



**GLİFOSAT HERBİSİTİNİN UYGULANDIĞI BUĞDAY
(*TRİTİCUM AESTİVUM* L.) BİTKİSİNDE
TRİAKONTANOLUN ANTİOKSİDAN SİSTEM
ÜZERİNE FİZYOLOJİK VE MOLEKÜLER
SEVİYEDE ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

İhsan KOÇAK

**Yüksek Lisans Tezi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı
Dr. Öğr. Üyesi Gökçe KARADAYI
2023**

(Her hakkı saklıdır.)

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK BİLİM DALI

**GLİFOSAT HERBİSİTİNİN UYGULANDIĞI BUĞDAY (*TRITICUM AESTIVUM L.*)
BİTKİSİNDE TRIAKONTANOLUN ANTİOKSİDAN SİSTEM ÜZERİNE
FİZYOLOJİK VE MOLEKÜLER SEVİYEDE ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

(Determination of the Effects at the Physiological and Molecular Level on Antioxidant
System of Triacontanol in Wheat (*Triticum aestivum L.*) Applied of Glyphosate Herbicide)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İhsan KOÇAK

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Gökçe KARADAYI

Erzurum
Temmuz, 2023

KABUL VE ONAY TUTANAĞI

İhsan KOÇAK tarafından hazırlanan “Glifosat Herbisitinin Uygulandığı Buğday (*Triticum aestivum L.*) Bitkisinde Triakontanolun Antioksidan Sistem Üzerinde Fizyolojik ve Moleküler Seviyede Etkilerinin Belirlenmesi” başlıklı çalışması 05 / 07 / 2023 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak, jürimiz tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bilim Dalında yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Doç. Dr. Burak ALAYLAR <i>Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Danışman:	Dr. Öğr. Üyesi Gökçe KARADAYI <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Dr. Öğr. Üyesi Melike KARAMAN <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır

Enstitü Yönetim Kurulunun
...../...../..... tarih ve sayılı
kararı.

Bu tezin Atatürk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım.

Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN
Enstitü Müdürü
Aslı Islak İmzalıdır

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

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Yüksek Lisans Tezi olarak Dr. Öğr. Üyesi Gökçe KARADAYI danışmanlığında sunulan “Glifosat Herbisitinin Uygulandığı Buğday (*Triticum aestivum* L.) Bitkisinde Triakontanolun Antioksidan Sistem Üzerinde Fizyolojik ve Moleküler Seviyede Etkilerinin Belirlenmesi” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	11	30
Kuramsal Temeller	28	30
Materyal ve Yöntem	31	35
Bulgular	17	20
Tartışma	15	20
Tezin Geneli	17	25

Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'den büyük olmaması gerekir.

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)
İhsan KOÇAK
5.7.2023
İmza: Aslı Islak İmzalıdır

Tez Danışmanı
Dr. Öğr. Üyesi Gökçe KARADAYI
5.7.2023
İmza: Aslı Islak İmzalıdır

* Tez ile ilgili YÖKTEZ’de yayımlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

☐ Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun/....../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

☒ Enstitü Yönetim Kurulunun/....../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans Eğitimim ve tez çalışmalarımı yaparken, deneyimi, bilgisi ve her türlü ilgi ve yakın desteği ile bana sürekli destek olan danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Gökçe KARADAYI'ya, yine bu süreçte desteğini esirgemeyen bütün Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü hocalarına, yüksel lisans eğitimi hususunda teşvik ve desteğini esirgemeyen ablam Dr. Öğr. Üyesi Emine MACİT ve eniştem Prof. Dr. Hanifi MACİT'e en içten dileklerle teşekkürlerimi sunarım.

Her konuda olduğu gibi bu süreçte de hep yanımda olan eşim Sevgi KOÇAK ve kızlarım Ayşe İrem KOÇAK, Aslı Betül KOÇAK ve Gül Zehra KOÇAK'a teşekkürlerimi sunarım.

İhsan KOÇAK

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GLİFOSAT HERBİSİTİNİN UYGULANDIĞI BUĞDAY (*Triticum aestivum* L.) BİTKİSİNDE TRIAKONTANOLUN ANTİOKSİDAN SİSTEM ÜZERİNE FİZYOLOJİK VE MOLEKÜLER SEVİYEDE ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

İhsan KOÇAK

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Gökçe KARADAYI

Amaç: Çalışmamızda herbisit uygulanan ekmeklik buğday'da (*Triticum aestivum* L.) antioksidan sistem üzerine triakontanolün rollerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Glifosat 200 µM, TRIA 10 µM, TRIA 20 µM, TRIA 40 µM, glifosat+TRIA10 µM, glifosat+TRIA 20 µM, glifosat+TRIA 40 µM dozlarına maruz bırakılan buğday bitkisinde antioksidant (SOD, CAT, POD) enzim aktivite tayinleri ile oksidatif stres biyomarkırlarının (LPO ve H₂O₂) miktarı belirlenmiştir. Ayrıca RNA izolasyonu yapılarak seçilen genlerin (EPPS, OEE1, ASR1) ekspresyon ifadeleri Real Time PCR analizi verilerine dayanarak her bir örnek için Ct değerleri elde edilmiştir. Bu genlerin ifade oranları $\Delta\Delta Ct$ oransal hesaplama algoritması yardımıyla tespit edilmiştir.

Bulgular: Glifosat 200 µM grubunun hidrojen peroksit enziminin aktivite değerleri kontrol grubuna göre %25 azalmıştır. TRIA 40 µM grubunun peroksidaz enziminin aktivite değerleri %105 artmıştır. Glifosat 200 µM grubunun malondialdehit seviyeleri %80 artarken, TRIA20 µM grubu değerleri %23 azalmıştır. Glifosat+TRIA10 µM ve glifosat+TRIA 20 µM ve grubunun malondialdehit seviyeleri sırasıyla %160, %50 artarken glifosat+TRIA 40 µM grubu %11 azalmıştır. Gen ekspresyonu analizlerinde ise EPPS, OEE1 ve ASR1 genlerinin en yüksek ifade oranlarının Glifosat+TRIA 10µM konsatrasyonda gerçekleştirdiği gözlenmiştir.

Sonuç: Elde ettiğimiz bulgular ışığında, herbisit uygulanan bitkilerde özellikle glifosatla ilgili stres geni olarak bilinen EPSPS geninin arttığı, glifosat ardından uygulanan triakontanol dozlarında ise bu genin ifadesinin azaldığı görülmüştür. Antioksidan sistemde görev alan stres biyomarkırları ve antioksidan enzimlerinin miktarlarına bakıldığında TRIA 40 µM dozunun bitkide iyileştirici etkilere neden olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda, Glifosatın hedef olmayan bitkilerde olumsuz etkilere neden olduğu triakontanolün yanıt olarak iyileştirici özellik gösterdiği bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Glifosat, Triakontanol, Hidrojen Peroksit, Peroksidaz, Katalaz, Lipit Peroksidasyon, Süperoksit Dismutaz

Temmuz 2023, 99 sayfa

ABSTRACT

MASTER THESIS

DETERMINATION OF THE EFFECTS AT THE PHYSIOLOGICAL AND MOLECULAR LEVEL ON ANTIOXIDANT SYSTEM OF TRIACONTANOL IN WHEAT (*Triticum aestivum* L.) APPLIED OF GLYPHOSATE HERBICIDE

İhsan KOCAK

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Uyesi Gokce KARADAYI

Purpose: In our study, it was aimed to determine the roles of triacontanol on the antioxidant system in herbicide applied bread wheat (*Triticum aestivum* L.).

Method: Antioxidant (SOD, CAT, POD) enzyme activity determinations and oxidative activity in wheat plants exposed to glyphosate 200 μ M, TRIA 10 μ M, TRIA 20 μ M, TRIA 40 μ M, glyphosate+TRIA10 μ M, glyphosate+TRIA 20 μ M, glyphosate+TRIA 40 μ M. The amount of stress biomarkers (LPO and H₂O₂) was determined. In addition, Ct values were obtained for each sample based on the Real Time PCR analysis of the expression expressions of the selected genes (EPPS, OEE1, ASR1) by RNA isolation. Expression rates of these genes were determined with the help of $\Delta\Delta$ Ct proportional calculation algorithm.

Findings: The activity values of hydrogen peroxide enzyme in the glyphosate 200 μ M group decreased by 25% compared to the control group. The activity values of the peroxidase enzyme of the TRIA 40 μ M group increased by 105%. While the malondialdehyde levels of the glyphosate 200 μ M group increased by 80%, the values of the TRIA20 μ M group decreased by 23%. Malondialdehyde levels of the glyphosate+TRIA10 μ M and glyphosate+TRIA 20 μ M and group increased by 160% and 50%, respectively, while the glyphosate+TRIA 40 μ M group decreased by 11%. In gene expression analyzes, the highest expression rates of EPPS, OEE1 and ASR1 genes were observed at Glyphosate+TRIA 10 μ M concentration.

Results: In the light of our findings, it was observed that the EPSPS gene, which is known as the stress gene related to glyphosate, increased in herbicide-treated plants, and the expression of this gene decreased in the doses of triacontanol applied after glyphosate. Considering the amounts of stress biomarkers and antioxidant enzymes involved in the antioxidant system, it was determined that the dose of TRIA 40 μ M caused healing effects in the plant. In line with these results, it was found that glyphosate caused adverse effects in non-target plants, and triacontanol showed curative properties in response.

Keywords: Glyphosate, Triacontanol, Hydrogen Peroxide, Peroxidase, Catalase, Lipid Peroxidation, Superoxide Dismutase

July 2023, 99 pages

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI.....	i
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ.....	x
GİRİŞ.....	1
KURAMSAL TEMELLER.....	9
Herbisitler.....	9
Glifosat (N-(fosfonometil)glisin).....	10
Bitki büyüme düzenleyicileri (BBD)	17
Triacontanol (TRIA)	21
Antioksidan Enzimler.....	23
Süperoksit dismutaz (SOD)	24
Peroksidaz (POD).....	26
Lipit Peroksidasyon (LPO)	28
Gen ekspresyonu	30
5-enol-Piruvilşikimat-3-fosfat sentaz (EPSPS).....	31
Absisik asit stres olgunlaştırma proteini (ASR 1).....	32
Okışjen gelişimini artırıcı protein-1 (OEE1).....	34
MATERYAL VE YÖNTEM	36
Materyal	36
Kullanılan bitkisel materyal	36
Yararlanılan alet ve cihazlar.....	36
Kullanılan çözelti ve solüsyonlar	37
Deney Bitkilerine Glifosat ve Triakontanol Uygulaması.....	38
Antioksidant Sistem Analizleri	39
Antioksidan enzim aktivitelerinin belirlenmesi	39

Oksidatif stres biyomarkırları (hidrojen peroksit ve süperoksit) ve lipid peroksidasyonu	39
Lipid Peroksidasyon Seviyesinin Belirlenmesi.....	40
Gen Ekspresyon Analizi.....	40
RNA izolasyonu	40
cDNA Sentezi.....	41
qRT-PCR ile gen ekspresyon analizi	41
Bulgularının Değerlendirilmesi.....	42
ARAŞTIRMA BULGULARI	44
Gen Ekspresyon Analizi.....	44
Fizyolojik Analizler	46
Oksidatif Stres Biyomarkır Analizi.....	48
Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂).....	48
Lipit peroksidasyonu (LPO).....	50
Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Değerlendirilmesi	51
Süperoksit dismutaz (SOD)	51
Peroksidaz (POD).....	53
Katalaz (CAT).....	56
TARTIŞMA.....	57
KAYNAKLAR.....	64
ÖZGEÇMİŞ.....	85

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Glifosat Yabancı Ot Kontrol Programları Neticesinde, Bitkilerde Artan Bazı Hastalıklar	13
Tablo 2. Çalışma Sırasında Kullanılan Cihazlar	36
Tablo 3. Çalışmada Gen Ekspresyon Analizlerinde Kullanılan Primerlerin Sekans Dizilimi	41
Tablo 4. Enzim Aktivitesi Değerlerinin Uygulama Gruplarına Göre Tek Yönlü Varyans Analizi İle Karşılaştırılması	47
Tablo 5. H ₂ O ₂ Stres Biyomarkırının Aktivite Değerlerinin Uygulama Gruplarına Göre Tukey Çoklu Karşılaştırma Testi İle Karşılaştırılması	48
Tablo 6. LPO Stres Biyomarkırının Seviyeleri Uygulama Gruplarına Göre Tukey Çoklu Karşılaştırma Testi İle Karşılaştırılması	50
Tablo 7. SOD Antioksidan Enzim Aktivite Değerleri Uygulama Gruplarına Göre Tukey Çoklu Karşılaştırma Testi İle Karşılaştırılması.....	52
Tablo 8. POD Antioksidan Enzim Aktivite Değerlerinin Uygulama Gruplarına Göre Tukey Çoklu Karşılaştırma Testi İle Değerlendirilmesi	54

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Glifosat, şikimat asit yolunda 5-enolpiruvilşikimat-3-fosfat sentazı (EPSPS) inhibe ederek, öncül olarak triptofan, fenilalanin veya tirozin gerektiren proteinlerin ve diğer moleküllerin üretimine müdahale eder.....	11
Şekil 2. Çoklu doymamış yağ asitlerinin enzimatik olmayan otoksidasyonu.....	30
Şekil 3. Glifosat ve TRIA uygulanan buğday bitkilerinde EPSPS, OEE1 ve ASR1 genlerinin ekspresyon değişimleri.....	45
Şekil 4. Glifosat ve TRIA uygulanan buğday bitkilerinde EPSPS, OEE1 ve ASR1 genlerinin ekspresyon büyüklüklerinin küme grafiği.....	46
Şekil 5. H ₂ O ₂ stres biyomarkırının aktivite değerlerinin uygulama gruplarına göre karşılaştırılması	49
Şekil 6. LPO stres biyomarkırının seviyelerinin uygulama gruplarına göre karşılaştırılması	51
Şekil 7. SOD antioksidan enzim aktivite değerlerinin uygulama gruplarının göre karşılaştırılması	53
Şekil 8 POD antioksidan enzim aktivite değerlerinin uygulama gruplarına göre standart sapmaları ve oranları	55
Şekil 9. CAT antioksidan enzim aktivite değerlerinin uygulama gruplarına göre standart sapmaları ve oranları	56

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

%	: Yüzde
<	: Küçük
>	: Büyük
µl	: Mikrolitre
°	: Derece
°C	: Santigrat
2,4-D	: 2,4-Diklorofenoksiasetik Asit
A	: Adenin
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ADP	: Adenin tri fosfat
ADP	: Adenozin difosfat
Alox15	: 12/15-LOX'u kodlayan araşidonat lipoksijenaz-15
AMPA	: Aminometilfosfonik asit
ANOVA	: Tek yönlü varyans analizi
ASR	: ABA-stres-olgunlaşma genleri
ASR 1	: Absisik Asit Stress Ripenning
ATP	: Adenozin tri fosfat
BBD	: Bitki Büyüme Düzenleyiciler
C	: Karbon
C18:2	: Linoleik
C20:4	: Araşidonik
Ca	: Kalsiyum
CAT	: Katalaz
cDNA	: Komplementer DNA
Cd	: Kadmiyum
Cm	: Santimetre
Co	: Kobalt
Cu	: Bakır
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
EPSPS	: 5-enolpiruvil-şikimat-3-fosfat sentaz
ETC	: Elektron taşıma zinciri

Fe	: Demir
g	: Gram
G	: Guanin
GA	: Giberellik asit
GDO	: Genetiği değiştirilmiş organizmaların
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
H₂SO₄	: Sulfirik asit
Ha	: Hektar
Hg	: Cıva
HRP	: Yaban turpu peroksidazı
IAA	: İndol asetik asit
K	: Potasyum
KH₂PO₄	: Mono potasyum fosfat
L	: Litre
LAI	: Yüksek yaprak alanı indeksi
LDL	: Lipoprotein
LOX	: Lipoksijenaz
LPO	: Lipit Peroksidasyon
M	: Molar
MCPA	: 2-metil-4-klorofenoksiasetik asit
Mg	: Magnezyum
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
Mn	: Mangan
Mn	: Manganez
MRNA	: Haberci (messenger) RNA
MSP	: Manganez Sağlamlaştırıcı Protein
N	: Azot
NAA	: α-Naftalen Asetik Asit
NaCl	: Sodyum klorür
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NBT	: Nitroblue tetrazolyum
NH₄OH	: Amonyum hidroksit
Ni	: Nikel
O₂	: Oksijen

OCTA	: Oktakosanol
OEE 1	: Oxygen-evolving enhancer protein-1
P	: Fosfor
PL	: Lipid peroksidasyonu
PLA₂	: Fosfolipaz A2
POD	: Peroksidaz
PPM	: Parts per million (milyonda bir birime verilen isimdir)
PUFA	: Çoklu doymamış yağ asitleri
qRT-PCR	: Gerçek Zamanlı Kantitatif Ters Transkripsiyon- Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RFAR	: Saha uygulama oranı
RNA	: Ribonükleik asid
R-OOH	: Hidroperoksit
ROS	: Reaktif oksijen türleri
S	: Sitozin
SELEX	: Üstel zenginleştirme yoluyla ligandların sistematik evrimi
SOD	: Süperoksit dismutaz
Sr	: Stronsiyum
Ti(SO₄)₂	: Titanyum disülfat
T_m	: Erime sıcaklığı
TRIA	: Triakontanol
TRIM	: İkinci haberci molekülleri
U	: Urasil
Zn	: Çinko

GİRİŞ

Tarım, 10.000 yıl önce insanoğlunun doğayı kendi ihtiyaçları için şekillendirmeye başlaması ile başlamıştır. Yapılan bu şekillendirmeden dolayı tabiatta istenmeyen bozulmalar meydana gelmiştir. Bu nedenle, tarımın başlıca amacı dengeleri bozmadan birim alandan olabildiğince çok miktarda ve yüksek kalitede ürün elde edebilmektir. Bu amaca ulaşabilmenin önündeki en büyük engellerden birisi yabancı otlardır (Oksar and Uygur, 2000). Yabancı otlar ile mücadelede kullanılan yöntemlerin başında yabancı ot öldürücü ilaçlar (herbisitler) gelmektedir (Sherman *et al.* 2018).

Yabancı otlar verim kayıplarına ve ürün kalitesinde düşüslere sebebiyet vermektedir. Seçici herbisitlerin piyasaya arzından önce, yabancı otları el ile ayıklamanın iş yükü, çiftçileri ürün rotasyonu, uygun toprak işleme ve nadas sistemlerini özenli bir şekilde bir araya getirerek yabancı ot yönetimi metotlarına uyma zorunluluğu ortaya çıkarmıştır. 1940'ların sonlarında seçici herbisitlerin takdim edilmesi ve sonraki on yıllarda yeni herbisitlerin devamlı olarak akışı, çiftçilere yeni bir imkan olan 'kimyasal çapa' olanağı verdi ve onları günümüze kadar yabancı otların kontrolü noktasında mahsul üretim sisteminden daha bağımsız bir şekilde ele alma konumuna taşımıştır. Bununla birlikte, yabancı ot kontrolü için herbisitlere duyulan güven, yabancı ot florasında ve herbisite dayanıklı biyotiplerin seçiminde değişikliklere neden olmuştur. Herbisitlerin 1980'lerde çevre ve insan sağlığı üzerindeki etkileri konusunda kamuoyunun endişesi, giderek daha sıkı kayıt gerekliliklerine yol açmış ve bazı ülkelerde pestisit kullanımını azaltmaya yönelik siyasi girişimler başlatılmıştır. Ziraide kullanılan herbisitlerin sayısı günümüze gelindiğinde ciddi miktarlarda düşmüştür (Kudsk and Streibig, 2003).

İkinci Dünya Savaşı başlamaya yakın dönemde, ot biliminde yepyeni bir peryot başlamıştır. İki oksin herbisiti olan MCPA (2-metil-4-klorofenoksiasetik asit) ve 2,4-D (2,4-Diklorofenoksiasetik Asit) 'nin keşfedilmesi istenmeyen yabancı otlarlar baş edebilmede yepyeni ufuklar açmıştır. Bu herbisitler daha sonra tahıl ürünlerinden geniş yapraklı yabancı otları seçici olarak kontrol edebilmek için kullanılabilir hale gelmiştir (Kudsk and Streibig, 2003). Geniş yapraklı yabancı otları kontrol etmek için uygun olan herbisitlere olan bağımlılık hali, tahılların ekim oranlarının artmasıyla birlikte yabancı ot florasında kontrol edilmesi zor türlerin gelişmesi ile sonuçlanmıştır (Andreasen *et al.* 1996). Bundan dolayı, çeşitli etki alanlarına sahip başka herbisit grupları geliştirilmiştir. Bunlardan en belirgin olanı EPSP (5-

enolpiruvilşikimat-3-fosfat) sentazın bir inhibitörü olan glifosat herbisitidir (Franz *et al.* 1997).

Glifosatın en büyük özelliği (N-(fosfonometil)glisin), seçici olmayan sistemik bir herbisit olmasıdır. Ancak paraquatın tersine glifosatın toksikolojik profilinin çok daha uygun olduğu bildirilmiştir. Günümüzde satışı en fazla olan herbisitlerden biridir. (Cobb and Kirkwood, 2000). Glifosat, hayvanlar için toksik olmadığı ve toprakta hızlı bir şekilde etkisiz hale geldiği yönünde genel bir kanaat vardır. Glifosatın toprakta tutunabildiği, taşınabildiği ve hedef olmayan organizmalar üzerinde aşamalı olarak etkileri olabileceği düşünülmektedir (Helander *et al.* 2012).

Dahası, toprak yapısını ve fonksiyonlarını bozmadan erozyonu ve besin kayıplarını azaltarak toprağın işlenmeden ekim yapılabilir hale getirmektedir (Duke and Powles, 2008). Ayrıca, glifosat, yemlik tahılların olgunlaşmasının koordinesinde ve hızlandırılmasında kullanılmaktadır. En etkili herbisitlerden biri olarak, yalnızca tarımda değil aynı zamanda ormancılıkta (Tanney and Hutchison, 2010) ve rekreasyon alanlarında yaprak dökücü olarak ve koruma amaçlı istilacı türleri kontrol etmek için başarıyla kullanılmıştır (Weidenhamer and Callaway, 2010). Glifosatın tanımlanıp kullanılmasından bu yana geçen onlarca yıl zarfında, genetiği değiştirilmiş organizmaların (GDO) kullanımına izin verilen ülkelerde transgenik glifosat direncine sahip bitkilerin ekilmesi glifosat kullanımını daha fazla artıran rutin bir olgu düzeyine getirmiştir (Beckie, 2011). Bununla birlikte, son çalışmalar glifosatın güvenliği konusunda şüpheler olduğunu bildirmektedir (Singh *et al.* 2020).

Bu şüphelerin kaynağı olarak genellikle herbisitlere daha toleranslı geniş yapraklı yabancı otları kontrol etmek için daha yüksek oranlarda glifosat kullanımı, sert su ve diğer bileşiklerle antagonistik etkilere neden olması, paraquat ile karşılaştırıldığında yavaş taşınma hızı ve yarılanma ömrünün uzun olması gibi sebepler gösterilebilmektedir (Baylis, 2000).

Şerit pas mantarının (*Puccinia striiformis* L.) yeni genotipleri, 2002'de Amerika Birleşik Devletleri'nde milyonlarca dolarlık buğday kaybına neden olmuştur (Chen *et al.* 2002). *Phakopsora pachyrhizi* ise Asya'da endemik olan Asya soya pası hastalığını meydana getirir. Bu patojen, baklagil türlerinde geniş bir konukçu çeşitliliğine sahiptir ve dirençli çeşitler bulunmamaktadır. Bundan dolayı, ABD'deki 70 milyon dönümlük soya fasulyesi, Asya soya fasulyesi pası tarafından tehdit altındadır ve fungusitler tek kontrol metodu olarak kullanılmaktadır (Schneider *et al.* 2005). Glifosat herbisiti, EPSPS enziminin inhibe edilmesi ile etkinliğini sağlamaktadır. EPSPS bitkilerde, mantarlarda ve bakterilerde bulunurken, hayvanlarda bulunmamaktadır (Nida *et al.* 1996). Dolayısıyla mantarlar ve bakteriler üzerine yüksek etki gösterebilmektedir (Singh *et al.* 2020).

Brezilya'daki başlıca Okaliptüs bitkisinin maruz kaldığı *Puccinia psidii* 'nin neden olduğu pas hastalığının dünya çapında *Myrtaceae* türleri içinde ciddi bir tehdit olduğu görülmüştür (Glen *et al.* 2007; Tommerup *et al.* 2003). Glifosatın Okaliptüs tarlalarına uygulanması yalnızca yabancı otlar üzerindeki zararlı etkileriyle değil aynı zamanda okaliptüs bitkilerinin *Puccinia psidii* Winter 'ın neden olduğu pasa karşı daha etkili hale geldiğine dair bilgiler sunulmuştur (Santos *et al.* 2007). Benzer şekilde, glifosat miktarı artırılarak Okaliptüs yapraklarına veya yaprak sapına direkt uygulandığında çimlenme ve appressorium meydana gelmesini de azaltmıştır. Dahası, agar besiyerinde bitkiler çimlendirilirken *Puccinia psidii* 'nin de artan herbisit dozları ile azaldığı gözlemlenmiştir. Sonuçta artan glifosat dozu ile *P. psidii* urediniosporların çimlenmesi ve apressorium oluşumundaki azalmalar, hastalığın şiddetinin ve yoğunluğunun daha düşük olmasının mantar metabolizmasındaki şikimik asit yolunun engellenmesine bağlı olabileceği anlaşılmaktadır (Tuffi Santos *et al.* 2011).

Yapılan araştırmalar, birçok bitki hastalığına herbisitlerin sebep olduğunu ya da spesifik bitki hastalıklarını çoğalttığını ortaya koymuştur (Altman and Campbell, 1977; Hornby *et al.* 1998; Mekwatanakarn and Sivasithamparam, 1987). Ayrıca, mikroelementlerin kullanımını olumsuz yönde etkilediği veya değiştirdiği bilinmektedir (Evans *et al.* 2007; Huber *et al.* 2004; Huber *et al.* 2005). Kritik fizyolojik birçok fonksiyonun aktivatörleri veya inhibitörleri mikroelementler olduğu bilgisi mevcuttu. Bu itibarla, bu düzenleyici elementlerin mevcudiyetindeki bir noksanlık ya da farklılık bitki büyümesini, hastalıklara ve zararlılara dönük direnci yüksek oranda etkileyebileceği değerlendirilmiştir (Datnoff *et al.* 2007).

Birçok katyon glifosat ile şelatlanmak suretiyle herbisit etkinliğini azaltır (Hickman *et al.* 2002; Bernards *et al.* 2005). Bitkilerdeki zayıflamış durumdaki şikimat metabolizması, çeşitli bitki patojenlerine karşı eğilimi ortaya çıkarmaktadır (Johal and Rahe, 1988; Rahe *et al.* 1990). Glifosat, yabancı otların biyolojik açıdan kontrol edebilmede kullanılan organizmaların virülansını ve patojenitesini arttırmak için mikoherbisitlerle karşılıklı ve daha büyük bir etki oluşturmaktadır (Boyette *et al.* 2006; Duke and Cerdeira, 2005).

Glifosatın düzenli bir şekilde tatbik edildiğinde hedef olmayan bitkilerde ciddi oranlarda hasar meydana getirebildiği bildirilmiştir (Cornish and Burgin, 2005). Yabancı otlarla mücadele etmek maksadıyla uygulanan glifosat, köklerin eksüdasyonu ve yapraklardan yıkanma nedenlerine bağlı olarak toprakta birikmesi söz konusudur (Kremer *et al.* 2005; Cornish and Burgin, 2005). Bundan dolayı, hedef olmayan bitkilere geçen glifosat miktarı uygulanmakta olan glifosatın %10'u civarında olduğu belirlenmiştir (Al-Khatib and Peterson, 1999; Ellis *et al.* 2003). Glifosatın topraktaki yarılanma ömrü birkaç haftadan yıllara kadar uzayabilmektedir. Glifosat kalıntılarının çoğunluğu toprağın 15cm lik üst kısmında bulunduğu

ve böylece hedef olmayan bitkilerin kök alımı ve toprağın mikrobiyal aktivitesi için ciddi bir tehdit oluşturduğu görülmüştür (Feng and Thompson, 1990).

Ayçiçeği ile yapılan bir çalışmada, glifosatın bitkilerde demir ve mangan alımını ve taşınmasını önemli miktarlarda azalttığını ortaya koymuştur. Glifosatın bitkilerin köklerinde ve yapraklarında demir (Fe) ve mangan (Mn) konsantrasyonu üzerindeki etkileri, uygulama yapıldıktan iki gün sonra çok belirgin bir duruma gelmiştir. Çinko (Zn) ve bakır (Cu) üzerinde ise glifosatın daha az etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Yaprakların tersine, köklerdeki Fe yoğunluğu glifosattan çok daha az etkilenirken, Mn yoğunluğunda büyük bir azalma meydana gelmiştir. Glifosat uygulaması ile Fe ve Mn'nin kökler tarafından alımındaki bu hızlı ve ciddi düşüşler, mikro besinlerin kök alım süreci ile glifosatın güçlü bir etkileşiminin varlığını ortaya koymaktadır. Mikro besinlerin alımı ve birikimi üzerindeki glifosatın bu engelleyici etkisinin ne şekilde cereyan ettiği bilinmemektedir. Bu çalışmalar sonucunda, glifosatın bitki hücrelerinde meydana getirdiği toksik etkinin aminometilfosfonik asit (AMPA) metabolitinden kaynaklandığı anlaşılmıştır (Reddy *et al.* 2004; Barja *et al.* 2001).

Glifosat uygulamasından sonra kloroz gelişimi, glifosatın en fazla biriktiği genç yaprakların genişleyen bazal kısımları ve sürgün uç bölgelerinde sınırlı olduğu görülmüştür (Feng *et al.* 2003). Glifosatın klorofil biyosentezini engelleyerek veya yüksek ışığa maruz kalma durumunda klorofil bozulmasını uyararak gerçekleştiği bildirilmiştir (Fuchs *et al.* 2002; Reddy *et al.* 2004).

Pamuk, tütün ve soya fasulyesi gibi bitkilerde yapılan araştırmalarda bitkilerin üreme dokularının glifosata karşı daha yüksek duyarlılığa sahip olduğu ve bunun nedeninin yüksek glifosat birikiminden kaynaklandığı bildirilmiştir (Feng *et al.* 2003; Pline *et al.* 2003; Walker *et al.* 2006). Glifosat uygulanan bitkilerin yaşlı bölgelerinde şikimat konsantrasyonu, glifosat uygulanmayan bitkilere göre 2,3 kat arttığı ve bitkilerin genç bölgelerinde ise 16 kat artış meydana geldiği görülmüştür (Yasuor *et al.* 2007).

Brezilya bölgesinde yapılan bir çalışmada, glifosatın kontrolsüz bir şekilde ya da çok az kontrolle yaygın olarak kullanıldığı ve nesli tükenmekte olan *Dimorphandra wilsonii* popülasyonunu tehdit ettiği bildirilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda (0, 5, 25 ve 50 mg/L) uygulanan Roundup, *D. wilsonii* 'de tohum çimlenmesi üzerindeki toksisitesi araştırılmıştır. Glifosat asidi ve Roundup, tohumların solunum aktivitelerini azaltma yoluyla tohum çimlenmesini önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir. Glifosat asidi ve Roundup formülasyonunun, Kompleks III ile mitokondriyal elektron taşıma zinciri (ETC) arasındaki ilgili enzimlerin aktivitelerini olumsuz etkilediği bildirilmiştir. Tohumların solunum mekanizması üzerine etkileri araştırıldığında elde edilen veriler sonucunda Roundup

toksitesinin glifosat asidinden daha yüksek olduğu görülmüştür. Dahası, glifosatın mitokondriyal ETC'yi bozarak *D. wilsonii* enerji (ATP) üretimini azalttığı ve bu nedenle doğal Brezilya habitatlarında glifosat kullanımından kaçınmanın önemli olduğunu göstermektedir (Gomes *et al.* 2017).

Glifosat dünyada en yaygın olarak kullanılan herbisit olmasına rağmen, artan kanıtlar hedef olmayan organizmalar üzerinde doğal bitkiler gibi ciddi ekotoksikolojik etkiler olduğunu göstermektedir. Transgenik ürünlere bağlı olarak yapılmakta olan tarımsal faaliyetler, Arjantin'de Chaco ormanlık alanlara doğru genişlemiştir. Yapılan çalışmada, tarımsal uygulamalar neticesinde geride kalan Chaco ormanlarında bulunan 23 yerli tür üzerinde glifosatın etkileri ortaya konulabilmektedir. Serada yetiştirilen dört haftalık fidelere (525, 1050, 2100, 4200 ve 8400 g/Ha; önerilen saha uygulama oranı (RFAR) = 2100) g/Ha) glifosat konsantrasyonları uygulanmış ve yanıt değişkenleri (fitotoksosite, büyüme oranları ve herbisite duyarlılık) ölçülmüştür. Bu herbisit konsantrasyonları, tarım alanına uygulanan glifosat oranlarını ve aşırı püskürtme yoluyla ormanlık alandaki bitki örtüsüne ulaşabilen dozları kapsamaktadır. Bu uygulamada %25 RFAR'ın çimlenme sonrası sprey olarak uygulanmasından sonra tüm türler öldürücü veya öldürücü olmayan etkiler göstermiştir. RFAR'ın %25'inin uygulanmasını müteakiben türlerin %70'inde büyümenin azaldığı ve türlerin %50'sinde ciddi fitotoksosite veya ölümün gerçekleştiği görülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre, incelenen türlerden bazılarının glifosata karşı çok hassas olduğu diğer türlerin ise herbisite toleranslı olarak sınıflandırılabilceği bir glifosata duyarlılık gösterdiği belirlenmiştir. Bu nedenle, orman alanlarında bulunan bitki örtüsü glifosat uygulamasından ağır bir şekilde etkilenebilmektedir. Glifosatın hedef olmayan bitkiler üzerindeki öldürücü ve öldürücü olmayan etkileri hem biyoçeşitlilik kaybına neden olmakta hem de bazı biyotiplerin sürekli olarak düşük dozlarda glifosata maruz kalmasından dolayı yeni yabancı otların gelişimini teşvik edebileceği öngörülmektedir (Florescia *et al.* 2017).

Herbisitlerin bitkiler üzerindeki olumsuz etkilerini sınırlandırmak veya antagonistik etki oluşturmak için bitki büyüme düzenleyicileri kullanılmaya başlanmıştır. Bitki büyüme düzenleyicilerinden biri olan Triakontanolun (TRIA) bitkiler üzerindeki olumlu etkileri ilk kez 1977 yılında ortaya konulmuştur. Yapılan araştırmalarda, TRIA içeren spreyler tarlada mısır ve arpanın büyümesini artırdığı ve doku kültürlerinde yetiştirilen pirinçte de benzer yanıtların oluştuğu belirtilmiştir (Ries *et al.* 1977). Daha sonra yoncadan ekstrakte edildikten sonra bitkilere tatbik edilen TRIA'nın büyüme düzenleyici fonksiyonlara sahip olduğu sonucuna varılmıştır. Keşfedildiği andan günümüze kadar TRIA'ya ilgi büyük ölçüde artmış ve yapılan pek çok araştırmada bitkilerin büyümesini, verimini (Asane *et al.* 1998; Barua,

1998), klorofil içeriğini ve fotosentez aktivitesini olumlu yönde etkilediği kanıtlanmıştır (Moorthy and Kathiresan, 1993; Ivanow, 1997; Blamowski *et al.* 1998). Domateste yapılan çalışmada köklere uygulanan TRIA'nın meyve verimini artırdığını göstermiştir. Bunun aksine, yapılan uygulamanın bitkinin asimilasyon yüzeyine önemli bir etki gerçekleştirmemiştir. Bu durum, çoğunlukla TRIA'nın yaprak yüzeyinde birim başına fotosentez verimliliğini artırdığını düşündürmüştür (Borowski, 1992). TRIA'nın bu etkisinin, yaprak stoma transpirasyonu, karboksilaz RuBP aktivitesi veya birincil fotokimyasal reaksiyonların aktivitesi üzerindeki etkisinden kaynaklanabildiği ileri sürülmüştür (Borowski *et al.* 2000). Dahası, endojen bir bitki büyüme düzenleyicisi olan TRIA, stres tolerans mekanizmalarının aktivasyonunu modüle ederek, tahıl bitkilerinde stres tarafından oluşturulan değişiklikleri hafifletmede önemli roller oynadığı rapor edilmiştir. Yapılan çalışmalarda, TRIA'nın hücrelerin fizyolojik etkinliğini artırmasından dolayı bitkinin genetik potansiyelini de büyük ölçüde etkilediği düşünülmüştür. Dahası, TRIA'nın çok kısa sürelerde bitkinin metabolizmasını etkilediği rapor edilmiştir. Pirinç (*Oryza sativa L.*) ve mısır (*Zea mays L.*) bitkilerine TRIA uygulanmasından 5 dakika sonra serbest amino asitlerin, indirgeyici şekerlerin ve çözünür proteinlerin arttığı görülmüştür (Ries, 1991). Yine, nanomolar konsantrasyonlarda sürgünlere uygulanan TRIA bitkilerin köklerinde bir dakika içinde L(+)-adenosin oranını artırdığı ortaya çıkarmıştır (Ries and Wert, 1988).

