksek oranda karanlık uygulanan bitki yapraklarında gözlenmiştir. Karanlıkta tutulan fidelerde gümüş nitrat uygulaması %17 oranında çözünür protein içeriğini artırmıştır (Şekil 4.11). AgNO₃ uygulaması IAA uygulanan fidelerde uygulama yapılmayan bitkilere göre daha az olmak üzere yaprak çözünür protein miktarını artırmıştır.

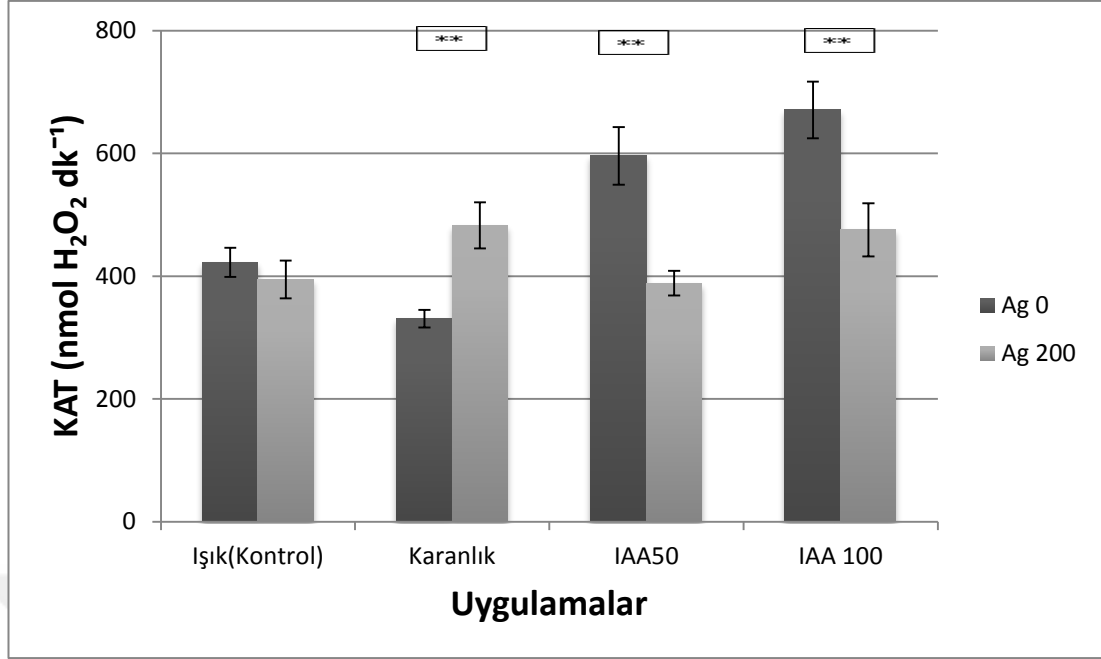


Şekil 4.11. Senesensin karanlık, IAA'nın 50 ve 100 ppm 'lik iki farklı konsantrasyonuyla uyarıldığı buğday bitkilerinde AgNO₃ uygulamasının toplam çözünür protein miktarı üzerindeki etkisi (İstatistikler uyarıcılar $p \leq 0,01^{**}$, gümüş $p \leq 0,01^{**}$, uyarıcı x gümüş $p \geq 0,01^{**}$).

4.8. KATALAZ (KAT) AKTİVİTESİ

KAT aktivitesi değerleri karanlıkta bırakılan bitkilerde kontrole göre önemli ölçüde azalırken, 50 ve 100 ppm IAA uygulamalarında önemli ölçüde artış göstermiştir. KAT enziminin aktivitesinde uygulama grupları arasında gözlenen farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p \leq 0,01$). En önemli değişim 100 ppm IAA uygulamalarında bulunmuştur. Kontrol örneklerinde $422.4 \text{ nmol dk}^{-1}$ olan KAT aktivitesi 100 ppm IAA uygulamasında $670.7 \text{ nmol dk}^{-1}$ ya yükselmiştir.

$AgNO_3$ uygulanması karanlıkta KAT enzim aktivitesini önemli ölçüde artırırken, 50 ve 100 ppm IAA uygulamaları yapılan bitkilerde KAT aktivitesinde belirgin oranlarda azalmaya neden olmuştur. Kontrol, 50 ve 100 ppm IAA uygulanan ve karanlık uygulaması yapılan fidelerde $AgNO_3$ uygulaması yapılmayanlara göre aralarındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p \leq 0,01$). Karanlık uygulanan fidelerle karanlıkla birlikte $AgNO_3$ uygulaması yapılanlar karşılaştırıldığında, KAT aktivitesinde yaklaşık olarak % 20'lik bir artış görülmüştür. $AgNO_3$ uygulanması 50 ppm IAA uygulanan fidelerde yaklaşık olarak % 35'lik bir azalmaya neden olurken, 100 ppm IAA uygulanan fidelerde yaklaşık olarak % 30'luk azalmaya neden olmuştur. Bununla birlikte, en yüksek KAT aktivitesi 100 ppm'lik IAA uygulaması yapılan fidelerde görülmüştür (şekil 4.12.).



Şekil 4.12. Senesensin karanlık, IAA'nın 50 ve 100 ppm 'lık iki farklı konsantrasyonu ile uyarıldığı buğday bitkilerinde AgNO₃ uygulamasının KAT aktivitesi üzerindeki etkisi (İstatistikler uyarıcılar p≤0,01**, gümüş p≤0,01**, uyarıcı x gümüş p≥0,01**).

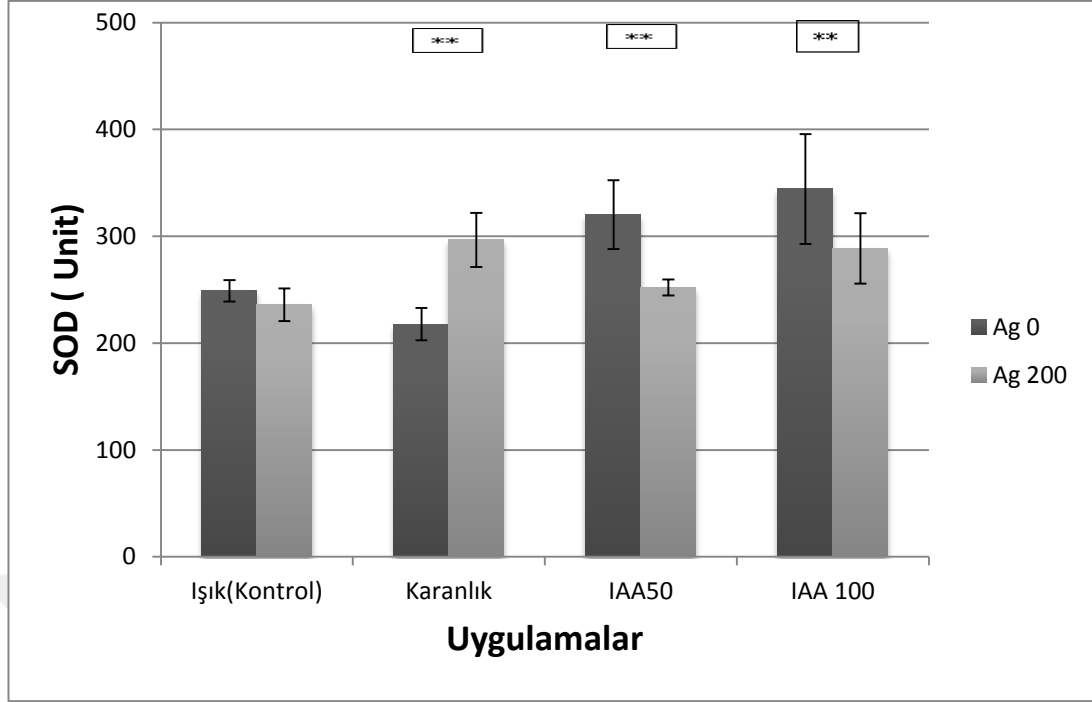
4.9. SÜPEROKSİT DİSMUTAZ (SOD) AKTİVİTESİ

Toplam SOD aktivitesi değerleri karanlıkta bırakılan bitkilerde kontrole göre sınırlı ölçüde azalırken, 50 ve 100 ppm IAA uygulamalarında önemli ölçüde artış göstermiştir. Buğday yapraklarında toplam SOD enziminin aktivitesinde uygulama grupları arasında gözlenen farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p≤0,01). En önemli değişim 100 ppm IAA uygulamalarında bulunmuştur. Kontrol örneklerinde 249 ünite olan toplam SOD aktivitesi 100 ppm IAA uygulamasında 344.2 üniteye yükselmiştir (Şekil 4.13). Cu/Zn SOD değerleri toplam SOD değerleri ile benzerlik gösterecek şekilde karanlıkta azalırken, 50 ve 100 ppm IAA uygulamalarında artış göstermiştir (Şekil 4.14).

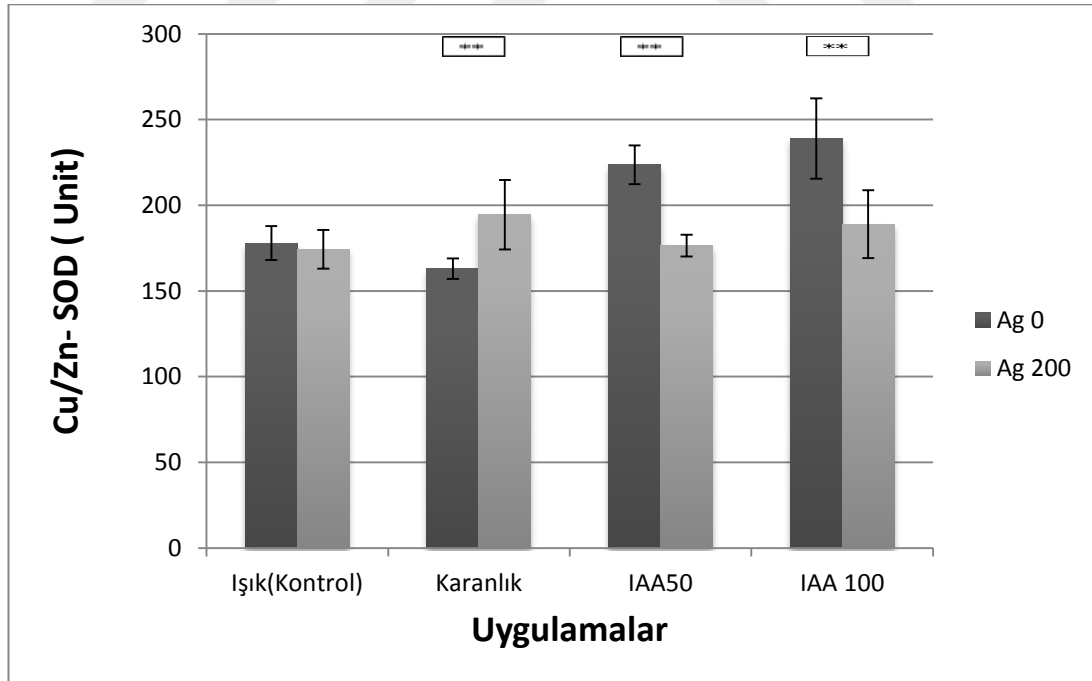
IAA ve karanlıkla erken senesense girmesi için uyarılan *T. aestivum* Gün-91 fidelerinde AgNO₃ uygulanması sonucunda toplam SOD aktivitesi değerleri bakımından AgNO₃ uygulaması yapılanlarla yapılmayanlar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p≤0,05). AgNO₃ uygulanması yapılan

kontrol, 50 ve 100 ppm IAA uygulanan ve karanlık uygulaması yapılan fidelerde AgNO₃ uygulaması yapılmayanlara göre aralarındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p \leq 0,05$). Karanlık uygulanan fidelerle karanlıkla birlikte AgNO₃ uygulaması yapılanlar karşılaştırıldığında SOD aktivitesinde yaklaşık olarak % 30'lık bir artış görülmüştür. AgNO₃ uygulanması 50 ppm IAA uygulanan fidelerde yaklaşık olarak % 22'lik bir azalmaya neden olurken 100 ppm IAA uygulanan fidelerde yaklaşık olarak % 15'lik azalmaya neden olmuştur. Bununla birlikte, en yüksek SOD aktivitesi 100 ppm'lik IAA uygulaması yapılan fidelerde görülmüştür (şekil 4.13).

AgNO₃ uygulaması karanlık uygulanan fidelerde Cu/Zn-SOD aktivitesinde artışa neden olurken IAA uygulanan fidelerde azalmaya neden olmuştur. Ayrıca karanlık ve AgNO₃ uygulaması yapılanlar karşılaştırıldığında, Cu/Zn-SOD aktivitesinde yaklaşık olarak % 12'lik bir artış görülmüştür. AgNO₃ uygulanması 50 ppm IAA uygulanan fidelerde yaklaşık olarak % 22'lik bir azalmaya neden olurken, 100 ppm IAA uygulanan fidelerde yaklaşık olarak % 21'lik azalmaya neden olmuştur. Bununla birlikte, en yüksek SOD aktivitesi 100 ppm'lik IAA uygulaması yapılan fidelerde görülmüştür (şekil 4.14).



Şekil 4.13. Senesensin karanlık, IAA'nın 50 ve 100 ppm 'lik iki farklı konsantrasyonuyla uyarıldığı buğday bitkilerinde AgNO₃ uygulamasının SOD aktivitesi üzerindeki etkisi (İstatistikler uyarıcılar p≤0,05*, gümüş p≤0,01**, uyarıcı x gümüş p≥0,01**).

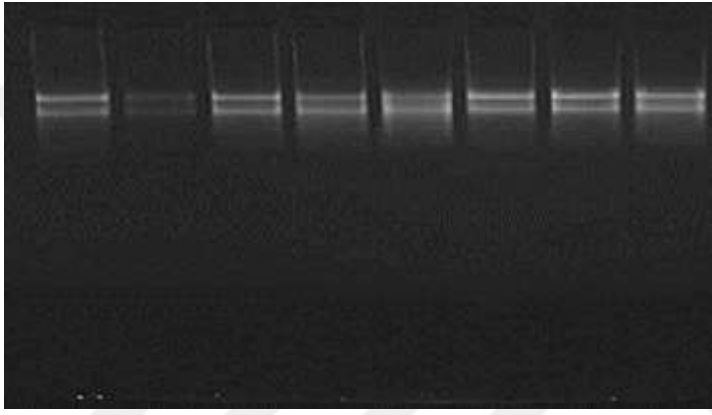


Şekil 4.14. Senesensin karanlık, IAA'nın 50 ve 100 ppm 'lik iki farklı konsantrasyonuyla uyarıldığı buğday bitkilerinde AgNO₃ uygulamasının Cu/Zn-SOD aktivitesi üzerindeki etkisi (İstatistikler uyarıcılar p≤0,01**, gümüş p≤0,01**, uyarıcı x p≥0,01**).

4.10. Cu/Zn-SOD GENİNİN İFADESİ

4.10.1. RNA İzolasyonu, Miktar ve Kalite Tayini

İzole edilen RNA örnekleri % 1.2'lik agarozda yürütülerek (Şekil 4.15), Nanodrop ND 1000 cihazı ile spektrofotometre ölçümleri (Çizelge 4.1) gerçekleştirilmiştir. Elde edilen jel görüntüleri ve spektrofotometrik veriler Real PCR analizlerinde kullanılacak kadar miktar ve saflıkta RNA elde edildiğini göstermektedir.



Şekil 4.15. İzole Edilen Buğdaya ait RNA'ların agaroz jel görüntüsü (% 1.2)

Çizelge 4.1. Buğdaya Ait RNA'ların Spektrofometrik Ölçümleri

RNA No	Örnek	ng/μl	A260	A280	260/280	260/230
1	Kontrol	1151.50	31.363	14.043	2.23	2.39
2	Kontrol + 200 ppm AgNO ₃	900.00	40.100	18.541	2.22	2.36
3	Karanlık	1036.25	25.906	11.608	2.23	2.32
4	Karanlık + 200 ppm AgNO ₃	1411.40	34.038	15.339	2.22	2.11
5	50 ppm IAA	683.64	24.135	10.532	2.22	1.28
6	50 ppm IAA + 200 ppm AgNO ₃	922.63	23.066	10.357	2.23	2.36
7	100 ppm IAA	778.70	24.256	10.884	2.23	1.35
8	100 ppm IAA + 200 ppm AgNO ₃	2624.20	28.386	12.785	2.22	1.99

4.10.2. cDNA Sentezi

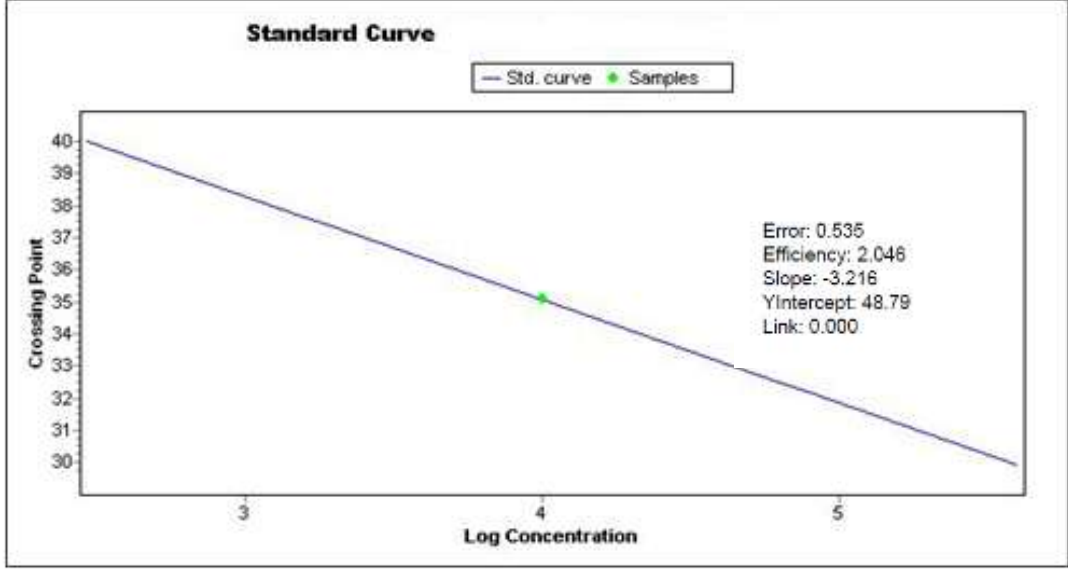
Triticum aestivum (Gün-91) çeşidi örneklerine ait cDNA'ların spektrofometrik ölçümleri sırası ile Çizelge 4.2.'de sunulmuştur. cDNA'ların saflıkları (260/280, 260/230) yeterli bulunurken, miktarları (ng/μl) beklenen oranlarda (yaklaşık 2000ng) elde edilmiştir.

