

33540

T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SİGARA DUMANINA MARUZ BIRAKILMIŞ SALATALIK (*Cucumis sativus* L.)
FİDELERİNDE KÖK YAŞARMA SIVISININ BÜYÜME HORMONLARI İLE
İLGİLİ ÇEŞİTLİ BİYOLOJİK TESTLERDEKİ AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ**

Songül ÇANAKÇI

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ELAZIĞ
1994

T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SİGARA DUMANINA MARUZ BIRAKILMIŞ SALATALIK (*Cucumis sativus* L.)
FİDELERİNDE KÖK YAŞARMA SIVISININ BÜYÜME HORMONLARI İLE
İLGİLİ ÇEŞİTLİ BİYOLOJİK TESTLERDEKİ AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ**

Songül ÇANAKÇI

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu tez...../...../199.....Tarihinde, Aşağıda Belirtilen Jüri Tarafından
Oybirliği / Oyçokluğu ile Başarılı / Başarısız Olarak Değerlendirilmiştir.

(İmza)

(İmza)

(İmza)

Danışman

Prof. Dr. Şener BALTEPE

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

SİGARA DUMANINA MARUZ BIRAKILMIŞ SALATALIK (*Cucumis sativus* L.) FİDELERİNDE
KÖK YAŞARMA SIVISININ BÜYÜME HORMONLARI İLE İLGİLİ ÇEŞİTLİ BİYOLOJİK
TESTLERDEKİ AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ

Songül ÇANAKÇI

Fırat Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
1994, Sayfa : 41

6 günlük *Cucumis sativus* L. fideleri, 24 saat süreyle sigara dumanıyla doyurulmuş kapalı sistemlere alınmış ve uygulama sonunda bitkilerde büyüme parametreleri tesbit edilmiştir. Ayrıca sigara dumanı uygulanmış ve uygulanmamış bitkiler dekapite edilerek, kök eksüdatları toplanmıştır. Daha sonra çözgen ayrıştırması ve kromatografik ayrıştırmayla, kök eksüdatından elde edilen çeşitli fazlara karşı, çeşitli spesifik biyolojik testlerin verdikleri cevaplar araştırılmıştır.

Su fazında, turp kotiledonu genişleme biyotesti ile sitokininler, etil asetat fazında buğday koleoptili dik büyüme testi ile indol asetik asit (IAA) ve absisik asit (ABA) , marul hipokotili dik büyüme testi ile gibberellinler (GA_x) tesbit edilmiştir.

Deneyler sonunda, sigara dumanından kaynaklanan stres faktörünün kök ve hipokotil büyümesinde meydana getirdiği inhibisyona paralel olarak, kök eksüdatındaki ABA düzeyinde bir artışa ve sitokinin düzeyinde bir azalışa yol açtığı gözlenmiştir. Kök eksüdatında IAA aktivitesine rastlanmamıştır. Kökte sentezlenip eksüdasyon sıvısıyla bitkinin üst kısımlarına taşınan gibberellinler, tek Rf 'te toplanamadığından stres faktörünün gibberellin düzeyine etkisi belirlenememiştir.

ANAHTAR KELİMELER : Sigara dumanı, bitki büyüme maddeleri, fide büyümesi, engellenme, kök eksüdatı, biyolojik test.

SUMMARY

Master Thesis

**AN INVESTIGATION ON THE ACTIVITY OF ROOT XYLEM EXUDATE OF CUCUMBER
(*Cucumis sativus* L.) SEEDLINGS IN VARIOUS BIOASSAYS RELATED
TO PLANT GROWTH HORMONES**

Songül ÇANAKÇI

Fırat University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

1994, Page : 41

6 days old *Cucumis sativus* L. seedlings were exposed to cigarette smoke in a closed system for 24 hours and later growth parameters were determined. Subsequent to smoke application, the seedlings were decapitated and root exudates obtained by collection was separated from treated and untreated seedlings were separated in to various fractions by solvent partitioning and chromatography. Using specific hormone bioassays, the activities of these fractions were determined. The basic water phase was assayed with radish cotyledone expansion method for cytokinins. The neutral-acidic ethyl acetat phase, on the other hand, was assayed with wheat coleoptile straight growth method for auxins and ABA, and with lettuce method for gibberellins.

Our results showed that the stress caused by cigarette smoke application gave rise to an increase of ABA and to a decrease of cytokinin levels in root exudate along with growth inhibition in the seedlings. The gibberellin activity could not be determined in the exudate due to the failure of the chromatography in the isolation of them in a certain Rf zone.

KEY WORDS: Cigarette smoke, plant growth substances, seedling growth, inhibition, root exudate, bioassay.

III

TEŞEKKÜR

Bana bu çalışma konusunu veren, yerinde ve zamanında uyarılarla çalışmalarımı yönlendiren, çalışma süresi boyunca yardımlarını esirgemeyen tez yöneticim Sayın Prof. Dr. Şener BALTEPE 'ye, laboratuvar imkanları konusundaki yardımlarından dolayı bölüm başkanımız Sayın Prof. Dr. Niyazi ÖZDEMİR 'e, değerli bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Yrd. Doç. Dr. Ömer MUNZUROĞLU 'na ve aileme teşekkürü bir borç bilirim.

Songül ÇANAKÇI



IV

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖZET.....	I
SUMMARY.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	V
1. GİRİŞ.....	1
2. MATERYAL ve METOD.....	12
2.1. Materyalin Temini.....	12
2.2. Metod.....	12
2.2.1. Fidelerin yetiştirilmesi ve kök eksüdatının toplanması.....	12
2.2.2. Kök eksüdatının etil asetat ile ayrıştırılması ve kromatografik yöntemle saflaştırılması.....	17
2.2.3. Biyolojik testler.....	18
2.2.3.1. Sitokininlerin biyolojik test ile belirlenmesi.....	18
2.2.3.2. IAA ve ABA için buğday koleoptili dik büyüme testi.....	19
2.2.3.3. Gibberellinler için marul hipokotili büyüme testi	20
3. SONUÇLAR ve TARTIŞMA.....	22
3.1. Sigara Dumanının Kök ve Hipokotil Büyümesi Üzerindeki İnhibitif Etkileri.....	22
3.2. Sigara Dumanının Yapraklardaki Klorofil İçeriği Üzerindeki Etkileri....	23
3.3. Sigara Dumanının Endogen Hormon Sentezi Üzerindeki Etkileri.....	24
3.3.1. Sigara dumanının içsel sitokinin sentezi üzerindeki etkileri.....	24
3.3.2. Sigara dumanının içsel IAA ve ABA sentezi üzerindeki etkileri.....	26
3.3.3. Sigara dumanının içsel gibberellin sentezi üzerindeki etkileri.....	29
4. KAYNAKLAR.....	35

ŞEKİLLER LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.2.1.1. Bitkilerin yerleştirildikleri kapalı sistem (PET bidon) ve bu kapalı sisteme sigara dumanı vermek için kullanılan vakum pompası...	13
Şekil 2.2.1.2. Islatma periyodunu tamamlamış salatalık tohumlarının petrilere aktarıldıktan sonraki görünüşleri.....	14
Şekil 2.2.1.3. Salatalık tohumlarının beherlerdeki ıslak filtre kağıtlarının arasına vertikal olarak transplante edilişi.....	15
Şekil 2.2.1.4. Dekapite edilmiş, sigara dumanı uygulanmış (deney) ve uygulanmamış (kontrol) salatalık fidelerinden eksüdasyon sıvısının toplanmasında kullanılan yöntem.....	16
Şekil 3.1.1. Sigara dumanı uygulanan (deney) ve uygulanmayan (kontrol) ortamlarda belirli bir süre (24 saat) gelişmeye bırakılan 10 'ar salatalık bitkisinin, kök ve hipokotillerindeki uzama yüzdeleri (KB: kök boyu, HB:hipokotil boyu).....	22
Şekil 3.2.1. Sigara dumanı uygulanan (deney) ve uygulanmayan (kontrol) ortamlarda belirli bir süre (24 saat) gelişmeye bırakılan salatalık bitkilerinin yapraklarında uygulama sonunda, dokunun gramı başına mg olarak hesaplanan klorofil miktarı (Bu sonuçlar iki replikatin ortalaması alınarak tespit edilmiştir).....	23
Şekil 3.3.1.1. Turp kotiledonlarının, sigara dumanı uygulanan (deney) ve uygulanmayan (kontrol) salatalık bitkilerinden elde edilen kök eksüdatlarının su fazlarında, 500 lux ışık altında ve 60 saat sonra belirlenen genel görünüşleri.....	24
Şekil 3.3.1.2. Sigara dumanı uygulanan (deney grubu) ve uygulanmayan (kontrol grubu) salatalık bitkilerinden elde edilen kök eksüdatlarının etil asetat ile ayrıştırılması sonunda geriye kalan ve bazik maddeleri içeren su fazlarında, turp kotiledonu genişleme biyotesti ile belirlenen sitokin aktivite.....	25
Şekil 3.3.2.1. Buğday koleoptili parçacıklarının, sigara dumanı uygulanan (deney) ve uygulanmayan (kontrol) salatalık fidelerinden elde edilen kök eksüdatının nötr-asidik etil asetat fazının kağıt kromatografi-	

