



**AMARANTHUS RETROFLEXUS'TA KURAKLIK TOLERANSI VE
PESTİSİT DİRENCİ ARASINDAKİ İLİŞKİDE BAZI ANTİOKSİDAN
ENZİMLERİN ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

Giray KURCAN

(Yürütücü, ÇOMÜ Fen-Ed. Fak. Biyoloji Bölümü)

Sevgi DONAT

(Araştırmacı, ÇOMÜ Fen-Ed. Fak. Biyoloji Bölümü)

Prof. Dr. Okan ACAR

(Danışman, ÇOMÜ Fen-Ed. Fak. Biyoloji Bölümü)

**TÜBİTAK-2209-A ÜNİVERSİTE ÖĞRENCİLERİ ARAŞTIRMA
PROJELERİ DESTEĞİ PROGRAMI
SONUÇ RAPORU**

2020

ÖZET

Abiyotik stresler bitkide ürün verimini azaltan morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler değişimlere neden olurlar. Kuraklık stresi hücrede reaktif oksijen türlerinin (ROS) konsantrasyonlarını artırarak hücre zarlarındaki fosfolipitlere, proteinlere ve nükleik asitlere zarar verir ve kloroz gerçekleşir.

İstilacı bir yabancı ot türü olan *Amaranthus retroflexus* L. tek yıllık ve otsu bir bitkidir. Kurağa dayanıklı olup, yol kenarları boyunca, ekili alanlar ve bahçelerde dahil olmak üzere tüm açık habitatlarda yaygındır. 2,4-D, dicamba, mecoprop, bromoxynil, glifosat gibi herbisitler *A. retroflexus* üzerinde etkili olsa da birçok araştırma bu türde herbisit direnci gelişimini rapor etmektedir.

Bu çalışmada, *A. retroflexus*'un kısa süreli kuraklık ve glifosat ile ortaya çıkan bazı fizyolojik ve biyokimyasal tepkilerin belirlenmesine odaklanılmıştır. Bu amaçla, 21 günlük *A. retroflexus* fidelerinin yaprak dokusunda toplam klorofil, toplam protein, lipid peroksidasyon (MDA), H₂O₂ miktarı, hücre zarı geçirgenliği (elektrolit sızıntısı), APX ve GR aktiviteleri belirlenmiştir.

Kuraklık stresi ve glifosat uygulamaları *A. retroflexus*'ta H₂O₂ miktarını ve hücre zarı geçirgenliğini arttırmış ve kloroza neden olmuşlardır. Sonuçlarımız *A. retroflexus*'a glifosat uygulaması sonrasında yüksek ROT zararı ve düşük ROT temizleme aktivitesi olduğunu göstermiştir. Bu, antioksidan kapasite temelinde *A. retroflexus*'un glifosata duyarlı olduğuna işaret etmektedir. Ayrıca bu araştırma ile *A. retroflexus*'ta kuraklık ve glifosatın APX ve GR aktivitelerini nasıl etkilediği ilk defa gösterilmektedir. Sonuçta, *A. retroflexus*'ta oksidatif stresin kısa süreli kuraklığa kıyasla glifosat ile daha çok zarara neden olduğu saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Amaranthus retroflexus*, kuraklık stresi, APX, GR, herbisit direnci

ABSTRACT:

Abiotic stresses cause morphological, physiological, biochemical and molecular changes that reduce crop yield in the plant. Drought stress increases the concentrations of reactive oxygen species (ROS) in the cell, damaging the phospholipids, proteins, and nucleic acids in the cell membranes and chlorosis occur.

Amaranthus retroflexus L., an invasive weed, is an annual and herbaceous plant. It is drought-resistant and is common in all open habitats, including along roadsides, in cultivated areas, and orchards. Although herbicides such as 2,4-D, dicamba, mecoprop, bromoxynil, glyphosate are effective on *A. retroflexus*, many studies report the development of herbicide resistance in this species.

In this study, it has been focused on determining some physiological and biochemical responses of *A. retroflexus* to short-term drought stress and glyphosate. For this purpose, total chlorophyll, total protein, lipid peroxidation (MDA), H₂O₂ amount, cell membrane permeability (electrolyte leakage), APX, and GR activities were determined in leaf tissue of 21-day-old *A. retroflexus* seedlings.

Drought stress and glyphosate treatments increased H₂O₂ and cell membrane permeability and resulting chlorosis in *A. retroflexus*. Our results showed that *A. retroflexus* had high ROS damage and low ROS scavenging activity after glyphosate treatment. This indicates that *A. retroflexus* is sensitive to glyphosate based on antioxidant capacity. In addition, this research shows for the first time how short-term drought stress and glyphosate affect APX and GR activities in *A. retroflexus*. As a result, it has been determined that oxidative stress causes more damage to glyphosate compared to short-term drought stress in *A. retroflexus*.

Key Words: *Amaranthus retroflexus*, drought stress, APX, GR, herbicide resistance

1. GİRİŞ:

Bitkiler uygun olmayan koşullar ile karşılaştıklarında büyüme ve gelişimleri için gerekli optimum koşullardan uzaklaşırlar. Stres olarak ifade edilen kısıtlayıcı koşullar bitkilerin doğada maruz kaldıkları abiyotik ve biyotik stres faktörleri nedeniyle gerçekleşir (Levitt, 1980). Stres faktörleri bitkisel üretimde ciddi verim kayıplarına neden olmaktadır. Kuraklık, tuzluluk, düşük ve/veya yüksek sıcaklık, kirlenme bilinen en iyi abiyotik faktörlerdir (Demirbaş ve Acar, 2008). Özellikle kuraklığın diğer tüm stres faktörleri içerisinde tarımsal üretimi sınırlandıran en önemli faktörlerden biri olduğu kabul edilmektedir (Boyer, 1982).

Abiyotik stresler; bitkide büyümeyi sınırlandıran/engellenen morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler değişimler yoluyla verimde azalmaya neden olurlar (Büyük ve ark., 2012). Örneğin, bitkide normal seviyede üretilen reaktif oksijen türleri (ROT)'nin konsantrasyonları kuraklıkla artar ve hücre zarlarındaki fosfolipitleri (Fridovic, 1986), proteinleri (Davies 1987), nükleik asitleri (Fridovic, 1986) ve klorofil parçalarını (Foyer ve ark., 1994).

Kuraklık stresi altındaki bitkilerde su kaybını azaltmak için stomalarını kapatmak, CO₂'in bitki tarafından absorpsiyonunu engellendiği için CO₂ fiksasyonunu azaltır. ATP ihtiyacının azalması sonucu, mitokondri ve kloroplastlarda elektron taşıma sisteminde elektron fazlalığı meydana gelir. Ancak, ışık absorpsiyonu devam ettiğinden kloroplastlarda biriken fazla elektronlar, moleküler O₂'e aktarılarak ROT'ları (süperoksit radikali (O₂•), hidroksil radikali (OH•), hidroperoksil radikali (HO₂•), singlet oksijen (¹O₂) ve hidrojen peroksit (H₂O₂)) oluştururlar (Asada, 1999, Edreva, 2005).

Hücre içinde ROT konsantrasyonundaki artışın neden olduğu dengesizlik oksidatif strese neden olur (Moller ve ark., 2007). Bitki hücreleri ROT'ları enzimik olmayan antioksidanlar (glutasyon (GSH) ve askorbat (ASA)) ve enzimik antioksidanlar yardımıyla (Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve peroksidazlar ((POX), guaiakol peroksidaz (GPX), glutasyon peroksidaz (GSH-Px), askorbat peroksidaz (APX)), monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR), dehidroaskorbat redüktaz (DHAR) ve glutasyon redüktaz (GR)) detoksifiye ederler (Botella ve ark., 2005, Foyer ve Noctor, 2009; Saraswathi ve Paliwal, 2011). ROT hücresel süreçlerde mitokondri, kloroplastta ya da fotorespirasyon boyunca elektron taşınımı sırasında üretilirler (Botella ve ark., 2005).