Çizelge 4.2. Buğday örneklerine ait cDNA'ların spektrofometrik ölçümleri

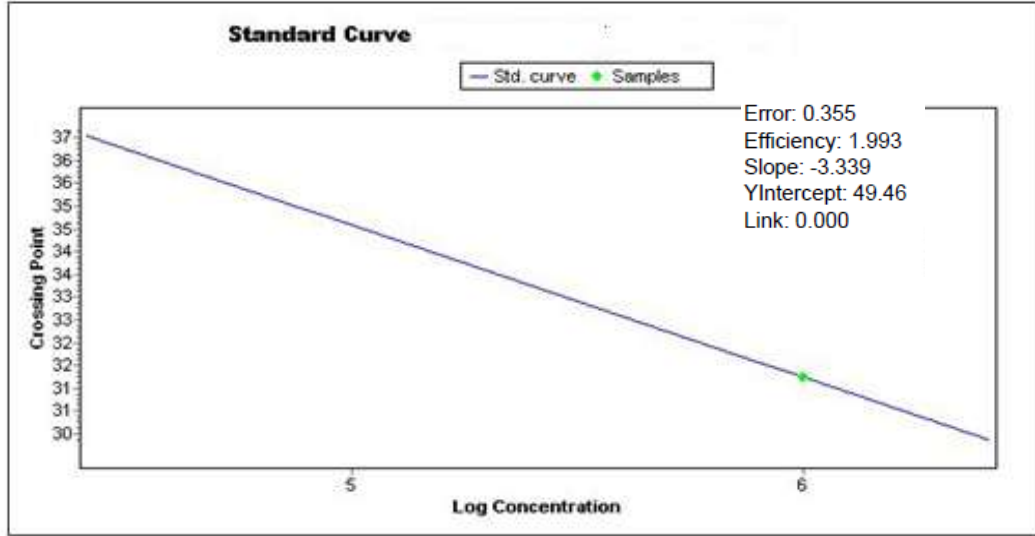
cDNA No	Örnek	ng/μl	A260	A280	260/280	260/230
1	Kontrol	1951.50	31.363	14.043	2.23	2.39
2	Kontrol + 200 ppm AgNO ₃	1900.00	40.100	18.541	2.22	2.36
3	Karanlık	1990.22	37.350	16.584	2.22	2.38
4	Karanlık + 200 ppm AgNO ₃	1988.23	34.252	15.656	2.23	2.12
5	50 ppm IAA	1934.50	22.759	10.166	2.24	2.28
6	50 ppm IAA + 200 ppm AgNO ₃	1921.89	23.047	10.363	2.22	2.36
7	100 ppm IAA	2005.50	26.619	12.022	2.21	2.26
8	100 ppm IAA + 200 ppm AgNO ₃	2024.20	28.386	12.785	2.22	1.99

4.10.3. Standart Eğri

Kullanılan primerlere ait standart eğri grafikleri Şekil 4.16, Şekil 4.17' de verilmiştir. Çizilen standart eğri grafiklerinin etkinlik (efficiency) değerleri yaklaşık 2 ve slope değerleri ise -3.3'e yakın bulunmuştur. İlgili primerler için Real Time PCR reaksiyon koşullarının ve standart eğrilerin uygun olduğu belirlenmiştir.



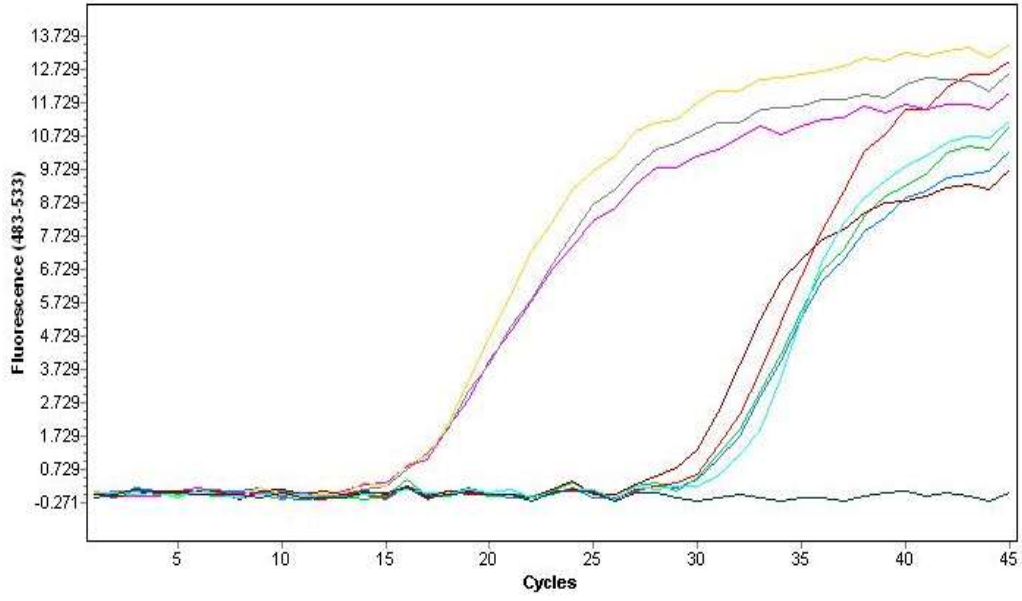
Şekil 4.16. Real Time PCR cihazından alınan GAPDH primerine ait standart eğri grafiği, efficiency ve slope değerleri



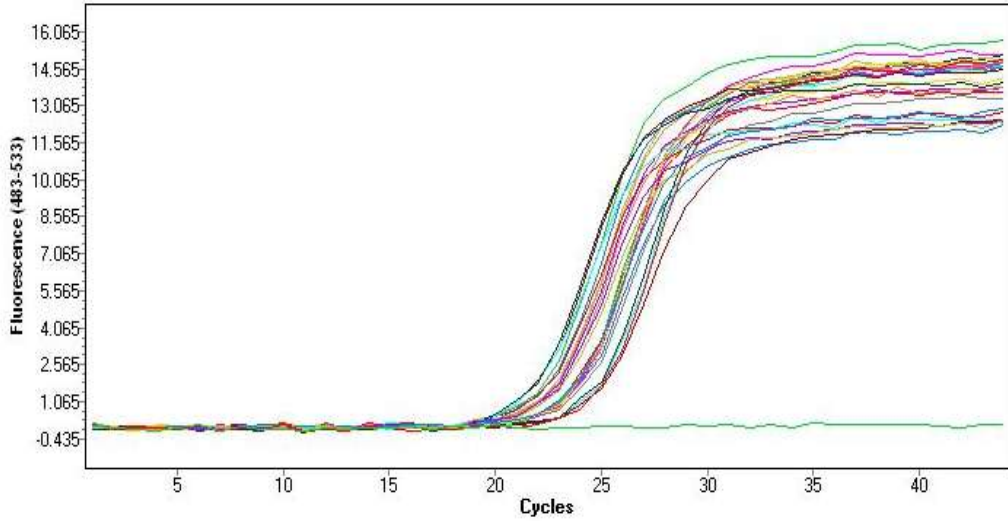
Şekil 4.17. Real Time PCR cihazından alınan Cu/Zn-SOD primerine ait standart eğri grafiği efficiency ve slope değerleri

4.10.4. Gerçek Zamanlı Amplifikasyon Eğrileri

GAPDH, Cu/Zn-SOD primerlerinde standart ve örneklere ait amplifikasyon eğrileri 4.18, Şekil 4.19'da sunulmuştur. Amplifikasyon eğrilerinde Ct değerleri 21-29. döngüler arasında elde edilmiş ve analizlerle bu Ct değerlerinin anlamlı değerler olarak kullanılabileceği belirlenmiştir.



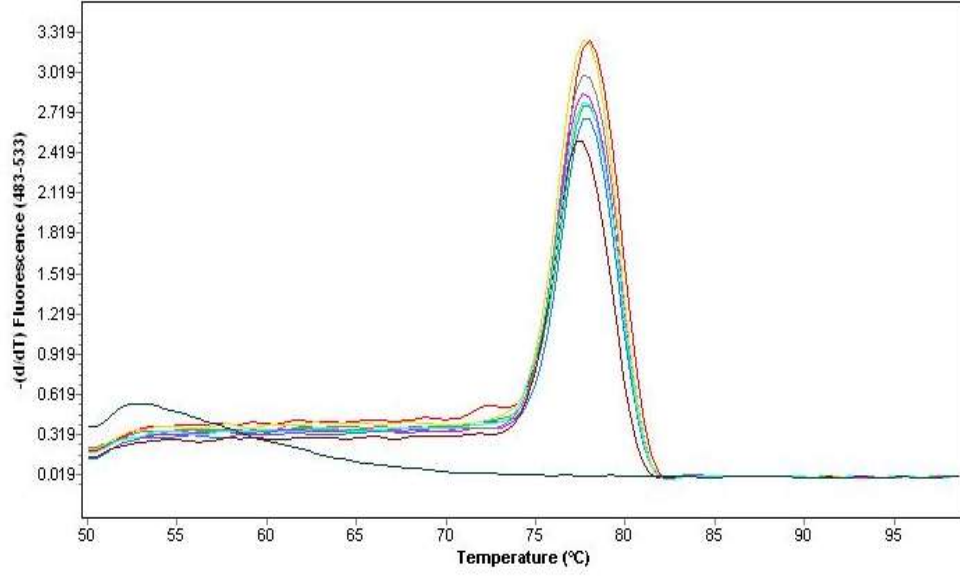
Şekil 4.18. GAPDH primerinde standart ve örneklere ait amplifikasyon eğrileri



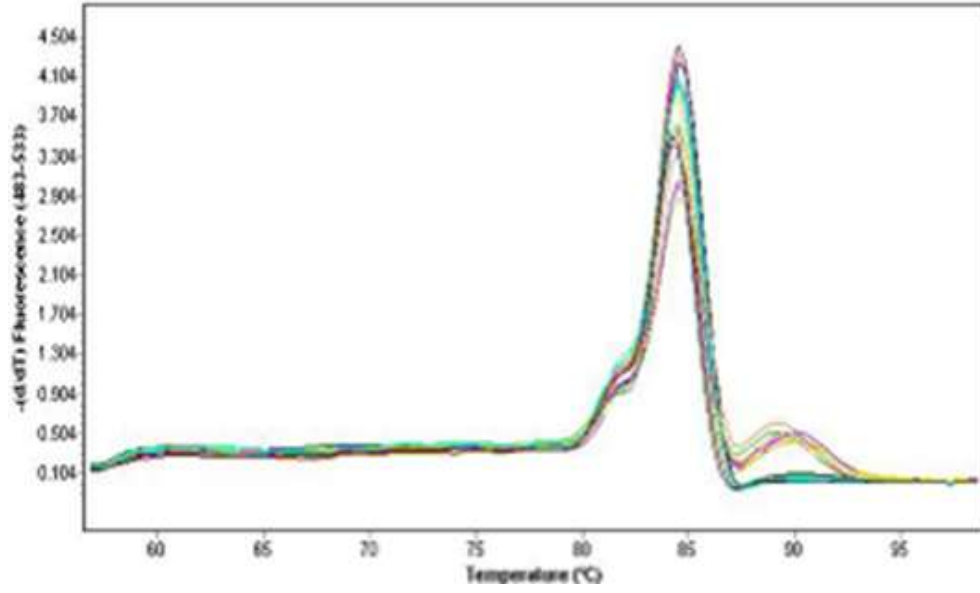
Şekil 4.19. Cu/Zn-SOD primerinde standart ve örneklere ait amplifikasyon eğrileri

4.10.5. Erime Eğrisi (Melting Curve)

Real Time PCR analizlerinde, primerlerde dimer varlığının kontrolü ve özgün olmayan amplifikasyon ürünlerinin tespitinde erime eğrisi (melting curve) analizleri gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.20, 4.21.). Erime eğrisi analizlerinde üst üste çakışan tek pik görüntüleri elde edilmiş ve dimer varlığı saptanmamıştır.



Şekil 4.20. GAPDH primerine ait standart ve örneklerin erime eğrisi grafiği



Şekil 4.21. Cu/Zn-SOD primerine ait standart ve örneklerin erime eğrisi grafiği

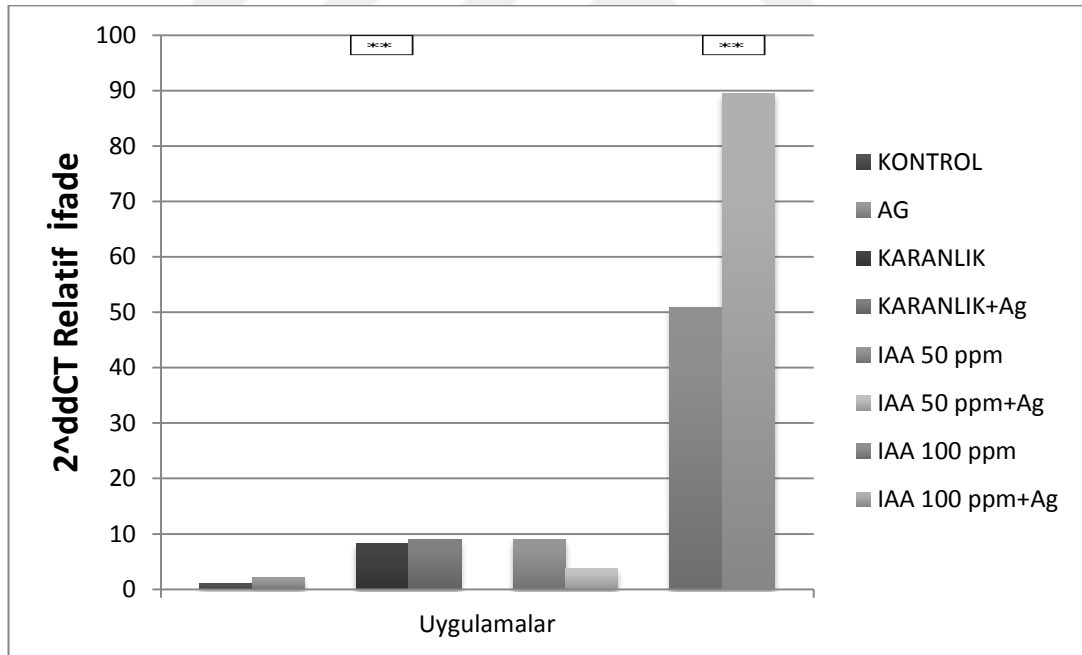
4.10.6. Real Time PCR Normalize Verilerinin Relatif İfade Analizleri

Cu/Zn SOD geninin ifadesi kontrol ile kıyaslandığında $AgNO_3$ uygulaması yapılan fidelerde istatistiksel olarak anlamsız miktarda artış göstermiştir. Ayrıca karanlık uygulaması yapılan fidelerle kıyaslandığında Cu/Zn SOD geninin ifadesi

hem karanlık hem de $AgNO_3$ uygulaması yapılan fidelerde istatistik olarak anlamsız düzeyde artmıştır (Şekil 4.22).

IAA'nın 50 ppm'lik dozu uygulanan fidelerle hem 50 ppm IAA hem de $AgNO_3$ uygulaması yapılan fidelerdeki Cu/Zn SOD geninin ifadesi karşılaştırıldığında $AgNO_3$ uygulaması Cu/Zn SOD geninin ifadesini istatistiksek olarak anlamsız da olsa azaltmaktadır. IAA'nın 100 ppm'lik dozu uygulanan fidelerle hem 100 ppm IAA hem de $AgNO_3$ uygulaması yapılan fidelerdeki Cu/Zn SOD geninin ifadesi karşılaştırıldığında $AgNO_3$ uygulaması Cu/Zn SOD geninin ifadesini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artırmıştır ($p \leq 0,05$) (Şekil 4.22).

Karanlık ve IAA uygulaması Cu/Zn SOD geninin ifadesini kontrol ile karşılaştırıldığında artırmıştır. Cu/Zn SOD geninin en yüksek ifade düzeyine 100 ppm IAA ve 200 ppm $AgNO_3$ 'ün birlikte uygulandığı fidelerde olmuştur (Şekil 4.22).

