



## **Karanlıkla Teşvik Edilen Yaprak Senesensi Sürecinde Gibberellik Asit ve 6-Benzilaminopürinin Bazı Biyokimyasal Parametreler Üzerine Etkisi**

**İlhami KARATAŞ<sup>1\*</sup> Lokman ÖZTÜRK<sup>2</sup> Yener OKATAN<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Gaziosmanpaşa Üniversitesi Almus Meslek Yüksekokulu, Tokat

<sup>2</sup>Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Tokat

<sup>3</sup>Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü (Emekli), Tokat

\*e-mail: [ilhami.karatas@gop.edu.tr](mailto:ilhami.karatas@gop.edu.tr)

Alındığı tarih (Received): 08.08.2015

Kabul tarihi (Accepted): 17.12.2015

Online baskı tarihi (Printed Online): 04.03.2016

Yazılı baskı tarihi (Printed): 16.05.2016

**Öz:** Bu çalışmada uzun süre karanlık ortamda bekletilerek senesens süreci uyarılan *Tropaeolum majus* L. (Latin çiçeği) yapraklarına, gibberellik asit (GA<sub>3</sub>) ve 6-benzilaminopürin (BAP) uygulamanın bazı senesens parametrelerine etkisi incelenmiştir. Bu amaçla 10<sup>-5</sup> M BAP ve 10<sup>-5</sup> M GA<sub>3</sub> uygulanarak karanlık ortama bırakılan yaprakların klorofil, protein, nişasta ve hidrojen peroksit miktarları ile katalaz ve peroksidaz enzimlerinin aktiviteleri belirlenmiştir. Bu iki hormon yaprakların klorofil ve protein içeriğinde meydana gelen kaybı azaltırken nişasta içeriğindeki düşüşü engelleyememiştir. BAP ve GA<sub>3</sub> katalaz aktivitesini kontrole göre anlamlı şekilde artırırken peroksidaz aktivitesini azaltmıştır. Hidrojen peroksit içeriği BAP ve GA<sub>3</sub> uygulanan yapraklarda belirgin şekilde azalmıştır. Bu sonuçlar, BAP ve GA<sub>3</sub> uygulamanın yaprak senesensinin biyokimyasal parametrelerini değiştirerek bu sürecin geciktirilmesinde etkili olduğunu göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Antioksidan enzimler, Benzilaminopürin, Gibberellik asit, Hidrojen peroksit, Senesens.

### **Effects of Gibberellic Acid and 6-Benzylaminopurine on Some Biochemical Parameters During Dark-Induced Leaf Senescence**

**Abstract:** In this study, effects of gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) and 6-benzylaminopurine (BAP) on some senescence parameters in detached leaves of *Tropaeolum majus* L. (Nasturtium) during dark-induced senescence were investigated. For this purpose, chlorophyll, protein, starch, hydrogen peroxide amounts, catalase and peroxidase activities of leaves kept in darkness after applying 10<sup>-5</sup> M GA<sub>3</sub> and 10<sup>-5</sup> M BAP were determined. Both the hormones reduced losses in chlorophyll and protein contents of leaves, but these treatments did not prevent rapid losses in starch amount under dark conditions. Applications of BAP and GA<sub>3</sub> increased significantly the catalase activity, decreased meaningfully peroxidase activity compared to the control group. The contents of hydrogen peroxide were markedly decreased in leaves applied by BAP and GA<sub>3</sub>. These results suggest that applications of BAP and GA<sub>3</sub> found to be effective in senescence delay by changing the biochemical parameters of leaf senescence.

**Keywords:** Antioxidant enzymes, Benzylaminopurine, Gibberellic Acid, Hydrogen peroxide, Senescence.

#### **1.Giriş**

Senesens; hücre, doku, organ ya da tüm bitkinin ölümüne neden olan programlı bir gelişim aşamasıdır (Lim ve Nam 2007). Senesens; bitkinin sadece bir bölümünün ölmesi anlamına gelmediği aynı zamanda çeşitli makro

moleküllerin yıkılarak bitkinin diğer bölümlerine taşındığı bir süreçtir (Sarwat ve ark. 2013). Yaprak senesensi çok sayıda fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler düzeyde değişikliklerin meydana geldiği programlı bir olaydır. Bu süreçte fotosentez etkinliği azalır,

protein miktarı ve klorofil içeriğinde bir düşüş meydana gelir, membranlardan iyon sızıntısı artar ve bunlarla birlikte senesensle ilgili genlerin ifadesinde bir artış gözlenir ( Song ve ark. 2014).