İstilacı bir tür olan *Amaranthus retroflexus* L. tek yıllık, otsu bir bitkidir. Yol kenarları boyunca, ekili alanlar ve bahçelerde dahil olmak üzere tüm açık habitatlarda yaygındır. Tohumla üreyen bir bitki olup, bir bitki yaklaşık 10 milyon adet tohum oluşturabilir ve bu tohumlar 10-40 yıl boyunca toprakta çimlenmeden canlılığını korur. Yassı ve yuvarlak olan tohumlar hayvanlarla, rüzgârla ve ekim sırasında tohumla bulaşık olarak dağılırlar. Yılda iki döl veren *A. retroflexus* her toprak tipinde büyüyebilir, aynı zamanda her türlü pH şartlarında yetişebilir (Kadioğlu ve ark., 2015).

Tarımsal üretim yapılan birçok alanda *Amaranthus* türleriyle mücadele gerekmektedir (Tozlu ve ark., 2010). Çıkış sonrası uygulamalarda kültür bitkisine göre değişkenlik olsa da 2,4-D, dicamba, mecoprop, bromoxynil, glifosat gibi herbisitler *A. retroflexus* üzerinde etkili olmaktadır (Kadioğlu ve ark., 2015). Diğer yandan *Amaranthus* türlerinde yaygın bir herbisit direnci olduğu (Hay ve ark., 2019), *A. retroflexus* için nikosülfüron ve glifosat direnci geliştiği (Vieira ve ark., 2018), *A. tuberculatus*'ta glifosat direnci olduğu (Murphy ve ark., 2019) rapor edilmiştir.

Bir başka araştırmada *A. retroflexus*'un şiddetli su stresi altında gelişen tohumlarının en yüksek çimlenme yüzdesine sahip oldukları belirlenmiştir (Karimmojeni ve ark., 2014). Bununla birlikte, *A. caudatus*'ta su kullanımı etkinliğinin kuraklık stresine adaptif bir yanıt özelliği taşıdığı da rapor edilmiştir (Valdayskikh ve ark., 2019). Dahası, *A. tricolor*'un kuraklığa toleranslı popülasyonlarının duyarlı popülasyona kıyasla daha yüksek antioksidan enzim aktivitelerine (SOD, CAT, APX, GR) ve daha düşük MDA içeriğine sahip olduğu gösterilmiştir. Ek olarak, GR, APX ve SOD'un birleşik etkisinin, *Amaranthus*'ta kuraklık toleransı ile ilişkili olabileceği ve H₂O₂'nin toksik etkisinin etkili şekilde düzenlenmesini sağlayabileceği bildirilmiştir (Slabbert ve Krüger, 2014).

Bu araştırmada, bir tarla yabancı otu olan *A. retroflexus*'ta kuraklık toleransında ve pestisit direncinde antioksidan savunma sistemi enzimlerinden APX ile GR'nin etkinliğinin belirlenmesi ve kuraklık stresine potansiyel toleransın pestisit direnci ile ilişkili olup olmayacağı araştırılmıştır. Buna göre; kuraklık stresi ve pestisit uygulamasıyla *A. retroflexus*'ta pigment miktarı, protein miktarı, APX ve GR aktiviteleri belirlenmiştir. Bu türde, pestisit direncinin anlaşılmasında kuraklık stresi ve antioksidan savunmayla ilişkili olarak pestisit direnci ilk defa sunulmaktadır.

2. MATERYAL VE YÖNTEM:

2.1 MATERYAL:

Amaranthus retroflexus L. *Amaranthaceae* familyasına ait olup tek yıllık otsu ve yabancı ot olarak tanımlanmış bir bitkidir (Kadioğlu ve ark., 2015). Bu araştırmada kullanılacak *Amaranthus retroflexus* tohumları 2017 yılında Adana il merkezindeki tarım arazilerinden toplanmış ve Zir. Yüksek Müh. Figen EFİL'den temin edilmişlerdir.

2.1.1. Bitki Materyalinin Yetiştirilmesi

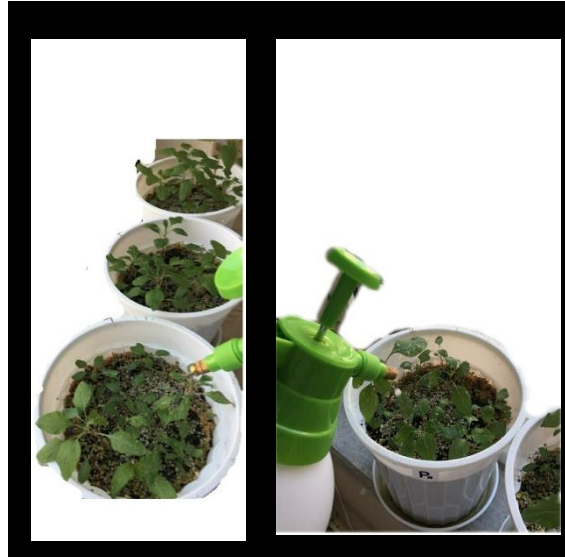
A. retroflexus tohumları %0,5'lik sodyum hipoklorit çözeltisi içinde 5 dk bekletilip, steril saf su ile 3 kez 2.5 dk yıkanarak sterilize edilmişlerdir. Sterilize tohumlar çimlenme için içerisinde nemli kurutma kâğıtları bulunan petri kaplarında bekletilmişlerdir. Çimlenen tohumlar, içerisinde toprak bulunan viyollere aktarılıp İn vitro şartlardaki bitki kabininde 22-24 °C'de, 16 saat aydınlık/8 saat karanlık fotoperiyotta yetiştirilmiş ve Hoagland besin solüsyonu (100%) ile sulanmışlardır (Steward, 1983).

2.2 YÖNTEM:

2.2.1. Kuraklık Stresi ve Herbisit Uygulamaları:

Bitkilerin gelişim durumlarına bağlı olarak yetiştirilecek 21 günlük fideler 4 gruba ayrılmışlardır. Birinci grup kuraklık ve pestisit bitkilerinin kontrol bitkileri (C), ikinci grup kuraklık stresi bitkileri (D), üçüncü grup önerilen doz pestisit uygulanan bitkiler (P-X) ve dördüncü grup ise önerilen dozun iki katı pestisit uygulanan bitkilerdir (P-2X) (Şekil 1).

Kuraklık stresi 7 gün su kıtlığı şeklinde uygulanmıştır. Pestisit uygulaması ise püskürtme yöntemiyle etken maddesi Glyphosate isopropylamin olan ticari bir herbisit önerilen dozu (300 ml/da, X) ve önerilen dozun 2 katı (600 ml/da, 2X) şeklinde uygulanmıştır. Kuraklık ve herbisit uygulamasını takiben 1. ve 4. günlerde bitkilerden yaprak doku örnekleri alınmış ve bu örnekler analizlerde kullanılmışlardır.



Şekil 1. Yirmibir günlük *Amaranthus retroflexus* L. fidelerine herbisit uygulaması

2.2.2. Bitki Ölçümleri ve Analiz Yöntemleri

Spektrofotometrik analizler Thermo Scientific Genesys Ones UV-Vis spektrofotometre cihazında gerçekleştirilmiştir.

2.2.2.1. Toplam Klorofil Analizi

Toplam klorofil miktarı klorofil metre cihazı (Minolta SPAD-502, Osaka, Japan) ile gerçekleştirilmiştir (Peryea ve Kammerreck, 1997). Bu amaçla, hasat günlerinde her bir gruptan 3 farklı fideden gelişmesini tamamlamış genç yapraklardan, 15 tekerrürlü olarak ölçüm yapılmıştır.