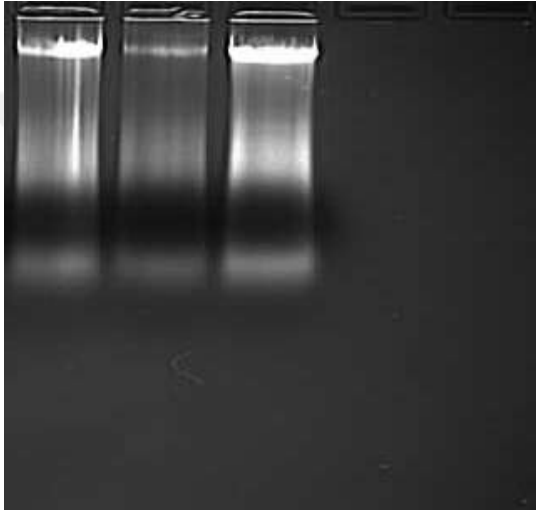


Şekil 4.22. Senesensin karanlık, IAA'nın 50 ve 100 ppm 'lik iki farklı konsantrasyonuyla uyarıldığı buğday bitkilerinde $AgNO_3$ uygulamasının Cu/Zn SOD gen ifadesi üzerindeki etkisi (İstatistikler uyarıcılar $p \leq 0,01^{**}$, gümüş $p \leq 0,01^{**}$, uyarıcı x $p \geq 0,01^{**}$).

4.11. BUĞDAYIN Cu/Zn-SOD VE GAPDH GEN BÖLGELERİNİN DİZİLERİNİN ÇIKARILMASI

4.11.1 DNA İzolasyonu, Miktar ve Kalite Tayini

İzole edilen kontrol DNA örnekleri % 1.2'lik agarozda yürütülerek (Şekil 4.23), Nanodrop ND 1000 cihazı ile spektrofotometre ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen jel görüntüleri ve spektrofometrik veriler sekans analizlerinde kullanılacak kadar miktar ve saflıkta DNA elde edildiğini göstermektedir.



Şekil 4.23 Kontrol örneklerinden izole edilen DNA'ya ait agaroz jel (%1.2) görüntüsü.

4.11.2. Buğdayın Cu/Zn-SOD ve GAPDH Gen Bölgelerinin Dizileri

CAATTCCTTACTTCGATGCGCATATGGTTTCTGGTTTTGGTATTTGGGCCACATACCACCT
ATGAGCAGTATTGATGTGTACTGATCTGATTTTACAGGGAGGAGTCTGAGGGAAACCACA
AGGGCA

GAPDH gen bölgesine ait dizi

CTCGTCGTCGCCGACGCCACCAAGAAGGCAGTCGCGGTGCTCAAGGGCTCCTCCAGGTC
GAGGGCGTCGTCACGCTCACCCAGGAAGACGACGGTCTACGACGGTGAACGTTTCGTATC
ACTGGACTTGCTCCTGGACT

Cu/Zn-SOD gen bölgesine ait dizi

4.2. TARTIŞMA

Yaşlanma zararlı serbest radikallerin birikmesine neden olur ve senesens genel olarak süperoksit, singlet oksijen, hidroksil ve hidrojen peroksit radikallerinin kontrolsüz biçimde artışıyla başlar. Senesens süresince birçok bitkide ROT seviyesi ve onların hasar verdiği ürünler artar, bu değişimler bazı antioksidan enzimlerin aktivitelerinde meydana gelen azalma yüzünden olur. Birçok farklı laboratuvarında elde edilen sonuçlara göre yaprak senesensinin son aşamalarında antioksidan koruma azalır [176]. Bitkilerde senesens süresince ROT'lar oksijen metabolizmasının yan ürünü olarak oluşurlar ve DNA mutasyonu, lipit peroksidasyonu, protein denaturasyonu gibi zararlara sebep olurlar [177, 178]. Antioksidan enzimler ve bileşenler bitki hücrelerinde reaktif oksijen türlerini ortadan kaldırırlar [179]. Ancak, senesens süresince bitkilerde ROT yoğunluğu artar ve bitkiler oksidatif hasara karşı hassas hale gelirler [180]. Işık yoğunluğunun azalması veya karanlık ışığa bağlı genlerin ifadelerinin azalmasına ayrıca fotosentetik proteinlerin ve klorofillerin yıkılmasına yol açar [181]. Karanlık stresi diğer çevresel streslere benzer şekilde bitki hücrelerinde oksidatif hasara neden olan süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil gibi ROT'ların meydana gelmesine neden olur. Karanlık protein kaybıyla birlikte yaprak senesensini artırır [182].

Doğal (indolasetik asit (IAA), indolbütirik asit (IBA)) ve sentetik (2,4-diklorofenoksiasetik asit (2,4-D), 2,4,5-triklorofenoksiasetik asit (2,4,5-T), naftalenasetik asit (NAA)) 2,4-D düşük konsantrasyonda kallus oluşumu ve somatik embriyogenezi uyarmak için kullanılır. Ancak yüksek konsantrasyonda oksinler bitkilerde senesensi uyarır. Oksinlerin etilen biyosentez yolağında yer alan sınırlayıcı bir enzim olan 1- aminosiklopropan-1-karboksilik asit (ACC) sentetaz enzimini kodlayan genin ifadesini artırdığı gösterilmiştir [183]. Gümüş (Ag⁺) iyonlarının birçok fizyolojik sistemde etilen bağlanmasını veya bunu takip eden yanıtlarda etilenin etkisini inhibe ettiği bilinmektedir [184]. Etilen yaprak senesensinin düzenlenmesinde anahtar hormon olarak görülmektedir [185]. Gümüş iyonlarının uygulanması reseptör proteinlerindeki bakır iyonlarının yerini alabilir. Sonuç olarak,

etilenin algılanması engellenir çünkü bakır iyonları etilen bağlanma reseptörleri üzerinde kritik role sahiptir [186]. Gümüş iyonlarının etilen üzerindeki bu etkisi birçok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir [187]. Ouma vd. (2004) [188]'e göre in-vitro koşullarda gümüş nitrat etilen biyosentezini engeller ve pamuk bitkisinde hipokotil bölümünde birden fazla sürgünün yenilenmesi sağlanır.

4.2.1. Fide Boyları

Thirupathi Karuppanapandian vd. (2011) [189] tarafından yapılan çalışmaya göre 8 günlük bakla (*Vigna radiata* L. Wilczek) bitkisinde yaprak senesensi 2,4-D ile uyarılmıştır daha sonra senesens gümüş nitrat (AgNO₃) veya gümüş nanopartikülleri (AgNPs) formundaki gümüş iyonlarının ilavesiyle inhibe edilmiştir. 2,4-D 300 veya 400µM'lık konsantrasyonlarda büyümeyi zayıf oranda azaltmıştır. 400 µM'den yüksek konsantrasyonlarda ise 2,4-D büyümeyi azaltarak senesensi uyarmıştır. Baklada 500 µM'lık 2,4-D uygulaması kontrol ile karşılaştırıldığında taze ağırlıkta ve gövde uzunluğunda azalmaya neden olmuştur. 500µM'lık 2,4-D uygulamasıyla birlikte 100µM 'lık gümüş nitrat uygulaması yapıldığında kontrole yakın uzunlukta fide boyu elde edilmiştir. Doğal ve sentetik oksinlerin artan oranlarda uygulanması hardal (*Brassica juncea*), ve bezelye (*Pisum sativum*) bitkilerinde kök ve gövde boyunun uzamasında azalmaya sebep olur ve klorofil kaybına neden olmuştur [190, 191] .

Seif Sahandi M. vd. (2011) [187] tarafından borage (*Borage officinalis*) bitkisinde yapılan çalışmaya göre 100 ppm'lik gümüş nitrat uygulanması fide boyunda artışa neden olmuştur ancak 100 ppm'den daha yüksek konsantrasyonlarda fide boyunda azalma gözlenmiştir. Gümüş nitrat uygulaması senesensi geciktirerek fide boyunun kontrole göre artmasını sağlamış olabilir. 100 ppm'den daha yüksek gümüş nitrat konsantrasyonu toksik etki göstermiş olabileceğinden fide boyunda azalmaya sebep olmuş olabilir. Çalışmamızda karanlık uygulaması ile senesense girmesi için teşvik edilen fidelerde 200 ppm AgNO₃ uygulaması fide boyunun önemli ölçüde artışına neden olmuştur (Şekil 4.1).

Çalışmamızda senesensi uyarıcı karanlık uygulaması fide boylarında kontrole kıyasla önemli miktarda azalmaya neden olmuştur. Karanlıkla birlikte fotosentez yavaşlamıştır ve senesens hızlanmıştır bu nedenle karanlık uygulaması fide boylarında kontrole göre azalmaya sebep olmuş olabilir. Senesensi teşvik edici olarak yapraklara püskürtülen 50 ve 100 ppm konsantrasyonlarındaki İndol-3 asetik asit (IAA) uygulamaları fide boyunda artışa neden olmuştur (şekil 4.1). Bu artışın sebebi IAA'nın belirli dozun altında senesensi geriletici etki yapıyor olmasından kaynaklanabilir.

Mervat Sh. Sadak, vd. (2013) [192] tarafından bakla bitkisinde yapılan çalışmada IAA solüsyonu yapraklara püskürtme yoluyla uygulanmıştır. IAA uygulaması bakla bitkisinde kontrol ile karşılaştırıldığında fide boyunda artışa neden olmuştur.

4.2.2. Oransal Su İçeriği (OSİ)

Mervat Sh. Sadak, vd. (2013) [192] tarafından yapılan çalışmada IAA uygulaması bakla bitkisinde kontrol ile karşılaştırıldığında fide boyu, yaş ve kuru ağırlığı artırmıştır.

Dagmar Prochazkova vd. (2001) [193] tarafından 80 günlük ve 100 günlük ömürlü 2 farklı mısır çeşidi ile normal çevresel koşullarda yapılan çalışmada oransal su içeriği her iki çeşitte de tepe püskülü çıktıktan sonra azalmıştır ancak oransal su içeriği 100 günlük çeşitte 80 günlük çeşite göre daha yüksek seviyede bulunmuştur. Bunun nedeni senesens ilerledikçe oransal su içeriğinin azalmasından dolayı olabilir ve bu sebeple 100 günlük çeşitte senesens 80 günlük çeşitte göre daha geç başlamış olabilir.

Çalışmamızda en yüksek OSİ değeri ışıkta yetişen ve herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol grubu bitkilerinde ölçülürken, en düşük değer 50 ppm IAA+200 ppm AgNO₃ uygulaması yapılan bitkilerde bulunmuştur (Şekil 4.2)

4.2.3. Klorofil miktarları ve klorofil a/b oranı

Klorofil ve protein kaybı yapraklarda senesensin belirlenmesi için kullanılan önemli biyokimyasal parametrelerdir [194].

Dagmar Prochazkova vd. (2001) [193] tarafından mısır bitkisinde yapılan çalışmada klorofil içeriği başlangıçta artmıştır ancak tepe püskülü çıktıktan 10 gün sonra azalmıştır. Çalışma 100 günlük ve 80 günlük ömre sahip mısır çeşitleri kullanılarak yapılmıştır. Her iki çeşitte de klorofil içeriği tepe püskülü çıktıktan 15 gün sonra azalmaya başlamıştır.

Hongwei Li vd. (2014) [195] tarafından yapılan çalışmada buğdayda (*Triticum aestivum* L.), yaprak senesensi süresince erken yaşlanan ve normal yaşlanan hatlarda toplam klorofil içeriğindeki azalma erken yaşlanan hatlarda normal sürede yaşlanan hatlara göre daha fazla olmuştur. Toplam klorofil miktarı erken yaşlanan hatlarda bayrak yaprak gelişiminden 10 gün sonra azalmaya başlarken normal yaşlanan hatlarda bayrak yaprak gelişiminden 20 gün sonrasına kadar artış göstermiş ancak daha sonra azalmaya başlamıştır.

Thirupathi Karuppanapandian vd. (2011) [189] tarafından yapılan çalışmada 8 günlük bakla (*Vigna radiata* L. Wilczek) bitkisinde yaprak senesensi 2,4-D ile uyarılmıştır daha sonra senesens gümüş nitrat (AgNO₃) veya gümüş nanopartikülleri (AgNPs) formundaki gümüş iyonlarının ilavesiyle inhibe edilmiştir. Çalışmamızda IAA'nın 50 ve 100 ppm'lik konsantrasyonu uygulanan fidelerde AgNO₃ uygulanması klorofil-a miktarında artışa neden olmuştur (şekil 4.3). Baklada 500 µM'lik 2,4-D uygulaması yapılan fideler kontrol ile karşılaştırıldığında klorofil içeriği yaklaşık %50 oranında azalmıştır. 2,4-D uygulaması klorofil içeriğinde azalmaya sebep olmuştur [189]. Doğal ve sentetik oksinlerin artan oranlarda uygulanması hardal (*Brassica juncea*), ve bezelye (*Pisum sativum*) bitkilerinde kök ve gövde boyunun uzamasında azalmaya sebep olmuştur ve ayrıca klorofil kaybına neden olmuştur [190, 191].

Mervat Sh. Sadak vd. (2013) [192] tarafından yapılan çalışmada bakla bitkisine 50 mg/l⁻¹ ve 75 mg/l⁻¹ konsantrasyonunda IAA püskürtme yoluyla uygulanmıştır. Çalışmanın sonuçlarına göre bakla bitkisine uygulanan IAA fotosentetik pigmentler klorofil a, b miktarında kontrole karşılaştırıldığında artışa neden olmuştur. Fotosentetik klorofil a,b pigmentlerindeki bu artış IAA'nın pigment sentezini teşvik etmesinden ve/veya pigment yıkılmasını geciktirmesinden dolayı olabilir [192].

Gören ve Çağ (2007) [196] tarafından yapılan çalışmada 16 günlük ayçiçeği fidelerine 0,01 ve 10µM konsantrasyonundaki IAA solüsyonu yapraklara püskürtülerek uygulanmıştır. Kontrol kotiledonlarıyla karşılaştırıldığında 10µM ve 0,01µM IAA solüsyonları uygulanması klorofil yıkılmasına neden olmuştur. IAA uygulaması ayçiçeği kotiledonlarında klorofil yıkımını artırmıştır. Çalışmamızda Işıktaki yetişen kontrol bitkileri ile karşılaştırıldığında karanlıkta ve IAA uygulamalarında toplam klorofil miktarı önemli ölçüde azalmıştır (şekil 4.6).

Karataş vd. (2010) [194] tarafından yapılan çalışmada karanlıkla uyarılan senesens süresince *Tropaeolum majus* yapraklarında IAA'nın bazı fizyolojik parametreler üzerindeki etkisine bakılmıştır. Işık yoğunluğunun azalması veya karanlık ışığa bağlı genlerin ifadelerinin azalmasına ayrıca fotosentetik proteinlerin ve klorofillerin yok olmasına yol açar [181]. Karanlık uygulaması yapılan yapraklarda klorofil içeriği kontrol ile kıyaslandığında önemli derecede daha azdır. Yüksek konsantrasyonda IAA uygulaması marul yaprak disklerinde klorofil kaybını hızlandırmıştır [197]. Çalışmamızda buğday yapraklarına püskürtülen IAA konsantrasyonu arttıkça klorofil kaybı da artmıştır. Ancak, buğdayda yapılan bir çalışmaya göre hem in vivo hem de in vitro koşullarda IAA uygulaması kloroplasttaki klorofil kaybını önlemiştir [198]. Toplam klorofil içeriği IAA ve karanlık uygulanmasıyla kontrole göre azalmıştır.

Mehrnaz ve Mansour (2014) [182] tarafından yapılan çalışmada *Pelargonium zonale* saksı bitkisinde karanlıkta yetiştirilirken (0, 20, 40, 60, ve 80 mg L⁻¹) konsantrasyonlarında gümüş nanopartikülü uygulaması yapılmıştır. Gümüş

nanopartikülleri uygulamasıyla birlikte klorofil a, b toplam klorofil ve klorofil a/b içeriği artış göstermiştir. Çalışmamızda buğday yapraklarına 200 ppm AgNO₃ püskürtülmesi tüm gruplarda klorofil kaybını geri çevirmiştir. Karanlıkla birlikte AgNO₃ uygulanması yapılan fidelerde klorofil-a miktarı sadece karanlık uygulananlara göre %26 artış göstermiştir (Şekil 4.3). Bununla birlikte, en yüksek klorofil-a miktarı ışıpta tutulup AgNO₃ uygulanan fidelerde görülmüştür (Şekil 4.3). 5 günlük karanlık uygulamasından sonra klorofil a ve b, toplam klorofil ve klorofil a/b miktarında azalma olmuştur. Gümüş nanopartikülünün 80 mg/l ve daha üst konsantrasyonları klorofil a,b, klorofil a/b, toplam klorofil miktarında azalmaya neden olmuştur.

4.2.4. Karotenoid Miktarları

Karotenoidler antioksidan bileşenlerdendir bitki hücrelerinde reaktif oksijen türlerini ortadan kaldırırlar [199]

Dagmar Prochazkova vd. (2001) [193] tarafından mısır bitkisinde yapılan çalışmada karotenoid içeriği tepe püskülü çıktıktan 30 gün sonrasına kadar artarken daha sonra azalmaya başlamıştır.

Mervat Sh. Sadak vd. (2013) [192] tarafından yapılan çalışmada bakla bitkisine IAA solüsyonu yapraklara püskürtme yoluyla uygulanmıştır. Uygulama sonrasında karotenoidlerin miktarlarında artış görülmüştür.

İlhami Karataş vd. (2010) [194] tarafından yapılan çalışmada karanlıkla uyarılan senesens süresince *Tropaeolum majus* yapraklarında IAA uygulanması karotenoidlerin kaybını hızlandırmıştır. Çalışmamızda β-Karoten kaybı kontrolle kıyaslandığında 50 ppm IAA uygulamasında % 21 ve 100 ppm IAA uygulamasında % 25 oranında gerçekleşmiştir. (Şekil 4.7). Karanlık uygulaması yapılan yapraklarda karotenoid içeriği kontrol ile kıyaslandığında önemli derecede azalmıştır. Karanlık uygulaması ile β-Karoten kaybı kontrol ile kıyaslandığında % 27 oranındadır (Şekil 4.7).