Birincil alkoller olan TRIA ve oktakosanol (OCTA) bitkilerde çoğunlukla bulunmaktadır. Pirinç (*Oryza sativa L.*) fidelerine eşit konsantrasyonlarda OCTA ve TRIA uygulanmıştır. Bunun sonucunda, TRIA'nın OCTA aktivitesini inhibe ettiği ve hem TRIA hem de OCTA'nın sırasıyla ikinci haberci molekülüleri olarak bilinen OCTAM ve TRIM'in oluştuğu ortaya konulmuştur. Kuru madde üretiminde TRIA'nın neden olduğu artış, birincil ve ikincil metabolizma arasındaki ilişkiyi etkileyerek ikincil ürün biyosentezinin artmasına yol açabilir. Bununla birlikte, abiyotik strese maruz kalan tıbbi ve aromatik bitkilerle ilgili olarak TRIA'nın bitki büyüme regülasyonu, fizyolojik aktiviteler ve ikincil metabolit biyosentezi üzerindeki rollerini aydınlatmak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmuştur. Bu inceleme, TRIA'nın bitkilerin büyümesi ve gelişmesindeki esas fonksiyonu, etki tarzı ve tarımsal ürünlerin mahsül verimliliği ile kalitelerini iyileştirmedeki önemini değerlendirmeyi amaçlamıştır (Naeem *et al.* 2012).

Sitinjak and Pandiangan (2015), tarafından yapılan bir çalışmada uygulanan TRIA'nın 14 haftalık kakao fidelerinde; fide uzunluğu, yaprak uzunluğu, yaprak sayısı ve gövde çapı dahil olmak üzere büyüme faktörlerini önemli ölçüde etkilediği belirtilmiştir. Büyüme düzenleyici maddelerin kakao bitkisinin büyümesini ve gelişmesini uyarabildiğini veya

baskılayabildiğini ortaya koymuştur. TRIA tarafından yapraklardaki fotosentez aktivite sürecini arttırmasına bağlı olarak kakao fidelerinin kökleri, sürgünleri, gövdeleri ve yapraklarındaki büyüme ile çok yakından bağlantılı olduğunu ortaya koymuştur. Bu çalışma aynı zamanda 1 ml/L konsantrasyonda TRIA verilen kakao fidelerinde, kontrol grubuna göre en yüksek fide boyunun (kontrolden %26.21) ve yaprak uzunluğunun (kontrolden %42.28) elde edildiğini göstermektedir. Daha yüksek bir konsantrasyonda (2 ml/L) ise fidelerin büyümesini (fide yüksekliği, yaprak uzunluğu, yaprak sayısı ve gövde çapı) engelleyebileceği ve hatta kakao fidelerinin ölmesine neden olabileceği belirtilmiştir. Ayrıca, TRIA'nın optimum konsantrasyonu (1 ml/L), kakao tohumlarının dokusundaki hücrelerin duyarlılığını arttırmak için 2 ml/L TRIA dozunun gerekli olduğunu ve kakao fidelerinin yaprak hücrelerinde meydana gelen fotosentez sürecini kontrol eden enzimlerin aktivitesini daha etkili bir şekilde arttırabilmesi ihtimali üzerinde durulmuştur. Ayrıca TRIA'nın optimum konsantrasyon uygulaması, hücrelerdeki sinyal yollarını etkili bir şekilde uyaracak ve böylece hücre bölünmesi ve hücre uzaması gibi koordineli bir şekilde çalışan endojen ve eksojen hormon oranını dengeleyerek fide yüksekliği, gövde çapı, yaprak sayısı ve yaprak genişliğinin maksimum büyümesini sağlayacaktır (Sitinjak and Pandiangan, 2015).

TRIA'nın, birçok Tarım ve bahçe bitkilerinin birçoğunda TRIA güçlü bir bitki büyüme teşvik edici madde olduğu bilinmektedir. İçerisinde toprak bulunan saksılarda yetiştirilen fasulye bitkilerine beş farklı konsantrasyonda (0 (Kontrol), 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} ve 10^{-5} M) 15 günlük periyotlarla TRIA sprey olarak uygulanmıştır. Bitkilerin taze ve kuru ağırlıkları, yaprak alanı, bitki başına nodül sayısı, toplam klorofil ve karotenoid mevcudiyeti, nitrat redüktaz aktivitesi, karbonik anhidraz aktivitesi, nodül-azot içeriği, leghemoglobin içeriği ve yaprak N, P, K ve Ca içerikleri ekim faaliyeti sonrası 60, 90 ve 120 gün aralıklarla analiz edilmiştir. Net fotosentetik hız, terleme hızı ve stoma iletkenliği sadece 90. günde ölçülmüştür. Tohumlarda da protein mevcudiyetine ek olarak karbonhidrat ve tirozinaz aktivitesi analiz edilmiştir. 10^{-6} M TRIA dozunda çalışılan özelliklerin çoğunu büyük oranda uyardığı özellikle tohum verimini ve protein içeriğini %56.3 ve %14.5 artırdığı tespit edilmiştir. En yüksek konsantrasyonda ise (10^{-5} M TRIA), tüm karakteristiklerin değerlerinin önemli ölçüde azaldığı kaydedilmiştir (Naeem *et al.* 2009).

Uzun yıllardır kullanılan herbisitlerin tarım arazilerinde hedef olmayan bitkiler ve toprak kalitesinde önemli olumsuzluklara neden olduğu görülmektedir. Özellikle hedef olmayan bitkilerde antioksidan sistem üzerine pek çok etkileri olduğu görülmüştür. Bu olumsuzlukların bitki büyüme düzenleyicilerinden biri olan TRIA ile antagonistik etki oluşturulabilceği veya bertaraf edilebileceği düşünülmüştür. Bundan dolayı, zirai mücadelede

uzun yıllardır kullanılan ve geniş tarım arazilerine uygulanan Glifosat herbisitinin antioksidan sistem üzerindeki etkilerine karşı TRIA'nın rollerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda çalışmamızda antioksidan enzimlerden olan Süperoksit dismutaz (SOD), Peroksidaz (POD), Lipit Peroksidasyon (LPO) ve Katalaz (CAT) ile oksidatif stres biyomarkırı olan Hidrojen peroksit (H_2O_2) miktarları belirlenecektir. Ayrıca abiyotik streslerle indüklenen ve antioksidan sistemdeki rollerini araştırmak için 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase (EPSPS), Absisik Asit Stress Ripening (ASR1) ve Oxygen-evolving enhancer protein-1 (OEE1) genlerinin ekspresyon seviyelerindeki değişimler gözlemlenecektir.



KURAMSAL TEMELLER

Herbisitler

Yabani otların kontrolü için herbisitlerin kabul görmesi 1950'lerde ve 1960'larda başlanmıştır. Herbisitler, milyonlarca işçinin yabani otları elle koparması ve çapalamasının yerini almış ve yabani ot kontrolü için toprak işleme kullanımını büyük ölçüde azaltmıştır. Herbisit kullanımı elle ayıklama ve ekimden daha etkili ve daha ucuz olduğu için üretim maliyetleri azalmış ve tahıl verimi artmıştır. Organik tahıl yetiştiricileri, kimyasal herbisitlerin kullanılmasına izin verilmediğinden, tahıl üretimindeki en büyük zorluklarının yabancı ot kontrolü olduğunu belirtmektedirler (Gianessi, 2007).

Çiftçiler yabani otlarla baş edebilmek için pek çok metod kullanmaktadır. Ayrıca, yetiştirilen tahılların biyolojisinin değiştirilmeden insan sağlığı açısından güvenli ve çevreye zararının olmadığı düşünülen herbisitlerin toksik olmayan konsantrasyonlarının uygulanmasıyla herbisite dayanıklı mahsuller yetiştirme olanağına da sahiptir (Kudsk and Streibig, 2003).

1951 yılında, tek yıllık ve çok yıllık otları kontrol edebilmek için kullanılan monuronun herbisidal fonksiyonları keşfedilmiştir. Bunun sonucunda çok sayıda üre bileşiğinin seçici özellikleri belirlenmek üzere laboratuvarlardan seralara gönderilmiştir (Geissbühler *et al.* 1975). 1952 yılında S-triazinler'in istenmeyen otları kontrol yetenekleri keşfedilmiş ve 1955 yılında bu bileşiklerin seçici özellikleri ilk defa rapor edilmiştir (Esser *et al.* 1975). Bu keşfedilen herbisitlerin en önemli özelliği Fotosistem II'nin inhibitörleri olmalarıdır. 1970'lerde çok farklı tahıllarda seçici herbisitlerin kullanılması ile ilgili olan taleplerin artmasından dolayı endüstri bu ürünleri başarılı bir şekilde geliştirmeye başlamıştır (Cobb and Kirkwood, 2000).

Takip eden yıllar içerisinde, bipiridilyum adı verilen yeni bir herbisit grubu keşfedilmiştir. Fotosistem I üzerine tesiri olan bu grupta diquat ve paraquat yer almaktadır (Calderbank and Slade, 1976). Başlangıç aşamalarında, bu kimyasalların yeşil dokuya hızlı bir şekilde zarar vermeleri, seçici olmamaları ve geri dönüşümsüz olarak toprak tarafından emilmeleri sebebiyle bu bileşiklerin özelliklerinin hiç de umulduğu gibi olmadığı düşünülüyordu. Bu nedenle, gelecekteki kullanımlarının kesinlikle sınırlı olduğu fikri hâkimdi. Lakin seçici olmayan yabani ot kontrolü bağlamında ki bu özelliklerinin mükemmel

olduğu ortaya çıktı. Zamanımıza gelindiğinde ise paraquat dünyada en çok satılan ikinci herbisit olmuştur (Graham, 2001).

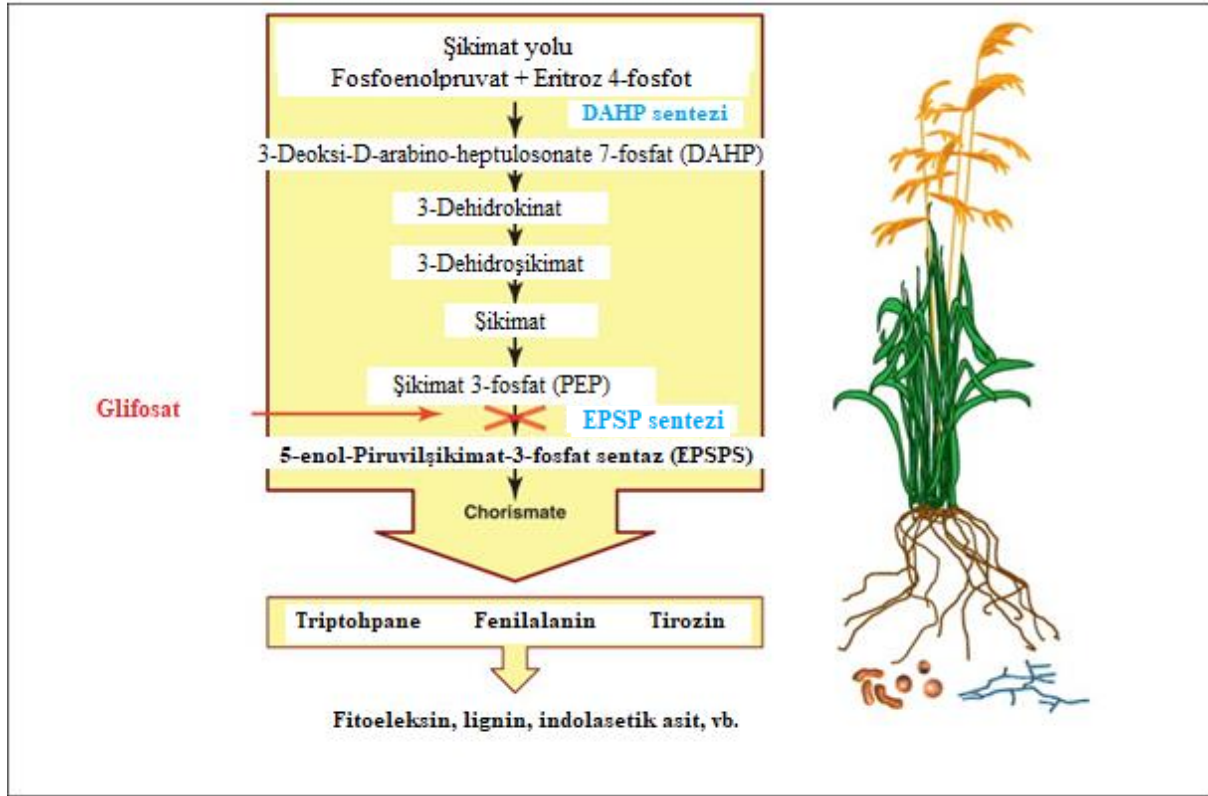
Geniş yapraklı yabancı otları kontrol etmek için uygun olan herbisitlere bağımlılık hali, tahıl ekinlerinin artan ekimi ile birleştiğinde çimen gibi yabancı ot florasında kontrol edilmesi zor türlere doğru bir kayma ile sonuçlanmıştır (Andreasen *et al.* 1996). Buna bağlı olarak otları kontrol edebilen herbisitlerin geliştirilmesine yönelik eğilimi değiştirmiş ve ariloksifenoksipropionatlar ve sikloheksandionlar geliştirilmesine yol açmıştır. Bu herbisitlerin en önemli özelliği asetil-CoA karboksilaz enzimini etkileyerek geniş bir spektrumun seçici kontrolünün mümkün olmasını sağlamıştır (Cobb and Kirkwood, 2000).

Glifosat (N-(fosfonometil)glisin)

İkinci Dünya Savaşı'ndan sonra, dünyanın gıda kıtlığını aşmak amacıyla çeşitli herbisitler formüle etmişlerdir. 2,4-diklorofenoksiasetik asit (Bus and Hammond, 2007) ve 2,4,5-triklorofenoksiasetik asit gibi çeşitli sentetik herbisitler, çiftliklerde, bahçelerde ve bahçecilik alanlarındaki yabancı otları kontrol etmek için kullanılmıştır. Paraquattan farklı olarak toksikolojik profili çok daha uygun olan ve seçici olmayan glifosat keşfedilmiştir (Graham, 2001). Glifosat molekülünün öncü sentezleyicisinin İsviçreli bir ilaç firmasından (Cilag) Henri Martin olduğu ve daha sonrasında glifosatın herbisidal aktivitesi Monsanto şirketinde çalışan John E. Franz adlı bir kimyager tarafından gerçekleştirildiği bilinmektedir (Duke and Powles, 2008). Herbisitlerin keşfinden bu yana geçen onlarca yıl zarfında glifosat hala en çok ve yaygın bir şekilde kullanılan herbisittir olma özelliğini korumaktadır. Son yıllarda glifosata dirençli genetiği değiştirilmiş tahılların yaygın olarak ekimi ile de glifosatın dünya çapında kullanımı çok daha fazla genişlemiştir (Helander *et al.* 2012). Dahası, glifosatın ticari formülasyonu olan Roundup'un uygun fiyatı nedeniyle dünyanın en çok satan herbisiti olmuştur (Duke and Powles, 2008)

Glifosatın herbisidal aktivitesini, şikimat metabolik yolağının bir enzimini inaktive etmesiyle sağlamaktadır (Şekil 1). Glifosatın etki mekanizması, şikimat yolağının 5-enolpiruvil-şikimat-3-fosfat sentaz (EPSPS) enziminin inhibisyonunda yüksek miktarda etkili olduğu bilinen ve bu özelliğinden dolayı yegâne herbisittir. Glifosat, EPSPS için substratlardan biri olan fosfoenilpiruvatın bir geçiş durumu analogudur. EPSPS'nin inhibisyonu, yolağın geri besleme inhibisyonunun azalmasına yol açmaktadır. Bu durum yüksek seviyelerde şikimatın dönüştürüldüğü şikimate-3-fosfata büyük miktarda karbon akışına neden olmaktadır. H.C. Steinrücken ve N. Amrhein'in çalışmaları, glifosat uygulanmış bitki dokularında şikimat seviyelerinin hızla artışı sonucunda, glifosatın

moleküler hedef bölgesi olan EPSPS'yi keşfetmesine olanak sağlayan anahtar olmuştur (Steinrücken, and Amrhein, 1980).



Şekil 1. Glifosat, şikimat asit yolunda 5-enolpiruvilşikimat-3-fosfat sentazı (EPSPS) inhibe ederek, öncül olarak triptofan, fenilalanin veya tirozin gerektiren proteinlerin ve diğer moleküllerin üretimine müdahale eder. Büyümeyi destekleyen (IAA gibi) veya savunma metabolitleri (Tanenler, antosiyaninler, flavonoidler ve lignin gibi) işlevi olupta engellenen moleküllerden bazılarıdır (Tuffi Santos *et al.* 2011)

Glifosat, neredeyse tüm otsu bitkileri seçici olmayan ve verimli bir şekilde öldürmektedir. Ancak, glifosatın toprak parçacıkları tarafından kuvvetli emilme ve hızlı mikrobiyal bozunma yoluyla toprakta kısa sürede etkisiz hale geldiği rapor edilmiştir (Giesy *et al.* 2000; Busse *et al.* 2001; Vereecken, 2005). Böylece, glifosatın hedef olmayan organizmalar için güvenli olduğu ilan edilmiştir (Franz *et al.* 1997; Duke and Powles, 2008). Dahası, hayvanlarda şikimat yolağı oluşmadığı için hayvanlara ve insanlara zararsız olarak kabul edilmiştir (Duke and Powles, 2008). Glifosatın ideal bir şekilde kullanımı tarımda kazanç oranını artırmakta ve çevreye daha zararlı olan herbisitlerin kullanımını azaltmaktadır. Glifosatın bu özellikleri birçok alanda onu rakipsiz bir herbisit haline getirmektedir (Woodburn, 2000; Benachour *et al.* 2007; Laitinen *et al.* 2009).

Glifosata dirençli buğdaylarda *Sp. tritici* ve *Puccinia triticina*'nın sebep olduğu şerit ve yaprak pasları üzerine araştırma yapılmıştır. Yapılan çalışmada, glifosat uygulanan örneklerin yapraklarında pas hastalığının oluşmadığı görülmüştür. Dahası, kontrole karşı

direnç geninin karşılaştırılması sonucunda direnç geninin glifosat uygulanan dokularda indüklendiği belirlenmiştir. Böylece, *Puccinia striiformis*'e karşı glifosatın hem önleyici hem de iyileştirici etkilere sahip olduğu belirlenmiştir (Feng *et al.* 2005).

Glifosatın diğer herbisitlere göre daha güvenli olması ana bitkilere zarar vermediği anlamına gelmemektedir. Glifosatın bilhassa suda yüksek çözünürlüğe sahip olması yüksek yayılabilme ve hızlı bir şekilde toprağa sızma potansiyeli olduğunu göstermektedir. Bu durum yeraltı sularının kirlenmesi ve hedef olmayan bitkilerin dokularında birikmesine yol açmaktadır. Böylece, ürün veriminde azalma, tarım ürünlerinin kalitesinde düşme ve toprak verimliliğinin bozulması gibi durumların meydana gelmesi ile sonuçlanmaktadır (Singh *et al.* 2020).

Bununla birlikte, nispeten basit, geniş spektrumlu, sistemik herbisit, besin verimliliği ve hastalık şiddeti üzerinde arzulanmayan fonksiyonlara sahip olabileceği ve dolayısıyla tarımsal devamlılığını tehdit edebileceği öngörüsü oluşmuş durumdadır. Glifosat geniş çapta yayılması neticesinde hastalık şiddetinde önemli bir artış görülmüş ve bitki savunmalarının doğrudan glifosatın sebep olduğu zayıflamadan dolayı patojen miktarında ve virülansında artışa neden olabileceği düşünülmektedir. Glifosatın bitkilerin hastalığa olan yatkınlık üzerindeki dolaylı etkileri, hastalığa karşı direnç noktasında spesifik mikro besinlerin hareketsizleştirilmesi ve bitkinin meristematik kök, sürgün ve üreme dokularında birikmesi ile birlikte büyümenin ve canlılığın azalmasına sebep olmaktadır (Johal and Huber, 2009).

Tablo 1. Glifosat Yabancı Ot Kontrol Programları Neticesinde, Bitkilerde Artan Bazı Hastalıklar (Johal and Huber, 2009)

Bitki	Hastalık	Patojen	Referanslar
Elma	Kanser	<i>Dotryosphaeria dothidea</i>	Rosenberger and Fargione, (2004)
Muz	Panama hastalığı	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>kubik</i>	Harper, (2007)
Arpa	Kök çürüklüğü	<i>magnaporthe grisea</i>	Smiley et al. (1992)
Fasulye	Antraknoz	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	Johal and Rahe, (1984), Johal and Rahe, (1988), Johal and Rahe, (1990)
Fasulye	Sönümleme, kök çürümesi	<i>Pythium</i> spp.	Johal and Rahe, (1984)
Fasulye	Kök çürüklüğü	<i>Fusarium solani</i> t. sp. <i>evreli</i>	Harper, (2007)
Fasulye	Hipokotil çürüklüğü	<i>fitofthora megasperma</i>	Keen et al. (1982)
Kanola	Taç çürüğü	<i>Fusarium</i> spp.	Harper, (2007)
Kanola	Solgunluk	<i>Fusarium oxysporum</i>	Harper, (2007), Large and McLaren, (2002)
Narenciye	Narenciye alacalı kloroz	<i>Xylella fastidiosa</i>	Yamada, (2006)
Narenciye	Taç çürüğü	<i>Phytophthora</i> spp.	Yamada, (2006)
Pamuk	Sönümleme	<i>Pythium</i> spp.	Harper, (2007)
Pamuk	Toplu top	Manganez eksikliği	Harper, (2007)
Pamuk	Solgunluk	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>	Harper, (2007)
Üzüm	Siyah yapışkan	<i>Phaeomonilia chlamydospora</i>	Harper, (2007)
Kavun	Kök çürüklüğü	<i>Monosporascus top güllesi</i>	
Soya fasulyesi	Kök çürüklüğü	<i>Corynespora cassicola</i>	Huber et al. (2005)
Soya fasulyesi	Sedef nokta	<i>Corynespora cassicola</i>	Huber et al. (2005)
Soya fasulyesi	Ani Ölüm Sendromu	<i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>glisinler</i>	Keen et al. (1982)
Soya fasulyesi	Kök çürüklüğü	<i>fitofthora megasperma</i>	Keen et al. (1982)
Soya fasulyesi	Kist nematodu	<i>heterodera glisinler</i>	Geisler et al. (2002), Kremer et al. (2000)
Soya fasulyesi	Deyaz küf	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Harper, (2007)
Şekerpancarı	Sarılar	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>beta</i>	Larson et al. (2006)
Şekerpancarı	Kök çürüklüğü	<i>Rhizoctonia solani</i>	Larson et al. (2006)
Domates	Taç kök çürüklüğü	<i>Fusarium</i>	Bramhall and Higgins, (1988)
Domates	Solgunluk	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>pisi</i>	Harper, (2007)
Çeşitli	Kanser	<i>Phytophthora</i> spp.	Harper, (2007)
Yabani otlar	Diyo kontrol	<i>Myrothecium verrucaria</i>	Doyette et al. (2006)
Buğday	Çıplak yama	<i>Rhizoctonia solani</i>	Harper, (2007)
Buğday	Yapışkan leke	<i>Septoria</i> spp.	Harper, (2007)
Buğday	Kök çürüklüğü	<i>Fusarium</i> spp.	Fernandez et al. (2005), Fernandez et al. (2007), Harper, (2007)
Buğday	Kafa kabuğu	<i>fusarium graminearum</i>	Fernandez et al. (2005)
Buğday	Hepsini al	<i>Gaeumannomyces graminis</i>	Hornby et al. (1998)

Fe ve Mn ile glifosat çok kararlı ve çözünürlüğü düşük tuzlar meydana getirir. Bu da özellikle glifosatın biriktiği sürgünlerin en genç kısımlarında meydana geliyor olması Fe ve Mn'nin fizyolojik inaktivasyonuna neden olabilir (Schulz *et al.* 1990). Minnesota'da yapılan saha gözlemleri sonucunda, Fe içeriği düşük topraklarda yetişen soya fasulyesi bitkilerinin glifosat muamelesi klorozunu teşvik ederek bu sonucu desteklemiştir (Franzen *et al.* 2003; Jolley *et al.* 2004). Son raporlar, glifosat uygulanmış soya fasulyesi ve acı bakla bitkilerinin nodüllerinde nitrat redüktaz ve nitrojenaz aktivitesinde gözle görülebilir bir azalmaya sebebiyet verdiğini ortaya koymuştur. (Bellaloui *et al.* 2006; de María *et al.* 2006). Bulaşıcı organizmalara yatkın biyolojiye sahip bitkilerde glifosatın yabancı ot kontrol edebilmedeki güçlendirilmiş etkisi birçok hastalık için gözlenmiştir (Tablo 1). Glifosatın tarım alanlarında yaygın kullanımı, etkili bir şekilde yönetildiği düşünülen birçok hastalığın şiddetinin veya “yeniden ortaya çıkmasının” artışında mühim bir etkidir.

Ayçiçeği bitkilerinde Fe ve Mn'nin alımı, taşınması ve birikmesinde glifosatın antagonistik etkisi olduğunu açıkça göstermektedir. Çözünürlüğü düşük olan glifosat-metal komplekslerinin oluşmasına bağlı glifosat ve katyonik mikro besinler arasındaki antagonizmanın en önemli etkenidir. Glifosatın yoğun olarak uygulandığı tarımsal organizasyonlarda ekimi yapılan bitkilerin glifosat ile kontaminasyonu çoğunlukla glifosat spreyinin sürüklenmesi ve glifosat kalıntılarının kökler tarafından topraktan alınması sonucu meydana gelmektedir (Cornish and Burgin, 2005).

Çakmak ve arkadaşları yaptığı çalışmada, glifosat uygulaması sonucunda tohum üretiminde meydana gelen azalma sürgün biyokütle üretiminde gerçekleşen azalmadan çok daha büyük olduğu görülmüştür. Önerilen dozun %0'dan %1.2'sine glifosat uygulaması arttırıldığında sürgün biyokütle üretimini yaklaşık 3 kat azalırken tohum üretimi durumunda bu azalma 8.8 kat olarak bildirilmiştir (Geiger *et al.* 1999).

Glifosat uygulanan bitkilerde Ca inaktivasyonu üreme organları başta olmak üzere bitkilerin büyüyen kısımlarının glifosata karşı duyarlılığından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Ca yoğunluğunun yüksek olduğu durumlarda, glifosatın yabancı otları öldürme etkisi kısıtlanmaktadır (Thelen *et al.* 1995; Schoenherr and Schreiber, 2004; Gauvrit *et al.* 2001). Çözünmeyen ya da az çözünen Ca-glifosat komplekslerinin veya çökelmelerinin meydana gelmesi Ca antagonizmasının sebebinini olarak bildirilmiştir (Sundaram and Sundaram, 1997; Schoenherr and Schreiber, 2004). Glifosata karşı toleransı yüksek olan kadife yapraklı bitkilerde ise yaprak dokusundaki yüksek Ca yoğunluğu ile ilgili olduğu değerlendirilmiştir (Nalewaja *et al.* 1992). Sürgünlerdeki meristematik dokularda olduğu gibi

Ca'un hücre duvarı stabilizasyonunu ve hücre uzamasını etkileyen kritik bir görevi bulunmaktadır (Marschner, 1995). Terleme oranındaki azalma durumlarına bağlı olarak sürgün uçları, Ca yoğunluğunda ki küçük değişikliklere karşı oldukça hassastır. Yapılan bir çalışmada, artan glifosat konsantrasyonlarının hem yapraklarda hem de tohumlarda köklerden sürgüne ve tohuma doğru Ca iletimini bloke ederek Ca yoğunluğunu önemli ölçüde düşürmüştür (Duke *et al.* 1983). Soya fasulyesi bitkisi ile yapılan çalışma bu bilgileri desteklemiştir (Cakmak *et al.* 2009).

Buna ilaveten, Mg'un glifosata bağlamak suretiyle çözünmeyen Mg-glifosat kompleksleri oluşturma afinitesine bağlı olarak bitki dokularında veya sprey solüsyonlarında hem glifosatin hem de Mg inaktivasyonuna sebebiyet vermektedir (Subramaniam and Hoggard, 1988; Thelen *et al.* 1995; Mueller *et al.* 2006). Bu nedenle, glifosat tarafından tohumlardaki ve kısmen yapraklardaki Mg konsantrasyonlarındaki azalma, bitki dokusu içinde Mg'un sınırlı taşınması anlamına gelebilir. Nalewaja ve Matysiak, püskürtme çözeltisindeki Mg yoğunluğunun yüksek olması sonucunda buğdaydaki glifosat kaynaklı tahribatın azaldığını ortaya koymuşlardır (Nalewaja and Matysiak, 1991). *Abutilon theophrasti* gibi bazı geniş yapraklı yabancı otların glifosata karşı toleransının yüksek olması yaprak yüzeyinde veya bitki içinde hem Mg hem de Ca'nın konsantrasyonunun fazlalığı ile alakalı olabileceği rapor edilmiştir (Hall *et al.* 2000).

Yakın zamanda yapılan çalışmalar göstermiştir ki Fe ve Mn alımını sağlayan mekanizmalar glifosata karşı duyarlıdır. Glifosat muamelesi yapılan yapraklarda, dikotil ve odunsu türler tarafından Fe alımı için gerekli olan zorunlu bir enzim olan ferrik redüktazın aktivitesini ciddi şekilde bozduğu gösterilmiştir (Öztürk *et al.* 2008; Marschner and Roemheld, 1994). Fe ve Mn'nin kökler tarafından alınması ve köklerden sürgünlere iletilmesi üzerindeki inhibitör rollerine ilaveten, glifosat ayrıca Fe ve Mn'nin floem yüklenmesine ve floem taşınmasına müdahale edebilmektedir (Cakmak *et al.* 2009). Glifosat uygulamaları nedeniyle Fe, Mn, Ca ve Mg'nin tohum konsantrasyonunda ki azalma tohum kalitesi yönünden endişeleri artırmaktadır. Tohumlardaki mineral besin maddelerinin miktarı, özellikle olumsuz toprak koşullarında, tohumların canlılığı, fide canlılığı ve oluşumunda önemli bir role sahiptir (Welch, 1999). Tahıl olgunlaşmasını teşvik edebilmek amacıyla hasat öncesi glifosat uygulaması yaygın bir teknik olarak kullanılmaktadır. Lakin bu yöntemin kullanımı neticesinde, zayıf tohum çimlenmesi ve azalan fide gücü gibi sonuçlar doğurabilmektedir (Bennett and Shaw, 2000; Baig *et al.* 2003).

Brassica türleri ile ilgili yapılan bir çalışmada; herbisit sürüklenmesinin, dirençli türlerin fenolojisini farklılaştırmadan hassas türlerin çiçeklenme fenolojisini değiştirerek bir

topluluktaki bitkilerin uygunluğunu ve göreceli rekabet edebilme kabiliyetini etkileyebileceği önerisi gündeme getirilmiştir. Velhasıl, yabancı mahsul ve yabancı otların eşeysel bakımdan uyumlu türlerinin çiçeklenme fenolojisinin değişimi, gen akışının artmasına, önceden uyumu bozulmuş bitkiler arasında melezlenmeye veya önceden ayarlanmış bitkiler arasındaki hibridizasyonun azalmasına etkisinin olabileceği düşünülmüştür (Londo, 2011a). Bu çalışmada, transgenik ve transgenik olmayan Brassica türlerinden oluşan bitki topluluklarında, saha uygulama seviyelerinin %10'u oranında herbisit glifosatın simüle edilmiş sürüklenmesinin etkisi değerlendirilmiştir. Glifosat uygulanan bitkilerdeki gözlemler neticesinde, hassas bitkilerin çiçeklenme süresinde bir değişikliğin oluşmasına neden olan gelişimsel gecikmeye sebebiyet verdiği ortaya konmuştur. Büyük ihtimalle, ölüme sebebiyet vermeyecek kadar bir glifosat dozu, bitkinin gelişimini ölüme sebebiyet vermeden bozmak için yeterlidir. Bu deneylerdeki belirli Brassica çeşitleri arasındaki gen akışı, glifosat sürüklenmesinin nihai bir sonucu olarak büyük oranda artmıştır. (Londo, 2011b).

Saha ve mezokozm testleri sonucunda, ölüme sebebiyet vermeyecek kadar herbisitlere maruz kalmanın neticesi göstermiştir ki; hedef bitkilere uygulanan herbisitlerin, hedef olmayan bitkilere doğru akışı hem yerli türlerin hem de yabancı otların doğurganlığını ve biyokütlesini indirgeyerek bitki topluluğunu etkileyebileceğini ortaya koymaktadır (Marshall, 2001; Pflieger *et al.* 2012). Ölümcül olmayan glifosata maruz kalan bitkiler, çiçeklenme süresinde değişken gecikmelerin olduğunu göstermiştir. Erkek üreme kabiliyeti, dişi üreme kabiliyetine göre glifosat maruziyetine çok daha duyarlı olduğu, bu ve benzeri sonuçlar, ölümcül olmayan glifosatın, glifosata duyarlı bitki popülasyonlarında çiçeklenme süresini değiştirme potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir. Yabancı ve otsu bitkilerde fenolojideki bu değişiklikler, dirençli ve hassas bitkiler arasındaki gen akışı modellerindeki farklılıklara katkıda bulunabilir, öyle ki direnç alelleri tek yönlü bir biçimde dirençli bitkilerden fonksiyonel bir şekilde çaprazlama yapan hassas bitkilere geçebilir. Bitkilerin çiçeklenme fenolojisi ve üreme stratejisindeki farklılaşmalar, özellikle yabancı ve geleneksel ekinlerde ya da eşey bakımından birbiriyle uyumlu yabancı otlarda, transgen sınırlaması ve yönetimi için önemli etkilere sahip olabilir (Londo, 2014).

Yapılan bir çalışma sterilize edilmemiş tarla toprağına diquat + paraquat, glifosat ve trifluralin uygulanması yapılmıştır. Buna göre, patojenin saprofitik büyüme üzerinde herhangi bir tesiri olmamıştır. Dahası, diquat + paraquat ve glifosat'ın steril olmayan toprağına uygulanmasının aktinomisetler üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığını göstermiştir. Bununla birlikte, diquat + paraquat tedavisi mantar sayısını arttırırken, glifosat bakteri sayısını azaltmıştır. Glifosat uygulanmış toprakta patojene karşı antagonistik etkisi olan

toprak mantarlarının oranı azalmıştır. *Eupenicillium euglaucum* (v. Beyma) Stolk & Samson (suşu B) ve *Penicillium verruculosum*'un görülme sıklığı Peyr. Agar üzerinde Ggt'nin güçlü ve düşük seviyeli antagonistleri olan (suşu B), glifosat muamelesini takiben toprakta oluşumları sırasıyla %7.7 ve %2.5 oranında azalmıştır. Ayrıca patojene orta derecede antagonizma sergileyen *Aspergillus viridinutans* Ducker & Thrower'ın sayısı diquat + paraquat ve glifosat tedavilerinde sırasıyla %1.9 ve %4.1 oranında azalma göstermiştir. Toplam mantar sayısından ziyade antagonistlerin oranı, araştırmada *G. graminis* var. *tritici*'nin toprak büyümesi ve patojenitesi üzerinde gözlemlenen tedavi edici etkisinin olabileceğini düşündürmüştür. Herbisit uygulanmış bazı topraklarda buğday hastalığındaki artış, toprak mikrobiyal popülasyonlarının patojene karşı antagonistik etkisi olan popülasyonların yok olmasına bağlı olabileceği kanaatini oluşturmuştur (Mekwatanakarn and Sivasithamparam, 1987).

Bitki büyüme düzenleyicileri (BBD)

Bitki büyüme düzenleyicileri ya da hormonları, bitkinin tamamının ya da belirli bir bölümünün büyümesini farklılaştırmak amacı ile kullanılan doğal veya sentetik ürünlerdir. Hormonlar, bitkiler tarafından doğal olarak üretilen, kök büyümesi, meyve tutumu ve düşmesi, büyüme ve diğer gelişme süreçleri gibi sıradan bitkisel durumları kontrol eden maddelerdir. Amerika Birleşik Devletleri'nde BBD'lerin tarımsal üretimde kullanılmaya başlanması 1930'lara kadar gitmektedir. BBD'lerin ilk keşfi ve kullanımı, ananasın çiçek üretimini artıran asetilen ve etilen ile olmuştur. Daha sonra, bitki büyüme düzenleyicilerinin kullanımı çok hızlı bir şekilde artarak tarımsal emtia üretiminin önemli bir bileşeni haline gelmiştir. Gerçek BBD fonksiyonu olmayan bazı herbisitler ve böcek ilaçları, bazı bitkilerin büyümesini düzenleyici etkilere neden olmaktadır. Bunlardan birisi, yaygın olarak kullanılan insektisit karbaril, elma meyvesini ağaçlardan seyreltmek ve yıllık verimi teşvik etmeye yardımcı olmak için kullanılır (Fishel, 2006).