2.2.2.2. Toplam Protein Analizi

Protein analizi Bradford (1976) yöntemine göre gerçekleştirilecektir. Buna göre, yaprak dokuları 1 mM EDTA içeren 3ml 0,05 M sodyum fosfat tamponunda (pH 7,8) homojenize edileceklerdir. Homojenatlar +4 °C' de 13000 rpm' de 30 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı protein analizinde kullanılacaklardır. 100 µl süpernatant ve 5 ml reaktif vortekste karıştırılır ve 595 nm'de spektrofotometrik absorbens değeri belirlenir. Tüm işlemler +4°C'de gerçekleştirilecektir.

2.2.2.3. Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

2.2.2.3.1. Askorbat Peroksidaz (APX; EC 1.11.1.11) Aktivitesi

Yaprak dokuları 1 ml 2 mM askorbik asit, 1 mM EDTA_{Na2.2H2O} içeren 50 mM Na-P tamponu (pH 7,8) ile homojenize edildikten sonra. Elde edilen süpernatant analizde kullanılacaktır (Nakano ve Asada, 1981) ($\epsilon=2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). 1 enzim ünitesi, dakikada okside olan 1 µmol ml^{-1} askorbat miktarı olarak hesaplanacaktır.

2.2.2.3.2. Glutasyon Redüktaz (GR; EC 1.6.4.2) Aktivitesi

Dokular 1 g yaş yaprak materyali, 1mM EDTA 3 ml 0,05 M Sodyum fosfat tamponunda (pH;7,8) homojenize edilip, homojenatlar 13000 rpm'de 40 dk santrifüjlenir. Buradan elde edilen süpernatantlar analiz için kullanılacaktır. Tüm işlemler soğuk zincirde (+4 °C) gerçekleştirilecektir. NADPH varlığında okside glutasyon miktarındaki azalma 3 dk süre ile 340 nm'de absorbensin azalmasından yola çıkılarak hesaplanacaktır ($\epsilon=6,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). 1 enzim ünitesi, dakikada okside olan glutasyon ($\mu\text{mol ml}^{-1}$) olarak hesaplanacaktır (Foyer ve Halliwell, 1976).

2.2.2.3.3. Lipit Peroksidasyonu (MDA) Miktarının Belirlenmesi

Lipit peroksidasyonunun son ürünü olan malondialdehit (MDA) seviyesinin ölçülmesi ile lipit peroksidasyon miktarı ($\text{nmol g yaş ağırlık}^{-1}$) belirlenecektir ($\epsilon=155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Madhava Rao ve Sresty, 2000).

2.2.2.3.4. Hücre Zarı Geçirgenliği (Elektrolit Sızıntısı)

Dionisio-Sese ve Tobita (1998)' ya göre hücre zarı geçirgenliği belirlenir. Bunun için 100 mg yaprak örneği 10 mL deiyonize su içeren falkon tüplerine transfer edilerek 32 °C' lik bir su banyosunda 2 saat inkübe edilir. Ortamın elektrik iletkenliği EC metre ile ölçülür (EC1). Daha sonra örnekler 121 °C' de 20 dk boyunca tüm dokuların ölmesi ve elektrolitlerin dışı çıkması için otoklavlanır. Oda sıcaklığında 25 °C'ye kadar soğutulularak bu ortamdaki elektrik iletkenliği ölçülür (EC2). Elektrolit sızıntısı (ES) aşağıdaki formüle uygulanarak hesaplanır. Ölçümler sırasında Isolab masa tipi EC metre cihazı kullanılacaktır.

$$ES = EC1/EC2 \times 100$$

2.2.2.3.5. İstatistik Analiz:

İstatistikler SPSS 22.0 kullanılarak tek yönlü varyans analizi (One Way ANOVA) ile değerlendirilecektir.

3. BULGULAR

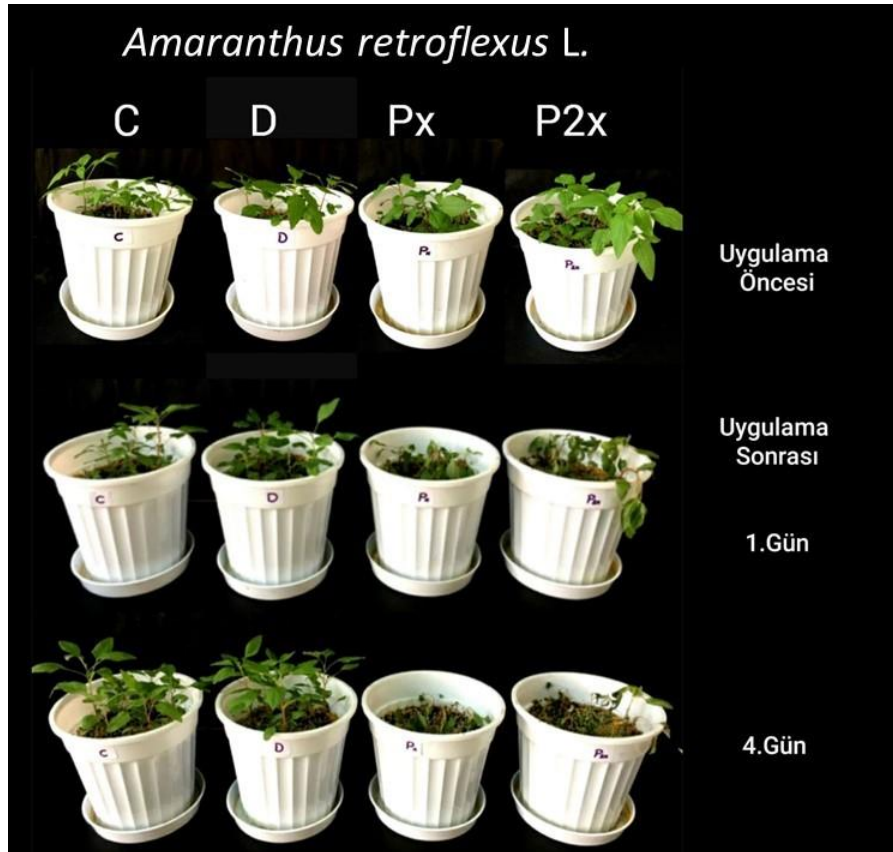
Bir tarla yabancı otu olan *A. retroflexus*'ta kuraklık toleransında ve pestisit direncinde antioksidan savunma sistemi enzimlerinden antioksidan savunma sisteminin iki enzimi olan APX ile GR aktivitelerinin belirlenmesi ve kuraklık stresine potansiyel toleransın pestisit direncini nasıl etkilediği araştırılmıştır. Bunlara ek olarak toplam klorofil miktarı, hidrojen peroksit miktarı, toplam protein miktarı, lipid peroksidasyon ve hücre zarı geçirgenliği analizleri de gerçekleştirilmiştir.

Bulgularımız genel olarak *A. retroflexus*'un kuraklık uygulamasına kıyasla pestisit uygulamalarından daha olumsuz etkilediğini ve kısa sürede öldüklerini göstermiştir (Şekil 2). Bu nedenle proje önerisinde ikinci örnekleme günü olan 7. Gün yerine, 4. günde örnekleme yapılması zorunluluğu doğmuş ve araştırmanın ilerlemesi buna göre gerçekleştirilmiştir.