Mehrnaz ve Mansour (2014) [182] tarafından yapılan çalışmaya göre karanlıkta tutulan *Pelargonium zonale* yapraklarına (0, 20, 40, 60, and 80 mg L⁻¹) konsantrasyonlarında gümüş nanopartikülü uygulaması yapılmıştır. Gümüş nanopartiküllerinin uygulanmasıyla karotenoid miktarı artmıştır. Gümüş nanopartikülünün 80 mg/l⁻¹ ve daha üst konsantrasyonları karotenoid miktarında azalmaya neden olmuştur. Bu azalma gümüş nanopartiküllerinin 80 mg/l⁻¹ ve daha fazla konsantrasyonlarda toksik etki yapmasından dolayı olmuş olabilir. Çalışmamızda AgNO₃ uygulamaları tüm gruplarda β-Karoten miktarında artışa neden olmuştur. (Şekil 4.7).

4.2.5. Toplam Antioksidan Kapasite

Toplam antioksidan kapasite bitki örneklerindeki serbest radikallerin ortadan kaldırılabilmesi için var olan tüm antioksidanları ifade etmek için kullanılır. Toplam antioksidan kapasite antioksidan kapasiteye katkı sağlayan küçük farklı moleküller (askorbat, glutatyon, fenolikler vs) ifade eder [200].

Çalışmamızda toplam antioksidan kapasite karanlık ile uyarılan senesens koşullarında önemli ölçüde azalmıştır. AgNO₃ uygulaması kontrol ve IAA uygulaması yapılan gruplarda toplam antioksidan kapasitenin sınırlı bir ölçüde azalmasına sebep olmuştur. Karanlıkta tutulup AgNO₃ uygulaması yapılan fidelerde antioksidan kapasite karanlıkta tutulan kontrol bitkilerine göre %53 gibi önemli bir artış göstermiştir (Şekil 4. 9).

4.2.6. Çözünür Fenol Miktarları

Fenoller bitkisel dokuları oksidatif hasara karşı koruyan antioksidanlardır ve fenoller senesens süresince antioksidan özelliğe sahiptir [201].

Seif Sahandi M vd. (2001) [202] tarafından yapılan çalışmada *Borage officinalis* bitkisinde gümüş nitrat uygulaması (100, 200 ve 300 ppm) dozlarında % 0,1'lik tween 20 ile birlikte püskürtme şeklinde yapılmıştır. Gümüş nitratın uygulama dozu arttıkça polifenol seviyesinde artış görülmüştür. Çalışmamızda gümüş nitrat uygulamalarının çözünür fenol miktarı üzerinde önemli ölçüde etkili

olduğu gözlenmiştir, Işıktaki yetişen kontrol örnekleri ile karanlıkta bırakılan ve IAA uygulaması ile senesense uğrayan bitkilerin tümünde AgNO₃ uygulaması çözünür fenol düzeylerini önemli ölçüde artırmıştır. AgNO₃ uygulamalarının çözünür fenol düzeylerini artırıcı etkisi ışıktaki %21, karanlıkta %32, 50 ppm IAA uygulamasında %25 ve 100 ppm IAA uygulamasında %9 oranında gerçekleşmiştir (şekil 4.10).

Mervat Sh. Sadak vd. (2013) [192] tarafından yapılan çalışmada 50 mg/l⁻¹ ve 75 mg/l⁻¹ konsantrasyonlarında IAA uygulaması yapraklara püskürtülerek yapılmıştır. IAA uygulaması kontrole göre toplam fenolik bileşiklerin miktarında artışa neden olmuştur.

Renuka Desai vd. (2012) [203] *Ranunculus asiaticus* L. çiçeğinde total fenol içeriği başlangıçta çiçek açtığı anda artmıştır ancak sonra senesens süresince azalmıştır [204]. “Raktangha” güllerinde toplam fenol içeriği çiçek senesens süresince azalma eğilimindedir [205]. Fenolik konsantrasyondaki bu azalma çiçek gelişiminin daha sonraki aşamalarında antioksidan savunma sisteminin peroksidaz, fenolikler ve askorbik asitin rollerini sınırlayabilir ve çiçek oksidatif strese karşı daha hassas hale gelir [206].

Çalışmamızda buğday bitkilerinde çözünür fenolik madde içeriği karanlık ve IAA uygulamalarında kontrole göre azalma göstermiştir. Azalma karanlık uygulamasında % 34 iken 50 ppm IAA uygulamasında %16 ve 100 ppm IAA uygulamasında %15 düzeyinde gerçekleşmiştir.

4.2.7 Çözünür Protein Miktarları

Yaprak senesens total protein içeriğinin azalmasıyla karakterize edilir. Senesens süresince birçok protein degrades olurken bazıları da bozulmadan kalır. Bitkilerde senesens süresince ROT'lar oksijen metabolizmasının yan ürünü olarak oluşurlar ve DNA mutasyonu, lipid peroksidasyonu, protein denaturasyonu gibi yıkılmalara sebep olurlar [177, 178].

Hongwei Li vd. (2014) [195] tarafından buğday bitkilerinde yapılan çalışmadan elde edilen sonuçlara göre erken yaşlanan hatlarda normal yaşlanan hatlara göre çözümlü protein miktarındaki azalma daha hızlı şekilde gerçekleşmiştir. Yani senesensin hızlanması çözümlü protein miktarındaki azalma hızını da artırmıştır.

Gören ve Çağ (2007) [196] tarafından yapılan çalışmada 16 günlük ayçiçeği fidelerine 0,01 ve 10µM IAA solüsyonu kotiledonlara püskürtülerek uygulanmıştır. 10µM'lık IAA uygulamasıyla çözümlü protein içeriği kontrolle karşılaştırıldığında %12 oranında azalmıştır.

Karataş vd. (2010) [194] tarafından yapılan çalışmada senesens süresince hem karanlık hem de IAA uygulaması yapılan *Tropaeolum majus* yapraklarında protein içeriği azalmıştır. Protein kaybı yapraklarda senesensin belirlenmesi için kullanılan önemli biyokimyasal parametrelerdir [194]. Oksin proteaz inhibitörlerini uyararak senesens süresince protein kaybını yavaşlatır. Oksinler senesens süresince proteaz inhibitör genlerinin ifadelerini artırır[194]. Çalışmamızda buğday bitkilerinin yaprak dokularında toplam çözümlü protein miktarları bakımından en önemli değişim karanlık uygulamaları ile gerçekleşmiştir. Karanlık uygulaması altında çözümlü protein miktarı ışıkta yetişen bitkilere göre % 45 oranında azalmıştır. Yapraklara IAA püskürtülmesi durumunda çözümlü protein düzeyinde azalma görülmüş olup, bu azalmanın IAA dozuna bağlı olduğu görülmüştür. 50 ppm IAA uygulaması ile % 8 olarak gerçekleşen azalma 100 ppm IAA uygulaması ile %23 olarak gerçekleşmiştir (Şekil 4.11). IAA uygulamalarının çözümlü protein miktarını artırması ya da azaltması uygulanan konsantrasyonla ilişkili olabilir. Yüksek konsantrasyonlarda uygulanan IAA çözümlü protein miktarında azalmaya neden olurken normal konsantrasyonlarda uygulanan IAA senesens süresince protein kaybını azaltabilir.

Yaprak senesensi total protein içeriğinin azalmasıyla karakterize edilir. Gümüş iyonlarının uygulanması reseptör proteinlerindeki bakır iyonlarının yerini alabilir. Sonuç olarak, etilenin algılanması engellenir ve etkisi azalmış olur çünkü bakır iyonları etilen bağlanma reseptörleri üzerinde kritik role sahiptir [202]. Etilen

hormonu senesens sürecinin yürütülmesinde anahtar hormondur ve etkinliğinin azalmasıyla senesens yavaşlayabilir. Çalışmamızda AgNO₃ uygulaması ışıkta yetişen kontrol bitkilerinin çözümlü protein düzeyini önemli oranda etkilemezken karanlık ve IAA uygulaması yapılan gruplarda çözümlü protein düzeylerindeki azalmayı önemli ölçüde geri çevirmiştir. Karanlıkta tutulan fidelerde gümüş nitrat uygulaması %17 oranında çözümlü protein içeriğini artırmıştır (şekil 4.11). AgNO₃ uygulaması IAA uygulanan fidelerde daha düşük düzeyde olmak üzere yaprak çözümlü protein miktarını artırmıştır.

4.2.8 Katalaz (KAT) Aktivitesi

Katalaz enzimi H₂O₂'yi oksijen (O₂) ve suya (H₂O) çeviren hem içeren tetramerik bir enzimdir. Bütün enzimler içinde en yüksek devir hızına sahiptir [207].

Farklı bitki türlerinde yapılan çalışmalara göre; KAT enzimi aktivitesi salatalık ve fasulye kotiledonlarında senesensin başlangıcından itibaren devamlı olarak azalmıştır [47]. KAT aktivitesi mısır ve soya fasulyesi yapraklarında senesensin başlangıcında artmış ancak daha sonra azalmıştır [208].

Dagmar Prochazkova vd. (2001) [193] tarafından mısır bitkisinde yapılan çalışmada KAT enziminin aktivitesi tepe püskülü çıktıktan 25 gün sonrasına kadar artmıştır ancak daha sonra azalmıştır. Senesensin başlangıcında KAT aktivitesi artmıştır ancak senesensin ilerlemesiyle KAT enzimi aktivitesinde azalma olmuştur.

Hongwei Li vd. (2014) [195] tarafından buğday (*Triticum aestivum* L.) bitkisinde yapılan çalışmada KAT enziminin aktivitesi erken yaşlanan hatlarda normal yaşlanan hatlara göre çeşitli zaman aralıklarında yapılan örneklemelerde daha düşük bulunmuştur. Senesens süresince KAT aktivitesi erken yaşlanan hatlarda bayrak yaprak gelişiminden 11. güne kadar artmış ancak daha sonra önemli düzeyde azalmıştır, ancak normal yaşlanan hatlarda bayrak yaprak gelişiminin 18. güne kadar artmış ve 18. günden sonra düşük miktarda azalmıştır.

Thirupathi Karuppanapandian vd. (2011) [189] tarafından bakla (*Vigna radiata* L. Wilczek) bitkisinde yapılan çalışmada 8 günlük bakla (*Vigna radiata* L.

Wilczek) bitkisinde yaprak senesensi 2,4-D ile uyarılmıştır daha sonra senesens gümüş nitrat ($AgNO_3$) ve ya gümüş nanopartikülleri (AgNPs) formundaki gümüş iyonlarının ilavesiyle inhibe edilmiştir. 2,4-D ile uyarılan yaprak senesensinde katalaz enzimi aktivitesi azalmıştır. 2,4-D uygulanması KAT, SOD gibi birçok antioksidan enzimin aktivitesini düzenler [15, 16]. KAT enzimi hidrojen peroksit radikaline karşı hassastır aktivitesinin azalmasıyla hücrede hidrojen peroksit seviyesi artmıştır. 2,4-D ile birlikte gümüş nitrat uygulaması KAT enzimi aktivitesi artmıştır.

Lamiaa F. El-Gaied vd. (2013) [209] tarafından yapılan çalışmada IAA uygulanan domates fidelerinde kontrol ile karşılaştırıldığında protein içeriği ve katalaz aktivitesi artmıştır. Oksin uygulanması buğdaylarda büyüme düzenleyici olduğundan katalaz enzimi aktivitesini ve katalaz transkriptlerinin aktivitesini artırmıştır. Çalışmamızda KAT enzimi aktivitesi 50 ve 100 ppm IAA uygulamalarında önemli ölçüde artış göstermiştir (Şekil 4.12). Acak bu artış IAA'nın uygulama dozuna bağlı olarak değişebilir yüksek konsantrasyondaki IAA senesensi uyararak KAT enzimi aktivitesinde azalmaya neden olabilirken optimum konsantrasyonlarda IAA uygulaması senesensin azalmasına neden olarak KAT aktivitesinde artışa neden olabilir.

İlhami Karataş vd. (2010) [194] tarafından yapılan çalışmada karanlıkla uyarılan senesens süresince *Tropaeolum majus* yapraklarında IAA uygulanması KAT enziminin aktivitesinde azalmaya neden olmuştur.

Mehrnaz ve Mansour (2014) [182] tarafından yapılan çalışmada karanlıkta tutulan *Pelargonium zonale* yapraklarına gümüş nanopartikülü uygulaması yapılmıştır. KAT aktivitesi 20 ve 40 mg/l^{-1} konsantrasyonundaki gümüş nanopartikülü uygulamalarında artarken daha yüksek gümüş nanopartikülü uygulamalarında azalmıştır. Çalışmamızda karanlık uygulanan fidelerle karanlıkla birlikte $AgNO_3$ uygulaması yapılanlar karşılaştırıldığında gümüş nitrat uygulaması KAT aktivitesinde yaklaşık olarak % 20'lik bir artış görülmüştür (Şekil 4.12). KAT aktivitesindeki artış gümüş nitratın etilen etkisini azaltarak bitkilerin senesense girmesini yavaşlatmasından dolayı olabilir. 200 ppm konsantrasyonunda $AgNO_3$

uygulanması, 50 ve 100 ppm IAA uygulamaları yapılan bitkilerde KAT aktivitesinde ciddi oranlarda azalmaya neden olmuştur (Şekil 4.12). KAT aktivitesindeki bu azalmanın nedeni $AgNO_3$ 'ün 200 ppm'lik dozunun enzim aktivitesini inhibe etmesi olabilir.

Bitkilerde karanlıkla uyarılan senesens hidrojen peroksit birikimi artar. Çalışmamızda KAT aktivitesi değerleri karanlıkta bırakılan bitkilerde kontrole göre önemli ölçüde azalmıştır. SOD ve KAT aktivitelerinde meydana gelen artışla oksidatif hasarın üstesinden gelinir [182]. Lei vd. (2008)'e [210] göre ıspanak yapraklarında gümüş nanopartiküllerinin uygulanmasıyla kloroplastlarda APX (askorbat peroksidaz), SOD, POD (Guaiacol peroxidase) ve KAT aktivitesi artar ve oksidatif hasar azalır. SOD ve KAT aktivitelerindeki azalma ile birlikte hücrede ROT konsantrasyonu artar böylece lipid peroksidasyonu, senesens ve hücre ölümü artar [211].

4.2.9 Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi

Bir metaloenzim olan SOD; reaktif oksijen türlerinin meydana getirdiği oksidatif stresle başa çıkmak için hücrelerde bulunan hücre içi enzimatik antioksidandır. Süperoksit ($O_2^{\cdot-}$) radikalini H_2O_2 'ye indirger ve $O_2^{\cdot-}$ ortadan kaldırıldığı için Haber-Weiss reaksiyonu yoluyla $\cdot OH$ radikalinin oluşma riskini azaltır. SOD enzimi ROT seviyesini azaltarak toksik etkilerine karşı ilk savunma hattını oluşturur [212, 213].

Farklı bitkilerde yapılan bazı çalışmalara göre toplam SOD aktivitesi tütün bitkisi yapraklarında Dertinger vd. (2003)'e [214] göre senesensin başlangıcında artmış daha sonra senesensin ilerlemesiyle azalmıştır, mısır bitkisi yapraklarında Procházková vd. (2001)'e [193] göre SOD aktivitesi başlangıçta artmış ancak daha sonra azalmıştır, buğday bitkisi yapraklarında Srivalli and Khanna-Chopra (2001)'e [215] göre SOD enzimi aktivitesi devamlı olarak azalış göstermiştir.

Cu/Zn SOD aktivitesi fasulye bitkisi kotiledonlarında Procházková ve Wilhelmová (2007)'ya [176] göre senesensin başlangıcında artmış ancak daha sonra

senesensin ilerlemesiyle azalmıştır. MnSOD aktivitesi fasulye bitkisi kotiledonlarında senesensin başlangıcında artmış daha sonra azalmıştır. MnSOD aktivitesi bezelye yapraklarında Jimenéz vd. (1998)'e [216] göre senesensin başlangıcından itibaren devamlı olarak azalmıştır.

Romero-Puertas vd. (2004) [178] tarafından yapılan çalışmada 2,4-D'nin bezelye (*Pisum sativum* L.) bitkisi üzerindeki etkileri rapor edilmiştir. Bitkilerde 2,4-D uygulaması süperoksit ve hidrojen peroksit radikallerinin artmasına sebep olmuştur ve bu da proteinlerin yıkılmasına yol açarak oksidatif stresin meydana gelmesine yol açmıştır. Püskürtme ile 2,4-D uygulanan bezelye yapraklarında SOD enzimi aktivitesi önemli düzeyde artmıştır.

Hongwei Li vd. (2014) [195] tarafından buğday (*Triticum aestivum* L.) bitkisinde yapılan çalışmada SOD ve KAT enzimlerinin aktiviteleri erken yaşlanan hatlarda normal yaşlanan hatlara göre çeşitli zaman aralıklarında yapılan örneklemelelerde daha düşük bulunmuştur. Erken yaşlanan hatlarda senesens etkileri normal yaşlanan hatlara göre daha erken ortaya çıkmıştır bu nedenle SOD aktivitesi erken yaşlanan hatlarda normal yaşlanan hatlara göre daha düşük olmuş olabilir.

