T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MERCİMEK (*Lens culinaris* MEDIK.) TOHUMLARININ ÇİMLENMESİ VE ERKEN FİDE BÜYÜMESİ ÜZERİNE NİTRİK OKSİTİN (NO) ETKİLERİ

Ekrem KERKÜTLÜOĞLU

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ŞANLIURFA
2007

Yrd. Doç. Dr. Esat ÇETİN ve İkinci Danışman Doç. Dr. Gül CEVAHİR ÖZ danışmanlığında, Ekrem KERKÜTLÜOĞLU'nun hazırladığı "Mercimek (*Lens culinaris* Medik.) Tohumlarının Çimlenmesi ve Erken Fide Büyümesi Üzerine Nitrik Oksitin (NO) Etkileri" konulu bu çalışma 22/06/2007 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Yrd. Doç. Dr. Esat ÇETİN

Üye : Prof. Dr. Atilla GÜR

Üye : Yrd. Doç. Dr. Mahmut DOĞAN

Bu Tezin Biyoloji Ana Bilim Dalında Yapıldığını ve Enstitümüz Kurallarına Göre Düzenlediğini onaylarım.

Prof. Dr. İbrahim BOLAT
Enstitü Müdürü

Bu çalışma HÜBAK tarafından desteklenmiştir.
Proje No: 754

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

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZ i
ABSTRACT ii
TEŞEKKÜR iii
ŞEKİLLER DİZİNİ iv
ÇİZELGELER DİZİNİ v
SİMGELER DİZİNİ vi
1. GİRİŞ 1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 4
2.1. Bitkilerde Nitrik Oksit Kavramı 4
2.1.1. Nitrik oksitin kimyasal özellikleri 4
2.1.2. Nitrik oksit metabolizması 5
2.1.3. Nitrik oksitin bitki büyüme ve gelişimi üzerine etkisi 8
2.1.4. Nitrik oksit ile hormonlar arasindaki ilişki 10
2.1.5. Biyotik ve abiyotik stres koşullarinda nitrik oksitin rolü 11
2.2. Tohum ve Çimlenmesi 13
2.2.1. Tohum yapısı kimyasal bileşimi ve önemi 13
2.2.2. Tohum dormansisi 14
2.2.3. Çimlenen tohumların metabolizması ve çimlenmeye etki eden faktörler 16
3. MATERYAL ve YÖNTEM 20
3.1. *Lens culinaris* Medik. Tohumlarının Çimlendirilmesi ve Fidelerin Yetiştirilmesi 20
3.2. Çimlenme Yüzdesi 21
3.3. Büyümenin Ölçülmesi 22
3.4. Taze ve Kuru Ağırlık Ölçülmesi 22
3.5. Çözünebilir Total Protein Miktarının Tayini 22
3.6. Amilaz Aktivitesinin Tayini 22
3.7. Asit Fosfataz Aktivitesinin Tayini 23
3.8. Asit ve Nötral Proteaz Aktivitesi Tayini 23
3.9. Klorofil ve Karotinoid Tayini 24
3.10. Antosiyanin Tayini 24
3.11. İstatistiksel Hesaplamalar 24
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA 26
4.1. Nitrik Oksitin Tohum Çimlenmesine Etkisi 26
4.2. Nitrik Oksitin Primer Kök Uzunluğuna Etkisi 28
4.3. Nitrik Oksitin Çözünebilir Total Protein Miktarına Etkisi 30

4.4. Nitrik Oksitin Amilaz Aktivitesine Etkisi 33
4.5. Nitrik Oksitin Asit Fosfataz Aktivitesine Etkisi 36
4.6. Nitrik Oksitin Asit Proteaz Aktivitesine Etkisi 38
4.7. Nitrik Oksitin Nötral Proteaz Aktivitesine Etkisi 39
4.8. Nitrik Oksitin Fide Büyümesine Etkisi 42
4.9. Nitrik Oksitin Taze ve Kuru Ağırlığa Etkisi 46
4.10. Nitrik Oksitin Klorofil ve Karotinoid İçeriğine Etkisi 49
4.11. Nitrik Oksitin Antosiyanin İçeriğine Etkisi 52
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER 55
KAYNAKLAR 60
ÖZGEÇMİŞ 69
ÖZET 70
SUMMARY 71

ÖZ

Yüksek Lisans Tezi

MERCİMEK (*Lens culinaris* Medik.) TOHUMLARININ ÇİMLMENMESİ VE ERKEN FİDE BÜYÜMESİ ÜZERİNE NİTRİK OKSİTİN (NO) ETKİLERİ

Ekrem KERKÜTLÜOĞLU

Harran Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Yrd. Doç. Dr. Esat ÇETİN
İkinci Danışman : Doç. Dr. Gül CEVAHİR
Yıl: 2007, Sayfa: 71

Bu çalışma, mercimek (Lens culinaris Medik.) tohumlarının çimlenmesi ve erken fide büyümesi üzerine Nitrik Oksitin (NO) etkilerinin incelenmesi amacıyla yapılmıştır. Deneylerde NO vericisi olarak SNP (sodium nitroprusside) kullanılmıştır. Tohumlar kontrol (distile su) ve deney grupları olarak da 0.01 µM, 100 µM, 600 µM ve 700 µM SNP konsantrasyonları ile 1 gece ön işlemi ardışık petri kaplarında etüvde karanlıkta çimlenmeye bırakılmıştır. Çimlenen tohumlarda radikulanın testadan dışarı çıkışı çimlenme kriteri olarak kabul edilmiştir. Çimlenmiş tohumlar fide büyümesi için perlit ortamında büyüme odasında 12 gün boyunca yetiştirilmiştir ve bu aşamada fidelere 100 µM, 600 µM ve 700 µM SNP konsantrasyonları uygulanmıştır. Mercimek tohumlarının, farklı SNP konsantrasyonlarında 24, 48 ve 72. saatteki çimlenme yüzdeleri, fide büyümesi (primer kök ve sürgün boyu, taze ve kuru ağırlık), çözülebilir total protein miktarı amilaz, asit fosfataz, proteaz gibi enzimlerin aktivitelerine ve pigment içeriklerine olan etkileri spektrofotmetrik parametrelere bakılarak incelenmiştir. Sonuç olarak, 100 µM SNP in çimlenme, primer kök uzunluğu, asit proteaz aktivitesi, gövde taze-kuru ağırlık, kök ve gövdede antosiyanin içeriğini teşvik ettiği saptanmıştır. Nötral proteaz aktivitesi üzerine en fazla 600 µM SNP etkili iken, çözünebilir total protein miktarı, fide büyümesi, kök taze-kuru ağırlık ile gövde klorofil ve karotinoid içeriği üzerine 700 µM SNP in etkili olduğu bulunmuştur. Bu tez çalışmasında elde edilen bulgulara dayanılarak mercimek tohumlarının çimlenme ve büyüme sürecinde NO in konsantrasyona bağlı olarak dikkate değer bir etkiye sahip olduğu ileri sürülebilir.

ANAHTAR KELİMELER: Nitrik oksit, sodyum nitroprussid, mercimek, çimlenme, büyüme

ABSTRACT

Master Thesis

THE EFFECTS OF NITRIC OXIDE (NO) ON THE GERMINATON OF LENTIL (*Lens culinars* Medik.) SEEDS AND EARLY SEEDLING GROWTH

Ekrem KERKÜTLÜOĞLU

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

Supervisor : Assist. Prof. Dr. Esat ÇETİN
Co-Advisor : Assoc. Prof. Dr. Gül CEVAHİR
Year: 2007, Page: 71

The aim of this study is to inspect the effects of Nitric Oxide on the germination of lentil (*Lens culinaris* L) seeds and early seedling growth. SNP (sodium nitroprusside) was employed in the experiment as a provider of NO. The seeds were left to germination in darkness in control group (distilled water) and experiment groups (following pretreatment with respective SNP concentrations of 0.01 µM, 100 µM, 600 µM, and 700 µM) in petri plates in the incubator. Germination criterion was accepted as the projection of the radicles from the testae. Germinated seeds were kept in perlite medium for 12 hours in the growth room for seedling growth, during this phase respective SNP concentrations of 100 µM, 600 µM, and 700 µM were applied to the seedlings. The germination rates of lentil seeds in different SNP concentrations, germination rates at 24^{th}, 48^{th}, and 72^{nd} hours, seedling growth (primary lengths of roots and shoots, fresh and dry weights) and pigment content, total dissoluble amounts of protein, and the effects of enzymes such as amylase, acid phosphatase and protease on their activities were inspected via examination of spectrophotometric parameters. Consequently it was determined that 100 µM SNP promoted germination, primary root length, acid protease activity, fresh-dry weights of stems, and anthocyanin content in both the root and the stem. The most effective concentration of SNP on neutral protease activity was found to be 600 µM, and a concentration of 700 µM SNP was found to be effective on the amount of dissoluble total protein, seedling growth, root fresh-dry weights, and chlorophyll and carotenoid content of the stem. In the light of the findings obtained in this thesis study, it can be claimed that depending on the concentration, NO has a noteworthy effect on the germination and growth process of lentil seeds.

KEY WORDS: Nitric oxide, sodium nitroprusside, lentil, germination, growth

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 2.1.	Nitrik Oksitin muhtemel biyosentez yolları……..	5
Şekil 4.1.	Kontrol ve farklı SNP konsantrasyonları uygulanmış mercimek tohumlarının 24. saat deki çimlenme yüzdelerinin karşılaştırılması.....	27
Şekil 4.2.	Kontrol ve farklı SNP konsantrasyonları uygulanmış mercimek tohumlarının 24, 48, ve 72. saatteki primer kök uzunluklarının karşılaştırılması……..	29
Şekil 4.3.	Kontrol ve farklı SNP konsantrasyonları uygulanmış mercimek tohumlarının 0, 24, 48 ve 72. saatteki total protein miktarlarının karşılaştırılması……	32
Şekil 4.4.	Kontrol ve farklı SNP konsantrasyonları uygulanmış mercimek tohumlarının 0, 24, 48 ve 72. saatteki amilaz aktivitelerinin karşılaştırılması ……..	34
Şekil 4.5.	Kontrol ve farklı SNP konsantrasyonları uygulanmış mercimek tohumlarının 0, 24, 48 ve 72. saatteki asit fosfataz aktivitelerinin karşılaştırılması ….....	37
Şekil 4.6.	Kontrol ve farklı SNP konsantrasyonları uygulanmış mercimek tohumlarının 0, 24, 48 ve 72. saatteki asit proteaz aktivitelerinin karşılaştırılması……...	39
Şekil 4.7.	Kontrol ve farklı SNP konsantrasyonları uygulanmış mercimek tohumlarının 0, 24, 48 ve 72. saatteki nötral proteaz aktivitelerinin karşılaştırılması……	41
Şekil 4.8.	Kontrol ve farklı SNP konsantrasyonları uygulanmış mercimek fidelerinin 3. gündeki genel görünümü……...	42
Şekil 4.9.	Kontrol ve farklı SNP konsantrasyonları uygulanmış mercimek fidelerinin 12. gündeki genel görünümü……	43
Şekil 4.10.	Kontrol ve farklı SNP konsantrasyonları uygulanmış mercimek fidelerinin kök, gövde ve fide uzunluklarının karşılaştırılması……	45
Şekil 4.11.	Kontrol ve farklı SNP konsantrasyonları uygulanmış mercimek fidelerinin köke ait taze ve kuru ağırlık değerlerinin karşılaştırılması ……..	47
Şekil 4.12.	Kontrol ve farklı SNP konsantrasyonları uygulanmış mercimek fidelerinin gövdeye ait taze ve kuru ağırlık değerlerinin karşılaştırılması……	49
Şekil 4.13.	Kontrol ve farklı SNP konsantrasyonları uygulanmış mercimek fidelerinin gövdeye ait total klorofil miktarlarının karşılaştırılması……...	50
Şekil 4.14.	Kontrol ve farklı SNP konsantrasyonları uygulanmış mercimek fidelerinin gövdeye ait karotinoid miktarlarının karşılaştırılması……..	52
Şekil 4.15.	Kontrol ve farklı SNP konsantrasyonları uygulanmış mercimek fidelerinin kök ve gövdeye ait antosiyanin miktarlarının karşılaştırılması…….	53

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 2.1	Bitkilerde Nitrik Oksitin görev aldığı bazı fizyolojik ve biyokimyasal olaylar……	10
Çizelge 3.1.	Hoagland çözeltisinin içeriği…….	21
Çizelge 4.1.	Kontrol ve farklı SNP konsantrasyonları uygulanmış mercimek tohumlarının 24. saatteki çimlenme yüzdeleri……	26
Çizelge 4.2	Kontrol ve farklı SNP konsantrasyonları uygulanmış mercimek tohumlarının 24, 48 ve 72. saatteki primer kök uzunlukları……...	28
Çizelge 4.3.	Kontrol ve farklı SNP konsantrasyonları uygulanmış mercimek tohumlarının 0, 24, 48 ve 72. saatteki total protein miktarları……	31
Çizelge 4.4.	Kontrol ve farklı SNP konsantrasyonları uygulanmış mercimek tohumlarının 0, 24, 48 ve 72. saatteki amilaz aktiviteleri……...	33
Çizelge 4.5.	. Kontrol ve farklı SNP konsantrasyonları uygulanmış mercimek tohumlarının 0, 24, 48 ve 72. saatteki asit fosfataz aktiviteleri…….	36
Çizelge 4.6.	Kontrol ve farklı SNP konsantrasyonları uygulanmış mercimek tohumlarının 0, 24, 48 ve 72. saatteki asit proteaz aktiviteleri……...	38
Çizelge 4.7.	Kontrol ve farklı SNP konsantrasyonları uygulanmış mercimek tohumlarının 0, 24, 48 ve 72. saatteki nötral proteaz aktiviteleri……...	40
Çizelge 4.8.	Kontrol ve farklı SNP uygulanmış mercimek fidelerinin kök, gövde ve fide uzunlukları…….……	44
Çizelge 4.9.	Kontrol ve farklı SNP konsantrasyonları uygulanmış mercimek fidelerinin köke ait taze ve kuru ağırlık değerleri……...	47
Çizelge 4.10.	Kontrol ve farklı SNP konsantrasyonları uygulanmış mercimek fidelerinin gövdeye ait taze ve kuru ağırlık değerleri…….	48
Çizelge 4.11.	Kontrol ve farklı SNP konsantrasyonları uygulanmış mercimek fidelerinin gövdeye ait total klorofil miktarları……..	50
Çizelge 4.12.	Kontrol, 100, 600 ve 700 µM SNP uygulanmış mercimek fidelerinin gövdeye ait karotinoid miktarları……..	51
Çizelge 4.13.	Kontrol ve farklı SNP konsantrasyonları uygulanmış mercimek fidelerinin kök ve gövdeye ait antosiyanin miktarları……	53
Çizelge 5.1	Mercimek tohumlarının çimlenmesi ve erken fide gelişimi üzerine 0.01 µM, 100 µM, 600 µM ve 700 µM SNP konsantrasyonlarının kontrol grubu ile karşılaştırılması…….	56

SİMGELER DİZİNİ

ABA	Absisik Asit
Cd	Kadmiyum
cADPR	Siklik Adenin Di Fofat Riboz
cGMP	Siklik Guanil Mono fosfat
g	gram
GA	Gibberellik Asit
GC	Guanil Siklik
GTP	Guanil Tri Fosfat
H_2O_2	Hidrojen Peroksit
IAA	Indol-3-Asetik asit
kDa	Kilo Dalton
Mo	Molibden
NADP(H)	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NO	Nitrik Oksit
NO^+	Nitrozonyum İyonu
NO^-	Nitroksil Anyonu
NO_2^-	Nitrit
NO_3^-	Nitrat
NOS	Nitrik Oksit Sentaz
NR	Nitrat Redüktaz
$ONOO^-$	Peroksinitrit
PCD	Programlanmış Hücre Ölümü (Programmed Cell Death)
ROS	Aktif Oksijen Türleri (Reactive Oxygen Species)
SA	Salisik Asit
SNP	Sodyum Nitropurissid
SNAP	S-Nitroso-N-Asetil-Penisilamin
XOR	Ksantin Oksidoredüktaz
µg	Mikrogram
µM	Mikromolar
α	Alfa

1. GİRİŞ

Son yıllarda Nitrik Oksit (NO) molekülü, Bitki Fizyolojisi ile ilgilenen bilim adamlarının çalışma konuları arasında önemli bir yer tutmaktadır. NO in bitkilerde varlığı saptandıktan sonra günümüze kadar bu molekülün biyosentez yolları, kimyasal özellikleri, metabolizması, bitki büyüme ve gelişmesi üzerine olan etkileri, çeşitli biyotik ve abiyotik stres koşullarında nasıl etki ettiği hakkında oldukça detaylı bilgiler edinilmiştir. Bu bilgiler ışığında, bitkilerde haberci molekül olarak kabul edilen NO in bitkilerde yaprak genişlemesi, tohum çimlenmesi, deetiyolasyon, hipokotil ve internod uzaması, stoma hareketi, klorofil içeriği, fotosentez, senesens ve programlanmış hücre ölümü gibi önemli süreçlerde rol oynadığı saptanmıştır.

Bitkilerde başarılı bir fide büyümesi uygun koşullar altında çimlenme olayının hemen ardından ortaya çıkar. Bu nedenle tohum çimlenmesi bitki yaşam döngüsünün son derece önemli bir evresidir. Tohum çimlenmesi ile ilgili olarak elde edilen literatür bilgisine göre NO molekülü tohum çimlenmesi olayında da etkin bir şekilde rol oynamaktadır. Daha çok bitkilerde dormansi kırılması üzerine NO in etkisi çalışılmış olmakla birlikte çimlenme olayının diğer yönlerini de etkilediği bilinmektedir. Ancak bu konu ile ilgili olarak bazı eksik noktalar bulunmaktadır ve oldukça az sayıda kaynakla sınırlı kalmıştır. Bu nedenle bu çalışmanın yapılmasının başlıca amacı, bitkilerde bir büyüme düzenleyicisi olarak da görev yapan NO in kuru bakliyat olarak tüketilen mercimek bitkisinin çimlenme ve erken fide büyümesi aşamasında etkilerini incelemek ve literatür bilgisine katkıda bulunmaktır.

Ülkemiz tarımında önemli yer tutan mercimek bitkisi bu tez çalışmasında deney materyali olarak seçilmiştir. Tez çalışma konusu, Mercimek (*Lens culinaris* Medik.) tohumlarının çimlenmesi ve erken fide büyümesi üzerine Nitrik Oksitin (NO) etkilerinin araştırılmasıdır. Tezin "Kuramsal Temeller" kısmında NO ve çimlenme ile ilgili literatür incelemesi sonucu elde edilen bilgiler derlenmiştir ve çeşitli araştırıcıların yaptıkları çalışmaların ışığında dıştan uygulanan NO vericisi SNP in çimlenme olayındaki rolü ortaya konmuştur. "Materyal ve Metod" kısmında araştırmada kullanılan mercimek bitkisi hakkında kısa bir bilgi verildikten sonra

tohumların çimlendirilmesi, bitkilerin yetiştirilmesi, NO in uygulanması ve deneyde kullanılan metodlar detaylı bir şekilde anlatılmıştır. Yapılan uygulama ve deneyler sonucunda elde edilen veriler "Araştırma Bulguları ve Tartışma" kısmında çizelge ve şekillerde özetlenmiş ve diğer araştırıcıların bulguları ile karşılaştırılıp yorumlanmıştır.

Çimlenme deneylerinde mercimek tohumları 0.01 µM, 100 µM, 600 µM ve 700 µM SNP konsantrasyonları ve kontrol olarak da distile suda bir gece (12 saat) ön işleme tabi tutulmuşlardır. Tohumlar 3 gün boyunca 25±2 °C lik etüvde çimlenmeye bırakılmışlardır. Çimlenme süresince (24, 48 ve 72. saatlerde) çimlenme yüzdeleri ve primer kök uzunlukları alınmıştır. Ayrıca her bir deney için kullanılan 60 tohumun plumula ve radikulası kesilerek çıkartılmış ve geri kalan tohum kısmında ilgili metodlar kullanılarak total protein miktarı ile bazı enzim aktiviteleri tayin edilmiştir. Fide aşamasında ise çimlenen tohumlar perlit ortamında iklim odasında büyütülmüştür. Kullanılan SNP konsantrasyonları tam Hoagland besi çözeltisinde hazırlanmıştır ve bitkilere 3 gün ara ile verilmiştir. Fide aşamasında bitkilerin kök ve gövde uzunlukları, taze ve kuru ağırlıkları, total klorofil, karotinoid ve antosiyanin miktarı ölçülerek elde edilen sonuçlar değerlendirilmiştir.

Mercimek tohumlarının çimlenmesini 100 µM SNP in teşvik, 700 µM SNP in ise belirgin şekilde inhibe ettiği, primer kök uzamasında da 100 µM SNP in oldukça etkili olduğu bulunmuştur. Çözünebilir total protein miktarının tüm SNP uygulamalarında konsantrasyona paralel olarak kontrolün üzerinde olduğu gözlenmiştir ve en belirgin artış 700 µM SNP uygulamasında elde edilmiştir. 700 µM SNP in amilaz aktivitesini teşvik ettiği, tüm SNP uygulamalarının asit fosfataz aktivitesi üzerinde aynı etkiye sahip olduğu, asit ve nötral proteaz aktivitelerinin zamana ve konsantrasyona bağlı olarak değişkenlik gösterdiği saptanmıştır. Nötral proteaz aktivitesi üzerine en fazla 600 µM SNP etkili iken, çözünebilir total protein miktarı, fide büyümesi, kök taze-kuru ağırlık ile gövde klorofil ve karotinoid içeriği üzerine 700 µM SNP in etkili olduğu bulunmuştur. Fide büyümesinin 12. gününde 100 µM SNP in özellikle kök uzamasını, üzeri konsantrasyonların ise gövde uzamasını teşvik ettiği görülmüştür. Kök-gövde taze ağırlığında 100 ve 700 µM SNP in etkisi belirginken, kök-gövde kuru ağırlığında kontrol ile hemen hemen aynı

değerler elde edilmiştir. Klorofil ve karotinoid içeriğinde 700 μM SNP in teşvik edici etkisi, özellikle kökte 100 μM SNP in antosiyanin miktarını arttırdığı saptanmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1 Bitkilerde Nitrik Oksit Kavramı

Uzun yıllardan beri canlılarda varlığı bilinen Nitrik Oksit (NO: azot monoksit), yalnızca hayvanlarda değil, bitkiler üzerindeki etkileri ile de son yıllarda araştırıcıların önemli çalışma konular arasında yer almaktadır. Yakın zamana kadar bitkilerde NO ile ilgili çalışmalar azot oksitler tarafından oluşturulan atmosferik kirlenme üzerine yoğunlaşmıştır. Bitkilerde NO in salınımı ve bitki büyümesi üzerine olan etkileri ilk kez 1970'li yıllarda tanımlanmasına rağmen (Anderson ve Mansfield, 1979; Klepper, 1979), bu yıldan sonra NO ile ilgili çalışmalar Leshem (Leshem ve Haramaty, 1996) ve Lamattina (Laxalt ve ark., 1997) gibi birkaç öncü araştırmacı ile oldukça sınırlı kalmıştır. Günümüzde hem memelilerde hem de bitkilerde, hücrenin önemli anahtar haberci moleküllerinden biri olarak görülen NO in bitkilerin savunma mekanizmasında görev aldığı kanıtlandıktan sonra bitki biyolojisi ile ilgili çalışmalarda dikkate değer bir artış olmuştur (Durner ve Klessig, 1999; Beligni ve Lamattina, 2001a; Wendehenne ve ark., 2001; Neill ve ark., 2002b, 2003; Del Rio ve ark., 2004; Graziano ve Lamattina, 2005; Crawford ve Guo, 2005; Zhang ve ark., 2006a; Arasimowicza ve Floryszak-Wieczorek, 2007; Bethke ve ark., 2006; Wei ve ark., 2007).