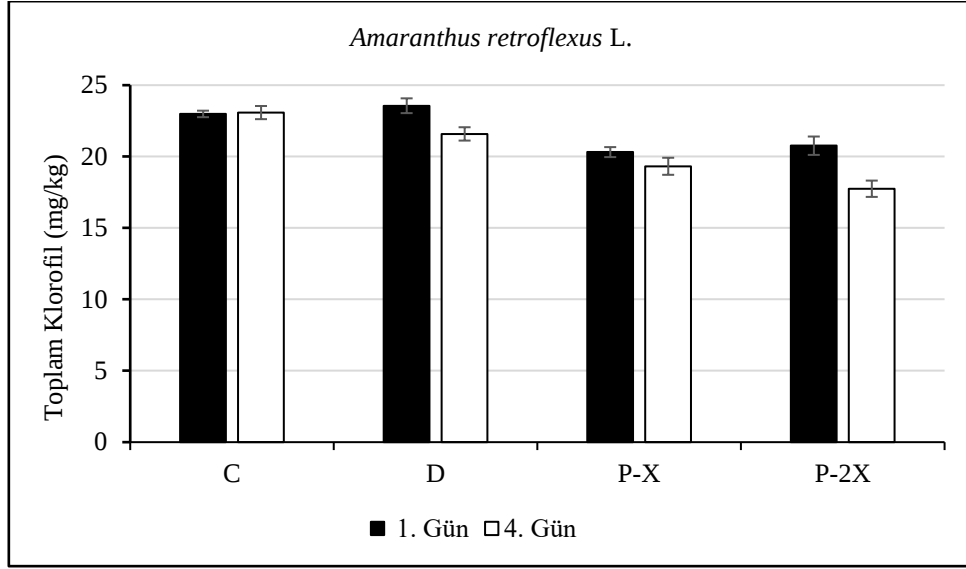
3.1. Toplam Klorofil İçeriği

Toplam klorofil içeriği 1. günde kontrole kıyasla kuraklık (D) uygulaması ile %3 artarken, önerilen doz (P-X) ve önerilen dozun iki kat (P-2X) uygulamaları ile sırasıyla %12 ve %1 azalmıştır. Denemenin 4. gününde ise D, P-X ve P-2X uygulamaları klorofil içeriğini kontrole kıyasla sırasıyla %7, %16 ve %23 azaltmıştır (Şekil 2, Şekil 3).

Sonuçlarımıza göre, deneme başlangıcında kuraklık uygulaması ile *Amaranthus retroflexus* L.'ta kloroz meydana gelmemiştir, fakat deneme sonunda tüm uygulamalar ile toplam klorofil içeriği azalmıştır.



Şekil 2. Yirmibir günlük *Amaranthus retroflexus* L.'ta kuraklık ve pestisit uygulamalarının uygulama öncesi ve deneme süresince etkisi (C: Kontrol, D: Kuraklık, P-X: Önerilen doz pestisit, P-2X: Önerilen dozun iki katı pestisit).

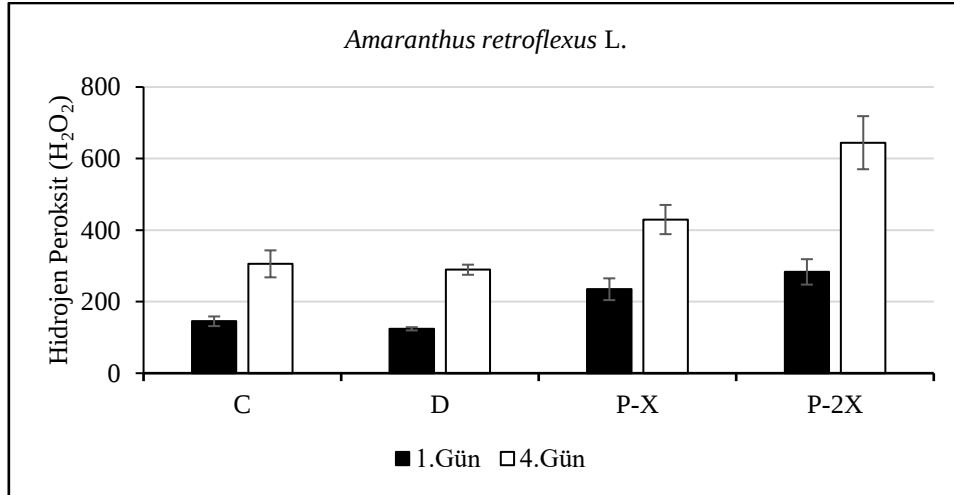


Şekil 3. *Amaranthus retroflexus* L. türünün toplam klorofil içeriğinde meydana gelen değişimler (mg/kg) (C: Kontrol, D: Kuraklık uygulaması, P-X: Önerilen dozda pestisit uygulaması, P-2X: Önerilen dozun iki katı pestisit uygulaması).

3.2 Hidrojen Peroksit Miktarı (H₂O₂)

Amaranthus retroflexus'un H₂O₂ miktarı denemenin 1. gününde kontrole kıyasla D uygulaması ile %15 azalmıştır. Bununla birlikte P-X ve P-2X uygulamaları ile kontrole kıyasla sırasıyla 3 kat ve 3,5 kat artmıştır. Denemenin 4. gününde ise kuraklık uygulaması ile H₂O₂ miktarı %5 azalırken, çarpıcı bir şekilde P-X uygulaması ile %40, P-2X uygulaması ile ise 2 kat artmıştır (Şekil 4).

Sonuçlar kuraklık uygulamasının H₂O₂ miktarını deneme boyunca azalttığına işaret etmektedir. Ancak P-X ve P-2X uygulamalarında kuraklık uygulamasına kıyasla daha az H₂O₂ miktarı belirlenmiştir.

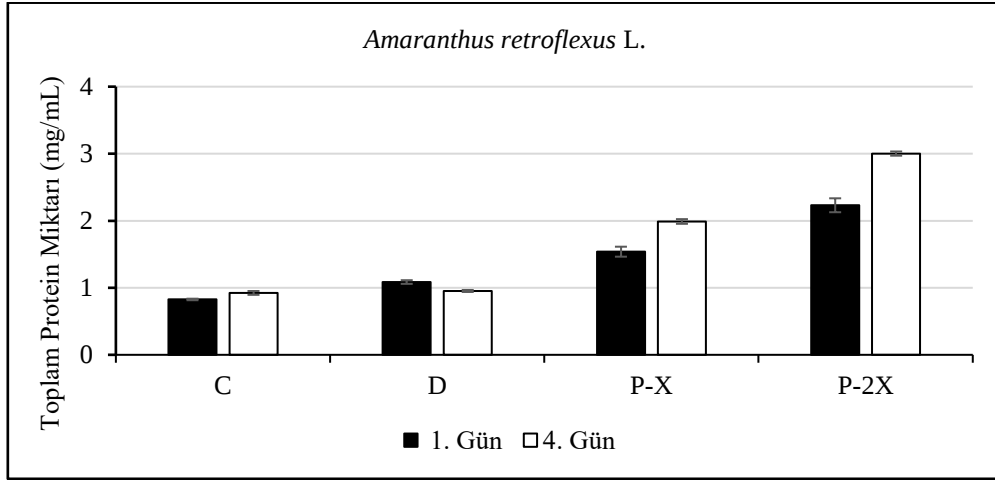


Şekil 4. *Amaranthus retroflexus* L. türünün hidrojen peroksit miktarında meydana gelen değişimler (C: Kontrol, D: Kuraklık uygulaması, P-X: Önerilen dozda pestisit uygulaması, P-2X: Önerilen dozun iki katı pestisit uygulaması).

3.3 Toplam Protein Miktarı

Toplam protein 1. günde kontrole kıyasla tüm uygulamalar ile artmıştır. Bu artışlar D, P-X ve P-2X uygulamaları ile kontrole kıyasla sırasıyla 1, 1.8 kat ve 2.6 kat olarak belirlenmiştir. Deneme sonunda tüm uygulamalar ile toplam protein miktarı artarken özellikle P-X ve P-2X gruplarında kontrole kıyasla sırasıyla 2 kat ve 3 kat artmıştır (Şekil 5).

Sonuçlar toplam protein miktarının kuraklık dışında herbisit uygulaması sonucu her iki hasat gününde de ile arttığını göstermektedir.