Doğal olarak oluşmasının yanı sıra sentetik olarak da mevcut olan BBD'ler, yalnızca yetiştiricilerin üretim problemlerini çözmelerine yardımcı olmakla kalmayıp, ayrıca mahsulün piyasa değerini hem artırmak hem de yetiştiricilerin getirilerini iyileştirmek için sitrikültürde (narenciye kültürü) yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Verim artışları, özellikle çekinik türler için meyve tutumunda ve/veya özellikle “küçük meyve” grubu mandalinalar için meyve boyutunda iyileştirme yoluyla elde edilir. Her ağaç için meyve sayısının artması, daha iyi çiçek başlangıcının bir nihayeti olarak çiçek sayısındaki yükselme ya da meyve tutumu üzerindeki direk bir şekilde etki etme yoluyla dolaylı olarak elde edilir. İyileştirilmiş meyve boyutu, doğrudan meyve dokularının büyümesinin uyarılmasıyla veya dolaylı olarak çiçek

başlangıcının kısmen engellenmesiyle veya müteakip meyve alınmasıyla meyve sayısının azaltılmasıyla sağlanır. PGR'ler aynı zamanda olgunlaşmayı hızlandırmak, hasadı geciktirmek ve hasat sonrası meyve kalitesini korumak, yetiştiriciye daha fazla kar sağlamaktadır (E1-Otmani *et al.* 2000).

Biber (*Capsicum annuum* L.), Nepal'in çoğu yerinde yaygın olarak yetiştirilen önemli bir baharat ürünüdür. Ülkenin birçok yerlerinde acı biber üretimi her mevsim gerçekleştirildiğinden, meyveler yıl boyunca piyasada bulmak mümkündür. Biber üretimi, sadece çeşitlerin doğal genetik varyasyonların verim potansiyeline göre yönetilmez, aynı zamanda çeşitli çevresel faktörlerden ve yetiştirme yöntemlerinden de büyük ölçüde etkilenmektedir. Biber üretimi, sıcaklığın yüksek ya da çok düşük olması gibi elverişsiz durumlarda bitkilerde fizyolojik ve hormonal anormalliklerin neden olduğu çiçek ve meyve dökümü nedeniyle azaltmaktadır (Erickson and Markhart, 2001). Solanöz meyve ve sebze mahsullerinde bitki büyüme düzenleyicilerinin etkisi üzerine yapılan araştırmalar, bitki büyüme düzenleyicilerinden bir kısmının uygulanmasının çiçek ve meyve dökülmesini azaltmada faydalı olduğunu ve böylece birim alan ve birim zamanda acı biber üretimini artırdığını ortaya koymuştur (Balraj *et al.* 2002; Joshi *et al.* 1999; Chaudhary *et al.* 2006).

Yapılan bir araştırmada, Jwala ve Suryamukhi biber çeşitlerinin büyümesini ve verimini destekleyen bitki büyüme düzenleyicilerinin belirlenmesini amaçlamıştır. Suryamukhi, verimi bakımından Jwala'dan üstün özellikler gösterirken, Jwala ise bitkisel özellikler bakımından Suryamukhi'den daha iyi olduğu gözlenmiştir. BBD'ler arasında, 2 ppm'de 2,4-D, meyve verimi, bitki başına meyve sayısı, meyve uzunluğu, meyve başına tohum sayısı, meyve başına tohum ağırlığı, tane ağırlığı ve meyve verimi daha fazla etkisi olduğu gözlemlenirken, 40 ppm'de NAA en yüksek yaprak alanı (LAI) indeksini verdiği gözlenmiştir. BBD'ler, kış mevsiminde çiçeklenme ve meyve vermeyi teşvik etmede yetersiz kaldığı gözlenmiştir. Bunun yanı sıra, 2 ppm 2,4-D, 5 ppm triacontanol, 40 ppm NAA ve 10 ppm GA3 uygulamaları yapıldığında kontrole göre sırasıyla %28.75, %25.70, %13.61 ve %2.30 daha yüksek meyve verimi sağlanmıştır. En yüksek oran 2 ppm 2,4-D uygulamasında kaydedilmiştir. GA3'ün yaprak spreyi olarak kullanılmasının ekonomik olmadığı belirlenmiştir (Chaudhary *et al.* 2006).

PGR'lerin önemli bir grubu, sebzelerin ve depolanmış gıda mahsullerinin filizlenmesinin bastırılması (Swietlińska and Zuk, 1978), yatma riskini azaltmak için tahıl mahsulünün uzunluğunun azaltılması ve samanın güçlendirilmesi (Basra, 2000), süs bitkilerinde çiçeklenmeyi artırmak için vejetatif büyümeyi geciktirme (Whipker, 2013) gibi belirli avantajlar elde etmek için tarım ve bahçecilikte yaygın olarak kullanılan bitkiler

üzerinde olumsuz düzenleme etkilerine sahiptirler. Klasik fitohormonlar ve sentetik PRG'lerin ilaveten, birçok bitki metabolitinin, yeni BBD'ler geliştirmek için başlıca bileşikler olarak hareket ederek bitki çimlenmesi ve gelişimi üzerine etkileri olduğu bildirilmiştir (Vanholme *et al.* 2019; Mathesius, 2018; Zanardo *et al.* 2009; Dayan *et al.* 2012).

Bitki dokularında doğal olarak bulunan, büyüme ve gelişmede besleyici bir rolden ziyade düzenleyici bir role sahip olan BBD'ler çoğunlukla çok az yoğunluklarda harekete geçebilen kimyasallar olarak bilinirler. Doğal bir şekilde büyümeyi teşvik eden bu kimyasalların bir kısmı yapay olarak ya da fermentasyon süreçleriyle üretilir ve ilgili tedarikçilerden temin edilebilir. BBD'lerin bilinmekte olan birkaç sınıfı mevcuttur. Bunlar; oksinler, sitokininler, gibberellinler, etilen, absisik asit'tir.

Bitkilere ait doku ve organ kültürlerinde morfogenez ve büyümeyi düzenlemede en etkin rol alan büyüme maddeleri oksinler ve sitokininlerdir; bu büyüme maddesi gruplarında, doğal büyüme maddelerinininkine eşdeğer ya da daha yüksek bir biyolojik etkiye sahip yapay düzenleyiciler bulunmuştur. Bitkilerde doğal bir şekilde bulunan absisik asit ya da giberellinlerle rekabet edebilecek kimyasal seçenekler hali hazırda bulunmamaktadır, lakin doğal olan giberellinlerden bazıları kültürlenmiş mantarlardan ekstrakte edilir aynı zamanda ekzojen düzenleyiciler olarak kullanılabilir. Buna ilaveten, bitki bünyesinde gibberellin sentezini engellemede büyük oranda etkili olan birkaç kimyasal sınıf, çok etkili büyüme düzenleyicileridir. Bu sınıflar çoğunlukla antigibberellinler ya da büyüme geciktiriciler şeklinde isimlendirilmektedir. Eksojen etilen bir büyüme düzenleyici olarak kullanılabilir, fakat gaz halinde olmasından dolayı, sıkı bir şekilde kapatılmış kaplar dışında mevcut konsantrasyonu tatbik etmek ve kontrol etmek zordur, ayrıca asetilen ve propilen gibi etilen etkisine benzer diğer alkinler ve alkenler için de geçerlidir. Bunun yanı sıra, etileni serbest bırakabilen bazı kimyasallar keşfedilmiştir. Bunlar bozulmamış moleküller halinde bitkilere alınmakta, fakat sonrasında bir bitkinin dokusu içinde etileni serbest bırakmak için parçalanmaktadır. Doku kültürlerinde BBD olarak kullanılan ve etilen salan 'ethephon' (2-klorethanfosfonik asit), da bu kimyasallardan biridir. Geçtiğimiz son on yıllık zaman diliminde, bitki hormonlarının mevcut olan beş sınıfından ayrı olarak, önemli ölçüde daha fazlasının olduğu açıkça ortaya çıkmış durumdadır. Brassinosteroidler, jasmonik asit, oligosakkarinler ve sistemin gibi bazıları iyi tanımlanmış durumda iken fusicoccin ve fitotropinlerin doğal analogları gibi var oldukları bilinen ancak henüz tanımlanamamış olanlar da mevcut durumdadır. Ek olarak, mikroorganizmalardan elde edilen elisitörlerin de BBD olarak kabul edilmesi gerektiği ve bitkilerde bu tür maddeler için spesifik reseptörlerin bulunduğu anlaşılmıştır (George *et al.* 2008).

Oksinler hücre uzamasını ve hücre bölünmesini uyarılmasına ek olarak fototropik ve gravitropik reaksiyonlarda da yer alırlar. Yüksek konsantrasyonlar bu tür reaksiyonları engelleyebilir ve tam tersine etki gösterebilir. Apikal baskınlık yani tepe tomurcuğunun yan tomurcukların gelişimini baskılaması tepe tomurcuğunda üretilen oksinin yanal tomurcukların büyümesini engellemesine neden olmaktadır. Mesela büyüyen tahıl tohumlarında nişastanın depolanması maksadıyla asimilatları çekmede de görev almaktadır. Yapay oksinler genellikle doğal olarak meydana gelenlerden daha kalıcıdır. Etilen oluşumunun harekete geçirilmesi, oksinlerin sebep olduğu birçok etkiyle alakalıdır (Rademacher, 2015).

Şu anda aşağı yukarı 140 farklı GA'nın yüksek bitkilerde ve/veya giberellin üreten mantarlarda olduğu bilinmektedir. Buna ek olarak, GA'ların sadece birkaçı kendi başına biyolojik aktiviteye sahipken, çoğunluğu öncül veya katabolittir. Yüksek bitkilerde GA'ların asıl hormonal görev ya da etkileri, bitkilerin uzunlamasına büyümenin teşvik edilmesi, çimlenmekte olan tohumlarda hidrolitik enzimlerin indüklenmesi, uzun gün bitkilerinde sürgünlemenin indüklenmesi ve meyve oluşumu ve gelişiminin teşvik edilmesidir. Yüksek bitkilerde GA'ların biyosentezi, ilgili enzimlerin doğasına ve hücrede karşılık gelen bölgesine göre üç safhaya ayrılabilir. Bunlar, proplastidlere etki eden terpen siklazlar, endoplazmik retikulum ile bağlantılı monooksijenazlar ve sitozolde bulunan dioksijenazlar'dır. Bu enzimler, sırasıyla D-gliseralehit 3-fosfat artı piruvattan ent-kauren meydana gelmesine, ent-kaurenin GA12-aldehite oksidasyonunu ve devamında da başka GA'ların hidroksilasyonlarını katalize etmektedirler. Üstelik birkaç PGR, gibberellin biyosentezini inhibe ederek etki ettiği rapor edilmiştir (Rademacher, 2000, 2016).

Sitokininler ise diğer etkilerinin yanı sıra, meristematik dokularda hücre bölünmesini uyarır, apikal baskınlığa yani boy uzamasına engel olmaya sebebiyet vererek oksinlere karşı koyar, yaprak yaşlanmasını geciktirir ve asimilatları geçiş noktalarına çekme gibi görevlerde rol almaktadırlar. Sitokininlerden olan kinetin [N-(2-furilmetil)-3H-purin-6-amin] ve 6-benziladenin, doku kültürlerinde transplantlar üretmek için önemli olan hormonlar olarak belirlenmiştir. 6-Benziladenin ayrıca yumuşak çekirdekli meyvelerde tek başına veya GA4/7 ile kombinasyon halinde bulunabilmektedir. Tidiazuron ve forklorfenuronun dahil olduğu sitokininler, bazı türlerde yaprak dökücü olarak ve meyve boyutunun iyileştirilmesinde rol almaktadır. Uygun miktarlarda ve bitki gelişiminin uygun merhalelerinde kullanılan sitokininlerin pamuk bitkisinde yaprak dökümüne ve elma ağaçlarında genç meyvelerin dökülmesine sebebiyet verdiği bilinmektedir (Zubkova *et al.* 1990; Grossmann, 1991). Ayrıca, pamukta absisyondan sitokinin kaynaklı sentezlenen etilenin sorumlu olduğu rapor

edilmiştir. 6-benziladenin ile muameleden sonra elma meyveciklerinde de etilen seviyeleri yükselmiştir (Greene *et al.* 1992).

Diğer bir bitki hormonu absisik asit (ABA) ise, yüksek bitkilerin abiyotik strese karşı güvence altına alınmasında ciddi bir rol oynar. Bitkiler kuraklık stresi altındayken stomaların kapanmasına neden olur ve bitki dokularının soğuğa dayanıklılığını artırır. ABA'nın diğer bir işlevi, erken gelişmiş tohum çimlenmesini engellemeye dahil olmasıdır. ABA tabiatta, (+)-cis, trans -izomer (= S -ABA) olarak bulunur. Bitki bünyesinde sentezi oldukça karmaşıktır ve ticari amaçlar için uygun olmadığı bildirilmiştir. (Rademacher, 2015).

Triacontanol (TRIA)

Triacontanol (TRIA), bazı bitkilerin kütikül mumlarında ve parankim dokularında daha düşük seviyelerde yaygın olarak bulunan 30 karbon atomlu doymuş alifatik alkoldür (Kolker, 1979). Özellikle Asya'da çok büyük oranlarda tarım alanında mahsul üretimini arttırmak amacıyla kullanılır. Çok fazla sayıda araştırmacının bildirdiğine göre, büyüme, verim, fotosentez, protein sentezi, su ve besinlerin alımı, azot fiksasyonu, enzim aktiviteleri ve serbest amino asitlerin içeriği, indirgeyici şekerler, çözünür protein ve aktif bileşenlerde TRIA aracılı iyileşme gerçekleşmektedir. (Naeem *et al.* 2012). Yonca küspesi ve küspenin kloroform özleri, birçok bitki türünün büyümesini ve verimini artırmıştır. Yonca ununun aktif dokusundan izole edilen kristalli bir madde, yapraklara püskürtüldüğünde veya besin kültüründe uygulandığında pirinç fidelerinin kuru ağırlığını ve su alımını artırmıştır. Kütle spektrometresi ile ölçümün nihayetinde bu madde triacontanol olarak tanımlanmıştır (Ries *et al.* 1977).

Bitki mumlarının her birisinde ortak bir bileşen olarak görülen TRIA, ilk defa 1977'de nanomolar konsantrasyonlarda ekinlerin büyümesini ve verimini artıran aktif bir büyüme maddesi olduğu kanıtlanmıştır. Birçok araştırmacı tarafından, fotosentez, besin alımı ve enzim aktivitesi dahilinde birkaç temel metabolik süreci üzerine etkileri gösterilmiştir. Bununla birlikte, ilk eylem bölgesi henüz açıklığa kavuşturulmamış durumdadır. TRIA, pirinçte (*Oryza sativa* L.) hızla ikinci bir haberci (TRIM) ortaya çıkarır, bu da nanomolar konsantrasyonlarda bitkilerin TRIA'ya benzer bir şekilde yanıt vermesine neden olur. Triacontanol ikinci haberci (TRIM), 9-0-L(+)-adenozin (9H-purin6-amin, 9-0-L-ribofuranosil) olarak tanımlanmıştır. 9-jf-L(+)-adenozini izole etme ve tanımlama işlemi sırasında, daha önce doğada meydana geldiği bildirilmeyen bu enantiyomerin, işlenmemiş pirinç fidelerinin köklerindeki toplam adenozin havuzunun yaklaşık %1'ini oluşturduğu gösterilmiştir (Ries, 1991).

İnsanoğlunun beslenmesinde etkili bir protein kaynağı olarak vazife gören Sümbül fasulyesinin (*Lablab purpureus* L.) tohumları ve kabukları %20-28 yüzdelinde protein içermektedir. Hipertansiyon tedavisinde potansiyel olarak kullanıma sahip olan bu fasulye tirozinaz enzimini içermektedir. Buna ilaveten, Hindistan'ın bu bölgesindeki (Batı Uttar Pradesh) Aligarh topraklarında bitki biyolojik verimliliğinin nispi olarak daha düşük olduğu görülmektedir. TRIA yaprağına uygulandığında mahsulün kalitesinin yanı sıra mahsul verimliliğini de artırıp artıramayacağını değerlendirmek amacıyla Naeem ve arkadaşları tarafından bir hipotez tasarlanmıştır. TRIA'nın, tarım ve bahçecilik ürünlerinin birçoğunda bitki büyümesini destekleyen etkili bir madde olduğu bilinmektedir. Saksı içerisindeki toprakta yetiştirilen sümbül fasulyesi bitkilerine 15 günlük aralıklarla beş konsantrasyonda TRIA (10^{-9} (Kontrol), 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} M) püskürtülmüştür. Bitkilerin taze ve kuru ağırlıkları, yaprak alanı, bitki başına nodül sayısı ve kuru ağırlığı, toplam klorofil ve karotenoid mevcudiyeti, nitrat redüktaz aktivitesi, karbonik anhidraz aktivitesi, nodül-azot içeriği, leghemoglobin içeriği ve yapraklardaki N, P, K ve Ca içerikleri ekimden itibaren 60, 90 ve 120 gün sonra analiz edilmiştir. Net fotosentetik hız, terleme hızı ve stoma iletkenliği yalnızca 90 DAS'ta ölçülmüştür. Tohumlarda protein içeriği ayrıca karbohidrat ve tirozinaz aktivitesi analiz edilmiştir. 10^{-6} M TRIA'nın yaprak spreysi, çalışılan özelliklerin çoğunu önemli ölçüde uyardığı tespit edilmiştir. En yüksek konsantrasyonda (10^{-5} M TRIA), tüm özelliklerin değerleri her üç aşamada da önemli ölçüde azalmıştır. 10^{-6} M TRIA örnek olarak değerlendirildiğinde, ilaçlanmamış bitkilerle karşılaştırıldığında tohum verim kapasitesi %56.3 ve protein içeriğini %14.5 oranlarında artırdığı tespit edilmiştir. TRIA, kontrol bitkileriyle karşılaştırıldığında tirozinaz aktivitesini de uyardığı tespit edilmiştir (Naeem *et al.* 2009).

Sıtma parazitlerini ortadan kaldıran, ateşi düşüren ve kanamayı kontrol altına alan *Artemisia annua* L., aromatik-antibakteriyel bir bitkidir ve ikincil bileşiği artemisininidir. Bu kıymetli sıtma önleyici bitkiye hem TRIA tek başına hemde GA ile birlikte uygulanmıştır. Uygulamadan sonra *Artemisia*'nın büyüme karakterleri, fotosentez, enzimatik aktiviteleri, uçucu yağ ile artemisinin içeriği ve verimi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Şu ana kadar ki bilgiler ışığında, TRIA ve GA kombinasyonunun ($1.5 \text{ mg l}^{-1} + 75 \text{ mg l}^{-1}$) konsantrasyonunda nitrat redüktaz ve karbonik anhidraz aktivitelerinin ciddi oranlarda (%25.9 ve %21.5 oranında) ve net fotosentetik oranı %25.4, stoma iletkenliği %14.1 ve dahili CO_2 'yi ise %15.4 oranında artırdığı rapor edilmiştir (Aftab *et al.* 2010).

Idrees ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada iyi bilinen iki büyüme düzenleyici, triacontanol (TRIA) ve gibberellic asit (GA3), ekonomik olduğu kadar tıbbi

açından da önemli bir bitki olan kişnişe (*Coriandrum sativum* L.) uygulanmış ve etkileri belirlenmiştir. Bitkilerin ekiminden 30 gün sonra TRIA veya farklı TRIA ve GA3 kombinasyonları püskürtme yoluyla uygulanmıştır. Tedaviler arasında, 10^{-6} T + 10^{-6} G'lik bir yaprak spreyi, uçucu yağ içeriği ve verim özellikleri (bitkide şemsiye sayısı, şemsiyede meyve sayısı, 100 tane ağırlığı ve tane verimi), büyüme (sürgün ve kök uzunlukları, yaş ve kuru ağırlıklar), fizyolojik ve biyokimyasal (yaprak potasyum içeriği hariç toplam klorofil ve karotenoid, nitrat redüktaz aktivitesi, karbonik anhidraz aktivitesi, yaprak azotu ve yaprak fosfor içeriği) parametrelerinin çoğu için değerleri önemli ölçüde artırdığını gözlemlediler. Bu çalışma ile elde edilen bulgular dahilinde, kişniş bitkisine kombine bir TRIA ve GA3 (10^{-6} T + 10^{-6} G) spreyinin, artan uçucu yağ içeriği ile verimlilik bakımından oldukça etkili olduğu sonucuna varılabilir (Idrees *et al.* 2010).

Antioksidan Enzimler

Antioksidan kelimesi, çoğunlukla, belli oranlarda reaktif bileşiklere maruziyetin sebebiyet verdiği hasarlara karşı hücreleri korumaya dönük geniş bir bileşik sınıfını ifade eder (Bhaduri and Fulekar, 2012). Eski zamanlardan beri bazı bitki ve baharatlar baharat olarak kullanımının yanı sıra, ilaç ve koruyucu olarak da kullanılmaktadır (Dorman *et al.* 2004). Son zamanlardaki bazı diyet formasyonlarından fizyolojik faydalar elde etmek ve kronik hastalıkların önüne geçmek amacıyla bazı tıbbi aromatikler sıklıkla kullanılmaktadır (Fares *et al.* 2011). Stres koşullarına bağlı olarak, hücrelerde reaktif oksijen türleri (ROS) ve diğer serbest radikaller oluşmaktadır. Bu gibi durumlarda, ROS üretiminin önlenmesi veya etkilerinin azaltılması, hastalıkların önlenmesi oldukça önemlidir (Tohma and Gulcin 2010; Wu *et al.* 2011; Goncalves *et al.* 2013). ROS türleri ve hidrojen peroksit, hipokloröz asit benzeri serbest radikaller, hidroksil radikalleri ve süperoksit anyonları, hücresel fonksiyonlar neticesinde hücreler tarafından üretilmektedir. Bununla birlikte, hızlı bir şekilde serbest radikal oluşumu, biyomoleküllerin oksidatif hasarına meydan vermektedir. Bu durum astım, inflamatuvar hastalık ve kanser gibi rahatsızlıklara yol açmaktadır (Bimal *et al.* 2011). Katalaz-peroksidaz benzeri antioksidanlar, ROS'un sebebiyet verdiği hasara, lipid peroksidasyonuna ve protein hasarına dönük koruma sağlar (Valko *et al.* 2007; Patil *et al.* 2009). Çoğunlukla hücreler SOD, POD, CAT, APOD ve E ve C vitamini, melatonin, karotenoidler ve benzeri enzimatik olmayan antioksidanları içeren karmaşık bir antioksidan sisteme sahiptir. (Rahman 2007; Raffa *et al.* 2011). Tıbbi öneme sahip bitki özleri, antioksidan ve antibakteriyel aktivitelere sahip önemli miktarda polifenolik bileşikler içermektedir (Alam *et al.* 2011; Begum *et al.* 2008; Ali *et al.* 2011; Rejiya *et al.* 2009; Güneş *et al.* 2019).

Süperoksit dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutazlar (SOD'lar), süperoksit radikallerinin oksijen ve hidrojen peroksit dismutasyonunu katalize eden metal içeren enzimlerdir. Bu enzimatik fonksiyon ilk olarak McCord ve Fridovich (McCord and Fridovich, 1969) tarafından sığır eritrositlerinden bir kupro-çinko proteini (eritrokuprein) ile tanımlanmıştır. SOD3 aktivitesine sahip benzer kupro-çinko proteinleri sonraki zamanlarda çeşitli ökaryotik canlılardan da elde edilmiştir (Giannopolitis and Ries, 1977). Enzim, birçok biyolojik oksidasyonun yan ürünleri olarak üretilen toksik-indirgenmiş oksijen türlerine karşı savunmada önemli bir rol oynadığı incelenen tüm aerobik organizmalarda bulunmuştur. Oksijen radikallerinin oluşumu, çevresel problemlerin gerçekleştiği durumlarda daha da şiddetlenebilir ve nihayetinde SOD'nin bitkilerin stres durumlarına karşı toleransı için hayli önemli olduğu ileri sürülmüştür. Bitkilerde, aktif bölge metal iyonlarına göre sınıflandırılan enzimin bakır/çinko, manganez ve demir olmak üzere üç farklı formu vardır. Bu enzimlerin dağılımı hücre altı düzey ve filogenik düzey olarak araştırılmıştır. Sadece bitkilerde üç ayrı SOD tipi birlikte bulunduğu gözlenmiştir. Bitki hücrelerinin farklı hücre altı bölümlerinde gerçekleşmeleri, moleküler evrimin araştırılmasına ve fonksiyonel olarak eşdeğer olan fakat yapısal olarak ayrı üç tip SOD'un niçin korunduğunun anlaşılmasına olanak tanımıştır. Bu durum ayrı SOD'ları kodlayan birkaç cDNA dizisini yakın zamanda elde etmeye imkan vermiştir ve moleküler tekniklerin uygulanması, bu enzim sistemi ve genel olarak bitkilerde oksidatif stres ile ilgili bilimizi büyük oranda yükseltmiş durumdadır (Bowler *et al.* 1994).

Tabiatla belirlenen en güçlü antioksidanlardan bir tanesi olan SOD aynı zamanda oksidatif strese karşı hücrel savunmanın önemli unsurlarından biridir. Çok yüksek katalitik reaksiyon hızı ve fiziko-kimyasal strese karşı yüksek dayanıklılık ve sağlamlık gibi birkaç önemli özellik sergileyen bir enzimdir. Buna ek olarak terapötik kapasitesi nedeniyle büyük ölçüde ilgi görmüştür. Birçok farklı hastalığın patofizyolojisinde oksidatif stresin mevcudiyeti bilinmekte olup aynı zamanda SOD takviyesinin böyle hastalıkların iyileştirilmesinde ya da engellenmesinde faydalı olduğu ispatlanmış durumdadır. Fakat, hala etkili, güvenilir ve güvenli bir antioksidan terapi durumuna getirilmemiştir (Bafana *et al.* 2011).

SOD, tüm yaşam biçimleri için her fiziki ortamda bulunmaktadır. SOD'lar Cu, Zn-, Fe-, Mn- ve Ni-SOD'lara ayıran dört değişik metal merkez ortaya konulmuş durumdadır. SOD ve diğer antioksidan enzimlerin evrimi muhtemelen milyarlarca yıl önce fotosentez yapabilen canlılar vasıtasıyla O₂ üretiminin etkisiyle başlamıştır. O dönemde prokaryotlarda Cu, Zn SOD'ler ve Fe SOD'ler/Mn SOD'ler olmak üzere iki temel SOD çeşidi birbirinden bağımsız bir şekilde meydana gelmiştir. Daha sonraki zaman peryotlarında Fe/Mn SOD'ler gen

duplikasyonu aracılığıyla Fe ve Mn SOD'lara evrilmişlerdir. Fe ve Mn SOD'ların üç boyutlu yapı ve amino asit dizisi yönünden yakından ilgili olmasının nedeni bu olgu olabilir. Ayrıca, kristal yapıları ve katalitik mekanizmaları Cu, Zn SOD ile kıyaslandığında tamamen farklıdır, bu durum bağımsız evrim hipotezini destekler durumdadır (Smith and Doolittle, 1992; Bafana *et al.* 2011).

Cu, Zn SOD temel olarak bakterilerde periplazmada yer almakta olup SODC geni tarafından kodlanmaktadır. Cu, Zn SOD ökaryotlarda, kloroplastta yer almaktadır. Hayvanlarda ise sitozolik SOD1 ve hücre dışı EC SOD/SOD3 olmak üzere iki ayrı Cu, Zn SOD tipi bulunmaktadır. Cu, Zn SOD için, kristal yapıların çoklu dizi hizalamasına ve yapısal olarak üst üste konumlandırılmasından dolayı evrim ağacı, EC SOD'un SOD1'den evrimin erken bir periyodunda, mantarların, bitkilerin ve metazoaların farklılaşmasından bile çok daha önceleri ayrıldığını kanıtlamış durumdadır (Zelko *et al.* 2002). Bitkiler öbür organizmaların aksine, birçok gen vasıtasıyla kodlanan çok sayıda Cu, Zn SOD formunu içerdiği bildirilmiştir. Filogenetik bakımdan ökaryotik Cu, Zn SOD'ler ile birlikte sınıflandırılırlar ve kloroplastik ve sitozolik SOD'lerin iki ana alt grubunda gruplanmışlardır ki bu durumda bahsedilen bu alt grupların bitkilerin evriminde erken süreçte ayrıldığını ifade etmektedir (Fink and Scandalios, 2002).

Ökaryotlarda ve prokaryotların mitokondrilerinde oluşan Mn SOD, prokaryotlarda SODA geni tarafından kodlanırken, hayvan mitokondrilerinde SOD2 olarak adlandırılmaktadır. Aynı şekilde Fe SOD, prokaryotlarda (SODB) ve kloroplastlarda yer almaktadır. Mitokondriyal ve kloroplastik Mn- ve Fe SOD'lerin prokaryotik türemiş olduğu öne sürülmüştür. Tütün ve Arabidopsis kloroplastik Fe SOD dizilerinin siyanobakteri *Anacystis nidulans* (Van *et al.* 1990) ile en çok benzer olduğu gösterilmiştir ve kökenleri muhtemelen endosimbiyontlardan gelmektedir. Kloroplast ve mitokondri dışında, daha yüksek organizmalar da O₂'nin aktive edilebileceği diğer bölmeler de (mikrozom, peroksizom, glioksizom, hücre dışı matris ve sitozol) SOD birikmiştir. Bu önemli bir durumdur, çünkü O₂'ye karşı zar geçirgen değildir. Dolayısıyla oluştuğu bölmede detoksifiye edilmesi gerekmektedir (Bafana *et al.* 2011).

Fe- ve Mn SOD grubunda yer alan Fe SOD'un, ilkel yerküre şartlarında çözünür durumdaki Fe(II) formasyonunda ki Fe'in bolluğu neticesinde daha eski olduğu iddiası mevcut durumdadır. İlkel şartlardaki O₂ oranı yükseldikçe, Fe(II)'nin mevcudiyetinin düştüğü ve yine ihtimaldir ki daha yüksek Mn kullanımına meyletme ile neticelenmiştir. Filogenetik ağacı, Fe SOD'ları Mn SOD'lerden ayırmada daha yakın zamanları işaret etmekte olup her biri için filogenetik kökenleri açısından benzer olduğunu doğrular nitelikte olmakla birlikte

sıklıkla yatay gen transferini düşünmeye sevk etmektedir. Aynı zamanda soyağacında, arkeal SOD'ları diğer prokaryotik SOD'lardan belirgin bir şekilde ayırmaktadır (Schäfer and Kardinahl, 2003). Arkea ve öbakteriler O₂'nin ortaya çıkmasından çok önce ayrıldığından, bu mevcut hal SOD'un bu iki soydan hangisinin ilk olarak meydana geldiği sorusunu gündeme getirmektedir (Bafana *et al.* 2011).

Arkeal Fe- ve Mn SOD'ların geneli çok büyük oranda termostabildir. Bu enzimlere ait yüksek T_m değerleri, erken dünya şartlarında, yani sıcak koşullarda evrimsel kökenlerini düşündürmeye sebep olmaktadır. İlginç bir şekilde, oda sıcaklığı da dâhil olmak üzere geniş bir sıcaklık aralığında bu hipertermofilik SOD'lar yüksek aktivite gerçekleştirmektedir. Biyokimyasal yönden değerlendirildiğinde, yüksek T_m geniş bir çalışma sıcaklığı skalası ile birleştirilmiş değerler, bu enzimlerin, reaksiyon döngüsü esnasında herhangi bir büyük ölçekli konformasyonel değişiklik gerektirme olasılığının az olduğu, yarı donmuş halde var olduğu ihtimalini düşünmemizi sağlamaktadır. Bu şekilde, hipertermofilik SOD'lar, mezofilik yaşam tarzının ılımlı sıcaklıklarına kolay bir şekilde uyum sağlayabilir ve böylece SOD, arkeik bir protein olarak değerlendirilebilir (Schäfer and Kardinahl, 2003). *Pseudoalteromonas haloplanktis* ve *Aliivibrio salmonicida* gibi psikrofillerden alınan Fe- ve Mn SOD'lerinin, en yüksek büyüme sıcaklıklarının fazlasıyla üzerindeki sıcaklıklarda ısıya dayanıklı olduğu kanıt olarak kabul edilmiştir (Castellano *et al.* 2006; Pedersen *et al.* 2009).

Ni-bağımlı enzimler (SODN) şu ana kadar yalnızca *Streptomyces* ve siyanobakterilerden karakterize edilmiş ve bundan dolayı onlar ile ilgili çok bilgi yoktur. Dupont ve arkadaşları (Dupont *et al.* 2008), literatürdeki verilerde muhtemel Ni SOD dizilerini değerlendirmişler ve çoğunun deniz ekosistemine ait olduğunu düşünmüşlerdir. İlâveten inceleme, ihtimal dâhilinde görülen dizilerin daha önce tanımlanan Ni SOD'lardan epeyce ayrı olduğunu göstermiştir. Kabul edilen diziler, ökaryotların ve prokaryotların her ikisinin de dâhil olduğu çeşitli filogenetik temeller arasında yatay gen aktarımının verileri ışığında gruplara ayrılmıştır (Bafana *et al.* 2011).

Peroksidaz (POD)

POD bitkilerde ve bazı hayvan hücrelerinde oluşan bu enzimler; aminler (o-fenilendiamin), p-fenilendiamin, benzidin, fenoller ve hidrokinon benzeri çok sayıda organik bileşiğin hidrojen peroksit ile oksidasyonunu katalize eder. Askorbik asit, fenol ve amin karışımları, o-toluidin gibi diğer oksitlenebilir bileşiklerle birlikte bir hidrojen vericisi olarak da işlev görebilir. Peroksidazın peroksitler için özgüllüğü yüksektir. Sadece hidrojen peroksitin (H₂O₂), metil ve etil hidroperoksitler peroksidaz ile birleşir. Öte yandan, peroksidazhidroperoksit kompleksinin belirtilen organik bileşikler için özgüllüğü düşüktür.

Farklı substratlar kullanılıyorsa, farklı orijinli peroksidazların aktivitesinin karşılaştırılması oldukça zor olmaktadır (Lück, 1965).

Oksidoredüktazlar olarak sınıflandırılan peroksidazlar, H_2O_2 'nin hidrojen atomlarının alıcısı ve başka bir bileşiğin verici olduğu reaksiyonları katalize etmekten sorumludur (Dahdouh *et al.* 2020). Bunlar, ikinci bir substratı oksitleyken H_2O_2 azalmasına katkıda bulunabilen hem içeren proteinlerdir. Bu oksidoredüksiyon reaksiyonları nedeniyle, bu enzimler, ROS'ların detoksifikasyonunda ve oksidatif stresin giderilmesinde ana rol oynayan temel antioksidan biyokatalizörler arasında bulunmaktadır (Wedelsbäck Bladh and Olsson, 2011; Zhuang *et al.* 2013). H_2O_2 'yi indirgeyerek ve çok çeşitli substratların 1- veya 2-elektron oksidasyonunu katalize ederek çeşitli organik ve inorganik bileşikleri oksitleyiciler (Al Ghouleh *et al.* 2011). Hayvansal olmayan peroksidazlar üç sınıfa ayrılır. Bunlar bakteri ve mantarlarda mevcut olduğu ve sitokrom C peroksidaz, askorbat peroksidaz ve katalaz içerdiği bilinen Sınıf I, amino asit dizilerine göre askorbat tipi olarak bilinen sınıf II, ve bitkiler tarafından sentezlenen guaiakol tipi olarak bilinen sınıf III olarak belirlenmiştir (Das *et al.* 2011). Peroksidolitik enzimler, kateşin, katekol, klorojenik asit, guaiakol ve pirogallol gibi çok çeşitli fenolik substratları oksitleyebilen farklı izoenzim formlarıdır. Peroksidazlar, hormon regülasyonu, bitki gelişimi, savunma mekanizmaları, lignin biyosentezi ve indoleasetik asit degradasyonu gibi çeşitli bitki fonksiyonlarında yer almaktadır (Chisari *et al.* 2007; Manu and Rao, 2009; Pandey *et al.* 2017). Bununla birlikte, bitki dokularından POD salınımı, guaiacol, katekol, pirogallol, kateşin ve klorojenik asit gibi çok çeşitli fenolik bileşiklerin oksidasyonundan sorumludur (Onsa *et al.* 2004). Meyve ve sebzelerde enzimatik aktiviteyi etkileyen birçok faktörün sıcaklık, pH, substrat ve besiyerinin bileşimi gibi fiziksel ve kimyasal parametrelere ayrılabilmesi iyi bilinmektedir. (Shu *et al.* 2016; Pandey *et al.* 2018). Enzim aktivitesi aynı zamanda mevsimden, gelişme aşamasından ve böcek ilacı ve gübre kullanımından da etkilenmektedir (Horotan and Oancea, 2013; Serrano-Martínez *et al.* 2014). Bitkilerden elde edilen peroksidazlar üzerine yoğunlaşmış olan; manyok (*Manihot utilissima*), şeftali (*Prunus persica*), yaban turpu (*Armoracia rusticana*), yeşil enginar (*Cynara scolymus* L.), dev taro (*Alocasia macrorrhiza*), tatlı patates (*Ipomoea batatas* ex L. Lam.), kabak (*Cucurbita pepo*), beyaz şalgam (*Brassica campestris rapifera*) gibi çok sayıda çalışma gerçekleştirilmiştir (Maciel *et al.* 2007; Sumathi and Pattabiraman, 1977; Dirlewanger *et al.* 2002; Freitas *et al.* 2004; Lavery *et al.* 2010).