Thirupathi Karuppanapandian vd. (2011) [189] tarafından yapılan çalışmada 8 günlük bakla (*Vigna radiata* L. Wilczek) bitkisinde yaprak senesensi 2,4-D ile uyarılmıştır daha sonra senesens AgNO₃ veya gümüş AgNPs formundaki gümüş iyonlarının ilavesiyle inhibe edilmiştir. 2,4-D uygulanması KAT, SOD gibi birçok antioksidan enzimin aktivitesini düzenler [190, 191]. 2,4-D uygulanması SOD enziminin aktivitesini kontrol ile karşılaştırıldığında artırmıştır. Çalışmamızda toplam SOD aktivitesi değerleri karanlıkta bırakılan bitkilerde kontrole göre sınırlı ölçüde azalırken, 50 ve 100 ppm IAA uygulamalarında önemli ölçüde artış göstermiştir (Şekil 4.13). Cu/Zn SOD değerler toplam SOD değerleri ile benzerlik gösterecek şekilde karanlıkta azalırken, 50 ve 100 ppm IAA uygulamalarında artış göstermiştir (şekil 4.14). Belirli doza kadar IAA uygulaması bitkilerde senesensi geciktirici etki yapmaktadır. IAA uygulaması ile birlikte SOD aktivitesinin artması IAA uygulamasının senesensi geciktirici etkisinden kaynaklanmış olabilir. 2,4-D ile

birlikte gümüş nitrat uygulaması ile SOD enzimi aktivitesi azalırken KAT enzimi aktivitesi artmıştır.

Mehrnaz ve Mansour (2014) [182] tarafından yapılan çalışmada karanlıktatutulan *Pelargonium zonale* gümüş nanopartikülü uygulaması yapılmıştır. SOD enzimi aktivitesi 60 mg/L⁻¹'ye kadarki gümüş nanopartikülü konsantrasyonlarında artış göstermiştir. Ancak daha yüksek konsantrasyonlarda azalmaya başlamıştır. Çalışmamızda karanlık uygulanan fidelerle karanlıkla birlikte AgNO₃ uygulaması yapılanlar karşılaştırıldığında SOD aktivitesinde yaklaşık olarak % 30'lık bir artış görülmüştür (şekil 4.13). Bu artışın sebebi AgNO₃ 'ün karanlıkla uyarılan senesensin etkilerini geciktirmesi olabilir. AgNO₃ uygulanması 50 ppm IAA uygulanan fidelerde SOD aktivitesinde yaklaşık olarak % 22'lik bir azalmaya neden olurken 100 ppm IAA uygulanan fidelerde yaklaşık olarak % 15'lik azalmaya neden olmuştur. (şekil 4.13). AgNO₃ uygulamasıyla birlikte SOD aktivitesinde ortaya çıkan bu azalmanın nedeni 200 ppm konsantrasyonunda uygulanan AgNO₃'ün toksik etki yapmasından dolayı olabilir. AgNO₃ uygulaması karanlık uygulanan fidelerde Cu/Zn-SOD aktivitesinde artışa neden olurken IAA uygulanan fidelerde azalmaya neden olmuştur (şekil 4.14.). Cu/Zn-SOD aktivitesinde ortaya çıkan bu azalma 200 ppm AgNO₃'ün Cu/Zn-SOD üzerindeki inhibitör etkisinden kaynaklanmış olabilir.

4.2.10 Cu/Zn-SOD Transkriptine Ait Gen İfadesi

Casano vd. (1994) [217] tarafından yapılan çalışmada Barley (*Hordeum vulgare* L.) bitkisinin genç ve yaşlanan yaprakları karanlık, ışık ve fotooksidatif stres koşullarında bekletilerek mitokondriyal Mn-SOD, kloroplastik FeSOD ve sitoplazmik Cu/Zn SOD enzimlerinin transkript seviyesi ve aktiviteleri belirlenmiştir. Karanlıkta 6 saatlik inkübasyondan sonra SOD'ların mRNA transkript seviyesi düşmüştür. Karanlıkta 20 saatlik inkübasyondan sonra SOD transkriptlerinin ifadesi hem yaşlı hem de genç yapraklarda azalmıştır.

Romero-Puertas vd. (2014) [178] tarafından yapılan çalışmada 2,4-D bezelye (*Pisum sativum* L.) bitkisinde büyüme ve ROT metabolizması üzerindeki etkileri rapor edilmiştir. 2,4-D özellikle ksantin oksidaz ve süperoksit dismutaz aktivitelerini ve transkript düzeylerini etkiler. 2,4-D uygulaması ile birlikte Mn-SOD

transkript düzeyi artarken Cu/Zn-SOD transkript düzeyi azalmıştır. Çalışmamızda IAA'nın 100 ppm'lik dozu uygulanan fidelerle hem 100 ppm IAA hem de AgNO₃ uygulaması yapılan fidelerdeki Cu/Zn SOD geninin ifadesi karşılaştırıldığında AgNO₃ uygulaması Cu/Zn SOD geninin ifadesini artırmıştır. Ayrıca IAA uygulamasıyla birlikte de Cu/Zn SOD geninin ifadesinde artış görülmüştür (Şekil 4.22). IAA ve AgNO₃'ın belli dozda uygulanması bitkilerde senesensi geciktirici etki yapabileceğinden dolayı antioksidan kapasitede artış meydana gelmiş olabilir ve bu nedenle Cu/Zn SOD geninin ifadesi artmış olabilir.

Hongwei Li vd. (2014) [195] tarafından buğdayda (*Triticum aestivum* L.) bitkisi kullanılarak yapılan çalışmada Cu/ZnSOD gen ifadesi bayrak yaprak gelişiminden hemen sonra erken ve geç yaşlanan hatlarda aynı seviyededir, bayrak yaprak gelişiminden 11 gün sonra Cu/ZnSOD geninin ifadesi erken yaşlanan hatlarda normal yaşlanan hatlara göre yaklaşık %50 daha azdır. Cu/ZnSOD geninin ifadesi bayrak yaprak gelişiminden 11, 18 ve 24 gün sonra erken yaşlanan hatlarda normal yaşlanan hatlara göre daha düşüktür. Erken yaşlanan hatlardaki Cu/ZnSOD geninin ifadesinin normal yaşlanan hatlardan daha düşük olması erken yaşlanan hatlarda senesens belirtilerinin normal yaşlanan hatlardan daha erken ortaya çıkmasından dolayı olabilir.

Lamiaa F. El-Gaied vd. (2013) [208] tarafından domates bitkisinde yapılan çalışmada IAA uygulaması yapılan domates yapraklarında SOD geninin ifadesi kontrole göre artmıştır.

Çalışmamızda Cu/Zn SOD geninin ifadesi kontrol ile kıyaslandığında AgNO₃ uygulaması yapılan fidelerde artış göstermiştir. Ayrıca karanlık uygulaması yapılan fidelerle kıyaslandığında Cu/Zn SOD geninin ifadesi hem karanlık hem de AgNO₃ uygulaması yapılan fidelerde artmıştır (Şekil 4.22). Cu/Zn SOD geninin ifadesindeki bu artış AgNO₃ uygulamasının etilen etkisini azaltarak senesensi geciktirmesine bağlı olabilir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

- ❖ *Triticum aestivum* L. (Gün-91) bitkilerinde karanlık uygulaması fide boyları, oransal su içeriği, klorofil-a, klorofil-b, toplam klorofil, β-karoten, ksantofil, toplam antioksidan kapasite, çözümlenir fenol, toplam çözümlenir protein, katalaz, süperoksit dismutaz, Cu/Zn-SOD enzimi aktivite düzeyleri azaltırken Cu/Zn-SOD geninin ifade düzeyi artırmıştır.
- ❖ *Triticum aestivum* L. (Gün-91) bitkilerinde IAA uygulanmasıyla fide boyları, oransal su içeriği, klorofil-a, klorofil-b, toplam klorofil, β-karoten, ksantofil, toplam antioksidan kapasite, çözümlenir fenol, toplam çözümlenir protein düzeyleri azalırken, katalaz, süperoksit dismutaz, Cu/Zn-SOD enzimleri ve Cu/Zn-SOD geninin ifade düzeyleri artmıştır.
- ❖ *Triticum aestivum* L. (Gün-91) bitkilerinde 200 ppm konsantrasyonundaki gümüş nitrat fide boyları, oransal su içeriği, klorofil-a, klorofil-b, toplam klorofil, β-karoten, ksantofil, toplam antioksidan kapasite, çözümlenir fenol, toplam çözümlenir protein, Cu/Zn-SOD geninin ifade düzeyi parametrelerinde artışa yol açarken katalaz, süperoksit dismutaz, Cu/Zn-SOD enzim aktivitesi parametrelerinin kontrole göre azalmasına neden olmuştur.
- ❖ Bu araştırmadan elde edilen bulgular senesens sürecinin antioksidan bileşik ve enzimlerin düzeyindeki değişimlerle ilişkili olduğunu göstermiştir. IAA ve karanlık uygulamaları senesens sürecini hızlandırmıştır. AgNO₃ uygulaması senesens sürecini geciktirici etki yapmıştır.
- ❖ Ancak yapılan bu çalışmanın IAA ve AgNO₃'ün daha farklı dozları uygulanarak ve hasat ile birlikte analizlerin zamana bağlı olarak (örneğin senesensin 7, 14, 21. günlerinde) yapılması senesens sürecinde IAA ve AgNO₃ iyonlarının etkilerinin belirlenmesinde daha ayrıntılı bulgular elde edilmesini sağlayabilir.
- ❖ AgNO₃ iyonlarının toksik etkisinden ve stomalardan geçmek için daha büyük partiküllere sahip olmasından dolayı toksik etkisi nispeten daha az olan ve daha küçük partiküllere sahip olduğundan stomalardan daha kolay geçerek daha düşük konsantrasyonlarda aynı etkiyi yapabilecek AgNps'ler (gümüş nanopartikülleri) uygulanması çalışmayı daha verimli hale getirebilir.

- ❖ Gen ifadesi analizleri sonuçlarının daha verimli olabilmesi için ıslah sürecinde bitki genomlarında meydana gelen değişimlerden dolayı çalışmada kullanılan *T. aestivum* (Gün-91) çeşidine özel gen bölgelerinin dizilerinin çıkartılıp bu dizilere yönelik primerler tasarlanması ve daha fazla genin ifadesine bakılarak IAA ve Ag^+ iyonlarının senesens sürecindeki etkileri daha etkili bir şekilde araştırılabilir.



KAYNAKLAR

- [1] Buchanan-Wollaston, V., Earl, S., Harrison, E., Mathas, E., Navabpour, S., Page, T., Pink, D., “The molecular analysis of leaf senescence a genomic approach”, *Plant Biotechnol*, 1: 3-22, (2003).
- [2] Susheng, G., “Senescence Processes in Plants”, 142: (2007).
- [3] Guo, Y., Cai, Z. and Gan, S. “Transcriptome of *Arabidopsis* leaf senescence” *Plant Cell Environ*, 27: 521–549, (2004).
- [4] Zentgraf, U., “Oxidative stress and leaf senescence”, *Annual Plant Reviews*, 26: (2007).
- [5] Thomas, H. and Howarth, C.J., “Five ways to stay green” *J. Exp Bot.*, 51: 329–337, (2000).
- [6] van der Hoorn, R.A.L., Leeuwenburgh, M. A., Bogyo, M., Joosten, M.H.A.J. and Peck, S .C., “Activity profiling of papain-like cysteine proteases in plants”, *Plant Physiol*, 135: 1170–1178, (2004).
- [7] Xu, P., Rogers, S.J. and Roossinck, M.J., “Expression of antiapoptotic genes *bcl-xL* and *ced-9* in tomato enhances tolerance to viral-induced necrosis and abiotic stress ”, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 (44): 15805–15810, (2004).
- [8] Zavaleta-Mancera, H.A., Frnaklin, K.A., Ougham H.J., Thomas, H. and Schott, I.M., “Regreening of senescent *Nicotiana* leaves Reappearance of NADPH-protophyllide oxidoreductase and light harvesting chlorophyll a/b-binding protein”, *J Exp Bot.*, 50: 1677–1682, (1999).
- [9] Zavaleta-Mancera, H.A., Thomas, B.J., Thomas, H. and Scott, I.M., “Regreening of *Nicotiana* leaves Redifferentiation of plastids ”, *J Exp Bot* 50: 1683–1689, (1999).
- [10] Lim PO, Kim HJ, Nam HG., “Leaf senescence”, *Annu Rev Plant Biol.*, 58: 115–136, (2007).
- [11] Verma V, Foulkes MJ, Worland AJ, Sylvester-Bradley R, Caligari PDS, Snape JW., “Mapping quantitative trait loci for flag leaf senescence as a yield determinant in winter wheat under optimal and drought-stressed environments”, *Euphytica*, 135 (2): 55–263, (2014).
- [12] Matile, P., “The vacuol and cell senescence”, *Advances in Botanical Research*, 25: 87-112., (1997).
- [13] Hong, G. N., “The molecular genetic analysis of leaf senescence”, *Current Opinion in Biotechnology*, 8: 200–207, (1997).

- [14] Horeteneiner S., Feller U., “Nitrogen metabolism and remobilization during senescence”, J. Exp. Bot., 53: 927-937, (2002).
- [15] Munne-Bosch, S., Jubany-Mari. T., Alegre, L., “Drought-induced senescence is characterized by a loss of antioxidant defenses in chloroplasts”, Plant Cell and Environment, 24 (12): 1319-1327, (2001).
- [16] Defosse, P.A., Lin, S.J., McNabb, D., “Sound silencing: the sir2 protein and cellular senescence” BioEssays, 23: 327-332, (2001).
- [17] Thirupathi, K., Wang W. H., Prabakaran, N., Jeyalakshmi K., Kwon M., Manoharan K., Kim W., “2,4-dichlorophenoxyacetic acid-induced leaf senescence in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilczek) and senescence inhibition by co-treatment with silver nanoparticles”, Plant Physiology and Biochemistry, 49: 168-177, (2011).
- [18] de Magalhaes, J. P. and Church, G. M., “Genomes optimize reproduction: aging as a consequence of the developmental program”, Physiology, 20 (4): 252–259, (2005).
- [19] Kirkwood, T.B., “Understanding the odd science of aging”, Cell, 120 (4): 437–447, (2005).
- [20] Jing, H.C., Hille, J. and Dijkwel, P. P., “Ageing in plants conserved strategies and novel pathways”, Plant Biol, 5 (5): 455–464, (2003).
- [21] Gregersen, P. L., Hawkesford, M.J., Barraclough, P. B., “Senescence and nutrient remobilization in crop plants Wiley-Blackwell”, 83–102, (2011).
- [22] Batt, T. and Woolhouse, H. W., “Changing activities during senescence and sites of synthesis of photosynthetic enzymes in leaves of labiate, *Perilla frutescens* (L.)”, J Exp Bot, 26: 569–579, (1975).
- [23] Hensel, L. L., Grbić, V., Baumgarten, D. and Bleecker, A.B., “Developmental and age-related processes that influence the longevity and senescence of photosynthetic tissues in *Arabidopsis*”, Plant Cell, 5: 553–564, (1993).
- [24] Smart, C.M., “Gene expression during leaf senescence.”, New Phytologist, 126: 419–448, (1994).
- [25] Matile, P., Hortensteiner, S., Thomas, H. and Krautler, B., “Chlorophyll breakdown in senescent leaves”, Plant Physiol, 112: 1403–1409, (1996).
- [26] Rolland, F., Moore, B. and Sheen, J., “Sugar sensing and signalling in plants” Plant Cell, 14: 185–205, (2002).

- [27] Srivalli, B. and Khanna-Chopra, R., “The developing reproductive ‘sink’ induces oxidative stress to mediate nitrogen mobilization during monocarpic senescence in wheat ” *Biochem Biophys Res Commun*, 325 (1): 198–202, (2004).
- [28] Ye, Z.Z., Rodriguez, R., Tran, A., “The developmental transition to flowering represses ascorbate peroxidase activity and induces enzymatic lipid peroxidation in leaf tissue in *Arabidopsis thaliana*”, *Plant Sci*, 158: 115–127, (2000).
- [29] Navabpour, S., Morris, K., Allen, R., Harrison, E., A-H-Mackerness, S. and Buchanan-Wollaston, V., “Expression of senescence-enhanced genes in response to oxidative stress”, *J. Exp Bot*, 54: 2285–2292, (2003).
- [30] Barth, C., Moeder, W., Klessig, D.F. and Conklin, P.L. “The timing of senescence and response to pathogens is altered in the ascorbate-deficient *Arabidopsis* mutant vitamin c-1”, *Plant Physiol*, 134: 1784–1792, (2004).
- [31] Zimmermann, P., Orendi, G., Heinlein, C., Zentgraf, U. “Senescence specific regulation of catalases in *Arabidopsis thaliana* (L.)” *Plant Cell Environ*, 29: 1049–1060, (2006).
- [32] Martin, G.M., Austad, S.N. and Johnson, T.E., “Genetic analysis of aging role of oxidative damage and environmental stresses”, *Nat. Genet.*, 13: 25–34, (1996).
- [33] Sohal, R.S. and Weindruch, R., “Oxidative stress, caloric restriction, and aging” *Science*, 273: 59–63, (1996).
- [34] Panavas, T. and Rubinstein, B., “Oxidative events during programmed cell death of daylily (*Emmercallis* hybrid) petals”, *Plant Sci*, 133: 125–138, (1998).
- [35] Orendi, G., Zimmermann, P., Baar, C. and Zentgraf, U., “Loss of stress-induced expression of catalase3 during leaf senescence in *Arabidopsis thaliana* is restricted to oxidative stress”, *Plant Sci*, 161: 301–314, (2001).
- [36] Kurepa, J., Smalle, J., Van Montagu, M. and Inzé, D., “Oxidative stress tolerance and longevity in *Arabidopsis*: the late flowering mutant *gigantea* is tolerant to paraquat”, *Plant J.*, 14: 759–764, (1998).
- [37] Elstner, E.F., “Oxygen activation and oxygen toxicity”, *Annual Review Plant Physiology* 33: 73-96, (1982).
- [38] Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C., “Free radicals in biology and medicine”, Oxford: Clarendon Press, (1989).