Senesensin başlaması ve ilerlemesi bir dizi çevresel (kuraklık, karanlık, yüksek sıcaklık ve patojen saldırısı) ve içsel faktörler (yaş, etilen, jasmonik asit, salisilik asit, absisik asit ve sitokinin) tarafından kontrol edilmektedir. Çevresel kaynaklı stresler ve içsel sinyaller bitki tarafından algılandığında gen ifadesinde ve/veya fizyolojik aktivitede birçok değişiklik meydana gelmektedir (Zhang ve Zhou 2013). Reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi, senesens sürecindeki ve abiyotik stres altındaki bitki hücrelerinin ilk yanıtlarından biridir (Khanna-Chopra 2012). Yaprak senesensi sürecinde oluşan hücre hasarı süperoksit radikali ( $O_2^-$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve hidroksil radikali ( $OH^\cdot$ ) gibi ROS'ların artışıyla bağlantılıdır (Sairam ve ark. 2003/4). ROS'lar bitkilerin normal hücre metabolizmasının bir ürünü olarak kloroplast, mitokondri, peroksizom, hücre duvarı ve plazma zarlarında üretilmekte ve bunların seviyeleri antioksidan savunma sistemi tarafından belirli bir düzeyde tutulmaktadır. Ancak kuraklık, tuzluluk, soğuk, ultraviyole radyasyonu, ağır metal gibi stres koşulları bu bileşiklerin üretimini artırmakta ve bunun bir sonucu olarak da üretimleri ile etkisizleştirilmeleri arasındaki denge bozulmaktadır. ROS seviyesindeki bu artış lipid, protein, pigment ve DNA gibi biyomoleküllerde hasara neden olmaktadır. Bitkiler ROS'ları etkisizleştirerek hücreleri bu hasardan koruyacak enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemlerine sahiptirler. Enzimatik antioksidanların en önemlileri arasında süperoksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APX), glutatyon redüktaz (GR), dehidro askorbat redüktaz (DHAR), peroksidaz (POD), glutatyon peroksidaz (GPX) ve katalaz (CAT) sayılırken, enzimatik olmayan antioksidanlar arasında askorbik asit (AA), tokoferoller (vitamin E), karotenoidler, glutatyon ve fenolikler bileşikler önemli bir yer teşkil etmektedir (Karuppanapandian ve ark. 2011; Sharma ve ark. 2012; Racchi 2013; Das ve Roychoudhury 2014).

Işık bitki büyüme ve gelişmesinde oldukça önemli bir role sahiptir. Işık fotosentezin yanı sıra bitkinin doğal gelişimi ve çevreyle olan etkileşiminde bir sinyal olarak da rol oynamaktadır. Işık şiddetinin normal seviyeden yüksek veya düşük olması yaprak senesensini hızlandırmaktadır. Karanlık uygulanması senesens sürecini teşvik etmekte ve doğal senesens sürecinde olduğu gibi bu süreçte de klorofil miktarı azalmakta, fotosentez aktivitesi kaybolmakta ve hücre bileşenleri parçalanmaktadır ( Zhang ve Zhou 2013).

Bitki hormonlarının yaprak senesensinin oluşum sürecini etkilediği uzun süredir bilinmektedir (Jibrán ve ark. 2013). Etilen, jasmonik asit, absisik asit ve salisilik asit gibi bazı bitki hormonları yaprak senesensini teşvik ederken sitokinin ve oksin gibi bazı hormonlar ise geciktirmektedir (Li ve ark. 2012). BAP ve  $GA_3$ 'ün senesensin değişik parametreleri üzerine etkileri araştırılmış olmasına rağmen, özellikle karanlıkla teşvik edilen yaprak senesensi sürecinde biyokimyasal parametreler üzerine etkileri ile ilgili çalışmalar sınırlı kalmıştır. Bu bağlamda yapılan çalışmayla karanlıkla teşvik edilmiş senesens sürecinde  $GA_3$  ve BAP uygulamanın senesens parametreleri, reaktif oksijen türleri ve antioksidan enzim aktiviteleri üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

## 2. Materyal ve Metod

### 2.1. Bitkilerin Yetiştirilmesi ve Uygulamalar

*Tropaeolum majus* L. (Tropaeolaceae) Güney Amerika'da yabani olarak yetişen tek yıllık bir bitki olup güzel çiçeklerinden dolayı birçok ülkede süs bitkisi olarak yetiştirilmektedir (Bazylo ve ark. 2014). Bu çalışmada kullanılan *Tropaeolum majus* L. bitkileri vertikal klinostat üzerinde 12 saat fotoperiyot, 25 °C gündüz ve 18 °C gece koşullarında yetiştirilmiştir. Bu koşullarda yetiştirilen bitkilerin yaprakları 70. günde kesilerek deney materyali olarak kullanılmıştır. Bu bitkinin yapraklarının petiyol kısımları, laminanın ortasından çıkmakta ve uzunlukları 20-25 cm'ye ulaşmaktadır. Belirtilen yaprak tipi, petiyoller aracılığıyla yapılacak

uygulamaları oldukça kolaylaştırmaktadır. Çalışmada yaprakların lamina kısımları petiyollerle (7 cm uzunluğunda) birlikte kesilerek içerisinde  $10^{-5}$  M BAP,  $10^{-5}$  M  $GA_3$  ve saf su (kontrol grubu) bulunan deney tüplerine petiyol kısımlarından yerleştirilmiştir. Kontrol ve uygulama grubu yapraklar 2, 4 ve 6 günlük süreler için karanlık ortamda bekletilmiştir. Bu çalışmada her bir uygulama üç tekerrürlü ve her tekerrürde 10'adet yaprak olacak şekilde tesadüf parseller deneme desenine göre gerçekleştirilmiştir. Uygulama ve kontrol grubu yaprakların klorofil, protein, nişasta ve hidrojen peroksit miktarı ile katalaz ve peroksidaz (POD) aktiviteleri 2, 4 ve 6. günlerin sonunda belirlenmiştir.