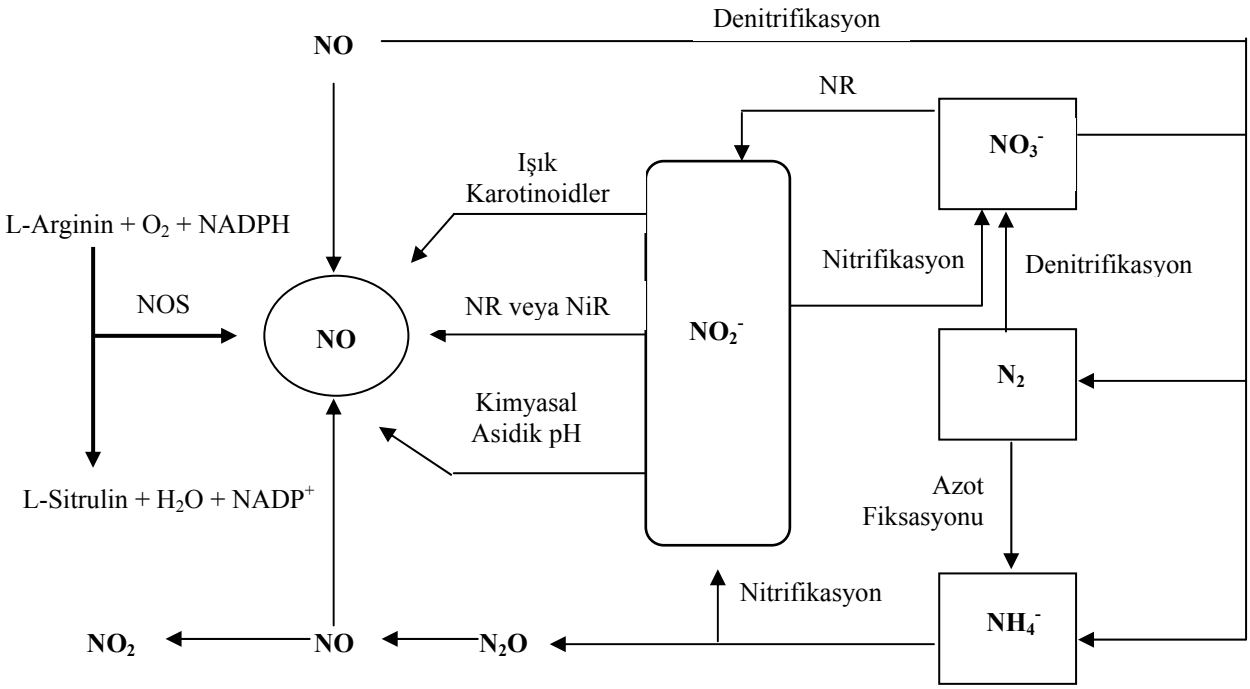
2.1.1. Nitrik oksitin kimyasal özellikleri

NO bir azot atomu ve bir oksijen atomunun birleşmesiyle oluşan, lipofilik özelliğinden dolayı hücre membranlarından kolayca difüzyona uğrayabilen, renksiz, gaz yapıda küçük bir moleküldür. Ayrıca çiftlenmemiş elektron taşıması nedeniyle serbest radikal olarak kabul edilen NO başka moleküllerle kuvvetli reaksiyonlara girebilen, birkaç saniye yarı ömrü olan fizyolojik haberci molekül olarak tanımlanmaktadır (Durner ve Klessig, 1999; Neill ve ark., 2002a). NO tek başına yüksek konsantrasyonlarda dahi hücrelere zarar vermez (Pryor ve Squadrito, 1995)

ancak hücrelerde kontrolsüz üretim ile artan NO, süperoksit anyonları ile reaksiyona girerek peroksinitriti ($ONOO^-$) meydana getirmesi sonucunda toksik etki gösterebilmektedir. NO in reseptör molekülleri aktive etmediği, bunun yerine birkaç farklı mekanizma yolu ile hedef moleküllere kovalent olarak bağlanarak hücrelerin yaşaması için temel biyokimyasal süreçlerden biri olan mitokondrilerdeki solunumu baskıladığı, demir sülfür içeren enzimlerle ilişkiye girerek bunların etkinliğini engellediği ve DNA da yıkımlara yol açtığı da bilinmektedir (Van der Viet ve ark., 1996; Stöhr ve Ullrich, 2002).

2.1.2. Nitrik oksit metabolizması

Bitkilerin sadece atmosferik NO e karşı cevaplar oluşturmadığı, aynı zamanda normal koşullarda bitki hücrelerinin endojen olarak az miktarda NO i ürettikleri de bulunmuştur (Wildt ve ark., 1997). NO sentezinin bitki türüne, dokusuna yetişme ortamına bağlı olarak değiştiği, sitosol, nukleus, peroksizom matriksi ve kloroplastlarda üretildiği gösterilmiştir (Barroso ve ark., 1999; Pedroso ve ark., 2000). Bitkilerde NO enzimatik ve enzimatik olmayan iki farklı metabolik yol ile sentezlenmektedir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Nitrik Oksitin muhtemel biyosentez yolları (Wojtaszek, 2000)

Enzimatik yollardan birinde, nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi tarafından L-argininin L-sitruline katalizlenmesi sonucu NO sentezlenmektedir. Tütün, soya fasulyesi, bezelye, mısır, buğday gibi bazı dikotil ve monokotil bitkilerde biyokimyasal, immunolojik ve moleküler teknikler kullanılarak NOS aktivesinin olduğu rapor edilmiştir (Kuo ve ark., 1995; Sen ve Cheema, 1995; Ninneman ve Maier, 1996; Ribeiro ve ark., 1999; Del Rio ve ark., 2004; Crawford, 2006). Ayrıca Cueto ve ark. (1996) *Lupinus albus* kök ve nodüllerinde NOS a benzer bir enzim aktivitesinin varlığını da bildirmişlerdir. Ayrıca mısır fidelerinin kök ucu ve genç yapraklarında 116 kDa luk NOS a benzer bir protein saptanmıştır (Ribeiro ve ark., 1999). Bütün bu verilerin yanı sıra, bazı bitkilerin yaprak ekstratlarında ve dokunulmamış dokularda NOS inhibitörlerinin, NO sentezi üzerine hiçbir etkisi olmadığını savunan araştırıcılar da bulunmaktadır (Clarke ve ark., 2000; Rockel ve ark., 2002). Diğer enzimatik yolda ise NO üretiminin başlıca kaynağı NADP(H) a bağımlı nitrat redüktaz (NR) enzimidir. Kofaktör olarak molibden (Mo) içeren bu enzim elektron vericisi NADP(H) ı kullanarak NO_2 den NO üretimini katalizlemektedir (Harper, 1981; Dean ve Harper, 1986; Yamasaki ve Sakihama, 2000; Rockel ve ark., 2002). *Phytophtora infestans* mantarı ile enfekte olmuş patates tuberlerinde, bazı stres koşulları altında ayçiceği ve mısır bitkisinde, ıspanak yapraklarında NR aktivitesine bağlı olarak NO üretiminin artabileceği ileri sürülmüştür (Rockel ve ark., 2002; Yamamoto ve ark., 2003). Bitkilerde NO üretiminin diğer enzimatik kaynakları ksantin oksidoredüktaz (XOR), peroksidaz, sitokrom P450 ve bazı Fe içeren proteinler olabilir. XOR ın bezelye yaprak peroksizomlarında bulunduğu ve bitkilerde haberci molekül olarak NO üretiminde anahtar rol oynadığı gösterilmiştir (Corpas ve ark., 2002). Peroksidaz enziminin hem N-hidroksiarginin ve H_2O_2 den NO ürettiği rapor edilmiştir (Boucher ve ark., 1992a; Huang ve ark., 2002b; Veicht, 2004).

Apoplastik alanlarda ve kloroplastlarda meydana geldiği bilinen NO in varlığı enzimatik olmayan yol ile NO_2 in askorbik asitle (pH 3-6) kimyasal olarak indirgenmesi sonucu arpa alevron hücrelerinde gösterilmiştir (Henry ve ark., 1997; Horemans ve ark., 2000; Stöhr ve Ullrich, 2002). Ayrıca NO karotinoidler tarafından NO_2 in ışıga bağımlı yolla indirgenmesi ile de oluşabilir (Cooney ve ark., 1994). Nitrifikasyon ve denitrifikasyon diğer bir alternatif kaynak olarak en önemli NO

üretim süreçlidir (Bollmann ve ark., 1999). Bununla birlikte NO, bitkilere dıştan uygulanan sodyum nitropurissid (SNP) ve S-nitroso-N-asetil-penisilamin (SNAP) gibi NO vericilerinden (donörlerinden) enzimatik olmayan şekilde de ortaya çıkar (Leshem, 1996).

NO biyolojik sistemlerde O_2 ile kuvvetli reaksiyona girdiğinde nitrozonyum iyonu (NO^+), nitroksil anyonu (NO^-), nitrit (NO_2^-), nitrat (NO_3^-), peroksinitrit ($ONOO^-$) gibi "aktif azot oksit türleri" meydana gelir. Lipid, protein ve DNA da yıkıma neden olan, güçlü oksidan özellik gösteren peroksinitrit gibi radikal özellik taşıyan azot oksit türleri aktif ve kısa ömürlü iken, nitrit (NO_2^-) ve nitrat (NO_3^-) ise NO oksidasyonunun kararlı son ürünleridir (Yamasaki ve ark., 1999; Garces ve ark., 2001). Hücrede NO aktif oksijen türleriyle (H_2O_2, OH^-, O_2^-, $ONOO^-$ vb.) kimyasal reaksiyona girdiğinde ise toksik ya da koruyucu etki gösterir. Ayrıca NO ve hücre içi antioksidan sistem (glutatyon, askorbat, karotinoidler ile antioksidan enzimler) arasında dolaylı bir koruyucu sinyal iletim yolu da mevcuttur (Beligni ve Lamattina, 1999a, b). NO üretimi ve salınması aşırı miktardaki serbest radikallerin ortamdan uzaklaştırılması için diğer detoksifikasyon mekanizmalarına ilave olarak en etkili yoldur (Gould ve ark., 2003).

NO kolaylıkla difüzyon edebilmesine rağmen, uzun ya da kısa mesafede NO öncü maddeleri olarak da taşınmaktadır (Jackson, 2002). Örneğin, bitki hücrelerinde NO in öncü maddesi olan nitritin klisem yolu ile taşındığı bilinmektedir (Desikan ve ark., 2002)

Bitkilerde NO ile ilgili bulgular her geçen gün artmaktadır, ancak sinyal mekanizmasının süreçleri hakkında yine de çok az şey bilinmektedir. Literatür bilgilerine göre NO için bugüne kadar spesifik bir reseptörün varlığı kanıtlanamamıştır (Neill ve ark., 2003). Bununla birlikte hücreler NO e oldukça duyarlıdır ve varlığında çeşitli hücresel aktiviteler gerçekleşir. NO, sinyal iletim yolunda iyon kanal proteinlerini ve onların gen anlatımlarını düzenleyen proteinleri doğrudan aktivite eder ya da protein kinazlar, iyon kanalları, ikincil haberci üreten enzimler gibi sinyal proteinlerle dolaylı yoldan ilişkiye girer (Neill ve ark., 2003; Crawford ve Guo, 2005; Kolla ve Raghavendra, 2007). Genellikle NO sinyal mekanizması, ikincil haberci olan cGMP a bağımlı ve cGMP dan bağımsız olarak iki şekilde oluşmaktadır (Bogdan, 2001). cGMP a bağımlı yolda, GTP dan cGMP

sentezini sağlayan guanil siklaz (GC) enzimini aktive ederek, cGMP miktarını arttırır. Böylece artan cGMP diğer bir ikincil haberci olan CADPR aktivitesini arttırarak sitosolik kalsiyum düzeylerini yükseltir. Ayrıca hücre içinde cGMP ın diğer bir hedefi de protein kinazları aktive etmektir (Honda ve ark., 2001; Trewavas ve ark., 2002). cGMP dan bağımsız yolda ise, demir, bakır, çinko gibi metal ya da tiyol içeren proteinler NO in en önemli hücresel hedefleridir (Beligni ve Lamattina, 2001a; Wendehenne ve ark., 2001).

2.1.3. Nitrik oksitin bitki büyüme ve gelişimi üzerine etkisi

Günümüzde birçok biyolojik süreçte görev aldığı bilinen NO hem bitki savunma mekanizmasında bir sinyal molekül olarak hem de büyüme ve gelişmede hormonal özelliklere sahip bir bileşik olarak rol oynamaktadır (Leshem ve Haramaty, 1996; Beligni ve ark., 1997; Delledonne ve ark., 1998; Beligni ve Lamattina, 1999a; Correa-Aragunde ve ark., 2006). NO yaprak genişlemesi, tohum çimlenmesi ve deetiyolasyonu teşvik ederken, hipotokil ve internod uzamasını inhibe etmektedir (Beligni ve Lamattina, 2000). Bitki büyümesi üzerine NO in etkilerinde konsantrasyonun son derece önemli olduğu vurgulanmıştır (Anderson ve Mansfield, 1979). Beligni ve Lamattina (2001a), NO in özellikle bitki gövdelerinde çeşitli metabolik ve gelişimsel süreçlerde rol oynadığını kanıtlamışlardır. Karanlıkta ya da düşük ışık şiddetinde büyüyen farklı bitki türlerinde (*Arabidopsis thaliana, Lactuca sativa, Solanum tuberosum*) nanomalar düzeydeki NO hipokotil ve internod uzamasını belirgin bir şekilde azaltmıştır (Beligni ve Lamattina, 2000). Bazı bitkilerde NO yapraklarda olduğu gibi (Leshem ve Haramaty, 1996), köklerde de düşük konsantrasyonlarda doku genişlemesini teşvik ederken, yüksek konsantrasyonlarda inhibe etmektedir (Gouvêa ve ark., 1997). NO in yüksek konsantrasyonlarının (40-80 ppm) domates, marul ve bezelye bitkisinde büyümeyi inhibe ettiği, düşük konsantrasyonlarının (0-20 ppm) ise büyümeyi teşvik ettiği ileri sürülmüştür (Hufton ve ark., 1996; Leshem ve Haramaty, 1996). Köklerde de farklı NO üretim yolları mevcuttur ve NOS a benzer bir protein kökün gelişim bölgesine bağlı olarak sitosolde ya da nukleusda bulunur. Kök uzama bölgesinde meydana gelen hızlı büyüme için gerekli olan nuklear transkripsiyon faktörü NO ile aktive

edilmektedir (Ribeiro ve ark., 1999). Marul tohumlarının ışık varlığında çimlenmesi SNP ve SNAP gibi NO vericileri tarafından teşvik edilir (Beligni ve Lamattina, 2000).

Takahashi ve Yamasaki (2002) NO in geri dönüşümlü olarak kloroplastlarda ATP sentezini, elektron trasportunu baskıladığını ve NR tarafından üretilen NO in fotosentezi inhibe ettiğini göstermişlerdir. Buna karşın patates, marul ve *Arabidopsis* gibi bazı bitkilere NO vericilerinin uygulanması klorofil içeriğini arttırmaktadır (Beligni ve Lamattina, 2000). NO in bezelye yapraklarında özellikle bekçi hücrelerinde klorofil içeriğini arttırdığı (Leshem ve ark., 1997) ve NO ile işlem görmüş yabani tip mısır bitkisinde klorosis olayını inhibe ettiği gösterilmiştir (Graziano ve ark., 2002)

Eksojen olarak uygulanan NO bitkilerde patojenlere (Durner ve ark., 1998), ışığa (Beligni ve Lamattina, 2000), yerçekimi (Pedroso ve Durzan, 2000) ile oksidatif strese (Beligni ve Lamattina, 1999a) karşı oluşturulan cevapları etkilediği, savunma genleri ve fitoaleksin üretimini arttırdığı bilinmektedir. Ayrıca bitkilerde katalaz, askorbat peroksidaz ve akonitaz enzimlerinin inhibisyonunda (Clarke ve ark., 2000), hücre çeperi lignifikasyonunda (Ferrer ve Ros Barcelo, 1999), bekçi hücrelerinde iyon kanallarının düzenlenmesinde (Garcia-Mata ve ark., 2003), kloroplast ve mitokondri fonksiyonlarında (Yamasaki ve ark., 2001), hücre ölümü (Pedroso ve ark., 2000a), senesens (Leshem, 1996; Leshem ve Haramaty, 1996; Hung ve Kao, 2003) ve yaralanma sinyalinde NO in muhtemel rolleri tespit edilmiştir.

Yüksek bitkilerde NO in endojen bir olgunlaşma faktörü olduğu ve antisenesens özellik gösterdiği saptanmıştır (Leshem ve ark., 1998; Selçukcan, 2005). Bezelye yapraklarına NO vericisi olan SNP in uygulanmasının etilen biyosentezini inhibe ederek senesensi geciktirdiği kanıtlanmıştır (Leshem ve Haramaty, 1996; Leshem, 2001). Sebze ve meyvelerde de NO in senesensi geciktirdiği ve hasat sonrası ömrü uzattığı ileri sürülmüştür (Leshem, 2001). Ayrıca NO in sitokinin ile teşvik edilmiş programlanmış hücre ölümünde rol aldığı düşünülmektedir (Kakimoto, 1996).

Bitkilerde içsel ve dıştan uygulanan NO in hangi fizyolojik ve biyokimyasal olayları etkilediği Çizelge 2.1.'de özet halinde verilmiştir.

Çizelge 2.1. Bitkilerde Nitrik Oksitin görev aldığı bazı fizyolojik ve biyokimyasal olaylar

BÜYÜME VE GELİŞME • Çimlenme • Kök Gelişimi • Stoma Hareketi • Senesens ve Programlanmış Hücre Ölümü • Hücre Çeperi Lignifikasyonu • Deetiyolasyon • Hipokotil uzaması
HÜCRESEL BÖLÜMLERDEKİ METABOLİZMASI • Kloroplast: Klorofil Biyosentezi, fotofosforilasyon • Mitokondri: Sitokrom c oksidaz, alternatif oksidaz • Peroksizom: Katalaz Düzenlenmesi
HORMONLAR İLE İLİŞKİSİ • Absisik asit • Etilen • Sitokinin
BİYOTİK STRES • Aşırı Duyarlılık Cevapları • Sistemik Kazanılmış Direnç
ABİYOTİK STRES • Tuzluluk • Yüksek Sıcaklık • Kuraklık • Ultraviyole

2.1.4. Nitrik oksit ile hormonlar arasındaki ilişki

Bitkilerde NO in çeşitli hormonların biyolojik etkilerine aracılık ettiği bilinmektedir (Neill ve ark., 2002a, b, c; Bethke ve ark., 2007). Sitokininin tütün, maydanoz ve *Arabidopsis* hücre kültüründe NO sentezini teşvik ettiği (Tun ve ark., 2001) ve *Amaranthus* fidelerinde NO in betalain birikimini teşvik ederek sitokinlerin bazı etkilerini taklit ettiği gösterilmiştir (Scherer ve Holk, 2000). Ayrıca NO sitokinin ile teşvik edilmiş programlanmış hücre ölümü (Programmed Cell Death=PCD) olayında da rol oynamaktadır (Neill ve ark., 2003). ABA bezelye bekçi hücrelerinde hızlı bir şekilde NO sentezini teşvik eder. NO de ABA ile teşvik edilmiş stoma kapanmasında görev almaktadır (Neill ve ark., 2002a, b). Benzer biçimde

oksin salatalık köklerinde NO sentezini teşvik etmektedir. SNP ve SNAP gibi NO vericilerinin konsantrasyonlara bağlı olarak salatalık eksplantlarında adventif kök gelişimini teşvik ettiği, hatta IAA (Indol-3-Asetik Asit) ile birlikte uygulandığında cevapta bir artışa neden olduğu ve lateral kök oluşumunun c-PTIO uygulaması ile inhibe edildiği (Pagnussat ve ark., 2002, 2003) tarafından kanıtlanmıştır. Bitki dokularının olgunlaşma ve senesens sürecinde NO ile etilen arasında antagonistik bir ilişkinin varlığı da ileri sürülmüştür (Leshem ve ark., 1998; Lamattina ve ark., 2003).

2.1.5. Biyotik ve abiyotik stres koşullarında nitrik oksitin rolü

NO, patojen (Durner ve ark., 1998; Delledonne, 2005), ışık (Beligni ve Lamattina, 2001a), yerçekimi (Pedrosa ve Durzan, 2000), tuzluluk (Aytamka, 2005) ve oksidatif stres (Beligni ve Lamattina, 1999) gibi çeşitli biyotik ve abiyotik streslere karşı oluşturulan cevaplarda bitkilerde hem antioksidan hem de antistres ajan olarak görev yapmaktadır (Neill ve ark., 2003). Stres koşulları altında yetişen bitkilerde NO miktarında ani bir artış olmaktadır (Garcês ve ark., 2001; Romero-Puertas ve Dellodonne, 2003; Zhang ve ark., 2006a; Arasimowicza ve Floryszak-Wieczorek, 2007). *Phyptophtora infestans* mantarı tarafından enfekte olmuş patates yapraklarında NO in klorofil kaybını önlediği (Laxalt ve ark., 1997), SNP ve SNAP gibi iki NO vericisinin herbisit ile işlem görmüş patates yaprakları ve izole kloroplastlarda lipid peroksidasyonu, protein ve RNA yıkımını indirgediği saptanmıştır (Beligni ve ark., 2000). Ayrıca, NO savunma ile ilgili PR-1 geninin anlatımını ve salisilik asit (SA) biyosentezini teşvik etmektedir (Draper, 1997). *P. syringae* pv *maculicola* mantarı ile enfekte olmuş *Arabidopsis* (tere otu) hücrelerinde NO programlanmış hücre ölümünü teşvik etmektedir (Clarke ve ark., 2000). Soya fasulyesi süspansiyon hücre kültürleri *Pseudomonas syringae* gibi bakteriyel bir patojenle enfekte edildiğinde aşırı duyarlılık cevabında NO oksidatif hücre ölümüne neden olan aktif oksijen ara ürünleri ile sinergistik olarak etkileşime girer. Aynı zamanda bu etki NO in doğrudan ya da dolaylı olarak bitkilerde hücre ölümüne neden olan mekanizmada rol oynadığını göstermektedir (Delledonne ve ark., 1998; Pedroso ve ark., 2000a, b). Yabani tip *Arabidopsis thaliana* ve NR mutantlarının

yapraklarında mekanik stres ve yaralanma sonucu NO üretiminin arttığı ve bunu NOS aktivitesiyle gerçekleştirdiği bulunmuştur (Garcês ve ark., 2001).

Kuraklık, tuzluluk, düşük ve yüksek sıcaklık gibi çeşitli abiyotik stres koşulları altında da NO in etkileri araştırılmıştır. Bu tip stres koşulları altında aktif oksijen türleri (Reactive Oxygen Species=ROS) açığa çıkmakta ve hücrelerde birçok oksidatif yıkım olayı başlamaktadır. Stres koşulları altında sinyal iletim yolunda görev alan NO aktif oksijen türleri ile karşılıklı etkileşim halindedir. Bitkilerde kuraklık stresi büyüme, gelişme ve ürün verimini sınırlayıcı bir etkendir. NO in son yıllarda buğday fidelerinde kuraklıktan kaynaklanan oksidatif strese karşı korunmada, transpirasyonu indirgeyen ve stoma hareketlerinde rol oynayan yeni bir molekül olduğu kabul edilmektedir. Buna ilave olarak, *Tradescantia sp.* ve *Vicia faba* da stoma kapanmasını teşvik ederek, ciddi kuraklık stresine karşı toleransı arttırdığı, *Arabidopsis*'de stoma kapanmasında H_2O_2 ile birlikte çalıştıkları bulunmuştur (Garcia Mata ve Lamattina, 2001; Garcia Mata ve ark., 2003). Ayrıca, Cheng ve ark., (2002) nın yaptıkları çalışmada, su eksikliği ile teşvik edilmiş pirinç yapraklarının senesensinin NO tarafından inhibisyonunun, artan süper oksit dismutaz (SOD) aktivitesi ve azalan lipid peroksidasyonu ile ilgili olduğu gösterilmiştir. Yonca bitkisinde kısa süreli sıcaklık stresi NO sentezinin artmasına, domates, buğday ve mısıra dıştan NO vericilerinin uygulanması soğuk direncinin oluşmasına neden olmaktadır (Lamattina ve ark., 2001; Leshem, 2001). Diğer çevresel streslerden biri olan UV ışığa maruz kalan ve NO vericileri uygulanan patates tuberlerinde kontrole oranla % 50 daha sağlıklı yapraklar içerdikleri gözlenmiştir (Lamattina ve ark., 2001). Buna karşın, An ve ark. (2005) nın yaptıkları çalışmada, UV-B stresi altında hem endojen hem de eksojen uygulanan NO in mısır yapraklarında büyüme ve gelişme süresince antistres molekül olarak rol oynamaktan çok, UV-B nin inhibe ettiği büyümede stres sinyal molekül olarak görev aldığı ileri sürülmektedir. Toksik etkisi bilinen kurşun (Pb) ve kadmiyum (Cd) gibi ağır metal etkisinde çimlenmenin inhibe olduğu bilinmektedir. Bu inhibisyonun SNP ile ön işlem sonucu *Lupinus luteus* tohumlarında yüksek oranda geri döndürülebildiği kanıtlanmıştır (Kopyra ve Gwóźdź, 2003). Ayrıca, kadmiyumun oluşturduğu oksidatif strese karşı ayçiçeği bitkisinde NO in koruyucu rol oynadığı tespit edilmiştir.

Stres cevaplarında NO in birbirleriyle ilişkili iki farklı mekanizma ile etkili olduğu önerilmektedir. Bu mekanizmalardan birinde NO, farklı stres koşulları tarafından oluşturulan aktif oksijen türlerine karşı doğrudan antioksidan etki göstermektedir. NO hızlı bir şekilde süperoksit radikalleri ile reaksiyona girerek peroksinitriti oluşturmaktadır. Peroksinitrit ve peroksinitritin protonlanmış formları okside edici ajanlar olmakla beraber, bu formlar peroksitlerden daha az toksiktir, böylece sınırlı sayıda hücre yaralanması gerçekleşmektedir (Wink ve ark., 1993). Bir başka şekilde, peroksinitrit H_2O_2 ile reaksiyona girerek ürün olarak nitrit iyonlarını ve oksijeni vermektedir (Martinez ve ark., 2000). Soya embriyonik süspansiyon kültürlerinde NO in süperoksit oranını kayda değer ölçüde azalttığı gösterilmiştir (Caro ve Puntarulo, 1998). Diğer bir mekanizmada ise, NO sinyal molekül olarak gen ekspresyonu düzeyinde işlev görmektedir (Wendehenne ve ark., 2001). Bu mekanizma cGMP/Ca^{++} a bağımlı yolun aktivasyonunu ve aktif oksijen türleri ile karşılıklı etkileşimini içermektedir (Klessig ve ark., 2000; Delledonne ve ark., 2001).