- [39] Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M. and Van Breusegem, F., “Reactive oxygen gene network of plants”. Trends Plant Science, 9: 490–498, (2004).
- [40] Kopáni, M., Celec, P., Danisovic, L., Michalka P. and Biró, C. “Oxidative stress and electron spin resonance”, Clinica Chimica Acta, 364: 61-66, (2006).
- [41] Staroverov, V. N. and Davidson, E. R., “Distribution of effectively unpaired electrons”. Chemistry Physical Letters, 330: 161- 168, (2000).
- [42] Van Camp, W. and Van Montagu, M., Inze, D., “H₂O₂ and NO: redox signals in disease resistance”. Trends Plant Science, 3: 330-334, (1998).
- [43] Van Breusegem, F., Dat, J. F., “Reactive oxygen species in plant cell death”, Plant Physiology, 141: 384-390, (2006).
- [44] Lamb, C., Dixon, R.A., “The oxidative burst in plant disease resistance”, Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology, 48: 251-275, (1997).
- [45] Gechev, T., Willekens, H. and Van Montagu, M., “Different responses of tobacco antioxidant enzymes to light and chilling stress”. Journal of Plant Physiology, 160: 509-515, (2003).
- [46] Stuhlfauth, T., Scheuermann, R. and Fock, H.P., “Light energy dissipation under water stress conditions”, Plant Physiology, 92: 1053-1061, (1990).
- [47] Tambussi, E. A., Bartoli, C. G, Beltrano, J., Guamet, J. J. and Araus, J. L., “Oxidative damage to thylakoid proteins in water-stressed leaves of wheat (*Triticum aestivum*)”. Physiology Planta, 108: 398-404, (2000).
- [48] Farrant J. M., “A comparison of mechanisms of desiccation tolerance among three angiosperm resurrection plant species”, Plant Ecology, 151: 29- 39, (2000).
- [49] Cadenas, S.E., “Biochemistry of oxygen toxicity”, Annual Review of Biochemistry, 58: 79-110, (1989).
- [50] Sairam, R. K., Saxena, D. C., “Oxidative stress and antioxidants in wheat cultivars: possible mechanism of water stress tolerance”. Journal of Agronomy and Crop Science, 184: 55-61, (2000).
- [51] Fridovich, I., “Biological effects of superoxide radical”, Archives of Biochemistry and Biophysics, 247: 1-11, (1986).
- [52] Liebler, D. C., Kling, D. S. and Reed, D. J., “Antioxidant protection of phospholipid bilayers by U-tocopherol. Control of U-tocopherol status and lipid peroxidation by ascorbic acid and glutathione”, Journal Biology Chemistry, 261:12114-12119, (1986).

- [53] Davies, K. J. A., “Protein damage and degradation by oxygen radicals”, I. General aspects. *Journal Biology Chemistry*, 262: 9895-9901, (1987).
- [54] Smirnoff, N., “The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation”. *New Phytologist*, 125: 27-58, (1993).
- [55] Prochazkova, D., Wilhelmova, N., “Leaf senescence and activities of the antioxidant enzymes”, *Biol Plant*, 51: 401–406, (2007).
- [56] Jing, H.C., Hebel, R., Oeljeklaus, S., Sitek, B., Stuhler, K., Meyer, H. E., “Early leaf senescence is associated with an altered cellular redox balance in *Arabidopsis cpr5/old1* mutants ”, *Plant Biol.*, 10: 85–98, (2008).
- [57] Breusegem, V., Dat, J. F., “Reactive oxygen species in plant cell death”, *Plant Physiol* 141: 384–390, (2006).
- [58] Kukavica, B., Jovanovic, S. V., “Senescence-related changes in the antioxidant status of ginkgo and birch leaves during autumn yellowing”, *Physiol Plant*, 122: 321–327, (2004).
- [59] Pavet, V., Olmos, E., Kiddle, G., Mowla, S., Kumar, S., Antoniow, J., Ascorbic acid deficiency activates cell death and disease resistance in *Arabidopsis thaliana*” *Plant Physiol*, 139: 1291–1303, (2005).
- [60] Vijayalakshmi, K., Fritz, A. K., Paulsen, G. M., Bai, G., Pandravada, S., Gill, B. S., “Modeling and mapping QTL for senescence-related traits in winter wheat under high temperature” *Mol Breed.*, 26: 163–175, (2010).
- [61] Li, H. W., Lin, F. Y., Wang, G., Jing, R. L., Zheng, Q., Li, B., Li, Z. S. “Quantitative trait loci mapping of dark-induced senescence in winter wheat (*Triticum aestivum* L.)”, *J. Integr. Plant Biol.*, 54: 33–44, (2012).
- [62] Zhang, C. J., Chen, G. X., Gao, X. X., Chu C. J., “Photosynthetic decline in flag leaves of two field-grown spring wheat cultivars with different senescence properties” *S. Afr. J. Bot.*, 72: 15–23, (2006).
- [63] Hongwei, L., Gui, W., Shudong, L., Qiang, A., Zheng, Q., Bin, L., Zhensheng, L., “Comparative changes in the antioxidant system in the flag leaf of early and normally senescing near-isogenic lines of wheat (*Triticum aestivum* L.)”, *Plant Cell Rep.*, 14: 16-24, (2014).
- [64] Thompson, J. E., Legge, R. L. and Barber, R. F. “The role of free radicals in senescence and wounding” *New Phytol*, 105: 317–344, (1987).
- [65] Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. “Free Radicals in Biology and Medicine, Oxford University Press”, 2: 324-335, (2001).
- [66] Kurepa, J., Smalle, J., Van Montagu, M. and Inz'e, D., “Oxidative stress tolerance and longevity in *Arabidopsis*: the late flowering mutant *gigantea* is tolerant to paraquat” *Plant J.* 14: 759–764, (1998).

- [67] Woo, H. R., Kim, J. H., Nam, H. G. and Lim, P. O., “The delayed leaf senescence mutants of *Arabidopsis*, ore1, ore3, and ore9 are tolerant to oxidative stress“ *Plant Cell Physiol*, 45 (7): 923– 932, (2004).
- [68] Noctor, G. and Foyer, C. H., “Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control”, *Annu. Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49: 249–279, (1998).
- [69] Baek, K. H. and Skinner, D. Z., “Alteration of antioxidant enzyme gene expression during cold acclimation of near isogenic wheat lines”. *Plant Science*, 165: 1221–1227, (2003).
- [70] Velikova, V., Yordanov, I., Edreva, A., “Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants, protective role of exogenous polyamines”, *Plant Science*, 151: 59–66, (2000).
- [71] Ying, G., Shen, Y., Tong, N., Gu, J., Hao, L. and Liu, Z., “Drought induced changes of physio-biochemical parameters in maize”, *Journal of Food, Agriculture and Environment*, Vol.10 (1): 853-858, (2012).
- [72] Rafiee, M., Abdipoor, F. and Lari, H., “Corn (*Zea mays* L.) antioxidants response to drought stress”, *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 57: 412-414, (2011).
- [73] Rhoads, D. M., Umbach, A. L., Subbaiah, C. C., Siedow, J. N. “Mitochondrial reactive oxygen species, contribution to oxidative stress and interorganellar signaling”, *Plant Physiol*, 141: 357–366, (2006).
- [74] Rosenwasser, S., Rot, I., Sollner, E., Meyer, A. J., Smith, Y., Leviatan, N., Fluhr, R., Friedman, H., “Organelles contribute differentially to reactive oxygen species-related events during extended darkness”, *Plant Physiol.*, 156, 185–201, (2011).
- [75] Allen, J. F., Hall, D. O., “Superoxide reduction as a mechanism of ascorbate-stimulated oxygen uptake by isolated chloroplasts”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 52: 856–862, (1973).
- [76] Asada, K., “Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions”, *Plant Physiol.*, 141: 391–396, (2006).
- [77] Dat, J., Vandenabeele, S., Vranová, E. van Montagu, M., Inzé, D., van Breusegem, F., “Dual action of the active oxygen species during plant stress responses” *Cell. Mol. Life Sci.*, 57, 779–795, (2000).
- [78] Takahashi, M. A., Asada, K., “Superoxide anion permeability of phospholipid membranes and chloroplast thylakoids“, *Arch. Biochem. Biophys.*, 226: 558–566, (1983).

- [79] Sandalio, L. M., Fernandez, V. M., Ruperez, F. L., Del R. L. A., "Superoxide free radicals are produced in glyoxysomes", *Plant Physiol*, 87: 1–4, (1988).
- [80] Corpas, F. J., Palma, J. M., Sandalio, L. M., Valderrama, R., Barroso, J. B., Del Rio, L. A., Peroxisomal xanthine oxidoreductase: "Characterization of the enzyme from pea (*Pisum sativum* L.) leaves", *J. Plant Physiol*. 165: 1319–1330, (2008).
- [81] Del Río, L. A. Donaldson, R. P., "Production of superoxide radicals in glyoxysomal membranes from castor bean endosperm", *J. Plant Physiol.*, 146: 283–287, (1995).
- [82] Zarepour, M., Kaspari, K., Stagge, S., Rethmeier, R., Mendel, R., Bittner, F., "Xanthine dehydrogenase atxdh1 from *Arabidopsis thaliana* is a potent producer of superoxide anions via its nadh oxidase activity", *Plant. Mol. Biol.*, 72: 301–310, (2010).
- [83] Yesbergenova, Z., Yang, G., Oron, E., Soffer, D., Fluhr, R., Sagi, M., "The plant mo-hydroxylases aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase have distinct reactive oxygen species signatures and are induced by drought and abscisic acid", *Plant. J.*, 42: 862–876, (2005).
- [84] McRae, D. G., Thompson, J. E., "Senescence-dependent changes in superoxide anion production by illuminated chloroplasts from bean leaves" *Planta*, 158: 185–193, (1983).
- [85] Pastori, G. M., Del Rio, L. A., "Natural senescence of pea leaves (an activated oxygen-mediated function for peroxisomes) ", *Plant Physiol.*, 113, 411–418, (1997).
- [86] Van Breusegem, F., Dat, J. F., "Reactive oxygen species in plant cell death" *Plant Physiol.*, 141: 384–390, (2006).
- [87] Robatzek, S., Somssich, I. E., "A new member of the arabidopsis wrky transcription factor family, atwrky6, is associated with both senescence- and defence-related processes" *Plant J. Cell Mol. Biol.*, 28: 123–133, (2001).
- [88] Jajić, I., Wiśniewska-Becker, A., Sarna, T., Jemiola-Rzemińska, M., Strzałka, K., "EPR spin labeling measurements of thylakoid membrane fluidity during barley leaf senescence", *J. Plant Physiol.*, 171: 1046–1053, (2014).

- [89] Rodriguez-Serrano, M., Romero-Puertas, M. C., Zabalza, A., Corpas, F. J., Gomez, M., Del Rio, L. A., Sandalio, L. M., "Cadmium effect on oxidative metabolism of pea (*Pisum sativum* L.) roots. Imaging of reactive oxygen species and nitric oxide accumulation *in vivo*", Plant Cell Environ., 29: 1532–1544, (2006).
- [90] Kopyra, M., Gwózdź, E. A., "Nitric oxide stimulates seed germination and counteracts the inhibitory effect of heavy metals and salinity on root growth of lupinus luteus", Plant Physiol. Biochem., 41: 1011–1017, (2003).
- [91] Romero-Puertas, M. C., Delledonne, M., "Nitric oxide signaling in plant-pathogen interactions" IUBMB Life, 55: 579–583, (2003).
- [92] Jajic, I., Sarna, T., Szewczyk, G., Strzalka, K., "Changes in production of reactive oxygen species level in illuminated thylakoids isolated during development and senescence of barley leaf senescence", J. Plant Physiol., 5: 35-43, (2015).
- [93] Bowler, C., Van Camp W., Van Montagu M., Inze, D., "Superoxide dismutases in plants", Critical reviews in Plant Sciences, 13: 199–218, (1994).
- [94] Quan, L. J., Zhang, B., Shi, W. W., Li, H.Y., "Hydrogen peroxide in plants: A versatile molecule of the reactive oxygen species network", J. Integr. Plant Biol., 50: 2–18, (2008).
- [95] Peng, L. T., Jiang, Y. M., Yang, S. Z., Pan, S. Y., "Accelerated senescence of fresh-cut chinese water chestnut tissues in relation to hydrogen peroxide accumulation", J. Plant Physiol. Mol. Biol., 31: 527–532, (2005).
- [96] Kumar, N., Ebel, R. C., Roberts, P. D., "Antioxidant metabolism of grapefruit infected with xanthomonas axonopodis pv. Citri", Environ. Exp. Bot., 71: 41–49, (2011).
- [97] Zhang, X. L., Jia, X. F., Yu, B., Gao, Y., Bai, J. G., "Exogenous hydrogen peroxide influences antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in cucumber leaves at low light", Sci. Hortic., 129: 656–662, (2011).
- [98] Ishibashi, Y., Yamaguchi, H., Yuasa, T., Iwaya-Inoue, M., Arima, S., Zheng, S. H., "Hydrogen peroxide spraying alleviates drought stress in soybean plants", J. Plant Physiol., 168: 1562–1567, (2011).
- [99] Yun, K. Y., Park, M., Mohanty, B., Herath, V., Xu, F., Mauleon, R., Wijaya, E., Bajic, V., Bruskiewich, R., Reyes, B., "Transcriptional regulatory network triggered by oxidative signals configures the early response mechanisms of japonica rice to chilling stress", BMC Plant. Biol., 10: 1–29, (2010).

- [100] Asada, K., "Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions", *Plant Physiol.*, 141: 391–396, (2006).
- [101] Hu, X., Bidney, D. L., Yalpani, N., Duvick, J. P., Crasta, O., Folkerts, O., Lu, G., "Overexpression of a gene encoding hydrogen peroxide-generating oxalate oxidase evokes defense responses in sunflower", *Plant Physiol.*, 133: 170–181, (2003).
- [102] Foyer, C. H., Noctor, G., "Redox homeostasis and antioxidant signaling: A metabolic interface between stress perception and physiological responses", *Plant Cell*, 17: 1866–1875, (2005).
- [103] Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., van Breusegem, F., "Reactive oxygen gene network of plants", *Trends Plant Sci.*, 9: 490–498, (2004).
- [104] Yang, T., Poovaiah, B. W., "Hydrogen peroxide homeostasis: Activation of plant catalase by calcium/calmodulin", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 99: 4097–4102, (2002).
- [105] Zimmermann, P., Heinlein, C., Orendi, G., Zentgraf, U., "Senescence-specific regulation of catalases in *Arabidopsis thaliana* (L.)", *Plant Cell Environ.*, 29: 1049–1060, (2006).
- [106] Dat, J., Vandenabeele, S., Vranová, E., van Montagu, M., Inzé, D., van Breusegem, F., "Dual action of the active oxygen species during plant stress responses", *Cell. Mol. Life Sci.*, 57: 779–795, (2000).
- [107] Liao, W. B., Zhang, M. L., Huang, G. B., Yu, J. H., "Hydrogen peroxide in the vase solution increases vase life and keeping quality of cut Oriental × Trumpet hybrid lily "manissa" ", *Sci. Hortic.*, 139: 32–38, (2012).
- [108] Khandaker, M. M., Boyce, A. N., Osman, N., "The influence of hydrogen peroxide on the growth, development and quality of wax apple (*Syzygium samarangense*, [blume] merrill & LM. Perry var. *Jambu madu*) fruits", *Plant Physiol. Biochem.*, 53: 101–110, (2012).
- [109] Bieker, S., Riester, L., Stahl, M., Franzaring, J., Zentgraf, U., "Senescence-specific alteration of hydrogen peroxide levels in *Arabidopsis thaliana* and oilseed rape spring variety *Brassica napus* L. Cv. Mozart", *J. Integr. Plant Biol.*, 54: 540–554, (2012).
- [110] Balazadeh, S., Wu, A., Mueller-Roeber, B., "Salt-triggered expression of the ANAC092-dependent senescence regulon in *Arabidopsis thaliana*", *Plant Signal. Behav.*, 5: 733–735, (2010).