### 2.2. Klorofil Miktarının Belirlenmesi

Toplam klorofil miktarlarını belirlemek için 0,25 g yaprak dokusu % 80'lik (v/v) 5 ml aseton içerisinde homojene edildikten sonra 3000 x g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Supernatantın absorbansları 645 ve 663 dalga boyunda spektrofotometrede ölçülmüştür. Klorofil miktarı Arnon (1949) formüllerine göre hesaplanmıştır.

### 2.3. Nişasta Miktarının Belirlenmesi

Nişasta miktarını belirlemek için 0,25 g yaprak dokusu 3 ml destile su içerisinde havanda homojenize edildikten sonra 3000 x g de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Supernatant 5 dakika kaynatıldıktan sonra, bir kez daha 3000 x g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. 0,9 ml süpernatanta 0,1 ml iyot (7,8 mM İyot ve % 2 KI (w/v)) çözeltisi ilave edilerek karışımın 600 nm'deki absorbansı spektrofotometrede ölçülmüştür. Standart grafikten yararlanılarak nişasta miktarı tayin edilmiştir (Dennis ve Winfield 1978).

### 2.4. Hidrojen Peroksit Miktarının Belirlenmesi

Yaprak dokusu (0,25 g) % 0,1'lik (w/v) 2,5 ml trikloroasetik asit içerisinde homojenize edildikten sonra 12000 x g'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Supernatanttan 0,5 ml alınarak üzerine 0,5 ml 10 mM  $KH_2PO_4$  tamponu (pH = 7) ve 1 ml 1 M KI eklenmiştir. Elde edilen karışımın 390

nm'deki absorbansı köre karşı ölçülmüştür. Hidrojen peroksit içeriği standart grafikten yararlanılarak belirlenmiştir (Velikova ve ark. 2000).

### 2.5. Enzim Aktivitesinin ve Protein Miktarının Belirlenmesi

Enzim aktivitelerinin ve protein içeriğinin belirlenmesi için 0,25 g yaprak dokusu 50 mM  $KH_2PO_4$  (pH = 7) tamponu içerisinde homojenize edilmiştir. Homojenat  $4^{\circ}C$  ve 12000 x g'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Yapraklardaki protein miktarının belirlenmesinde Bradford (1976) yöntemi kullanılmıştır. Protein içeriği sığır serum albümininden hazırlanan standart grafikten yararlanılarak belirlenmiştir.

Katalaz aktivitesinin ölçümünde, 3 ml'lik reaksiyon karışımı 50 mM  $KH_2PO_4$  (pH = 7) tamponu, 15 mM  $H_2O_2$  ve 30  $\mu$ l enzim den oluşacak şekilde hazırlanmıştır. Spektrofotometrede  $H_2O_2$ 'nin 240 nm'de absorbansındaki düşüş iki dakika boyunca (Jasco V-530 UV/VIS, Japan) ölçülmüştür. Bir enzim ünitesi dakikada 1  $\mu$ mol  $H_2O_2$ 'nin harcanmasını sağlayan enzim miktarı olarak ifade edilmiş ve  $H_2O_2$ 'nin ekstinksiyon katsayısı ( $0.036 \text{ cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$ ) kullanılarak hesaplanmıştır (Havir ve Mchale 1987).

Peroksidaz aktivitesinin ölçümünde, 3 ml'lik reaksiyon karışımı 50 mM  $KH_2PO_4$  (pH = 6,5) tamponu, 22,5 mM  $H_2O_2$ , 30 mM guaiacol ve 30  $\mu$ l enzim den oluşacak şekilde hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımının absorbansı spektrofotometrede (Jasco V-530 UV/VIS, Japan) 470 nm'de iki dakika boyunca ölçülmüştür. Bir enzim ünitesi bir dakikada 1  $\mu$ mol guaiacol'u katalizleyen enzim miktarı olarak ifade edilmiş ve tetraguaiacolun ekstinksiyon katsayısı ( $26.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) kullanılarak hesaplanmıştır (Angelini ve ark. 1990).

### 2.6. İstatistiksel Analizler

İstatistiki analizlerin yapılmasında SPSS 16 for Windows Standart Versiyon paket programından faydalanılmıştır. Kontrol ve uygulama gruplarındaki farklılıkların belirlenmesinde tek yönlü varyans analizi (one-

way ANOVA) kullanılmıştır. Bu amaçla  $P < 0,05$  önemlilik düzeyinde Duncan çoklu karşılaştırma testi yapılmıştır. (Duncan 1955).