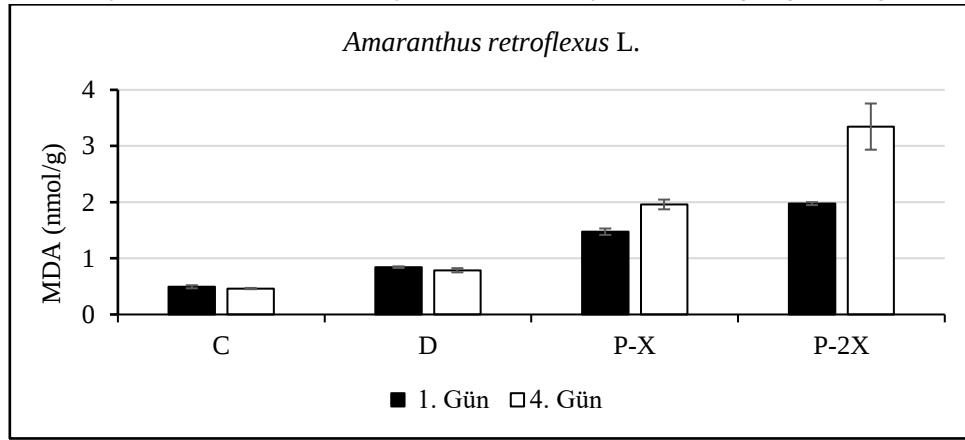


Şekil 5. *Amaranthus retroflexus* L.'de toplam protein miktarında meydana gelen değişimler (mg/mL) (C: Kontrol, D: Kuraklık uygulaması, P-X: Önerilen dozda pestisit uygulaması, P-2X: Önerilen dozun iki katı pestisit uygulaması).

3.4 Lipit Peroksidasyon Miktarı

Lipit peroksidasyon miktarı 1. günde kuraklık uygulaması ile kontrole kıyasla D, P-X, P-2X uygulamaları ile sırasıyla 1.8, 3 ve 4 kat artmıştır. Deneme sonunda tüm uygulamalar ile lipit peroksidasyon miktarı artmıştır. Bu artışlar özellikle P-X ve P-2X uygulamaları ile sırasıyla 4.2 ve 7.2 kat olarak gerçekleşmiştir (Şekil 6).

Sonuçlar deneme boyunca artan pestisit dozlarıyla lipit peroksidasyonun da arttığını göstermiştir.

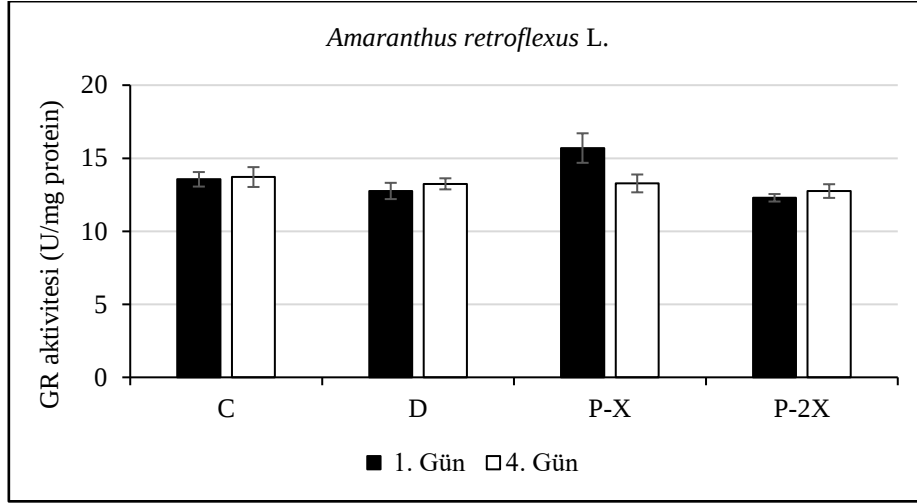


Şekil 6. *Amaranthus retroflexus* L. türünün MDA (Malondialdehit) miktarında meydana gelen değişimler (nmol/gr) (C: Kontrol, D: Kuraklık uygulaması, P-X: Önerilen dozda pestisit uygulaması, P-2X: Önerilen dozun iki katı pestisit uygulaması).

3.5 Glutasyon Redüktaz (GR) Aktivitesi

Amaranthus retroflexus türünde GR aktivitesi kuraklık uygulamasıyla kontrole kıyasla 1. günde %6 azalmıştır. Fakat P-X uygulaması ile aktivite %15 artmıştır. Uygulama dozu iki katına çıkarıldığında ise aktivite %9 oranında gerilemiştir. Uygulamanın 4. gününde kontrole kıyasla D ve P-X uygulamalarında %3 azalma tespit edilirken, P-2X uygulamasında ise bu azalma %7 oranındadır (Şekil 7).

Sonuçlar kısa vadede P-X uygulamasının GR aktivitesini arttırdığını ve diğer tüm uygulamalar ile aktivitenin azaldığını göstermektedir. Özellikle deneme sonunda hiçbir uygulamanın GR aktivitesini kontrole kıyasla arttırmadığı belirlenmiştir.

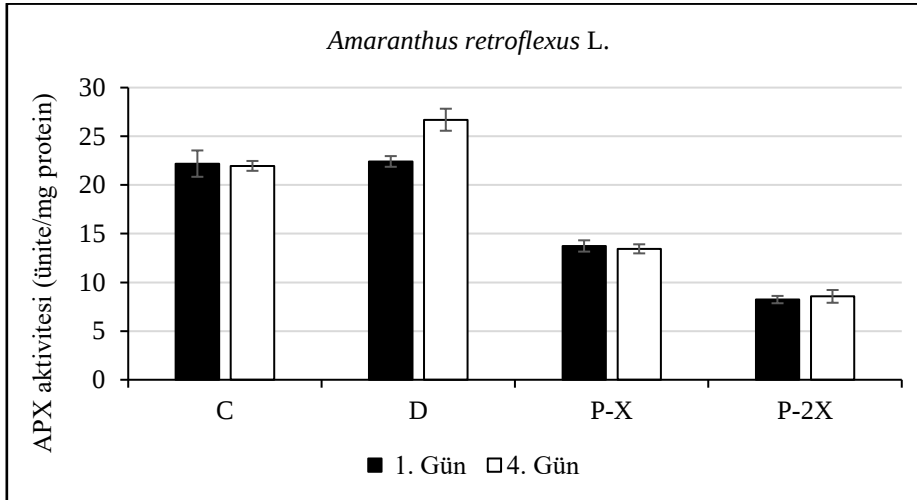


Şekil 7. *Amaranthus retroflexus* L.'de GR aktivitesinde meydana gelen değişimler (U/mg protein) (C: Kontrol, D: Kuraklık uygulaması, P-X: Önerilen dozda pestisit uygulaması, P-2X: Önerilen dozun iki katı pestisit uygulaması).

3.6 Askorbat Peroksidaz (APX) Aktivitesi

Askorbat peroksidaz aktivitesi 1. günde özellikle P-X ve P-2X uygulamaları ile kontrole kıyasla sırasıyla %38 ve %63 oranında azalmıştır. Denemenin 4. gününde ise D uygulaması ile %22 artan APX aktivitesi, P-X ve P-2X uygulaması ile kontrole kıyasla sırasıyla %39 ve %61 oranında azalmıştır (Şekil 8).

Sonuçlarımız deneme sonunda kuraklıkla artan APX aktivitesine zıt şekilde, artan herbisit dozuna paralel azalan APX aktivitelerine işaret etmektedir.