Armoracia rusticana yani yaban turpunun köklerinden elde edilen iyi bilinen yaban turpu peroksidazı (HRP), büyük biyoteknolojik ve ticari yararlılıkları olan bitki kökenli bir POD için oldukça güzel bir örnektir (Lavery *et al.* 2010; Ambatkar and Mukundan, 2014).

Enzim mühendisliği ve mikrobiyal biyoteknoloji alanlarında, bitkilerden elde edilen POD'lara büyük rağbet gösterilmektedir. Öncelikle, bitki kaynaklarından enzimlerin ekstraksiyonu maliyet bakımından uygundur ve mikrobiyal bir kaynaktan üretilmesinden daha kolaydır. Diğer taraftan, POD'lar, biyoteknolojik uygulamalarda birçok gaye için uygulanmaktadır. Yalnızca boyaların renk giderimi, atık sudan pigmentlerin biyolojik olarak parçalanması ve inatçı aromatik bileşiklerin içme suyundan uzaklaştırılmasına ilaveten, antioksidan potansiyellerini bulmak maksadıyla farmasötik ve tıbbi yaklaşımlarda da tatbik edilmektedir. Belirli amino asit kalıntılarının peroksidaz işlevine nasıl dahil olduğunun anlaşılması, özellikle POD HRP'nin 3 boyutlu yapısına ait bilginin entegrasyonu ile, peroksidazdaki belirli dizilerin biyolojik aktivitelerde nasıl yer aldığını anlamamıza yardımcı olmaktadır (Dahdouh *et al.* 2022).

Lipit Peroksidasyon (LPO)

Lipid peroksidasyonu (LPO), oksidatif stresin neden olduğu ana olaylardan biridir (Kovacs *et al.* 1996). LPO, membran düzeninde bozulmaya ve proteinlerin ve DNA bazlarının fonksiyonel kaybına ve modifikasyonuna neden olduğu ve çeşitli hastalıkların patogeneğinde rol oynadığı kanıtlanmıştır. LPO'nun ince yapıların bozulmasına, bütünlüğün, akışkanlığın ve geçirgenliğin farklılaşmasına ve biyomembranların fonksiyonel kaybına sebebiyet verdiği, düşük yoğunluklu lipoproteini (LDL) proaterojenik ve proinflamatuvar formlara dönüştürdüğü ve potansiyel olarak toksik ürünler ürettiği ortaya konulmuştur (Greenberg *et al.* 2008). LPO'nun üç farklı yolak ile ilerlediği kanıtlanmıştır. Bunlardan birincisi serbest radikal aracılı oksidasyon, ikincisi serbest radikalden bağımsız, enzimatik olmayan oksidasyon ve üçüncüsü enzimatik oksidasyondur (Niki *et al.* 2005; Niki, 2009).

LPO, doğrudan veya dolaylı olarak birçok toksisite, eksiklik ve anormal durumla ilişkilendirilerek, bir kantitasyon yöntemine veya yöntemlerine duyulan ihtiyacı vurgulamaktadır. Ne yazık ki, lipit hidroperoksitlerin geçici doğası ve bunların ayrışma ürünleri, kantitatif saptamayı çok zorlaştırmaktadır. İn vivo LPO'nun varlığına dair kanıt elde etmek ile bunun göreceli önemini veya reaksiyon hızını belirlemek arasında büyük bir fark bulunmaktadır. Benzer şekilde, bir dokunun veya hâlihazırdaki LPO duyarlılığını belirleme ile bu süreci katalize etme (veya başlatma) kapasitesi de farklılık göstermektedir. LPO'nun, sentez adımlarının her biri çok çeşitli faktörlerden etkilenebilen başlatma, yayılma ve/veya sonlandırma fazlarına sahip olabileceği radikal reaksiyonlarını içermektedir. Bu faktörler lipidin doğasını, antioksidanların veya antioksidan sistemlerin varlığını, başlatma mekanizmasını vb. içerir.

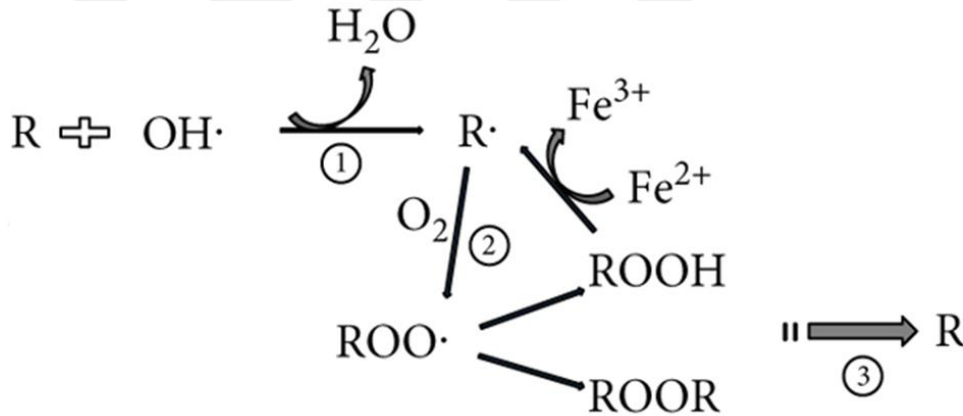
LPO, soya fasulyesi lipoksijenazı gibi lipid hidroperoksitlerin oluşumunu katalize eden enzimler, diğer radikaller veya ikincil olarak radikallere yol açan maddeler ve ayrıca belirli tip şelatlı demir-oksijen kompleksleri tarafından başlatılabilir. Bir demir-oksijen kompleksi tarafından LPO sentezinin başlatılması, Fe indirgenmesini gerektirir. Pek çok kimyasal, enzim ve enzim sistemi doğrudan veya dolaylı olarak Fe azaltabilir ve bu nedenle LPO sentezini başlatabilir. Fe indirgeyebilen enzimler arasında NADPH-sitokrom P450 redüktaz, ferredoksin redüktaz ve NADH-ubikinon redüktaz yer almaktadır. Fe indirgeme yeteneğinin, Fe şelatörünün doğasından önemli ölçüde etkilenebileceği belirtilmelidir. Ek olarak, tüm indirgenmiş Fe-O kompleksleri LPO sentezini başlatamadığından, Fe şelasyonuna özellikle dikkat etmek önemlidir. Bazı enzimler yalnızca Fe'i, indirgeyebilen bir ara ürün üreterek Fe indirgeyebilirler. Bu durum, ksantin oksidaz gibi süperoksit üreten enzimler için geçerlidir. Fe indirgeme yeteneğine sahip çeşitli kimyasal sistemler de kullanılabilir. Bunlar arasında askorbik asit, glutatyon, dihidroksifumarat, sistein ve ditiyotritol bulunur. Son olarak, indirgenmiş Fe'in doğrudan eklenmesiyle LPO sentezini başlatmak mümkündür.

Mikrozomlar, in vitro LPO çalışmaları için belki de en yaygın kullanılan sistemdir. Bu tür sistemlerin, her ikisi de değişken olabilen hem Fe indirgeme kabiliyeti vardır hem de substratı içerdiği bilinmektedir. Sabit miktarda Fe şelat eklenmedikçe, üçüncü bir değişken Fe konsantrasyonu (ve şelasyon) meydana gelmektedir. Çoğu araştırmacı, sistem keşfedildiğinde kullanılan şelatör olduğundan, mikrozomal LPO incelerken ADP-şelatlı Fe kullanmaktadırlar. 4 Eksojen Fe eklenmezse LPO kontaminasyonu, ortamda bulunacak Fe miktarına bağlı olabileceği vurgulanmaktadır. Mikrozomlar ve mitokondri gibi LPO sistemleri, lipid peroksidasyon çalışmasını zorlaştırabilecek başka aktiviteler içermektedir. Örneğin, mikrozomlar, mikrozomal NADPH'ye bağlı LPO içeren deneylerde kullanılacak birçok maddenin NADPH'ye bağlı metabolizmasını katalize edebilir. Bu, NADPH eşdeğerlerini azaltmak için bir rekabete, sitokrom P450 tarafından LPO yayılmasının engellenmesine veya bir antioksidanın sitokrom P450'ye bağlı üretimine yol açabilmektedir (Aust, 1985).

LPO zincir reaksiyonlarının ürünleri yüksek biyolojik aktivite sergilemektedir (Zarkovic *et al.* 2017). Bu ürünler, DNA, proteinler ve enzim aktivitesini yok etmenin yanı sıra hücre ölümünü başlatan sinyal yollarını aktive etmek için moleküler olarak hareket etmektedir (Łuczaj *et al.* 2017). Biyomembranlar lipid peroksidasyonuna eğilimlidir ve muhtemelen enzimatik ve enzimatik olmayan olmak üzere iki yolla meydana gelmektedir.

Enzimatik olmayan yol aynı zamanda enzimatik olmayan fosfolipid (PL) otooksidasyonu adıyla da anılmakta olup, Fe'e bağlı lipid peroksidasyonudur. PL'leri içeren yüksek çoklu doymamış yağ asitlerin (PUFA'lar) radikal zincir reaksiyonlarının

otooksidasyonu üç aşamayla gerçekleştirebilir. 1) Başlatma; bir PL'nin çoklu doymamış asil zinciri, hidrojeni hidroksili ($\cdot\text{OH}$) kaybederek $\text{R}\cdot$ (PL içeren karbon merkezli bir radikal) oluşturmak için oksitlenir; 2) Yayılan; $\text{R}\cdot$, bir peroksil radikali ($\text{R-OO}\cdot$) oluşturmak için moleküler oksijenle reaksiyona girer (Lal *et al.* 1988). Bir yandan, $\text{R-OO}\cdot$ yayılma reaksiyonları, bir lipid hidroperoksit (R-OOH) oluşturmak için bir PL molekülünden soyutlanan hidrojeni içerir. Öte yandan, $\text{R-OO}\cdot$ eklenmesi başka bir PL'nin bis-alilik pozisyonuna $\text{R-OO-R}\cdot$ dimerler oluşturur (Gardner, 1989). Fenton kimyası işlemi sırasında, R-OOH , alkoksil ($\text{RO}\cdot$) radikalleri oluşturmak için indirgeyici bölünmeye maruz kalabilir (Bang *et al.* 2014). PUFA'ların otooksidasyon reaksiyonları, malondialdehit, izoprostanlar ve 4-hidroksi-2-nonenal (4-hidroksi-2,3-trans-nonenal, HNE) gibi birçok elektrofilik tür oluşturur. Bu lipid peroksidasyon ürünleri çeşitli biyolojik fonksiyonlara sahiptir (Michalski *et al.* 2008). 3) Bitiş; zincir reaksiyonunun iki radikali birbiriyle reaksiyona girerek stabil moleküller oluşturur ve antioksidanlar, zincir reaksiyonunu engelleyen radikalleri etkili bir şekilde ayrıştırır (Pratt *et al.* 2011). (Şekil 2).



Şekil 2. Çoklu doymamış yağ asitlerinin enzimatik olmayan otooksidasyonu (Su *et al.* 2019).

Gen ekspresyonu

Transkripsiyon, translasyon ve takip eden protein modifikasyonu, genetik bilginin DNA'nın arşiv kopyasından kısa ömürlü haberci RNA'ya transferini, çoğunlukla takip eden protein üretimi ile temsil edilir. Bir canlıdaki bütün hücreler aslında aynı DNA'yı barındırmasına rağmen, hücre tipleri ve işlevleri, gen ifadelerindeki sayı ve kalite bakımından değişik olması sebebiyle farklılık ifade eder ve bundan dolayı gen ifadesinin kontrolü, farklılaşma ve gelişimin merkezinde bulunmaktadır. Farklılaşmış hücreleri sembolize eden gen ifade kalıpları, gelişim boyunca meydana getirilir ve mitoz bölünme geçiren hücreler olarak muhafaza edilmektedir. Böylece, kalıtsal bilginin yanı sıra, hücreler DNA'nın nükleotid dizisinde kodlanmayan bilgiyi de aktarmış olurlar ki buna epigenetik adı verilir (Waterland, 2006). ABD Ulusal Sağlık Enstitüleri (2009) son epigenomik girişinde,

epigenetik'in hem gen aktivitesindeki ve ifadesindeki kalıtsal değişiklikler hem de bir hücrenin transkripsiyonel potansiyelindeki zorunlu olarak kalıtsal olması gerekmeyen kararlı, uzun vadeli değişiklikleri ifade ettiğini belirtmektedir. Tam tanımdan bağımsız olarak, gen ekspresyon modellerini istikrarlı bir şekilde değiştiren epigenetik süreçlerin; sitozin metilasyonu, histon proteinlerinin translasyon sonrası modifikasyonu ve kromatinin yeniden modellenmesi ve RNA temelli mekanizmaları olmak üzere üç süreç içereği düşünölmektedir.

Gen ifadesi, çok sayıda adımı içeren karmaşık bir süreçtir (Alberts *et al.*, 2008.) Gen ifadesindeki birinci basamağı, DNA molekülünün tam bir RNA kopyasına transkripsiyonudur. Transkripsiyonu harekete geçirmek için, RNA polimeraz DNA'nın belirli bir bölgesine (promotör) bağlanır ve DNA zincirlerinden birine tamamlayıcı bir mRNA dizisi meydana getirmektedir. Transkripsiyonun akabindeki işlem oldukça önemlidir. Kopyalanan RNA'nın 5' ucuna metillenmiş bir guanozin 'başığı' eklenirken, mRNA'nın eklenmesi, intron dizilerini kaldıran ve eksonları bir araya getiren adım adım bir dizi bölünme ve ligasyon olayları yoluyla uygun bir şekilde gerçekleşir. Eklemeden sonra, mRNA'nın 3' ucu yarılır ve çekirdekten sitoplazmaya mRNA taşınması için hazırlanırken polyA kuyruğı olarak bilinen bir dizi adenozin kalıntısı eklenir. Bu aşamada, mRNA, çeviri için ribozomlarla etkileşime girmeye hazırdır. Translasyonda, polipeptitler, N terminalinden C terminaline üç farklı adımla (başlatma, uzama ve sonlandırma), aşama aşama sentezlenir (Gibney and Nolan, 2010).

5-enol-Piruvilşikimat-3-fosfat sentaz (EPSPS)

5-enol-Piruvilşikimat-3-fosfat sentaz (EPSP sentaz; fosfoenolpiruvat:3-fosfoşikimat 1-karboksiviniltransferaz, EC 2.5.1.19), bitkilerde, mantarlarda ve bakterilerde aromatik amino asitlerin sentezine giden yolda bulunan bir enzimdir ve geniş spektrumlu herbisit glifosatın hedefidir. *Escherichia coli*'den elde edilen enzimin üç boyutlu yapısı kristalografik tekniklerle ortaya konulmuştur. Polipeptit omurga zinciri, 3-A çözünürlüğünde hesaplanan bir elektron yoğunluk haritasının incelenmesiyle gözlemlenmiştir. İki alanlı yapı, belirgin bir kıvrıma sahip ve iki paralel sarmal ve dört sarmallı bir tabaka içeren bir protein katlama biriminin 6 katlı replikasyonu ile meydana gelmiş olduğı izlenmiştir. Her alan, ortalama üç katlı bir simetri eksenini ile bağlantılı olan bu birimlerin üçünden meydana gelir. Alanların her birinde sarmalların üçü, üç beta-yapraklarından meydana gelen bir yüzey ve diğere üç sarmalın solventle erişilebilir yüzleri tarafından bütünüyle gömölüdür. Alanlar, ortalama bir ikili ile ilişkilidir, ancak mevcut kristallerde molekül, yaklaşık üç katlı eksenleri aşağı yukarı normal olduğundan, nokta grubu 32'nin simetrisiyle simetri göstermemektedir. Gözlenen iki küresel alanın her birinin topolojik üç katlı simetrisi ve oryantasyonu, substratların ve inhibitörlerin bağlanmasını bir sarmal makrodipol etkisi ile yönlendirebilir ve aktif bölgenin, alanlar arası

geçiş bölümlerinin yakınında bulunduğunu düşündürür. Yapı aynı zamanda sekans değişiklikleri vasıtasıyla sağlanan glifosat toleransı için bir gerekçe önermektedir. (Stallings *et al.* 1991).

Absisik asit stres olgunlaştırma proteini (ASR 1)

Domates (*Lycopersicon esculantum*) ASR1(abscisik asit stres olgunlaştırma proteini), bitkiye özgü küçük bir protein olup, hücresel etki modu dizisine veya homoloji analizlerine dayalı olarak tündengelimlere meydan okuyan, su ve tuz stresi koşulları altında aşırı ifade edilen, bilinmeyen biyolojik rollere sahip çok sayıda bitki gen ürününden biridir. Domates ASR1 mRNA ve proteinin kararlı durum hücresel seviyeleri, bitkilerin poli(etilen glikol), NaCl veya absisik aside maruz kalmasının ardından geçici olarak artmaktadır. Anti-ASR1 antikorları ile Western blot ve dolaylı immüno Floresan analizi, ASR1'in hem sitoplazmik hem de nükleer alt hücre bölmelerinde mevcut olduğunu gözler önüne sermiştir ki bunun yaklaşık olarak toplam ASR1 proteininin üçte biri çekirdekte tespit edilmiştir. Nükleer ASR1, kromatine bağlı bir proteindir ve 1 M NaCl ile ekstrakte edilebilir, ancak %0.5 Triton X-100 ile ekstrakte edilemez. *Escherichia coli*'de aşırı eksprese edilen ve homojenliğe saflaştırılan ASR1, çinkoya bağımlı DNA bağlama aktivitesine sahiptir. Rekabetçi bağlanma deneyleri ve SELEX (üstel zenginleştirme yoluyla ligandların sistematik evrimi) analizi, ASR1'in tercih edilen bir DNA dizisine bağlandığını göstermektedir (Kalifa *et al.* 2004).

Domates ASR gen ailesinin ilk üyesi olan ASR1, bir domates meyvesi cDNA arşivi stres koşullarındaki yapraklardan (Iusem *et al.* 1993) cDNA ile taranmasıyla tanımlanmış olup adı da buradan gelmektedir. O zamandan beri, açık tohumlular ve anjiospermiler de dâhil olmak üzere birçok bitki türünden çok sayıda ASR ortologu klonlanmıştır. ASR gen aileleri hem monokotların hem de dikotların genomlarında mevcuttur fakat Arabidopsis model bitkisinde bulunmamaktadır (Carrari *et al.* 2004). Tuhaf bir şekilde, bitkiler âleminin dışındaki organizmalarda ASR ortologları bulunamamıştır. ASR genlerin absisik asit (ABA) ve başta tuzluluk ve kuraklık olmak üzere abiyotik stres tarafından indüklendiği gösterilmiştir (Iusem *et al.* 1993; Chang *et al.* 1996; Joo *et al.* 2013). Ayrıca meyvelerin olgunlaşma döneminde (Iusem *et al.* 1993; Gilad *et al.* 1996; Çakir *et al.* 2003; Srivastava and Handa, 2005; Luo *et al.* 2014) ve patates-yumru gelişimi sürecinde (Frankel *et al.* 2007; Silhavy *et al.* 1995) yüksek oranda ifade edilmektedirler. (Golan *et al.* 2014).

Domates ASR gen ailesi, kromozom 4 üzerinde bir kümede lokalize olan beş genden oluşur. ASR gen ailesinin dört üyesi domatesten klonlanmıştır (Gilad *et al.* 1996; Maskin *et al.* 2007; Frankel *et al.* 2006). Bu genler, oldukça homolog proteinleri kodlar ve farklı boyutta tek bir introna sahiptir, ancak konumu korunmuştur (Gilad *et al.* 1996; Rossi *et al.* 1996;

Amitai-Zeigerson *et al.* 1994). Domates genom dizisinin (Sato *et al.* 2012) tamamlanmasının ardından, ekzon nükleotid dizisi ASR3'üne oldukça benzer olan beşinci bir ASR geni açıklanmıştır. Yabani domates türleri de bu beş üyeli ASR gen ailesini kodluyor olması domatesin evcilleştirilmesi ve yetiştirilmesi sırasında bu ailenin kaybolmadığını düşündürmektedir (Frankel *et al.* 2006; Fischer *et al.* 2013). Ayrıca ASR1, 2 ve 4 yabani domates türlerinden aktarılan genler de kuraklık ve soğuk stresi tarafından aktive edilmiştir. Bitki ASR genlerinin çoğu, düşük moleküler ağırlıklı proteinleri kodlamaktadır. Ek olarak, birkaç bitki türünün genomları, daha yüksek moleküler ASR polipeptitlerini kodlayan bir gen içermektedir (Silhavy *et al.* 1995; Hara *et al.* 2002; Yamada *et al.* 2007).

ASR proteinleri, güçlü hidrofiliklikleri nedeniyle küçük ve ısıya dayanıklı proteinler olarak karakterize edilmektedirler (Yang *et al.* 2005). ASR proteinleri, proteinlerin hidrofilin grubuna ait olduğu ileri sürülmüştür (Battaglia *et al.* 2008). Domates ASR1'in şaperon benzeri aktiviteye sahip (Konrad and Bar-Zvi, 2008) ve hem sitozol hem de çekirdeğe lokalize (Kalifa *et al.* 2004) olan doğal olarak sıralanmamış bir protein olduğu gösterilmiştir (Goldgur *et al.* 2007). Zambak poleni ASR proteini için ikili hücre altı yerleşimi de gösterilmiştir (Wang *et al.* 2005). Pirinç ASR1'in de şaperon benzeri aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Kim *et al.* 2012; Dai *et al.* 2011). ASR1, Zn^{2+} bağımlı DNA bağlama aktivitesine sahiptir (Kalifa *et al.* 2004, Rom *et al.* 2006). Zn^{2+} 'nın bağlanması üzerine ASR1 yapılandırılarak dimerize olmakta (Maskin *et al.* 2007; Goldgur *et al.* 2007) ve çekirdekte yer değiştirmektedir (Goldgur *et al.* 2007; Ricardi *et al.* 2012; Kim *et al.* 2009). Zn^{2+} ve Fe^{3+} iyonları soya fasulyesi ASR'sinin yapısını etkilemiştir (Li *et al.* 2013). Nükleer ASR proteinleri, spesifik promotör dizilerine bağlanarak gen ekspresyonunu modüle etmektedirler (Çakir *et al.* 2003; Kalifa *et al.* 2004; Saumonneau *et al.* 2008; Yang *et al.* 2005).

ASR genlerinin kuraklık ve tuzluluk stresinde merkezi bir rol oynadığı gösterilmiştir. ASR genlerinin aşırı ekspresyonu, transgenik bitkilerin su/ozmotik (Dai *et al.* 2011; Yang *et al.* 2005; Jeanneau *et al.* 2002), tuzluluk (Yang *et al.* 2005; Shkolnik-Inbar and Bar-Zvi, 2010; Yadav *et al.* 2012; Kalifa *et al.* 2004) ve soğuk (Kim *et al.* 2009; Hsu *et al.* 2011) streslerine karşı artan tolerans ile sonuçlanmıştır. Ancak, şimdiye kadar bu tepkiler yalnızca heterolog proteinlerin üretiminde izlenmiştir. Diğer bitki türlerinden ASR proteinlerini eksprese eden transgenik Arabidopsis bitkileri, abiyotik streslere karşı artan bir tolerans göstermiştir (Dai *et al.* 2011; Hsu *et al.* 2011). Arabidopsis'te domates ASR1'in ektojik ekspresyonunun, bitkinin ABA'ya, glikoza ve abiyotik strese toleransına, transkripsiyon faktörü ABI4 ile DNA bağlanması için rekabet yoluyla verdiği tepkiyi etkilediği gösterilmiştir (Shkolnik and Bar-Zvi, 2008). Bu nedenle, çalışılan gen(ler)e doğal olarak sahip olmayan

heterolog organizmalardaki ekspresyon araştırmaları, özellikle düzenleyici proteinler için dikkatle analiz edilmelidir.       sonuçlar, incelenen genin biyolojik rolünü doğrudan yansıtımayabilir. Ek olarak, ASR geninin, dallı zincirli amino asitlerin biyogenezinde etkisi olduğu gibi, karbonhidrat sinyali, şeker taşıma ve metabolizmada yer aldığı gösterilmiştir. ( akir *et al.* 2003; Frankel *et al.* 2007; Dominguez *et al.* 2013; Saumonneau *et al.* 2012; Virlovvet *et al.* 2011; Golan *et al.* 2014).

Domateste ilk ASR (ABA-stres-olgunlaşma) geninin klonlanmasından bu yana, patates, soya fasulyesi, mısır, karpuz, zambak, pirinç, üzüm ve muz gibi 20'den fazla bitkide 50'den fazla ASR geni bulunmuştur ve ASR gen ailesinin sayısı türler arasında değişiklik göstermektedir (Iusem *et al.*1993; Gonz lez and Iusem, 2014). ASR proteinlerinin çift işlevleri vardır. Birincisi, ASR proteinleri, su stresinin bitkilere verdiği zararı azaltmak için kuraklık stresi ortamlarında biyomakromolek lleri koruyabilen LEA proteinlerinin temel özelliklerine sahip olarak onların görevlerini gerçekleştirmektedirler. (Hundertmark and Hinch, 2008; Zan *et al.* 2020).

ASR genleri, bitki büyümesini ve stres tepkilerini düzenlemede önemli roller oynamaktadır. Zan ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada buğdayda 29 ASR geni tanımlamıştır. Buğday ASR (TaASR) gen ailesinde sırasıyla 23 çift tandem duplikasyon geni ve altı çift segmental duplikasyon geni bulunmuştur. Yayınlanmış RNA-seq verilerini ve 12 TaASR geninin qRT-PCR sonuçlarını kullanarak, abiyotik stresler altında TaASR genlerinin ekspresyon profillerini analiz edilmiştir. Genlerin çoğunun temel olarak tuz ve düşük sıcaklık stresine tepki verdiği tespit edilmiştir. Son olarak, hücre altı lokalizasyon ve kendi kendine aktivasyon deneyleri, 12 TaASR geni vasıtasıyla kodlanan proteinlerin tümünün çekirdekte ve hücre zarında mevcut olduğu ve tam uzunluktaki proteinlerin, transkripsiyon faktörleri olarak rollerini destekleyen kendi kendine aktivasyon potansiyeline sahip olduğunu göstermiş durumdadır. (Zan *et al.* 2020).

Okisjen gelişimini artırıcı protein-1 (OEE1)

OEE proteinleri genellikle 3 alt birimden oluşur. Bu proteinler, manganezi sağlamlaştıran ve tilakoid lümende sınırlandırılan ve fotosistem II'ye (PSII) bağlanan nükleer kodlu plastid proteinlerdir. Siyanobakterilerden yeşil alglere kadar fototrofik organizmalarda ve yüksek bitkilerin kloroplastlarında yüksek oranlarda muhafaza edilirler. (Yamamoto, 1988; Heide *et al.* 2004). Siyanobakterilerin, kırmızı alglerin ve yeşil bitkilerin OEE 1 proteinleri, birbirlerinin PSII çekirdekleriyle başarıyla yeniden meydana getirilebilirler (Ishida and Green, 2002). OEE proteininin antioksidan aktivitesi her ne kadar bildirilmemiş olsada, Heide ve arkadaşları yeşil alglerden *Scenedesmus obliquus*'un OEE 1'inde tioredoksin aktivitesini ifade

etmişirler (Mu *et al.* 2009). Tiorredoksin, fizyolojik bakımdan önemli bir antioksidan olarak görev yapabilir (Ishida and Green, 2002). Bu durum da OEE 1'in birden fazla fonksiyona sahip olduğunu düşündürmektedir (Kim *et al.* 2015).

OE33 veya 33 kDa manganez sağlamlaştırıcı protein (MSP) olarak da bilinen dışsal oksijen geliştiren güçlendirici protein 1 (OEE), fotosistem II'nin lümen tarafında konumlanmaktadır (Yamamoto and Nishimura, 1983; Zouni *et al.* 2001). Su oksidasyonu meydana gelirken manganez kümesini en iyi duruma getirdiği kanaati mevcuttur. Ayrıca genişletilmiş formasyonu reaksiyon merkezi D1 proteinini ışıktaki gerçekleşen oksijen radikallerinin etkisinden ve ısı stresinden koruyabilmektedir (Yamamoto, 2001). OEE işlevi, oksitlenmiş (disülfid) durumda iki korunmuş sistein kalıntısına ihtiyaç duyar, ancak bir sistein-alanin çift mutantının da etkin olduğu gösterilmiştir (Tanaka and Wada, 1988; Betts *et al.* 1996; Heide *et al.* 2004).

MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

Kullanılan bitkisel materyal

Araştırmada kullanılan bitki materyali *Triticum aestivum* (Alparslan genotipi) türünün tohumları kullanılmıştır. Bu tohumların çimlendirilmesinin sonucunda sağlanan bitki gövdeleri kullanılmıştır. Bu materyal Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesinden temin edilmiştir.

Yararlanılan alet ve cihazlar

Çalışma süresince faydalandığımız cihaz ve aletler aşağıda belirtilmiştir (Tablo 2).

Tablo 2. Çalışma Sırasında Kullanılan Cihazlar

Kullanılan Cihaz	Temin Edilen Firma
Azot Tankı	Termo, Electron Corporation
Buzdolabı	Arçelik, TÜRKİYE, 8190NF
Derin Dondurucu	Nuarie, U.S.A., -86 Ultralow Freezer, SN P07K-476316-PK
Elektroforez Akım Sağlayıcı	OWL OSP300-2Q, U.S.A.
Elektroforez Tankı (Yatay)	OWL B2, U.S.A.
Etüv	Memmert, UN55
Hassas Terazı	Mettler Toledo AL204, CHINA)
Jel Görüntüleme Sistemi	DNR BioImaging Systems MiniBis Pro, ISRAEL
Manyetik Karıştırıcı	Daihan Scientific MSH 20A, KOREA
Mikrodalga Fırın	Arçelik, TÜRKİYE, MD 592
Nanodrop	Qiagen/Qiagxpert 200061 24V F 2.5A
Otoklav	Hirayama, JAPAN, HVE 50, SN 030787253
Otomatik Pipetler	Eppendorf, GERMANY
PCR	Corbett Research CG1-96, AUSTRALIA
pH Metre	InoLab pH730 wtw Series, GERMANY
Spektrofotometre	Cecil, CE 5502
RT-PCR	Qiagen/Rotor-Gene Q
Saf Su Cihazı	GFL 2004, GERMANY
Santrifüj	Hettich, GERMANY, EBA-20
Steril Kabin	(Esco AC2-4E1, SINGAPORE) 27
Su Banyosu	Memmert WNB14, GERMANY
Vorteks	Velp Scientifica, F202A0173

Kullanılan çözelti ve solüsyonlar

Araştırma boyunca faydalanılan çözeltilerin kimyasal bileşenleri şunlardır:

Glifosat çözeltisi

- 200 μ M'lık glifosat çözeltisi hazırlamak için %98'lik glifosattan (Raundop) 50 ml alınıp üzeri 200 ml'ye tamamlanmıştır.

Triakontanol çözeltisi

- % 96'lık 1-Triakontanol'den 10.97 mg alınarak 15 ml saf steril su ile çözülmüştür. Yine steril su ile 25 ml'ye tamamlanarak 1mM stok çözelti elde edilmiştir.
- Stok çözeltiden 10 ml alınıp üzeri 250 ml'ye tamamlanarak 40 μ M uygulama dozu hazırlanmıştır. Diğer dozlar bu dozdan seyreltilerek hazırlanmıştır.

TE tamponu

- pH değeri 8.0 olan 10 mM Tris-HCl
- pH değeri 8.0 olan 1 mM EDTA (pH 8.0)

%70'lik Etil Alkol

- 70 ml (%97'lik) etil alkol alınmış ve steril edilmiş saf (distile) su ilave edilerek nihai hacmi 100 ml olacak şekilde ayarlanmıştır.

Enzimlerin Homojenizasyon Çözeltisi

- 3.4 g KH_2PO_4 200 ml saf suda çözülmüştür. Üzerine %1 PVP ve 1mM EDTA eklenmiştir. Çözeltinin pH 7.0 olacak şekilde tertip edilmiş ve saf su ilavesiyle birlikte nihai hacim 250 ml olacak şekilde ayarlanmıştır.

CAT Analizinde Kullanılan Tampon

- 1.4 g KH_2PO_4 80 ml saf suda çözülmüştür. Çözeltinin pH'sı 7.5'e ayarlanmış ve saf su ilavesiyle birlikte nihai hacim 100 ml olacak şekilde tamamlanmıştır.

SOD Analizinde Kullanılan Tampon

- 1.7 g KH_2PO_4 tartılarak 200 ml saf suda çözülmüştür. Daha sonra pH: 7.8 olacak şekilde tertip edilmiş ve saf su ilavesiyle birlikte son hacim 250 ml'ye tamamlanmıştır.

Trikloroasetik Asit (TCA) Çözeltisi

- 5 g TCA 100 ml saf su içerisinde eklenmiştir. Tam olarak homojen oluncaya kadar karıştırılmıştır.

Tiobarbutirik Asit (TBA) Çözeltisi

- 20 g TCA 100 ml saf su içinde çözülmüştür. Üzerine 0.5 g TBA ilave edilmiş ve tam olarak homojen oluncaya kadar karıştırılmıştır.

Titanyum Disülfat Çözeltisi

- Titanyum disülfattan 1 g alınarak 20 ml saf su içerisinde çözdürülmüştür.

Ethidiyum Bromür (Et-Br) Çözeltisi

- 50 ml 0.5xTBE tamponuna 30 µl ethidium bromür katılarak tertip edilmiştir. Bu karışımın oda sıcaklığında ve karanlıkta muhafazası sağlanmıştır.

10X TBE tamponu.

- 107 g Tris-Base
- 55 g Borik Asit
- 5.8 g EDTA

500 ml distile suda çözülmüştür. Daha sonra çözelti 1000 ml'ye tamamlanmış ve pH 8.0'e ayarlanmıştır.

Primerlerin Hazırlanması: Kullanılan primerler üretici firma tarafından önerilen oranda seyreltilerek önce stok solüsyonu, akabinde de uygun hesaplamalar yardımıyla çalışma solüsyonları hazırlanmıştır.

Deney Bitkilerine Glifosat ve Triakontanol Uygulaması

Çalışmamızda *Triticum aestivum* türünün ALPARSLAN genotipine ait tohumlar kullanılmıştır. Tohumlar (*Triticum aestivum* L.) %0.1 sodyum hipoklorit solüsyonu ile sterilize edilecek ve 3 tekerrür halinde distile su ile yıkanmıştır. Saksıların her birine 15 tohum olacak şekilde ekilmiştir. Saksılar, 25/20°C gündüz/gece sıcaklığına ve %70 bağıl nem ile 16 saat aydınlık/8 saat karanlık fotoperiyoduna tabi tutulmuştur. Ekimden sonraki ilk hafta boyunca fideler distile su ile sulanmıştır. Üç yaprak döneminde olan fidanlara 1 hafta boyunca TRIA (Sigma Aldrich) 10, 20 ve 40 µM olan üç konsantrasyon (Asadi Karam *et al.* 2017) bitkilere spreyci olarak uygulanmıştır. Bu şekilde 1 hafta gelişen bitkilere 200 mM glifosat

uygulanmış ve 1 hafta daha büyümesi beklenmiştir (Mierau *et al.* 2020). Deneyin sonunda tüm numunelerin yaprakları toplanmış ve daha sonra analizler için -80 °C'de saklanmıştır.

Antioksidant Sistem Analizleri

Antioksidan enzim aktivitelerinin belirlenmesi

0.5 g buğday yaprağı alınarak 5 ml 100 mM'lık soğuk fosfat tamponu (pH 7.4, 1 mM EDTA ve %4 (a/h) çözünmeyen polivinilpirolidon) içinde homojenize edilmiştir. Daha sonra, 30 dakika boyunca 10000 x g'de santrifüj yapılmıştır. Supernatant alınarak enzim aktivite deneylerine kadar -80 °C'de tutulmuştur.

Süperoksit dismutazın (SOD) aktivitesi, Dhindsa *et al.* (1981) tarafından verilen protokole göre yapılmıştır. SOD'un nitroblue tetrazolyum (NBT) uygulanarak 560nm'de absorbans değeri kaydedilmiştir. Spektrofotometre küvetine (3 ml) riboflavin ihtiva etmeyen reaksiyon karışımından 2.58 ml alınarak üzerine 30 µl homojenat ilave edilmiştir. Daha sonra bu karışımın içerisine 13 µM'lık riboflavin çözeltisinden 390 µl pipetlenip karıştırma işlemi yapıldıktan hemen sonra beyaz bir ışık kaynağının altında 15 dakika bekletilmiştir. Reaksiyon ışık kaynağı kapatılarak durdurulmuştur. 15 dakikalık bir süze zarfında renk açılma yoğunluğu 560 nm'de köre karşı okunmuştur.