### 3. Bulgular ve Tartışma

#### 3.1. Klorofil, Protein ve Nişasta İçeriği

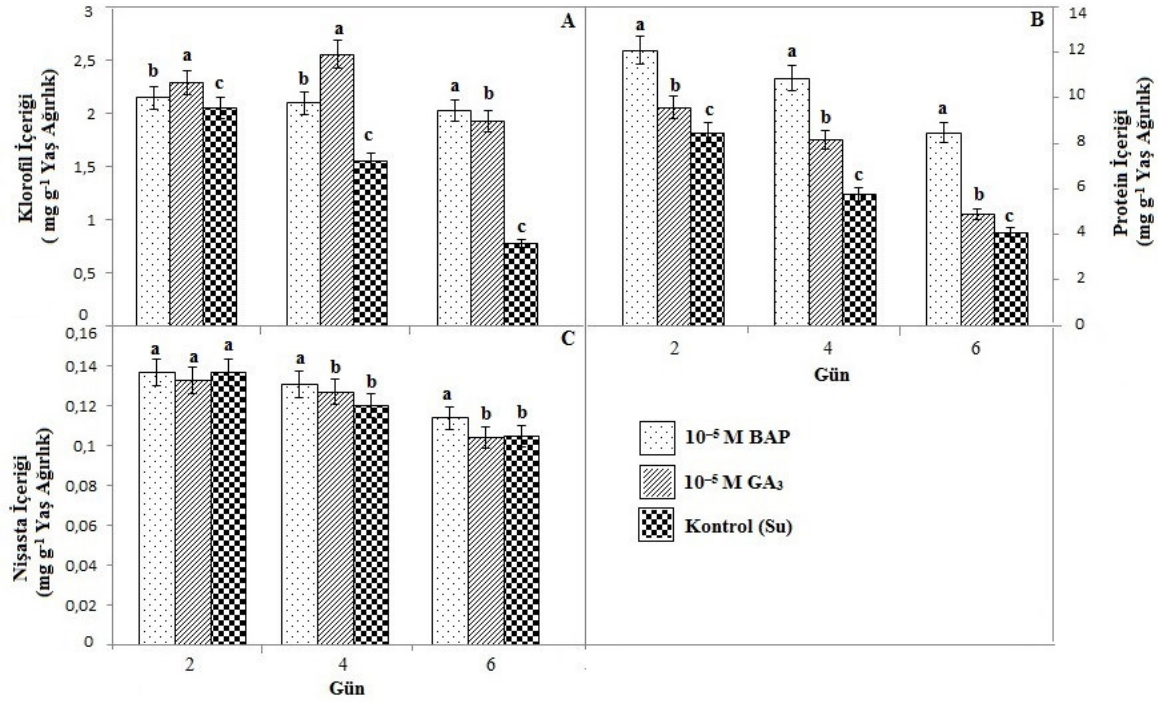
Klorofil ve protein içeriğindeki düşüş yaygın olarak senesens sürecinin biyokimyasal parametreleri olarak kullanılmaktadır. BAP,  $GA_3$  ve su içeren deney tüplerine yerleştirilerek 2, 4 ve 6 gün boyunca karanlığa maruz bırakılan yapraklarda klorofil içeriği zamana bağlı olarak azalmaktadır. Ancak BAP ve  $GA_3$  klorofil içeriğindeki bu kaybı kontrole göre önemli ölçüde ( $P < 0,05$ ) azaltmıştır. BAP ve  $GA_3$  uygulanan yaprakların klorofil içeriği 6. günün sonunda kontrol grubuna göre sırasıyla % 160,25 ve % 147,43 daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Klorofil içeriğindeki değişim Şekil 1'de gösterilmiştir. Bu veriler yapılan daha önceki çalışmalarla benzerlik göstermektedir. *Brassica oleracea* yapraklarına BAP uygulanması senesens sürecinde klorofil kaybını geciktirmiş ve klorofilin yıkımında rol alan enzimler (klorofilaz, Mg-deçelataz) ile peroksidaza bağlı klorofil beyazlanmasının seviyesini azaltmıştır (Costa ve ark. 2005). Sitokinin üretimi artırılmış transgenik tütün bitkisinde senesens gecikmiştir (Gan ve Amasino 1995). Ayrıca düşük ışık şiddeti altındaki *Raphanus sativus* L. yaprak disklerine kinetin uygulanması senesens sürecini ertelediği ve klorofil yıkımını minimize ettiği bildirilmiştir (Seema ve ark. 2011). Yine benzer bir çalışmada Ranwala ve Miller (2000), *Lilium* bitkisinde yaprak senesensi sürecinde gibberellinlerin ( $GA_{4+7}$ ) klorofil ve protein kaybını engellediğini belirtmiştir. Bu çalışmadan elden edilen veriler incelendiğinde yapraklardaki toplam protein içeriğinin zamana bağlı olarak azaldığı görülmektedir. Ancak BAP ve  $GA_3$  uygulanması protein içeriğindeki bu düşüşü istatistiksel olarak önemli ölçüde ( $P < 0,05$ ) engellemiştir. Protein kaybının engellenmesinde  $GA_3$ 'e göre BAP'ın daha etkili olduğu görülmüştür. BAP uygulanan yaprakların protein içeriği 6. günün sonunda kontrol grubundan % 107,31 daha fazla iken bu oran  $GA_3$  uygulananlarda % 19,51 olarak