2.2. Tohum ve Çimlenmesi

2.2.1. Tohum yapısı kimyasal bileşimi ve önemi

Tohum, bitkilerin üreme ve yayılma organı olarak neslin devamını sağlamada görev alan, oldukça yalın bir yapıya sahip üretken bir organdır (Mayer ve Mayber, 1982; Bewley ve Black, 1994; Srivastava, 2002; Taiz ve Zeiger, 2002). Tohum, çifte döllenmeden sonra embriyo ve endospermin oluşması ile birlikte olgunlaşan tohum taslağından gelişir. Olgun bir tohum, döllenmeden sonra zigotun ardışık mitoz bölünmeleri ile oluşan embriyo, bir ya da iki integümentten gelişen koruyucu bir tohum gömleği (testa) ve primer endosperma nukleusundan köken alan besin depo eden endospermden meydana gelir. Bazı tohumlarda gelişim sırasında nusellus kaybolmaz, olgun tohumda kalarak besin deposu olarak görev yapar ve perisperm adını alır. Olgun tohumda embriyonik eksen plumula, epikotil, kotiledon, hipokotil ve radikuladan oluşurken, karbonhidrat, lipid ve protein gibi maddeler de sıklıkla tohumun endosperminde (*Lycopersicon esculentum, Zea mays* ve *Triticum aestivum*), bazı bitkilerin kotiledonlarında (*Phaseolus vulgaris* ve *Lactuca sativa*), ya da

perisperminde (*Yucca, Acorus spp., Piper spp.*) depolanır. Endospermin karbonhidrat, lipid ve proteinlere ilave olarak makro ve mikro elementleri, çeşitli organik asitleri, fitosterolleri, bazı pigmentleri, fenolik bileşikleri, alkaloidleri, bitki büyüme düzenleyicileri ve vitaminleri taşıdığı da bilinmektedir. Testa embriyoyu dış çevre koşullarına karşı koruyucu bir göreve sahiptir.

Tohumlar büyüklük, şekil ve renk bakımından çok çeşitlilik gösterir. Taksonomik sınıflandırmada tohum yüzeyi, tohum gömleğinin anatomisi, tohum taslağının durumu, embriyonun şekil, boyut ve konumu büyük öneme sahiptir. Ayrıca tohumlar özellikle (Gramineae, Leguminosae tohumları) insan ve hayvanlar için önemli bir besin kaynağı olması açısından ve ticari değerlerinden (içecek, ilaç, lif ve endüstriyel yağların kaynağı) dolayı büyük bir değer taşır (Yentür, 2003).

2.2.2. Tohum dormansisi

Bilindiği gibi embriyonik evre döllenme ile tohumun olgunlaşması arasındaki süredir. Bu sürede yoğun bir hücre bölünmesi, primordiyal organların farklılaşması ve depo maddelerin embriyonik doku ve endosperm içinde depolanması ile karakterize edilir (Srivastava, 2002).

Tohum belli bir süre bazı iç (embriyonun olgunlaşmaması, tohum gömleğinin mekaniksel olarak kuvvetli olması ya da suya ve gazlara geçirgen olmaması, çimlenme ket vurucularının varlığı) ve dış (ışık ya da sıcaklık) etmenlerin etkisi ile dormant (uyku) halde kalır. Bu duruma tohum dormansisi adı verilir (Mayer ve Mayber, 1982). Dormansi fizyolojik bir olay olup, bitki dölünün devamı için bir sonraki büyüme mevsimine kadar uygun olmayan çevresel koşulların atlatılmasına yardımcı olur. Böylece tohum dormansisi çevresel koşullarda çimlenmeyi engelleyerek tohumun hayatta kalma şansını mümkün olduğu kadar arttırmaktadır. Bunun yanında, çimlenme sürecinde geçici bir ertelemeye neden olarak tohumun daha uzak mesafelere dağılımı için tohuma ek bir zaman sağlar. Tohum dormansisi doğada oldukça yaygındır, süresi tohumdan tohuma değişebilir ve populasyonların devamlılıklarını sürdürebilmeleri için son derece önemlidir (Srivastava, 2002; Taiz ve Zeiger, 2002).

Bazı tohumlar için dormansi söz konusu değildir ve bu tohumlar (fasulye, bezelye, mısır, söğüt, meşe, kavak) uygun ortam koşullarında ya da yere düşer düşmez hemen çimlenebilirler. Tohumların çimlenebilmesi için geçirmesi gereken dormant periyod (içsel tamamlanma süreci) vivipari gösteren tohumlarda hiçbir zaman olmaz, böyle tohumlar örneğin portakal, domates, *Rhizophora*'da olduğu gibi ana bitki üzerinde dahi çimlenme özelliğine sahiptir (Cao ve ark., 2007). Bu olay vivipari olarak bilinir. Bazı tohumlar ise belli bir süre bekletildikten sonra uygun koşullarda çimlenebilir. Bu tip tohumların olgunlaşma sonrası denilen bir periyoda ihtiyaç duydukları bilinmektedir. Bu süre depolama süresi ile değişebilir. Tohumların bazılarında 2 (buğday varyeteleri), 4 (*Pisum elatius*) hafta iken diğer bazılarında ise örneğin *Cyperus*'da 7 yıldır.

Tohum dormansisinin kırılması ışık, sıcaklık ve tohumun içsel gelişiminin tamamlanması gibi ya da çeşitli çevresel faktörler tarafından sağlanabilir ve dormant tohumlar bu faktörlerden bir ya da birkaçına cevap vererek dormansilerini kaybedeler (Srivastava, 2002; Taiz ve Zeiger, 2002). Olgunlaşma sonrası embriyoda anatomik ve morfolojik değişiklikler, tohum içinde (tohum depo maddelerinin bileşimi) ya da tohum gömleğinin permeabilitesi gibi fiziksel ve kimyasal değişimler meydana gelebilir. Çoğu tohum uygun çimlenme sıcaklığına konulmadan önce, çimlenebilmeleri için belli düşük ya da yüksek sıcaklıklara maruz bırakılmaya gereksinim duyar. Diğer bir deyimle dormansinin kırılması için soğuk bir periyod geçirmesi gerekir. İmbibe olmuş tohumların nemli koşullar altında düşük sıcaklığa maruz bırakılması olayına stratifikasyon denir. Yine bazı tohumların testası çok sert olduğu için mekaniksel olarak zarar verilerek çimlenmesi kolaylaştırılır, bu da skarifikasyon olarak bilinir.

Uygun dış ortam koşulları (yeterli su, oksijen, sıcaklık, ışık gibi) sağlandığında tohum su alıp çimlenmeye başlar, embriyo genellikle imbibisyondan sonra etkinlik kazanır. Su tohum çimlenmesindeki en önemli faktördür. Tohumlar en iyi % 20 oksijen ve % 0.03 karbondioksit ortamında çimlenme gösterir. Işık çimlenmeyi etkileyen çevresel bir faktör olarak bilinir. Bazı tohumlar (marul, tütün) ışıkta, bazıları (*Gladiolus*, *Hedera*) karanlıkta, diğer bazıları da (*Anemone*, *Pelargonium*) çimlenmek için ne ışığa ne de karanlığa bağımlı değillerdir, bu tohumlar nötral tohumlardır. Birçok kültür bitkisinin tohumu karanlıkta ya da ışıkta iyi çimlenir.

Bunun aksine yabani bitkilerin pek çoğunun ışığa karşı davranışlarının farklı olduğu gözlenmiştir. Çimlenmede fitokrom pigment sistemi rol oynar, kırmızı ötesi ışık marulda çimlenmeye ket vururken, kımızı ışık teşvik eder. Tohumun cinsine göre sıcaklığa bağlı çimlenme cevapları da değişir. Ancak, sıcaklığın kültür bitkilerinde çimlenmeyi etkilediği ile ilgili çok az kanıt vardır. İçsel faktörlerden olan bitki hormonları oldukça önemli bir rol oynar. Gibberellin, sitokinin ve az miktarda etilen çimlenmeyi teşvik ederken, absisik asit ket vurur (Mayer ve Mayber, 1982; Srivastava, 2002; Taiz ve Zeiger, 2002; Yentür, 2003).

Tohumlar çevresel faktörlere oldukça dayanıklıdır, uygun fotoperiyotlarda canlılık ve çimlenme yeteneklerini koruyabilirler. Tohum genetiksel olarak uzun süre canlı kalma yeteneğine sahip olsa da çevresel faktörler ve depolama gibi etkenlerle bu süre kısalabilir. Bunun yanı sıra tohumun olgunlaşması sırasında ana bitkinin maruz kaldığı su, mineral beslenme, sıcaklık, ve ışık gibi faktörler de tohumun canlılık süresini etkilemektedir (Srivastava, 2002).

2.2.3. Çimlenen tohumların metabolizması ve çimlenmeye etki eden faktörler

Yüksek bitkilerde neslin devamı tohum çimlenmesi ile başlamaktadır (Önder ve Yentür, 1999; Yentür, 2003). Çimlenme ile tohumda bazı fizyolojik, biyokimyasal, moleküler düzeyde değişiklikler meydana gelir. Çimlenme, optimal koşullarda (su, oksijen, sıcaklık, ışık) tohum embriyosundan normal bir bitki meydana getirebilme yetisinde olan yapıların ortaya çıkmasıdır. Çimlenme sırasında kuru tohum dışarıdan sadece su ve oksijen alır. Embriyonik dokuda su alınması ile metabolizmanın aktif hale gelmesi sonucu çimlenme aşaması başlar. İmbibisyonu ardışık tohum gömleğinden radikulanın belirimi çimlenme olayının en önemli kriteridir. Tohum çimlenmesi birbirini izleyen bir dizi reaksiyonu içeren 3 evrede gerçekleşmektedir. Dormant haldeki tohum tarafından suyun alındığı I. Evre, protein sentezinin olduğu II. Evre, fide gelişiminin başladığı III. Evre (Bewley ve Black, 1994; Srivastava, 2002; Kösesakal, 2005).

Kuru tohumlar birçok biyokimyasal reaksiyonların meydana geldiği oldukça iyi düzenlenmiş fonksiyonel birimlerdir. Kuru tohumlarda su içeriği toplam ağırlığın yaklaşık % 5-10 u kadardır. Kuru tohumların metabolizma hızı çok düşük olmasına

rağmen metabolizma potansiyeli oldukça yüksektir. Ayrıca membran ve çeşitli hücre organelleri yapısal olarak belirsiz ve biyokimyasal olarak etkin değillerdir. Hidratasyonu izleyen birkaç saat içerisinde hücre membranları selektif permeabilitesini kazanmakta, mitokondri ve nukleus gibi organellerde önemli yapısal değişikler meydana gelmektedir. Solunum hızının saptanması kuru tohumların metabolizma hızını belirlemek için kullanılan önemli bir kriterdir. Tohumlar suya konulduğunda, ilk metabolik değişim solunum hızının artmasıdır. İkinci metabolik değişim, depo materyallerinin yıkımıdır ki bu olay proteinlerin hidrastasyonuyla başlatılır. Tohumlar imbibe olduğunda, depo maddelerin yıkımı, tohumdan embriyoya, kotiledondan büyüyen kısımlara madde taşınması ve yıkım ürünlerinden yeni maddelerin sentezlenmesi gibi önemli kimyasal değişimler meydana gelmektedir. Çimlenmenin başlangıcında kuru tohumlarda madde kaybı ile birlikte ağırlıkta da azalma olmaktadır. Çimlenmenin erken evrelerinde düşük molekül ağırlıklı maddeler, iyonlar, şekerler ile amino asitler çimlenme ortamına geçebilirler. Bu arada ABA ve bazı fenolikler gibi çoğu çimlenme inhibitörlerinin de etkisi ortadan kalkmaktadır. Çimlenmeyi ardışık fideler büyüyüp kotiledonlar ya da ilk yapraklar ışığa maruz kalınca fotosentez kapasitesinin artmasına paralel kuru ağırlıkta da artış olur. Kuru tohumda meydana gelen yıkım, taşınma ve sentez olayları enzimler tarafından sağlanır. Bu enzimler kuru tohumlarda da mevcut ancak imbibe olduğunda aktif hale geçerler ve çimlenmenin ileri evrelerinde aktivitelerinde artışlar gösterirler. Çimlenen tohumlarda meydana gelen diğer bir önemli değişim DNA ve RNA miktarındaki değişimdir ki DNA sentezi çimlenmenin ileri evresinde meydana gelirken, RNA içeriğindeki artış oldukça erken evrede oluşmaktadır. Tohumda, solunum kısa bir süre çimlenmenin erken evrelerinde tamamen oksijensiz ortamda gerçekleşir, ancak testanın yırtılmasıyla birlikte tohum oksijenli solunum yapmaya başlar. Çimlenme enerji isteyen bir olaydır, ilk aşamada solunum yolu ile enerji sağlanırken, sentez için gerekli metabolitler de pentoz fosfat yan yolundan temin edilir. *Glycine* ve *Cicer* de olduğu gibi bazı tohumlarda çimlenme sırasında KCN e dirençli bir alternatif solunum yolu da izlenir (Yentür, 2003). Çimlenme sürecinde hormonlar yeniden sentez edilir ya da dokuda mevcut inaktif formlarından aktif formlarına dönüştürülürler (Raven ve ark., 1999; Srivastava, 2002).

Çimlenme sürecinin başlaması, fitohormonlar tarafından düzenlenmesi ve bir bitkinin meydana gelmesi son derece iyi düzenlenmiş bir olaydır. Kuru tohum su alınca embriyodaki gibberellinler alevron tabakasına hareket eder, Gibberellik asit (GA) ler alevron tabakasında α- ve β-amilaz, hidrolazlar, glukonazlar, nukleaz, proteaz gibi hidrolitik enzimlerin sentezini ya da salınmasını teşvik eder. Endosperme salınan bu enzimler ile depo gereçler aşama aşama parçalanır. Bu şekilde sitokinin ve oksin gibi büyüme maddelerinin öncü maddeleri serbest kalır. Endospermde oluşan bu hormonlar embriyoya taşınarak orada hücre bölünme ve uzamasını teşvik eder. Ayrıca hormonlar endospermdeki depo maddelerinin mobilizasyonu için gerekli enzimlerin sentezinde görev alır. Depo maddelerinden sağlanan beslenme sona erdikten sonra büyüyen ve gelişen embriyo testayı parçalayarak dışarı çıkar, ototrofik çimlenme süreci başlar. Bu sürede kök toprağa bağlanır, kotiledonlar açılır, daha sonra toprak yüzeyine çıkan fide ışıkla karşılaşır, fotosentetik özellik kazanarak bağımsız hale gelip hızla gelişimini devam ettirir (Srivastava, 2002; Yentür, 2003).

Radikulanın uzaması ve testadan dışarı çıkması çimlenmenin tamamlandığını gösterir (Bewley ve Black, 1994; Srivastava, 2002). Bu nedenle çimlenme tanımı fide büyümesini kapsamaz, fide büyümesi çimlenmenin bitmesi ile başlamaktadır. Fide gelişiminde epigeik ve hipogeik olmak üzere iki tip görülmektedir. Epigeik tipte hipokotilin uzaması ile kotiledonlar örneğin, *Phaseolus vulgaris, Lycopersicon esculentum* da olduğu gibi toprak yüzeyinden yukarı doğru çıkarlar ve bir süre sonra fotosentetik hale gelirler. Hipogeik tipte ise hipokotil az uzadığı için kotiledonlar toprak altında kalırlar ve *Vicia faba, Zea mays* bitkilerinde görüldüğü gibi epikotilin uzaması ile ilk gerçek yapraklar toprak üzerinde yükselir.

Çimlenmenin kontrolü içsel ve çevresel faktörler olmak üzere iki kısımda incelenebilir. Daha öncede bahsedildiği gibi tamamen tohumun kendisinden kaynaklı bir durum olan dormansi olayında embriyonik yetersizlik, çimlenme inhibitörleri ve dormansinin genetik kontrolünü içeren içsel faktörler ile çevresel faktörlerden olan su, sıcaklık, gazlar ve ışık etkendir. Çimlenmeyi teşvik ediciler sitokininler (kinetin, zeatin), GA ile etilen gibi hormonlar ve potasyum nitrat, tiyoure, strigol gibi basit yapılı bileşikler olarak sayılabilir. Çimlenmeyi engelleyiciler ise hormon olarak ABA ve bileşikler olarak da trans-sinnamik asit, kumarin, kafeik asit, ferulik asit, siyanür,

dinitrofenol ve hidroksilamin gibi maddelerdir (Mayer ve Mayber, 1982; Srivastava, 2002; Yentür, 2003). Ayrıca tohum çimlenmesi toprakta varolan organik ve inorganik kimyasal maddeler tarafından da etkilenebilmektedir (Bewley ve Black, 1994).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Bu tez çalışmasında, deney materyali olarak mercimek (*Lens culinaris* Medik.) tohum ve fideleri kullanılmıştır. Mercimek tohumları May tohum firmasından (Bursa) temin edilmiştir. Leguminosae familyasına ait olan *Lens culinaris* Medik. hipogeik çimlenme özelliğine sahip, tek yıllık, otsu bir sebze bitkisidir. Mercimek tohum ve fidelerinin tercih edilmesinin sebebi kolay yetiştirilebilen bir kültür bitkisi olması, kısa sürede deney materyali haline gelmesi ve literatür incelemelerine göre çimlenme deneyleri ile ilgili çalışmalarda bitkisel materyal olarak sıklıkla kullanılmasıdır. Mercimeğin Türkiye'de Güney Anadolu, Ege ve Marmara bölgesinde tarımı yapılmaktadır. Büyüklük, şekil ve renklerine göre isim alan (yeşil, kırmızı, sultan gibi) mercimek bitkisi yumuşak ve ince gövdeli olup zayıf bir kök sistemine sahiptir. Nişasta ve protein içeriği oldukça fazla olan mercimek kuru bakliyat olarak tüketilir. Ayrıca B vitaminleri ve fosfor açısından da zengindir. Bu nedenle beden ve zihin gücünü arttıran, sinirleri kuvvetlendiren, bağırsaklara yumuşaklık veren, kan yapan, anne sütünü arttıran özelliklere sahiptir.

3.1. *Lens culinaris* Medik. Tohumlarının Çimlendirilmesi ve Fidelerin Yetiştirilmesi

Bu araştırmada, NO vericisi olarak kullanılan SNP ($[Na_2Fe(CN)_5 \cdot NO]$ Sigma firmasından temin edilmiştir. Mercimek tohumlarından hemen hemen eşit büyüklükte olanları seçilerek, deney solüsyonlarında (0.01 µM, 100 µM, 600 µM ve 700 µM SNP) ve kontrol olarak da distile suda bir gece (12 saat) ön işleme tabi tutulmuşlardır. Kullanılan SNP konsantrasyonları ön denemelerden sonra seçilmiştir. Daha sonra, tohumlar farklı SNP konsantrasyonları ve distile su ile (12 ml) nemlendirilmiş 15 cm çapındaki petri kaplarında (30 tohum) filtre kağıtları arasında 3 gün boyunca 25±2 °C lik etüvde çimlenmeye bırakılmışlardır. Çimlenme süresince (24, 48 ve 72. saat) çimlenme yüzdeleri ve primer kök uzunlukları alınmıştır. Ayrıca her bir deney için kullanılan 60 tohumun plumula ve radikulası kesilerek çıkartılmış

ve geri kalan tohum kısmında ilgili metodlar kullanılarak çözünebilir total protein miktarı ile bazı enzim aktiviteleri tayin edilmiştir. Deneyler en az 3 kez tekrarlanmıştır. Çimlenmeyi izleyen fide aşamasında ise çimlenen tohumlar perlite trasfer edilerek 12 saat ışık periyodu, 6 000 lüks ışık şiddeti ve 25±2 °C sıcaklık koşullarına sahip bitki büyüme odasında yetiştirilmiştir. Seçilen 100 µM, 600 µM ve 700 µM SNP konsantrasyonları tam Hoagland besi solüsyonunda hazırlanarak bitkilere 3 gün ara ile uygulanmıştır. 12 gün boyunca 3 günlük aralıklar ile fidelerin kök, gövde uzunlukları, taze ve kuru ağırlıkları alınmıştır. Ayrıca fidelerin yaprak ve gövdelerinde klorofil, karotinoid ve antosiyanin içeriği de saptanmıştır.

Çizelge 3.1. Hoagland çözeltisinin içeriği

Mineral Tuzlar	Konsantrasyon	1 L için alınacak miktar (ml)
$Ca(NO_3)_2$	1 M	5
KNO_3	1 M	5
$MgSO_4$	1 M	2
KH_2PO_4	1 M	1
FeEDTA*	0.1 M	2
Mikro elementler	**	1

* FeEDTA (etilen diamin tetra asetik asitin Fe kompleksi) stok çözeltide 5 mg/ml Fe içerecek şekilde hazırlanmıştır.
** Mikro elementleri içeren stok çözeltinin 1 litresinde bulunan mineral tuzların miktarları: 2.86 gr H_3BO_3, 1.81 gr $MnCl_2.4H_2O$, 0.11 gr $ZnCl_2$, 0.05 gr $CuCl_2$, 0.025 gr Na_2MoO_4.

Çizelgede görülen mineral tuzlardan yukarıda belirtilen miktarlarda alınarak son hacim distile su ile 1 000 ml ye tamamlanmıştır.

3.2. Çimlenme Yüzdesi

Kontrol ile 0.01 µM, 100 µM, 600 µM ve 700 µM SNP konsantrasyonunda 1 gece ön muameleden sonra petrilere alınan *Lens culinaris* Medik. tohumlarının çimlenmeleri sabit kalana kadar (24. saatten 72. saate kadar) günlük olarak izlenmiştir ve 24. saatteki çimlenme oranları yüzde olarak ifade edilmiştir.

3.3. Büyümenin Ölçülmesi

Çimlenme aşamasında (24. saatten 72. saat sonuna kadar) sadece primer kök uzunluğu, fide aşamasında (12 gün boyunca, 3 er günlük aralıklarla) kök, gövde uzunlukları milimetrik taksimatlı cetvel kullanılarak ölçülmüştür ve değerler mm cinsinden verilmiştir.

3.4. Taze ve Kuru Ağırlık Ölçülmesi

Fide aşamasında kontrol ve deney grubu bitkilerinin kök ve gövdeye ait taze ağırlıkları alındıktan sonra, etüvde (100 ºC) ağırlık sabit kalıncaya kadar (3 gün) kurutulup kuru ağırlıkları saptanmıştır ve değerler grafikte histogram halinde gram cinsinden verilmiştir.

3.5. Çözünebilir Total Protein Miktarının Tayini

Çözünebilir total protein miktarının tayininde Bradford (1976) Dye-binding metodu kullanılmıştır. Tohumlar 0.1 M (pH 7.0) sodyum fosfat tamponunda homojenizasyonu ardışık 45 dk 13 000 rpm de santrifüj edilmiştir. Süpernatantlardan 0.1 ml alınarak üzerine 1/4 sulandırılmış Coomassie Brillant Blue G-250 (Bio-Rad) den 5 ml ilave edilerek iyice karıştırılmıştır. Karanlıkta 15 dk bekleme süresinden sonra ekstrakttaki proteinin 595 nm de Blanke karşı absorpsiyonu spektrofotometrik olarak ölçülmüştür ve µg/ml cinsinden hesaplanmıştır. Standart olarak Bovine Serum Albumin (BSA) kullanılmıştır.

3.6. Amilaz Aktivitesinin Tayini

Çeşitli SNP konsantrasyonları ve distile suda çimlenmeye bırakılan mercimek tohumlarının plumula ve radikulaları dip kısımlarından kesildikten sonra taze kısmın ağırlığı alınıp, tohum ağırlığının üzerine 4 katı hacimde 0.05 M sodyum fosfat tamponu (pH 6.6) ilave edilerek homojenize edilmiştir. Whatman kağıdından süzdükten sonra 20 000 g de 15 dk 4 ºC de santrifüj edilerek, enzim aktivitesi

Jennings ve Duffus (1977) a göre spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Bu amaçla 0.6 gr nişasta, 3 ml 1 M asetat tamponu (pH 5.2) içeren 100 ml saf su içinde çözündürülerek substrat olarak kullanılmıştır. Ölçüm için 1 ml nişasta çözeltisinden ve 0.5 ml enzim eksraktından alınıp karıştırılmıştır ve bu karışımın 0.1 ml sine 5 ml iyot çözeltisi ilave edilerek 608 nm de ilk absorbans kaydedilmiştir. Daha sonra 35 ºC lik su banyosunda 5 dk bekletilerek son absorbansı ölçülmüştür. Enzim aktivitesi A_{608} / 5 dk./gr olarak hesaplanmıştır. Blank olarak 5 ml iyot çözeltisi kullanılmıştır.