VI

si ile ayrıştırılması sonunda, ABA 'ya tekabül eden Rf 'te belirlenen genel görünüşleri.....	26
Şekil 3.3.2.2. Sigara dumanı uygulanmamış salatalık fidelerinden elde edilen kök eksüdatının nötr-asidik etil asetat fazının kağıt kromatografisi ile ayrıştırılması sonunda, buğday koleoptili dik büyüme biyotesti ile ölçülen IAA ve ABA aktiviteleri.....	27
Şekil 3.3.2.3. Sigara dumanı uygulanması ile gelişimi engellenmiş salatalık fidelerinden elde edilen kök eksüdatının nötr-asidik etil asetat fazının kağıt kromatografisi ile ayrıştırılması sonunda, buğday koleoptili dik büyüme biyotesti ile ölçülen IAA ve ABA aktiviteleri.....	28
Şekil 3.3.3.1. Sigara dumanı uygulanmamış salatalık fidelerinden elde edilen kök eksüdatının nötr-asidik etil asetat fazının ince tabaka kromatografisi ile ayrıştırılması sonunda, marul hipokotili büyüme testi ile ölçülen gibberellin aktiviteleri.....	30
Şekil 3.3.3.2. Sigara dumanı uygulanması ile gelişimi engellenmiş salatalık fidelerinden elde edilen kök eksüdatının nötr-asidik etil asetat fazının ince tabaka kromatografisi ile ayrıştırılması sonunda, marul hipokotili büyüme testi ile ölçülen gibberellin aktiviteleri.....	31
Şekil 3.3.3.3. Sigara dumanı uygulanması ile gelişimi engellenmiş (deney grubu) ve sigara dumanı uygulanmamış (kontrol grubu) salatalık fidelerinden elde edilen ham kök eksüdatında, marul hipokotili büyüme testi ile ölçülen gibberellin aktiviteleri.....	32

1. GİRİŞ

Çağımızda, özellikle artan insan nüfusu, plansız kentleşme, hızlı endüstrileşme ve gittikçe genişleyen trafik ağının bir neticesi olarak, çevre kirliliği acilen çözüm bekleyen bir sorun halini almış bulunmaktadır.

Bir parçası olduğumuz doğal çevrenin hava, su, toprak gibi unsurlarının, toplumsal hayatın fiziksel, kimyasal ve biyolojik nitelikteki, yapay ortam faktörleri ile doğal dengesinin bozulacak düzeyde kirlenmesi, çevre kirliliği (pollüsyon) olarak nitelendirilmektedir. Kirleticiler (pollutant) 'ler, bir noktada lokalize olmayıp, atmosferdeki meteorolojik olayların mümkün kıldığı yüksek diffüzyon kapasitesiyle, kısa sürede geniş ekosistemleri etkileri altına alabilmektedirler. Bu nedenle, çevre kirliliği evrensel bir sorundur.

Çoğu zaman, farklı kaynaklardan direk atmosfere bırakılan primer kirleticilerden ziyade, bunların atmosferde geçirdikleri kimyasal tepkimelerden doğan sekonder kirleticiler daha toksik karakterlidirler. Örneğin kükürtdioksit (SO_2), önce atmosfer oksijeninin ve ultraviyole ışınlarının etkisiyle kükürttrioksit (SO_3) 'e dönüşerek, son aşamada atmosferdeki su buharıyla birleşip, asit yağmurları halinde yeryüzüne düşen H_2SO_4 'ü oluşturmaktadır.

Bitkiler üzerinde, yoğun etkilere sahip olan hava kirliliği, bu yönüyle pek çok çalışmaya konu olmuştur. Bitkiler, hayvanlardaki adaptasyon yeteneğini düzenleyen içsel homeostatik mekanizmaya sahip olmadığından, ortamsal değişikliklere daha hızlı ve gözle görülür biçimde cevap vermektedirler. Kirleticilerin bitkiye esas giriş yolları yaprak ve köklerdir. Kükürt-dioksit (SO_2), azot oksitleri (NO_x), karbon monoksit (CO), ozon (O_3) ve diğer fotokimyasal sis ürünleri, amonyak (NH_3), etilen, florürler (F^-), klor (Cl_2), hidrojen sülfür (H_2S), hidrojen klorür (HCl) ve egzoz gazı bileşenleri bitkiye yapraklar yoluyla girmektedir. Kökler vasıtasıyla, kirleticiler ancak suda çözünmüş olarak ve süspansiyonlar halinde, bitkiye girebilmektedirler. Bunların yanı sıra, hidrokarbonlar, zehirli aerosoller, sigara dumanı, volkanik ve radyoaktif artıklar önemli kirleticilerdir.

Çevre kirleticilerinin bitkiler üzerindeki etki derecesi, kirleticiler ve taşıyıcı ortam, konsantrasyon ve maruz bırakma süresi, bitkinin genetik yapısı ve ortamsal etkileşimleri gibi değişkenlere bağlıdır. Besin zincirinin merkezi halkasını

oluşturan ve aktif hareket edemeyen bu canlı grubunun, kirleticilere adaptasyon gösterme amacına yönelik davranışları, çevre kirleticilerinin bitkiler üzerindeki etkileri olarak tanımlanmaktadır.

Bitkiler üzerindeki olumsuz etkileri uzun zamandan beri bilinen SO_2 'in kaynağını fosil yakıtların yakılması oluşturmaktadır. SO_2 , düşük konsantrasyonlarda stomaların açılmasını, yüksek konsantrasyonlarda stomaların kapanmasını teşvik etmektedir. Ayrıca bu gazın yüksek konsantrasyonlarda net fotosentez oranını önemli ölçüde azalttığı açıklanmıştır (Lendzlan ve Unsworth, 1981).

SO_2 ve ozonlu heksen (ozonoidler), kuvvetli klorofil zehiridirler. Ozonlu heksen ile 4 saat muamele edilmiş bitkilerde % 4, 24 saat muamele edilmiş bitkilerde % 49 oranında klorofil miktarı azalmıştır (Todd ve Garber, 1958). SO_2 'e maruz kalmış bitkilerde, fide büyümesinin önemli ölçüde engellendiği, yaprakların klorozis ve nekrozise uğradığı (Godzik ve ark., 1985), kök büyümesinin gövde büyümesinden daha fazla etkilendiği (Jones ve Mansfield, 1982) rapor edilmiştir. Asit yağmurları (H_2SO_4), toprak ve suların pH 'sını düşürerek canlılar üzerinde olumsuz etkiler meydana getirmektedir. Bu tür yağmurların, bitkilerde büyümeyi engellediği ve stomaların kapanmasına yol açtığı da bilinmektedir (Neufeld ve ark., 1985).

Atmosferdeki yüksek sıcaklık veren yanmalar sonucu meydana gelen NO_2 'in yüksek konsantrasyonlarda toksik etki yaparak, yapraklarda nekrotik bölgelerin oluşumuna, defoliasyona (Naegele, 1974) ve klorozise (Heck, 1964) yol açtığı belirtilmiştir. SO_2 ile NO_2 arasında, zararlı etki oluşturma yönünden sinergistik bir etki bulunduğu bildirilmiştir (Godzik ve ark., 1985).