gerçekleşmiştir (Şekil 1). Bu sonuçlar daha önce *Triticum aestivum*' da karanlıkla teşvik edilen senesens sürecinde BAP uygulanmasıyla elde edilen sonuçlarla örtüşmektedir. Söz konusu çalışma neticesinde  $10^{-4}$  M BAP uygulanan yaprakların 6. günde protein içeriğinin % 77'sini koruduğu ifade edilmiştir (Zavaleta-Mancera ve ark. 2007). Benzer bir çalışmada karanlıkla senesens süreci teşvik edilmiş buğday yaprak segmentlerine  $10 \mu\text{M}$  BAP uygulanması, protein kaybını geciktirmiştir (Huang ve ark. 2011). Maydanoz yapraklarında senesens sürecinde serin proteaz aktivitesinde meydana gelen artışla protein kaybı arasında bir kolerasyon olduğu belirtilmiştir. Bu süreçte  $GA_3$  uygulanması protein kaybını geciktirdiği ve proteaz aktivitesini azalttığı ifade edilmiştir (Jiang ve ark. 1999). *Pelargonium*'un kesik yapraklarında karanlıkla teşvik edilen senesens sürecinde gibberellik asit ( $GA_3$ ) uygulanması ROS seviyesindeki yükselişi inhibe etmekte ve klorofil yıkılmasını engellemektedir (Rosenwasser ve ark. 2006; Rosenwasser ve ark. 2010).

Yaprakların nişasta içeriği kontrol ve uygulama gruplarında önemli ölçüde azalmıştır. BAP ve  $GA_3$  uygulanması bu düşüşü engelleyememiştir. *Brassica oleracea* da yapılan benzer bir çalışmada karanlıkla teşvik edilen senesens sürecinde hasattan sonra meydana gelen sukroz konsantrasyonundaki hızlı düşüşü BAP uygulanması engelleyemediği belirtilmiştir (Downs ve ark. 1997).

#### 3.2. Hidrojen Peroksit İçeriği ve Enzim Aktiviteleri

Yaprak dokularındaki hidrojen peroksit içeriği kontrol ve uygulama gruplarında zamana bağlı olarak artış göstermiştir (Şekil 2). Ancak BAP ve  $GA_3$  uygulanması hidrojen peroksit içeriğindeki artışı istatistiksel olarak önemli ölçüde ( $P < 0,05$ ) yavaşlatmıştır. BAP ve  $GA_3$  uygulanan yaprakların 6. günün sonundaki hidrojen peroksit içeriği kontrolden sırasıyla % 24,72 ve % 23,49 daha az olduğu belirlenmiştir.



**Şekil 1.** BAP ve GA<sub>3</sub> uygulanan yaprakların klorofil, protein ve nişasta içeriğinin zamana bağlı değişimi.

**Figure 1.** The time dependent changes of the chlorophyll (A), protein (B) and starch (C) contents of BAP and GA<sub>3</sub> applied leaves.

Katalaz aktivitesi tüm deney gruplarında zamana bağlı olarak azalmıştır (Şekil 2). Ancak BAP ve GA<sub>3</sub> uygulanan yapraklarda katalaz aktivitesinin kontrolden daha yüksek olduğu belirlenmiştir (P<0,05).