3.7. Asit Fosfataz Aktivitesinin Tayini

Bu enzimin aktivitesi Tanaka ve ark. (1990) nın yöntemi kullanılarak tayin edilmiştir. Buna göre, tohumlar 1 ml 50 mM Tris-HCl (pH 6.8) tamponu ile homojenizasyonu ardışık 20 dk 13 000 rpm de santrifüj edilmiştir. Enzim aktivitesi pH 5.0 de ve 31 ºC de p-nitrofenilfosfattan, p-nitrofenol çıkış oranının ölçülmesi ile saptanmıştır. Tepkime ortamı, total hacim 1 ml olacak şekilde 150 mmol potasyum asetat, 30 mmol p-nitrofenolfosfat ve enzim ekstraktından ibarettir. 30 dk 31 ºC de inkübasyondan sonra bu karışıma 1 ml 2 M Na_2CO_3 ilave edilmiştir. Daha sonra enzim eksraktı içermeyen Blank e karşı spektrofotometrede 410 nm de absorbansı okunarak asit fosfataz aktivitesi Unite/ml dk. cinsinden kantitatif olarak ifade edilmiştir.

3.8. Asit ve Nötral Proteaz Aktivitesi Tayini

Tohumların 2 ml 50 mM fosfat-sitrat tamponunda (pH 6.0) ektraksiyonu ardışık homojenatlar soğukta (4 ºC) yarım saat bekletildikten sonra 12 000 rpm de 15 dk 4 ºC de santrifüj edilmiştir. Süpernatant fraksiyonunda Azocoll (Calbiochem) substrat olarak kullanılarak proteaz aktivitesi tayin edilmiştir. 1 ml lik final reaksiyon karışımı 5 mg Azocoll, 0.8 ml 50 mM fosfat-sitrat tamponu asit proteaz için (pH 4.2), nötral proteaz için (pH 6.6) ve 0.2 ml enzim içerir. Enzim içermeyen kontrol gruplarda benzer şekilde hazırlandıktan sonra bu karışımı içeren tüpler vortekslenip karıştırıcılı su banyosunda 43 ºC de 3 saat bekletilmiştir. Bu süre sonunda reaksiyonu durdurmak için tüpler 1 saat buz içinde tutulup, çözünmeyen Azocollü uzaklaştırmak

için tüpler yeniden santrifüjlenmiştir. Süpernatantın absorbansı 520 nm dalga boyunda okunup, enzim aktivitesi O.D. 520/ g T.A olarak ifade edilmiştir.

3.9. Klorofil ve Karotinoid Tayini

Klorofil tayini yapılacak olan bitki gövdesinin taze ağırlığı alınarak bir miktar $CaCO_3$ tozu ile % 90 aseton içerisinde ekstre edilmiştir. Ekstreler 24 saat boyunca +4 °C de bekletildikten sonra 3 000 g de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra buradan alınan örneklerin spektrofotometrede 630, 645, 665, 480 ve 750 nm dalga boylarındaki absorbsiyon değerleri ölçülerek, total klorofil ve karotinoid içerikleri µg/ g.T.A. cinsinden tayin edilmiştir (Parsons ve Strickland, 1963).

3.10. Antosiyanin Tayini

Taze ağırlıkları alınmış gövde kısımları Mancinelli (1990) nin metoduna göre % 1 oranında asitlendirilmiş 18 ml metanolde ekstre edilmiştir. Ekstreler arasıra çalkalanarak 2 gün 3-5 °C buzdolabında bekletildikten sonra filtre kağıdından süzülmüş ve çözeltideki antosiyanin içeriği spektrofotometrede 530 nm dalga boyunda ölçülerek, birim taze ağırlıkdaki antosiyanin içeriği optik yoğunluk (OD/g T.A.) olarak ifade edilmiştir.

3.11. İstatistiksel Hesaplamalar

Çimlenme aşamasında yapılan deneylerin sonuçları istatiksel veriler şeklinde değerlendirilmiştir. Araştırmada deneyler en az 3 kez tekrarlanmış olup, standart hataları aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplanmıştır.

$X: \sum X_i / N$

X: Aritmetik ortalam

$\sum X_i$: Değerlerin toplamı (birinciden N'inciye kadar değişkenin bütün değerlerinin toplamı)

N: Tekrarlanan deney sayısı

$S = \sqrt{\sum X_i} / N$

S: Standart sapma

Standart Hata: $S / \sqrt{N}$

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Nitrik Oksitin Tohum Çimlenmesine Etkisi

NO vericisi SNP in mercimek tohumlarının çimlenmesine etkisini saptamak amacı ile her bir konsantrasyon serisi için 30 tohum petrilere ekilip, 0. saatten 72. saat sonuna kadar günlük olarak izlenmiş ve çimlenmeleri kaydedilmiştir. İmbibisyondan 24 saat sonra SNP in farklı konsantrasyonlarının mercimek tohumlarının çimlenmesi üzerine olan etkileri Çizelge 4.1. ve Şekil 4.1.'de özetlenmiştir.

Çizelge 4.1. Kontrol ve farklı SNP konsantrasyonları uygulanmış mercimek tohumlarının 24. saatteki çimlenme yüzdeleri

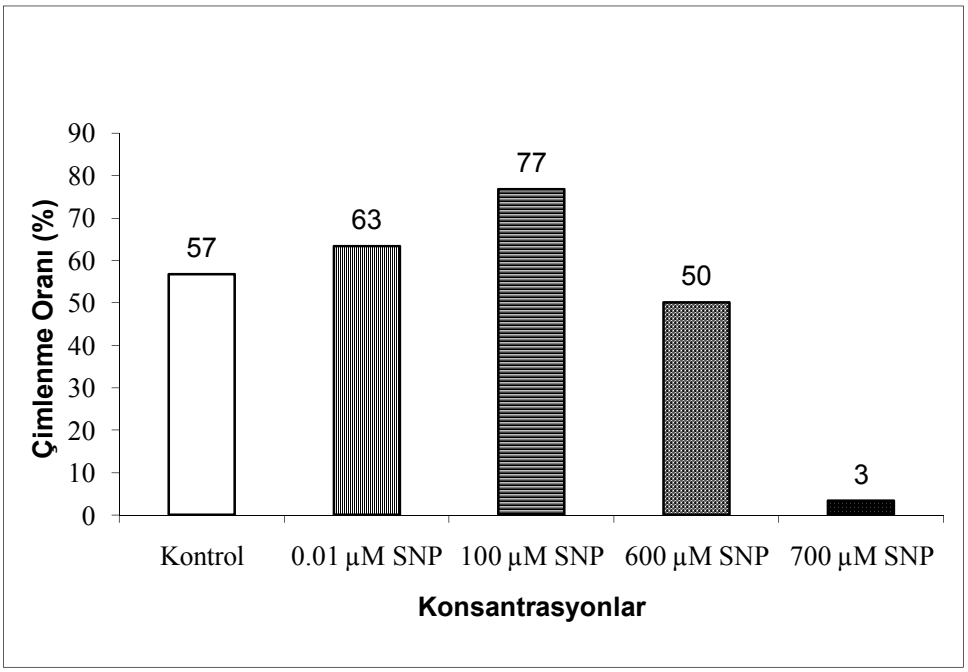
Deney Serileri	Çimlenme Yüzdesi (%)
Kontrol	57
0.01 µM	63
100 µM	77
600 µM	50
700 µM	3

Çizelge 4.1.'den de görüldüğü gibi 24. saatte kontrol ve tüm SNP konsantrasyonlarında çimlenme meydana gelmiş ancak 600 ve 700 µM SNP in tohum çimlenmesinde belirgin gerilemelere neden olduğu saptanmıştır. Çimlenme üzerine olan bu inhibisyon özellikle 700 µM SNP de daha belirgin şekilde ortaya çıkmıştır. 0.01 µM SNP de çimlenmede bir artış izlenirken, en yüksek çimlenme yüzdesi 100 µM SNP de elde edilmiştir.

Çimlenme deneylerinde tabloda yer almayan ara değerler denenmiş olup çıkan sonuçlar tablo da gösterilen değerlere çok yakın olduğundan belirtilmemiştir. 700

µM SNP den daha büyük değerler letal etki yaptığından dolayı bu değer sınır değer olarak kalmıştır.

Şekil 4.1.'den izlendiği gibi 24. saatte deney grupları kontrol grubu ile kıyaslandığında, 0.01 µM SNP de % 11, 100 µM SNP de % 35 oranında teşvik gözlenirken, 600 ve 700 µM SNP de ise sırasıyla % 12 ve % 94 oranında belirgin bir inhibisyon tespit edilmiştir.



Şekil 4.1. Kontrol ve farklı SNP konsantrasyonları uygulanmış mercimek tohumlarının 24. saatteki çimlenme yüzdelerinin karşılaştırılması

Sonuç olarak mercimek tohumlarının, çimlenmesi aşamasında SNP uygulamalarına oldukça duyarlı olduğu ve 100 µM SNP de belirgin bir teşvik, 700 µM SNP de ise kuvvetli bir inhibisyon saptanmıştır. Bu da tohum çimlenmesinde SNP konsantrasyonunun son derece önemli olduğunu göstermektedir.

Bu sonuçlar diğer bazı bitkilerin tohumları kullanılarak yapılan araştırmaların verileriyle parelellik göstermektedir. NO vericisi olan bileşliklerin *Arabidopsis'*de ve *Lactuca sativa*'da (Beligni and Lamattina, 2000) çimlenmeyi teşvik ettiği bulunmuştur. Ayrıca, Kopyra ve Gwóźdź (2003) tarafından NO vericisi olan SNP in *Lupinus*'de 0.1 ve 800 µM SNP arasında, konsantrasyona bağlı olarak tohum çimlenmesini ve kök büyümesini arttırdığı bildirilmiştir. Bu çalışmayı destekleyen diğer bir çalışmada ise SNP in çimen tohumlarının çimlenmesini teşvik ettiği belirtilmiştir (Sarath ve ark., 2006). Bu çalışmada da NO in mercimek tohumlarının

çimlenme sürecinde konsantrasyona bağlı olarak teşvik ya da inhibe ettiği ortaya konmuştur.

SNP teşvik edici etkisini, çimlenme ve dormansi olayında önemli rol oynayan endojen gibberellin seviyelerini etkileyerek de gösterebilir. Bununla ilgili destekleyici çalışmaların yapılmasına gereksinim duyulmaktadır.

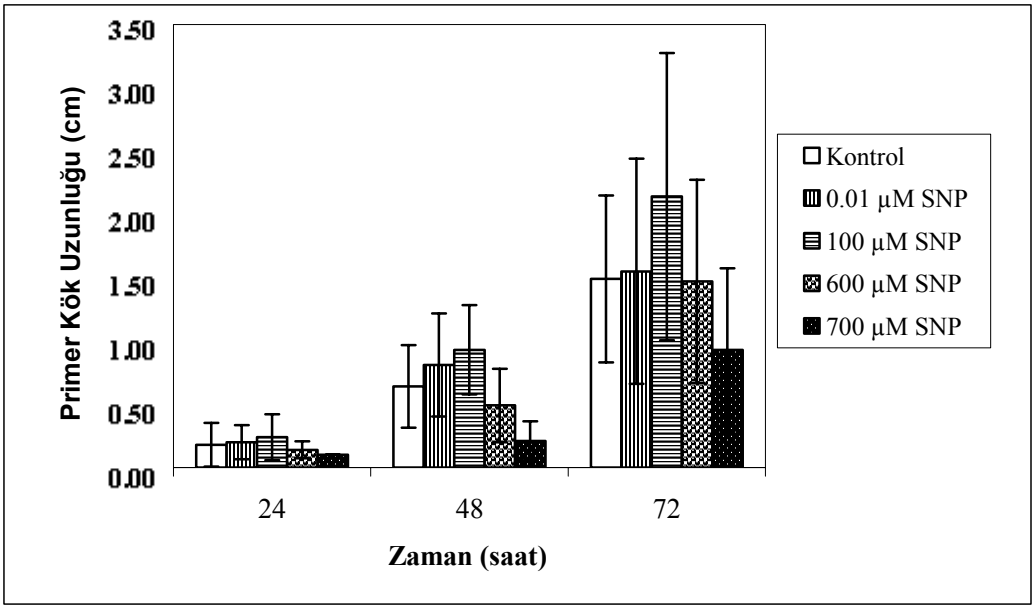
4.2. Nitrik Oksitin Primer Kök Uzunluğuna Etkisi

Mercimek tohumlarının çimlenme aşamasında SNP in 72 saat boyunca primer kök uzunluğuna etkisi her gün uzunlukları alınarak kaydedilmiş ve daha sonra büyüme deneyi için çimlenen tohumlar perlite alınmıştır. Mercimek tohumlarının primer kök uzunluklarına ait veriler Çizelge 4.2. ve Şekil 4.2.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. Kontrol ve farklı SNP konsantrasyonları uygulanmış mercimek tohumlarının 24, 48 ve 72. saatteki primer kök uzunlukları

Deney Serileri	Ölçüm Aralıkları (saat)	Primer Kök Uzunluğu (cm)
Kontrol	24	0.18
	48	0.64
	72	1.49
0.01 µM SNP	24	0.20
	48	0.81
	72	1.55
100 µM SNP	24	0.24
	48	0.93
	72	2.14
600 µM SNP	24	0.14
	48	0.49
	72	1.47
700 µM SNP	24	0.10
	48	0.21
	72	0.93

Çizelge 4.2.'den de görüldüğü gibi zamana bağlı olarak tüm deney grupları kontrol ile kıyaslandığında SNP in primer kök uzunluklarına olan etkisi son derece belirgindir. Özellikle primer kök uzunluğunda en fazla büyüme 48 ve 72. saatlerde 100 µM SNP de elde edilirken, konsantrasyon artışına paralel olarak özellikle 700 µM SNP in dikkate değer bir gerilemeye neden olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.2. Kontrol ve farklı SNP konsantrasyonları uygulanmış mercimek tohumlarının 24, 48, ve 72. saatteki primer kök uzunluklarının karşılaştırılması

Şekil 4.2.'de farklı SNP konsantrasyonlarında çimlenen mercimek tohumlarının primer kök uzunluğu kontrol ile karşılaştırıldığında özellikle 72. saatte 100 µM SNP % 43 oranında teşvik ederken, 700 µM SNP in ise % 37 oranında inhibe ettiği bulunmuştur. 0.01 ve 600 µM SNP konsantrasyonlarının kontrol grubu ile hemen hemen aynı cevapları gösterdiği saptanmıştır.

Bu sonuç Zhang ve ark. (2005a) nın buğday tohumlarının çimlenmesini ve radikula uzunluğunu SNP in konsantrasyona bağlı olarak belirgin şekilde teşvik ettiği bulgusu ile paraleldir. Bu çalışmada, primer kök uzunluğu ile ilgili deneylerin sonucunda, kök büyümesi üzerine pozitif yöndeki en etkili konsantrasyonun 100 µM SNP olduğu, 700 µM SNP in ise dikkate değer bir inhibisyona yol açtığı elde edilmiştir. Bu bulgu, çimlenme deneyinde olduğu gibi primer kök uzamasında da konsantrasyonun ne derece önemli olduğunu göstermektedir. Burada 100 µM SNP in

neden olduğu belirgin teşvik edici etkinin, NO in oksin ile birlikte çalışarak ortaya çıktığı ileri sürülebilir. Buna karşın Parani ve ark. (2004) 100 μM SNP in etilen biyosentezinden sorumlu iki enzimin (ACC sentaz ve ACC oksidaz) gen anlatımını arttırarak kök uzamasını inhibe ettiği bulgusu ile zıtlık göstermektedir. Ayrıca Tian ve ark. (2007) SNP in *H. Moscheutos*'de 50 μM dan daha yüksek SNP konsantrasyonlarının belirgin bir şekilde kök uzamasını inhibe ettiğini göstermişlerdir. SNP in yüksek konsantrasyonlarının kök uzaması üzerine inhibitör etkisinin mekanizması hala anlaşılamamıştır. Bu çalışmada da 100 μM SNP in üzerindeki konsantrasyonlarda inhibisyon gözlenmiştir. Bu inhibitör etkiyi açıklayan çeşitli olasılıklar vardır. Bunlardan biri aşırı NO varlığında sitotoksit peroksinitritin ($ONOO^-$) kök uzaması ile ilgili bazı fizyolojik cevapları değiştirmesidir (Beligni ve Lamattina, 1999a, b) diğerin de ise SNP in etilen biyosentezini teşvik etmesidir (Parani ve ark., 2004). Son yıllarda NO in hıyar (*Cucumis sativus*) bitkisinde apikal kök oluşması sırasında oksin cevabında rol oynadığı da gösterilmiştir (Pagnussat ve ark., 2002).

Burada elde edilen sonuçlara göre dıştan uygulanan NO in mercimek tohumlarının primer kök uzunluğunun düzenlenmesinde doğrudan ya da dolaylı olarak rol oynayabileceği, 100 μM SNP in daha üzerindeki konsantrasyonlarda meydana gelen inhibisyonun, NO etkisinde etilen miktarının artmasıyla ortaya çıktığı söylenebilir.

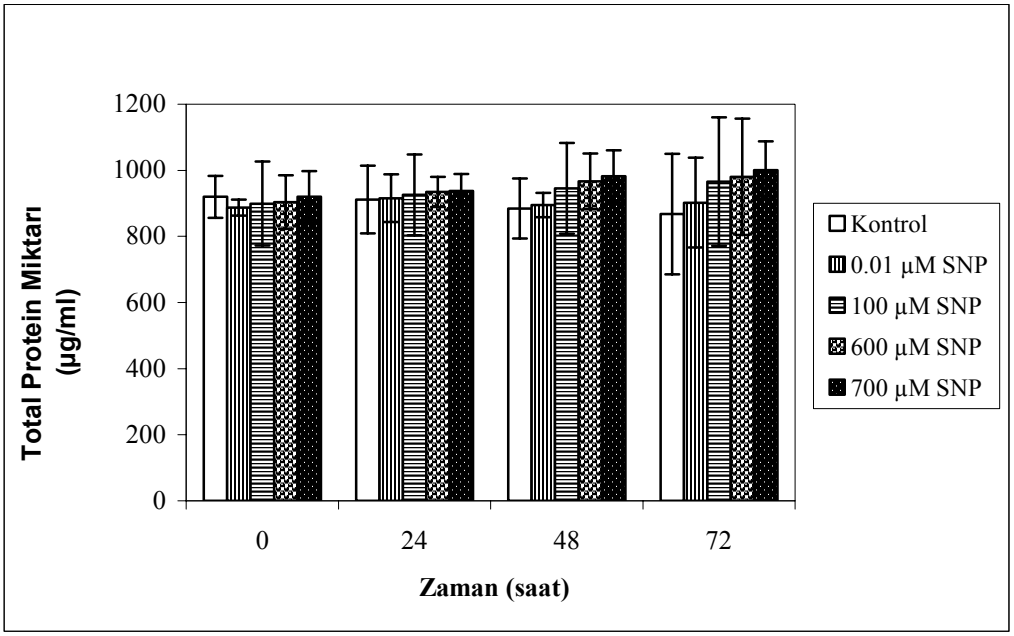
4.3. Nitrik Oksitin Çözünebilir Total Protein Miktarına Etkisi

Her bir deney için kullanılan yaklaşık 60 tohumun plumula ve radikulası kesilerek çıkartılmış ve geri kalan tohum kısmında Bradford (1976) yöntemi kullanılarak total protein miktarı tayin edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.3. ve Şekil 4.3.'de verilmiştir.

Çizelge 4.3. Kontrol ve farklı SNP konsantrasyonları uygulanmış mercimek tohumlarının 0, 24, 48 ve 72. saatteki total protein miktarları

Deney Serileri	Ölçüm Aralıkları (saat)	Total Protein Miktarı (µg/ml)
Kontrol	0	920
	24	911
	48	885
	72	868
0.01 µM SNP	0	887
	24	916
	48	895
	72	902
100 µM SNP	0	899
	24	926
	48	945
	72	966
600 µM SNP	0	904
	24	935
	48	967
	72	980
700 µM SNP	0	920
	24	938
	48	982
	72	1000

Çizelge 4.3.'deki sonuçlar incelendiğinde total protein içeriğinde kontrol grubunda zamana bağlı bir azalma elde edilirken, tüm deney gruplarında hem zamana hem de artan SNP konsantrasyonuna bağlı olarak gittikçe yükselen değerler elde edilmiştir.



Şekil 4.3. Kontrol ve farklı SNP konsantrasyonları uygulanmış mercimek tohumlarının 0, 24, 48 ve 72. saatteki total protein miktarlarının karşılaştırılması

Şekil 4.3.'de görüldüğü gibi mercimek tohumlarının total protein miktarı, imbibisyonu ardışık 0. saatte 0.01, 100 ve 600 µM SNP de kontrolün altında, 700 µM SNP de ise kontrole yakın bir değer saptanmıştır. Zamana bağlı olarak kontrol grubundaki protein miktarı daha az bulunurken, deney serilerinde kontrole göre çok belirgin olmasa da daha yüksek seviyelerde kalmıştır. Diğer bir deyimle protein miktarında artan konsantrasyon ile doğru orantılı olarak artan değerler elde edilmiştir. Kuru tohumda protein içeriği fazla olan mercimeğin kontrol grubundaki total protein miktarındaki azalış ise imbibisyonu takiben protein yıkımı ile ilgili enzimlerin hızla aktive olup, onları hidrolize etmesi ya da yeni protein sentezinin olmaması şeklinde yorumlanabilir. Artan SNP konsantrasyonlarında ya protein yıkımı hızlı değil, bundan dolayı çimlenme oranının düşük ve kök uzamasının da daha az olduğu söylenebilir. Bunun sonucunda antioksidan sistemle ilgili enzimlerin sentezi artar, dolayısıyla düşük SNP konsantrasyonlarına göre protein miktarının yüksek çıkması söz konusu olabilir. Liul ve ark. (2007) NO in plazma membranı intrinsik protein (aquaporinler) gen anlatımını teşvik ederek su alınmasını arttırıp çimlenmeyi hızlandırdığını bulmuşlardır. Ancak bu çalışmada, 700 µM SNP de çimlenme yüzdesi çok az olmasına karşın total protein miktarı gerek kontrole gerekse diğer deney gruplarına göre oldukça fazladır. NO in total protein içeriği ile doğrudan

ilgisini gösteren makaleye ulaşılamadığından karşılaştırma yapma olanağımız da olmamıştır. Bu nedenle konu ile ilgili daha ileri düzeyde araştırılmaların yapılmasının gerekli olduğu kanısındayız.

4.4. Nitrik Oksitin Amilaz Aktivitesine Etkisi

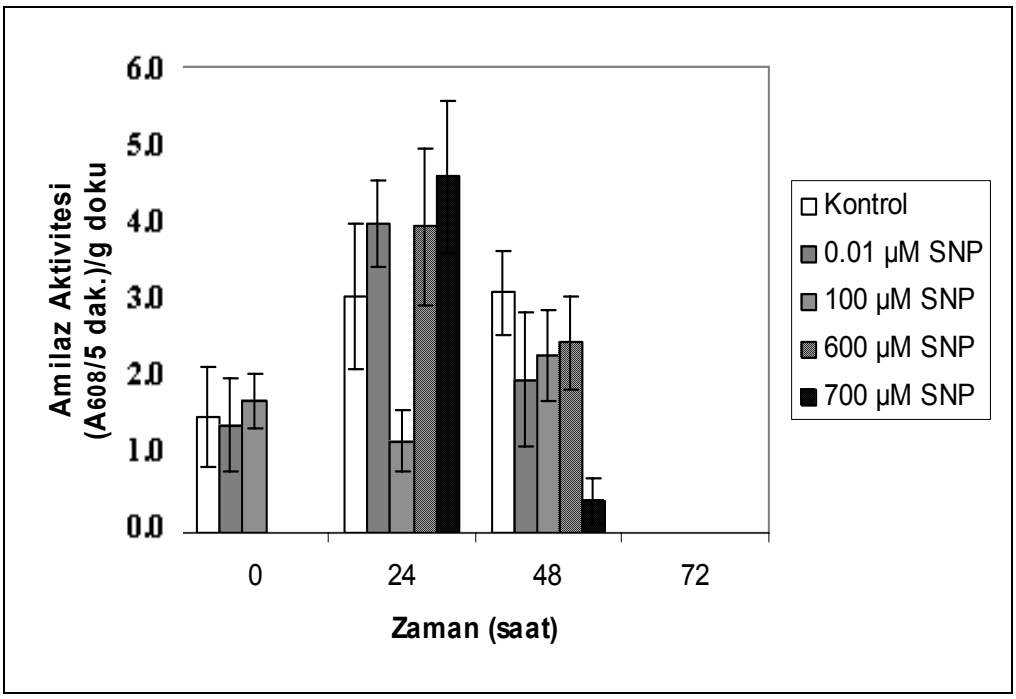
Bu deney serisinde SNP in mercimekte tohum çimlenmesinin 0, 24, 48 ve 72. saatlerinde amilaz aktivitesi üzerine etkisi incelenmiştir ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.4. ve Şekil 4.4.'de özetlenmiştir.