Nitrojen oksitler ve hidrokarbonların atmosferdeki fotokimyasal tepkimelerinden peroksiaçil nitratlar (PAN) ve ozon (O_3) gibi fotokimyasal sis ürünleri oluşmaktadır. İlk kez 1958 yılında bu sis içerisinde bitkilere esas etki eden unsurun ozon olduğu tespit edilmiştir (Naegele, 1974). Bu gazın, mezofil hücrelerinde özellikle palizat parankimasının ultrastrüktürüne olumsuz etkileri vardır (Thomson ve ark., 1965). Mekanizması aydınlatılamamış olmakla beraber ozonun, bitkilerde soğuğa ve kuraklığa dayanıklılığı etkilediği (Davison ve Bailey, 1982) ve soya fasulyesinde su stresine adaptasyonu azalttığı (Winner ve Atkinson, 1986) bildirilmiştir. Bu gaz ile muamele gören limon meyvelerinde,

muhtemelen klimakterik nitelikte olduğu düşünülen bir solunum artışı gözlenmiştir (Todd ve Garber, 1958).

Peroksiaçıl nitratların en tipik etkileri, mezofil tabakasının çökmesine ve yaprağın alt kısmının parlak bronz bir renk almasına yol açmalarıdır.

Bitkiler üzerindeki en önemli hasarları, farklı kirletici kaynaklardan atmosfere bırakılan dumanın bileşimindeki gazlar meydana getirmektedir. Motorlu taşıtlardan kaynaklanan egzoz gazının, bitkilerde klorozis, nekrozis ve protein parçalanmasına yol açtığı (Munzuroğlu ve Baltepe, 1994), büyümenin engellenmesine, stomaların kapanmasına, klorofil miktarının ve biyokütlesel verimin azalmasına, epidermis, mezofil ve iletim dokularının bütünlüğünün bozulmasına neden olduğu (Türkan, 1988) bildirilmiştir. Ağır metaller (Cu, Hg, Ni, Pb, Zn, vs.) 'in yüksek dozlarda stoma fonksiyonunda bozulmaya, fotosentezin depresyonuna, solunumda düzensizliklere ve büyümede azalmaya sebep olduğu gösterilmiştir (Larcher, 1980). Önemli bir fitohormon olan etilen gazının bitkilerde büyümeyi engellediği, yapraklarda klorozis ve nekroze neden olduğu bilinmektedir (Beevers, 1976). Etilen hem serbest, hem de bağlı ABA miktarında artışa yol açmaktadır (Hananya ve ark., 1976).

Kirleticilerin, primer etkilerinin bitki büyüme regülatörleri üzerinde meydana geldiği ve bu faktörlerin özellikle bitki büyüme ve gelişmesi üzerindeki etkilerinin hormonlarla ilişkili olduğu düşünülmektedir. Örneğin, sülfür (SO_2) 'in deney tüpünde indolasetik asit (IAA) 'in oksidasyonunu arttırdığı gösterilmiştir (Yang ve Saleh, 1973).

Halka açık kapalı atmosferlerde, sigara dumanı önemli bir kirlilik faktörüdür. Sigara dumanı çapları 0.1-1 nm arasında değişen sıvı-katı partiküllerden ve gazlardan oluşan toksik bir aerosoldür. Tütünün bileşimiyle, yanma (prolisis) sonucu oluşan sigara dumanının bileşimi oldukça farklıdır. Yanma olayının ardından, yaklaşık 4000 çeşit kimyasal madde oluşmaktadır.

Yapılan analizler sonunda, tütün dumanında bulunan toksik ve kanserojen maddelerin aşağıdaki yapıtaşlarını içerdiği bildirilmektedir (Munzuroğlu, Yayınlanmamış);

Amonyak ve uçucu aminler; amonyak, etilamin, metilamin, dimetilamin, pridin, prolidin, trimetilamin, hidrazin,...

Uçucu aldehit ve ketonlar; asetaldehit, aseton, akroleyn, formaldehit, furfural, karotenaldehit,...

Diğer uçucu bileşikler; benzen, ürethan, vinil klorit, karbon monoksit, azot oksitleri, hidrosiyamik asit,...

Çok çekirdekli aromatik bileşikler; fluoren, fluoranthen, karbakzol, kronen, prilen, antrasen, antantren, benzo (b) fluoren, metilfluoranten,...

Alkoller; butanol - 1, butanol - 2, metanol, etanol, propanol - 1,...

Fenolik bileşikler ve kinonlar; katekol, guakol, fenol, etil fenol, 1 - naftol, 2 - naftol, 4 - vinil alkol, 4 - vinil guakol,...

Karboksilik asitler; asetik asit, benzoik asit, formik asit, laktik asit, süksinik asit, propiyonik asit, n - bütirik asit,...

Laktonlar; kumarin, 8- bütirik lakton,...

Aromatik aminler; anilin, toluidin, 2, 3 ve 4 etilalinin, 1 ve 2 naftilaminler...

Pridin ve prolidinler; pridin, 3-vinil pridin, n-nitrosamin, 3-metilpridin, 2-metilprazin,...

İz elementler; alüminyum, antimoan, arsenik, bizmut, kadmiyum, kobalt, bakır, kurşun, magnezyum, mangan, nikel, potasyum, selenyum, sodyum, çinko,...

Katran ve nikotin.

Kısaca özetlediğimiz bu yapıtaşlarının çoğunluğu, farklı kaynaklardan atmosfere bırakılan kirlilik unsurlarıyla aynı kimyasal karakterde olup, sekonder tepkimelerle toksik yetenek kazanmaktadırlar (Heseltine ve ark., 1988).

Sigara dumanından nikotin, nem ve karbon monoksit çıktıktan sonra, geri kalan maddelerin tümü, dumanın katran fazı olarak tanımlanmaktadır. Katran fazında, çeşitli aromatik nitrozaminler, aromatik aminler, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, hidrosiyamik asit, furfural akrolein, nitrik oksit, azotdioksit ve fenolik bileşikler yer almaktadır. Küçük molekülü ve lipofilik bir madde olan nikotin, cilt ve mukozalardan kolaylıkla absorbe edilebilmektedir.

Köpekler üzerinde yapılan çalışmalarda, hayvanın gözüne veya diline damlatılan 1-2 damla nikotinin öldürücü olduğu gözlenmiştir .

Tütün dumanının, akciğer kanseri oluşturmak açısından hava kirliliğinden daha etkili olduğu ve bu etkinin dumanın içerdiği katranla orantılı olduğu, hayvanlar üzerindeki deneylerle ortaya konmuştur. Fare ve tavşanların derilerine sigara dumanı uygulanması ile epitel tümörlerin ortaya çıktığı belirtilmiştir. Aktif veya pasif içicilikle alınan tütün dumanında bulunan CO, akciğerlerde hemoglobine bağlanma yönünden, oksijenle rekabet ederek,

karboksihemoglobin (HbCO₂) halinde, dokulara taşınmaktadır. Ayrıca sigara dumanı lökositlerin fazla miktarda proteolitik enzimler salgılamasına yol açarak, akciğer dokusunun elastikiyetini ortadan kaldırmaktadır.

Bu kirlilik faktörünün bitkiler üzerindeki etkilerinin araştırılması, çok eski tarihlere dayanmaktadır. Ancak bu konudaki bilimsel yayınlar oldukça sınırlıdır. Çünkü sigara dumanı genel olarak atmosferik bir kirletici faktör değildir, dolayısıyla dış ortamdaki bitkiler üzerinde olumsuz bir etkisi söz konusu olamaz. Ancak son yıllarda pasif içiciliğin organizmalar üzerindeki etkisi ayrıntılı olarak ortaya koyulduktan sonra, özellikle kapalı mekanlardaki tüm organizmalarda olduğu gibi, bitkilerde de bu kirletici faktöre karşı davranışlar merak konusu olmaya başlamıştır. Sigara dumanının, genç fidelerde anormal gelişmelere yol açtığı bilinmektedir (Stiles, 1950). Soğan fidelerinin kök uçlarında, sigara dumanının mitotik anormallikler meydana getirdiği, hücre duvarının şekillenmesini engellediği bildirilmiştir (Bhalla ve ark., 1976). Sigara dumanı katranı, bitkide kök hücrelerinde mikronukleuslar ve kromozom köprüleri oluşturarak, bölünme düzensizliklerine neden olmaktadır (Yakar-Olgun, 1959). Özörgücü ve arkadaşları (1986), kolşisin ve sigara dumanı uygulanmış genç *Vicia faba* ve *Pisum sativum* köklerinde, boy kısalmasına karşı, enine bir artış tespit etmişlerdir. Ayrıca kök hücrelerinde, DNA miktarının arttığını ve sitoplazma vizkositesinin azaldığını saptamışlardır. Bu çalışmada, hücre bölünmesini inhibisyona uğratan kolşisin ile kanserojenik etkenliğe sahip sigara dumanının benzer özellikteki farklılıklara yol açması oldukça ilginçtir.