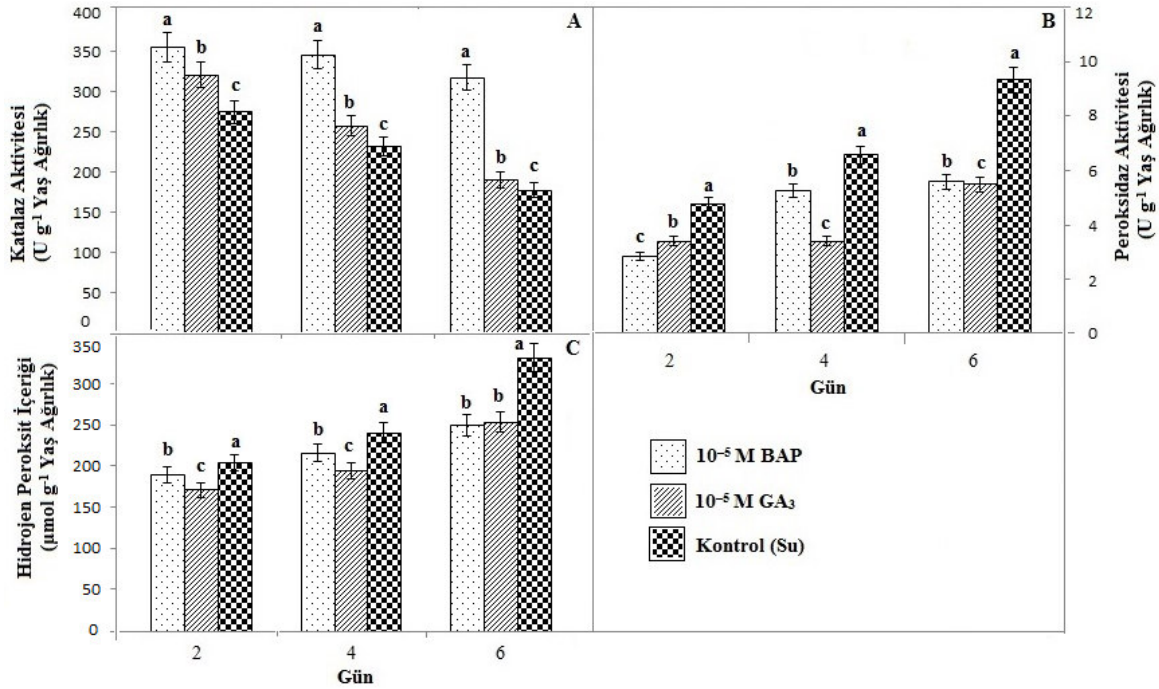
Hidrojen peroksit bitkilerde pek çok sayıda metabolik yollar vasıtasıyla üretilmekte ve senesens sürecindeki yapraklarda seviyesi artmaktadır. Hidrojen peroksit ortamda bulunan geçiş elementleri ve superoksit radikalleri ile etkileşerek çok reaktif olan hidroksil radikaline dönüşmektedir. Oluşan bu hidroksil radikali nükleik asit, lipid ve proteinlere saldırarak oksidatif hasara neden olmaktadır (Chang ve Kao 1998; Kanazawa ve ark. 2000). Oksidatif streste artış (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> birikmesi ve lipid peroksidasyonu) ve antioksidan enzim aktivitesindeki düşüş yaprak senesensinin başlıca sebeplerinden sayılmaktadır (Prochazkova ve ark. 2001). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin yok edilmesinde katalaz enziminin anahtar rol oynadığı yapılan daha önceki çalışmalarda belirtilmiştir (Rogers 2012). Yürütülen bu çalışmada BAP uygulanması katalaz aktivitesini

artırırken, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin artışını önemli ölçüde azaltmıştır. Bu sonuç, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin yıkılmasında katalaz enziminin anahtar rol oynadığı fikrini desteklemektedir. Benzer şekilde, *Triticum aestivum* yapraklarında karanlıkla teşvik edilen senesens sürecinde BAP uygulanmasının katalaz aktivitesini artırdığı ve hidrojen peroksit seviyesini azaltarak oksidatif zarardan hücre membranlarını ve fotosentetik mekanizmayı koruduğu bildirilmiştir (Zavaleta-Mancera ve ark. 2007). GA<sub>3</sub> uygulamanın BAP ile benzer sonuçlar verdiği ve katalaz aktivitesini artırarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin artışını önemli ölçüde azalttığı belirlenmiştir. Dhindsa ve ark. (1982) da yaprak senesens sürecinde Kinetin ve GA<sub>3</sub> uygulanmasının SOD ve katalaz aktivitesindeki düşüşü inhibe ettiğini ve bu enzimlerin seviyelerinin korunduğunu kaydetmişlerdir.

Peroksidazlar (POD), hidrojen peroksiti kullanarak çok sayıda organik ve inorganik substratın oksidasyonunu katalizleyen hem proteinleridir. POD, çeşitli aromatik bileşenleri substrat olarak kullanarak

metabolizma esnasında ortaya çıkan  $H_2O_2$ 'yi etkisiz hale getirmektedir (Karuppanandian ve ark. 2011).  $H_2O_2$ 'nin etkisizleştirilmesinde sadece POD değil bununla birlikte CAT, APX, GPX, askorbik asit ve glutasyon gibi antioksidan enzim ve bileşiklerde görev yapmaktadır (Racchi 2013). Yürütülen bu çalışmada yaprakların  $H_2O_2$  içeriğinin zamana bağlı olarak artış gösterdiği ve bunun paralelinde peroksidaz aktivitesinin de arttığı belirlenmiştir (Şekil 2). Senesens sürecinde peroksidaz aktivitesinin arttığı birçok araştırmacı

tarafından ifade edilmiştir (Kanazawa ve ark. 2000; Bartoli ve ark. 1995; Prochazkova ve ark. 2001; Huang ve ark. 2011). Ancak bu süreçte BAP ve  $GA_3$  uygulanması peroksidaz aktivitesini kontrole göre anlamlı şekilde azalttığı yapılan bu çalışmayla belirlenmiştir. Peroksidaz antioksidan bir enzim olmasının yanında, aktivitesinin çok yüksek olduğu durumlarda alternatif bir yolla klorofil katabolizmasına katıldığı ifade edilmiştir.