- [111] Balazadeh, S., Kwasniewski, M., Caldana, C., Mehrnia, M., Zanon, M. I., Xue, G. P., Mueller-Roeber, B., "ORS1, an H₂O₂-responsive nac transcription factor, controls senescence in *Arabidopsis thaliana*", Mol. Plant., 4: 346–360, (2011).
- [112] Wu, A., Allu, A. D., Garapati, P., Siddiqui, H., Dortay, H., Zanon, M.I., Asensi-Fabado, M. A., Munne-Bosch, S., Antonio, C., Tohge, T., "JUNGBRUNNEN1, a reactive oxygen species-responsive NAC transcription factor, regulates longevity in *Arabidopsis*", Plant Cell, 24: 482–506, (2012).
- [113] Garapati, P., Xue, G. P., Munne-Bosch, S., Balazadeh, S., "Transcription factor ATAF1 in arabidopsis promotes senescence by direct regulation of key chloroplast maintenance and senescence transcriptional cascades", Plant Physiol, 10: 210-223, (2015).
- [114] Jubany-Mari, T., Munne-Bosch, S., Lopez-Carbonell, M., Alegre, L., "Hydrogen peroxide is involved in the acclimation of the mediterranean shrub, *cistus albidus* L., to summer drought", J. Exp. Bot., 60: 107–120, (2009).
- [115] Prasad, T. K., Anderson, M. D., Martin, B. A., Stewart, C. R., "Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide", Plant Cell, 6: 65–74, (1994).
- [116] Gao, Y., Guo, Y. K., Lin, S. H., Fang, Y. Y., Bai, J. G., "Hydrogen peroxide pretreatment alters the activity of antioxidant enzymes and protects chloroplast ultrastructure in heat-stressed cucumber leaves", Sci. Hortic., 126: 20–26, (2010).
- [117] Siewewiesiuk, J., "Why there are photodamages to photosystem II at low light intensities", Acta Physiol. Plant., 24, 399–406, (2002).
- [118] Kumar, N., Ebel, R. C., Roberts, P. D., "H₂O₂ degradation is suppressed in kumquat leaves infected with *xanthomonas axonopodis*", Sci. Hortic., 130: 241–247, (2011).
- [119] Dixit, V., Pandey, V., Shyam, R., "Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L.)", Journal of Experimental Botany., 52 (358): 1101-1109, (2001).
- [120] Beyer, R. E., "The role of ascorbate in antioxidant protection of biomembranes: Interaction with vitamin E and coenzyme Q", Journal of Bioenergetics and Biomembranes, 26: 349-358, (1994).

- [121] Shalata, A., Mittova, V., Guy, M. and Tal, M., "Response of cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennelli* to salt dependent oxidative stress: the root antioxidative system", *Physiologia Plantarum*, 112: 487-494, (2001).
- [122] Shigeoka, S., Ishikawa, T., Tamoi, M., Miyagawa, Y., Takeda, T., Yabuta, Y. and Yoshimura, K., "Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes", *Journal of Experimental Botany.*, 53 (372): 1305-1319, (2002).
- [123] Krieger-Liszkay, A., "Singlet oxygen production in photosynthesis", *J. Exp. Bot.*, 56: 337-346, (2005).
- [124] Gill, S. S., Tuteja, N., "Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants", *Plant Physiol. Biochem.*, 48: 909-930, (2010).
- [125] Pospíšil, P., Šnyrychová, I., Nauš, J., "Dark production of reactive oxygen species in photosystem II membrane particles at elevated temperature: EPR spin-trapping study", *Biochim. Biophys. Acta*, 1767: 854-859, (2007).
- [126] Alboresi, A., Dall'osto, L., Aprile, A., Carillo, P., Roncaglia, E., Cattivelli, L., Bassi, R., "Reactive oxygen species and transcript analysis upon excess light treatment in wild-type *Arabidopsis thaliana* vs. a photosensitive mutant lacking zeaxanthin and lutein", *BMC Plant. Biol.*, 11: 62-69, (2011).
- [127] Springer, A., Acker, G., Bartsch, S., Bauerschmitt, H., Reinbothe, S., Reinbothe, C., "Differences in gene expression between natural and artificially induced leaf senescence in barley", *J. Plant Physiol.*, 176: 180-191, (2015).
- [128] Op den Camp, R. G. L., Przybyla, D., Ochsenein, C., Laloi, C., Kim, C., Danon, A., Wagner, D., Hideg, É., Göbel, C., Feussner, I., "Rapid induction of distinct stress responses after the release of singlet oxygen in *Arabidopsis*", *Plant Cell*, 15: 2320-2332, (2003).
- [129] Laloi, C., Stachowiak, M., Pers-Kamczyc, E., Warzych, E., Murgia, I., Apel, K., "Cross-talk between singlet oxygen- and hydrogen peroxide-dependent signaling of stress responses in *Arabidopsis thaliana*", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104: 672-677, (2007).
- [130] Kim, C., Meskauskiene, R., Apel, K., Laloi, C., "No single way to understand singlet oxygen signalling in plants" *EMBO Rep.*, 9: 435-439, (2008).
- [131] Krasnovsky, A., "Singlet molecular oxygen in photobiochemical systems: IR phosphorescence studies", *Membr. Cell Biol.*, 12: 665-690, (1998).

- [132] Ramel, F., Birtic, S., Ginies, C., Soubigou-Taconnat, L., Triantaphylides, C., Havaux, M., "Carotenoid oxidation products are stress signals that mediate gene responses to singlet oxygen in plants", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 109: 5535–5540, (2012).
- [133] Lee, S., Seo, P.J., Lee, H.J., Park, C.M., "A nac transcription factor ntl4 promotes reactive oxygen species production during drought-induced leaf senescence in arabidopsis", *Plant J. Cell Mol. Biol.*, 70: 831–844, (2012).
- [134] Prochazkova, D., Sairam, R.K., Srivastava, G.C., Singh, D.V., "Oxidative stress and antioxidant activity as the basis of senescence in maize leaves", *Plant Sci.*, 161: 765–771, (2001).
- [135] Munné-Bosch, S., Jubany-Marí, T., Alegre, L., "Drought-induced senescence is characterized by a loss of antioxidant defences in chloroplasts", *Plant Cell Environ.*, 24: 1319–1327, (2001).
- [136] Berger, S., Weichert, H., Porzel, A., Wasternack, C., Kühn, H., Feussner, I., "Enzymatic and non-enzymatic lipid peroxidation in leaf development", *Biochim. Biophys. Acta*, 1533: 266–276, (2001).
- [137] Zhang, M. P., Zhang, C.J., Yu, G. H., Jiang, Y. Z., Strasser, R. J., Yuan, Z.Y., Yang, X. S., Chen, G. X., "Changes in chloroplast ultrastructure, fatty acid components of thylakoid membrane and chlorophyll a fluorescence transient in flag leaves of a super-high-yield hybrid rice and its parents during the reproductive stage", *J. Plant Physiol.*, 167: 277–285, (2010).
- [138] Triantaphylides, C., Krischke, M., Hoeberichts, F. A., Ksas, B., Gresser, G., Havaux, M., van Breusegem, F., Mueller, M. J., "Singlet oxygen is the major reactive oxygen species involved in photooxidative damage to plants", *Plant Physiol.*, 148: 960–968, (2008).
- [139] Arora, A., Sairam, R. K., Srivastava, G. C., "Oxidative stress and antioxidative system in plants", *Curr. Sci.*, 82: 1227–1238, (2002).
- [140] Thompson, J. E., Legge, R. L., Barber, R. F., "The role of free radicals in senescence and wounding" *New Phytol.*, 105: 317–344, (1987).
- [141] Liebler, D. C., Kling, D. S. and Reed, D. J., "Antioxidant protection of phospholipid bilayers by U-tocopherol. Control of U-tocopherol status and lipid peroxidation by ascorbic acid and glutathione", *Journal Biology Chemistry*, 261:114-119, (1986).
- [142] Sairam, R. K., Deshmukh, P.S. and Saxena, D.C., "Role of antioxidant systems in wheat cultivars tolerance to water stres", *Biologia Plantarum*, 41: 387-394, (1998).

- [143] Fridovich, I., “Biological effects of superoxide radical”, Archives of Biochemistry and Biophysics, 247: 1-11, (1986).
- [144] Thirupathi, K., Hong, W., Natarajan, P., Kandhavelu, J., Mi K., Kumariah M., Wook K., “2,4-dichlorophenoxyacetic acid-induced leaf senescence in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilczek) and senescence inhibition by co-treatment with silver nanoparticles“, Plant Physiology and Biochemistry 49: 168-177, (2011).
- [145] Manoharan, K., Karuppanapandian T., Sinha P. B., Prasad R., “Membrane degradation, accumulation of phosphatidic acid, stimulation of catalase activity and nuclear DNA fragmentation during 2,4-D-induced leaf senescence in mustard“, J. Plant Biol. 48: 394-403, (2005).
- [146] Strader, L. C., Beisner, E. R., Bartel B., “Silver ions increase auxin efflux independently of effects on ethylene response“, Plant Cell, 21: 3585-3590, (2009).
- [147] Grossmann, K., Kwiatkowski J., Tresch S., “Auxin herbicides induce H₂O₂ overproduction and tissue damage in cleavers (*Galium aparine* L.)“, J. Exp. Bot., 52: 1811-1816, (2001).
- [148] Swarup, R., Perry, P., Hagenbeek, D., Van Der, D., Beemster G. T., Sandberg G., Bhalerao R., Ljung K., Bennett M. J., “Ethylene upregulates auxin biosynthesis in Arabidopsis seedlings to enhance inhibition of root cell elongation“, Plant Cell, 19: 2186-2196, (2007).
- [149] Strader, L. C., Beisner, E. R., Bartel B., “Silver ions increase auxin efflux independently of effects on ethylene response“, Plant Cell, 21: 3585-3590, (2009).
- [150] Giridhar, P., Reddy, B. O., Ravishankar G. A., “Silver nitrate in uences in vitro shoot multiplication ant root formation in *Vanilla planifolia*“, Andr. Curr Sci, 81: 1166-1170, (2001).
- [151] Reis, L. B., Paiva, V. B., Picoli, E. A., Costa, M. G. C., Rego, M. M., Carvalho, C. R., Finger, F. L., Otoni, W. C., “Axillary bud development of passionfruit as affected by ethylene precursor ad inhibitors“, In Vitro Cell Dev Biol-Plant 39: 618-622, (2003).
- [152] Tripathi, S. K., Tuteja, N., “Integrated signaling in flower senescence: An overview“ Plant Signal. Behav., 2: 437-445, (2007).
- [153] Hunter, D. A., Ferrante, A., Vernieri, P., Reid, M. S., “Role of abscisic acid in perianth senescence of daffodil *Narcissus pseudonarcissus*“, Physiol. Plant., 121: 313-321, (2004).

- [154] Breeze, E., Wagstaff, C., Harrison, E., Bramke, I., Rogers, H., Stead, A., Thomas, B., Buchanan, V., “Gene expression patterns to define stages of post-harvest senescence in *Alstroemeria* petals“, *Plant Biotechnol. J.*, 2: 155–168, (2004).
- [155] Van Doorn, W. G., Balk, P. A., van Houwelingen, A. M., Hoeberichts, F. A., Hall, R. D., Vorst, O., van Wordragen, M. F., “Gene expression during anthesis and senescence in *Iris* flowers“, *Plant Mol. Biol.*, 53: 845–863, (2003).
- [156] Channelière, S., Rivière, S., Scalliet, G., Szecsi, J., Jullien, F., Dolle, C., Vergne, P., Dumasa, C., Bendahmane, M., Hugueney, P., “Analysis of gene expression in rose petals using expressed sequence tags. “ *FEBS Lett.*, 515: 35–38, (2002).
- [157] Xu, X., Gookin, T., Jiang, C. Z., Reid, M. S., “Genes associated with opening and senescence of *Mirabilis jalapa* flowers“, *J. Exp. Bot.*, 58: 2193–2201; (2007).
- [158] Wang, H., Brandt, A. S., Woodson, W. R., “A flower senescence-related mRNA from carnation encodes a novel protein related to enzymes involved in phosphonate biosynthesis“, *Plant Mol. Biol.*, 22: 719–724, (1993).
- [159] Michael, M. Z., Savin, K.W., Baudinette, S. C., Graham, M. W., Chandler, S. F., Lu, C. Y., Caesar, C., Gautrais, I., Young, R., Nugent, C. D., “Cloning of ethylene biosynthetic genes involved in petal senescence of carnation and petunia, and their antisense expression in transgenic plants“, *Cellular and Molecular Aspects of the Plant Hormone Ethylene*, 12: 298–303, (1993).
- [160] Wetzel, C. M., Jiang, C. Z., Meehan, L. J., Voytas, D. F., Rodermel, S. R., “Nuclear-organelle interactions: The *immutans* variegation mutant of *Arabidopsis* is plastid autonomous and impaired in carotenoid biosynthesis“, *Plant J.*, 6: 161–175, (1994).
- [161] Mylona, P. V., Polidoros, A. N., “ROS regulation of antioxidant genes, in reactive oxygen species and antioxidants in higher plants; New Hampshire, 101–127, (2010).
- [162] Bustin, S. A., Benes, V., Nolan, T., “Pfaffl MW. Quantitative real-time RT-PCR a perspective“, *Journal of molecular endocrinology.*, 34 (3): 597-601, (2005).
- [163] Nolan, T., Hands, R. E., Bustin, S. A., “Quantification of mRNA using real-time RT-PCR“, *Nature protocols.*, 1 (3): 1559-82, (2006).

- [164] Ginzinger, D. G., “Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream“, *Experimental hematology*, 30 (6): 503-12, (2002).
- [165] Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., Williams, P. M., “Real time quantitative PCR“, *Genome research.*, 6 (10): 86-94, (1996).
- [166] Pfaffl, M. W., “A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*“, 29 (9): 37-45, (2001).
- [167] Wong, M. L., Medrano, J. F., “Real-time PCR for mRNA quantitation“, *BioTechniques.*, 39 (1): 75-85, (2005).
- [168] Porra, R. J., Thompson, R. A., Kriedemann, P. E., “Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvent verification of the concentration of chlorophyll standarts by atomic absorption spectroscopy“, *Biochem. Biophys. Acta.*, 975: 384-394, (1989).
- [169] Moore, T. C., “Research experiences in plant physiology“, Springer-Verlag, 12: 39-44, (1974).
- [170] Ferraris, L., Abbatista-Gentile, I., Matta, A., “Variations of phenols concentrations as a consequence of stresses that induce resistance to *Fusarium wild* of tomato“, *J. Plant Dis. Protec.* 94: 624–629., (1987).
- [171] Prieto, P., Pineda, M., Aguilar, M., “Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E“, *Anal Biochem.*, 269 (2): 337-341, (1999).
- [172] Hartree, E. F., “Determination of protein: A modification of Lowry Method that gives a linear photometric response“, *Analytical Biochemistry*, 48: 422-427, (1972).
- [173] Beyer, W. F., Fridowich, I., “Assaying for superokside dismutase activity: Some large consequences of minor changes in conditions“, *Analytical Biochemistry*, 161: 559-566, (1987).
- [174] Aebi, H. E., Bergmeyer, J., Grabl, M., “Catalase In: Methods of enzymatic analysis ”, Eds. Verlag Chemie, Weinheim, 3: 273-286, (1983).
- [175] Livak, K. J., Schmittgen, T. D., “Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method“, *Methods.*, 25 (4): 402-408, (2001).
- [176] Prochazkova, D., Wilhelmova, N. “Leaf senescence and activities of the antioxidant enzymes“, *Biologia plantarum*, 51 (3): 401-406, (2007).

- [177] Manoharan, K., Karuppanapandian, T., Sinha, P. B., Prasad, R. “Membrane degradation, accumulation of phosphatidic acid, stimulation of catalase activity and nuclear DNA fragmentation during 2,4-D-induced leaf senescence in mustard”, J. Plant Biol., 48: 394-403, (2005)
- [178] Romero-Puertas, M .C., McCarthy, I., Gomez, M., Sandalio, L. M., Corpas, F. J., del Rio, L. A., Palma, J. M., “Reactive oxygen species-mediated enzymatic systems involved in the oxidative action of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid”, Plant Cell Environ., 27 :1135-1148, (2004).
- [179] Farooq, U. and Bano A., “Effect of abscisic acid and chlorocholine chloride on nodulation and biochemical content of *Vigna radiata* L. under water stress“, Pak. J. Bot., 38 (5): 1511-1518, (2006).
- [180] Pastori, G. M., and Del, L. A., “Natural senescence of pea leaves. An activated oxygenmediated function for peroxisomes“ Plant Physiol., 113: 411-418, (1997).
- [181] Wingler, A., Schaewen A. V., Leegood R. C. , Lea P. J. and Quick W. P., “Regulation of leaf senescence by cytokinin, sugars, and light“, Plant Physiol., 116: 329-335, (1998).
- [182] Hatami, M., Ghorbanpour, M., “Defense enzyme activities and biochemical variations of *Pelargonium zonale* in response to nanosilver application and dark storage”, Turkish Journal of Biology, 38: 130-139, (2014).
- [183] Staroverov, V. N. and Davidson, E. R., “Distribution of effectively unpaired electrons”. Chemistry Physical Letters, 330: 161- 168, (2000).
- [184] Camp, W. and Montagu, M., Inze, D., “H₂O₂ and NO: redox signals in disease resistance”. Trends Plant Science, 3: 330-334, (1998).
- [185] Halliwell, B. and Gutteridge, J. C., “Free radicals in biology and medicine”, Oxford: Clarendon Press, (1989).
- [186] Hedden, E. P., Thomas, S. G., “Annual Plant Reviews“, Blackwell Publishing, Oxford, 12: 125-139, (2006).
- [187] Seif Sahandi, M., Sorooshzadeh, A., Rezazadeh,S. and Naghdibadi, H. A., “Effect of nano silver and silver nitrate on seed yield of borage”, Journal of Medicinal Plants Research , 5 (2): 171-175, (2011)
- [188] Ouma, J. P., Young, M. M., Reichert, N. A., “Optimization of in vitro regeneration of multiple shoots from hypocotyl sections of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) “, Afr. J. Biotechnol., 3 (3): 169-173, (2004).