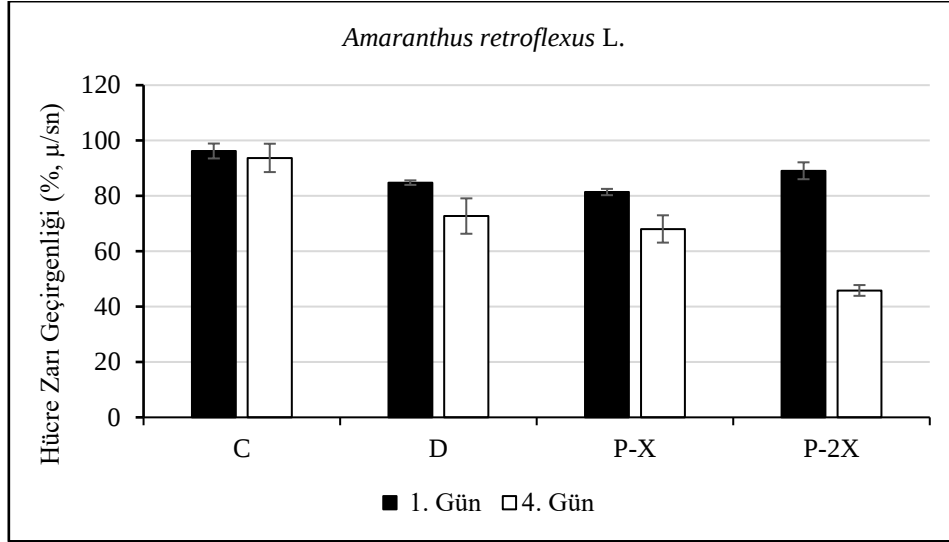


Şekil 8. *Amaranthus retroflexus* L. türünün APX miktarında meydana gelen değişimler (U/mg protein) (C: Kontrol, D: Kuraklık uygulaması, P-X: Önerilen dozda pestisit uygulaması, P-2X: Önerilen dozun iki katı pestisit uygulaması).

3.7 Hücre Zarı Geçirgenliği (HZG)

Hücre zarı geçirgenliği *Amaranthus retroflexus*'ta D, P-X ve P-2X uygulamaları ile kontrole kıyasla sırasıyla %12, %15 ve %7 azalmıştır. Denemenin 4. gününde ise HZG kontrole kıyasla D, P-X ve P-2X uygulamaları ile sırasıyla %22, %27 ve %51 azalmıştır (Şekil 9).

Sonuç olarak, deneme sonunda özellikle artan pestisit dozlarına paralel olarak HZG'de dramatik azalışlar belirlenmiştir.



Şekil 9. *Amaranthus retroflexus* L.'ta hücre zarı geçirgenliğinde meydana gelen değişimler (% (μ /sn)) (C: Kontrol, D: Kuraklık uygulaması, P-X: Önerilen dozda pestisit uygulaması, P-2X: Önerilen dozun iki katı pestisit uygulaması).

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Yabancı otlar, kültür tarımında çok yaygın bir problem olup mücadele gerektirir. Bununla birlikte yabancı otlar sulama/yağış rejimindeki değişimlere bağlı kuraklık stresiyle sürekli mücadele etmektedirler. Ürün çeşidine bağlı olarak değişmekle birlikte, tarım alanlarının sulama rejimi değişse de tarlada ve civarında yabancı ot ile mücadelede herbisitler çok yaygın bir kullanıma sahiptirler. Güney Amerika kökenli bir bitki olan *Amaranthus* cinsi son yıllarda Türkiye'deki tarım alanları için büyük bir sorun oluşturmaktadır. Bu araştırma, istilacı bir yabancı ot türü olan *Amaranthus retroflexus*'un yaygın bir herbisit olan glifosata ve kısa süreli kuraklık stresi yanıtta fizyolojik ve biyokimyasal tepkilerini belirlemeye odaklanmıştır. Bu amaçla, laboratuvar koşullarında yetiştirilen 21 günlük *A. retroflexus* fidelerinin yaprak dokusunda toplam klorofil, toplam protein, lipid peroksidasyon (MDA), H_2O_2 miktarı, hücre zarı geçirgenliği (elektrolit sızıntısı), APX ve GR aktiviteleri belirlenmiştir.

Herbisitlerin bir kısmı bitkiler için fotosentetik verimin temel bileşeni olan kloroplastları hedef almaktadır. Benzer şekilde kuraklık stresi de kloroplastlarda herbisitler gibi metabolik karmaşaya neden olarak, özellikle ROT konsantrasyonlarında artışa bağlı lipid peroksidasyon zar yapısını bozar ve kloroz başlar. Farklı *Amaranthus* türlerinde kuraklığa bağlı kloroz gelişimi rapor edilmiştir. Buna göre *A. tricolor*'da kuraklık stresi altında pigment miktarının azaldığı (Sarker ve Oba, 2018) ve kurağa dayanıklı biyotipe kurağa duyarlı biyotipe kıyasla daha az kloroz geliştiği saptanmıştır (Sarker ve ark., 2018). Ek olarak, *A. cruentus*'ta nem stresinin klorofil içeriğini azalttığı gösterilmiştir (Masekoa ve ark., 2019). Benzer şekilde, araştırmamızda *A. retroflexus*'ta kuraklık ile klorofil içeriği azalmıştır. Ancak bu azalma glifosat uygulaması sonucunda çok daha dramatik şekilde gerçekleşmiştir. *A. retroflexus*'ta kuraklığa kıyasla glifosatın daha fazla kloroza neden olması glifosatın etki mekanizmasıyla ilişkili olabilir. Çünkü glifosat içeren herbisitler bitkilere ve bazı mikroorganizmalara özgü bir metabolik yolağın olan şikimik asit yolağındaki 5-enol pürivil şikimat-3-fosfat (EPSP) enzimini inhibe eder. Bu ise protein sentezinde ve büyüme için kritik aromatik amino asitlerde azalmaya yol açar. Sonuçta bitkide bodur büyüme, kloroz ve doku ölümü meydana gelir (Tomlin, 2006; Lawrence, 2002; Franz ve ark., 1997; WHO, 1996).

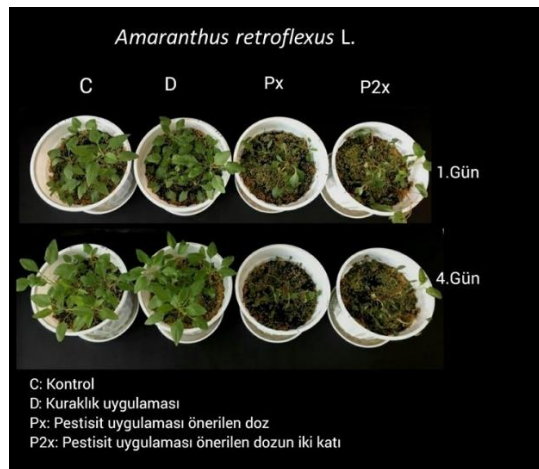
Reaktif oksijen türleri, bitkilerin biyotik ve abiyotik streslere maruz kalması sonucunda doğal konsantrasyonlarının üzerine çıkarak lipitler, proteinler ve karbonhidratlarla reaksiyona girebilir. Oksidatif stres sonucunda hücre zarlarında ve organellerde yapısal zarar meydana gelir (Özkur ve ark., 2009). Süperoksit radikalinin (O_2^*) su ile reaksiyonu sonucunda oluşan ve diğer ROT'lara kıyasla daha kararlı bir molekül olan H_2O_2 , başta kloroplast ve mitokondri olmak üzere birçok organelde ve hücre zarında bulunur (Asada, 1999). Sudan karaya çıkışlarından bu yana bitkiler için majör bir stres olan kuraklık nedeniyle H_2O_2 ve diğer ROT'ların miktarı artmaktadır (Batra ve ark., 2014). *A. tricolor*'da kuraklıkla artan H_2O_2 seviyelerinin (Sarker ve Oba, 2018), kurağa duyarlı biyotipte dramatik artışlara neden olurken kurağa dayanıklı biyotipte değişmediği gösterilmiştir (Sarker ve ark., 2018). Her ne kadar araştırmamızda *A. retroflexus*'ta kısa süreli kuraklık H_2O_2 seviyelerini arttırmamış olsa da glifosat uygulaması artan doza bağlı olarak H_2O_2 miktarını şiddetli şekilde artırmıştır.