**Şekil 2.** BAP ve  $GA_3$  uygulanan yaprakların katalaz (A) ve peroksidaz (B) aktivitesi ile hidrojen peroksit (C) içeriğinin zamana bağlı değişimi.

**Figure 2.** The time dependent changes of the catalase (A), peroxidase activity (B) and hydrogen peroxide (C) contents of BAP and  $GA_3$  applied leaves.

Bu yolda peroksidaz, hidrojen peroksitle bir fenolik bileşiği katalizleyerek fenolik bir radikal meydana getirmekte ve oluşan radikal klorofil renksiz bir bileşiğe indirgemektedir (Costa ve ark. 2005). Çalışmamızın 3.1 bölümünde belirtildiği gibi karanlıkla teşvik edilen senesens sürecinde BAP ve  $GA_3$  uygulanması klorofil kaybını önemli ölçüde engellemektedir. Düşük ışık şiddeti uygulayarak yaprak senesensi teşvik edilmiş *Raphanus sativus* bitkisinde peroksidaz aktivitesinin arttığı bildirilmiştir. Bu süreçte

kinetin uygulanması söz konusu enzimin aktivitesini azaltmakta, klorofil kaybını engellemekte ve senesensi ertelemede etkili olduğu ifade edilmiştir (Seema ve ark. 2011). Xu ve ark. (2012)'da BAP uygulamasının SOD, APX ve CAT aktivitesini artırırken POD aktivitesini anlamlı şekilde azalttığı ve senesens sürecini geciktirdiğini bildirmiştir.

#### 4. Sonuç

Senesens programlanmış hücre ölümünün bir çeşidi olup hormonlar gibi iç faktörler ve ışık şiddeti gibi dış faktörlerle düzenlenen aktif bir süreçtir. Bu çalışmayla karanlıkla teşvik edilmiş senesens sürecinde BAP ve GA<sub>3</sub> uygulamalarının bazı senesens parametrelerine etkisi incelenmiştir. Söz konusu hormonlar klorofil ve protein kaybını azaltmıştır. Bu hormonların uygulanması antioksidan savunma sisteminin en önemli enzimlerinden biri olan katalazın aktivitesini kontrole göre önemli ölçüde artırarak reaktif oksijen türlerinden H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin seviyesini azaltmıştır. Gerek BAP gerekse GA<sub>3</sub> alternatif bir yolla klorofil katabolizmasına katılan peroksidaz aktivitesini azaltarak klorofil içeriğindeki düşüşü yavaşlatmıştır. Elde edilen veriler ışığında, BAP ve GA<sub>3</sub> uygulamalarının yaprak senesensini önemli ölçüde geciktirdiği belirlenmiştir.

**Teşekkür:** Katkılarından dolayı Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonuna teşekkür ederiz.

#### Kaynaklar

- Angelini R, F. Manes and R. Federico (1990). Spatial and functional correlation between diamineoxidase and peroxidase activities and their dependence upon de-etiolation and wounding in chick-pea stems. *Planta.*, 182: 89-96.
- Arnon D.I (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.*, 24: 1-15.
- Bartoli C G, Simontacchi M, Guiamet J J, Montaldi E and Puntarulo S (1995). Antioxidant enzymes and lipid peroxidation during aging of *Chrysanthemum morifolium* RAM petals. *Plant Science* (104) 161-168.
- Bazyloka A, Parzonko A, Jeż W, Osińska E and Kiss A K (2014). Inhibition of ROS production, photoprotection, and total phenolic, flavonoids and ascorbic acid content of fresh herb juice and extracts from the leaves and flowers of *Tropaeolum majus*. *Industrial Crops and Products* (55) 19-24.
- Bradford M.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: 248-251.
- Costa M L, Civello P M, Chaves A R and Martinez GA (2005). Effect of ethephon and 6-benzylaminopurine on chlorophyll bleaching during Post-Harrest Senescence of Broccoli (*Brassica oleracea* L.) at 20 °C. *Postharvest Biology and Technology*, 35: 191-199.
- Chang C J and Kao C H (1998). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> metabolism during senescence of rice leaves: changes in enzyme activities in light and darkness. *Plant Growth Regulation* (25) 11-15.
- Das K and Roychoudhury A (2014). Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science*. (2) 53. doi: 10.3389/fenvs.2014.00053.
- Dennis VM and Winfield B A (1978). The determination of starch and cellulose in refuse and compost. *Water Poll. Cont.*, 77: 529-531.
- Dhindsa R S, Plumb-Dhindsa P L and Reid D M (1982). Leaf senescence and lipid peroxidation: effect of some phytohormones, and scavengers of free radicals and singlet oxygen. *Physiol. Plant.*(56) 453-457.
- Downs C G, Somerfield S and Davey M C (1997). Cytokinin treatment delays senescence but not sucrose loss in harvested broccoli. *Postharv. Biol. Tech* (11) 93-100.
- Duncan B.D (1955). Multiple range and multiple F-tests. *Biometrics*. P.1-42.
- Gan S and Amasino R.M (1995). Inhibition of Leaf Senescence by Autoregulated Production of Cytokinin, *Science*, 270, 1986-1988
- Havir E A and Mchale N A (1987). Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiol.*, 84: 450-455.
- Huang J, Han B, Xu S, Zhou M and Shen W (2011). Heme oxygenase-1 is involved in the cytokinin-induced alleviation of senescence in detached wheat leaves during dark incubation. *Journal of Plant Physiology* (168) 768-775.
- Jiang W B, Lers A, Lomaniec E and Aharoni N (1999). Senescence-related serine protease in parsley. *Phytochemistry* (50) 377-382.
- Jibrán R, Hunter D A and Dijkwel P P (2013). Hormonal regulation of leaf senescence through integration of developmental and stress signals. *Plant Mol Biol* (82)547-561
- Kanazawa S, Sano S, Koshiha T and Ushimaru T (2000). Changes in antioxidative enzymes in cucumber cotyledons during natural senescence: comparison with those during dark-induced senescence, *Physiol. Plant.* (109) 211-216.
- Karuppanapandian T, Moon, J-C, Kim C, Manoharan K and Kim W (2011). Reactive oxygen species in plants: their generation, signal