Tohum çimlenmesinden başlayarak, büyüme ve gelişmenin daha sonraki evrelerinde sigara dumanının etkileri araştırılmış, bu faktörün tohum çimlenmesini ve ondan sonraki morfogenetik gelişmeyi önemli ölçüde geciktirdiği tespit edilmiştir. Sigara dumanının bitkideki etkisini, ilk kez endogen hormon seviyesinde ele alan bu fizyolojik çalışmada, sigara dumanı uygulanması ile çimlenmeleri engellenmiş tohumlarda bazı hormonların düzeyinde önemli bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir. Sonuç olarak, stres faktörü ortamdaki kaldırıldıktan sonra, tohumların çimlenme aktivitelerinin normale döndüğü ve dokuların içsel hormonlara karşı tekrar duyarlılık kazandığı rapor edilmiştir (Munzuroğlu, Yayınlanmamış).

Şimdiye kadar genel kapsamda ele aldığımız atmosferik kirleticiler ve sigara dumanı, canlılarda strese yol açan faktörler kategorisine girmektedirler.

Biyolojik açıdan, dilimize "zorlama" olarak çevrilebilen stres terimi ilk kez Levitt (1972) tarafından, "çevre şartlarının optimum dışındaki değişimleri ile bitkinin büyüme ve gelişmesinin ters yönde zorlanmasıdır " şeklinde tanımlanmıştır. Strese sokulmuş bitkilerde, bitki büyüme maddelerinin düzeyi ve karşılıklı etkileşimleri, bugün henüz tamamiyle aydınlatılamamıştır. Ancak bu etkileşimlerin stres fizyolojisinin temelini teşkil ettiği, diğer bir deyimle stresin sebep veya sonucu olduğu düşünülmektedir.

Strese sokulmuş bitkilerde büyümenin geciktiği, hızlı yaşlanma görüldüğü, köke oranla daha az ve küçük sürgün meydana geldiği, bitki bünyesinde ve bazı metabolik olaylarda çok sayıda değişikliklerin olduğu bildirilmiştir (Vaadia ve ark., 1961). Bir çok araştırmacı tarafından, farklı stres faktörleri için doğrulanmış olan bu sonuçlar, stres fizyolojisinde genel bir haberci molekül bulunduğu görüşünü desteklemektedir.

Su stresine maruz kalmış tütün bitkilerinde, stres başlangıcından 30 dakika gibi kısa bir zaman sonunda sitokinin aktivitesinin yarı yarıya azaldığı açıklanmıştır (Itai ve Vaadia, 1971).

Tuz stresine maruz kalan bitkilerde büyüme hızı ve verimi azalmaktadır. Tuz iyonları, osmotik strese yol açmaları yanında, yüksek konsantrasyonlarda uygulanırsa, tohum çimlenmesi esnasında embriyo üzerinde spesifik olarak toksik etki yaratmaktadırlar. NaCl 'ün, mitoz bölünmeyi engellemek suretiyle, bitkide genetik bozukluklara yol açtığı belirtilmiştir (Nieman, 1965). Benzer etkiler sigara dumanı içinde gözlenmiştir (Özörgücü ve ark., 1986).

Kuraklık ve tuzluluğun yol açtığı osmotik streslerde bitkinin içsel sitokinin etkinliğinin stres yoğunluğu ile orantılı olarak azaldığı sonucuna varılmıştır. Ancak stres koşulları ortadan kalktığında sitokinin düzeyi tekrar normale ulaşmaktadır (Itai ve Ben - Zioni, 1976).

Tahıl bitkileri üzerinde yapılan araştırmalar, köklere uygulanan çok küçük bir osmotik basıncın (1bar) dahi belli metabolik olayları ve bitki büyümesini engellediğini göstermiştir. Dolayısıyla, bu sonuçlar köklerin su teminindeki veya su seviyesindeki ciddi bir azalmayla ilgili değildir (Meyer ve Gingrich, 1964).

RNA sentezini desteklemek suretiyle, protein metabolizmasını etkileyen kinetin (Osborne, 1962) muamelesi ile hızlı yaşlanma (Mothes, 1964), solunum ve amilolitik aktivitedeki değişimlerin (Itai ve Ben-Zioni, 1973) normale dönüştürülebildiği rapor edilmiştir.

Bitki köklerinin su stresine tepkileri ile ABA arasındaki ilişkiler açık değildir. Bununla birlikte su potansiyelindeki bir azalma, osmotik su potansiyelindeki değişim ister su azlığından (Loveys ve Kriedemann, 1973), isterse tuzluluk gibi osmotik ajanlardan kaynaklansın, bitkideki içsel ABA düzeyinde gözle görülür bir artışa yol açmıştır.

Mizrahi ve arkadaşları (1971), tütün bitkisine, bir gün süre ile nem ve tuz uygulaması sonunda, ABA seviyesindeki yükselmeye paralel olarak terlemede bir azalma olduğunu rapor etmişlerdir. Osmotik strese uğramış bitkilerde sentezlenen ABA su kaybedilmesini engelleyici bir mekanizma olarak stomaların kapanmasına yol açmaktadır (Loveys ve Kriedemann, 1973).

Soğuğa maruz kalmış bitkilerde, ABA'nın stoma hareketlerini regüle ettiği ve su açığının kökün hidrolitik iletkenliğindeki bir azalmadan kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür (Smit-Spinks ve ark., 1984).

Optimumun dışındaki sıcaklık uygulamalarıyla strese sokulmuş bitkilerde yaş ağırlıkta azalma meydana geldiği (Itai ve ark., 1973), bunun kuru madde miktarındaki artış veya su içeriğindeki azalıştan kaynaklanmış olabileceği ileri sürülmüştür (Smit - Spinks ve ark., 1984).

ABA 'in osmotik stres koşullarında köklerde birikerek suyun girişine karşı, kökün direncini azalttığı (Walton ve ark., 1976), kök hücrelerinde protoplastın yoğunluğunu arttırdığı, su hareketlerini etkileme mekanizmasının temelinde iyon hareketleri üzerindeki etkilerinin yattığı (Cram ve Pitman, 1972) ileri sürülmüştür. Strese karşı adaptasyon gösterilmesinde, fonksiyonel bir öneme sahip olan ABA 'in, iyon alınımlarını engellediği bildirilmiştir (Shaner ve ark., 1975). Ancak bu hormonun, alınan iyonların kökte taşınımını engellediği (Cram ve Pitman, 1972), ya da hızlandırdığı (Karmoker ve Van Steueninck, 1978) şeklinde, çelişkili sonuçlar mevcuttur. Örneğin, optimumun üstündeki sıcaklığa maruz kalmış bitki köklerinde, Cl^- iyonlarının alınımları hızla azalmış, akış hızı ise artmıştır. Bunun hormonal dengedeki değişimin sebep veya sonucu olan zar bütünlüğündeki bozulmadan kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür (Itai ve ark., 1973).

Pamuk fidelerinde, donma öncesinde dışardan verilen ABA, 4°C 'de 5 gün süreyle hasarlanmayı önleyebilmiştir (Rikin, ve ark., 1979). Dışardan benziladenin (BA) uygulanan turp fidelerinde, dona karşı direncin arttığı ve bunun büyüme

inhibitörleri ile toleransı artırıcı maddelerin, artan hareketliliğinden kaynaklanabileceği bildirilmiştir (Hale ve Orcutt, 1987).

Strese maruz kalmış bitkilerde, plastid oluşumunda ve klorofil, karotenoid sentezinde görülen azalmanın ABA birikiminden (Duysen ve Freeman, 1976) ya da sitokinin seviyesindeki azalmadan (Itai ve ark., 1973) kaynaklandığı ileri sürülmüştür.

Bütün bu sonuçlar, genelde stres olgusunun bitkideki hormonal denge ile çok yakından ilişkili olduğunu ve stres durumunda ABA 'ın bir karşı koyma mekanizmasının temelini oluşturduğunu, bu nedenle sentezinin arttığını ortaya koymuştur. Buna mukabil, bitkide sitokinin düzeyi stresin beliriminden itibaren, hemen hemen tüm stres türlerinde önemli ölçüde azalmaktadır.