Katalaz (CAT) analizi Aebi (1984) tarafından verilen protokole göre yapılmıştır. 50 mM KH₂PO₄ tamponu (pH 7.2) ve 40 mM H₂O₂ substrat çözeltisinden 1.5 ml konulmuştur. Daha sonra üzerine 25 µl enzim ekstraktı eklenmiştir. Her bir tüp spektrofotometrede 240 nm'de 5 dakikalık bir zaman periyodunda 1 dakika aralıklarla köre karşı absorbans değeri okunmuş ve H₂O₂'nin absorbansdaki doğrusal olarak azaldığı aralıktan her dakika için absorbans azalması hesaplanmıştır.

Peroksidaz (POD) aktivitesi Tiryaki (2015), tarafından bildirilen protokol kullanılarak ölçülmüştür. Reaksiyon numunesi; 54 µL guaiacol ve 15 µL H₂O₂ alınır. 0.1mM fosfat tamponu içerisinde çözünmüştür. Küvete 3 ml tampondan konulmuştur ve üzerine 10 µL enzim ekstresi ilave edilmiştir. Kontrol numunesi ise, PBS (2.8 ml), guaiacol (0.1 ml) ve H₂O₂ (0.1 ml) içerecek şekilde ayarlanmıştır. 470 nm absorbans dalga boyunda 5 dakika boyunca absorbans artışı kaydedilerek POD aktivitesi ölçülmüştür.

Oksidatif stres biyomarkırları (hidrojen peroksit ve süperoksit) ve lipid peroksidasyonu

Hidrojen peroksit (H₂O₂) miktarının belirlenmesi Tiryaki (2015) tarafından gerçekleştirilen protokole uygun olarak yapılmıştır. Bu analiz için 0.5 g yaprak alınmış ve 10 ml soğuk aseton içinde homojenize edilmiştir. Daha sonra homojenat 10.000 xg'de 10 dakika

santrifüj edilmiştir. 1.5 ml alınan süpernatantın üzerine 0.3 ml %19'luk NH_4OH (amonyum hidroksit) ve 0.15 ml %5'lik $\text{Ti}(\text{SO}_4)_2$ (titanyum disülfat) ilavesi yapılarak karışması sağlanmıştır. Çökelek oluşturmaının akabinde, karışım 10.000 xg'de 10 dakika daha santrifüj işlemi uygulanmıştır. Supernatant uzaklaştırılmıştır. Geriye kalan peletin üzerine 3 ml 2 M'lık sülfürik asit (H_2SO_4) ilave edilmiş ve 415 nm'de absorbans değeri ölçülmüştür.

Lipid Peroksidasyon Seviyesinin Belirlenmesi

Lipid peroksidasyonu için Tiryaki (2015) tarafından rapor edilen protokole göre yürütülmüştür. 0.5 g yaprak sıvı azotta öğütülmüştür. Üzerine %5'lik 5 ml TCA ilave edilerek homojenize olması sağlanmış, ardından homojenat 6000 rpm'de 15 dakika santrifüjlenmiştir. Elde edilen süpernatantın üzerine %0.5'lik 1 ml TBA ekleme yapılmıştır. Elde edilen karışım 97 °C'de katı ısı bloklarında 30 dakika inkübe edilmiştir. Örnekler alınarak tekrar 6000 rpm'de 15 dakika santrifüjlenerek süpernatant alınmıştır.

Lipid peroksidasyonun hesaplanmasında 532 nm ve 600 nm kullanılmıştır. 532 nm'de ölçülen absorbans değerinden 600nm'de belirlenen değer çıkarılmış ve 1 ml çözeltideki MDA (nmol/ml): $[(A_{532}-A_{600})/155000] \times 106$ formülü kullanılarak hesaplanmıştır.

Gen Ekspresyon Analizi

RNA izolasyonu

RNA izolasyonu gerçekleştirebilmek amacıyla RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)'nden faydalanılmış olup, üretici firmanın protokol yönergesine tamamiyle uygun olacak bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

- Maksimum 100 mg bitki numunesi DEPC ile steril edilmiş ve havanda sıvı azot yardımıyla parçalanıp ve 2 ml'lik tüplere aktarılmıştır.
- 450 µl Buffer RTL veya Buffer RLC bitki numunesi üzerine eklendikten sonra güçlü bir şekilde vorteksleme yapılmıştır.
- Bu karışım lila tüplere aktarılmış ve 2 dakika en yüksek hızda santrifüj edilmiştir. Supernatant yeni bir santrifüj tüpüne aktarılmıştır.
- Elde edilen supernatanta (%96-100)'lük etanolden 0.5 volume eklenmiş ve pipetleme yapılmıştır.
- Numune (yaklaşık 650 µl) pembe kolonlara alınmış ardından 15 sn 10000 rpm'de santrifüj edilmiş ve sıvı olan kısım uzaklaştırılmıştır.
- RNeasy spin kolona 700 µl Buffer RWI eklenmiştir. Yine 15 sn 10000 rpm'de santrifüje edilmiş ve sıvı olan kısım uzaklaştırılmıştır.

- RNeasy spin kolona 500 µl Buffer RPE eklenmiştir. 15 sn 10000 rpm’de santrifüj edilmiş ve sıvı olan kısım uzaklaştırılmıştır.
- Spin kolona 500 µl Buffer RPE eklenmiş ve 2 dk 10000 rpm’de çevrilmiştir.
- Kolon yeni bir 1.5 ml’lik tüpe alınmıştır. Üzerine 30-50 µl RNase Free Water eklenmiştir. 1 dk 10000 rpm’de santrifüj işlemi uygulanmıştır.
- RNA örnekleri kullanılıncaya kadar –86 °C’de saklanmıştır.
- Elde edilen RNA’ların miktarlarını belirlemek için Qiagen Qiaxpert System ile absorbans (A) değerleri okunmuştur. RNA miktarları okunduktan sonra, numunelerin hepsinin miktarları 0,1ng-5µg olacak şekilde ayarlanmıştır.

cDNA Sentezi

cDNA sentezi Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Sentez Kiti yardımıyla üretici firma tarafından belirlenen yönergelerle uygun olacak şekilde yapılmıştır.

- Steril bir tüpe miktarı 0,1ng-5 µg olacak şekilde toplam RNA, 1 µl oligo (dT)₁₈ primer konulmuş ve nihai hacim 12 µl’ye tamamlanmıştır.
- Bu karışım hafif bir şekilde santrifüjlenmiştir. Sonrasında 65°C’de 5 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan çıkarılır çıkarılmaz buzun üzerine konulmuştur.
- Bu karışımın üzerine 4 l 5X Reaksiyon Buffer, 1 µl RiboLock RNase Inhibitor, 2 µl 10 mM dNTP Mix ve 1 µl RevertAid M-MuLV RT eklenir ve nihai hacim 20 µl olmuştur.
- Karışım hafif bir şekilde santrifüj edilmiş ve PCR’a yerleştirilmiştir. PCR döngüsünde; 42°C’de 60 dk inkübasyonun akabinde 70°C’de 5 dk reaksiyon kurularak yapılmıştır.

qRT-PCR ile gen ekspresyon analizi

Çalışmamızda Housekeeping gen olarak β-Actin ve GAPDH seçilmiştir. Kullanılacak olan primerlerin baz dizileri aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 3. Çalışmada Gen Ekspresyon Analizlerinde Kullanılan Primerlerin Sekans Dizilimi

Primerler	İleri Primer 5’→3’	Geri Primer 3’→5’
<u>β-Actin</u>	<u>GTGTCGCACCAGAGGATCAT</u>	<u>CGCTGGCATAACAAGGACAGA</u>
<u>GAPDH</u>	<u>GAGGTTGCTGTGTTTGGCTG</u>	<u>GGAGCAAGGCAGTTAGTGGT</u>
<u>EPPS</u>	<u>GACGGTGTGACCACAAAAGC</u>	<u>TGGTACGCCATCAAGCACAT</u>
<u>ASR1</u>	<u>CCGGTCATCCCTCTTCTAGC</u>	<u>CCTCGTGCTTCTCGTACTGT</u>
<u>OEE1</u>	<u>GCTGACCTTCGACGAGATCC</u>	<u>CAAGGGTGTAGGTGAGACGG</u>

qRT-PCR işlemini yaparken Thermo Scientific Maxima SYBR Green/ROX qPCR Kiti kullanılmıştır. Üretici firma tarafından belirlenen protokol talimatlarına uygun olarak yapılmıştır.

- Kullanılan bütün solüsyonlar hafifçe vortekslenmiştir.
- Stok master mix aşağıda belirtilen oranlarda hazır hale getirilmiştir.

Maxima SYBR Green/ROX QPCR Master Mix (2X)	12.5 µl
İleri Primer	0.3 µM
Geri Primer	0.3 µM
Kalıp DNA	500 ng
Steril su	Nihai hacim 25 µl'ye tamamlanmıştır

- Karışım PCR tüplerine transfer edildikten sonra hafif bir şekilde santrifüj işlemi uygulanmıştır.
- PCR döngüsü aşağıdaki gibi ayarlanmıştır;

1)	10dk	95°C
2)	15 sn	95°C
	30 sn	* °C
		40 döngü
	30 sn	72°C

* Tasarlanan primerin bağlanma sıcaklığına göre değişim göstermektedir.

Bulgularının Değerlendirilmesi

Her örnek üç tekerrür şeklinde analiz edilmiştir. Enzim aktivitesi değerlerinin ve uygulama gruplarına ilişkin normal dağılım testi için Kolmogorov-Simirnov analizi kullanılmış ve verilerin çarpıklık ve basıklık değerleri kontrol edilmiştir. Araştırmanın sayısal verileri normal dağılıma uygun olduğu ve bağımlı değişkenler ikiden fazla olmasına bağlı olarak Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) uygulanmıştır. Varyansların homojenliği Levene's test istatistiği ile kontrol edilmiş ve varyansların homojenliği koşulunu sağlayan verilere çoklu karşılaştırma testleri uygulanmıştır. Üçten fazla grup karşılaştırmaları için Bonferroni ve eşit örneklem sayısına sahip grup karşılaştırmaları için Tukey testleri uygulanmıştır. Araştırma bulguları IBM SPSS Statistics 23 programı yardımıyla analiz edilmiştir.

Gen ekspresyonu sonucu elde edilen verilerin değerlendirilmesi ve istatistiksel analizi için örneklerin eşik (threshold) değerleri belirlenmiştir. RT-PCR analiz verilerine dayanarak her bir örneğin Ct değerleri elde edilmiştir. Bu verilerden elde ettiğimiz standart sapmalar

Microsoft Excel programı aracılığıyla hesap edilmiştir. Standart sapması küçük numunelerin 3 kez tekraren değerlendirmesi yapılmıştır. Buğday bitkilerinden elde edilen genlerin ifade oranları Livak ve Schmittgen (2001) göre $\Delta\Delta Ct$ oransal hesaplama algoritması tekniği yardımıyla tespit edilmiştir. <http://www.qiagen.com/tr/shop/genes-and-pathways/data-analysis-center-overview-page/> adresinde belirlenen değerler hem kontrol gruplarıyla hem de housekeeping genlerle kıyaslanarak değişim kat sayıları belirlenmiştir.



ARAşTIRMA BULGULARI

Triticum aestivum bitkisine uygulanan glifosat herbisitinin meydana getirdiği değişimlere TRIA'nın göstermiş olduğu etkiler belirlenmiştir. Bu bağlamda, glifosat ve TRIA uygulanan bitkilerin yapraklarında gen ekspresyonu, stres biyomarkırlarının miktarı ve enzimatik antioksidan stres yanıt analizleri gerçekleştirilmiştir.

Gen Ekspresyon Analizi

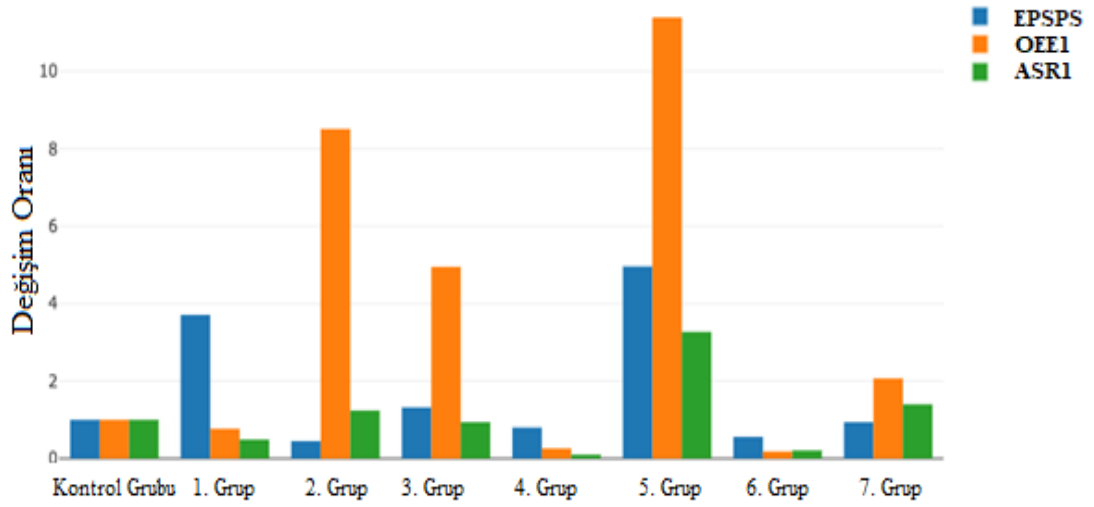
Çalışmamızda EPSPS, OEE1 ve ASR1 genlerinin uygulamalar sonucunda ekspresyonlarında meydana gelen değişim kat sayıları şekil 3'te ve ekspresyon büyüklüklerinin küme grafiği şekil 4'te gösterilmiştir.

EPSPS geninin ekspresyonunda yalnızca glifosat uygulanan bitkilerde yaklaşık 4 kat artış gözlenmiştir. 10 µM, 20 µM ve 40 µM olmak üzere üç doz uygulanan TRIA sonucunda 10µM dozda, kontrol grubuna oranla düşüş gözlenirken, 20µM dozda kontrol grubuna oranla kısmi bir artış gözlenmiştir. Glifosat uygulandıktan sonra 10 µM, 20 µM ve 40 µM olmak üzere üç doz TRIA uygulanan bitkilerde TRIA 10µM dozda yaklaşık 5 kat bir artış gözlenmiştir. Dahası, EPSPS geninin ekspresyonunda önemli yükselişler özellikle glifosat uygulamalarında meydana gelmiştir. Ayrıca, ekspresyonunun en düşük olduğu konsantrasyon TRIA 10µM'da olduğu gözlenmiştir.

Çalışmamızda gerçekleştirdiğimiz OEE1 gen ekspresyon analizi sonucunda kontrol grubuna göre yalnızca glifosat uygulanan bitkilerde önemsiz bir miktar düşüğü gözlenmiştir. TRIA 10µM, 20µM ve 40µM dozlarında ise sırasıyla yaklaşık 8 kat ve 5 kat bir artış görülürken TRIA 40µM konsantrasyonunda kontrol grubuna göre önemli bir düşüş görülmüştür. Glifosat uygulandıktan sonra 10µM, 20µM ve 40µM olmak üzere üç doz TRIA uygulanan bitkilerde 10µM dozda 10 katın üzerinde bir artış sağlanırken 40µM dozda ise 2 kat artış kaydedilmiştir. Ayrıca, Glifosat+TRIA 20µM konsantrasyonunda önemli bir düşüş görülmüş hatta ekspresyon seviyesi sıfır noktasına yaklaşmıştır.

ASR1 geninde meydana gelen ekspresyon değişikliklerinde ise TRIA 40µM ve Glifosat+TRIA 20µM dozlarında kontrole göre ekspresyonlarında azalma görülürken diğer dozlarda yükseldikleri gözlemlenmiştir. Bu genin en yüksek Glifosat+TRIA 10µM dozunda ekspre edildiği belirlenmiştir. Glifosat uygulandıktan sonra TRIA 10µM, 20µM ve 40µM dozları uygulanan bitkilerde 10µM dozda 3 kat ekspresyonun arttığı görülmüştür. Fakat,

20µM ve 40µM dozlarda artışın olmadığı aksine Glifosat+TRIA 20µM konsantrasyonda ciddi bir düşüş olduğu belirlenmiştir.



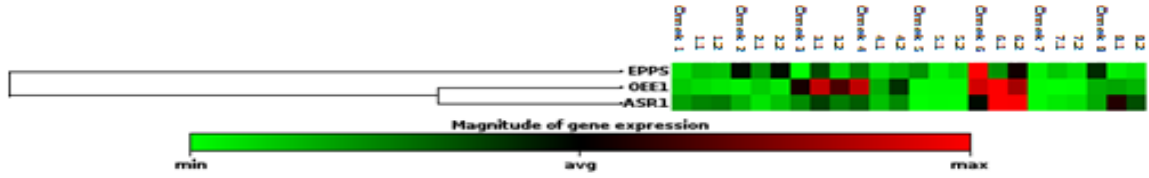
1.Grup: Glifosat, **2.Grup:** TRIA 10µM, **3.Grup:** TRIA 20µM, **4.Grup:** TRIA 40µM, **5.Grup:** Glifosat+TRIA 10µM, **6.Grup:** Glifosat+TRIA 20µM, **7. Grup:** Glifosat+TRIA 40µM

Şekil 3. Glifosat ve TRIA uygulanan buğday bitkilerinde EPSPS, OEE1 ve ASR1 genlerinin ekspresyon değişimleri

Bu sonuçlara göre;

- EPSPS geni en yüksek Glifosat + TRIA 10 µM konsantrasyonunda upregüle olmuştur. Bunun yanı sıra en düşük ekspresyon ifadesi TRIA 10 µM konsantrasyonunda görülmüştür. TRIA 10 µM ve Glifosat + TRIA 10 µM uygulamalarında EPSPS geninin ekspresyonunda önemli değişimler ($p<0,05$) meydana gelmemiştir.
- OEE1 geni en yüksek Glifosat + TRIA 10 µM konsantrasyonunda upregüle olmuştur. Bunun yanı sıra en düşük ekspresyon ifadesi Glifosat + TRIA 20 µM konsantrasyonunda görülmüştür. TRIA 10 µM, TRIA 40 µM, Glifosat + TRIA 10 µM ve Glifosat + TRIA 20 µM uygulamalarında EPSPS geninin ekspresyonunda önemli değişimlerin ($p<0,05$) olduğu belirlenmiştir.
- ASR1 geni en yüksek Glifosat + TRIA 10 µM konsantrasyonunda upregüle olmuştur. Bunun yanı sıra en düşük ekspresyon ifadesi TRIA 40 µM görülmüştür. TRIA 40 µM, Glifosat + TRIA 10 µM ve Glifosat + TRIA 20 µM uygulamalarında EPSPS geninin ekspresyonunda önemli değişimlerin ($p<0,05$) meydana geldiği anlaşılmıştır.

Bu göstergeler ışığında; EPSPS, OEE1 ve ASR1 genlerinin en yüksek ifade oranlarının Glifosat + TRIA 10 µM konsantrasyonunda gerçekleştiği gözlenmiştir. Bunun yanı sıra en düşük ekspresyon seviyelerinin ise Gly+TRIA 20µM’da gerçekleşmiştir.



Şekil 4. Glifosat ve TRIA uygulanan buğday bitkilerinde EPSPS, OEE1 ve ASR1 genlerinin ekspresyon büyüklüklerinin küme grafiği

Fizyolojik Analizler

Çalışmamızda *Triticum aestivum* bitkisine uygulanan glifosat herbisiti ve TRIA bitki büyüme düzenleyicisinin antioksidan sistemde meydana getirdikleri değişimlerin belirlenmesi için stres biyomarkır ve antioksidan enzim miktarlarındaki değişimler analiz edilmiştir. Bunun için tek yönlü varyan analizi yapılmış ve meydana gelen değişimler Tablo 4 verilmiştir.

Yapılan analiz sonuçlarına göre; ($F(7,16) = 663.724$; $p < .05$) Hidrojen peroksit enziminin aktivite değerlerinin uygulama gruplarına göre anlamlı olarak farklılaştığı analiz edilmiştir. ($F(7,16) = 22.228$; $p < .05$) Peroksidaz enziminin aktivite değerlerinin uygulama gruplarına göre farklılaştığı analiz edilmiştir. ($F(7,16) = 1.018$; $p > .05$) Katalaz enziminin aktivite değerlerinin uygulama gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde farklılaşmadığı belirlenmiştir. ($F(7,16) = 4588.216$; $p < .05$) Malondialdehit enziminin aktivite değerlerinin uygulama gruplarına göre farklılaştığı tek yönlü varyans analizi sonucunda saptanmıştır. ($F(7,16) = 5.151$; $p < .05$)) Süperoksit enziminin aktivite değerlerinin uygulama gruplarına göre anlamlı olarak farklılaştığı belirlenmiştir.

Tablo 4. Enzim Aktivitesi Değerlerinin Uygulama Gruplarına Göre Tek Yönlü Varyans Analizi İle Karşılaştırılması

	Uygulama Grupları	N	Ortalama	Standart Sapma	F	p
H ₂ O ₂	KONTROL	3	2992.70	7.40	663.724	0.000*
	GLY 200 µM	3	2247.21	13.24		
	TRIA 10 µM	3	2749.67	28.99		
	TRIA 20 µM	3	2777.40	30.36		
	TRIA 40 µM	3	2435.71	10.67		
	GLY+TRIA 10 µM	3	2334.39	20.78		
	GLY+TRIA 20 µM	3	2426.82	19.31		
	GLY+TRIA 40 µM	3	2989.35	15.30		
POD	KONTROL	3	36.54	1.67	22.228	0.000*
	GLY 200 µM	3	37.92	1.03		
	TRIA 10 µM	3	46.88	4.86		
	TRIA 20 µM	3	53.16	8.51		
	TRIA 40 µM	3	71.10	5.23		
	GLY+TRIA 10 µM	3	63.65	3.01		
	GLY+TRIA 20 µM	3	30.31	7.86		
	GLY+TRIA 40 µM	3	40.10	4.44		
CAT	KONTROL	3	23.90	0.35	1.018	0.455
	GLY 200 µM	3	24.02	0.07		
	TRIA 10 µM	3	23.76	0.13		
	TRIA 20 µM	3	23.90	0.15		
	TRIA 40 µM	3	23.68	0.23		
	GLY+TRIA 10 µM	3	24.04	0.55		
	GLY+TRIA 20 µM	3	23.72	0.15		
	GLY+TRIA 40 µM	3	23.62	0.20		
MDA	KONTROL	3	0.35	0.00	4588.216	0.000*
	GLY 200 µM	3	0.62	0.00		
	TRIA 10 µM	3	0.34	0.01		
	TRIA 20 µM	3	0.27	0.00		
	TRIA 40 µM	3	0.40	0.00		
	GLY+TRIA 10 µM	3	0.90	0.01		
	GLY+TRIA 20 µM	3	0.51	0.01		
	GLY+TRIA 40 µM	3	0.31	0.01		
SOD	KONTROL	3	68.36	1.85	5.151	0.003*
	GLY 200 µM	3	67.89	0.90		
	TRIA 10 µM	3	75.32	0.46		
	TRIA 20 µM	3	72.64	1.78		
	TRIA 40 µM	3	72.92	0.80		
	GLY+TRIA 10 µM	3	71.45	0.39		
	GLY+TRIA 20 µM	3	69.64	0.90		
	GLY+TRIA 40 µM	3	70.00	0.85		

*p< .005 Tek Yönlü Varyans Analizi

Oksidatif Stres Biyomarkır Analizi

Hidrojen peroksit (H₂O₂)

Yapılan post hoc testleri sonucunda hidrojen peroksit enziminin aktivite değerlerinin gruplar arasında anlamlı olarak farklılaştığı belirlenmiştir. Bu değişimler Tablo 5 ve Şekil 5'te verilmiştir.

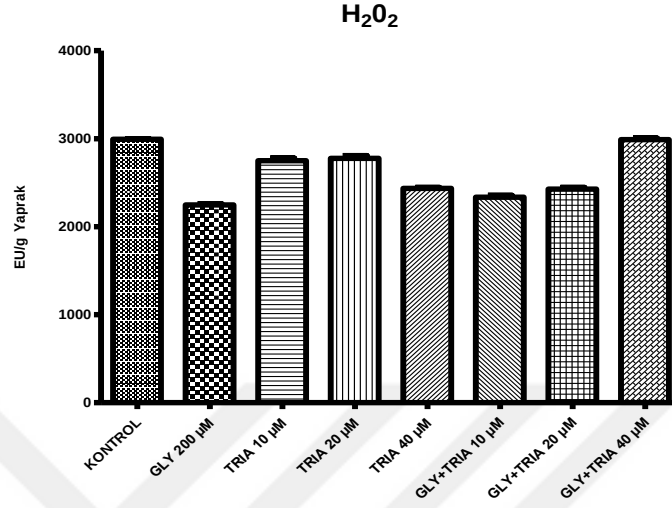
Tablo 5. H₂O₂ Stres Biyomarkırının Aktivite Değerlerinin Uygulama Gruplarına Göre Tukey Çoklu Karşılaştırma Testi İle Karşılaştırılması

Uygulama Grupları	Ortalama Fark	q	Anlamlı Fark	p
KONTROL ve GLY 200 µM	745.5	65.13	Var	***
KONTROL ve TRIA 10 µM	243	21.23	Var	***
KONTROL ve TRIA 20 µM	215.3	18.81	Var	***
KONTROL ve TRIA 40 µM	557	48.66	Var	***
KONTROL ve GLY+TRIA 10 µM	658.3	57.51	Var	***
KONTROL ve GLY+TRIA 20 µM	565.9	49.44	Var	***
KONTROL ve GLY+TRIA 40 µM	3.344	0.2921	Yok	-
GLY 200 µM ve TRIA 10 µM	-502.5	43.9	Var	***
GLY 200 µM ve TRIA 20 µM	-530.2	46.32	Var	***
GLY 200 µM ve TRIA 40 µM	-188.5	16.47	Var	***
GLY 200 µM ve GLY+TRIA 10 µM	-87.17	7.616	Var	**
GLY 200 µM ve GLY+TRIA 20 µM	-179.6	15.69	Var	***
GLY 200 µM ve GLY+TRIA 40 µM	-742.1	64.84	Var	***
TRIA 10 µM ve TRIA 20 µM	-27.72	2.422	Yok	-
TRIA 10 µM ve TRIA 40 µM	314	27.43	Var	***
TRIA 10 µM ve GLY+TRIA 10 µM	415.3	36.28	Var	***
TRIA 10 µM ve GLY+TRIA 20 µM	322.9	28.21	Var	***
TRIA 10 µM ve GLY+TRIA 40 µM	-239.7	20.94	Var	***
TRIA 20 µM ve TRIA 40 µM	341.7	29.85	Var	***
TRIA 20 µM ve GLY+TRIA 10 µM	443	38.7	Var	***
TRIA 20 µM ve GLY+TRIA 20 µM	350.6	30.63	Var	***
TRIA 20 µM ve GLY+TRIA 40 µM	-212	18.52	Var	***
TRIA 40 µM ve GLY+TRIA 10 µM	101.3	8.852	Var	***
TRIA 40 µM ve GLY+TRIA 20 µM	8.891	0.7768	Yok	-
TRIA 40 µM ve GLY+TRIA 40 µM	-553.6	48.37	Var	***
GLY+TRIA 10 µM ve GLY+TRIA 20 µM	-92.43	8.075	Var	***
GLY+TRIA 10 µM ve GLY+TRIA 40 µM	-655	57.22	Var	***
GLY+TRIA 20 µM ve GLY+TRIA 40 µM	-562.5	49.14	Var	***

***p<0.0001 Tukey Çoklu Karşılaştırma Testi

**p<0.001

Kontrol grubu hidrojen peroksit enziminin aktivite değerleri Gly 200 μ M, TRIA 10 μ M, TRIA 20 μ M, TRIA 40 μ M, gly+TRIA 10 μ M, gly+TRIA 20 μ M gruplarına göre anlamlı olarak artış gösterirken ($p<.05$), kontrol grubu değerleri ve gly+TRIA 40 μ M grubu değerleri arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p=1.00$).



Şekil 5. H₂O₂ stres biyomarkırının aktivite değerlerinin uygulama gruplarına göre karşılaştırılması

Ayrıca, Şekil 5'te de görüldüğü gibi Gly 200 μ M grubunun hidrojen peroksit aktivite değerleri TRIA 10 μ M, TRIA 20 μ M, TRIA 40 μ M, Gly+TRIA 10 μ M, gly+TRIA 20 μ M ve Gly+TRIA 40 μ M gruplarına göre anlamlı olarak artmıştır ($p<.05$). TRIA 10 grubu ile TRIA 20 grubu değerlerinin arasında anlamlı bir değişimin olmadığı analiz edilmiştir ($p>.05$). TRIA 10 μ M grubunun hidrojen peroksit aktivite değerleri TRIA 40 μ M, gly +TRIA 10 μ M gly +TRIA 20 μ M gruplarının değerlerine göre anlamlı olarak artarken, gly+TRIA 40 μ M grubuna göre azalmıştır ($p<.05$). TRIA 20 μ M grubunun hidrojen peroksit aktivite değerleri TRIA 40 μ M, gly+TRIA 10 μ M ve gly+TRIA 20 μ M gruplarına göre artarken gly+TRIA 40 μ M grubuna göre anlamlı şekilde azalmıştır ($p<.05$). TRIA 40 grubunun hidrojen peroksit aktivite değerleri gly+TRIA 10 μ M grubuna göre anlamlı olarak artarken, gly+TRIA 40 μ M grubuna göre azalmıştır ($p<.05$). Aynı zamanda TRIA 40 μ M grubu ve gly+TRIA 20 μ M grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamamıştır ($p>.05$). Gly+TRIA 10 μ M grubu kontrol ve gly+TRIA 40 μ M gruplarına göre anlamlı olarak azalmıştır. Ayrıca gly+TRIA 10 μ M grubunun hidrojen peroksit aktivite değerleri ve gly 200 μ M, TRIA 40 μ M, gly+TRIA 20 μ M gruplarının değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamamıştır ($p>.05$). Gly+TRIA 20 μ M grubunun hidrojen peroksit aktivitesi kontrol ve gly+TRIA 40 μ M gruplarına göre anlamlı olarak azaldığı gösterilmiştir ($p<.05$). Gly+TRIA 40 μ M grubunun hidrojen peroksit aktivitesi kontrol grubu haricinde tüm uygulama

gruplarında artış göstermiştir ($p>.05$). Gly+TRIA 40 μ M grubu ve kontrol grubu arasında ise istatistiksel olarak bir fark saptanamamıştır ($p=1.00$).

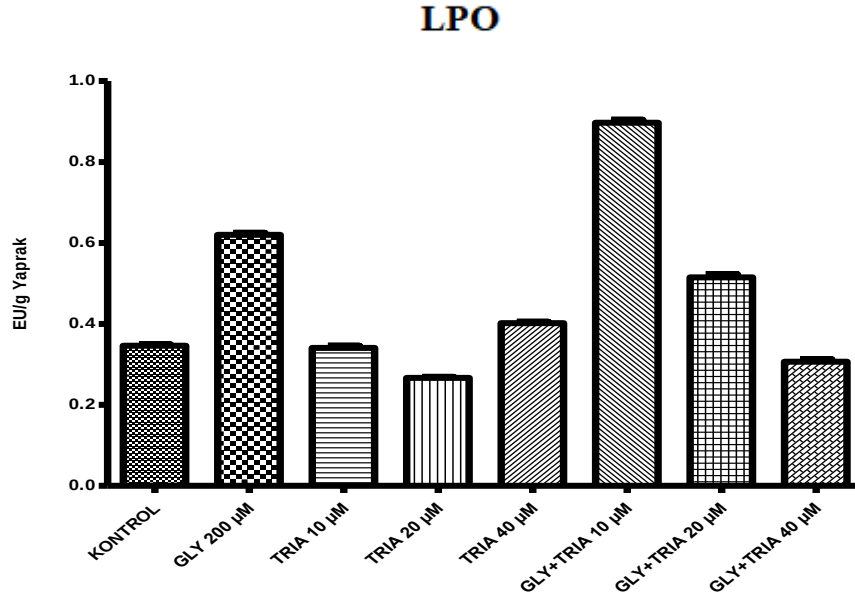
Lipit peroksidasyonu (LPO)

Yapılan post hoc testleri sonucunda Lipit peroksidasyonu (LPO) için MDA değerlerinin gruplar arasında anlamlı olarak farklılaştığı belirlenmiştir. Bu değişimler Tablo 6 ve Şekil 6'da verilmiştir.

Tablo 6. LPO Stres Biyomarkırının Seviyeleri Uygulama Gruplarına Göre Tukey Çoklu Karşılaştırma Testi İle Karşılaştırılması

Uygulama Grupları	Ortalama Fark	q	Anlamlı Fark	p
KONTROL ve GLY 200 μ M	-0.2742	88.12	Var	***
KONTROL ve TRIA 10 μ M	0.005233	1.682	Yok	-
KONTROL ve TRIA 20 μ M	0.0795	25.55	Var	***
KONTROL ve TRIA 40 μ M	-0.05597	17.99	Var	***
KONTROL ve GLY+TRIA 10 μ M	-0.5508	177	Var	***
KONTROL ve GLY+TRIA 20 μ M	-0.1686	54.19	Var	***
KONTROL ve GLY+TRIA 40 μ M	0.03933	12.64	Var	***
GLY 200 μ M ve TRIA 10 μ M	0.2794	89.8	Var	***
GLY 200 μ M ve TRIA 20 μ M	0.3537	113.7	Var	***
GLY 200 μ M ve TRIA 40 μ M	0.2182	70.13	Var	***
GLY 200 μ M ve GLY+TRIA 10 μ M	-0.2766	88.9	Var	***
GLY 200 μ M ve GLY+TRIA 20 μ M	0.1056	33.93	Var	***
GLY 200 μ M ve GLY+TRIA 40 μ M	0.3135	100.8	Var	***
TRIA 10 μ M ve TRIA 20 μ M	0.07427	23.87	Var	***
TRIA 10 μ M ve TRIA 40 μ M	-0.0612	19.67	Var	***
TRIA 10 μ M ve GLY+TRIA 10 μ M	-0.556	178.7	Var	***
TRIA 10 μ M ve GLY+TRIA 20 μ M	-0.1738	55.87	Var	***
TRIA 10 μ M ve GLY+TRIA 40 μ M	0.0341	10.96	Var	***
TRIA 20 μ M ve TRIA 40 μ M	-0.1355	43.54	Var	***
TRIA 20 μ M ve GLY+TRIA 10 μ M	-0.6303	202.6	Var	***
TRIA 20 μ M ve GLY+TRIA 20 μ M	-0.2481	79.74	Var	***
TRIA 20 μ M ve GLY+TRIA 40 μ M	-0.04017	12.91	Var	***
TRIA 40 μ M ve GLY+TRIA 10 μ M	-0.4948	159	Var	***
TRIA 40 μ M ve GLY+TRIA 20 μ M	-0.1126	36.2	Var	***
TRIA 40 μ M ve GLY+TRIA 40 μ M	0.0953	30.63	Var	***
GLY+TRIA 10 μ M ve GLY+TRIA 20 μ M	0.3822	122.8	Var	***
GLY+TRIA 10 μ M ve GLY+TRIA 40 μ M	0.5901	189.7	Var	***
GLY+TRIA 20 μ M ve GLY+TRIA 40 μ M	0.2079	66.83	Var	***

*** $p<0.0001$ Tukey Çoklu Karşılaştırma Testi



Şekil 6. LPO stres biyomarkırının seviyelerinin uygulama gruplarına göre karşılaştırılması

Şekil 6 'da da görüldüğü üzere Gly 200 µM grubunun LPO seviyeleri TRIA 10 µM, TRIA 20 µM, TRIA 40 µM, Gly+TRIA 20 µM ve Gly+TRIA 40 µM gruplarına göre artış gösterirken, Gly+TRIA 10 µM grubunun seviyelerine göre azalmıştır ($p<.05$). Analiz sonuçları TRIA 10 µM grubunun seviyelerinin TRIA 20 µM ve Gly+TRIA 40 µM gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı olarak artış gösterdiğini, TRIA 40 µM, Gly+TRIA 10 µM ve Gly+TRIA 20 µM gruplarının seviyelerine göre azaldığını göstermiştir ($p<.05$). TRIA 20 µM grubunun LPO seviyesi ise TRIA 40 µM, Gly+TRIA 10 µM, Gly+TRIA 20 µM ve Gly+TRIA 40 µM gruplarına göre anlamlı olarak azaldığı analiz edilmiştir ($p<.05$). TRIA 40 µM grubunda Gly+TRIA 10 µM ve Gly+TRIA 20 µM gruplarına göre azalış gösterdiği, Gly+TRIA 40 µM grubuna göre anlamlı artış gösterdiği belirlenmiştir ($p<.05$). Gly+TRIA 10 µM grubunun LPO seviyeleri Gly+TRIA 20 µM ve Gly+TRIA 40 µM gruplarının seviyelerine göre anlamlı olarak artmıştır ($p<.05$). Son olarak Gly+TRIA 20 µM grubunda LPO seviyeleri Gly+TRIA 40 µM grubunun değerlerine göre artmıştır ($p<.05$).

Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Değerlendirilmesi

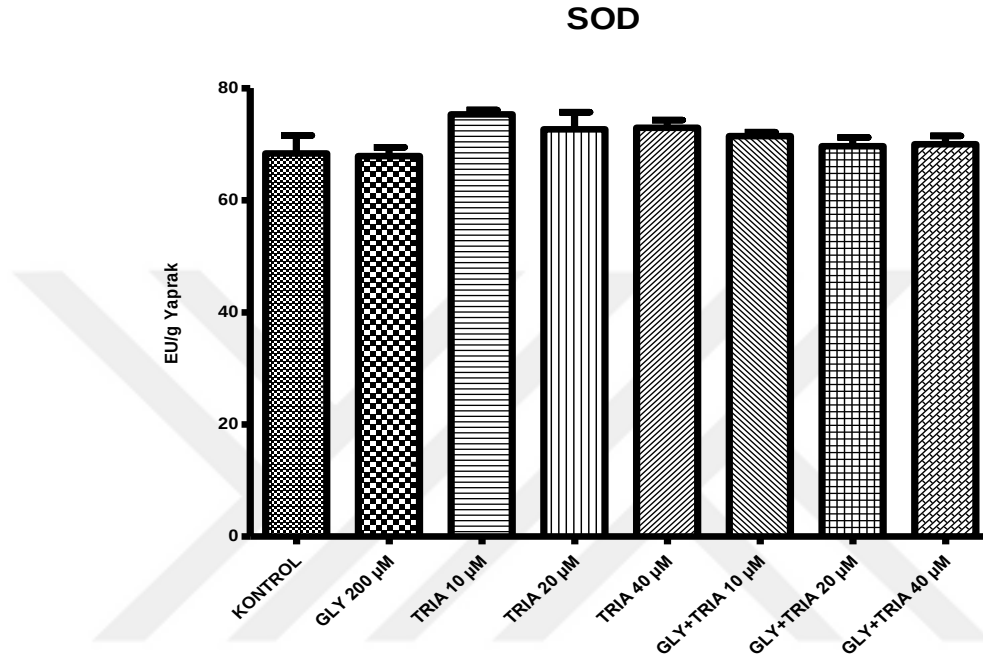
Süperoksit dismutaz (SOD)

Yapılan post hoc testleri sonucunda SOD antioksidan enziminin aktivite değerleri uygulama gruplarına göre anlamlı olarak farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Bu farklılıklar Tablo 7 ve Şekil 7'de gösterilmiştir.

Tablo 7. SOD Antioksidan Enzim Aktivite Değerleri Uygulama Gruplarına Göre Tukey Çoklu Karşılaştırma Testi İle Karşılaştırılması

Uygulama Grupları	Ortalama Fark	q	Anlamlı Fark	p
KONTROL ve GLY 200 µM	0.4628	0.4153	Yok	-
KONTROL ve TRIA 10 µM	-6.967	6.252	Var	**
KONTROL ve TRIA 20 µM	-4.286	3.846	Yok	-
KONTROL ve TRIA 40 µM	-4.567	4.099	Yok	-
KONTROL ve GLY+TRIA 10 µM	-3.094	2.777	Yok	-
KONTROL ve GLY+TRIA 20 µM	-1.282	1.151	Yok	-
KONTROL ve GLY+TRIA 40 µM	-1.645	1.476	Yok	-
GLY 200 µM ve TRIA 10 µM	-7.43	6.668	Var	**
GLY 200 µM ve TRIA 20 µM	-4.749	4.261	Yok	-
GLY 200 µM ve TRIA 40 µM	-5.03	4.514	Yok	-
GLY 200 µM ve GLY+TRIA 10 µM	-3.557	3.192	Yok	-
GLY 200 µM ve GLY+TRIA 20 µM	-1.745	1.566	Yok	-
GLY 200 µM ve GLY+TRIA 40 µM	-2.108	1.892	Yok	-
TRIA 10 µM ve TRIA 20 µM	2.682	2.407	Yok	-
TRIA 10 µM ve TRIA 40 µM	2.4	2.154	Yok	-
TRIA 10 µM ve GLY+TRIA 10 µM	3.873	3.476	Yok	-
TRIA 10 µM ve GLY+TRIA 20 µM	5.685	5.102	Var	*
TRIA 10 µM ve GLY+TRIA 40 µM	5.322	4.776	Yok	-
TRIA 20 µM ve TRIA 40 µM	-0.2815	0.2526	Yok	-
TRIA 20 µM ve GLY+TRIA 10 µM	1.191	1.069	Yok	-
TRIA 20 µM ve GLY+TRIA 20 µM	3.003	2.695	Yok	-
TRIA 20 µM ve GLY+TRIA 40 µM	2.641	2.37	Yok	-
TRIA 40 µM ve GLY+TRIA 10 µM	1.473	1.322	Yok	-
TRIA 40 µM ve GLY+TRIA 20 µM	3.285	2.948	Yok	-
TRIA 40 µM ve GLY+TRIA 40 µM	2.922	2.622	Yok	-
GLY+TRIA 10 µM ve GLY+TRIA 20 µM	1.812	1.626	Yok	-
GLY+TRIA 10 µM ve GLY+TRIA 40 µM	1.449	1.301	Yok	-
GLY+TRIA 20 µM ve GLY+TRIA 40 µM	-0.3626	0.3254	Yok	-
**p<0.001 Tukey Çoklu Karşılaştırma Testi				

Kontrol grubunun SOD aktive değerleri TRIA 10 µM grubuna göre azalmıştır. Dahası, Gly 200 grubunun aktive değerlerinin de TRIA 10 µM grubuna göre azaldığı görülmüştür. TRIA 10 µM grubunun aktive değerleri ise Gly+TRIA 20 µM grubuna göre arttığı analiz edilmiştir ($p<.05$). Bu gruplar dışında kalan diğer grupların birbirleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir ($p>.05$). Bu analiz sonuçları şekil 7’de de gösterilmiştir.



şekil 7. SOD antioksidan enzim aktivite değerlerinin uygulama gruplarının göre karşılaştırılması

Peroksidaz (POD)

Yapılan post hoc testleri sonucunda POD antioksidan enziminin aktivite değerlerinin gruplar arasında anlamlı olarak bir farklılık gösterdiği belirlenmiş ve meydana gelen farklılıklar Tablo 8 ve şekil 8’de gösterilmiştir.

Tablo 8. POD Antioksidan Enzim Aktivite Değerlerinin Uygulama Gruplarına Göre Tukey Çoklu Karşılaştırma Testi İle Değerlendirilmesi

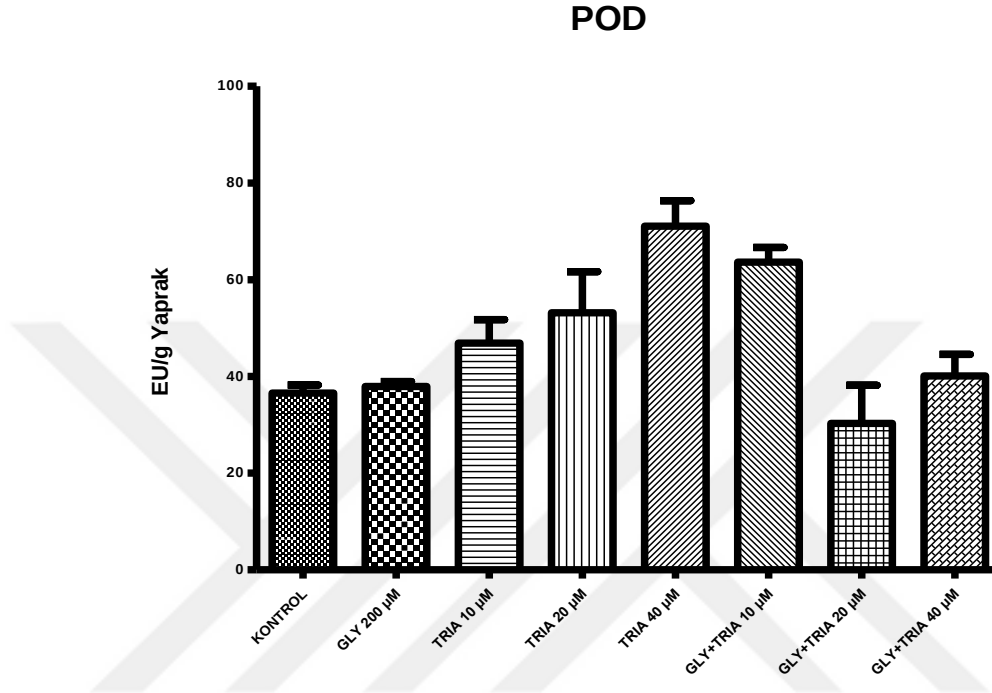
Uygulama Grupları	Ortalama Fark	q	Anlamlı Fark	p
KONTROL ve GLY 200 µM	-1.382	0.4587	yok	-
KONTROL ve TRIA 10 µM	-10.34	3.431	yok	-
KONTROL ve TRIA 20 µM	-16.61	5.514	var	*
KONTROL ve TRIA 40 µM	-34.56	11.47	var	***
KONTROL ve GLY+TRIA 10 µM	-27.11	8.998	var	***
KONTROL ve GLY+TRIA 20 µM	6.236	2.07	yok	-
KONTROL ve GLY+TRIA 40 µM	-3.557	1.181	yok	-
GLY 200 µM ve TRIA 10 µM	-8.956	2.973	yok	-
GLY 200 µM ve TRIA 20 µM	-15.23	5.056	var	*
GLY 200 µM ve TRIA 40 µM	-33.17	11.01	var	***
GLY 200 µM ve GLY+TRIA 10 µM	-25.73	8.539	var	***
GLY 200 µM ve GLY+TRIA 20 µM	7.618	2.529	yok	-
GLY 200 µM ve GLY+TRIA 40 µM	-2.176	0.7221	yok	-
TRIA 10 µM ve TRIA 20 µM	-6.275	2.083	yok	-
TRIA 10 µM ve TRIA 40 µM	-24.22	8.039	var	***
TRIA 10 µM ve GLY+TRIA 10 µM	-16.77	5.567	var	*
TRIA 10 µM ve GLY+TRIA 20 µM	16.57	5.501	var	*
TRIA 10 µM ve GLY+TRIA 40 µM	6.781	2.251	yok	-
TRIA 20 µM ve TRIA 40 µM	-17.94	5.956	var	*
TRIA 20 µM ve GLY+TRIA 10 µM	-10.5	3.484	yok	-
TRIA 20 µM ve GLY+TRIA 20 µM	22.85	7.584	var	**
TRIA 20 µM ve GLY+TRIA 40 µM	13.06	4.333	yok	-
TRIA 40 µM ve GLY+TRIA 10 µM	7.448	2.472	yok	-
TRIA 40 µM ve GLY+TRIA 20 µM	40.79	13.54	var	***
TRIA 40 µM ve GLY+TRIA 40 µM	31	10.29	var	***
GLY+TRIA 10 µM ve GLY+TRIA 20 µM	33.34	11.07	var	***
GLY+TRIA 10 µM ve GLY+TRIA 40 µM	23.55	7.817	var	***
GLY+TRIA 20 µM ve GLY+TRIA 40 µM	-9.794	3.251	yok	-

***p<0.0001 Tukey Çoklu Karşılaştırma Testi

**p<0.001

*p<0.01

Kontrol grubunun POD antioksidan enzim aktivite değerleri TRIA 20 μ M, TRIA 40 μ M ve Gly+TRIA 10 μ M gruplarına göre azalmıştır ($p<.05$). Buna ek olarak kontrol grubu ile Gly 200 μ M, TRIA 10 μ M, Gly+TRIA 20 μ M ve Gly+TRIA 40 μ M gruplarının değerleri arasında anlamlı bir farklılık saptanamamıştır ($p>.05$). Kontrol grubunda meydana gelen bu farklılıklar şekil 8’de de belirtilmiştir.



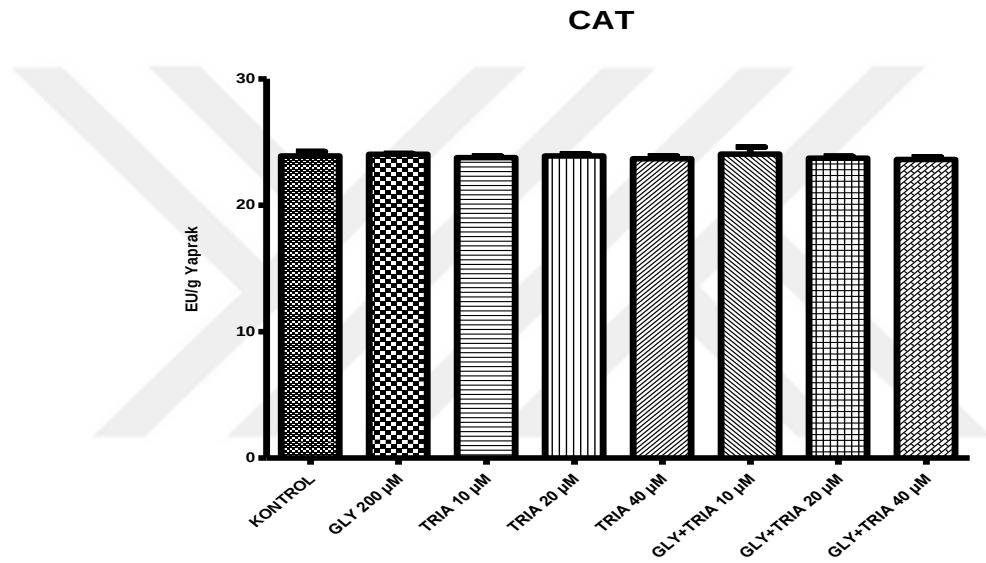
şekil 8 POD antioksidan enzim aktivite değerlerinin uygulama gruplarına göre standart sapmaları ve oranları

Gly 200 μ M grubu TRIA 20 μ M, TRIA 40 μ M Gly+TRIA 10 μ M gruplarına göre anlamlı olarak azalmıştır ($p<.05$). Buna ek olarak Gly grubu ile TRIA 10, Gly+TRIA 20 μ M ve Gly+TRIA 40 μ M gruplarının değerleri arasında anlamlı bir farklılık saptanamamıştır ($p>.05$). TRIA 10 μ M grubunun POD aktivite değerlerinin TRIA 40 μ M ve Gly+TRIA 10 μ M grubuna göre anlamlı olarak azaldığı Gly+TRIA 20 μ M grubu değerlerine göre ise arttığı analiz edilmiştir ($p<.05$). Ayrıca TRIA 10 μ M grubu ile kontrol, Gly 200 μ M, TRIA 20 μ M ve Gly+TRIA 40 μ M gruplarının değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir ($p>.05$). TRIA 20 μ M grubunun POD enziminin aktivite değerleri Gly+TRIA 20 μ M grubuna göre anlamlı olarak artarken, TRIA 40 μ M grubu değerlerine göre azalmıştır ($p<.05$). TRIA 20 μ M grubu değerleri ile Gly+TRIA 10 μ M ve Gly+TRIA 40 gruplarının değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık belirlenememiştir ($p>.05$). TRIA 40 μ M grubunun peroksidaz enziminin aktivite değerleri Gly+TRIA 10 μ M grubu haricinde tüm uygulama gruplarında anlamlı bir artış görülmüştür ($p<.05$). TRIA 40 μ M grubu değerleri ve Gly+TRIA 10 μ M grubu arasında ise istatistiksel olarak anlamlı fark saptanamamıştır ($p>.05$).

Gly+TRIA 10 μ M grubu POD aktivitesinde Gly+TRIA 20 μ M ve Gly+TRIA 40 μ M gruplarına göre anlamlı olarak arttığı analiz edilmiştir ($p<.05$). Son olarak Gly+TRIA 20 μ M grubunda ve Gly+TRIA 40 μ M peroksidaz enziminin aktivite değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanamamıştır ($p>.05$).

Katalaz (CAT)

Tek yönlü varyans analizi sonucunda CAT antioksidan enziminin aktivite değerleri uygulama grupları ile karşılaştırılmıştır. Bu analiz sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığın meydana gelmediği belirlenmiştir ($p>.05$). CAT antioksidan enziminin aktivite farklılıkları Şekil 9’da gösterilmiştir.



Şekil 9. CAT antioksidan enzim aktivite değerlerinin uygulama gruplarına göre standart sapmaları ve oranları

TARTIŞMA

Antioksidan sistem, özellikle abiyotik stres ve glifosat dâhil olmak üzere her tür stres etkenine karşı ortak bir tepki olarak düzenlenmektedir (Hasanuzzaman et al. 2020; Devireddy et al. 2021). ROS üretimi ile moleküler (gen ekspresyonu dâhil), metabolik (proteomik dâhil) ve fizyolojik düzeylerde (enzimatik olmayan ve enzimatik antioksidan sistemler dâhil) farklı savunma sistemlerinin uyarılması ve aralarındaki iletişim ile etkilenen bitkilerin stresli durumunu ve bu strese yanıt oluşturma mekanizmalarını belirlemektedir. Bunun sonucunda, bitki ya stres koşullarına alışır ya da ölüm meydana gelmektedir. H_2O_2 , glutasyon ve fitohormonlar gibi bazı ROS'ların sinyal etkileri ve aralarındaki iletişim sayesinde antioksidan sistemin düzenlenmesi gerçekleşmektedir (Choudhury et al. 2017; Zhang et al. 2020).

Glifosata maruz kalan bitkilerde özellikle şikimat yolunun ana hedef olduğu bilinmektedir. Bu nedenle çalışmamızda seçilen EPSPS geni şikimat yolağında, ASR 1 geni hormonal düzenlemelerde ve OEE 1 ise fotosentez yolağında rol aldıkları için belirlenmiştir. Oksidatif olayların ve/veya oksidatif stres oluşması herbisit uygulamasından kaynaklanan ikincil etkiler olarak rapor edilmiştir (Liu et al. 2019; Soares et al. 2019; Hasanuzzaman et al. 2020). Glifosatın bazı durumlar hedef bitkiler yerine ana bitkilerin büyümesinde olumsuz etki oluşturması şikimat yolunun inhibisyonu ile gerçekleşmektedir. Bu durum oksinler dâhil olmak üzere fenolik yapıdaki birçok ikincil metaboliti de etkilemektedir. Glifosat uygulamasının bir sonucu olarak bitki büyümesinin engellendiği kati bir şekilde rapor edilmiştir (Shopova et al. 2021). Bu nedenle, çalışmamızda şikimat yolağında rol alan EPSPS geni araştırılmıştır. Gen ekspresyon analizleri sonucunda EPSPS geninin Glifosat ve Glifosat+TRIA 10 μM dozlarında ekspre olduğu belirlenmiştir. Bu durumun glifosatla birlikte hedef olmayan bitkinin şikimat yolağının etkilendiği ve EPSPS geninin ekspresyon seviyesinin artarak upregüle olduğu görülmüştür. Fakat özellikle Glifosat+TRIA 20 μM ve Glifosat+TRIA 40 μM dozlarında EPSPS geninin ekspresyonunda önemli düşüşler gözlenmiştir. Bu durumun TRIA'nın iyileştirici etkisinden kaynaklandığı ve aynı zamanda EPSPS geninin aşırı ekspresyonunun bitkiye enerji yükü getirdiği için düşmüş olabileceği şeklinde yorumlanmıştır. Yapılan bir çalışmada, EPSPS geninin aşırı ekspre edildiği glifosata dirençli *Eleusine indica* bitkisinde duyarlı bireylere göre 15 kat daha fazla EPSPS transkriptlerinin olduğu, fakat tarla koşullarında üretilen toplam tohum sayısında %40'lık bir azalma meydana geldiği bildirilmiştir. Bu durumun, EPSPS geninin transkriptinin ve

proteininin fazladan kopyalarının bitki için kaynak ve enerji harcamalarına yol açmasından dolayı olduğu rapor edilmiştir (Li et al. 2021).

Srivastava ve arkadaşları (2022), ASR geni üzerine yaptığı çalışmada pirinç bitkisinde abiyotik stresler ile bitki hormonlarının etkilerini karşılaştırmıştır. Bu çalışmaya göre, ASR geninin ağır metal, tuz ve kuraklık streslerine göre Metil jasmonat, etilen ve ABA hormonlarında daha yüksek ekspresyon olduğu görülmüştür. Dahası, ABA hormonunda en yüksek ekspresyon meydana gelmiştir. Çalışmamızda ASR1 geninin ekspresyonu incelendiğinde özellikle glifosat ve TRIA 'nın birlikte uygulandığı bitkilerde ekspresyonun kontrole göre arttığı görülmüştür. Dahası, en yüksek ekspresyonun Glifosat+TRIA 10µM konsantrasyonunda gerçekleşmiştir. Fakat Glifosat+TRIA 20µM dozunda kontrole göre azalmıştır. Benzer şekilde, buğday ASR proteini olan TaASR1 transkript seviyesi araştırıldığında %20 PEG uygulandıktan 6 saat sonra kontrole kıyasla yaklaşık altı kat arttığı ve transgenik bütün bitkilerinde kuraklık stresine toleransı sağladığı rapor edilmiştir (Hu et al. 2013). Gen ifadesinin düzenlenmesinde meydana gelen tüm aşamaların cis-düzenleyici unsurlar tarafından yönetildiği bilinmektedir. ASR geninin promotör bölgesi, ABRE, HSE, Box-W1, CGTCA-domaini ve MBS elemanları dâhil olmak üzere birkaç strese duyarlı eleman içermektedir. Bu elementler hem fitohormon sinyali hem de abiyotik stres direnci altında gen transkripsiyonunun düzenlenmesinde rol oynayan kritik moleküler anahtarlardır. Bu nedenle, strese duyarlı cis-düzenleyici elemanların bulunması ASR geninin hem glifosat hem de TRIA altında ifadesinin uyarılmış olması bitkide çoklu stres yanıtlarının düzenlenmesinde rol alabileceğini göstermektedir.

OEE1 geni fotosentez ve enerji metabolizmasında rol oynayan özellikle tilakoid zarlarında bulunan fotosistem II'ye bağlanan proteinleri kodlamaktadır. Yapılan çalışmalarda özellikle fotosentez metabolizmasında ışık kaynaklı süreçlerde önemli roller oynadığı bildirilmiştir. İki farklı pirinç genotipinde tuz stresi ve spermidin uygulaması sonrasında OEE proteininde meydana gelen değişimler incelenmiştir. Bu çalışmaya göre tuz ve spermidine yanıt olarak Pokkali genotipinde OEE geni upregüle olurken KDML105 genotipinde ya önemli bir değişim olmamış ya da downregüle olmuştur. Pokkali genotipinde tuz stresi uygulanan bitkilerde OEE ekspresyonunun indüklendiği tuz ile spermidin uygulanan bitkilerde ise ekspresyonun daha da arttığı ifade edilmiştir. Bu durumun protein hasarını tamir etmek için gerçekleşebileceği öngörülmüştür (Saleethong et al. 2016). Çalışmamızda ise, TRIA 10µM ve Glifosat+TRIA 10µM dozlarında aşırı ekspresyon olduğu görülmüştür. Özellikle Glifosat+TRIA 10µM dozunda 11 kat bir artış gerçekleşmiştir. Buna karşın, diğer dozlarda kontrol grubuyla aynı veya downregüle olduğu görülmüştür. Burada TRIA'nın OEE genini

teşvik ettiği dolayısıyla fotosentetik işlemlerin arttırdığı görülmüştür. Literatürdeki bir başka çalışmada, *Agrostis tenuis* bitkisine 8 gün boyunca arsenik uygulanmış ve OEE proteinindeki değişimler gözlemlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, ağır metallerin özellikle tilakoid zarlarında biriktiği bundan dolayı fotosentetik etkinliğin azaldığı bildirilmiştir (Duquesnoy et al. 2009). Ağır metallerle yapılan başka bir çalışmada ise, bu genin ekspresyonunun kobalt, çinko ve stronsiyum gibi ağır metallerle indüklendiği, kadmiyum ve civa ağır metalleri ile ekspresyonunun azaldığı bildirilmiştir (Zhang et al. 2004). Böylece literatürdeki çalışmalar ile çalışmamızda elde ettiğimiz verilerin örtüştüğü görülmektedir.

TRIA'nın etki mekanizması araştırıldığında, TRIA'nın pirinçte (*Oryza sativa L.*) hızla ikinci bir haberciyi (TRIM) ortaya çıkardığını ve bunun da bitkilerin nanomolar dozlarda TRIA'ya benzer bir şekilde yanıt vermesine yol açtığını gözlemlemişlerdir (Acosta-Motos et al. 2017). TRIA ile muamele edilen bitkilerde üretilen L-adenozin miktarları ile kontrol bitkileri karşılaştırılmış ve miktarların eş değer olduğu saptanmıştır. Dahası, TRIA'nın tonoplasttaki L(+)-adenozin oranını artırdığı bildirilmiştir. Bitkilerde AMP, adenosin difosfattan üretilen bir moleküldür ve taşınabilir bir L(+)-adenozin kaynağı olarak trifosfat formunda işlev görmektedir. Adenozin deaminaz çalışmaları, TRIA uygulanmamış kontrol bitkilerinde L (+)- adenozinin başka bir adenosin ile inaktif olarak var olabileceği ortaya koyulmuş ve TRIA uygulamalarında bitki fonksiyonlarını etkileyen L(+)-adenozin salınımıyla sonuçlanmıştır (Ries et al. 1993). Bununla birlikte, çok düşük konsantrasyonlarda kullanılan TRIA'nın belirli bitki türlerinin veriminde ve kalitesinde önemli sonuçlar getirebileceğine dair çok güçlü kanıtlar vardır (Verma et al. 2022).

Araştırmamızda ağırlıklı olarak bitki oksidatif durumunu gösteren bazı evrensel stres markırları (LPO ve H₂O₂) ve enzimatik antioksidan savunma sisteminde (SOD, CAT ve POX) oluşan etkilerin üzerinde durulmuştur. Glifosattan dolayı oksidatif hasarın oluşması çok önemli bir sonuç olarak kabul edilmektedir (Shopova et al. 2021). Hidrojen peroksit, süperoksit anyonu ve hidroksil radikali, glifosat uygulamasından sonra olumsuz etkilere neden olan ROT'lar olarak bilinmektedir. Aşırı üretimlerinin makromoleküller ve biyomembranlarda oksidatif hasara neden olduğu bilinmektedir (Spormann et al. 2019; Soares et al. 2019; Hasanuzzaman et al. 2020). Buna karşın, bitki büyüme düzenleyicileri ROS'ların sinyal iletiminde, bertaraf edilmelerinde, stres algılamada ve bitki gelişiminde farklı tepki mekanizmalarının indüksiyonunda iyileştirmeye ve bitkinin hayatta kalmasına yönelik etkilerin oluşmasında önemli bir rol oynamaktadırlar (Waszcak et al. 2018; Tian et al. 2018; Devireddy et al. 2020). Çoğu ürüne nispeten düşük konsantrasyonlarda ekzojen olarak uygulandığında büyümeyi artırdığı iyi bilinen bir bitki büyümesini teşvik edici olduğu

bildirilmiştir (Naeem et al. 2009). TRIA'nın, tarımsal bitki büyümesi, verimi, gelişimi ve ana metabolik aktivitelerinin yanısıra tahıl bitkilerinde abiyotik stres faktörlerine karşı verilen yantlarda da görev aldığı rapor edilmiştir (Sarwar 2017; Zaid et al. 2019; Chandra and Roychoudhury 2020; Berger et al. 2020). Dahası, TRIA bitkinin maksimum büyüme döneminde uygun miktarda uygulanması durumunda köklerdeki enzimatik aktiviteyi ve bitkinin genel performansını artıran hormon işlevselliğini arttırdığı gösterilmiştir (Naeem et al. 2009; Karam and Keremat 2017).

Glifosatın büyüme üzerindeki olumsuz etkileri şikimat yolağının inhibisyonunu sadece aromatik amino asitlerin biyosentezini engelleyerek değil, aynı zamanda oksinler dahil olmak üzere fenolik yapıdaki bir dizi sekonder metaboliti de olumsuz etkilemesiyle de gerçekleştirmektedir (Jiang et al. 2013; Liu et al. 2019; Soares et al. 2019; Jang et al. 2020). Oksidatif stres belirteçleri (LPO ve H_2O_2) üzerindeki etkiler, bitkinin gelişim seviyeleri ve çevresel koşullara bağlı olarak farklı şekillerde değişebilen çeşitli faktörler (stres yoğunluğu, süresi, bitki türleri vb.) dikkate alınarak yorumlanması gerekmektedir. Örneğin LPO'nun buğday, bezelye, mısır, *Salvinia natans* (L.), *Hordeum vulgare* L, *Vallisneria natans* (Lour.) ve domateste glifosat uygulamasına bağlı olarak arttığı bildirilmiştir (Zhong et al. 2018; Liu et al. 2019; Jang et al. 2020).

Fakat, aşırı herbisit konsantrasyonları uygulanan bitkilerde LPO'nun genel olarak veya dokuya özgü olarak azaldığı diğer çalışmalarda rapor edilmiştir (Soares et al. 2019). Glifosat uygulamasından sonra H_2O_2 içeriğinin hem inhibisyonu hem de indüksiyonu da gözlenmiştir (de Freitas-Silva et al. 2017; Spormann et al. 2019). Söğüt yapraklarında ve *S. lycopersicum* köklerinde ise glifosat uygulamasına bağlı olarak H_2O_2 seviyelerinde değişiklik olmadığı da belgelenmiştir (Gomes et al. 2016; Soares et al. 2019). Çalışmamızda sadece glifosat uygulanan bitkilerde H_2O_2 miktarının önemli bir şekilde yüksek olduğu görülmüştür. Ayrıca, TRIA uygulanan dozlarda kontrole göre H_2O_2 miktarının arttığı, fakat glifosat uygulamasına göre kaydadeğer bir şekilde azaldıkları fark edilmiştir. Yine, glifosat ve TRIA'nın birlikte uygulandığı bitkilerde sadece glifosat dozuna göre anlamlı bir şekilde azaldığı belirlenmiştir. Dahası, glifosat uygulaması ile TRIA'nın kombin veya tek olarak uygulandığı dozlarda H_2O_2 miktarının büyük oranda azaldığı görülmüştür. Bu durumun TRIA'nın ekzojen olarak uygulanan bitkilerde stres markırlarını düşürerek iyileştirici rol oynadığı ve fazla enerji sarfiyatını engellediği belirlenmiştir.

Bitkilerde LPO'daki önemli bir artışın meydana gelmiş olması herbisit uygulanmış bitkilerde biyomembran lipid peroksidasyonunda güçlü bir dengesizliğin olduğunu göstermektedir. Glifosat dozunun uygulandığı bitkilerde LPO miktarının glifosat ve

Gly+TRIA 10 µM gruplarında yüksek oranlarda arttığı görülmüştür. Glifosat ve TRIA'nın ardışık uygulandığı bitkilerde TRIA'nın dozları arttıkça LPO miktarının azaldığı ve böylece hücre hasarında düşüşün meydana geldiği belirlenmiştir. Bitki büyüme düzenleyicilerinin herbisitlerin lipid peroksidasyonu üzerindeki olumsuz etkisini azaltması TRIA'nın olumlu etkilere neden olduğunu işaret etmektedir. Ayrıca bitki büyüme düzenleyicilerinin strese alışma sırasında bitki metabolizmasını olumlu yönde etkilediği de bilinmektedir (Sitinjak and Pandiangan 2014). Sadece TRIA'nın uygulandığı konsantrasyonlarına bakıldığında kontrole göre TRIA 40 µM dozunda artışın olduğu görülmüştür. Bunun stres faktörlerine bağlı olarak olabileceği şeklinde yorumlanmıştır. Çünkü hem sadece TRIA'nın uygulandığı diğer dozlarda hem de herbisitle birlikte uygulanan dozlarda LPO miktarının önemli bir şekilde azaldığı gözlenmiştir.

Bitki antioksidan savunma sistemleri, çeşitli biyolojik süreçlerde ve çevresel değişkenlere verilen yanıtlarda önemli roller üstlenen enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlardan oluşmaktadır (Xu et al. 2012). Bu detoksifikasyon sistemi, ROS iyileştirme sisteminin neden olduğu toksisitesinin zararlı etkilerini azaltmaktadır (Sardar et al. 2022). Çeşitli antioksidan enzimler, fotosentez sırasında sürekli olarak oluşturulan ve elektron taşınmasını düzenlemeye yardımcı olan ROS'ların bertaraf edilmesini sağlamaktadırlar (Gill and Tuteja, 2010). Bitkilerdeki enzimatik detoksifikasyon süreçleri çoğunlukla SOD, POD ve CAT'dan oluşur. Glifosat uygulanan bitkilerde bulunan antioksidan (POD, CAT, SOD) enzimlerinin aktivitelerinde oluşan artış daha önce rapor edilmiştir (Xia et al. 2009; Sharma et al. 2013; Sharma et al. 2016). Mevcut araştırmamızda, POD'un glifosat ve TRIA uygulaması ile en çok etkilenen antioksidan enzimatik aktivite olduğu görülmüştür. POD'un aktivitesinde meydana gelen artışın ksenobiyotik metabolizmasının önemli bir unsuru olabilir (Xia et al. 2009; Sharma et al. 2016).

Genel olarak, peroksidazlar hem H₂O₂ artışında hem de oksidatif döngü veya peroksidatif döngüde rol alabilirler. Genel olarak peroksidatif döngüde H₂O₂, fenolik substrat bileşiklerini fenoksi radikallerine dönüştürmek için kullanılır. Oksidatif döngüde NADH, daha sonra oksijeni süperoksit radikaline indirgeyen NAD• radikaline elektron verici olarak oksitlenir. Daha sonra peroksidazın “NADH-oksidad” aktivitesi, SOD'un katkısı olsun ya da olmasın H₂O₂ seviyesinin artışı ile sonuçlanmaktadır (Liszkay et al. 2003; Kärkönen and Kuchitsu 2015). Çalışmamızda bu antioksidan enzimlerin miktarlarına bakıldığında CAT ve SOD miktarlarında kaydadeğer bir değişimin oluşmadığı görülmüştür. Fakat POD enziminin aktivitesinde önemli değişimler meydana gelmiştir. Özellikle TRIA 40 µM konsantrasyonunda H₂O₂ seviyesinin TRIA 10 µM ve TRIA 20 µM dozlarına göre önemli

şekilde düştüğü farkedilmiştir. Dahası, POD enziminin aktivitesi incelendiğinde TRIA 40 µM konsantrasyonunda en yüksek seviyeye ulaştığı görülmektedir. Bu durum H₂O₂ miktarlarının düşürülmesinde POD yolunun kullanıldığı ve bu yolak sayesinde ROS'ların bertaraf edildiği düşünülmüştür. Benzer sonuçlar, *Coriandrum sativum* bitkisinin Cd stresine maruz bırakılması ve bu strese yanıt oluşturmak için TRIA'nın kullanılması çalışmasında rapor edilmiştir. Bu çalışmada, POD enzim aktivitesinin TRIA'nın tek uygulandığı 10 µmol L⁻¹ konsantrasyonunda meydana geldiği bildirilmiştir (Sardar et al. 2022). Benzer şekilde, TRIA ile muamele edilmiş fidelerin yaprakları, stresi azaltmak için artırılmış SOD ve CAT aktivitesi göstermiştir (Karam et al. 2016). Bunun aksine, Khan ve Mohammad (2017), TRIA'nın *Mentha piperita* L.'nin antioksidan sistemleri üzerindeki etkisini farklı tuzluluk seviyelerinde incelemişlerdir. 1 µM TRIA yapraklara spreylendiğinde CAT, POD ve SOD aktivitesini belirgin şekilde artırarak tuzluluk stresinin etkilerini azaltmıştır (Khanam and Mohammad 2017). Ayrıca TRIA'nın plazma zarındaki NADPH oksidaz aktivitesini de uyardığı görülmüştür. Chen et al. (2003) TRIA uygulaması ile Rubisco enziminin aktivitesinde artış ve bundan dolayı gelişen fotosentetik aktivitenin bitki büyümesini ve kuru ağırlığın arttığını söylemişlerdir. Dahası, hücre zarı seviyesindeki değişikliklerden dolayı bitki büyümesinin değiştiği de görülmüştür (Chen et al. 2003; Zaid et al. 2020). Kloroplast ve protoplastlarda yapılan çalışmada fotosentez seviyesindeki artışın özellikle TRIA'nın bitki gelişiminin erken evrelerinde uygulandığında bitkilerin uyarıldığı ışık miktarının artmasının temel nedeni olarak belirtilmiştir (Ivanov and Angelov 1997).