Bitkilerde artan ROT konsantrasyonları nedeniyle oksidatif stres meydana gelmektedir (Asada,1999). Oksidatif stres özellikle hücre ve organel zarlarındaki lipidlerin oksidasyonuna neden olur. Sonuçta lipid peroksidasyon hücre ve/veya organel zarlarına zarar vererek hücrel ve hücre altı seviyede hasara yol açar (Elstner ve Osswald, 1994). Bu bağlamda MDA miktarı lipid peroksidasyonun bir ölçüsü olarak kullanılmaktadır. *A. tricolor*'da kuraklık ile MDA seviyelerinin arttığı rapor edilmiştir (Sarker ve Oba, 2018; Sarker ve ark., 2018). Buna zıt şekilde, araştırmamızda *A. retroflexus*'ta kısa süreli kuraklığın MDA miktarını değiştirmedeği belirlenmiştir. Glifosat uygulamaları ise artan H_2O_2 miktarına uyumlu şekilde MDA miktarlarını arttırmıştır.

Askorbat-Glutatyon döngüsü enzimleri ROT detoksifikasyonunda etkilidir (Edreva, 2005). Bu döngüdeki APX ve GR'nin SOD ve CAT gibi diğer antioksidan enzimler ile birlikte kuraklığa maruz kalan *A. tricolor*'da kalıcı ve dramatik artışa sahip olduğu gösterilmiştir. Bu artış aynı zamanda askorbat ve glutatyon içeriğindeki artışla da desteklenmektedir (Sarker ve ark., 2018). Sonuçlarımız, *A. retroflexus*'ta kuraklık ile APX aktivitesinin deneme sonunda arttığını ancak GR aktivitesinin buna eşlik etmediğini göstermiştir. Her ne kadar kısa süreli kuraklık (Zhang ve ark., 2020) veya uzun süreli kuraklık (Avashti ve ark., 2020) çoğu bitkide her iki enzim aktivitesini artırıyor olsa da sonuçlarımız *A. retroflexus* için GR aktivitesinin değişmemesinin kuraklık stresinin kısa süreli olmasından kaynaklandığını düşündürmektedir. Diğer yandan, deneme sonunda glifosat uygulaması APX aktivitelerini dramatik şekilde azaltırken, GR aktivitelerinde ise anlamlı bir değişim saptanmamıştır. Glutatyon içeren herbisitlerin etki mekanizması temelinde, APX aktivitelerinde kloroz kaynaklı bir düşüş beklenebilir. Ayrıca artan H_2O_2 ve HZG seviyeleri de bunu desteklemektedir.

Seçimsiz bir herbisit olan glifosatın uygulandığı kültür alanlarında, hedef dışı bitkilerin glifosat sürüklenmesine bağlı olarak etkilendikleri bilinmektedir. Bu durum *Amaranthus* biyotiplerinde iki nesil boyunca glifosata duyarlılığı azaltmaktadır (Vieira ve ark., 2020). Yüksek tohum üretme potansiyeline sahip *Amaranthus* türlerinde (Kadioğlu ve ark., 2015), glifosata dirençli biyotipler gelişmekte ve buna neden olan mutasyonların belirlenmesine halen devam etmektedir (Huang ve ark., 2019; Murphy ve ark., 2019). Araştırmamızda glifosat uygulanmış bitkilerin gelişimi durmuştur. Kuraklık uygulaması ise glifosata kıyasla daha az zararlı etki göstermiştir (Şekil 10). *A. caudatus*'un kuraklığa adaptif özellikleri olduğu ve su kullanım etkenliğinin iyi olduğu rapor edilmiştir (Valdeyskikh ve ark., 2019). Bir başka araştırmada ise artan sulama periyotları ve stres varlığının *A. retroflexus*'u çok daha başarılı ve çok daha rekabetçi, yaptığı vurgulanmıştır (Asadi ve ark., 2019). Bu durum, *A. retroflexus*'un uzun süreli kuraklıktan nasıl etkilendiğinin de araştırılması gerektiğine işaret etmektedir.

Sonuç olarak, *A. retroflexus*'ta kuraklık stresi ve glifosat uygulamaları kloroza neden olmuşlardır. Buna artan H_2O_2 ve HZG seviyeleri eşlik etmiştir. *A. palmeri*'nin glifosata dirençli biyotiplerinde düşük ROT zararı ve yüksek ROT temizleme aktivitesi rapor edilmiştir (Maroli ve ark., 2015). Buna zıt şekilde, sonuçlarımız *A. retroflexus*'a glifosat uygulaması sonrasında yüksek ROT zararı ve düşük ROT temizleme aktivitesi olduğunu göstermiştir. Antioksidan kapasite bağlamında, *A. retroflexus*'un glifosata duyarlı olduğu söylenebilir. Ayrıca bu araştırma ile kuraklık ve glifosatın *A. retroflexus*'ta etkisi ile APX ve GR aktivitelerini nasıl etkilediği ayrı ayrı gösterilmiştir. Sonuçta, oksidatif zararın *A. retroflexus*'ta kuraklığa kıyasla glifosat ile daha fazla zarara neden olduğu saptanmıştır.



Şekil 10. Yirmibir günlük *Amaranthus retroflexus* L.'ta kuraklık ve pestisit uygulamaları sonrasındaki etki (Üstten görünüş) (C: Kontrol, D: Kuraklık, P-X: Önerilen doz pestisit, P-2X: Önerilen dozun iki katı pestisit).