Bilindiği gibi bitkilerde, bilhassa ilkbaharda gövdenin herhangi bir yerinin kesilmesi ile açılan yaradan, bileşik kaplar kanununa aykırı şekilde sıvı sızması, eksüdasyon (yaşarma) olarak tanımlanmaktadır. Ksilemdeki suyun üst kısımlara taşınmasında transpirasyon akımına ek olarak, kök basıncı da belli bir rol oynamaktadır. Kökler vasıtasıyla aktif bir şekilde, suda çözünmüş olarak alınan tuz iyonları, metabolik enerjinin yetersizliği sebebiyle Kaspari şeridini geçemeyerek, ksilem elemanlarında birikmektedir. Köklerle alınan su ve suda çözünmüş maddeleri yukarıya doğru pompalayan, ksilemdeki bu tuz yoğunluğuna kök ya da eksüdasyon basıncı adı verilir. Transpirasyon akımının ortadan kalktığı dekapite edilmiş bitkilerde, kök basıncına bağlı olarak ksilemde yükselen ve kesik yüzeyden dışarıya akan sıvıya kök yaşarma sıvısı veya eksüdasyon sıvısı denir. Kök basıncı, kloroform gibi anestezik ve siyanür gibi toksik maddelerden etkilenen ve oksijen artışına paralel olarak artan, aktif metabolik bir olaydır. Ayrıca, bu olayın kök civarına uygulanan çeşitli stres faktörlerinden (su, tuz, sıcaklık, v.s.) de etkilendiği bilinmektedir.

Bütün bunların yanısıra, fizyolojide bitki kök hücrelerinden diffüzyonla rizosfere sıvı salgılanması da, eksüdasyon olarak tanımlanmaktadır. Örneğin, bu tip bir çalışmada yer fıstığının tohum ve kök eksüdatlarında, oksin, sitokin ve gibberellin benzeri büyütücü faktörlerin köklerden rizosfere difüzyonla salgılandığı ve bunların kökteki diğer bileşenlerle kombinasyonlar halinde bulunabildiği bildirilmiştir (Reddy ve ark., 1989; Goğala, 1989). Ayrıca bu büyütücü faktörlerin filizlenen tohumlara ve köklere yakın bölgelerde (rizosfer) bitki patojenlerinin aktivitelerini etkilediği açıklanmıştır (Reddy ve ark., 1988).

Ancak, bizim çalışmamızın konusunu, ilk tanımdaki eksüdasyon sıvısı oluşturmaktadır. Kanımızca literatürde bu konuda yanlış anlamalara mani olmak için, ksilem sıvısına kök eksüdatı, kökten rizosfere verilen sıvıya ise kök diffüze denilmesi daha uygun olacaktır. Bitki büyüme maddelerinin yanında, kök basınç sıvısında nitrat, aminoasitler, amidler ve üreid türünden bileşiklerin mevcut olduğu bilinmektedir (Winkler ve ark., 1988; Pate, 1989).

Bitkilerde, kök eksüdatında endogen hormon seviyesinde yapılan çalışmalar oldukça fazladır. Bu çalışmaların büyük çoğunluğu, ABA ve sitokinler üzerinedir. Koparılmış yapraklarda yaşlanma, yaprak sapında yeni köklerin şekillenmesi ile önlenmektedir (Osborne ve McCalla, 1961). Bu durum köklerden kaynaklanan belli faktörlerin yapraktaki protein parçalanmasını regüle ettiğini açıkça göstermektedir. İşte bu gözlemlere dayanılarak yapılan çalışmalar sonucunda sitokinlerin, kökte bulundukları ve orada sentezlenip ksilem sıvısı ile sürgünlere taşındıkları anlaşılmıştır. Bunu doğrulayan çok sayıda literatür mevcuttur (Wareing ve ark., 1977; Feldman, 1979; Wagner ve Beck, 1993).

Eksüdasyon sıvısında IAA bulunduğunu belirten bir rapora literatürde rastlanmamıştır. Şekerler, iyonlar ve diğer bazı çözünenlerin aksine, IAA genellikle floem kalburlu boruları veya ksilem içinde taşınmayıp, vaskular dokularla temas halindeki parankima hücreleri aracılığı ile taşınmaktadır (Jacobs, 1979; Aloni, 1987 a,b).

1950 'li yıllarda, çeşitli bitkisel ekstraktların kromatogramlarında büyümeyi engelleyici bir bölge gözlenmiştir. Başta ABA olmak üzere çeşitli engelleyicilerin bulunduğu bu bölgeye, β - inhibitör adı verilmiştir. Biran ve Halevy (1973), *Dahlia* çeliklerinin köklenmesinde büyüme regülatörlerinin etkisini incelerken, kök eksüdatında köklerden kaynaklanan ve sürgüne doğru taşınan β - inhibitörlerinin varlığını, ortaya koymuşlardır.

Gibberellinlerin kökte sentezlenip sürgünlere taşındığı bilinmektedir (Salisbury ve Ross, 1985; Scott, 1972). Uzun süre düşük sıcaklığa maruz bırakılan mısır köklerinde, gibberellin (GA_x) üretim ve taşınımının önemli ölçüde azaldığı gözlenmiştir (Atkın ve arkd., 1973).

Itai ve Ben - Zioni (1976), kuraklık stresine bağlı olarak fasulye bitkilerinin kök eksüdatlarında, ABA düzeyinin arttığını ve bunun sitokinin etkenliğini engellediğini belirtmişlerdir.

Su stresine maruz bırakılmış *Helianthus annuus* bitkilerinin kök eksüdatlarının kromatografik saflaştırılmasıyla kinetin benzeri aktivite araştırılarak sitokininlerin kök faktörleri olduğu, strese bağlı olarak aktivitelerinin azaldığı ve sulamadan belli bir süre (48 saat) sonra, normale döndüğü rapor edilmiştir (Itai ve Vaadia, 1965).

Itai (1967) tuz stresinin, fasulye ve ayçiçeği bitkilerinin kök eksüdatlarında sitokinin etkinliğini azalttığını ve stresin kalkmasıyla bu etkinliğin yeniden arttığını açıklamışlardır. Yine iki gün süreyle tuz stresine maruz bırakılan *Zea mays* bitkilerinde, ksilem eksüdatında sitokinin seviyesinin azaldığı ve bu azalmanın moleküler seviyedeki sitokinin sentezi ile ilgili olabileceği rapor edilmiştir (Çetingül ve Baltepe, 1982). Kök sistemine 2 dakika süreyle 47 °C sıcaklık uygulanan fasulye ve tütün bitkilerinden alınan ksilem eksüdatlarında, sitokinin aktivitesinin azaldığı ve ABA seviyesinin arttığı, hormon seviyelerindeki değişimlerin optimumun üzerindeki sıcaklık artışına paralel olduğu belirtilmiştir (Itai ve ark., 1973).

Düşük sıcaklığa tolerans kazandırmak amacıyla yapılan çalışmalarda soğuğa alıştırılmamış olan bitkilerin kök eksüdatlarındaki ABA seviyesi alıştırılmış olanlara kıyasla önemli ölçüde yüksek bulunmuştur (Smit - Spinks, ve ark., 1984).

Dekapite edilmiş bitkilerde ve kesilmiş köklerde ABA 'in ksilemdeki akışı arttırarak eksüdasyonu hızlandırdığı ileri sürülmüştür (Collins ve Kerrigan, 1974).

Kısa gün şartlarına maruz kalmış *Xanthium strumarium* 'dan alınan ksilem eksüdatında sitokinin aktivitesinin azaldığı ve bunun yapraklarda azalan klorofil içeriği ile ilgili olduğu bildirilmiştir (Van Staden ve Wareing, 1972).

Sitokininler, köklerde sentezlenerek gövdeye taşındığından, bunların ksilem sıvısındaki yoğunluğu, hem protein sentezini, hem de gövde büyümesini düzenleyici bir faktör olarak düşünülmektedir (Kende, 1964)

Kulaeva (1962) tarafından, tütün yaprak diskleri üzerine ham kök eksüdatı uygulanarak, eksüdatın klorofil azalmasını geciktirme kapasitesi test edilmiş ve gecikmenin olduğu bildirilmiştir.