Çizelge 4.4. Kontrol ve farklı SNP konsantrasyonları uygulanmış mercimek tohumlarının 0, 24, 48 ve 72. saatteki amilaz aktiviteleri

Deney Serileri	Ölçüm Aralıkları (saat)	Amilaz Aktivitesi (A_{608}/5 dak)/g doku
Kontrol	0	1.490
	24	3.043
	48	3.093
	72	0.000
0.01 µM SNP	0	1.385
	24	3.986
	48	1.975
	72	0.000
100 µM SNP	0	1.690
	24	1.182
	48	2.282
	72	0.000
600 µM SNP	0	0.000
	24	3.940
	48	2.447
	72	0.000
700 µM SNP	0	0.000
	24	4.583
	48	0.412
	72	0.000

Çizelge 4.4. değerlendirildiğinde kontrol tohumlarına ait amilaz aktivitesi 0. saatten başlayarak giderek artmış ve 24. saatte maksimum düzeye ulaşmıştır, 48.

saatte ise az çok aynı kalmıştır. Çimlenmenin 0. saatinde 0.01 µM SNP de amilaz aktivitesi kontrole yakın, 100 µM SNP uygulamasında az da olsa kontrolün üzerinde, 600 ve 700 µM SNP de ise herhangi bir aktivite gözlenmemiştir. Çimlenme yüzdesi 24. saatte maksimum olan 100 µM SNP deki tohumların amilaz aktivitesi diğer tüm uygulamalardan süpriz bir şekilde az bulunmuştur. 24. saatte maksimum aktivite 700 µM SNP uygulamasında elde edilirken, 48. saatte giderek azalmış ve minumum düzeye ulaşmıştır. Çimlenmenin 72. saatinde ise hiçbir aktivite gözlenmemiştir.



Şekil 4.4. Kontrol ve farklı SNP konsantrasyonları uygulanmış mercimek tohumlarının 0, 24, 48 ve 72. saatteki amilaz aktivitelerinin karşılaştırılması

Şekil 4.4.'e göre çimlenmenin 24. saatinde 100 µM SNP haricindeki tüm deney gruplarında belirgin bir aktivite gözlenirken, 100 µM SNP deki tohumların 0. saate göre amilaz aktivitesi % 30 oranında azalmıştır. Bunun aksine 24. saate göre 48. saatte amilaz aktivitesi 0.01, 600 ve 700 µM SNP konsantrasyonlarında sırasıyla % 50, % 38 ve % 91 oranında azalırken, 100 µM SNP de 0. saatteki değerini geçen bir sonuç elde edilmiştir.

24. saatte 100 µM SNP de mercimek tohumlarının çimlenme yüzdesinin fazla olması ile amilaz enzim aktivitesi arasında bir uyumsuzluk görülmektedir. 100 µM SNP de amilaz aktivitesindeki maksimum artış belki de imbibisyonu ardışık 0. ile 24. saatler arasında olmuş olabilir. Daha detaylı moleküler metodlar kullanılarak

enzim aktivitesindeki değişikleri saptamanın gerekli olduğu görülmüştür. 72. saatte tüm deney gruplarında herhangi bir aktivitenin olmaması çimlenmenin sona erdiğini işaret etmektedir.

Amilaz çimlenmede rol alan önemli enzimlerden biridir. Bu enzim çimlenme sırasında aktif duruma geçerek, embriyonun beslenmesi dolayısıyla büyümesi için gerekli olan glukozu endospermde bulunan nişastayı parçalamak suretiyle sağlar (Bidwell, 1974). Yapılan diğer çalışmalarda amilaz aktivitesi üzerine çeşitli bitki büyüme düzenleyicilerinin etkisi oldukça fazla incelenmiştir (Jovanovic ve ark., 1997; Yan ve ark., 2004). Bununla birlikte amilaz ve NO arasındaki ilişkiyi gösteren ancak birkaç literatür bilgisine rastlanmıştır. Buna göre çimlemenin erken evrelerinde buğday tohumlarının gibberelline değil ancak NO uygulamasına duyarlı olduğu, NO in α-amilaz aktivitesini etkilemeksizin β-amilaz aktivitesinde konsantrasyona bağlı olarak hızlı bir artışa neden olduğu bulunmuştur (Zhang ve ark., 2005a). Bu araştırma SNP in hem serbest β-amilazın disosiyasyonunda ilginç bir rol oynadığını hem de bağlı β-amilazın serbest şekle dönüşmesini doğrudan teşvik ettiğini göstermiştir. Ayrıca benzer şekilde arpa, soya fasulyesi, pirinç, kavun gibi diğer bitki tohumlarında da mevcut NO e karşı verilen hızlı β-amilaz cevabının, tohum çimlemesinin erken evresinde oluşan ortak bir olay olduğu düşünülmektedir. Bu çalışmada da muhtemelen NO in β-amilaz aktivitesini etkilediği söylenebilir. Yüksek SNP konsantrasyonları doğrudan amilaz sentezini ya da serbest şekle dönüşmesini teşvik etmiş olabilir. Zhang ve ark. (2005b) nın başka bir çalışmasında buğday tohumlarına SNP in fruktoz, glukoz, sukroz gibi şekerler ile birlikte uygulanması durumunda, şekerlerin amilaz izozim I i aktive ettiği, bu aktivitede çimlenmenin erken evrelerini başlatan haberci molekül NO in rol oynadığı gösterilmiştir. Bu çalışmada NO çimlenme yüzdesini arttırdığı için 24. saatte amilaz aktivitesini de teşvik etmesi beklenirdi ancak çimlenmenin daha erken bir evresinde etkisini gösterdiği fikri Zhang ve ark. (2005a, b) nın her iki çalışması ile paraleldir.

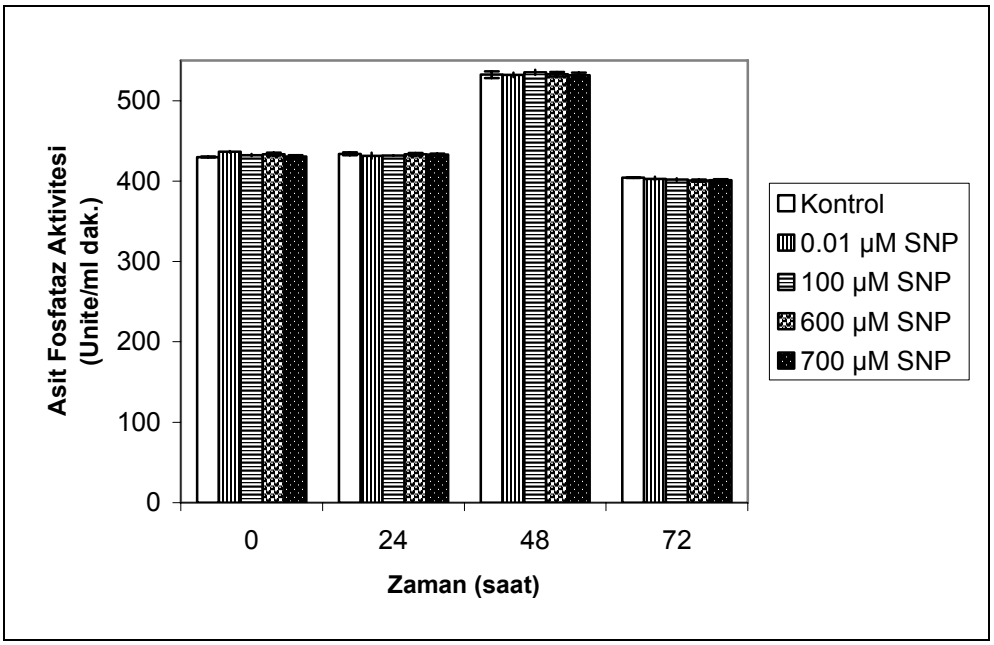
4.5. Nitrik Oksitin Asit Fosfataz Aktivitesine Etkisi

Asit fosfataz aktivitesi sonuçları Çizelge 4.5. ve Şekil 4.5.'de verilmiştir. 0, 24, ve 72. saatlerde tüm deney gruplarının asit fosfataz aktivitesi hemen hemen aynı seviyede kalırken, 48. saatte yine tüm deney gruplarında aynı oranda bir aktive artışı saptanmıştır.

Çizelge 4.5. Kontrol ve farklı SNP konsantrasyonları uygulanmış mercimek tohumlarının 0, 24, 48 ve 72. saatteki asit fosfataz aktiviteleri

Deney Serileri	Ölçüm Aralıkları (saat)	Asit Fosfataz Aktivitesi (Ünite/ml dak)
Kontrol	0	429.87
	24	433.92
	48	532.35
	72	404.32
0.01 µM SNP	0	436.49
	24	431.53
	48	532.08
	72	402.94
100 µM SNP	0	432.35
	24	431.89
	48	535.29
	72	402.02
600 µM SNP	0	433.55
	24	433.46
	48	532.90
	72	400.64
700 µM SNP	0	430.70
	24	432.84
	48	531.62
	72	401.01

Çizelge 4.5.'deki sonuçlar incelendiğinde, kontrol grubu tohumların asit fosfataz aktivitesi ile SNP uygulanmış diğer deney gruplarının aktiviteleri arasında belirgin bir farklılık bulunamamıştır.



Şekil 4.5. Kontrol ve farklı SNP konsantrasyonları uygulanmış mercimek tohumlarının 0, 24, 48 ve 72. saatteki asit fosfataz aktivitelerinin karşılaştırılması

Şekil 4.5. incelendiğinde, SNP in asit fosfataz aktivitesi üzerine kontrolden farklı olarak 0, 24, 48 ve 72. saatlerde bir aktivite değişikliği görülmezken, 48. saatte kontrol ve tüm deney gruplarında meydana gelen artışın SNP uygulaması ile bağlantılı olmadığı sonucuna varılmıştır.

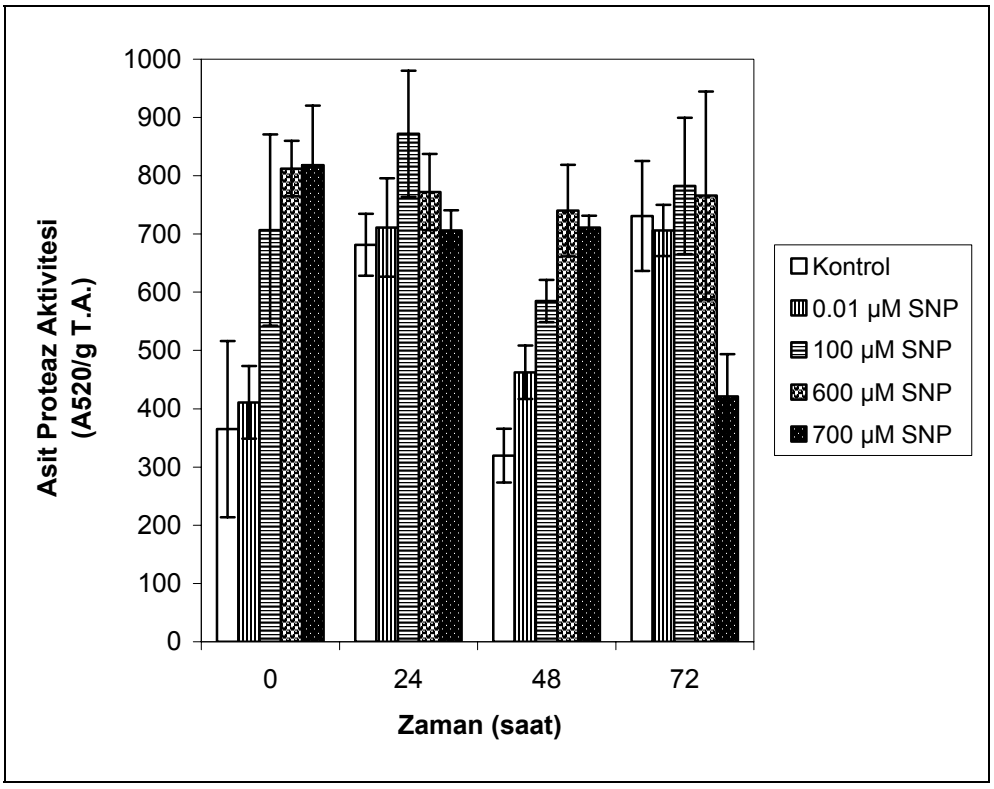
Asit fosfatazlar bitkilerde oldukça yaygın bulunan enzimlerdir. Bitki asit fosfatazlarının bugüne kadar tohum, kotiledon, yaprak, kök, tuber, bulb ve kök nodullerindeki aktiviteleri incelenmiştir (Tanaka ve ark., 1990; Garcia ve ark., 2004). Asit fosfatazların özellikle çimlenmenin metabolik süreçlerinde ve bitki olgunlaşmasında rol oynadığı bilinmektedir. Çimlenme sırasında tohumda asit fosfatazların anlatımı yapılmakta ve aktivitelerinde bir artış olmaktadır. Böylece büyüyen embriyo için depo materyaller açığa çıkmaktadır (Prazeres ark., 2004). Tohum çimlenmesi gibi hızlı büyüme ve bölünmenin olduğu bu evrede fosfora olan gereksinim belirgin şekilde artar. Asit fosfatazların çimlenme sırasında fosfor depolarının hareketlenmesinde rol oynadıkları bilinmektedir (Duff ve ark., 1994). NO in amilaz aktivitesi üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı, en azından mercimek tohumlarının çimlenme sürecinde ikisi arasında önemli bir bağlantının bulunmadığı düşünülebilir.

4.6. Nitrik Oksitin Asit Proteaz Aktivitesine Etkisi

Mercimek tohumlarının çimlenme aşamasında kontrol ve deney gruplarına ait asit proteaz sonuçları Çizelge 4.6. ve Şekil 4.6.'da özetlenmiştir.

Çizelge 4.6. Kontrol ve farklı SNP konsantrasyonları uygulanmış mercimek tohumlarının 0, 24, 48 ve 72. saatteki asit proteaz aktiviteleri

Deney Serileri	Ölçüm Aralıkları (saat)	Asit Proteaz Aktivesi (A_{520}/g T.A)
Kontrol	0	365.03
	24	681.31
	48	319.72
	72	730.82
0.01 µM SNP	0	411.02
	24	711.12
	48	462.51
	72	706.30
100 µM SNP	0	706.72
	24	872.21
	48	584.82
	72	782.43
600 µM SNP	0	812.41
	24	772.17
	48	740.25
	72	765.98
		.
700 µM SNP	0	818.45
	24	706.10
	48	711.10
	72	421.24



Şekil 4.6. Kontrol ve farklı SNP konsantrasyonları uygulanmış mercimek tohumlarının 0, 24, 48 ve 72. saatteki asit proteaz aktivitelerinin karşılaştırılması

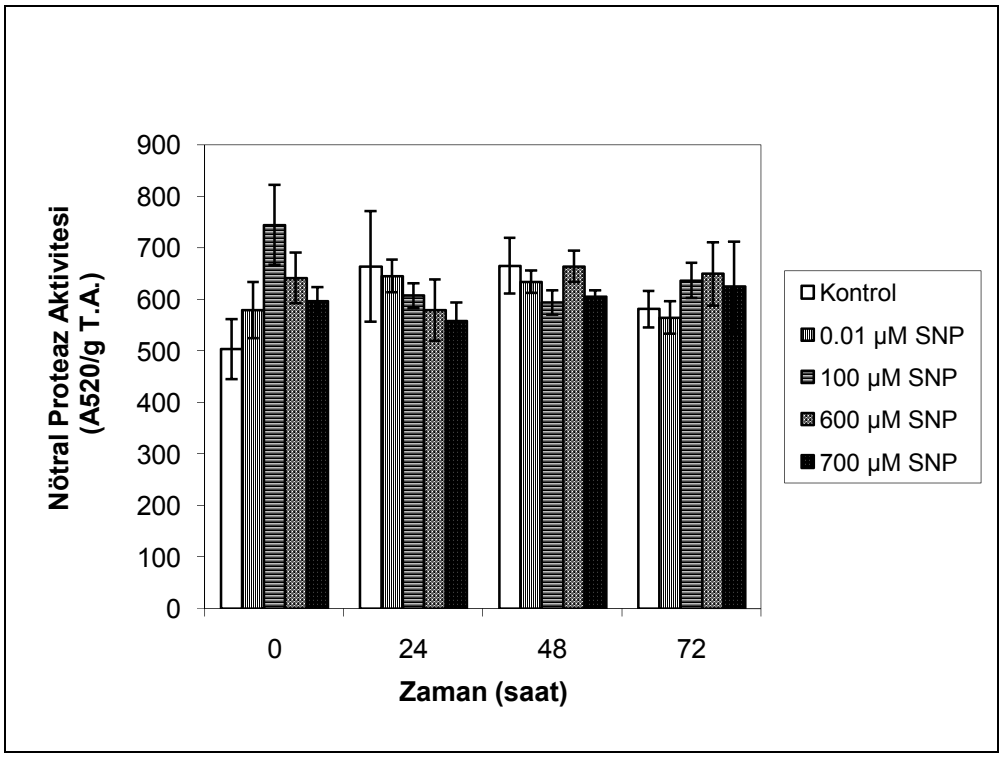
Çizelge 4.6. ve Şekil 4.6. incelendiğinde 0. saatte kontrole göre deney gruplarının asit proteaz aktivitesinde konsantrasyona paralel bir artış gözlenmiştir. 24. saatte tüm deney konsantrasyonlarında enzim aktivitesi kontrol grubundan fazla olmakla birlikte 600 ve 700 µM SNP konsantrasyonlarında sırasıyla % 5 ve % 13 oranında azalma; kontrol, 0.01 ve 100 µM SNP de ise sırasıyla % 86, % 73 ve % 23 oranında artış belirlenmiştir. 48. saatte hemen hemen 0. saate yakın değerler elde edilirken, 72. saatte 700 µM SNP de önemli derecede azalma, diğer deney gruplarda ise artış saptanmıştır.

4.7. Nitrik Oksitin Nötral Proteaz Aktivitesine Etkisi

Mercimek tohumlarının çimlenme aşamasında tüm deney gruplarındaki nötral proteaz aktivitesine ait sonuçlar Çizelge 4.7. ve Şekil 4.7.'de verilmiştir.

Çizelge 4.7. Kontrol ve farklı SNP konsantrasyonları uygulanmış mercimek tohumlarının 0, 24, 48 ve 72. saatteki nötral proteaz aktiviteleri

Deney Serileri	Ölçüm Aralıkları (saat)	Nötral Proteaz Aktivesi (A_{520}/g T.A)
Kontrol	0	503.99
	24	664.69
	48	665.66
	72	581.79
0.01 µM SNP	0	579.39
	24	645.61
	48	634.76
	72	637.34
100 µM SNP	0	745.19
	24	607.97
	48	594.95
	72	637.34
600 µM SNP	0	642.20
	24	580.11
	48	664.48
	72	650.23
700 µM SNP	0	597.66
	24	559.00
	48	605.65
	72	625.33



Şekil 4.7. Kontrol ve farklı SNP konsantrasyonları uygulanmış mercimek tohumlarının 0, 24, 48 ve 72. saatteki nötral proteaz aktivitelerinin karşılaştırılması

Çizelge 4.7. ve Şekil 4.7. incelendiğinde, 100 µM SNP de 0. saatte kontrole göre % 47 oranında maksimum bir aktivite elde edilmiştir. 24. ve 48. saatlerde kontrole yakın ya da altında değerler saptanmıştır. 72. saatte ise kontrole göre sadece 0.01 µM SNP de azalma, diğerlerinde ise artış belirlenmiştir.

Çimlenme olayında rol oynayan enzimlerden biri olarak proteaz aktivitesindeki değişikler son derece önemlidir. Tohum çimlenmesi sırasında depo proteinlerinin proteolitik olarak yıkıldığı bilinmektedir (Marttila ve ark., 1995; Vierstra, 1996). Mercimek tohumlarında asit proteaz aktivitesi ilk 24 saat içinde, nötral proteaz aktivitesi ise imbibisyonu ardışık 0. saatte belirgin olarak artmıştır, sonra az çok değişmeden kalmıştır. NO in bu enzimin aktivitesi üzerine de çok erken evrede etki ettiği düşünülürse sentezinden ziyade salınmasını teşvik etmiş olabilir. Bu da diğer araştırıcıların proteaz aktivitesindeki değişikliklerin çimlenmenin daha erken evrelerinde olduğu bilgisi ile uyumludur. Bu bulgu, Zhang ve ark. (2005a) nın buğday tohumlarının erken çimlenme aşamasında SNP ile teşvik edilen proteaz aktivitesinde çok hafif bir artışa neden olduğu sonucuyla paralelik göstermektedir.

4.8. Nitrik Oksitin Fide Büyümesine Etkisi

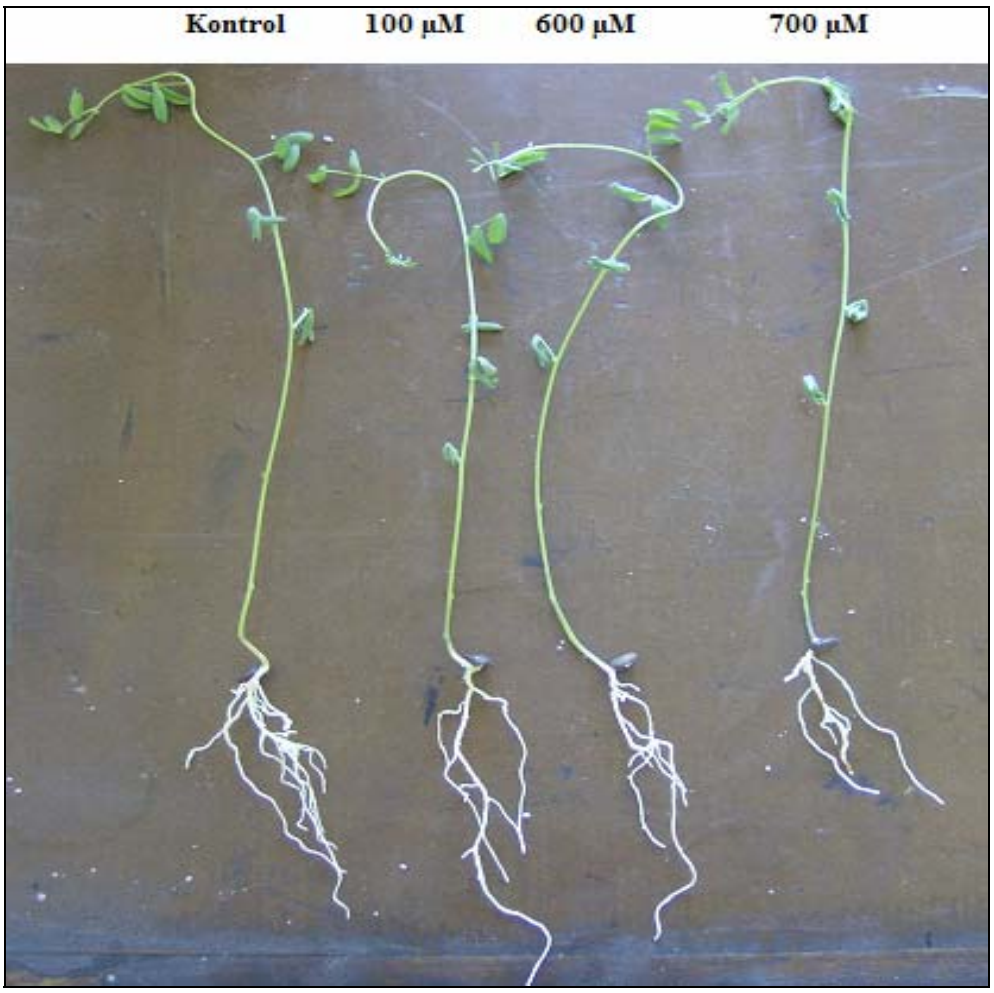
Çimlenmeyi ardışık tohumlar Materyal ve Metod kısmında anlattığı gibi perlit ortamına aktarılarak iklim odasında yetiştirilmiştir. Fidelerin 3. ve 12. gündeki görünümleri Şekil 4.8. ve 4.9.'da izlenmektedir. Fidelerin gelişim aşamasında 12. günden sonra konsantrasyonlar arasında belirgin farklılıklar olmadığı için deneylere devam edilmemiştir. Mercimeğin erken gelişim aşamasında, ön denemeler sonucu SNP konsantrasyonları 100 µM, 600 µM ve 700 µM SNP olarak seçilmiştir. 0.01 µM SNP de 100 µM SNP e benzer sonuçlar gözlendiği için deneylerde bu konsantrasyonlar kullanılmamıştır.



Şekil 4.8. Kontrol ve farklı SNP konsantrasyonları uygulanmış mercimek fidelerinin 3. gündeki genel görünümü

Şekilden de görüldüğü gibi fide büyümesinin 3. gününde kontrole göre 100 µM SNP gövde büyümesini teşvik etmiştir ve tüm SNP uygulamalarında kök uzamasının

indirgendiği dikkat çekicidir. 600 µM ve 700 µM SNP ise hem kök hem de gövde büyümesi üzerine inhibe edici etki göstermektedir. Sonuç olarak çimlenme aşamasında konsantrasyon ne derece önemli ise fide büyümesinde de hem konsantrasyona hem de gelişim evresine bağlı olarak SNP uygulamalarında önemli değişikler meydana gelmiştir.