Tuzluluk stresinin olumsuz etkilerine karşı TRIA'nın vejetatif dönemde yaprağa uygulanarak meydana getirdiği etkiler araştırılmıştır. Bu çalışmada, TRIA'nın 10 ve 20 µM konsantrasyonunda klorofil içeriği, zar geçirgenliği, fotosentez oranı, stoma iletkenliği ve elektron taşıma hızı gibi birçok fotosentetik bileşenleri düzenleyerek *Triticum aestivum* 'da iyileştirici özellik göstermiştir (Zaid et al. 2019). Dahası, Aziz ve Shahbaz (2015) tarafından yapılan çalışmada kanola tohumlarına 0.5 mg/L TRIA ile yapılan ön muamelenin 150 mM tuz stresi altındaki bitkilerin kök ve gövdelerinde K⁺ miktarını artırdığı bildirilmiştir. Buna karşılık, buğday tohumlarında TRIA ile yapılan ön uygulamanın K⁺ ve Ca²⁺ iyonu emilimi ve kullanımı üzerinde hiçbir etkisi olmamıştır (Krishnan and Kumari 2008). Yine, TRIA ile muamele edilmiş mısır bitkilerinde nikel alımının azaldığı ve bunun sonucunda ROS seviyesinin düştüğü gözlemlenmiştir (Younis and Ismail 2019).

Tüm bu çalışmalar gözönünde bulundurulduğunda, Dünya'da en çok ekilen ve tüketilen tarla bitkilerinden biri olan *Triticum aestivum* (Ekmeklik buğday)'da araştırmalar yapılmıştır. Yapılan araştırmalarda glifosat herbisitinin *Triticum aestivum* bitkisi üzerine

etkileri adına literatürde 228 çalışma bulunmuş ve bu çalışmaların 28'inin 2021-2022 yıllarına ait olduğu görülmüştür. Yine gerçekleştirilen literatür çalışmasında, *Triticum aestivum* bitkisine uygulanan glifosat herbisitine karşı TRIA'nın etkilerine dair herhangi bir çalışma gözlenememiştir. Bu nedenle, hem *Triticum aestivum* bitkisinin Dünya'da yaygın bir gıda maddesi olarak kullanılması hem de glifosat herbisitinin en yaygın kullanılan zirai mücadelelerden biri olması çalışmamızın yapılmasında en büyük unsurlar olmuştur. Dahası, TRIA'nın glifosat herbisitine karşı etkilerinin çalışılmamış olması hem literatüre büyük bir katkı sağlamış hem de çalışmamızın özgün değerini oluşturmuştur.



KAYNAKLAR

- Acosta-Motos, J. R., Ortuño, M. F., Bernal-Vicente, A., Diaz-Vivancos, P., Sanchez-Blanco, M. J., & Hernandez, J. A. (2017). Plant responses to salt stress: adaptive mechanisms. *Agronomy*, 7(1), 18.
- Aftab, T., Khan, M. M. A., Idrees, M., Naeem, M., Singh, M., & Ram, M. (2010). Stimulation of crop productivity, photosynthesis and artemisinin production in *Artemisia annua* L. by triacontanol and gibberellic acid application. *Journal of Plant Interactions*, 5(4), 273-281.
- Al Ghouleh, I., Khoo, N. K., Knaus, U. G., Griendling, K. K., Touyz, R. M., Thannickal, V. J., ... & Pagano, P. J. (2011). Oxidases and peroxidases in cardiovascular and lung disease: new concepts in reactive oxygen species signaling. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(7), 1271-1288.
- Alam, M. B., Hossain, M. S., Chowdhury, N. S., Mazumder, M., Haque, M. E., & Islam, A. (2011). In vitro and in vivo antioxidant and toxicity evaluation of different fractions of *Oxalis corniculata* Linn.
- Ali, M. S., Islam, M. S., Rahman, M. M., Islam, M. R., Islam, M. E., & Islam, M. R. (2011). Antibacterial and cytotoxic activity of methanol extract of *Spilanthes calva* (DC) leaves. *Int J Pharm Sci Res*, 2(7), 1707-1711.
- Al-Khatib, K., & Peterson, D. (1999). Soybean (*Glycine max*) response to simulated drift from selected sulfonylurea herbicides, dicamba, glyphosate, and glufosinate. *Weed Technology*, 13(2), 264-270.
- Altman, J., & Campbell, C. L. (1977). Effect of herbicides on plant diseases. *Annual Review of Phytopathology*, 15(1), 361-385.
- Ambatkar, M., & Mukundan, U. (2014). Calcium salts enhance activity and azo dye decolourisation capacity of crude peroxidase from *Azadirachta indica*. *American Journal of Plant Sciences*, 2014.
- Amitai-Zeigerson, H., Scolnik, P. A., & Bar-Zvi, D. (1994). Genomic nucleotide sequence of tomato *Asr2*, a second member of the stress/ripening-induced *Asr1* gene family. *Plant Physiology*, 106(4), 1699.
- Anderson, M. E. (1985). [70] Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. In *Methods in enzymology* (Vol. 113, pp. 548-555). Academic Press.
- Andreasen, C., Stryhn, H., & Streibig, J. C. (1996). Decline of the flora in Danish arable fields. *Journal of Applied Ecology*, 619-626.
- Asadi Karam, E., & Keramat, B. (2017). Foliar spray of triacontanol improves growth by alleviating oxidative damage in coriander under salinity. *Indian Journal of Plant Physiology*, 22, 120-124.
- Asadi Karam, E., Keramat, B., Asrar, Z., & Mozafari, H. (2017). Study of interaction effect between triacontanol and nitric oxide on alleviating of oxidative stress arsenic toxicity in coriander seedlings. *Journal of Plant Interactions*, 12(1), 14-20.
- Asane, G. B. (1998). Effect of cytochrome crop, triacontanol and cycocel on growth, yield and quality of pea (*Pisum sativum* L.). *Adv. Plant Sci.*, 11, 31-34.

- Aust, S. D. (1985). Lipid peroxidation. Handbook of methods for oxygen radical research, 203-207.
- Aziz, R., & Shahbaz, M. (2015). Triacantanol-induced Regulation in the Key Osmoprotectants and Oxidative Defense System of Sunflower Plants at Various Growth Stages under Salt Stress. *International Journal of Agriculture & Biology*, 17(5).
- Bafana, A., Dutt, S., Kumar, A., Kumar, S., & Ahuja, P. S. (2011). The basic and applied aspects of superoxide dismutase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 68(2), 129-138.
- Baig, M. N., Darwent, A. L., Harker, K. N., & O'Donovan, J. T. (2003). Preharvest applications of glyphosate affect emergence and seedling growth of field pea (*Pisum sativum*). *Weed Technology*, 17(4), 655-665.
- Balraj, R., M. B. Kurdikeri and Revanappa. 2002. Effect of growth regulators on growth and yield of chilli (*Capsicum annum* L.) at different pickings. *Indian J. Hort.* 59 (1): 84-88.
- Bang, S., Park, S., Lee, Y. M., Hong, S., Cho, K. B., & Nam, W. (2014). Demonstration of the Heterolytic O–O Bond Cleavage of Putative Nonheme Iron (II)–OOH (R) Complexes for Fenton and Enzymatic Reactions. *Angewandte Chemie International Edition*, 53(30), 7843-7847.
- Barja, B. C., Herszage, J., & dos Santos Afonso, M. (2001). Iron (III)–phosphonate complexes. *Polyhedron*, 20(15-16), 1821-1830.
- Barua, S. C. (1998). Productivity of Santa Rosa plum trees in response to triacantanol. *J. Interacademia*, 2, 124-129.
- Basra, A. (Ed.). (2000). *Plant growth regulators in agriculture and horticulture: their role and commercial uses*. CRC press.
- Battaglia, M., Olvera-Carrillo, Y., Garcarrubio, A., Campos, F., & Covarrubias, A. A. (2008). The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. *Plant physiology*, 148(1), 6-24.
- Baylis, A. D. (2000). Why glyphosate is a global herbicide: strengths, weaknesses and prospects. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 56(4), 299-308.
- Beckie, H. J. (2011). Herbicide-resistant weed management: focus on glyphosate. *Pest management science*, 67(9), 1037-1048.
- Begum, F., Uddin, K., Sultana, S., Ferdous, A. H., & Begum, Z. A. (2008). Effects of methanol extract of *Piper chaba* stem bark on chronic Inflammation in rats. *Ibrahim Medical College Journal*, 2(2), 37-39.
- Bellaloui, N., Reddy, K. N., Zablotowicz, R. M., & Mengistu, A. (2006). Simulated glyphosate drift influences nitrate assimilation and nitrogen fixation in non-glyphosate-resistant soybean. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(9), 3357-3364.
- Benachour, N., Sipahutar, H., Moslemi, S., Gasnier, C., Travert, C., & Seralini, G. E. (2007). Time-and dose-dependent effects of roundup on human embryonic and placental cells. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 53(1), 126-133.
- Bennett, A. C., & Shaw, D. R. (2000). Effect of preharvest desiccants on weed seed production and viability. *Weed Technology*, 14(3), 530-538.

- Berger, A., Boscari, A., Horta Araujo, N., Maucourt, M., Hanchi, M., Bernillon, S., ... & Brouquisse, R. (2020). Plant nitrate reductases regulate nitric oxide production and nitrogen-fixing metabolism during the *Medicago truncatula*–*Sinorhizobium meliloti* symbiosis. *Frontiers in plant science*, 1313.
- Bernards, M. L., Thelen, K. D., Penner, D., Muthukumaran, R. B., & McCracken, J. L. (2005). Glyphosate interaction with manganese in tank mixtures and its effect on glyphosate absorption and translocation. *Weed Science*, 53(6), 787-794.
- Betts, S. D., Ross, J. R., Hall, K. U., Pichersky, E., & Yocum, C. F. (1996). Functional reconstitution of photosystem II with recombinant manganese-stabilizing proteins containing mutations that remove the disulfide bridge. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1274(3), 135-142.
- Bhaduri, A. M., & Fulekar, M. H. (2012). Antioxidant enzyme responses of plants to heavy metal stress. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 11, 55-69.
- Bimal, K. G., Eun, S. S., Eun, H. K., Amal, K. G., Chang, Y. Y., & Bal, K. G. (2011). A comparative evaluation of the antioxidant activity of some medicinal plants popularly used in Nepal. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(10), 1884-1891.
- Blamowski, Z. K., Borowski, E., & Blamowska, M. (1998). Wpływ długołańcuchowych alkoholi alifatycznych na wzrost, wymianę gazową i rozdział asymilatów w roślinach rzodkiewki. *Acta Agrobotanica*, 51(1-2), 5.
- Bork, P., & Sudol, M. (1994). The WW domain: a signalling site in dystrophin?. *Trends in biochemical sciences*, 19(12), 531-533.
- Borowski, E. (1992). Wpływ triakontanolu [TRIA] na wzrost, kwitnienie i owocowanie pomidorów. *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska. Sectio E. Agricultura*, 47, 241-249.
- Borowski, E., Blamowski, Z. K., & Michałek, W. (2000). Effects of Tomatex/Triacontanol/on chlorophyll fluorescence and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) yields. *Acta Physiologiae Plantarum*, 22(3), 271-274.
- Bowler, C., Van Camp, W., Van Montagu, M., Inzé, D., & Asada, K. (1994). Superoxide dismutase in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 13(3), 199-218.
- Boyette, C. D., Reddy, K. N., & Hoagland, R. E. (2006). Glyphosate and bioherbicide interaction for controlling kudzu (*Pueraria lobata*), redvine (*Brunnichia ovata*), and trumpetcreeper (*Campsis radicans*). *Biocontrol Science and Technology*, 16(10), 1067-1077.
- Brammall, R. A., & Higgins, V. J. (1988). The effect of glyphosate on resistance of tomato to *Fusarium* crown and root rot disease and on the formation of host structural defensive barriers. *Canadian Journal of Botany*, 66(8), 1547-1555.
- Bus, J. S., & Hammond, L. E. (2007). Regulatory progress, toxicology, and public concerns with 2, 4-D: where do we stand after two decades?. *Crop protection*, 26(3), 266-269.
- Busse, M. D., Ratcliff, A. W., Shestak, C. J., & Powers, R. F. (2001). Glyphosate toxicity and the effects of long-term vegetation control on soil microbial communities. *Soil biology and biochemistry*, 33(12-13), 1777-1789.
- Cakmak, I., Yazici, A., Tutus, Y., & Ozturk, L. (2009). Glyphosate reduced seed and leaf concentrations of calcium, manganese, magnesium, and iron in non-glyphosate resistant soybean. *European Journal of Agronomy*, 31(3), 114-119.
- Calderbank, A., & Slade, P. (1976). In *Herbicides: Chemistry, Degradation and Mode of Action* 2nd ed., ed. by PC KEARNEY and DD KAUFMAN, Vol. 2.

- Carrari, F., Fernie, A. R., & Iusem, N. D. (2004). Heard it through the grapevine? ABA and sugar cross-talk: the ASR story. *Trends in plant science*, 9(2), 57-59.
- Castellano, I., Di Maro, A., Ruocco, M. R., Chambery, A., Parente, A., Di Martino, M. T., ... & De Vendittis, E. (2006). Psychrophilic superoxide dismutase from *Pseudoalteromonas haloplanktis*: biochemical characterization and identification of a highly reactive cysteine residue. *Biochimie*, 88(10), 1377-1389.
- Chandra, S., & Roychoudhury, A. (2020). Penconazole, paclobutrazol, and triacontanol in overcoming environmental stress in plants. *Protective Chemical Agents in the Amelioration of Plant Abiotic Stress: Biochemical and Molecular Perspectives*, 510-534.
- Chang, S., Puryear, J. D., Dias, M. D. L., Funkhouser, E. A., Newton, R. J., & Cairney, J. (1996). Gene expression under water deficit in loblolly pine (*Pinus taeda*): isolation and characterization of cDNA clones. *Physiologia Plantarum*, 97(1), 139-148.
- Chaudhary, B. R., Sharma, M. D., Shakya, S. M., & Gautam, D. M. (2006). Effect of plant growth regulators on growth, yield and quality of chilli (*Capsicum annum* L.) at Rampur, Chitwan. *Journal of the Institute of Agriculture and Animal Science*, 27, 65-68.
- Chen, X., Moore, M., Milus, E. A., Long, D. L., Line, R. F., Marshall, D., & Jackson, L. (2002). Wheat stripe rust epidemics and races of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in the United States in 2000. *Plant Disease*, 86(1), 39-46.
- Chen, X., Yuan, H., Chen, R., Zhu, L., & He, G. (2003). Biochemical and photochemical changes in response to triacontanol in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Growth Regulation*, 40, 249-256.
- Chisari, M., Barbagallo, R. N., & Spagna, G. (2007). Characterization of polyphenol oxidase and peroxidase and influence on browning of cold stored strawberry fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(9), 3469-3476.
- Choudhury, F. K., Rivero, R. M., Blumwald, E., & Mittler, R. (2017). Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *The Plant Journal*, 90(5), 856-867.
- Clark, S. R., Guy, C. J., Scurr, M. J., Taylor, P. R., Kift-Morgan, A. P., Hammond, V. J., ... & O'Donnell, V. B. (2011). Esterified eicosanoids are acutely generated by 5-lipoxygenase in primary human neutrophils and in human and murine infection. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 117(6), 2033-2043.
- Cobb, A. H., & Kirkwood, R. C. (Eds.). (2000). *Herbicides and their mechanisms of action* (Vol. 295). Sheffield: Sheffield Academic Press
- Cornish, P. S., & Burgin, S. (2005). Residual effects of glyphosate herbicide in ecological restoration. *Restoration Ecology*, 13(4), 695-702.
- Çakir, B., Agasse, A., Gaillard, C., Saumonneau, A., Delrot, S., & Atanassova, R. (2003). A grape ASR protein involved in sugar and abscisic acid signaling. *The Plant Cell*, 15(9), 2165-2180.
- Dahdouh, A., Bachir-Bey, M., & Kati, D. E. (2020). Optimization of peroxidase activity of turnip (*Brassica Rapa*) using response surface methodology. *Acta Universitatis Cinbinesis, Series E: Food Technology*, 24(2).
- Dahdouh, A., Boucherba, N., Bouacem, K., Mechri, S., Amirouche, A., Aksas, A., ... & Kati, D. E. (2022). A new peroxidase from the roots of the Algerian white turnip (*Brassica rapa*, variety *rapa*): extraction, purification, characterisation, and antioxidant potential. *Biocatalysis and Biotransformation*, 40(6), 432-449.

- Dai, J. R., Liu, B., Feng, D. R., Liu, H. Y., He, Y. M., Qi, K. B., ... & Wang, J. F. (2011). MpAsr encodes an intrinsically unstructured protein and enhances osmotic tolerance in transgenic Arabidopsis. *Plant cell reports*, 30, 1219-1230.
- Das, A., Bhattacharya, S., Bagchi, A., & Dasgupta, R. (2015). Structural and functional characterization of Arabidopsis thaliana WW domain containing protein F4JC80. *Computational Intelligence in Medical Informatics*, 25-39.
- Das, M. K., Sharma, R. S., & Mishra, V. (2011). A novel cationic peroxidase (VanPrx) from a hemi-parasitic plant (*Viscum angulatum*) of Western Ghats (India): Purification, characterization and kinetic properties. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 71(1-2), 63-70.
- Datnoff, L. E., Elmer, W. H., & Huber, D. M. (2007). Mineral nutrition and plant disease. American Phytopathological Society (APS Press).
- Dayan, F. E., Owens, D. K., & Duke, S. O. (2012). Rationale for a natural products approach to herbicide discovery. *Pest management science*, 68(4), 519-528.
- de Freitas-Silva, L., Rodríguez-Ruiz, M., Houmani, H., da Silva, L. C., Palma, J. M., & Corpas, F. J. (2017). Glyphosate-induced oxidative stress in Arabidopsis thaliana affecting peroxisomal metabolism and triggers activity in the oxidative phase of the pentose phosphate pathway (OxPPP) involved in NADPH generation. *Journal of plant physiology*, 218, 196-205.
- de María, N., Becerril, J. M., García-Plazaola, J. I., Hernández, A., De Felipe, M. R., & Fernández-Pascual, M. (2006). New insights on glyphosate mode of action in nodular metabolism: role of shikimate accumulation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(7), 2621-2628.
- Devireddy, A. R., Zandalinas, S. I., Fichman, Y., & Mittler, R. (2021). Integration of reactive oxygen species and hormone signaling during abiotic stress. *The Plant Journal*, 105(2), 459-476.
- Dhindsa, R. S., Plumb-Dhindsa, P. A. M. E. L. A., & Thorpe, T. A. (1981). Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *Journal of Experimental botany*, 32(1), 93-101.
- Dirlewanger, E., Cosson, P., Tavaud, M., Aranzana, M. J., Poizat, C., Zanetto, A., ... & Laigret, F. (2002). Development of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] and their use in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Theoretical & Applied Genetics*, 105(1).
- Dominguez, P. G., Frankel, N., Mazuch, J., Balbo, I., Iusem, N., Fernie, A. R., & Carrari, F. (2013). ASR1 mediates glucose-hormone cross talk by affecting sugar trafficking in tobacco plants. *Plant Physiology*, 161(3), 1486-1500.
- Dorman, H. D., Bachmayer, O., Kosar, M., & Hiltunen, R. (2004). Antioxidant properties of aqueous extracts from selected Lamiaceae species grown in Turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(4), 762-770.
- Duke, S. O., & Cerdeira, A. L. (2005). Potential environmental impacts of herbicide-resistant crops. Embrapa Meio Ambiente-Capítulo em livro científico (ALICE).
- Duke, S. O., & Powles, S. B. (2008). Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 64(4), 319-325.

- Duke, S. O., Wauchope, R. D., Hoagland, R. E., & Wills, G. D. (1983). Influence of glyphosate on uptake and translocation of calcium ion in soybean seedlings. *Weed Research*, 23(3), 133-139.
- Dupont, C. L., Neupane, K., Shearer, J., & Palenik, B. (2008). Diversity, function and evolution of genes coding for putative Ni-containing superoxide dismutases. *Environmental microbiology*, 10(7), 1831-1843.
- Duquesnoy, I., Goupil, P., Nadaud, I., Branlard, G., Piquet-Pissaloux, A., & Ledoigt, G. (2009). Identification of *Agrostis tenuis* leaf proteins in response to As (V) and As (III) induced stress using a proteomics approach. *Plant Science*, 176(2), 206-213.
- E1-Otmani, M., Coggins Jr, C. W., Agustí, M., & Lovatt, C. J. (2000). Plant growth regulators in citriculture: World current uses. *Critical reviews in plant sciences*, 19(5), 395-447.
- Ellis, J. M., Griffin, J. L., Linscombe, S. D., & Webster, E. P. (2003). Rice (*Oryza sativa*) and corn (*Zea mays*) response to simulated drift of glyphosate and glufosinate. *Weed Technology*, 17(3), 452-460.
- Erickson, A. N., & Markhart, A. H. (2001). Flower production, fruit set, and physiology of bell pepper during elevated temperature and vapor pressure deficit. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 126(6), 697-702.
- Esser, H., Dupuis, G., Ebert, E., Marco, G. J., & Vogel, C. (1975). s-Triazines, in "Herbicides: Chemistry, Degradation, and Mode of Action"(PC Keamey and DD Kaufman, Eds.), Vol. 1.
- Evans, I., Solberg, E., & Huber, D. M. (2007). Copper and plant disease. *Mineral nutrition and plant disease*, 177.
- Falade, A. O., Nwodo, U. U., Iweriebor, B. C., Green, E., Mabinya, L. V., & Okoh, A. I. (2017). Lignin peroxidase functionalities and prospective applications. *MicrobiologyOpen*, 6(1), e00394.
- Fares, R., Bazzi, S., Baydoun, S. E., & Abdel-Massih, R. M. (2011). The antioxidant and anti-proliferative activity of the Lebanese *Olea europaea* extract. *Plant Foods for Human Nutrition*, 66, 58-63.
- Feng, J. C., & Thompson, D. G. (1990). Fate of glyphosate in a Canadian forest watershed. 2. Persistence in foliage and soils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(4), 1118-1125.
- Feng, P. C., Baley, G. J., Clinton, W. P., Bunkers, G. J., Alibhai, M. F., Paulitz, T. C., & Kidwell, K. K. (2005). Glyphosate inhibits rust diseases in glyphosate-resistant wheat and soybean. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(48), 17290-17295.
- Feng, P. C., Chiu, T., & Sammons, R. D. (2003). Glyphosate efficacy is contributed by its tissue concentration and sensitivity in velvetleaf (*Abutilon theophrasti*). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 77(3), 83-91.
- Fernandez, M. R., Selles, F., Gehl, D., DePauw, R. M., & Zentner, R. P. (2005). Crop production factors associated with *Fusarium* head blight in spring wheat in eastern Saskatchewan. *Crop Science*, 45(5), 1908-1916.
- Fernandez, M. R., Zentner, R. P., DePauw, R. M., Gehl, D., & Stevenson, F. C. (2007). Impacts of crop production factors on *Fusarium* head blight in barley in eastern Saskatchewan. *Crop Science*, 47(4), 1574-1584.

- Fink, R. C., & Scandalios, J. G. (2002). Molecular evolution and structure–function relationships of the superoxide dismutase gene families in angiosperms and their relationship to other eukaryotic and prokaryotic superoxide dismutases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 399(1), 19-36.
- Fischer, I., Steige, K. A., Stephan, W., & Mboup, M. (2013). Sequence evolution and expression regulation of stress-responsive genes in natural populations of wild tomato. *PLoS One*, 8(10), e78182.
- Fishel, F. M. (2006). Plant growth regulators. Document PI-139, Pesticide Information Office, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.
- Florencia, F. M., Carolina, T., Enzo, B., & Leonardo, G. (2017). Effects of the herbicide glyphosate on non-target plant native species from Chaco forest (Argentina). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 144, 360-368.
- Fortea, M. I., López-Miranda, S., Serrano-Martínez, A., Hernández-Sánchez, P., Zafrilla, M. P., Martínez-Cachá, A., & Núñez-Delicado, E. (2011). Kinetic characterisation and thermal inactivation study of red alga (*Mastocarpus stellatus*) peroxidase. *Food chemistry*, 127(3), 1091-1096.
- Frankel, N., Carrari, F., Hasson, E., & Iusem, N. D. (2006). Evolutionary history of the *Asr* gene family. *Gene*, 378, 74-83.
- Frankel, N., Nunes-Nesi, A., Balbo, I., Mazuch, J., Centeno, D., Iusem, N. D., ... & Carrari, F. (2007). *ci21A/Asr1* expression influences glucose accumulation in potato tubers. *Plant molecular biology*, 63, 719-730.
- Franz, J. E., Sikorski, J. A., & Mao, M. K. (1997). Glyphosate: a unique global herbicide. American Chemical Society.
- Franzen, D. W., O'Barr, J. H., & Zollinger, R. K. (2003). Interaction of a foliar application of iron HEDTA and three postemergence broadleaf herbicides with soybeans stressed from chlorosis. *Journal of plant nutrition*, 26(12), 2365-2374.
- Freitas, R. A., Paula, R. C., Feitosa, J. P. A., Rocha, S., & Sierakowski, M. R. (2004). Amylose contents, rheological properties and gelatinization kinetics of yam (*Dioscorea alata*) and cassava (*Manihot utilissima*) starches. *Carbohydrate polymers*, 55(1), 3-8.
- Fuchs, M. A., Geiger, D. R., Reynolds, T. L., & Bourque, J. E. (2002). Mechanisms of glyphosate toxicity in velvetleaf (*Abutilon theophrasti* medikus). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 74(1), 27-39.
- Gardner, H. W. (1989). Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 7(1), 65-86.
- Gauvrit, C., Gaudry, J. C., Lucotte, T., & Cabanne, F. (2001). Biological evidence for a 1: 1 Ca^{2+} : glyphosate association in deposit residuals on the leaf surface of barley. *Weed Research*, 41(5), 433-445.
- Geiger, D. R., Shieh, W. J., & Fuchs, M. A. (1999). Causes of self-limited translocation of glyphosate in *Beta vulgaris* plants. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 64(2), 124-133.
- Geisler, L., Graef, G., Wilson, J., & Schimelfenig, J. (2002). Interaction of glyphosate tolerance with soybean cyst nematode resistance. *Phytopathology*, 92, S529.
- Geissbuhler, H., Martin, H., & Voss, G. (1975). The substituted ureas. *Herbicides: chemistry, degradation, and mode of action*, 1, 209-221.

- George, E. F., Hall, M. A., & Klerk, G. J. D. (2008). Plant growth regulators I: introduction; auxins, their analogues and inhibitors. *Plant Propagation by Tissue Culture: Volume 1. The Background*, 175-204.
- Gianessi, L. P., & Reigner, N. P. (2007). The value of herbicides in US crop production. *Weed Technology*, 21(2), 559-566.
- Giannopolitis, C. N., & Ries, S. K. (1977). Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. *Plant physiology*, 59(2), 309-314.
- Gibney, E. R., & Nolan, C. M. (2010). Epigenetics and gene expression. *Heredity*, 105(1), 4-13.
- Giesy, J. P., Dobson, S., & Solomon, K. R. (2000). Ecotoxicological risk assessment for Roundup® herbicide. *Reviews of environmental contamination and toxicology*, 35-120.
- Gilad, A., Amitai-Zeigerson, H., Bar-Zvi, D., & Scolnik, P. A. (1996, June). ASR1, a tomato water-stress regulated gene: genomic organization, developmental regulation and DNA-binding activity. In *III International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding* 447 (pp. 447-454).
- Glen, M., Alfenas, A. C., Zauza, E. A. V., Wingfield, M. J., & Mohammed, C. (2007). *Puccinia psidii*: a threat to the Australian environment and economy—a review. *Australasian Plant Pathology*, 36(1), 1-16.
- Golan, I., Dominguez, P. G., Konrad, Z., Shkolnik-Inbar, D., Carrari, F., & Bar-Zvi, D. (2014). Tomato abscisic acid stress ripening (ASR) gene family revisited. *PLoS one*, 9(10), e107117.
- Goldgur, Y., Rom, S., Ghirlando, R., Shkolnik, D., Shadrin, N., Konrad, Z., & Bar-Zvi, D. (2007). Desiccation and zinc binding induce transition of tomato abscisic acid stress ripening 1, a water stress-and salt stress-regulated plant-specific protein, from unfolded to folded state. *Plant physiology*, 143(2), 617-628.
- Gomes, M. P., da Silva Cruz, F. V., Bicalho, E. M., Borges, F. V., Fonseca, M. B., Juneau, P., & Garcia, Q. S. (2017). Effects of glyphosate acid and the glyphosate-commercial formulation (Roundup) on *Dimorphandra wilsonii* seed germination: interference of seed respiratory metabolism. *Environmental Pollution*, 220, 452-459.
- Gomes, M. P., Le Manac'h, S. G., Maccario, S., Labrecque, M., Lucotte, M., & Juneau, P. (2016). Differential effects of glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) on photosynthesis and chlorophyll metabolism in willow plants. *Pesticide biochemistry and physiology*, 130, 65-70.
- Goncalves, S., Gomes, D., Costa, P., & Romano, A. (2013). The phenolic content and antioxidant activity of infusions from Mediterranean medicinal plants. *Industrial Crops and Products*, 43, 465-471.
- González, R. M., & Iusem, N. D. (2014). Twenty years of research on Asr (ABA-stress-ripening) genes and proteins. *Planta*, 239, 941-949.
- Graham, J. A. (2001). Agrobiotechnology: opportunities and challenges for the adjuvant industry. In *Proceedings 2001 6th International Symposium on Adjuvants for Agrochemicals* (pp. 8-15). ISSA.
- Greenberg, M. E., Li, X. M., Gugiu, B. G., Gu, X., Qin, J., Salomon, R. G., & Hazen, S. L. (2008). The lipid whisker model of the structure of oxidized cell membranes. *Journal of biological chemistry*, 283(4), 2385-2396.

- Greene, D. W., Autio, W. R., Erf, J. A., & Mao, Z. Y. (1992). Mode of action of benzyladenine when used as a chemical thinner on apples. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 117(5), 775-779.
- Grossmann, K. (1991). Induction of leaf abscission in cotton is a common effect of urea-and adenine-type cytokinins. *Plant physiology*, 95(1), 234-237.
- Güneş, A., Kordali, Ş., Turan, M., & Bozhüyük, A. U. (2019). Determination of antioxidant enzyme activity and phenolic contents of some species of the Asteraceae family from medicinal plants. *Industrial crops and products*, 137, 208-213.
- Hall, G. J., Hart, C. A., & Jones, C. A. (2000). Plants as sources of cations antagonistic to glyphosate activity. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 56(4), 351-358.
- Hara, M., Kumagai, K., & Kuboi, T. (2002). Characterization and expression of a water stress responsive gene from a seashore plant *Calystegia soldanella*. *Plant Biotechnology*, 19(4), 277-281.
- Harper, M. (2007). The Review of the Moratorium on GM Canola. Australia.
- Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M. B., Parvin, K., Bhuiyan, T. F., Anee, T. I., Nahar, K., ... & Fujita, M. (2020). Regulation of ROS metabolism in plants under environmental stress: a review of recent experimental evidence. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22), 8695.
- Heide, H., Kalisz, H. M., & Follmann, H. (2004). The oxygen evolving enhancer protein 1 (OEE) of photosystem II in green algae exhibits thioredoxin activity. *Journal of Plant Physiology*, 161(2), 139-149.
- Helander, M., Saloniemi, I., & Saikkonen, K. (2012). Glyphosate in northern ecosystems. *Trends in plant science*, 17(10), 569-574.
- Hickman, M. V., Dodds, D. M., & Huber, D. M. (2002). Micronutrient interactions reduce glyphosate efficacy on tall fescue. In *Proc. Weed Sci. Soc. Am* (Vol. 42, p. 18).
- Hornby, D. (1998). Take-all disease of cereals: a regional perspective. Cab International.
- Horotan, A., & Oancea, S. (2013). Effects of fungicide and acetylsalicylic acid treatments on the physiological and enzymatic activity in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Acta Universitatis Cinbinesis, Series E: Food Technology*, 17(1).
- Hsu, Y. F., Yu, S. C., Yang, C. Y., & Wang, C. S. (2011). Lily ASR protein-conferred cold and freezing resistance in *Arabidopsis*. *Plant physiology and biochemistry*, 49(9), 937-945.
- Hu, H., Columbus, J., Zhang, Y., Wu, D., Lian, L., Yang, S., ... & Herrero, J. J. (2004). A map of WW domain family interactions. *Proteomics*, 4(3), 643-655.
- Hu, W. E. I., Huang, C., Deng, X., Zhou, S., Chen, L., Li, Y. I. N., ... & He, G. (2013). TaASR1, a transcription factor gene in wheat, confers drought stress tolerance in transgenic tobacco. *Plant, cell & environment*, 36(8), 1449-1464.
- Huang, S. S., Hsu, L. J., & Chang, N. S. (2020). Functional role of WW domain-containing proteins in tumor biology and diseases: insight into the role in ubiquitin-proteasome system. *FASEB BioAdvances*, 2(4), 234.
- Huber, D. M., Leuck, J. D., Smith, W. C., & Christmas, E. P. (2004, November). Induced manganese deficiency in GM soybeans. In *North central Fert. Exten. Conf.*
- Huber, D., Cheng, M., & Winsor, B. (2005). Association of severe *Corynespora* root rot of soybean with glyphosate-killed ragweed. *Phytopathology*, 95(6).

- Hundertmark, M., & Hinch, D. K. (2008). LEA (late embryogenesis abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC genomics*, 9, 1-22.
- Idrees, M., Khan, M. M. A., Aftab, T., & Naeem, M. (2010). Synergistic effects of gibberellic acid and triacontanol on growth, physiology, enzyme activities and essential oil content of *Coriandrum sativum* L. *The Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology*, 4(1), 24-29.
- Ishida, K. I., & Green, B. R. (2002). Second-and third-hand chloroplasts in dinoflagellates: phylogeny of oxygen-evolving enhancer 1 (PsbO) protein reveals replacement of a nuclear-encoded plastid gene by that of a haptophyte tertiary endosymbiont. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(14), 9294-9299.
- Iusem, N. D., Bartholomew, D. M., Hitz, W. D., & Scolnik, P. A. (1993). Tomato (*Lycopersicon esculentum*) transcript induced by water deficit and ripening. *Plant Physiology*, 102(4), 1353.
- Ivanov, A. G., & Angelov, M. N. (1997). Photosynthesis response to triacontanol correlates with increased dynamics of mesophyll protoplast and chloroplast membranes. *Plant growth regulation*, 21(2), 145-152.
- Jang, S. J., Mallory-Smith, C., & Kuk, Y. I. (2020). Inhibition of wheat growth planted after glyphosate application to weeds. *Weed Science*, 68(4), 373-381.
- Jeanneau, M., Gerentes, D., Foueillassar, X., Zivy, M., Vidal, J., Toppan, A., & Perez, P. (2002). Improvement of drought tolerance in maize: towards the functional validation of the Zm-Asr1 gene and increase of water use efficiency by over-expressing C4-PEPC. *Biochimie*, 84(11), 1127-1135.
- Jiang, L. X., Jin, L. G., Guo, Y., Tao, B., & Qiu, L. J. (2013). Glyphosate effects on the gene expression of the apical bud in soybean (*Glycine max*). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 437(4), 544-549.
- Johal, G. S., & Huber, D. M. (2009). Glyphosate effects on diseases of plants. *European Journal of agronomy*, 31(3), 144-152.
- Johal, G. S., & Rahe, J. E. (1984). Effect of soilborne plant pathogenic fungi on the herbicidal action of glyphosate on bean seedlings. *Phytopathology*, 74(8), 950-955.
- Johal, G. S., & Rahe, J. E. (1988). Glyphosate, hypersensitivity and phytoalexin accumulation in the incompatible bean anthracnose host-parasite interaction. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 32(2), 267-281.
- Johal, G. S., & Rahe, J. E. (1990). Role of phytoalexins in the suppression of resistance of *Phaseolus vulgaris* to *Colletotrichum lindemuthianum* by glyphosate. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 12(3), 225-235.
- Jolley, V. D., Hansen, N. C., & Shiffler, A. K. (2004). Nutritional and management related interactions with iron-deficiency stress response mechanisms. *Soil Science and Plant Nutrition*, 50(7), 973-981.
- Joo, J., Lee, Y. H., Kim, Y. K., Nahm, B. H., & Song, S. I. (2013). Abiotic stress responsive rice ASR1 and ASR3 exhibit different tissue-dependent sugar and hormone-sensitivities. *Molecules and cells*, 35, 421-435.
- Joshi, N. C., Singh, D. K., & Jain, S. K. (1999). Response of plant bioregulators on growth and yield of chilli during summer season. *Adv. Hort. & Fores*, 7, 95-99.
- Kagan, V. E., Mao, G., Qu, F., Angeli, J. P. F., Doll, S., Croix, C. S., ... & Bayır, H. (2017). Oxidized arachidonic and adrenic PEs navigate cells to ferroptosis. *Nature chemical biology*, 13(1), 81-90.