Ayrıca 8 haftalık *Helianthus annuus* bitkilerinden toplanan ksilem eksüdatlarında kromatografik saflaştırmayla yapılan bir çalışmada, arpa yaprak disklerinde klorofil parçalanmasının büyük ölçüde geciktiği ve çeşitli besleyici

faktörler (şekerler, inorganik azot bileşikleri; amonyum nitrat, potasyum nitrat, amonyum sülfat ve organik azot bileşikleri; amino asit, kazein hidrolaz) ile tekrarlanan çalışmalarda bu tip bir etkinin gözlenmediği açıklanmıştır (Kende, 1964). Bu sonuçlar, kökten sürgüne taşınan, yaprakların metabolizmasını ayarlayıcı rol oynayan, bugün klorofil parçalanmasını yavaşlattığı ve sentezini arttırdığı bilinen (Baltepe, 1986) sitokininlerin kök eksüdatında mevcut olduğunu desteklemektedir. Kök eksüdatıyla soya fasulyesi kallusunun doku kültüründe yapılan benzer çalışmalar hücre bölünmesinin arttığını göstermiş ve bu testin kinetin benzeri maddelerin tespiti için spesifik bir biyotest olabileceğini ortaya koymuştur (Kende, 1964).

Fizyolojik kuraklığa maruz kalmış domates bitkilerinin ksilem öz suyunda ve sürgünlerinde gibberellin seviyesi azalmıştır (Reid ve Crozier, 1971). Yine aynı stres faktörüne maruz kalmış domates bitkilerinin kök uçlarında sentezlenen gibberellin etkinliğinin, kök eksüdatında normalden düşük olduğu bildirilmiştir (Hale ve Orcutt, 1987).

Özetlersek, stres olgusu hangi faktörden kaynaklanırsa kaynaklansın, genelde kök eksüdatında ABA düzeyinde bir artış ve sitokinin düzeyinde ise belirgin bir azalışa yol açmaktadır. ABA düzeyindeki artış, bitkinin stres faktörüne karşı koyma mekanizması olarak da kabul edilmektedir. Yapılan çalışmalar, bu sınıfta IAA bulunmadığını ortaya koyduğu için, stres durumunda bu hormonun eksüdatta değişimini incelemek mümkün olamamıştır. Kök ucundan eksüdasyon sıvısı ile üst kısımlara taşındığı bilinen gibberellinler konusu ise açıklığa kavuşturulmuş değildir. İşte yaptığımız bu çalışmada, çok değişik faktörlerin bir bileşkesi olan sigara dumanının, toprak üstü kısımlarda meydana getirdiği büyüme inhibisyonuna paralel olarak, bitkide endogen hormon düzeyinde yarattığı değişikliklerin çeşitli spesifik biyotestler yardımıyla kök eksüdatında test edilmesi amaçlanmıştır. Literatür taramalarımız esnasında sigara dumanının yol açtığı strese bağlı olarak, bu tip bir çalışmaya rastlamadığımızdan, bu çalışmanın ilk defa tarafımızdan yapıldığını söyleyebiliriz. Ancak bu konuda yapılacak değişik çalışmalar konunun iyice aydınlatılması bakımından faydalı olacaktır. Bu ve buna benzer çalışmaların, biyosferdeki canlılığın temelini teşkil eden bitkilerin, kirleticilere karşı davranış mekanizmalarının aydınlatılmasına ışık tutacağına inanmaktayız.

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Materyalin Temini

Araştırmalarımızda bitkisel materyal olarak, dikotil bir bitki olan salatalık (*Cucumis sativus* cv. Beit alpha) tohumları ve biyolojik testler için marul (*Lactuca sativa* cv. Yedikule) tohumları, turp (*Raphanus sativus* L.) tohumları ile buğday (*Triticum aestivum* cv. Cumhuriyet) tohumları kullanılmıştır. Salatalık ve marul tohumları Bahçe Tohumları Anonim Şirketi (İstanbul) 'nden, turp tohumları İstanbul Tohum mağazasından, buğday tohumları Tarım ve Orman Bakanlığı Güneydoğu Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü (Diyarbakır) 'nden temin edilmiştir.

Deneylerde kullanılan indol - 3 - asetik asit (IAA) Merck, gibberellik asit (GA₃) Cambrian Chemicals, absisik asit (ABA) Fluka AG ve kinetin SIGMA firmalarından temin edilmiştir.

Bütün deneylerde, doz olarak bir adedinin bütün ağırlığı 0.9 gram olarak belirlenen, filtresiz bitlis sigaraları kullanılmıştır. Deney materyali olan salatalık bitkileri 20 şer litrelik şeffaf pet bidonların oluşturduğu kapalı sistemlere alınmış ve Şekil 2.2.1.1 'deki vakum pompası kullanılarak sigara dumanı verilmiştir.

2.2. Metod

2.2.1. Fidelerin yetiştirilmesi ve eksüdatın toplanması

Deney materyali olan hepsi sağlıklı ve eş büyüklükteki salatalık tohumlarından 16-17 gram 250 ml. 'lik bir behere konularak, üzerine 100 ml musluk suyu ilave edilmiştir. Daha sonra, beher 23-24 °C 'lik karanlık ortama kaldırılarak 5 saat bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda şişme ortamından çıkarılan tohumlar 11cm.'lik petrilere bulunan ve 10 'ar ml musluk suyu ile ıslatılmış olan çift katlı filtre kağıtlarının üzerine, her petriye 50 'şer adet tohum gelecek şekilde ekim yapılmış (Şekil 2.2.1.2) ve petrilere 23-24 °C 'lik etüve kaldırılmıştır. Etüve

kaldırıldıktan yaklaşık 19 saat sonra, karanlıkta çimlenmiş tohumlardan radikula uzunluğu 2-2.5 mm civarına gelenler seçilerek alınmış ve 250 ml. 'lik beherlerde bulunan her biri 100 ml toprak çözeltisiyle ıslatılmış filtre kağıtlarının kıvrımları

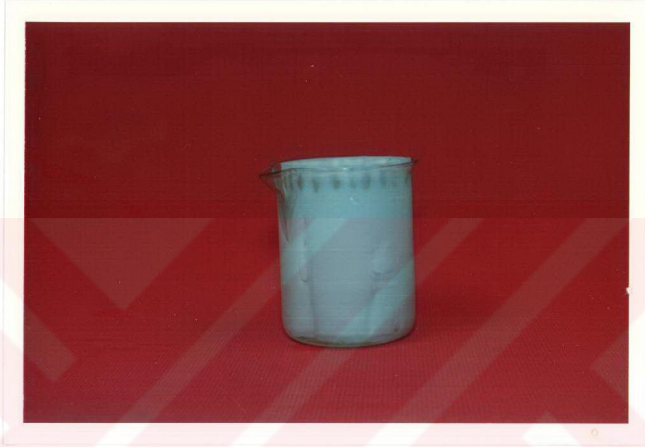


Şekil 2.2.1.1 : Bitkilerin yerleştirildikleri kapalı sistem (PET bidon) ve bu kapalı sisteme sigara dumanı vermek için kullanılan vakum pompası.



Şekil 2.2.1.2 : Islatma periyodunu tamamlamış salatalık tohumlarının petrilere aktarıldıktan sonraki görünüşleri.

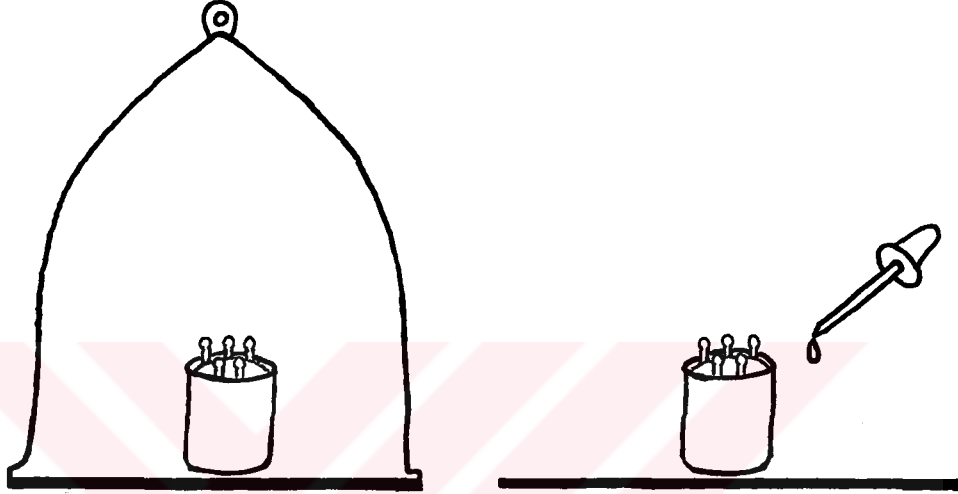
arasına vertikal biçimde (Şekil 2.2.1.3), transplante edilmişlerdir. Toprak çözeltisini elde etmek için 100 gr toprak 400 ml musluk suyu ile iyice karıştırıldıktan sonra çökmesi beklenmiş ve üstte kalan süspansiyon kullanılmıştır. Musluk suyu yerine bu süspansiyonun kullanılmasının sebebi, kök basıncının dolayısıyla eksüdatın oluşması için ortamda mineral maddelerin bulunmasının gerekli oluşudur. Beherler 23-24 °C 'lik karanlık etüve kaldırılarak, 2 gün süreyle bekletilmişlerdir. Daha sonra, 23-25 °C 'deki laboratuvar şartlarında, normal fotoperiyot altında 72 saat gelişmeye bırakılmışlardır. Böylece 6 günlük olan salatalık bitkileri homojenliklerine göre, her beherde 30 'ar bitki kalacak şekilde seyreltilmiş ve 210 'ar bitki içeren iki gruba ayrılmıştır.