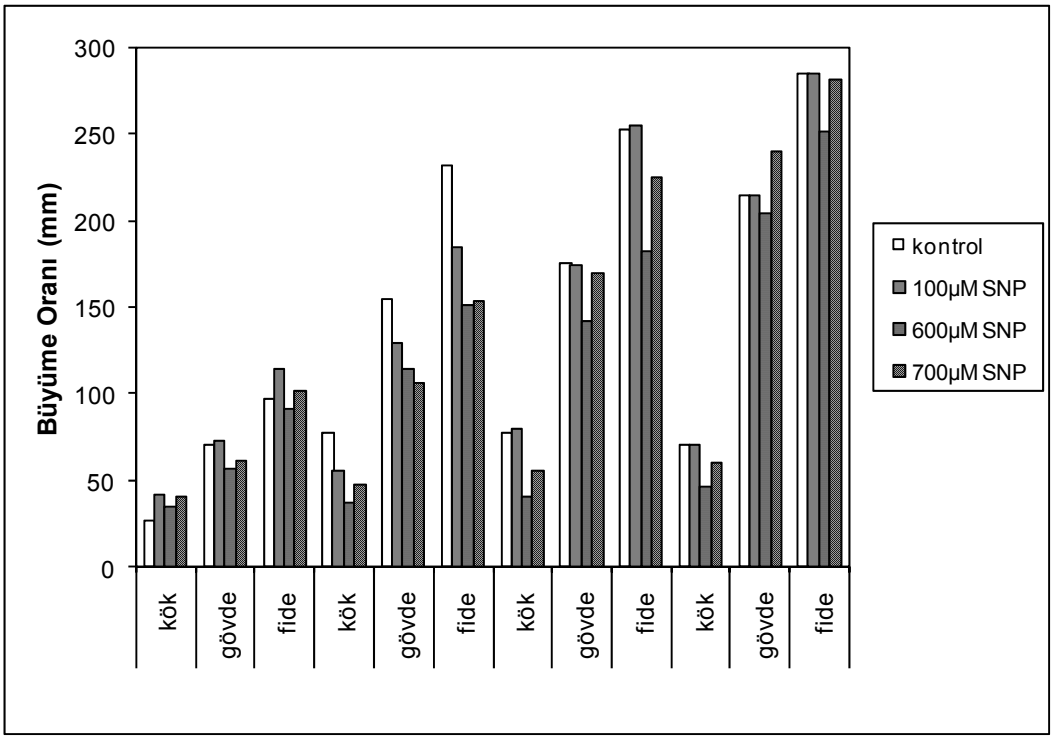
Şekil 4.9. Kontrol ve farklı SNP konsantrasyonları uygulanmış mercimek fidelerinin 12. gündeki genel görünümü

Fide gelişmesinin 12. gününde 100 µM SNP gövde uzamasından ziyade kök uzamasına etkisi ile dikkat çekmekte ve artan SNP konsantrasyonuna paralel olarak kök uzaması indirgenmekte ancak gövde büyümesi teşvik olmaktadır. Sonuç olarak bu durum tüm fide boyuna da yansımıştır.

Kontrol ve farklı SNP konsantrasyonlarında yetiştirilen mercimek fidelerinin kök, gövde ve fide uzunlukları 12 gün boyunca üç gün aralıklarla milimetrik olarak ölçülmüş ve değerler Çizelge 4.8. ve Şekil 4.10.'da özetlenmiştir.

Çizelge 4.8. Kontrol ve farklı SNP uygulanmış mercimek fidelerinin kök, gövde ve fide uzunlukları

Deney Serileri	Ölçüm Aralıkları (gün)	Kök Uzunluğu (mm)	Gövde Uzunluğu (mm)	Fide Uzunluğu (mm)
Kontrol	3	26.7	70.0	96.7
	6	77.5	155.0	232.5
	9	77.5	175.0	252.5
	12	87.5	215.0	302.5
100 µM SNP	3	41.3	72.7	114.0
	6	72.5	130.0	202.5
	9	80.0	175.0	255.0
	12	88.0	216.0	304.0
600 µM SNP	3	35.0	56.7	91.7
	6	36.5	115.0	151.5
	9	40.0	142.5	182.5
	12	46.5	205.0	251.5
700 µM SNP	3	40.0	61.7	101.7
	6	48.0	106.0	154.0
	9	55.0	170.0	225.0
	12	60.0	240.0	282.5



Şekil 4.10. Kontrol ve farklı SNP konsantrasyonları uygulanmış mercimek fidelerinin kök, gövde ve fide uzunluklarının karşılaştırılması

Çizelge 4.8. ve Şekil 4.10.'dan da görüldüğü gibi 6, 9 ve 12. günde kontrol ile 100 µM SNP de yetiştirilen bitkilerin büyüme oranlarının birbirine yakın olduğu görülmüştür. 600 ve 700 µM SNP konsantrasyonun da ise değerler birbirine yakın olmasına rağmen 600 µM SNP in kök ve gövde uzamasına inhibe edici etkisi ortaya çıkmıştır. Diğer bir deyimle 12. günde kök ve gövde uzamasında 100 µM SNP de % 5 lik bir teşvik edici etki görülürken 600 µM SNP de ise % 47 oranında inhibe edici etkiden söz edilebilir. 12 gün sonunda mercimekte tüm fide büyümesi üzerine SNP in etkisi incelendiğinde, 100 µM SNP in kontrol ile aynı olduğu, 600 ve 700 µM SNP de sırası ile % 17 ve % 7 oranında azalma görülmüştür.

Zanardo ve ark. (2005), *Brassica napus* L. nin çimlenmesi üzerine NO in etkilerini inceledikleri çalışmada, NO vericisi SNP in çimlenme ve kök büyümesini 0.1 µM SNP konsantrasyonlarında teşvik ettiğini, 0.5 µM SNP konsantrasyonlarında ise inhibe ettiğini bulmuşlardır. Bu tez çalışmasının fide büyümesi aşamasında elde edilen sonuçlarımız hem Zanardo ve ark. (2005) nın hem de Correa-Aragunde ve ark. (2004) nın çalışmasının destekler nitelik taşımaktadır. Correa-Aragunde ve ark. (2004), NO vericisi SNP in *Lycopersicon esculentum* Mill. fidelerine uygulanması durumunda primer kök büyümesinin indirgendiğini, lateral kök oluşumunun ve

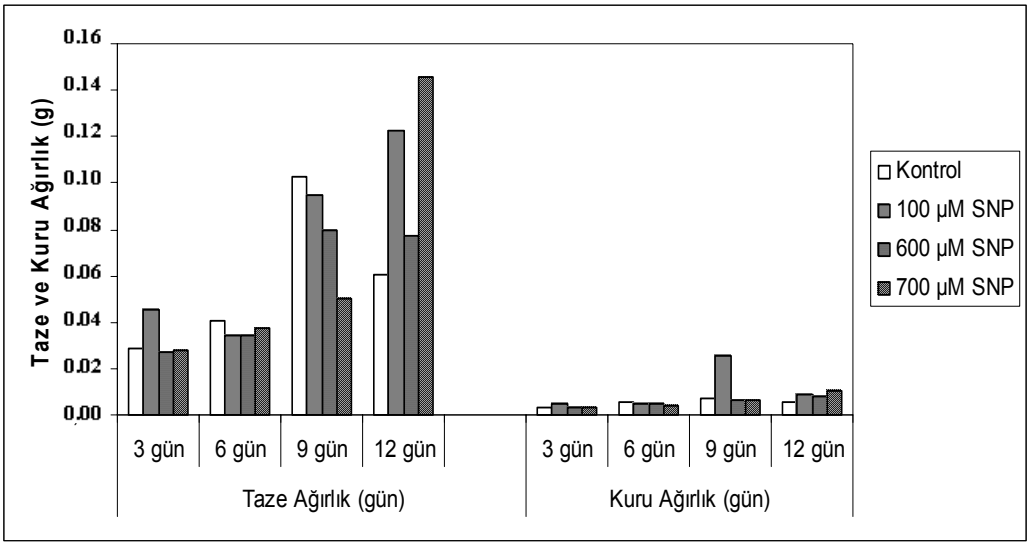
uzamasının konsantrasyona bağlı olarak teşvik edildiğini göstermişlerdir. Ayrıca hıyar bitkisinde NO in kök uzaması üzerinde teşvik edici etkisi olduğunu tespit eden Pagnussat ve ark. (2002) nın sonuçları ile de paraleldir. Bu çalışmada da NO in büyüme üzerine olan etkisinde oksin ile birlikte görev aldığı ya da bu süreçte rol oynayan diğer moleküler olaylarda gerekli olduğu ileri sürülebilir. NO yaprak genişlemesi, tohum çimlenmesi ve deetiyolasyonu teşvik ederken, hipotokil ve internod uzamasını inhibe etmektedir (Beligni ve Lamattina, 2000). Karanlıkta ya da düşük ışık şiddetinde büyüyen farklı bitki türlerinde (*Arabidopsis thaliana, Lactuca sativa, Solanum tuberosum*) nanomolar düzeydeki NO hipokotil ve internod uzamasını belirgin bir şekilde azaltmıştır (Beligni ve Lamattina, 2000). Bu çalışmada da 100 µM SNP ve üzeri konsantrasyonların gövde büyümesini inhibe ettiği bulgusu Beligni ve Lamattina (2000) nın sonuçları ile örtüşmektedir. NO in yüksek konsantrasyonlarının (40-80 ppm) domates, marul ve bezelye bitkisinde büyümeyi inhibe ettiği, düşük konsantrasyonlarının (0-20 ppm) ise büyümeyi teşvik ettiği ileri sürülmüştür (Hufton ve ark., 1996; Leshem ve Haramaty, 1996).

4.9. Nitrik Oksitin Taze ve Kuru Ağırlığa Etkisi

İklim odasında yetiştirilen mercimek fidelerinin kök ve gövdeye ait taze-kuru ağırlıkları 12 gün boyunca 3 gün ara ile ölçülerek, elde edilen değerler Çizelge 4.9., Çizelge 4.10. ve Şekil 4.11., Şekil 4.12.'de özetlenmiştir.

Çizelge 4.9. Kontrol ve farklı SNP konsantrasyonları uygulanmış mercimek fidelerinin köke ait taze ve kuru ağırlık değerleri

Deney Serileri	Ölçüm Aralıkları (gün)	Taze Ağırlık (g)	Kuru Ağırlık (g)
Kontrol	3	0.03	0.00
	6	0.04	0.01
	9	0.10	0.01
	12	0.06	0.01
100 µM SNP	3	0.05	0.00
	6	0.03	0.01
	9	0.09	0.03
	12	0.12	0.01
600 µM SNP	3	0.03	0.00
	6	0.03	0.00
	9	0.08	0.01
	12	0.08	0.01
700 µM SNP	3	0.03	0.00
	6	0.04	0.00
	9	0.05	0.01
	12	0.15	0.01



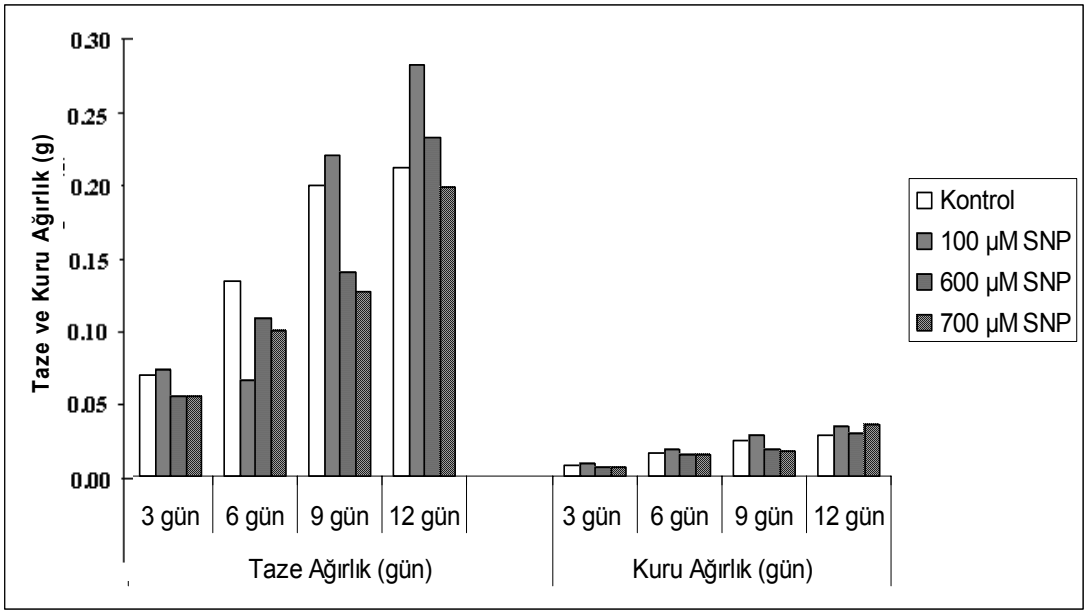
Şekil 4.11. Kontrol ve farklı SNP konsantrasyonları uygulanmış mercimek fidelerinin köke ait taze ve kuru ağırlık değerlerinin karşılaştırılması

Çizelge 4.9. ve Şekil 4.11.'den de görüldüğü gibi 3. günde 100 µM SNP de kök taze ağırlığında % 66 oranında artış saptanırken, 600 µM ve 700 µM SNP kontrol ile aynı düzeyde seyretmektedir. 6. ve 9. günde tüm konsantrasyonlarda kontrolün

altında değerler elde edilirken, özellikle 9. günde kök taze ağırlığında artan konsantrasyona paralel indirgenme tespit edilmiştir. 12. günde tüm konsantrasyonlarda kontrolün üzerinde ağırlık artışı bulunmuştur, en etkili konsantrasyonun 700 µM SNP olduğu sonucuna varılmıştır. Kök kuru ağırlık değerleri ise tüm deney gruplarında birbirine yakın düzeyde seyretmektedir.

Çizelge 4.10. Kontrol ve farklı SNP konsantrasyonları uygulanmış mercimek fidelerinin gövdeye ait taze ve kuru ağırlık değerleri

Deney Serileri	Ölçüm Aralıkları (gün)	Taze Ağırlık (g)	Kuru Ağırlık (g)
Kontrol	3	0.07	0,01
	6	0.14	0,02
	9	0.20	0,02
	12	0.21	0,03
100 µM SNP	3	0.07	0.01
	6	0.07	0.02
	9	0.22	0.03
	12	0.29	0.03
600 µM SNP	3	0.05	0.01
	6	0.11	0.01
	9	0.14	0.02
	12	0.23	0.03
700 µM SNP	3	0.05	0.01
	6	0.10	0.01
	9	0.13	0.02
	12	0.20	0.04



Şekil 4.12. Kontrol ve farklı SNP konsantrasyonları uygulanmış mercimek fidelerinin gövdeye ait taze ve kuru ağırlık değerlerinin karşılaştırılması

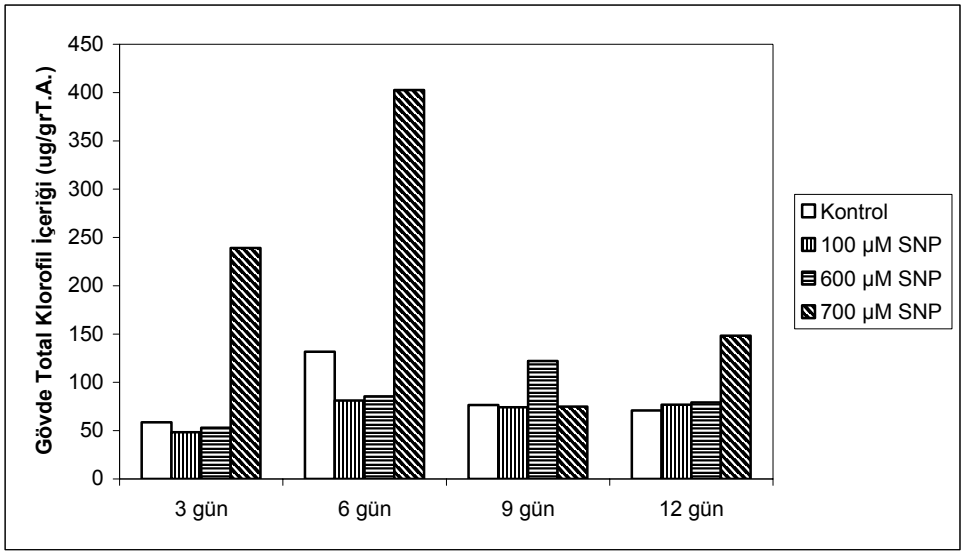
Çizelge 4.10. ve Şekil 4.12. incelendiğinde 3, 9, ve 12. günde 100 µM SNP ile yine 12. günde 600 µm SNP hariç gövde taze ağırlığında kontrolün altında değerler elde edilmiştir. Gövde kuru ağırlığında ise az çok kontrole yakın sonuçlar saptanmıştır. Gövde kuru ağırlığında 12. günde tüm konsantrasyonlarda çok hafif bir teşvik edici etkiden söz edilebilir. Literatür incelemelerinde bu konu ile ilgili bir veriye rastlanmamıştır.

4.10. Nitrik Oksitin Klorofil ve Karotinoid İçeriğine Etkisi

İklim odasında yetiştirilen mercimek fideleri 12 gün boyunca üç gün ara ile hasat edilerek yaprakları çıkartılıp geri kalan gövde kısımlarının klorofil ve karotinoid içeriklerine ait elde edilen değerler Çizelge 4.11.ve 4.12. ile Şekil 4.13. ve 4.14.'de özetlenmiştir.

Çizelge 4.11. Kontrol ve farklı SNP konsantrasyonları uygulanmış mercimek fidelerinin gövdeye ait total klorofil miktarları

Deney Serileri	Ölçüm Aralıkları (gün)	Total Klorofil (µg/grT.A.)
Kontrol	3	58.65
	6	131.78
	9	76.45
	12	70.95
100 µM SNP	3	48.20
	6	80.98
	9	74.09
	12	76.96
600 µM SNP	3	52.83
	6	85.47
	9	122.18
	12	79.28
700 µM SNP	3	239.07
	6	402.58
	9	74.77
	12	148.21



Şekil 4.13. Kontrol ve farklı SNP konsantrasyonları uygulanmış mercimek fidelerinin gövdeye ait total klorofil miktarlarının karşılaştırılması

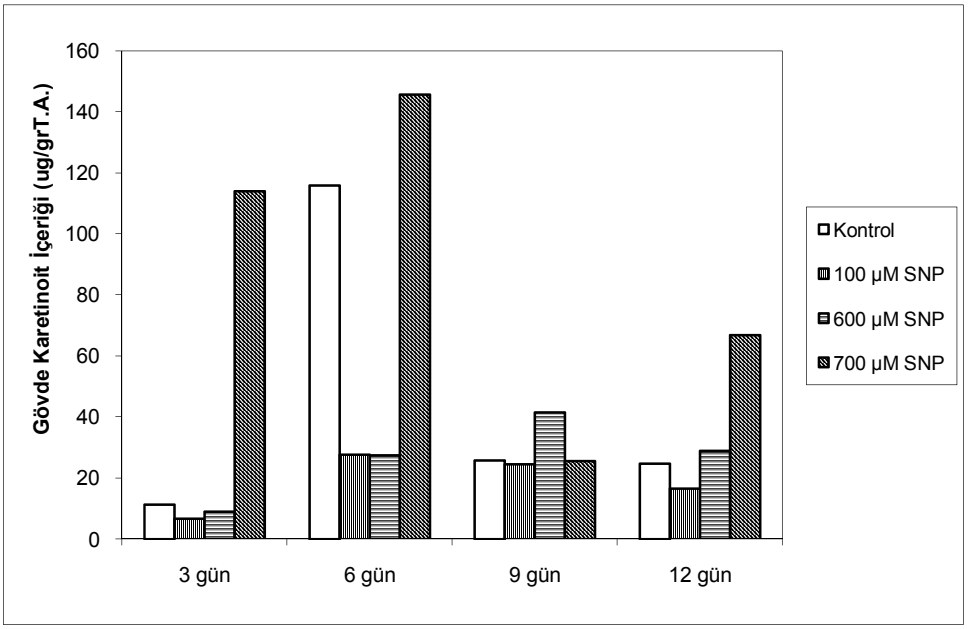
Çizelge 4.11. ve Şekil 4.13.'e bakıldığında gövde total klorofil içeriği 600 ve 700 µM SNP hariç diğer deney serilerinde hemen hemen kontrole yakın ya da altında

seyretmektedir. Klorofil içeriğini 3, 6 ve 12. günlerde kontrole göre 700 µM SNP teşvik ederken, 9. günde 600 µM SNP de % 60 lık artış görülmektedir.

Takahashi ve Yamasaki (2002) NR tarafından üretilen NO in fotosentezi inhibe ettiğini göstermişlerdir. Bu çalışmada da 100 µM SNP de klorofil miktarında inhibisyon saptanması ve bunun fotosentezi negatif yönde etkilediği düşünülürse Takahashi ve Yamasaki (2002) nin çalışması ile paraleldir. Ancak 700 µM SNP de klorofil miktarındaki belirgin artış Beligni ve Lamattina (2000) nın bulgusunu desteklemektedir. Bu araştırıcılar patates, marul ve *Arabidopsis* gibi bazı bitkilere NO vericilerinin uygulanması durumunda klorofil içeriğinin artdığını bulmuşlardır (Beligni ve Lamattina, 2000). Bu tez çalışması ile uyumlu diğer araştırmalarda ise NO in bezelye yapraklarında özellikle bekçi hücrelerinde klorofil içeriğini arttırdığı (Leshem ve ark., 1997) ve NO ile işlem görmüş yabani tip mısır bitkisinde klorozis olayını inhibe ettiği gösterilmiştir (Graziano ve ark., 2002). Mercimekde çimlenme ve erken fide büyümesi aşamasında incelenen diğer parametrelerde olduğu gibi klorofil miktarı üzerine NO in etkisinde de konsantrasyon son derece önemlidir.

Çizelge 4.12. Kontrol, 100, 600 ve 700 µM SNP uygulanmış mercimek fidelerinin gövdeye ait karotinoid miktarları

Deney Serileri	Ölçüm Aralıkları (gün)	Karotinoid (µg/grT.A.)
Kontrol	3	11.30
	6	115.84
	9	25.67
	12	24.73
100 µM SNP	3	6.59
	6	27.53
	9	24.41
	12	16.49
600 µM SNP	3	8.85
	6	27.43
	9	41.37
	12	28.72
700 µM SNP	3	113.82
	6	145.62
	9	25.39
	12	66.80



Şekil 4.14. Kontrol ve farklı SNP konsantrasyonları uygulanmış mercimek fidelerinin gövdeye ait karotinoid miktarlarının karşılaştırılması

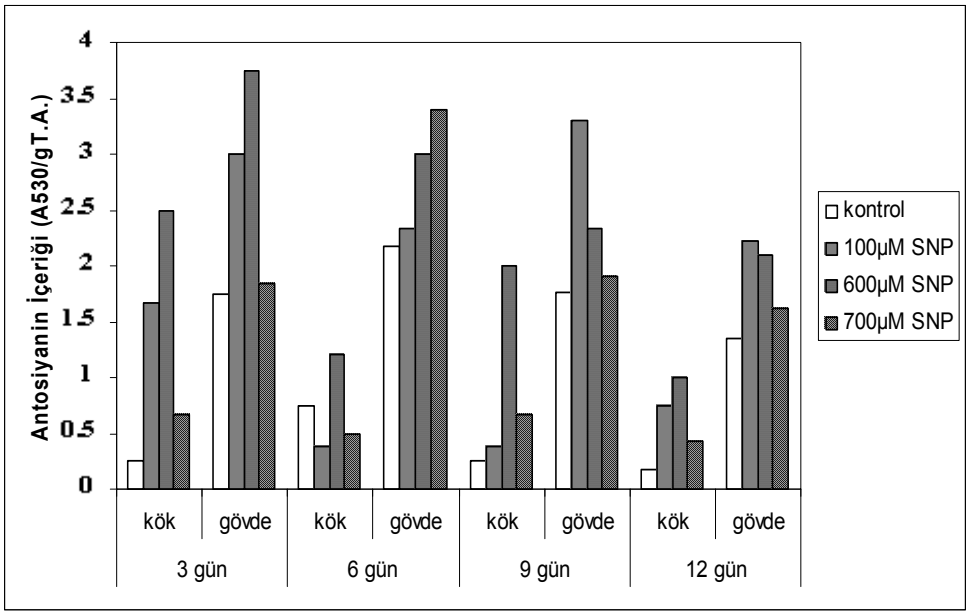
Çizelge 4.12. ve Şekil 4.14. incelendiğinde gövde karotinoid içeriği üzerine özellikle 3. ve 6. günlerde en etkili konsantrasyonun 700 µM SNP olduğu belirgindir. 100 ve 600 µM SNP de gövde karotinoid içeriği kontrolün altında bulunmuştur. Burada NO karotinoid biyosentezini gelişme evresine ve konsantrasyona bağlı olarak dikkat çekici bir şekilde teşvik etmiş ya da inhibe etmiştir.

4.11. Nitrik Oksitin Antosiyanin İçeriğine Etkisi

Mercimek fidelerinin kök ve gövde kısımlarına ait antosiyanin içeriği 530 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve gram taze ağırlıkta Optik Yoğunluk olarak Çizelge 4.13. ve Şekil 4.15.'de verilmiştir.