- transduction, and scavenging mechanisms. *AJCS* 5, 709-725.
- Khanna-Chopra R (2012). Leaf senescence and abiotic stresses share reactive oxygen species-mediated chloroplast degradation. *Protoplasma* (249) 469-481.
- Li Li Z, Peng J, Wen X and Guo H (2012). Gene network analysis and functional studies of senescence-associated genes reveal novel regulators of *Arabidopsis* leaf senescence. *Journal of Integrative Plant Biology* 54 (8): 526–539.
- Lim O P and Nam G H (2007). Aging and senescence of the leaf organ. *Journal of Plant Biology* 50 (3): 291-300.
- Prochazkova D, Saram R K, Srivastava G C and Singh D V (2001). Oxidative stress and antioxidant activity as the basis of senescence in maize leaves. *Plant Science* (161) 765-771.
- Racchi M L (2013). Antioxidant Defenses in Plants with Attention to *Prunus* and *Citrus* spp. *Antioxidants* (2) 340-369.
- Ranwala A P and Miller W B (2000). Preventive mechanisms of gibberellin4+7 and light on low-temperature-induced leaf senescence in *Lilium* cv. Stargazer. *Postharvest Biology and Technology*, 19 : 85-92.
- Rogers H J (2012). Is there an important role for reactive oxygen species and redox regulation during floral senescence? *Plant, Cell and Environment*. (35) 217–233.
- Rosenvasser S, Mayak S and Friedman H (2006). Increase in reactive oxygen species ( ROS ) and in senescence-associated gene transcript ( SAG ) levels during dark-induced senescence of *pelargonium* cuttings, and the effect of gibberellic acid. *Plant Science* (170) 873–879.
- Rosenwasser S, Belausov E, Riov J, Holdengreber V and Friedman H (2010). Gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) Inhibits ros increase in chloroplasts during dark-induced senescence of pelargonium cuttings. *J Plant Growth Regul* (2010) 29: 375–384.
- Sairam R K, Singh D V and Srivastava G C (2003/4). Changes in activities of antioxidant enzymes in sunflower leaves of different ages. *Biologia Plantarum*,47(1):61-66.
- Sarwat M, Naqvi A R, Ahmad P, Ashaf M and Akram N A (2013). Phytohormones and microRNAs as sensors and regulators of leaf senescence: Assigning macro roles to small molecules. *Biotechnology Advances* (31) 1153-1171.
- Seema, Khokhar M and Mukherjee D (2011). Role of kinetin and a morphactin in leaf disc senescence of *Raphanus sativus* L. under low light. *Physiol Mol Biol Plants* 17(3):247–253.
- Sharma P, Jha A B, Dubey R S and Pessaraki M (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany* doi:10.1155/2012/217037.
- Song Y, Yang C, Gao S, Zhang W, Li L and Kuai B (2014). Age-triggered and dark-induced leaf senescence require the bHLH transcription factors PIF3, 4, and 5. *Molecular Plant* (7) 1776-1787.
- Velikova V, I. Yordanov and A. Edrava (2000). Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. Protective role of exogenous polyamines. *Plant Sci.*, 151: 59-66.
- Xu F, Yang Z, Chen X, Jin P, Wang X and Zheng Y (2012). 6-Benzylaminopurine delays senescence and enhances health-promoting compounds of harvested Broccoli. *J. Agric. Food Chem.* (60) 234–240.
- Zavaleta-Mancera H A, Lo'pez-Delgado H, Loza-Tavera H, Mora-Herrera M, Trevilla-Garcı C, Vargas-Sua'rez M and Ougham H (2007). Cytokinin promotes catalase and ascorbate peroxidase activities and preserves the chloroplast integrity during dark-senescence. *Journal of Plant Physiology* (164) 1572-1582.
- Zhang H and Zhou C (2013). Signal transduction in leaf senescence. *Plant Mol Biol* (82) 539-545.