Şekil 2.2.1.3 : Salatalık tohumlarının beherlerdeki ıslak filtre kağıtlarının arasına vertikal olarak transplante edilişi.

Bundan sonra, gruplar 20 'şer lt hacmindeki iki farklı pet bidona alınarak, bir gruba vakum pompasıyla emilmek suretiyle 1 sigara dumanı verilmiş ve her iki bidonun kapakları kapatılarak, tekrar yukarıda belirtilen laboratuvar şartlarına alınmıştır. Yaklaşık 24 saat sonra pet bidonlardan çıkarılan bitkiler, kök boğazının 2 cm yukarisından kesilmişlerdir. Kök ve hipokotil boyu ölçümleri için ayrılan 10 'ar adet deney ve kontrol bitkisinde, 24 saatlik uygulamadan sonra ölçümler yapılarak sigara dumanının inhibitif etkisi belirlenmiştir. Dekapite edilmiş, sigara dumanı uygulanmış ve uygulanmamış bitkiler, eksüdat toplamak amacı ile tekrar pet bidonlara yerleştirilmiş ve 30-45 dakika sonra, eksüdat vermeye başlamışlardır. Bitkilerden 3 gün süreyle ve her iki grup içinde belli aralıklarla toplanan (Şekil 2.2.1.4) kök eksüdasyon sıvısında, stres faktörünün toprak üstü kısımlarda meydana getirdiği büyüme inhibisyonuna paralel olarak

sitokinin, absisik asit (ABA), indolasetik asit (IAA) ve gibberellin (GA_x) içerikleri spesifik biyotestlerle belirlenmiştir.



Şekil 2.2.1.4 : Dekapite edilmiş, sigara dumanı uygulanmış (deney) ve uygulanmamış (kontrol) salatalık fidelerinden eksüdasyon sıvısının toplanmasında kullanılan yöntem.

Ayrıca sigara dumanı uygulanmış ve uygulanmamış salatalık bitkilerinin 3'er adedinin kotiledon yapraklarında, toplam klorofil miktarı hesaplanmıştır. Bu amaçla, her iki gruba ait koparılmış yapraklar, adsorbe olmuş suları filtre kağıdı ile alınarak, ayrı ayrı tartılmışlardır. Bu yapraklar 3'er ml % 80 'lik aseton ilavesinden sonra ezilerek, klorofil ekstraktları süzölmüştür. Klorofil ekstraktlarının hacimleri asetonla 7 'şer ml. 'ye tamamlanmış ve 2500 gravitede 3 dakika süreyle santrifüj edilerek, Coleman Junior II 6/20 marka spektrofotometre ile 652 nm 'de absorpsanları okunmuştur. Dokunun gramı başına miligram olarak klorofil miktarı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (Ross, 1974).

$$\text{Toplam klorofil (mg /gr)} = \frac{\text{Absorbans Değeri} \times \text{Çözeltinin hacmi (7 ml)}}{36 \times 1 \times \text{Kotiledonun Doku Ağırlığı (gr)}}$$

2.2.2. Kök eksüdatının etil asetat ile ayrıştırılması ve kromatografik yöntemle saflaştırılması

Deney ve kontrol grubundaki bitkilerden toplanan kök eksüdatlarının hacimleri ayrı ayrı saf suyla 20 ml. 'ye tamamlanmıştır. Daha sonra seyreltik HCl ile pH 'ı 2.5 'e ayarlanmıştır. Bundan sonra, su fazları 20 'şer ml etil asetat ile 4x1 defa çalkalanarak asidik ve nötr maddelerin etil asetat fazına geçmesi, sitokinin gibi bazik maddelerin su fazında kalması (Baltepe, 1974) sağlanmıştır. Ayırma işleminden sonra, su fazının pH 'ı seyreltik NaOH ile 7 'ye ayarlanmış ve 60°C 'de rotavapor (döner buharlaştırıcıda)'da düşük basınç altında 5 ml kalacak şekilde buharlaştırılmış ve saf suyla hacim 10 ml.'ye tamamlanmıştır. Yukardaki işlemlerden geçirilen su fazı, daha sonra Letham (1971) 'a göre, sitokinin biyotestine tabi tutulmuştur.

Asidik ve nötr maddeleri içeren etil asetat fazı ise, 35°C 'de rotavapor'da düşük basınç altında kuruluğa kadar uçurulmuştur. Daha sonra buharlaştırma balonu 2 ml metanol ile yıkanarak küçük bir cam şişeye alınmıştır. Bu 2 ml metanol çözeltisinin 1 ml. 'si, metanolde hazırlanan IAA ve ABA markerleriyle birlikte Whatman Nr 1 kromatografi kağıdına uygulanmıştır. Metanol çözeltisi çizgi halinde, markerler ise nokta şeklinde uygulanmış ve izopropanol : amonyak : saf su (120 : 15 : 15) (Nitsch ve Nitsch, 1955) karışımından oluşan solventte çıkıcı kromatografi ile ayrıştırılmıştır. Ayırıştırma işlemi çözgenin uygulama noktasından itibaren 17-18 cm yüksekliğe ulaşınca kadar sürdürülmüştür. Daha sonra markerlerin Rf 'leri $KMnO_4$ ile belirlenmiş ve uygulama noktası ile solventin yükselme sınırı arasındaki kısım 10 eşit parçaya bölünerek, deney ve kontrol kök eksüdatlarının Rf 'lerinin tekabül ettiği kromatogram parçaları küçük cam şişelere alınmış ve üzerlerine 5 'er ml saf su ilave edilerek +4°C' de karanlıkta 24 saat süreyle eluasyona bırakılmışlardır. Bu sürenin sonunda Nitsch ve Nitsch (1956) 'in koleoptil dik büyüme testinin tarafımızdan modifiye edilmiş şekliyle biyolojik teste tabi tutulmuşlardır.

Sigara dumanı uygulanmış ve uygulanmamış fidelerden toplanan kök eksüdatlarının asidik ve nötr fazını içeren 1 ml. 'lik metanol çözeltisi ise, 0,5 mm kalınlığında Hf_{254} silica-gel ile kaplı 20x20 boyutlarında cam plağa uygulanmıştır. Marker olarak metanolde hazırlanmış GA_3 uygulanmıştır. Metanol çözeltisinin ve markerin uygulanışı bir önceki deneyde olduğu gibi

yapılmıştır. Daha sonra cam plak izopropanol : amonyak : saf su (120 : 15 : 15) karışımını içeren ince tabaka tankına konulmuş ve uygulama noktasından 10 cm yüksekliğe ulaşıncaya kadar ayırıştırma işlemi sürdürülmüştür. Markerlerin Rf'leri, yine KMnO_4 ile belirlenmiştir. Kromatografi işlemi sonunda marker olarak GA_3 uygulanan plakta, uygulama noktası ile solventin yükselme sınırı arasındaki mesafe 10 eşit parçaya bölünerek, her Rf 'e tekabül eden silica-gel kısımları kazınmış ve deney tüplerine alınmışlardır. Her Rf 'e ait silica-gel kazıntısı 10 ml metanol ilave edilerek $+4^\circ\text{C}$ ve karanlıkta 6 saat süreyle eluasyona bırakılmışlardır. Bu süre sonunda her Rf 'e ait silica-gel kazıntılarının ekstraktları süzölmüştür. Deney tüplerindeki çökeltiler 2x5 'er ml metanol ile çalkalanarak, yeniden süzölmüş ve filtre kağıdı üzerinde kalan çökelti 1 ml metanol ile yıkanmıştır. Daha sonra her Rf 'e tekabül eden süzöntüler toplamı, içerisinde tek katlı filtre kağıdı bulunan 7 cm. 'lik petrilere dökülerek çeker ocakta kuruluğa kadar buharlaştırılmıştır. Bundan sonra, her petriye 3 'er ml saf su ilave edilmiş ve $+4^\circ\text{C}$ karanlık ortamda 24 saat süreyle eluasyona bırakılmışlardır. Bu sürenin sonunda, Frakland ve Wareing (1960) 'in modifiye edilmiş (Munzuroğlu, Yayınlanmamış) marul hipokotili büyüme biyotestine tabi tutulmuşlardır.