Çizelge 4.13. Kontrol ve farklı SNP konsantrasyonları uygulanmış mercimek fidelerinin kök ve gövdeye ait antosiyanin miktarları

Deney Serileri	Ölçüm Aralıkları (gün)	Kök (A_{530}/g T.A.)	Gövde (A_{530}/g T.A)
Kontrol	3	0.25	1.75
	6	0.75	2.17
	9	0.25	1.77
	12	0.17	1.35
100 µM SNP	3	1.67	3
	6	0.38	2.33
	9	0.38	3.29
	12	0.75	2.22
600 µM SNP	3	2.5	3.75
	6	1.2	3
	9	2	2.33
	12	1	2.09
700 µM SNP	3	0.67	1.83
	6	0.5	3.4
	9	0.67	1.91
	12	0.43	1.63



Şekil 4.15. Kontrol ve farklı SNP konsantrasyonları uygulanmış mercimek fidelerinin kök ve gövdeye ait antosiyanin miktarlarının karşılaştırılması

Çizelge 4.13. ve Şekil 4.15.'de görüldüğü gibi uygulanan SNP konsantrasyonlarında antosiyanin içeriği hem kök hem de gövdede genellikle

kontrolün üzerindedir. Kontrole göre kök antosiyanin içeriğinin 100 μM SNP de 3. ve 12. günde, 600 μM SNP de ise 6. ve 9. günde dikkate değer artış elde edilmiştir. Gövde antosiyanin içeriği 12 gün boyunca kontrolün üzerinde saptanmıştır. Gövdede en fazla antosiyanin içeriği 3. günde 600 μM SNP de, 6. günde 700 μM SNP de ve 9. günde 100 μM SNP de tespit edilmiştir. Sonuç olarak NO vericisi SNP in antosiyanin içeriği üzerine konsantrasyona bağlı olarak teşvik edici etkisinden söz edilebilir. SNP in farklı konsantrasyonlarında yetiştirilen mercimek fidelerinin kök ve gövdeye ait antosiyanin sonuçlarını karşılaştıracak herhangi bir literatür bilgisine rastlanmamıştır. Bu nedenle yapılan bu analizlerin sonuçları bu alandaki boşluğu bir dereceye kadar kapatabilecektir. Ayrıca diğer araştırıcıların çalışmalarına da katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Tüm bu verilerin ışığında mercimekte tohum çimlenmesi ve erken fide büyümesi aşamasında NO vericisi olarak kullanılan SNP konsantrasyonlarının ne derece önemli olduğunu vurgulamak doğru olacaktır. Konsantrasyona bağlı olarak NO in çimlenme, primer kök uzaması, çeşitli çimlenme enzimleri, çözülebilir total protein miktarı, klorofil, karotinoid ve antosiyanin pigment içeriği üzerinde düzenleyici etkiye sahip olduğu ileri sürülebilir. Bu tez çalışmasında elde edilen bazı bulguların ilk kez yapılması açısından da ayrıca bir öneme sahip olduğu düşünülmektedir. Bu konu ile ilgili olarak az sayıda literatür bilgisine ulaşılmıştır. Bu nedenle çimlenme ve erken büyüme aşamasında yapılacak başka çalışmalara katkı sağlayacağı kanısındayız. Bu tez çalışmasının, çimlenme ve erken fide büyümesi aşamasında NO in sinyal mekanızmasının aydınlatılması için daha detaylı moleküler düzeydeki araştırmalarla desteklenmesinin gerekli olduğu düşünülmektedir. Sonuç olarak NO bir büyüme düzenleyicisi olarak mercimek bitkisinin çimlenme ve erken büyüme aşamasında kesin olarak bir rol oynadığı ileri sürülebilir.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Son yıllarda ikincil haberci molekül olarak dikkatleri üzerine çeken NO in bitkilerde nerede ve nasıl üretildiği, taşınıp taşınmadığı, hücre, doku ve organlarda hangi konsantrasyonlarda nasıl etki gösterdiği ile ilgili çok sayıda araştırmalar yapılmaktadır. Ayrıca bitki yaşam döngüsünde doğrudan ya da dolaylı olarak hangi süreçlerde yer aldığı ve bu süreçleri nasıl etkilediği, bilinen diğer bitki büyüme düzenleyicileri ile etkileşimleri araştırıcılar tarafından incelenmektedir. Bu tez çalışmasında Dünyada ve Ülkemizde ekonomik değere sahip olan mercimek (*Lens culinaris* Medik.) bitkisi deney materyali olarak seçilmiştir. SNP in mercimek bitkisinin çimlenme ve erken fide büyümesi evresinde muhtemel rollerini incelemek amaç edinilmiştir. Bu iki evrede önemli etkilere sahip olabileceği düşünülerek başlatılan çalışmada eksojen olarak uygulanan SNP in farklı konsantrasyonlarının tohum çimlenmesi, primer kök uzunluğu, çözünebilir total protein içeriği, amilaz, asit fosfataz, asit ve nötral proteaz aktivitesi, genç fidelerin kök-gövde uzunluğu, taze ve kuru ağırlık değişimleri, pigment içerikleri (klorofil, karotinoid, antosiyanin) üzerinde meydana getirdiği değişiklikler ilgili metodlar kullanılarak saptanmıştır. Eksojen olarak uygulanan SNP konsantrasyonlarının mercimek bitkisinin çimlenmesi ve erken fide büyümesi sürecine etkileri yapılan deneylerin verileri doğrultusunda değişimin en belirgin olduğu an seçilerek kontrol grubu bitkiler ile karşılaştırılması Çizelge 5.1.'de özetlenmiştir.

Çizelge 5.1. Mercimek tohumlarının çimlenmesi ve erken fide gelişimi üzerine 0.01 µM, 100 µM, 600 µM ve 700 µM SNP konsantrasyonlarının kontrol grubu ile karşılaştırılması

Deney Serileri	Kontrol	0.01 µM	100 µM	600 µM	700 µM
* NO in Tohum Çimlenmesine Etkisi	Orta	Fazla	En Fazla	Az	Daha Az
*** NO in Primer Kök Uzunluğuna Etkisi	Orta	Fazla	En Fazla	Az	Daha Az
*** NO in Total Protein Miktarına Etkisi	Daha Az	Az	Orta	Fazla	En Fazla
** NO in Amilaz Aktivitesine Etkisi	En Fazla	Az	Orta	Fazla	En Az
*** NO in Asit Fosfataz Aktivitesine Etkisi	En Fazla	Fazla	Fazla	Az	Orta
*** NO in Asit Proteaz Aktivitesine Etkisi	Orta	Az	En Fazla	Fazla	En Az
*** NO in Nötralal Proteaz Aktivitesine Etkisi	Az	Fazla	Fazla	En Fazla	Orta
**** NO in Fide Büyümesine Etkisi	Orta	Yok	Fazla	Az	En Fazla
**** NO in Kökteki Taze ve Kuru Ağırlığa Etkisi	Az	Yok	Fazla	Orta	En fazla
**** NO in Gövdedeki Taze ve Kuru Ağırlığa Etkisi	Orta	Yok	En Fazla	Fazla	Az
**** NO in Gövdedeki Klorofil İçeriğine Etkisi	Az	Yok	Orta	Fazla	En Fazla
**** NO in Gövdedeki Karotinoid İçeriğine Etkisi	Orta	Yok	Az	Fazla	En Fazla
**** NO in Kökteki Antosiyanin İçeriğine Etkisi	Az	Yok	En Fazla	Fazla	Orta
**** NO in Gövdedeki Antosiyanin İçeriğine Etkisi	Az	Yok	En Fazla	Fazla	Orta

*** 24. saatteki**
**** 48. saatteki**
***** 72. saatteki**
****** 12. gündeki**

- Mercimek tohumlarında en fazla çimlenmenin % 77 ile 100 µM SNP konsantrasyonunda olduğu tespit edilmiştir. Burada düşük konsantrasyonda uygulanan SNP in tohum çimlenmesini teşvik ettiği ileri sürülebilir.
- Tüm deney grupları kontrol ile kıyaslandığında primer kök uzunluğunun 0.01 µM ve 100 µM SNP konsantrasyonunlarının teşvik edici etkisi

görülmektedir. 600 µM ve 700 µM SNP konsantrasyonlarında ise primer kök uzunluğunda bir inhibisyonun olduğu belirgindir. Burada primer kök uzunluğu üzerine en etkili konsantrasyonun 100 µM SNP olduğu söylenebilir.

- Sonuç olarak hem çimlenme hem de primer kök uzunluğunda meydana gelen değişikliklerde NO in doğrudan ya da dolaylı olarak bazı mekanizmaları etkileyerek rol oynadığı düşünülebilir. Muhtemelen NO in iki süreçte de önemli bir rol oynayan oksin ve giberellin gibi çimlenme ve büyümeyi teşvik edici bu iki hormon ile birlikte bir büyüme düzenleyicisi olarak görev aldığı düşünülebilir.
- Tüm deney gruplarında total protein miktarı daima kontrolün üzerinde bulunmuştur. NO molekülü artan SNP konsantrasyonuna bağlı olarak yeni proteinlerin sentezini teşvik etmiş ya da tohumda var olan depo proteinlerin yıkımını engellemiş olabilir. Yüksek SNP konsantrasyonlarında muhtemelen NO in sitotoksik ürünlere dönüşümü sonucu ortaya çıkan strese karşı antioksidan sistemle ilgili enzim ya da maddelerin sentezi ile ilgili olaylardan dolayı protein miktarı da yüksek çıkmış olabilir.
- NO in amilaz aktivitesine etkisini muhtemelen imbibisyonu ardışık çimlenmenin çok erken evrelerinde gösterdiği ileri sürülebilir. Erken evrelerdeki bu aktivite artışı göz önüne alındığında, özellikle 100 µM SNP in amilaz enziminin sentezinden ziyade salınmasını teşvik ettiği düşünülebilir.
- Kontrol ve tüm deney gruplarının asit fosfataz aktiviteleri hemen hemen birbirinin aynıdır. NO in bu enzimin aktivitesi ile doğrudan ilgili olmadığı düşünülebilir ya da amilaz aktivitesinde olduğu gibi çok erken evrelerde bir aktivite artışına neden olduğu kuvvetle muhtemeldir.
- 0-48. saatler arasında tüm SNP konsantrasyonlarının asit proteaz aktivitesini kesinlikle teşvik ettiği söylenebilir. Çimlenme boyunca NO ile teşvik edilmiş uzun süreli asit proteaz aktivitesi bu enzimin hem de novo sentezini hem de salınmasını etkilediği ifade edilebilir. Ancak tohum depo proteinlerinin yıkımından sorumlu bu enzimin aktivitesindeki artış ile elde edilen protein sonuçlarıyla bir uyumsuzluk söz konusudur.
- Nötral proteaz aktivitesinin özellikle imbibisyonu ardışık 0. saatte maksimum aktivite göstermesi daha sonra azalması, burada NO in bu enzimin sadece

salınmasını teşvik ettiğini düşündürür. Başka bir olasılıkta bu enzim aktivitesindeki azalış, NO in belkide proteaz inhibitörlerinin sentezini teşvik etmesi ile ilişkili olabilir.

- NO in büyüme üzerine çimlenmede olduğu kadar etkili olmadığı, hatta kök ve gövde büyümesinde zaman zaman kontrolun altında değerler elde edilmesi büyüme sürecinde NO in teşvik edici etkiye sahip olmadığını düşündürebilir. Ancak konsantrasyona bağlı olarak NO kök büyümesini gövde büyümesine göre teşvik etmiştir.
- Kök ve gövdede NO in düşük konsantrasyonda taze ağırlık artışına, yüksek konsantrasyonda ise kaybına neden olduğu söylenebilir.
- Kök ve gövde kuru ağırlığının uygulanan tüm SNP konsantrasyonlarında hemen hemen aynı olması, fidede organik madde miktarının da az olduğunu işaret etmektedir.
- Gövde klorofil ve karotinoid içeriği daha çok yüksek konsantrasyonda teşvik edilmiştir. Burada yüksek SNP konsantrasyonunda ortaya çıkan toksik ürünlerden dolayı strese karşı antioksidan özelliğe sahip karotinoid içeriğinin koruyucu olarak görev yapmak üzere sentezinin artmış olabileceği ileri sürülebilir.
- Hem kök hem de gövdede antosiyanin miktarının artması, NO in antosiyanin biyosentezinde rol oynayan anahtar enzimlerle ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

Bu tez çalışmasında, haberci molekül özelliğine sahip olan NO in mercimek tohumlarının çimlenme ve fide büyümesi aşamasında elde edilen verilere göre bir kriter olduğu bulgusu literatürde bu konu ile ilgili eksikliğin bir dereceye kadar kapatılmasında, bazı açık kalmış noktaların aydınlatılmasında ve bitki fizyolojisi ile çalışan araştırıcılara katkı sağlayacağı ümit edilmektedir.

Bitki-NO çalışmalarında yapılan çok sayıda araştırmaya rağmen NO in tohum çimlenmesi, bitki büyüme ve gelişmesi üzerindeki esas rollerini belirlenebilmesi için farklı yöntemler kullanılarak yapılacak çalışmalara gereksinim duyulmaktadır.

Sonuç olarak hem çimlenme hem de erken fide büyümesi aşamalarında NO in konsantrasyona bağlı olarak teşvik ya da inhibe edici etkisinin ortaya çıktığı ya da

düzenleyici bir rol üstlendiği, NO eksikliğinde büyümenin gerilemesi, artan NO konsantrasyonlarında ise bitki büyümesinin teşviki şeklinde olabileceği ifade edilebilir. Ayrıca mercimek bitkisinin bu iki evrede NO e oldukça duyarlı olduğu da söylenebilir. NO etkisini başka moleküllerle etkileşime girerek de gösterebilir. NO vericisi olan SNP uygulanarak yapılan bu çalışmayla konsantrasyonun çok önemli olduğu ve çeşitli fizyolojik olaylarda NO konsantrasyonun büyük önem taşıdığı bir kez daha kanıtlanmıştır**.** Bu çalışma ele alınan parametreler üzerine NO in etkisinin saptanması açısından ilk kez yapıldığı için ayrıca bir öneme sahiptir.

KAYNAKLAR

AN, L., LIU, Y., ZHANG, M., CHEN, T. and WANG, X., 2005. Effects of Nitric Oxide on Growth of Maize Seedling Leaves in the Presence or Absence of Ultraviolet-B Radition, Journal of Plant Physiology, 162:317-326.

ANDERSON, L. and MANSFIELD, T.A., 1979. The Effects of Nitric Oxide Pollution on The Growth of Tomato. Environmental Pollution, 20:113-121.

ARASIMOWICZA, M. and FLORYSZAK-WIECZOREK, J. 2007. Nitric Oxide as a Bioactive Signalling Molecule in Plant Stress Responses, Plant Science, 172(5):876-887.

AYTAMKA, E., 2005. Soya Fasulyesi (*Glycine max* L.) bitkisinde Tuz Stresi ile Nitrik Oksit Arasındaki İlişki, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı Botanik Programı, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, 65s.

BARROSO, J.B., CORPAS, F.J., CARRERAS, A., SANDALIO, L.M., VALDERRAMA, R., PALMA, J.M., LUPIANEZ, J.A. and DEL RIO, L.A., 1999. Localization of Nitric Oxide Synthase in Plant Peroxisomes, Journal of Biological Chemistry, 274:36729-36733.

BELIGNI, M.V., GARCIA-MATA, C., GRAZIANO, M. and LAMATTINA, L., 2000. Nitric Oxide Functions as both Antioxidant and Antistress Agent ın Plants, American Society of Plant Biologists Meetings, July 15-19, San Diego, California, USA, Poster, 0649.

BELIGNI, M.V. and LAMATTINA, L., 1999a. Nitric Oxide Counteracts Cytotoxic Processes Mediated by Reactive Oxygen Species in Plant Tissues, Planta, 208:337-344.

BELIGNI, M.V. and LAMATTINA, L., 1999b. Is Nitric Oxide Toxic or Protective?, Trends Plant Sci., 4:299-300.

BELIGNI, M.V. and LAMATTINA, L., 2000. Nitric Oxide Stimulates Seed Germination and De-etiolation and Inhibits Hypocotyl Elongation, Three Light-Inducible Responses in Plants, Planta, 210:215-221.

BELIGNI, M.V. and LAMATTINA, L., 2001a. Nitric Oxide in Plants: The History is just Beginning, Plant, Cell and Environment, 24:267-278.

BELIGNI, M.V., LAXALT, A. and LAMATTINA, L., 1997. Putative Role of Nitric Oxide in Plant-Pathogen Interactions, In: Moncada S. Toda N, Higgs EA (eds) The Biology of Nitric Oxide, part 6 (Proc Fifth Int Meeting on the Biology of Nitric Oxide, Kyoto, Japan). Portland Press, 250p.

BETHKE, P.C., LIBOUREL, I.G.L., AOYAMA, N., CHUNG, Y.Y., STILL, D.W. and JONES, R. L. 2007. The *Arabidopsis* Aleurone Layer Responds to Nitric Oxide, Gibberellin, and Abscisic Acid and Is Sufficient and Necessary for Seed Dormancy. Plant Physiology 143:1173-1188.

BETHKE, P.C., LIBOUREL, I.G.L. and JONES, R.L., 2006. Nitric oxide reduces seed dormancy in *Arabidopsis*. J Exp Bot 57:517–526.

BEWLEY, J.D. and BLACK, M., 1994. Seeds Physiology of Development and Germination Second Edition, Plenum Press, New York and London, 306-447.
BIDWELL, R.G.S., 1974. Plant Physiology. Macmillan Publishing Co, New York.
BOGDAN, C., 2001. Nitric Oxide and the Regulation of Gene Expression, Trends in Cell Biology, 11:66-75.
BOLLMANN, A., KOSCHORRECK, M., MEUSER, K. and CONRAD, R., 1999. Comparison of two different methods to measure nitric oxide turnover in soils, Biol. Fertil. Soils, 29:104-110.
BOUCHER, J.L., GENET. A., VADON, S., DELAFORGE, M. and MANSUY, D., 1992a. Formation of nitrogen oxides and citrulline upon oxidation of N^{w}-hdroxy-L-arginine by hemeproteins, Biochem. Biophys. Res.Commun., 184: 1158-1164.
BRADFORD, M., 1976. Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein Dye-binding, Anal. Biochem., 37:403-412.
CAO, X., COSTA, L.M., BIDERRE-PETIT, C., KBHAYA, B., DEY, N., PEREZ, P., MCCARTY, D.R., GUTIERREZ-MARCOS, J.F. and BECRAFT, P.W., 2007. Abscisic Acid and Stress Signals Induce Viviparous1 Expression in Seed and Vegetative Tissues of Maize. Plant Physiology 143:720-731.
CARO, A. and PUNTARULO, S., 1998. Nitric Oxide Decreases Superoxide Anion Generation by Microsomes from Soybean Embryonic Axes, Physiologia Plantarum, 104:357-364.
CHENG, F.Y., HSU, S.Y. ve KAO C.H., 2002. Nitric Oxide Counteracts the Senescence of Detached Rice Leaves Induced by Dehydration and Polyethylene Glycol but not by Sorbitol, Plant Growth Regul., 38:265–272.
CLARKE, A., DESIKAN, R., HURST, R.D., HANCOCK, J.T. and NEILL, S.J., 2000. NO Way Back: Nitric Oxide and Programmed Cell Death in *Arabidopsis thaliana* Suspension Cultures, Plant Journal, 24:667-677.
COONEY, R.V., HARWOOD, P.J., CUSTER, L.J. and FRANKE, A.A., 1994. Light-Mediated Conversion of Nitrogen Dioxide to Nitric Oxide by Carotenoids, Enviromental Health Perspective, 102:460-462.
CORPAS, F.J., BARROSO, J.B., ESTEBAN, F.J., ROMERO-PUERTAS, M.C., VALDERRAMA, R., CARRERAS, A., QUIRÓS, M., LEÓN, A.M., PALMA, J.M., SANDALIO, L.M. and DEL RIO, L.A., 2002. Peroxisomes as a Source of Nitric Oxide in Plant Cells, Free Radical Biol. Med., 33(S1):187.
CORREA-ARAGUNDE N, GRAZIANO M, CHEVALIER C. and LAMATTINA L. 2006. Related Articles, Nitric Oxide Modulates the Expression of Cell Cycle Regulatory Genes During Lateral Root Formation in Tomato. J Exp Bot., 57(3):581-588.
CORREA-ARAGUNDE, N., GRAZIANO, M. and LAMATTINA, L., 2004. Nitric Oxide Plays a Central Role in Determining Lateral Root Development in Tomato, Planta, 218(6):900-905.
CRAWFORD, N. M., 2006. Mechanisms for Nitric Oxide Synthesis in Plants. J. Exp. Bot., 57:471-478.
CRAWFORD, N.M. and GUO, F.Q., 2005. New Insights into Nitric Oxide Metabolism and Regulatory Functions. Trends in Plant Science, 10:195–200.
CUETO, M., HERNANDEZ-PERERA, O., MARTIN, R., BENTURA, M.L., RODRIGO, J., LAMAS, S. and GOLVANO, M.P., 1996. Presence of Nitric

Oxide Synthase activity in Roots and Nodules of *Lupinus albus*, FEBS Letters, 398:159–164.

DEAN, J.V. and HARPER, J.E., 1986. Nitric Oxide and Nitrous Oxide Production by Soybean and Winged Bean During the in vivo Nitrate Reductase Assay, Plant Physiology, 82:718-723.

DELLEDONNE, M., 2005. NO News is Good News for Plants, Currunt Opinion in Plant Biology, 8:1-7.

DELLEDONNE, M., XIA, Y., DIXON, R.A. and LAMB, C., 1998. Nitric Oxide Functions as a Signal in Plant Disease Resistance, Nature, 394:585-588.

DELLEDONNE, M., ZEIER, J., MAROCCO, A. and LAMB, C., 2001. Signal Interactions Between Nitric Oxide and Reactive Oxygen Intermediates in the Plant Hypersensitive Disease Resistance Response, Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 98:13454-13459.

DEL RIO, L.A., CORPAS, F.J. and BARROSO, J.B., 2004. Nitric oxide and nitric oxide synthase activity in plants, Phytochemistry, 65 (7):783-792.

DESIKAN, R., GRIFFITHS, R., HANCOCK, J. and NEILL, S., 2002. A New Role for an Old Enzyme: Nitrate Reductase-Mediated Nitric Oxide Generation is Required for Abscisic Acid-Induced Stomatal Closure in *Arabidopsis thaliana*, Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 99: 16314-16318.

DRAPER, J., 1997. Salicylate, Superoxide Synthesis and Cell Suicide in Plant Defence, Trends in Plant Science, 2:163-165.

DUFF, S.N.G., SARATH, G. and LAXTON, W. C., 1994. The Role of Acid Phosphatases in Plant Phosphorus Metabolism. Physiol. Plantarum, 90:791-800.

DURNER, J. and KLESSIG, D.F., 1999. Nitric Oxide as a Signal in Plants, Current Opinion in Plant Biology, 2:369-374.

DURNER, J., WENDEHEMME, D. and KLESSIG, D.F., 1998. Defense Gene Induction in Tobacco by Nitric Oxide, Cyclic GMP and Cyclic ADP-Ribose, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 95, 10328-10333.

ERYILMAZ, F., 2003. Yüksek Bitkilerde Tuz Stresi ile Antosiyanin İçeriği Arasındaki İlişkiler, Yüksek Lisans Tezi, İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü.

FERRER, M.A. and ROS BARCELO, A., 1999. Differential effects of Nitric Oxide on Peroxidase and H_2O_2 Production By The Xylem Of *Zinnia Elegans*, Plant, Cell and Environment, 22: 891–897.

GARCÊS, H., DURZAN, D. and PEDROSO, M.C., 2001. Mechanical Stress Elicits Nitric Oxide formation and DNA Fragmentation in *Arabidopsis Thaliana*, Annals of Botany, 87:567-574.

GARCIA MATA, C., GAY, R., SOKOLOVSKI, S., HILLS, A., LAMATTINA, L. and BLATT, M.R., 2003. Nitric Oxide Regulates K^+ and Cl^- Channels in Guard Cells Through A Subset Of Abscisic Acid-Evoked Signaling Pathways, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 100: 11116–11121.

GARCIA-MATA, C. and LAMATTINA, L., 2001. Nitric Oxide Induces Stomatal Closure and Enhances the Adaptive Plant Responses Against Drought Stress, Plant Physiology, 126: 1196-1204.

GARCIA, N.A.T., OLİVERA, M., IRIBARNE, C. and LLUCH, C., 2004. Partial Prufication and Characterization of a Non-Specific Acid Phosphatase in

Leaves and Root Nodules of *Phaseolus vulgaris*. Plant Physiology and Biochemistry. (Article in Press).

GIBA, Z., GRUBIŠIĆ, D., TODOROVIĆ, S., SAJC, L., STOJAKOVIĆ, D. and KONJEVIĆ, R., 1998. Effect of Nitric Oxide-Releasing Compounds on Phytochrome-Controlled Germination of Empress Tree Seeds, Plant Growth Regulation, 26:175-181.

GOULD, K.S., LAMOTTE, O., KLINGUER, A., PUGIN, A. and WENDEHENNE, D., 2003. Nitric Oxide Production in Tobacco Leaf Cells: a Generalized Stress Response?, Plant, Cell and Environment, 26:1851-1862.

GOUVÊA, C.M.C.P., SOUZA, J.F., MAGALHAES, A.C.N. and MARTINS, I.S., 1997. NO-Releasing Substances that induce Growth Elongation in Maize Root Segments, Plantn Growth Regulation, 21:183-187.

GRAZIANO, M., BELIGNI, M.V. and LAMATTINA, L., 2002. Nitric Oxide Improves Iron Availability in Plants, Plant Physiology, 130:1852-1859.