- [189] Karuppanapandian, T., Wei, H., Prabakaran, N., Jeyalakshmi, K., Kwon, M., Manoharan, K., Kim, W., “2,4-dichlorophenoxyacetic acid-induced leaf senescence in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilczek) and senescence inhibition by co-treatment with silver nanoparticles”, *Plant Physiology and Biochemistry*, 49: 168-177, (2011).
- [190] Hansen, H., Grossmann K., “Auxin-induced ethylene triggers abscisic acid biosynthesis and growth inhibition“, *Plant Physiol.* 124: 1437-1448, (2000).
- [191] Swarup, R., Perry, P., Hagenbeek, D., Straeten, D., Beemster, G. T., Sandberg, G., Bhalerao, R., Ljung, K., Bennett, M. J., “Ethylene upregulates auxin biosynthesis in Arabidopsis seedlings to enhance inhibition of root cell elongation“, *Plant Cell*, 19: 86-96, (2007).
- [192] Sadak, M., Dawood, M. G., Bakry, B. A., and El-Karamany, M. F., “Synergistic Effect of Indole Acetic Acid and Kinetin on Performance, Some Biochemical Constituents and Yield of Faba Bean Plant Grown under Newly Reclaimed Sandy Soil”, *World Journal of Agricultural Sciences*, 9 (4): 335-344, (2013).
- [193] Prochazkova, D., Sairam, R. K., Srivastava, G. C., Singh, D. V., “Oxidative stress and antioxidant activity as the basis of senescence in maize leaves”, *Plant Science* , 161: 765–771, (2001).
- [194] Karataş, İ., Öztürk, L., Erşahin Y., ve Okatan, Y., “Effects of auxin on photosynthetic pigments and some enzyme activities during dark-induced senescence of *tropaeolum* leaves”, *Pak. J. Bot.*, 42 (3): 1881-1888, (2010).
- [195] Li, H., Wang, G., Liu, S., An, Q., Zheng, Q., Li, B., Li Z., “Comparative changes in the antioxidant system in the flag leaf of early and normally senescing near-isogenic lines of wheat (*Triticum aestivum* L.) ”, *Plant Cell Rep.*, 33: 1109–1120, (2014).
- [196] Gören, N., and Çağ, S., “The Effect of Indole-3-Acetic Acid and Benzyladenine on Sequential Leaf Senescence on *Helianthus Annuus* L. Seedlings”, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*”, 21 (3): 322-327, (2007).
- [197] Aharoni, N., “Interrelationship between ethylene and growth regulators in the senescence of lettuce leaf discs“, *J Plant Grow. Regul.*, 8: 309-317, (1989).
- [198] Misra, A. N., and Biswall, U. C., “Effects of phytohormones on chlorophyll degradation during aging of chloroplast *In vivo* and *In vitro*. *Protoplasma* “, 105: 1615-1602, (1980).

- [199] Farooq, U. and Bano, A., “Effect of abscisic acid and chlorocholine chloride on nodulation and biochemical content of *Vigna radiata* L. under water stress“, Pak. J. Bot., 38 (5): 1511-1518, (2006).
- [200] Mitrovic, A., and Bogdanovic, J., “Effect of gibberellic acid on total antioxidant activity during *Chenopodium rubrum* L. ontogenesis invitro”, Arch. Biol. Sci., 61 (1); 49-55, (2009).
- [201] Trivellini, A., Vernieri, P., Ferrante, A., and Serra, G., “Physiological characterization of flower senescence in long life and ephemeral hibiscus (*Hibiscus rosasinensis* L.)“, Acta Hort., 755: 457-464, (2007).
- [202] Sahandi, S. M., Sorooshzadeh, A., Rezazadeh, H. S., and Naghdibadi, H. A., “Effect of nano silver and silver nitrate on seed yield of borage”, Journal of Medicinal Plants Research, 5 (2): 171-175, (2011).
- [203] Desai, R., Patel, R., and Mankad, A., “Petal senescence in cut *Tagetes erecta* L. flowers: role of phenolics”, International Journal of Science, Environment and Technology, 5: 485 – 490, (2012).
- [204] Waseem, S., and Inayatullah, T., “Effect of cycloheximide on senescence and postharvest performance of *Ranunculus asiaticus* L. “, Pak. J. Bot., 42 (5): 3577-3585, (2011).
- [205] Bhattacharjee, S. K., “Post harvest life and quality of rose cut flowers as affected by precooling, storage and gamma irradiation“, Indian Rose Annual, 19: 116-143, (2003).
- [206] Takahama, U., and Oniki, T., “A peroxidase/phenolics/ascorbate system can scavenge hydrogen peroxide in plant cells“, Physiol. Plant., 101: 845–852, (1997).
- [207] Gill, S. S., and Tuteja, N., “Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants”, Plant Physiology and Biochemistry, 48 (12): 909–930, (2010).
- [208] Kukavica, B., and Jovanovic, S. V., “Senescence-related changes in the antioxidant status of ginkgo and birch leaves during autumn yellowing”, Physiologia plantarum, 122: 321–327, (2004).
- [209] El-Gaied, L. F., Abu El-Heba, G. A. ve El-Sherif, N. A., “Effect of growth hormones on some antioxidant parameters and gene expression in tomato”, GM Crops and Food: Biotechnology in Agriculture and the Food Chain 4 (1): 67-73, (2013).

- [210] Lei, Z., Mingyu, S., Xiao, W., Chao, L., Chunxiang, Q., Liang, C., Hao, H., Xiaoqing, L., Fashui, H., “Antioxidant stress is promoted by nano-anatase in spinach chloroplasts under UV-B radiation“, *Biol Trace Elem Res*, 121: 69–79, (2008).
- [211] Debasis, C., Chatterjee, J., Datta, S. K., “Oxidative stress and antioxidant activity as the basis of senescence in chrysanthemum florets“, *Plant Growth Regul.*, 53: 107–115, (2007).
- [212] DIXIT, V., Pandey, V., Shyam, R., “Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L.)”, *Journal of Experimental Botany.*, 52 (358): 1101-1109, (2001).
- [213] Mittiova, V., Tal, M., Volokita, M. and Guy, M., “Salt stress induces upregulation of an efficient chloroplast antioxidant system in the salt-tolerant wild tomato species *Lycopersicon pennellii* but not in the cultivated species”, *Physiologia Plantarum*, 115: 393-400, (2002).
- [214] Dertinger, U., Schaz, U., Schulze, E. D., “Age-dependence of the antioxidative system in tobacco with enhanced glutathione reductase activity or senescence-induced production of cytokinins“, *Physiol. Plant.*, 119: 19-29, (2003).
- [215] Srivalli, B., Khanna-Chopra, R., “Induction of new isoforms of superoxide dismutase and catalase enzymes in the flag leaf of wheat during monocarpic senescence“, *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 288: 1037-1042, (2001).
- [216] Jimenez, A., Hernandez, J.A., Pastori, G., Del Río, L.A., Sevilla, F. “Role of ascorbate-glutathione cycle of mitochondria and peroxisomes in the senescence of pea leaves“, *Plant Physiol.*, 118: 1327-1335, (1998).
- [217] Casano, L. M., Martin, M., and Sabater, B., “Sensitivity of Superoxide Dismutase Transcript levels and Activities to Oxidative Stress Is lower in Mature-Senescent Than in Young Barley leaves”, *Plant Physiol.*, 106: 1033-1039, (1994).

EKLER

Ek 1. *T. aestivum* L. (Gün-91) çeşidinin yapılan uygulamalar sonrasındaki fide boylarına ait varyans analizi sonuçları

Değişiklik Kaynağı	Serbestlik derecesi	Standart sapma	Kareler ortalaması	F oranı	f tablo değ. 0,05	f tablo değ. 0,01
Gümüş **	1	130,7	130,7	30,8	4,49	8,53
Uyarıcı *	3	42,8	14,3	3,4	3,24	5,59
Etkileşim **	3	292,3	97,4	22,9	3,24	5,59
Hata	16	68	4,25			
Toplam	23	533,8				

Ek 2. Yapılan uygulamalar sonrasındaki Oransal Su İçeriği (RWC) ait varyans analizi sonuçları

Değişiklik Kaynağı	Serbestlik derecesi	Standart sapma	Kareler ortalaması	F oranı	f tablo değ. 0,05	f tablo değ. 0,01
Gümüş	1	1,9	1,9	0,1	4,49	8,53
Uyarıcı	3	128,9	43,0	1,8	3,24	5,59
Etkileşim	3	95,8	31,9	1,3	3,24	5,59
Hata	16	391,7	24,48125			
Toplam	23	618,3				

Ek 3. Yapılan uygulamalar sonrasındaki Klorofil-a miktarına ait varyans analizi sonuçları

Değişiklik Kaynağı	Serbestlik derecesi	Standart sapma	Kareler ortalaması	F oranı	f tablo değ. 0,05	f tablo değ. 0,01
Gümüş **	1	50848,4	50848,4	14,4	4,49	8,53
Uyarıcı **	3	300749,1	100249,7	28,4	3,24	5,59
Etkileşim *	3	51615	17205,0	4,9	3,24	5,59
Hata	16	56577,6	3536,1			
Toplam	23	459790,1				

* İstatistiksel olarak % 5 düzeyinde önemli ($p \leq 0,05$)

** İstatistiksel olarak % 1 düzeyinde önemli ($p \leq 0,01$)

Ek 4. Yapılan uygulamalar sonrasındaki Klorofil-b miktarına ait varyans analizi sonuçları

Değişiklik Kaynağı	Serbestlik derecesi	Standart sapma	Kareler ortalaması	F oranı	f tablo değ. 0,05	f tablo değ. 0,01
Gümüş	1	163597,6	163597,6	0,4	4,49	8,53
Uyarıcı	3	2223852	741284,1	1,7	3,24	5,59
Etkileşim	3	104050,5	34683,5	0,1	3,24	5,59
Hata	16	56577,6	444476,1			
Toplam	23	2935976				

Ek 5. Yapılan uygulamalar sonrasındaki Klorofil-a/b miktarına ait varyans analizi sonuçları

Değişiklik Kaynağı	Serbestlik derecesi	Standart sapma	Kareler ortalaması	F oranı	f tablo değ. 0,05	f tablo değ. 0,01
Gümüş **	1	0,0	0,0	0,0	4,49	8,53
Uyarıcı	3	0,8	0,3	7,1	3,24	5,59
Etkileşim	3	0,1	0,0	0,9	3,24	5,59
Hata	16	0,6	0,04			
Toplam	23	1,5				

Ek 6. Yapılan uygulamalar sonrasındaki toplam klorofil miktarına ait varyans analizi sonuçları

Değişiklik Kaynağı	Serbestlik derecesi	Standart sapma	Kareler ortalaması	F oranı	f tablo değ. 0,05	f tablo değ. 0,01
Gümüş **	1	396833,9	396833,9	17,4	4,49	8,53
Uyarıcı **	3	4142185	1380728,2	60,6	3,24	5,59
Etkileşim	3	80537,9	26846,0	1,2	3,24	5,59
Hata	16	364726,5	22795,41			
Toplam	23	4984283				

* İstatistiksel olarak % 5 düzeyinde önemli ($p \leq 0,05$)

** İstatistiksel olarak % 1 düzeyinde önemli ($p \leq 0,01$)

Ek 7. Yapılan uygulamalar sonrasındaki β -karoten miktarına ait varyans analizi sonuçları

Değişiklik Kaynağı	Serbestlik derecesi	Standart sapma	Kareler ortalaması	F oranı	f tablo değ. 0,05	f tablo değ. 0,01
Gümüş **	1	400,2	400,2	3,0	4,49	8,53
Uyarıcı	3	2672,5	890,8	6,6	3,24	5,59
Etkileşim	3	112,5	37,5	0,3	3,24	5,59
Hata	16	2162,7	135,1688			
Toplam	23	5347,8				

Ek 8. Yapılan uygulamalar sonrasındaki ksantofil miktarına ait varyans analizi sonuçları

Değişiklik Kaynağı	Serbestlik derecesi	Standart sapma	Kareler ortalaması	F oranı	f tablo değ. 0,05	f tablo değ. 0,01
Gümüş	1	4056,0	4056,0	1,0	4,49	8,53
Uyarıcı	3	14316	4772,0	1,1	3,24	5,59
Etkileşim	3	244	81,3	0,0	3,24	5,59
Hata	16	67248	4203			
Toplam	23	85864				

Ek 9. Yapılan uygulamalar sonrasındaki toplam antioksidan kapasiteye ait varyans analizi sonuçları

Değişiklik Kaynağı	Serbestlik derecesi	Standart sapma	Kareler ortalaması	F oranı	f tablo değ. 0,05	f tablo değ. 0,01
Gümüş**	1	20533,5	20533,5	10,6	4,49	8,53
Uyarıcı **	3	95385,8	31795,3	16,4	3,24	5,59
Etkileşim *	3	25129,8	8376,6	4,3	3,24	5,59
Hata	16	31006,7	1937,919			
Toplam	23	183555,8				

* İstatistiksel olarak % 5 düzeyinde önemli ($p \leq 0,05$)

** İstatistiksel olarak % 1 düzeyinde önemli ($p \leq 0,01$)

Ek 10. Yapılan uygulamalar sonrasındaki toplam çözünür fenol miktarlarına ait varyans analizi sonuçları

Değişiklik Kaynağı	Serbestlik derecesi	Standart sapma	Kareler ortalaması	F oranı	f tablo değ. 0,05	f tablo değ. 0,01
Gümüş **	1	1450416,7	1450416,7	155,4	4,49	8,53
Uyarıcı **	3	2603333	867777,8	93,0	3,24	5,59
Etkileşim *	3	151250	50416,7	5,4	3,24	5,59
Hata	16	149333,3	9333,331			
Toplam	23	5698333				

Ek 11. Yapılan uygulamalar sonrasındaki toplam çözünür protein miktarlarına ait varyans analizi sonuçları

Değişiklik Kaynağı	Serbestlik derecesi	Standart sapma	Kareler ortalaması	F oranı	f tablo değ. 0,05	f tablo değ. 0,01
Gümüş **	1	451552,7	451552,7	29,8	4,49	8,53
Uyarıcı**	3	4329815,3	1443271,8	95,3	3,24	5,59
Etkileşim**	3	305410	101803,3	6,7	3,24	5,59
Hata	16	242187,3	15136,71			
Toplam	23	7508655,3				

Ek 12. Yapılan uygulamalar sonrasındaki Katalaz enzimi aktivitesine ait varyans analizi sonuçları

Değişiklik Kaynağı	Serbestlik derecesi	Standart sapma	Kareler ortalaması	F oranı	f tablo değ. 0,05	f tablo değ. 0,01
Gümüş **	1	29120,0	29120,0	23,9	4,49	8,53
Uyarıcı **	3	113344,7	37781,6	31,0	3,24	5,59
Etkileşim **	3	128301,3	42767,1	35,1	3,24	5,59
Hata	16	19492,9	1218,306			
Toplam	23	290259,6				

* İstatistiksel olarak % 5 düzeyinde önemli ($p \leq 0,05$)

** İstatistiksel olarak % 1 düzeyinde önemli ($p \leq 0,01$)

Ek 13. Yapılan uygulamalar sonrasındaki SOD enzimi aktivitesine ait varyans analizi sonuçları

Değişiklik Kaynağı	Serbestlik derecesi	Standart sapma	Kareler ortalaması	F oranı	f tablo değ. 0,05	f tablo değ. 0,01
Gümüş **	1	1263,3	1262,3	5,0	4,49	8,53
Uyarıcı **	3	19301	6433,7	25,4	3,24	5,59
Etkileşim**	3	19840,1	6613,4	26,2	3,24	5,59
Hata	16	12046	252,875			
Toplam	23	52451				

Ek 14. Yapılan uygulamalar sonrasındaki Cu/Zn SOD enzimi aktivitesine ait varyans analizi sonuçları

Değişiklik Kaynağı	Serbestlik derecesi	Standart sapma	Kareler ortalaması	F oranı	f tablo değ. 0,05	f tablo değ. 0,01
Gümüş **	1	1782,5	1782,5	35,7	4,49	8,53
Uyarıcı **	3	5831	1943,7	39,0	3,24	5,59
Etkileşim **	3	6790,6	2263,5	45,4	3,24	5,59
Hata	16	797,8	49,8625			
Toplam	23	22374,8				

Ek 15. Yapılan uygulamalar sonrasındaki Cu/Zn SOD geninin ifadesine ait varyans analizi sonuçları

2^ddCT Relatif Ekspresyon	Uygulamalar	Expression	Type	Reaction Efficiency	Std. Error	95% C.I.	P(H1)
KONTROL	1						
AG **	2,049114	1,035	TRG	1	0,443 - 3,385	0,432 - 3,449	0,998
KARANLIK	8,299359	3,053	TRG	1	1,320 - 8,928	1,106 - 12,294	0,084
KARANLIK+Ag**	8,938297	3,16	TRG	1	1,424 - 10,033	1,167 - 11,879	0,075
IAA 50 ppm	9,031715	3,175	TRG	1	1,396 - 9,854	1,189 - 11,944	0,08
IAA 50 ppm+Ag	3,6782	1,879	TRG	1	0,879 - 6,256	0,691 - 6,917	0,573
IAA 100 ppm **	50,91433	5,67	TRG	1	2,423 - 18,083	2,298 - 19,629	0,088
IAA 100 ppm+Ag **	89,44941	6,483	TRG	1	2,942 - 21,324	2,471 - 23,235	0,084

* İstatistiksel olarak % 5 düzeyinde önemli ($p \leq 0,05$)

** İstatistiksel olarak % 1 düzeyinde önemli ($p \leq 0,01$)

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Mert ÖKTEM

Doğum Tarihi: 12/01/1990

Öğrenim Durumu: Lisans Mezunu

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lise	Matematik-Fen	Batıkent Lisesi	2004-2007
Lisans	Biyoloji Bölümü	Sakarya Üniversitesi Fen- Edebiyat Fakültesi	2008- 2012
Yüksek Lisans	Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı	Mersin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü	2014-

(Varsa) Görevler:

Görev Unvanı	Görev Yeri	Yıl
Arş. Gör.	Mersin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü	2014-