5. KAYNAKLAR

- Alscher R.G., Erturk N., Heath L.S., 2002. Role of Superoxide Dismutases (SODs) In Controlling Oxidative Stress in Plants. *Journal of Experimental Botany*, 53(372): 1331-1341.
- Apel K., Hirt H., 2004. Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annu Rev Plant Biol.* 55: 373-99.
- Asada K. The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1999; 50: 601-39.
- Asada K., 1999. The Water- Water Cycle in Chloroplasts: Scavenging of Active Oxygens and Dissipation of Excess Photons, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50: 601-639.
- Asadi, S., Abadi, H.R.M.D.C., Asgari, A., Zadeh, P.S., 2019, The effect of different irrigation periods on growth indicators of some weed species, *Applied Ecology and Environmental Research* 17(5), 10929-10940
- Avashthi, H., Pathak, R.K., Gaur, V.S., Singh S., Gupta V.K., Ramteke P.W., Kumar, A., 2020, Comparative analysis of ROS-scavenging gene families in finger millet, rice, sorghum, and foxtail millet revealed potential targets for antioxidant activity and drought tolerance improvement. *Netw Model Anal Health Inform Bioinforma* 9, 33.
- Batra N. G., Sharma V., Kumari N., 2014. Drought-Induced Changes in Chlorophyllfluorescence, Photosynthetic Pigments, and Thylakoid Membrane Proteins of *Vigna Radiate*. *J. Plant Interact.* 1, 712-721.
- Beauchamp C., Fridovich I., 1971. Superoxide Dismutase: Improved Assay and Applicable to Acrylamide Gels. *Anal. Biochem.*, 44: 276-287.
- Blokhina O., Virolainen E., Fagerstedt K.V., 2003. Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: A Review. *Annals of Botany*, 91: 179-194.
- Botella M.A., Rosado R.A., Hasegawa P.M., 2005. Plant Adaptive Responses to Salinity Stress. *Plant Abiotic Stress*, Blackwell Publishing Ltd, 270 p.
- Bradford M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.
- Büyük İ., Semra-Aydın S., Aras S., 2012. Bitkilerin Stres Koşullarına Verdiği Moleküler Cevaplar. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 69(2): 97-110.
- Davies K.J.A., 1987. Protein Damage and Degradation by Oxygen Radicals. I. General Aspects. *J. Biol. Chem.* 262, 9895-9901.
- Demirbaş S., Acar O., 2008. Superoxide Dismutase and Peroxidase Activities from Antioxidative Enzymes in *Helianthus annuus* L. Roots During *Orobancha cumana* Wallr. Penetration. *Fresenius Environ. Bull.*, 17 (8a): 1038-1044.
- Dionisio-Sese M.L., Tobita S. 1998. Antioxidant Responses of Rice Seedlings to Salinity Stress, *Plant Science*, 135: 1-9.
- Edreva A., 2005. Generation and Scavenging of Reactive Oxygen Species in Chloroplasts: a Submolecular Approach. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 106: 119-133.
- Edreva, A., 2005, Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach, *Agric Ecos Environ*, 1068(2-3), 119-133.
- Eltner, E.F., Osswald, W., 1994, Mechanisms of oxygen activation during plant stress, *Proc. R. Soc. Edinb.*, 102 B, 131-154.
- Foyer C.H., Descourvières P., Kunert K.J., 1994. Protection Against Oxygen Radicals: An Important Defense Mechanism Studied in Transgenic Plants. *Plant, Cell & Environment Journal*, 17(5): 507-523.
- Foyer C.H., Halliwell B., 1976. Presence of Glutathione and Glutathione Reductase in Chloroplasts: A Proposed Role in Ascorbic Acid Metabolism. *Planta*, 133: 21-25.
- Foyer C.H., Noctor G., 2009. Redox Regulation in Photosynthetic Organisms: Signaling, Acclimation, and Practical Implications, 11(4): 861-905.
- Franz, J.E., Mao, M.K., Sikorski, J.A., 1997, Glyphosate: A Unique Global Herbicide; American Chemical Society: Washington, DC, pp 521-527, 604-605, 615.
- Fridovic I., 1986. Superoxide Dismutases, *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, Vol: 58
- Gechev T.S., Breusegem F.V., Stone J.M., Denev I. ve Laloi C. 2006. Reactive Oxygen Species as Signals That Modulate Plant Stress Responses and Programmed Cell Death. *BioEssays* 28, 1091-1101.
- Giannopolitis N., Ries S. K., 1977. Superoxide Dismutase. Occurrence in Higher Plants. *Plant Physiol.*, 59:309-314.
- Hay, M. M., Dille, J. A., Peterson, D. E., 2019. Management of Pigweed (*Amaranthus* spp.) in Grain Sorghum With Integrated Strategies. *Weed Technology*, 1-9.
- Huang, Z., Huang, H., Chen, J., Chen, J., Wei, S., Zhang, C., 2019. Nicosulfuron-Resistant *Amaranthus retroflexus* L. in Northeast China. *Crop Protection*, 122, 79-83.
- Kadioğlu, İ., Başaran, B., Kaya, Y., 2015. *Amaranthus retroflexus* L.: An Invasive Plant. *Türkiye Herboloji Dergisi*, 18(3), 74-76.
- Karimmojeni, H., Bazrafshan, A. H., Majidi, M. M., Torabian, S., Rashidi, B., 2014. Effect of Maternal Nitrogen and Drought Stress on Seed Dormancy and Germinability of *Amaranthus retroflexus*. *Plant Species Biology*, 29(3), E1-E8.
- Lawrence, K.S., 2002, *Herbicide Handbook*, 8th ed. Vencill, W.K.(Ed), Weed Science Society of America, p 231-

234.

- Madhava R.K.V., Sresty T.V.S., 2000. Antioxidative Parameters in The Seedlings of Pigeon pea (*Cajanus cajan* L. Millspaugh) in Response to Zn and Ni Stresses. *Plant Sci.*, 157: 113-128.
- Masekoa, I., Ncube, B., Mabhaudhia, T., Tesfayb, S., Chimonyoa, V.G.P., Arayac, H.T., Fessehazionc, M., Du Plooy, C.P., 2019, Moisture stress on physiology and yield of some indigenous leafy vegetables under field conditions, *South African Journal of Botany*, 126, 85-91.
- Moller I.M., Jensen P.E., 2007. Hansson A. Oxidative Modifications to Cellular Components in Plants, *Annu Rev Plant Biol*, 58, 459-81.
- Murphy, B. P., Larran, A. S., Ackley, B., Loux, M. M., Tranel, P. J., 2019. Survey of Glyphosate-, Atrazine- and Lactofen-Resistance Mechanisms in Ohio Waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*) populations. *Weed Science*, 67(3), 296-302.
- Nakano Y., Asada K., 1981. Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts *Plant, Cell, Physiol.*, 22(3), 867-880.
- Noctor, G., Foyer C.H., 1998. Ascorbate and Glutathione: Keeping Active Oxygen under Control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49, 249-279.
- Özkur O., Özdemir F., Bor M., Türkan L. Physiochemical and Antioxidant Responses of The Perennial Xerophyte *Capparis Ovata* Desf to Drought. *Environ Exp Bot* 2009; 66: 487-92.
- Pan Y., Wu L.J., Yu Z.L., 2006. Effect of Salt and Drought Stress on Antioxidant Enzymes Activities and SOD Isoenzymes of Liquorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch). *Plant Growth Regul. Article*, 49(2): 157–165
- Peryea F.J., Kammereck R., 1997. Use of Minolta SPAD-502 Chlorophyll Meter to Quantify the Effectiveness of Mid-Summer Trunk Injection of Iron on Chlorotic Pear Trees. *Journal of Plant Nutrition*, 20: 1457-1463.
- Racchi M.L., 2013. Antioxidant Defenses in Plants with Attention to *Prunus* and *Citrus* spp. *Antioxidants*, 2: 340-369.
- Saraswathi S.G., Paliwal K., 2011. Drought Induced Changes in Growth, Leaf Gas Exchange and Biomass Production in *Albizia lebbek* and *Cassia siamea* Seedlings. *J. Environ. Biol.*, 32, 173–178.
- Sarker, U., Oba, S., 2018. Catalase, Superoxide Dismutase and Ascorbate-Glutathione Cycle Enzymes Confer Drought Tolerance of *Amaranthus tricolor*. *Scientific Reports*, 8(1), 16496.
- Slabbert, M. M., Krüger, G. H. J., 2014. Antioxidant Enzyme Activity, Proline Accumulation, Leaf Area and Cell Membrane Stability in Water Stressed *Amaranthus* leaves. *South African Journal of Botany*, 95, 123-128.
- Smirnov N., 1993. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytol*, 125, 27-58.
- Stewart W., N., Rothwell G., W., 1983. *Paleobotany and the Evolution of Plants*. Cambridge University Press.
- Tomlin, C. D. S., 2006, *The Pesticide Manual: A World Compendium*, 14th ed.; British Crop Protection Council: Hampshire, UK, pp 545- 548.
- Tozlu, G., Çoruh, İ., Gültekin, L., 2010. Türkiye’de *Amaranthus* (*Amaranthaceae*) Türlerine Karşı Biyolojik Mücadelede Böceklerin Kullanımı. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 41(2), 169-176.
- Valdayskikh, V. V., Voronin, P. Y., Artemyeva, E. P., Rymar, V. P., 2019, January. Amaranth Responses to Experimental Soil Drought. In *AIP Conference Proceedings* (Vol. 2063, No. 1, p. 030023). AIP Publishing.
- Vieira, B. C., Samuelson, S. L., Alves, G. S., Gaines, T. A., Werle, R., Kruger, G. R., 2018. Distribution of glyphosate-resistant *Amaranthus* spp. in Nebraska. *Pest Management Science*, 74(10), 2316-2324.
- WHO, 1996, *Data Sheets on Pesticides: Glyphosate*; International Programme on Chemical Safety, World Health Organization, Food and Agriculture Organization: Geneva, Switzerland.
- Zhang, H., Duan, W., Xie, B., Wang B., Hou F., Li A., Dong S., Qin Z., Wang Q., Zhang L., 2020, Root yield, antioxidant capacities, and hormone contents in different drought-tolerant sweet potato cultivars treated with ABA under early drought stress. *Acta Physiol Plant* 42, 132.