- Kalifa, Y., Gilad, A., Konrad, Z., Zaccari, M., Scolnik, P. A., & Bar-Zvi, D. (2004). The water-and salt-stress-regulated Asr1 (abscisic acid stress ripening) gene encodes a zinc-dependent DNA-binding protein. *Biochemical journal*, 381(2), 373-378.
- Kärkönen, A., & Kuchitsu, K. (2015). Reactive oxygen species in cell wall metabolism and development in plants. *Phytochemistry*, 112, 22-32.
- Keen, N. T., Holliday, M. J., & Yoshikawa, M. (1982). Effects of glyphosate on glyceollin production and the expression of resistance to *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* in soybean. *Phytopathology*, 72(11), 1467-1470.
- Khanam, D., & Mohammad, F. (2018). Plant growth regulators ameliorate the ill effect of salt stress through improved growth, photosynthesis, antioxidant system, yield and quality attributes in *Mentha piperita* L. *Acta physiologiae plantarum*, 40, 1-13.
- Khanmohammadi, M., Dastjerdi, M. B., Ai, A., Ahmadi, A., Godarzi, A., Rahimi, A., & Ai, J. (2018). Horseradish peroxidase-catalyzed hydrogelation for biomedical applications. *Biomaterials science*, 6(6), 1286-1298.
- Kim, E. Y., Choi, Y. H., Lee, J. I., Kim, I. H., & Nam, T. J. (2015). Antioxidant activity of oxygen evolving enhancer protein 1 purified from *Capsosiphon fulvescens*. *Journal of food science*, 80(6), H1412-H1417.
- Kim, I. S., Kim, Y. S., & Yoon, H. S. (2012). Rice ASR1 protein with reactive oxygen species scavenging and chaperone-like activities enhances acquired tolerance to abiotic stresses in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecules and cells*, 33, 285-293.
- Kim, S. J., Lee, S. C., Hong, S. K., An, K., An, G., & Kim, S. R. (2009). Ectopic expression of a cold-responsive OsAsr1 cDNA gives enhanced cold tolerance in transgenic rice plants. *Molecules and Cells*, 27, 449-458.
- Kolker, L. S. (1979). Analytical procedures for 1-triacontanol and its presence and the environment.
- Konrad, Z., & Bar-Zvi, D. (2008). Synergism between the chaperone-like activity of the stress regulated ASR1 protein and the osmolyte glycine-betaine. *Planta*, 227, 1213-1219.
- Kovacs, P., Juranek, I., Stankovicova, T., & Svec, P. (1996). Lipid peroxidation during acute stress. *Die Pharmazie*, 51(1), 51-53.
- Kremer, R., Means, N., & Kim, S. (2005). Glyphosate affects soybean root exudation and rhizosphere micro-organisms. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 85(15), 1165-1174.
- Krishnan, R. R., & Kumari, B. D. (2008). Effect of N-triacontanol on the growth of salt stressed soybean plants. *Journal of Bioscience*, 19(2), 53-62.
- Kudsk, P., & Streibig, J. C. (2003). Herbicides—a two-edged sword. *Weed Research*, 43(2), 90-102.
- Kuhn, H., Banthiya, S., & Van Leyen, K. (2015). Mammalian lipoxygenases and their biological relevance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1851(4), 308-330.
- Kuhn, H., Belkner, J., Wiesner, R., & Brash, A. R. (1990). Oxygenation of biological membranes by the pure reticulocyte lipoxygenase. *Journal of Biological Chemistry*, 265(30), 18351-18361.
- Laitinen, P., Rämö, S., Nikunen, U., Jauhiainen, L., Siimes, K., & Turtola, E. (2009). Boreal kumlu toprakta glifosat ve fosfor liçi ve artıkları. *Bitki ve toprak*, 323 (1), 267-283.

- Lal, M., Schöneich, C., Mönig, J., & Asmus, K. D. (1988). Rate constants for the reactions of halogenated organic radicals. *International Journal of Radiation Biology*, 54(5), 773-785.
- Lange, R., & McLaren, D. (2002). Fusarium wilt—a new disease of canola.
- Larson, R. L., Hill, A. L., Fenwick, A., Kniss, A. R., Hanson, L. E., & Miller, S. D. (2006). Influence of glyphosate on Rhizoctonia and Fusarium root rot in sugar beet. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 62(12), 1182-1192.
- Lavery, C. B., MacInnis, M. C., MacDonald, M. J., Williams, J. B., Spencer, C. A., Burke, A. A., ... & D'Cunha, G. B. (2010). Purification of peroxidase from horseradish (*Armoracia rusticana*) roots. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(15), 8471-8476.
- Li, R. H., Liu, G. B., Wang, H., & Zheng, Y. Z. (2013). Effects of Fe³⁺ and Zn²⁺ on the structural and thermodynamic properties of a soybean ASR protein. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 77(3), 475-481.
- Li, Z., Li, X., Cui, H., Zhao, G., Zhai, D., & Chen, J. (2021). Vegetative and fecundity fitness benefit found in a glyphosate-resistant Eleusine indica population caused by 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase overexpression. *Frontiers in Plant Science*, 12, 776990.
- Liszkay, A., Kenk, B., & Schopfer, P. (2003). Evidence for the involvement of cell wall peroxidase in the generation of hydroxyl radicals mediating extension growth. *Planta*, 217, 658-667.
- Liu, S., He, Y., Tian, H., Yu, C., Tan, W., Li, Z., & Duan, L. (2019). Application of brassinosteroid mimetics improves growth and tolerance of maize to nicosulfuron toxicity. *Journal of Plant Growth Regulation*, 38, 701-712.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCT method. *methods*, 25(4), 402-408.
- Londo, J. P., Bollman, M. A., Sagers, C. L., Lee, E. H., & Watrud, L. S. (2011a). Changes in fitness-associated traits due to the stacking of transgenic glyphosate resistance and insect resistance in *Brassica napus* L. *Heredity*, 107(4), 328-337.
- Londo, J. P., Bollman, M. A., Sagers, C. L., Lee, E. H., & Watrud, L. S. (2011). Glyphosate-drift but not herbivory alters the rate of transgene flow from single and stacked trait transgenic canola (*Brassica napus*) to nontransgenic *B. napus* and *B. rapa*. *New Phytologist*, 191(3), 840-849.
- Londo, J. P., McKinney, J., Schwartz, M., Bollman, M., Sagers, C., & Watrud, L. (2014). Sub-lethal glyphosate exposure alters flowering phenology and causes transient male-sterility in *Brassicasp.* *BMC plant biology*, 14(1), 1-10.
- Łuczaj, W., Gęgotek, A., & Skrzydlewska, E. (2017). Antioxidants and HNE in redox homeostasis. *Free Radical Biology and Medicine*, 111, 87-101.
- Luo, C., Dong, L., He, X. H., Yu, H. X., Ou, S. J., & Fang, Z. B. (2014). Molecular cloning and characterisation of a cDNA encoding an abscisic acid-, stress-, and ripening-induced (ASR) protein in mango (*Mangifera indica* L.). *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 89(3), 352-358.
- Lück, H. (1965). Peroxidase. *Methods of enzymatic analysis*, 895-897.)
- Macias, M. J., Wiesner, S., & Sudol, M. (2002). WW and SH3 domains, two different scaffolds to recognize proline-rich ligands. *FEBS letters*, 513(1), 30-37.

- Maciel, H. P. F., Gouvêa, C. M. C. P., Toyama, M., Smolka, M., Marangoni, S., & Pastore, G. M. (2007). Extraction, purification and biochemical characterization of a peroxidase from *Copaifera langsdorffii* leaves. *Quimica Nova*, 30, 1067-1071.
- Manu, B. T., & Rao, U. P. (2009). Calcium modulated activity enhancement and thermal stability study of a cationic peroxidase purified from wheat bran. *Food Chemistry*, 114(1), 66-71.
- Marschner, H. (1995). Mineral nutrition of higher plants 2nd edn. Institute of Plant Nutrition University of Hohenheim: Germany.
- Marschner, H., & Römheld, V. (1994). Strategies of plants for acquisition of iron. *Plant and soil*, 165(2), 261-274.
- Marshall, E. J. P. (2001, November). Biodiversity, herbicides and non-target plants. In Brighton Crop Protection Conference Weeds (Vol. 2, pp. 855-862).
- Maskin, L., Frankel, N., Gudesblat, G., Demergasso, M. J., Pietrasanta, L. I., & Iusem, N. D. (2007). Dimerization and DNA-binding of ASR1, a small hydrophilic protein abundant in plant tissues suffering from water loss. *Biochemical and biophysical research communications*, 352(4), 831-835.
- Mathesius, U. (2018). Flavonoid functions in plants and their interactions with other organisms. *Plants*, 7(2), 30.
- McCord, J. M., & Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *Journal of Biological chemistry*, 244(22), 6049-6055.
- Mekwatanakarn, P., & Sivasithamparam, K. (1987). Effect of certain herbicides on soil microbial populations and their influence on saprophytic growth in soil and pathogenicity of take-all fungus. *Biology and Fertility of Soils*, 5(2), 175-180.
- Michalski, M. C., Calzada, C., Makino, A., Michaud, S., & Guichardant, M. (2008). Oxidation products of polyunsaturated fatty acids in infant formulas compared to human milk—a preliminary study. *Molecular nutrition & food research*, 52(12), 1478-1485.
- Mierau, A., Kurtenbach, M. E., Johnson, E. N., Gulden, R. H., Weber, J. D., May, W. E., & Willenborg, C. J. (2020). Herbicide programs for control of glyphosate-resistant canola (*Brassica napus*) in glyphosate-resistant soybean. *Weed Technology*, 34(4), 540-546.
- Moorthy, P., & Kathiresan, K. (1993). Physiological responses of mangrove seedling to triacontanol. *Biologia plantarum*, 35(4), 577-581.
- Morgan, L. T., Thomas, C. P., Kühn, H., & O'Donnell, V. B. (2010). Thrombin-activated human platelets acutely generate oxidized docosahexaenoic-acid-containing phospholipids via 12-lipoxygenase. *Biochemical Journal*, 431(1), 141-148.
- Mu, C., Zhao, J., Wang, L., Song, L., Song, X., Zhang, H., ... & Cui, Z. (2009). A thioredoxin with antioxidant activity identified from *Eriocheir sinensis*. *Fish & Shellfish Immunology*, 26(5), 716-723.
- Mueller, T. C., Main, C. L., Thompson, M. A., & Steckel, L. E. (2006). Comparison of glyphosate salts (isopropylamine, diammonium, and potassium) and calcium and magnesium concentrations on the control of various weeds. *Weed Technology*, 20(1), 164-171.
- Naeem, M., Khan, M. M. A., & Moinuddin. (2012). Triacontanol: a potent plant growth regulator in agriculture. *Journal of Plant Interactions*, 7(2), 129-142.*

- Naeem, M., Khan, M. M. A., & Siddiqui, M. H. (2009). Triacntanol stimulates nitrogen-fixation, enzyme activities, photosynthesis, crop productivity and quality of hyacinth bean (*Lablab purpureus* L.). *Scientia horticulturae*, 121(4), 389-396.
- Nalewaja, J. D., & Matysiak, R. (1991). Salt antagonism of glyphosate. *Weed Science*, 39(4), 622-628.
- Nalewaja, J. D., Matysiak, R., & Freeman, T. P. (1992). Spray droplet residual of glyphosate in various carriers. *Weed Science*, 40(4), 576-589.
- Nida, D. L., Kolacz, K. H., Buehler, R. E., Deaton, W. R., Schuler, W. R., Armstrong, T. A., ... & Fuchs, R. L. (1996). Glyphosate-tolerant cotton: genetic characterization and protein expression. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(7), 1960-1966.
- Niki, E. (2009). Lipid peroxidation: physiological levels and dual biological effects. *Free Radical Biology and Medicine*, 47(5), 469-484.
- Niki, E., Yoshida, Y., Saito, Y., & Noguchi, N. (2005). Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochemical and biophysical research communications*, 338(1), 668-676.
- Okşar, M., & Uygur, S. (2000). Çukurova'daki yabancı otlar ve bunların biyolojik mücadele olanakları. *Türkiye Herboloji Derg.*, 3(1), 27-36.
- Onsa, G. H., bin Saari, N., Selamat, J., & Bakar, J. (2004). Purification and characterization of membrane-bound peroxidases from *Metroxylon sagu*. *Food Chemistry*, 85(3), 365-376.
- Ozturk, L., Yazici, A., Eker, S., Gokmen, O., Römheld, V., & Cakmak, I. (2008). Glyphosate inhibition of ferric reductase activity in iron deficient sunflower roots. *New Phytologist*, 177(4), 899-906.
- Pandey, S., Sharma, A. K., Solanki, K. P., & Singh, S. P. (2018). Catalysis and stability of an extracellular α -amylase from a haloalkaliphilic bacterium as a function of the organic solvents at different pH, salt concentrations and temperatures.
- Pandey, V. P., Awasthi, M., Singh, S., Tiwari, S., & Dwivedi, U. N. (2017). A comprehensive review on function and application of plant peroxidases. *Biochem Anal Biochem*, 6(1), 308.
- Patil, S. M., Kadam, V. J., & Ghosh, R. (2009). In vitro antioxidant activity of methanolic extract of stem bark of *Gmelina arborea* Roxb.(Verbenaceae). *International Journal of PharmTech Research*, 1(4), 1480-1484.
- Pedersen, H. L., Willassen, N. P., & Leiros, I. (2009). The first structure of a cold-adapted superoxide dismutase (SOD): biochemical and structural characterization of iron SOD from *Aliivibrio salmonicida*. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 65(2), 84-92.
- Pfleeger, T., Blakeley-Smith, M., King, G., Henry Lee, E., Plocher, M., & Olszyk, D. (2012). The effects of glyphosate and aminopyralid on a multi-species plant field trial. *Ecotoxicology*, 21(7), 1771-1787.
- Plant, P. J., Yeger, H., Staub, O., Howard, P., & Rotin, D. (1997). The C2 domain of the ubiquitin protein ligase Nedd4 mediates Ca^{2+} -dependent plasma membrane localization. *Journal of Biological Chemistry*, 272(51), 32329-32336.
- Pline, W. A., Edmisten, K. L., Wilcut, J. W., Wells, R., & Thomas, J. (2003). Glyphosate-induced reductions in pollen viability and seed set in glyphosate-resistant cotton and attempted remediation by gibberellic acid (GA3). *Weed Science*, 51(1), 19-27.

- Pratt, D. A., Tallman, K. A., & Porter, N. A. (2011). Free radical oxidation of polyunsaturated lipids: New mechanistic insights and the development of peroxy radical clocks. *Accounts of chemical research*, 44(6), 458-467.
- Rademacher, W. (2000). Growth retardants: effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways. *Annual review of plant biology*, 51(1), 501-531.
- Rademacher, W. (2015). Plant growth regulators: backgrounds and uses in plant production. *Journal of plant growth regulation*, 34, 845-872.
- Rademacher, W. (2016). Chemical regulators of gibberellin status and their application in plant production. *Annual Plant Reviews*, Volume 49: Gibberellins, The, 359-404.
- Raffa, M., Atig, F., Mhalla, A., Kerkeni, A., & Mechri, A. (2011). Decreased glutathione levels and impaired antioxidant enzyme activities in drug-naïve first-episode schizophrenic patients. *BMC psychiatry*, 11(1), 1-7.
- Rahe, J. E., Lévesque, C. A., & Johal, G. S. (1990). Synergistic role of soil fungi in the herbicidal efficacy of glyphosate.
- Rahman, K. (2007). Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical interventions in aging*, 2(2), 219-236.
- Reddy, K. N., Rimando, A. M., & Duke, S. O. (2004). Aminomethylphosphonic acid, a metabolite of glyphosate, causes injury in glyphosate-treated, glyphosate-resistant soybean. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(16), 5139-5143.
- Rejiya, C. S., Cibin, T. R., & Abraham, A. (2009). Leaves of *Cassia tora* as a novel cancer therapeutic—An in vitro study. *Toxicology in vitro*, 23(6), 1034-1038.
- Ricardi, M. M., Guaimas, F. F., González, R. M., Burrieza, H. P., López-Fernández, M. P., Jares-Erijman, E. A., ... & Iusem, N. D. (2012). Nuclear import and dimerization of tomato ASR1, a water stress-inducible protein exclusive to plants.
- Ries, S. (1991). Triacantanol and its second messenger 9- β -L (+)-adenosine as plant growth substances. *Plant Physiology*, 95(4), 986-989.
- Ries, S. K., & Wert, V. F. (1988). Rapid elicitation of second messengers by nanomolar doses of triacantanol and octacosanol. *Planta*, 173, 79-87.
- Ries, S. K., Wert, V., Sweeley, C. C., & Leavitt, R. A. (1977). Triacantanol: a new naturally occurring plant growth regulator. *Science*, 195(4284), 1339-1341.
- Ries, S., Savithiry, S., Wert, V., & Widders, I. (1993). Rapid induction of ion pulses in tomato, cucumber, and maize plants following a foliar application of L (+)-adenosine. *Plant physiology*, 101(1), 49-55.
- Rom, S., Gilad, A., Kalifa, Y., Konrad, Z., Karpasas, M. M., Goldgur, Y., & Bar-Zvi, D. (2006). Mapping the DNA- and zinc-binding domains of ASR1 (abscisic acid stress ripening), an abiotic-stress regulated plant specific protein. *Biochimie*, 88(6), 621-628.
- Rosenberger, D., & Fargione, M. (2004). Apple pest report 12, 6. University of Maine Cooperative Extension Service.
- Rossi, M., Lijavetzky, D., Hopp, H. E., Iusem, N., Bernacchi, D., Rossi, M., ... & Iusem, N. (1996). Asr genes belong to a gene family comprising at least three closely linked loci on chromosome 4 in tomato. *Molecular and General Genetics MGG*, 252, 489-492.
- Salah, Z., Alian, A., & Aqeilan, R. I. (2012). WW domain-containing proteins: retrospectives and the future. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 17(1), 331-348.

- Saleethong, P., Roytrakul, S., Kong-Ngern, K., & Theerakulpisut, P. (2016). Differential proteins expressed in rice leaves and grains in response to salinity and exogenous spermidine treatments. *Rice Science*, 23(1), 9-21.
- Santos, L. D. T., Meira, R. M. S. A., Ferreira, F. A., Sant'Anna-Santos, B. F., & Ferreira, L. R. (2007). Morphological responses of different eucalypt clones submitted to glyphosate drift. *Environmental and experimental botany*, 59(1), 11-20.
- Sardar, R., Ahmed, S., Akbar, M., Yasin, N. A., & Li, G. (2022). Alleviation of cadmium phytotoxicity in triacontanol treated *Coriandrum sativum* L. by modulation of physiochemical attributes, oxidative stress biomarkers and antioxidative system. *Chemosphere*, 295, 133924.
- Sarwar, M., Amjad, M., & Ayyub, C. M. (2017). Alleviation of Salt Stress in Cucumber (*Cucumis sativus*) through Seed Priming with Triacontanol. *International Journal of Agriculture & Biology*, 19(4).
- Sato, S., Tabata, S., Hirakawa, H., Asamizu, E., Shirasawa, K., Isobe, S., ... & Fernandez-Munoz, R. (2012). The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature*, 485(7400), 635-641.
- Saumonneau, A., Agasse, A., Bidoyen, M. T., Lallemand, M., Cantereau, A., Medici, A., ... & Atanassova, R. (2008). Interaction of grape ASR proteins with a DREB transcription factor in the nucleus. *Febs Letters*, 582(23-24), 3281-3287.
- Saumonneau, A., foi, M., Lallemand, M., Rabot, A., & Atanassova, R. (2012). Dissection of the transcriptional regulation of grape ASR and response to glucose and abscisic acid. *Journal of experimental botany*, 63(3), 1495-1510.
- Schäfer, G., & Kardinahl, S. (2003). Iron superoxide dismutases: structure and function of an archaic enzyme. *Biochemical Society Transactions*, 31(6), 1330-1334.
- Scheffner, M., Nuber, U., & Huibregtse, J. M. (1995). Protein ubiquitination involving an E1–E2–E3 enzyme ubiquitin thioester cascade. *Nature*, 373(6509), 81-83.
- Schneider, R. W., Hollier, C. A., Whitam, H. K., Palm, M. E., McKemy, J. M., Hernandez, J. R., ... & DeVries-Paterson, R. (2005). First report of soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi* in the continental United States. *Plant disease*, 89(7), 774-774.
- Schönherr, J., & Schreiber, L. (2004). Interactions of calcium ions with weakly acidic active ingredients slow cuticular penetration: a case study with glyphosate. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(21), 6546-6551.
- Schulz, A., Münder, T., Holländer-Czytko, H., & Amrhein, N. (1990). Glyphosate transport and early effects on shikimate metabolism and its compartmentation in sink leaves of tomato and spinach plants. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 45(5), 529-534.
- Serrano-Martínez, A., del Amor, F., Fortea, M. I., Lucas-Abellán, C., López-Miranda, S., & Núñez-Delicado, E. (2014). Effect of plant age and saline water on antioxidant and peroxidase activity in sweet pepper fruit. *Journal of Agricultural Science*, 6(12), 1-13.
- Serrano-Martínez, A., Fortea, M. I., Del Amor, F. M., & Núñez-Delicado, E. (2008). Kinetic characterisation and thermal inactivation study of partially purified red pepper (*Capsicum annuum* L.) peroxidase. *Food chemistry*, 107(1), 193-199.
- Sharma, A., Bhardwaj, R., Kumar, V., & Thukral, A. K. (2016). GC-MS studies reveal stimulated pesticide detoxification by brassinolide application in *Brassica juncea* L. plants. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 14518-14525.

- Sharma, I., Bhardwaj, R., & Pati, P. K. (2013). Stress modulation response of 24-epibrassinolide against imidacloprid in an elite indica rice variety Pusa Basmati-1. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 105(2), 144-153.
- Sherman, T. D., Vaughn, K. C., & Duke, S. O. (2018). Mechanisms of action and resistance to herbicides. In *Herbicide-resistant crops* (pp. 13-35). CRC Press.
- Shkolnik, D., & Bar-Zvi, D. (2008). Tomato ASR1 abrogates the response to abscisic acid and glucose in Arabidopsis by competing with ABI4 for DNA binding. *Plant biotechnology journal*, 6(4), 368-378.
- Shkolnik-Inbar, D., & Bar-Zvi, D. (2010). ABI4 mediates abscisic acid and cytokinin inhibition of lateral root formation by reducing polar auxin transport in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 22(11), 3560-3573.
- Shopova, E., Katerova, Z., Brankova, L., Dimitrova, L., Sergiev, I., Todorova, D., & Talaat, N. B. (2021). Modulation of physiological stress response of *Triticum aestivum* L. to glyphosate by brassinosteroid application. *Life*, 11(11), 1156.
- Shu, G., Zhang, B., Zhang, Q., Wan, H., & Li, H. (2016). Effect of temperature, pH, enzyme to substrate ratio, substrate concentration and time on the antioxidative activity of hydrolysates from goat milk casein by alcalase. *Acta Universitatis Cibiniensis. Series E: Food Technology*, 20(2), 29-38.
- Silhavy, D., Hutvágner, G., Barta, E., & Bánfalvi, Z. (1995). Isolation and characterization of a water-stress-inducible cDNA clone from *Solanum chacoense*. *Plant molecular biology*, 27, 587-595.
- Singh, S., Kumar, V., Gill, J. P. K., Datta, S., Singh, S., Dhaka, V., ... & Singh, J. (2020). Herbicide glyphosate: Toxicity and microbial degradation. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(20), 7519.
- Sitinjak, R. R., & Pandiangan, D. (2015). The effect of plant growth regulator triacontanol to the growth of cação seedlings (*Theobroma cacao* L.). *AGRIVITA, Journal of Agricultural Science*, 36(3), 260-267.
- Smiley, R. W., Ogg Jr, A. G., & Cook, R. J. (1991). Influence of glyphosate on Rhizoctonia root rot, growth, and yield of barley. *Plant disease (USA)*.
- Smith, M. W., & Doolittle, R. F. (1992). A comparison of evolutionary rates of the two major kinds of superoxide dismutase. *Journal of molecular evolution*, 34, 175-184.
- Soares, C., Pereira, R., Spormann, S., & Fidalgo, F. (2019). Is soil contamination by a glyphosate commercial formulation truly harmless to non-target plants?—Evaluation of oxidative damage and antioxidant responses in tomato. *Environmental Pollution*, 247, 256-265.
- Spormann, S., Soares, C., & Fidalgo, F. (2019). Salicylic acid alleviates glyphosate-induced oxidative stress in *Hordeum vulgare* L. *Journal of environmental management*, 241, 226-234.
- Srivastava, A., & Handa, A. K. (2005). Hormonal regulation of tomato fruit development: a molecular perspective. *Journal of plant growth regulation*, 24, 67-82.
- Srivastava, D., Verma, G., Chawda, K., Chauhan, A. S., Pande, V., & Chakrabarty, D. (2022). Overexpression of Asr6, abscisic acid stress-ripening protein, enhances drought tolerance and modulates gene expression in rice (*Oryza sativa* L.). *Environmental and Experimental Botany*, 202, 105005.
- Stallings, W. C., Abdel-Meguid, S. S., Lim, L. W., Shieh, H. S., Dayringer, H. E., Leimgruber, N. K., ... & Kishore, G. M. (1991). Structure and topological symmetry of

- the glyphosate target 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase: a distinctive protein fold. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(11), 5046-5050.
- Steinrücken, H. C., & Amrhein, N. (1980). The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvylshikimate acid-3-phosphate synthase. *Biochemical and biophysical research communications*, 94(4), 1207-1212.
- Su, L. J., Zhang, J. H., Gomez, H., Murugan, R., Hong, X., Xu, D., ... & Peng, Z. Y. (2019). Reactive oxygen species-induced lipid peroxidation in apoptosis, autophagy, and ferroptosis. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019.
- Subramaniam, V., & Hoggard, P. E. (1988). Metal complexes of glyphosate. *Journal of agricultural and food chemistry*, 36(6), 1326-1329.
- Sudol, M., & Hunter, T. (2000). NeW wrinkles for an old domain. *Cell*, 103(7), 1001-1004.
- Sudol, M., Chen, H. I., Bougeret, C., Einbond, A., & Bork, P. (1995). Characterization of a novel protein-binding module—the WW domain. *FEBS letters*, 369(1), 67-71.
- Sudol, M., Recinos, C. C., Abraczinskas, J., Humbert, J., & Farooq, A. (2005). WW or WoW: the WW domains in a union of bliss. *IUBMB life*, 57(12), 773-778.
- Sumathi, S., & Pattabiraman, T. N. (1977). Natural plant enzyme inhibitors V. A trypsin/chymotrypsin inhibitor from *Alocasia macrorrhiza* tuber. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*, 485(1), 167-178.
- Sundaram, A., & Sundaram, K. M. S. (1997). Solubility products of six metal-glyphosate complexes in water and forestry soils, and their influence on glyphosate toxicity to plants. *Journal of Environmental Science & Health Part B*, 32(4), 583-598.
- Swietlińska, Z., & Zuk, J. (1978). Cytotoxic effects of maleic hydrazide. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 55(1), 15-30.
- Tanaka, S., & Wada, K. (1988). The status of cysteine residues in the extrinsic 33 kDa protein of spinach photosystem II complexes. *Photosynthesis research*, 17, 255-266.
- Tanney, J. B., & Hutchison, L. J. (2010). The effects of glyphosate on the in vitro linear growth of selected microfungi from a boreal forest soil. *Canadian journal of microbiology*, 56(2), 138-144.
- Thelen, K. D., Jackson, E. P., & Penner, D. (1995). The basis for the hard-water antagonism of glyphosate activity. *Weed Science*, 43(4), 541-548.
- Tian, Y., Fan, M., Qin, Z., Lv, H., Wang, M., Zhang, Z., ... & Bai, M. Y. (2018). Hydrogen peroxide positively regulates brassinosteroid signaling through oxidation of the BRASSINAZOLE-RESISTANT1 transcription factor. *Nature Communications*, 9(1), 1063.
- Tiryaki (2015). Soğuk dayanıklı verimli yaprak apoplastından izole edilmiş hücrelerin fasulyede (*Phaseolus vulgaris* L.) soğuk stres toleransı etkileri üzerine. *YÖK Tez, Atatürk Üniversitesi, Erzurum*.
- Tohma, H. S., & Gulçin, I. (2010). Antioxidant and radical scavenging activity of aerial parts and roots of Turkish liquorice (*Glycyrrhiza glabra* L.). *International Journal of Food Properties*, 13(4), 657-671.
- Tommerup, I. C., Alfenas, A. C., & Old, K. M. (2003). Guava rust in Brazil—a threat to *Eucalyptus* and other *Myrtaceae*. *New Zealand Journal of Forestry Science*, 33(3), 420-428.

- Tuffi Santos, L. D., Graça, R. N., Alfenas, A. C., Ferreira, F. A., Melo, C. A., & Machado, M. S. (2011). Glyphosate reduces urediniospore development and *Puccinia psidii* disease severity on *Eucalyptus grandis*. *Pest management science*, 67(7), 876-880.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(1), 44-84.
- Van Camp, W., Bowler, C., Villarroel, R., Tsang, E. W., Van Montagu, M., & Inze, D. (1990). Characterization of iron superoxide dismutase cDNAs from plants obtained by genetic complementation in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(24), 9903-9907.
- Vanholme, B., El Houari, I., & Boerjan, W. (2019). Bioactivity: phenylpropanoids' best kept secret. *Current Opinion in Biotechnology*, 56, 156-162.
- Vereecken, H. (2005). Mobility and leaching of glyphosate: a review. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 61(12), 1139-1151.
- Verma, T., Bhardwaj, S., Singh, J., Kapoor, D., & Prasad, R. (2022). Triaccontanol as a versatile plant growth regulator in overcoming negative effects of salt stress. *Journal of Agriculture and Food Research*, 100351.
- Virlouvet, L., Jacquemot, M. P., Gerentes, D., Corti, H., Bouton, S., Gilard, F., ... & Coursol, S. (2011). The ZmASR1 protein influences branched-chain amino acid biosynthesis and maintains kernel yield in maize under water-limited conditions. *Plant physiology*, 157(2), 917-936.
- Walker, D. R., Walker, A. K., Wood, E. D., Bonet Talevera, M. E., Fernandez, F. E., Rowan, G. B., ... & Boerma, H. R. (2006). Gametic selection by glyphosate in soybean plants hemizygous for the CP4 EPSPS transgene. *Crop science*, 46(1), 30-35.
- Wang, H. J., Hsu, C. M., Jauh, G. Y., & Wang, C. S. (2005). A lily pollen ASR protein localizes to both cytoplasm and nuclei requiring a nuclear localization signal. *Physiologia plantarum*, 123(3), 314-320.
- Waszczak, C., Carmody, M., & Kangasjärvi, J. (2018). Reactive oxygen species in plant signaling. *Annual review of plant biology*, 69, 209-236.
- Waterland, R. A. (2006). Epigenetic mechanisms and gastrointestinal development. *The Journal of pediatrics*, 149(5), S137-S142.
- Wedelsbäck Bladh, K., & Olsson, K. M. (2011). Introduction and use of horseradish (*Armoracia rusticana*) as food and medicine from antiquity to the present: emphasis on the Nordic countries. *Journal of herbs, spices & medicinal plants*, 17(3), 197-213.
- Weidenhamer, J. D., & Callaway, R. M. (2010). Direct and indirect effects of invasive plants on soil chemistry and ecosystem function. *Journal of chemical ecology*, 36(1), 59-69.
- Welch, R. M. (1999). Importance of seed mineral nutrient reserves in crop growth. *Mineral Nutrition of Crops*. Food Product Press. New York, 205-206.
- Whipker, B. E. (2013). Growth regulators for floricultural crops in greenhouses. *Plant growth regulator guide*. GrowerTalks Magazine, C. Beytes, ed.(West Chicago, IL: Ball Publishing), 8-37.
- Woodburn, A. T. (2000). Glyphosate: production, pricing and use worldwide. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 56(4), 309-312.

- Wu, C. R., Lin, W. H., Hseu, Y. C., Lien, J. C., Lin, Y. T., Kuo, T. P., & Ching, H. (2011). Evaluation of the antioxidant activity of five endemic *Ligustrum* species leaves from Taiwan flora in vitro. *Food chemistry*, 127(2), 564-571.
- Xia, X. J., Zhang, Y., Wu, J. X., Wang, J. T., Zhou, Y. H., Shi, K., ... & Yu, J. Q. (2009). Brassinosteroids promote metabolism of pesticides in cucumber. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(18), 8406-8413.
- Yadav, N. S., Shukla, P. S., Jha, A., Agarwal, P. K., & Jha, B. (2012). The SbSOS1 gene from the extreme halophyte *Salicornia brachiata* enhances Na⁺ loading in xylem and confers salt tolerance in transgenic tobacco. *BMC plant biology*, 12, 1-18.
- Yamada, T. (2006). *Informações Agronomicas 116*. IPNI-International Plant Nutrition Institute, Piracicaba-SP, Brazil.
- Yamada, T., Ichimura, K., Kanekatsu, M., & van Doorn, W. G. (2007). Gene expression in opening and senescing petals of morning glory (*Ipomoea nil*) flowers. *Plant cell reports*, 26, 823-835.
- Yamamoto, Y. (1988). Organization of the oxygen-evolution enzyme complex studied by butanol/water phase partitioning of spinach photosystem II particles. *Journal of Biological Chemistry*, 263(1), 497-500.
- Yamamoto, Y. (2001). Quality control of photosystem II. *Plant and Cell Physiology*, 42(2), 121-128.
- Yamamoto, Y., & Nishimura, M. (1983). Organization of the O₂-evolution enzyme complex in a highly active O₂-evolving photosystem-II preparation. In *The oxygen evolving system of photosynthesis* (pp. 229-238). Academic Press.
- Yang, C. Y., Chen, Y. C., Jauh, G. Y., & Wang, C. S. (2005). A lily ASR protein involves abscisic acid signaling and confers drought and salt resistance in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 139(2), 836-846.
- Yasuor, H., Riov, J., & Rubin, B. (2007). Glyphosate-induced male sterility in glyphosate-resistant cotton (*Gossypium hirsutum* L.) is associated with inhibition of anther dehiscence and reduced pollen viability. *Crop protection*, 26(3), 363-369.
- Zaid, A., Asgher, M., Wani, I. A., & Wani, S. H. (2020). Role of triacontanol in overcoming environmental stresses. *Protective chemical agents in the amelioration of plant abiotic stress: biochemical and molecular perspectives*, 491-509.
- Zaid, A., Mohammad, F., & Fariduddin, Q. (2020). Plant growth regulators improve growth, photosynthesis, mineral nutrient and antioxidant system under cadmium stress in menthol mint (*Mentha arvensis* L.). *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 26, 25-39.
- Zan, T., Li, L., Xie, T., Zhang, L., & Li, X. (2020). Genome-wide identification and abiotic stress response patterns of abscisic acid stress ripening protein family members in *Triticum aestivum* L. *Genomics*, 112(5), 3794-3802.
- Zanardo, D. I. L., Lima, R. B., Ferrarese, M. D. L. L., Bubna, G. A., & Ferrarese-Filho, O. (2009). Soybean root growth inhibition and lignification induced by p-coumaric acid. *Environmental and Experimental Botany*, 66(1), 25-30.
- Zarkovic, K., Jakovcevic, A., & Zarkovic, N. (2017). Contribution of the HNE-immunohistochemistry to modern pathological concepts of major human diseases. *Free Radical Biology and Medicine*, 111, 110-126.
- Zelko, I. N., Mariani, T. J., & Folz, R. J. (2002). Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene

- structures, evolution, and expression. *Free radical biology and medicine*, 33(3), 337-349.
- Zhang, H., Zhao, Y., & Zhu, J. K. (2020). Thriving under stress: how plants balance growth and the stress response. *Developmental Cell*, 55(5), 529-543.
- Zhang, K., Qin, Z. S., Liu, J. S., Chen, T., Waterman, M. S., & Sun, F. (2004). Haplotype block partitioning and tag SNP selection using genotype data and their applications to association studies. *Genome research*, 14(5), 908-916.
- Zhong, G., Wu, Z., Yin, J., & Chai, L. (2018). Responses of *Hydrilla verticillata* (Lf) Royle and *Vallisneria natans* (Lour.) Hara to glyphosate exposure. *Chemosphere*, 193, 385-393.
- Zhuang, H., Tang, N., & Yuan, Y. (2013). Purification and identification of antioxidant peptides from corn gluten meal. *Journal of Functional Foods*, 5(4), 1810-1821.
- Zou, X., Levy-Cohen, G., & Blank, M. (2015). Molecular functions of NEDD4 E3 ubiquitin ligases in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1856(1), 91-106.
- Zouni, A., Witt, H. T., Kern, J., Fromme, P., Krauss, N., Saenger, W., & Orth, P. (2001). Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 Å resolution. *Nature*, 409(6821), 739-743.
- Zubkova, N. F., Bukashkina, Z. V., & Kulaeva, O. N. (1990). A study of defoliating effects of cytokinins. *Fiziologiya Rastenii*, 37(3), 535-541.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	İhsan KOÇAK
Doğum tarihi:	
Doğum Yeri:	
Uyruğu:	
Adres:	
Tel:	
E-mail:	
Eğitim	
Lise: Oltu Lisesi	Oltu Lisesi
Lisans:	Atatürk Üniversitesi, Fen- Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü
Yüksek lisans:	Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik
Doktora:	
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce:	
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar	
Tezden Üretilmiş Yayınlar	