GRAZIANO, M. and LAMATTINA, L., 2005. Nitric oxide and iron in plants: an emerging and converging story, Trends in Plant Science, 10(1): 4-8.

HARPER, J.E., 1981. Evolution of Nitrogen Oxide(s) during in vivo Nitrate Reductase Assay of Soybean Leaves, Plant Physiology, 68:1488-1493.

HENRY, Y.A., DUCASTEL, B. and GUISSANI, A. 1997. Basic Chemistry of Nitric Oxide and Related Nitrogen Oxides, Nitric Oxide Research From Chemistry To Biolgy, Landes Co. Biomed. Publ, Austin, USA, 15-46.

HOAGLAND, D.R. and ARNON, D.I., 1938 The Water Cultere Method For Browling Plants With Out Soil. Cal.agri. ext. Station Circular, 347:1-39

HONDA, A., ADAMS, S.R., SAWYER, C.L., LEV-RAM, V., TSIEN, R.Y. and DOSTMANN, W.R., 2001. Spatiotemporal Dynamics of Guanosine 3', 5'-cyclic Monophosphate Revealed by a Genetically Encoded, Fluorescent Indicator, Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 98: 2437-2442.

HOREMANS, N., FOYER, C.H. and ASARD, H., 2000, Transport and action of ascorbate at the plasma membrane, Trends Plant Sci., 5:263-267.

HUANG, J., SOMMERS, E.M., KIM-SHAPIRO, D.B. and KING, S.B., 2002b. Horseradish peroxidase catalyzed nitric oxide formation from hydroxyurea, J. Am. Chem. Soc., 124:3473-3480.

HUFTON, C.A., BESFORD, R.T. and WELLBURN, A.R., 1996. Effects of NO ($+NO_2$) Pollution on Growth, Nitrat Reductase Activities and Associated Protein Contents in Glasshouse Lettuce Grown Hydroponically in Winter CO_2 Enrichment, New Phytologist, 133:495-501.

HUNG, K.T. and KAO, C.H., 2003. Nitric Oxide Counteracts the Senescence of Rice Leaves Induced By Abscisic Acid, J. Plant Physiol., 160 (8):871–879.

JACKSON, M.B., 2002. Long Distance Signalling from Roots to Shoots Assessed: the Flooding Story, Journal of Experimental Botany, 53:175-181.

JENNINGS, P.H. and DUFFUS, C.M., 1977. Effects of giberellic acid on polyphenol oxydase activity in de-enbryonated wheat and barley grain. New Phytol., 383-389.

JOVANOVIC, S.V., STEENKEN, S., SIMIC, M.G. and HARA, Y., 1997. Antioxidant Properties of Flavonoids: Reduction Potentials and Electron Transfer Reactions of Flavonoid Radicals, In: Rice-Evans, C.A. and Packer, . (eds.), Flavonoids in Health and Disease, Marcel Dekker, New York.

KAKIMOTO, T., 1996. CKI1, a Histidine Kinase Homolog Implicated in Cytokinin Signal Transduction Science, 274:982-985.

KAUR-SAWHNEY, R., SHIH, L.M., CEGIELSKA, T. and GALSTON, A.W., 1982. Inhibition of Protease activity By Polyamines. Relevance for control of leaf senescence. FEBS letters. 145:345-349.

KLEPPER, L.A., 1979. Nitric Oxide (NO) and Nitrogen Dioxide (NO_2) Emissions from Herbicide-Treated Soybean Plants. Atmosphere and Enviroment, 537.

KLESSIG, D.F., DURNER, J., NOAD, R., NAVARRE, D.A., WENDEHENNE, D., KUMAR, D., ZHOU, J., SHAH, J., ZHANG, S., KACHROO, P., TRIFA, Y., PONTIER, D., LAM, E. and SILVA, H., 2000. Nitric Oxide and Salicylic Acid Signalling in Plant Defense, Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA, 97: 8849-8855.

KOLLA, V.A. and RAGHAVENDRA, A.S., 2007. Nitric Oxide is A Signaling intermediate during bicarbonate-induced stomatal closure in *pisum sativum*. physiologia plantarum, 130 (1):91–98.

KOPYRA, M. and GWÓŹDŹ, E.A., 2003. Nitric Oxide Stimulates Seed Germination and Counteracts the Inhibitory Effect of Heavy Metals and Salinity on Root Growth of *Lupinus luteus*, Plant Physiology and Bichemistry, 41:1011-1017.

KÖSESAKAL, T., 2005. Domateste (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Tohum Çimlenmesi ve Bitki Büyümesi Üzerine Çinkonun Etkisi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı Botanik Programı, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, 51s.

KUO, W.N., KU, T.W., JONES, D.L. and JN-BAPTISTE, J., 1995. Nitric Oxide Synthase Immunoreactivity in Baker's Yeast, Lobster and Wheat Germ, Biochemical Archives, 11:73-78.

LAMATTINA, L., BELIGNI, M.V., GARCIA-MATA, C. and LAXALT, A.M., 2001. Method of Enhancing the Metabolic Function and the Growing Conditions of Plants and Seeds, US Patent. US 6242384 B1.

LAMATTINA, L., GARCÍA-MATA, C., GRAZIANO, M. and PAGNUSSAT, G., 2003. Nitric Oxide: The Versatility of an Extensive Signal Molecule, Annu. Rev. Plant Biol., 54:109–136.

LASPINA, N.V., GROPPA, M.D., TOMARO, M.L. and BENAVIDES, M.P., 2005. Nitric Oxide Protects Sunflower Leaves Against Cd-Induced Oxidative Stress, Plant Science, 168 (7):252-260.

LAXALT, A.M., BELIGNI, M.V. and LAMATTINA, L., 1997. Nitric Oxide Preserves the Level of Chlorophyll in Potato Leaves Infected by *Phytophthora infestans*. European Journal of Plant Pathology, 103:643-651.

LESHEM, Y.Y., 1996. Nitric Oxide in Biological Systems, Plant Growth Regulation, 18:155–169.

LESHEM, Y.Y., 2001. Nitric Oxide in Plants, London, UK: Kluwer Academic Publishers.

LESHEM, Y.Y. and HARAMATY, E., 1996. The Characterisation and Contrasting Effects of the Nitric Oxide Free Radical in Vegetative Stress and Senescence of *Pisum sativum* Linn. Foliage, Journal of Plant Physiology, 148:258-263.

LESHEM, Y.Y., HARAMATY, E., ILUZ, D., MALIK Z., SOFER, Y., ROITMAN, L. and LESHEM, Y., 1997. Effect of Stress Nitric Oxide (NO): Interaction

Between Chlorophyll Fluorescence, Galactolipid Fluidity and Lipoxygenase Activity, Plant Physiology and Bichemistry, 35:573-579.

LESHEM, Y.Y., WILLS, R.B.H. and VENG-VA KU, V., 1998. Evidence for the Function of the Free Radical Gas, Nitric Oxide (NO^*), as a Endogenous Maturation and Senescence Regulating Factor in Higher Plants, Plant Physiology and Biochemistry, 36:825-833.

LIUL, H.Y., YUL, X., CUIL, D.Y., SUNL, M.Y., SUNL, W.N., TANGL, Z.C., KWAK2, S.S. and SUL, W.A., 2007. The Role of water Channel Proteins And Nitric Oxide Signaling In Rice Seed Germination. Cell Research advance online publication doi: 10.1038/cr. 34.

MAGALHAES, J.R., MONTE, D.C. and DURZAN, D., 2000. Nitric Oxide and Ethylene Emission in *Arabidopsis thaliana*, Physiology and Molecular Biology of Plants, 6:117-127.

MANCINELLI, A.L., 1990. Interaction between Light Quality and Light Quantity in the Photoregulation of Anthocyanin Production, Plant Physiol., 92:1191-1195.

MARTINEZ, G.R., Di MASCIO, P., BONINI, M.G., AUGUSTO, O., BRIVIBA, K., SIES, H., MAUER, P., ROTHLISBERGER, U., HEROLD, S. and KOPPENOL, W.H., 2000. Peroxynitrite doe not Descompose to Singlet Oxygen (ΔgO_2) and Nitroxyl (NO^-), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97: 10307-10312.

MARTTILA, S., JONES, B.L. and MIKKONEN, A., 1995. Differential localization of two acid proteinases in germinating barley *Hordeum vulgare* seeds. Physiol. Plant, 93:317-327.

MATTIONI, C., LACERENZE, N.G., TROCCOLI, A., DELEONARDIS, A.M. and DIFONZA, N., 1997. Water and Salt Stress-Induced Alterations in Proline metabolism of *Triticum durum* Seedlings, Physiol. Plant., 101:787-792.

MAYER, A.M. and MAYBER, P., 1982. The Germination of Seeds. Third Edition, Pergamon press, England, 028854-5.

NEILL, S.J., DESIKAN, R., CLARKE, A. and HANCOCK, J.T., 2002a. Nitric Oxide is a Novel Component of Abscisic Acid Signalling in Stomatal Guard Cell, Plant Physiology, 128:13-16.

NEILL, S.J., DESIKAN, R., CLARKE, A., HURST, R.D. and HANCOCK, J.T., 2002b. Hydrogen Peroxide and Nitric Oxide as Signalling Molecules in Plants, Journal of Experimental Botany, 53:1237-1242.

NEILL, S.J., DESIKAN, R. and HANCOCK, J.T., 2002c. Hydrogen Peroxide Signalling, Current Opinion in Plant Biology, 5:388-395.

NEILL, S.J., DESIKAN R. and HANCOCK, J.T., 2003. 159, 1469-1481.

NINNEMANN, H. and MAIER, J., 1996. Indication for the Occurrence of Nitric Oxide Synthase in Fungi and Plants and the Involvement in Photoconidiation of *Neurospora crassa*, Photochemistry Photobiology, 64:393-398.

ÖNDER, N. ve YENTÜR S., 1999. Bitkilerin Büyüme Gelişme Farklılaşma ve Hareket Fizyolojisi, İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları, İstanbul, 975:414-516

PAGNUSSAT, G.C., LANTERI, M.L. and LAMATTINA, L., 2003. Nitric Oxide and Cyclic GMP Are Messengers in The Indole Acetic Acid-Induced Adventitious Rooting Process, Plant Physiol., 132:1241–1248.

PAGNUSSAT, G.C., SIMONTACCHI M., PUNTARULO, S. and LAMATTINA, L., 2002. Nitric Oxide is Required for Root Organogenesis, Plant Physiology, 129:954-956.

PALMA, J.M., SANDALIO, L.M., CORPAS, F.J., ROMERO-PUERTAS, M.C., MCCARTY, I. and DEL RİO, L.A., 2002. Plant Proteases, Protein Degradation, and Oxidative Stress: Role of Peroxisomes, Plant Physiology and Biochemistry. 40(6-8):521-530.

PARANI, M., RUDRABHATLA, S., MYERS, R., WEIRICH, H., SMITH, B., LEAMAN, DW., GOLDMAN, S.L., 2004. Microarray analysis of nitric oxide responsive transcripts in *Arabidopsis*. Plant Biotech. J., 2:359–366.

PARSONS, T.R. and STRICKLAND, J.D.H., 1963. Discussion of Spectrophotometric Determination of Marine Pigments, with Revised Equations for Ascertaining Chlorophylls and Carotenoids, Journal of Marine Research, 21:115-163.

PEDROSO, M.C. and DURZAN, D.J., 2000. Effect of Different Gravity Environments on DNA Fragmentation and Cell death in Kalanchoë Leaves, Ann. Bot., 86:983–994.

PEDROSO, M.C., MAGALHAES, J.R. and DURZAN, D., 2000a. A Nitric Oxide Burst Precedes Apoptosis in Angiosperm and Gymnosperm Callus Cells and Foliar Tissues, Journal of Experimental Botany, 51:1027-1036.

PEDROSO M.C., MAGALHAES J.R. ve DURZAN D.J., 2000b. Nitric oxide induces cell death in Taxus cells, Plant Sci., 157:173–180.

PRAZERES, J.N., FERREIRA, C.V. and AOYAMA, H., 2004. Acid Phosphatase Activities During the Germination of *Glycine max* seeds. Plant Physiol Biochem., 42(1):15-20.

PRYOR, W.A. and SQUADRITO, G.L., 1995. The Chemistry of Peroxynitrite: a Product from the Reaction of Nitric Oxide with Superoxide?, American Lournal of Physiolgy, 268:699-700

RAVEN, P.H. and JOHNSON, G., 1999. Biology Fifth Edition, WCB/McGraw-Hill, Boston, 697-35353:2.

RBEIRO, E.A., CUNHA, F.Q., TAMASHIRO, W.M.S.C. and MARTINS, I.S., 1999. Growth Phase-Dependent Subcellular Localization of Nitric Oxide Synthase in Maize Cells, FEBS Letters, 445:283-286.

ROCKEL, P., STRUBE, F., ROCKEL, A., WILDT, J. and KAISER, W.M., 2002. Regulation of Nitric Oxide (NO) Production by Plant Nitrate Reductase in vivo and in vitro, Journal of Experimental Botany, 53:103-110.

ROMERO-PUERTAS, M.C. and DELLEDONNE, M., 2003. Nitric oxide signalling in plant-pathogen interactions, IUBMB Life, 55:579–583.

SARATH, G., BETHKE, P., JONES, R., BAIRD, L., GUICHUAN, H. and MITCHELL, R., 2006. Nitric Oxide Accelerates Seed Germination in Warm-Season Grasses. Planta. 223:1154-1164

SCHERER, G.F.E. and HOLK, A., 2000. NO Donors Mimic and NO Inhibitors Inhibit Cytokinin Action in Betalaine Accumulation in *Amaranthus caudatus*, Plant Growth Regulation, 32:345-350.

SELÇUKCAN, Ç., 2005. Ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) Bitkisinde Senesens ile Nitrik Oksit arasındaki İlişkinin İncelenmesi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı Botanik Programı, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, 54s.

SEN, S. and CHEEMA, I.R., 1995. Nitric Oxide Synthase and Calmodulin Immunoreactivity in Plant Embryonic Tissue, Biochemical Archives, 11:221-227.

SRIVASTAVA, L.M., 2002. Plant Growth and Development, Hormones and Environment, Academic Press, California, 12:660570

STÖHR, C. and ULLRICH, W.R., 2002. Generation and Possible Roles of NO in Plant Roots and Their Apoplastic Space, Journal of Experimental Botany, 53 (379):2293-2303.

TAIZ, L. and ZEIGER, E., 2002. Plant Physiology Third edition, Sinauer Associates, USA, 0-87893-823-0.

TAKAHASHI, S. and YAMASAKI, H., 2002. Reversible Inhibition of Photophosphorylation in Chloroplasts by Nitric Oxide, FEBS Letters, 512: 145-148.

TANAKA, H., HOSHI, J., NAKATA, K., TAKAGI, M. and YANO, K., 1990. Isolation and some Properties of Acid Phosphatase -1 from Tomato Leaves. Agric. Biol. Chem. 54(8):947-1952.

TIAN, Q.Y., SUN, D.H., ZHAO, M.G., and ZHANG, W.H., 2007. Inhibition of Nitric Oxide Synthase (NOS) Underlies Aluminum-induced Inhibition of Root Elongation in *Hibiscus moscheutos*. New Phytologist, 174:322–331

TREWAVAS, A.J., RODRIGUES, C., RATO, C. and MALHO, R., 2002. Cyclic Nucleotides: the Current Dilemma!, Current Opinion in Plant Biology, 5:425–429.

TUN, N.N., HOLK, A. and SCHERER, G.F.E., 2001. Rapid Increase of NO Release in Plant Cell Cultures Induced by Cytokinin, FEBS Letters, 509:174-176.

VAN der VLIET, A., EISERICH, J.P., KAUR, H., CROSS, C.E. and HALLIWELL, B., 1996. Nitrotyrosine as Biomarker for Reactive Nitrogen Species, In: Packer L, ed. Nitric Oxide, B. Physiological and Pathological Processes, Methods in Enzymology, 269:175-184.

VEICHT, N.C., 2004. Horseradish Peroxidase: A Modern Review of A Classic Enzyme, Phytochemistry, 65:249-259.

VIERSTRA, R.D., 1996. Proteolysis in plants: Mechanisms an Functions. Plant Mol. Biol. 32:275-302.

WEI, M., ANDRIES, S., TSAI, Y.C., BRAAM, J. and BERKOWITZ, G., 2007. CNGC-mediated Ca Conductance, Cytosolic Ca/CaM Rise and Resulting Activation of Nitric Oxide Generation are Critical Steps in Plant Innate Immunity. Botany and Plant Biology Congress. 7-11 July, 2007, Chicago, Illinois.

WENDEHENNE, D., PUGIN, A., KLESSIG, D.F. and DURNER, J., 2001. Nitric Oxide: Comparative Synthesis and Signalling in Animal and Plant Cells, Trends in Plant Science, 6:177-183.

WILDT, J., KLEY, D., ROCKEL, A., ROCKEL, P. and SEGSCHNEIDER, H.J., 1997. Emission of NO from several higher Plant Species, Journal of Geophysical research, 102:5919-5927.

WINK, D.A., HANBAUER, I., KRISHNA, M.C., DeGRAFF, W., GAMSON, J. and MITCHELL J.B., 1993. Nitric Oxide Protects Against Cellular Damage and Cytotoxicity from Reactive Oxygen Species, Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 90:9813-9817.

WOJTASZEK, P., 2000. Nitric oxide in plants: To NO or not to NO, Phytochemistry, 54 (1):1-4.

YAMAMOTO, A., KATOU, S., YOSHIOKA, H., DOKE, N. and KAWAKITA, K., 2003. Nitrate Reductase, a Nitric Oxide-producing Enzyme: Induction by Pathogen Signals, J. Gen. Plant Pathol., 69: 218–229.

YAMASAKI, H. and SAKIHAMA, Y., 2000. Simultaneous Production of Nitric Oxide and Peroxynitrite by Plant Nitrate Reductase: in vitro Evidence for the NR-Dependent Formation, FEBS Letters, 468:89-92.

YAMASAKI, H., SAKIHAMA, Y. and TAKAHASHI, S., 1999. An Alternative Pathway for Nitric Oxide Production in Plants: New Features of an Old Enzyme, Trends in Plant Science, 2:128–129.

YAMASAKI, H., SHIMOJI, H., OHSHIRO, Y. and SAKIHAMA, Y., 2001. Inhibitory effects of nitric oxide on oxidative phosphorylation in plant mitochondria, Nitric Oxide Biol. Chem., 5:261–270.

YAN, W., DILDAY, R.H., HELMS, R.S. and BOURLAND, F.M. 2004. Effects of Gibberellic Acid on Rice Germination and Seedling Emergence in Stress Conditions. Arkansas Agricultural Experiment Station Research Series, 517:303-316.

YENTÜR, S., 2003. Bitki Anatomisi, İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları, İstanbul, 975 (5): 351-404

ZHANG, H., SUN, Y.G., ZHANG, F., NIE, L., SHEN, W.B. and XU, L.L., 2005b. Effects of Exogenous Nitric Oxide Donor on Germination and Activities of Hydrolytic Enzymes in Wheat Seed under Osmotic Stress. Planta, 31(3):241-246.

ZHANG Y.Y., WANG, L.L., Liu Y.L., ZHANG, Q., WEİ, Q.P., and ZHANG, W., 2006a. Nitric Oxide Enhances Salt Tolerance in Maize Seedlings through Increasing Activities of Proton-pump and Na+/H+ Antiport in the Tonoplast. Planta, 224:545–555.

ZHANG, H., WEN-BIAO, S., ZHANG, W. and LANG-LAI, X., 2005a. A Rapid Response of β-amylase to Nitric Oxide but not Gibberellin in Wheat Seeds During the Early Stage of Germination. Planta, 220 (5): 708-716.

ZHAO, L., ZHANG, F., GUO, J., YANG, Y., LI, B. and ZHANG, L., 2004. Nitric Oxide Functions as a Signal in Salt Resistance in the Calluses from Two Ecotypes of Reed, Plant Physiology, 134:849-857.

ZANARDO, D.I.L., ZANARDO, F.M.L., FERRARESE, M.L.L., MAGALHAES, J.R. and FERRARESE-FILHO, O., 2005. Nitric Oxide affecting Seed Germination and Peroxidase activity in Canola (*Brassica napus* L.). Physiology and Molecular Biology of Plants. 11(1):81-86.

ÖZET

Bu araştırmada, Mercimek (*Lens culinaris* Medik.) tohumlarının çimlenmesi ve erken fide büyümesi üzerine Nitrik Oksitin (NO) etkileri araştırılmıştır. Mercimek tohumları, NO vericisi olarak kullanılan SNP (sodium nitroprusside) in 0.01 μM, 100 μM, 600 μM ve 700 μM SNP gibi farklı konsantrasyonlarında ve kontrol olarak da distile suda bir gece (12 saat) ön işleme tabi tutulmuştur. Bunu ardışık tohumlar, deney çözeltileri ile ıslatılmış filtre kâğıdı bulunan petri kaplarına transfer edilerek 3 gün boyunca 25±2 °C lik etüvde çimlendirilmiştir. Çimlenme sürecinde (24, 48 ve 72 saat) tohumların çimlenme yüzdeleri ve primer kök uzunlukları saptanmıştır. Ayrıca plumula ve radikulası kesilerek çıkartılmış geri kalan tohum kısmında çözünebilir total protein miktarı, amilaz, asit fosfataz, asit ve nötr proteaz gibi çeşitli enzimlerin aktiviteleri incelenmiştir. Perlit yetişme ortamına transfer edilen çimlenen tohumların büyüme odasında 12 gün boyunca büyümeleri izlenmiştir. Büyüme aşamasında SNP in üç farklı (100 μM, 600 μM ve 700 μM) konsantrasyonu tam Hoagland besi çözeltisinde hazırlanmıştır ve bitkiler 3 gün ara ile bu çözelti ile sulanmıştır. Fidelerin kök ve gövde uzunlukları ile taze ve kuru ağırlıkları saptanmıştır. Ayrıca total klorofil, karotinoid ve antosiyanin miktarları da spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Mercimek tohumlarının çimlenmesini 100 μM SNP in teşvik, 700 μM SNP in ise belirgin şekilde inhibe ettiği, primer kök uzamasında 100 μM SNP in oldukça etkili olduğu bulunmuştur. Çözünebilir total protein miktarının tüm SNP uygulamalarında konsantrasyona paralel olarak kontrolün üzerinde olduğu gözlenmiştir ve en belirgin artış 700 μM SNP uygulamasında elde edilmiştir. 700 μM SNP in amilaz aktivitesini teşvik ettiği, tüm SNP uygulamalarının asit fosfataz aktivitesi üzerinde aynı etkiye sahip olduğu, asit ve nötr proteaz aktivitelerinin zamana ve konsantrasyona bağlı olarak değişkenlik gösterdiği saptanmıştır. Fide büyümesinin 12. gününde 100 μM SNP in özellikle kök uzamasını, üzeri konsantrasyonların ise gövde uzamasını teşvik ettiği görülmüştür. Kök-gövde taze ağırlığında 100 ve 700 μM SNP in etkisi belirginken, kök-gövde kuru ağırlığında kontrol ile hemen hemen aynı değerler elde edilmiştir. Klorofil ve karotinoid içeriğinde 700 μM SNP in teşvik edici etkisi, özellikle kökte 100 μM SNP in antosiyanin miktarını arttırdığı tespit edilmiştir.

SUMMARY

This study inspects the effects of Nitric Oxide (NO) on the germination of lentil (*Lens culinaris* L) seeds and early seedling growth. Lentil seeds were pretreated in various concentrations of SNP (sodium nitroprusside), respectively 0.01 μM, 100 μM, 600 μM, and 700 μM, and in distilled water as control group for one night (12 hours). Following this pretreatment, the seeds were transferred to petri plates with filter papers dampened with experiment solutions and germinated in an incubator for 3 days at 25±2 °C. During germination process (at 24, 48, and 72 hours), the germination rates for the seeds and primary root lengths were determined. Furthermore, total dissoluble protein amounts and activities of various enzymes such as amylase, acid phosphatase, and acid and neutral protease were inspected in the remaining sections of seeds whose plumules and radicles were removed. Growth of germinated seeds which were transferred to perlite growth medium was studied for 12 days. Three different concentrations of SNP (100 μM, 600 μM, and 700 μM) were prepared in full Hoagland nutritive solutions and the plants were watered with this solution at 3-day intervals. Root and stem lenghts of seedlings and their fresh and dry weights were determined. Further, spectrophotometric measurements of their chlorophyll, carotenoid, and anthocyanin contents were made. It was found that 100 μM SNP promoted the germination of lentil seeds, whereas 700 μM SNP clearly inhibited the same, and that 100 μM SNP was highly effective in primary root growth. Total dissoluble protein amounts were found to be higher than the control group in all SNP applications depending on the concentrations, and the most obvious increase was seen in the application of 700 μM SNP. It was determined that 700 μM SNP promoted amylase activity, that all SNP applications had the same effect on acid phosphatase activity, and that acid and neutral protease activities changed depending on time and concentration. On the 12th day of seedling growth, it was seen that 100 μM SNP promoted root growth and higher concentrations promoted stem growth. While 100 and 700 μM SNP had marked effects on fresh weights of root and stem, values similar to the control group were obtained for root-stem dry weights. It was determined that 700 μM SNP had a promotive effect on chlorophyll and carotenoid content, and 100 μM SNP increased anthocyanin content at the root.