2.2.3. Biyolojik testler

2.2.3.1. Sitokininlerin biyolojik test ile belirlenmesi

Bitkilerden toplanan kök eksüdatı, etil asetat ayırıştırması ile asidik ve nötr maddelerden arındırılmış ve 5 ml 'ye yoğunlaştırılarak, hacmi saf suyla 10 ml 'ye tamamlanmıştır. Daha sonra bu fazın içinde bulunan sitokinin grubu maddelerin belirlenmesi için, Letham (1971) 'in modifiye edilmiş (Munzuroğlu, Yayınlanmamış) biyotesti, aşağıdaki şekliyle uygulanmıştır.

Turp (*Raphanus sativus* L.) tohumları 4 saat süreyle ıslatıldıktan sonra ıslak pamuk üzerine ekilmiş ve 24°C karanlıkta 92 saat çimlenmeye bırakılmışlardır. Bu süre sonunda gelişen fideler arasında homojenliklerine göre seleksiyon yapılmış ve 4-4,5 cm boyunda olanlar alınarak, küçük kotiledon

yaprakları kesilmiştir. 11 cm. 'lik petriler içine çift katlı ve eşit ağırlıkta filtre kağıtları yerleştirildikten sonra yoğulaştırılmış ve hacmi saf suyla 10 ml. 'ye tamamlanmış su fazları alınarak, bu petriler içine dökülmüşlerdir. Ayrıca, kalibrasyon için saf suda hazırlanmış değişik konsantrasyonlardaki kinetin çözeltileri yine aynı şekilde petriler içindeki filtre kağıtlarının üzerine dökülerek test sistemleri hazırlanmıştır. Bundan sonra her petriye teker teker tartılmak suretiyle 10 'ar kotiledon adaksial yüzeyleri filtre kağıdındaki çözelti ile temas edecek şekilde yerleştirilmişlerdir. Kotiledonlar belli bir plan dahilinde petrilere yerleştirilerek, hangi kotiledonun nereye konulduğu kolayca belirlenebilmiştir. Daha sonra petrilerin kapakları kapatılmış ve 23 - 24 °C 'lik ortamda 500 lux ışık şiddetinde devamlı floresans ışığı altında 60 saat süreyle bekletilmişlerdir. Bu sürenin sonunda kotiledonlar teker teker tartılarak her birindeki ağırlık artışı saptanmıştır.

Bu serideki deneyler 4 defa tekrarlanmış ve benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bir deneyin sonucu örnek olarak verilmiştir.

2.2.3.2. IAA ve ABA için buğday koleoptili dik büyüme testi

Buğday (*Triticum aestivum* cv. Cumhuriyet) tohumları 5 saat süreyle ıslatıldıktan sonra beherler içindeki ıslak filtre kağıtlarının kıvrımları arasına vertikal olarak ekilmişlerdir. Daha sonra bu beherler 24-25 °C karanlık ortama kaldırılarak 67 saat süreyle bekletilmişlerdir. Bu süre sonunda 3-3.5 cm boya erişen koleoptiller alınarak uçtan 3 mm. 'lik kısmın altında kalan 5 mm. 'lik kısımları yeşil ışık altında kesilmiş ve endogen hormonlarından arındırmak amacıyla saf suda 1/2 saat bekletilmişlerdir. Bundan sonra her Rf 'e tekabül eden kromatogram eluatlarının bulunduğu özel tüplere bu koleoptil parçacıklarından 8 'er adet bırakılmış ve 26 °C karanlık ortamda 20 saat süreyle bekletilmişlerdir. Bu süre sonunda koleoptil parçalarının boyları milimetrik cetvelle ölçülmüş ve bu şekilde her Rf 'in büyüme aktivitesi ayrı ayrı belirlenmiştir.

Kalibrasyonlar için şimdiye kadar bilinenlerden daha değişik olan ve ilk kez Munzuroğlu (Yayınlanmamış) tarafından kullanılan bir yöntem uygulanmıştır. IAA ve ABA 'den belli konsantrasyonlarda kalibrasyon çözeltisi hazırlamak

yerine, bir Rf 'in tekabül ettiği kromatogram parçası büyüklüğündeki kromatografi parçacıklarına değişik konsantrasyonlarda IAA ve ABA içeren metanol çözeltileri 1 'er ml olarak uygulanmıştır. Bu şekilde her parçacığa uygulanan hormon miktarı μ gr olarak kaydedilmiştir. Daha sonra bu kağıt parçacıkları Rf 'lere tekabül eden kromatogram parçalarıyla aynı eluasyon ve biyolojik test işlemine tabi tutulmuşlardır. Böylece kromatogram eluatları ile kalibrasyon çözeltilerindeki büyüme maddelerinin ortamda aynı oranlarda çözünmeleri sağlanmıştır.

2.2.3.3. Gibberellinler için marul hipokotili büyüme testi

Marul (*Lactuca sativa* cv. Yedikule) tohumları 3 saat süreyle ışık altında ıslatıldıktan sonra petrilerdeki çift katlı ıslak filtre kağıtları üzerine ekilmiş ve 23-24 °C karanlık ortama kaldırılmışlardır. Islatmanın başlangıcından toplam 36 saat sonra petriler alınarak homojen çimlenme yönünden seleksiyon yapılmış ve kök uzunlukları 3-4 mm arasında olanlar seçilerek ince tabaka eluatlarının bulunduğu petrilere 10 'ar adet gelecek şekilde, transplante edilmişlerdir. Daha sonra her Rf 'e tekabül eden petriler ve ayrıca kalibrasyon amacıyla hazırlanmış GA₃ konsantrasyonları eluatlarının bulunduğu petriler 23-24 °C 'de ve 4000 lux ışık şiddetinde devamlı floresans ışığı altında 60 saat süreyle bekletilmişlerdir. Bu süre sonunda bir milimetrik cetvel yardımıyla hipokotiller ölçülmüştür. Böylece her Rf 'e ve kalibrasyonlara tekabül eden biyolojik aktivite belirlenmiştir. Bir önceki deneyde olduğu gibi kalibrasyonlar hazırlanırken klasik yöntem kullanılmamıştır. Kalibrasyon amacıyla değişik konsantrasyonlarda GA₃ içeren metanol çözeltileri, içinde tek katlı filtre kağıdı bulunan 7cm. 'lik petrilerin her birine 10 'ar ml gelecek şekilde uygulanmış ve kurutulmuşlardır. Bu şekilde her petrideki filtre kağıdına uygulanan hormon miktarı μ gr olarak kaydedilmiştir. Daha sonra her petriye 3 'er ml saf su ilave edilmiş ve diğer Rf 'lerde olduğu gibi eluasyona bırakılmışlardır (Munzuroğlu, Yayınlanmamış).

İnce tabaka ve kağıt kromatogramlarının Rf 'lerinin biyolojik aktiviteleri saptandıktan sonra sonuçlar histogramlar halinde verilmiştir. Her histogram Tukey (1953) 'e göre istatistiki analize tabi tutulmuştur. Histogramlarda (.....) biçiminde gösterilen çizgilerin dışında kalan taranmış bölgeler %5

düzeyinde istatistiki bakımından önemli farklılıkları belirlemektedir. Ayrıca aktivite görülen bölgelerde ortalamanın standart hatası ($SE_{\bar{x}}$) 'den hesaplanmıştır. Kağıt ve ince tabaka kromatografileri 3 seri halinde yapılmıştır. Benzer sonuçlar gösteren bu serilerden birisi esas alınmıştır.

Kromatografi sonunda, ekstraktaki gibberellinlerin belli bir R_f zonunda toplanamaması sebebiyle bu biyotest, doğrudan doğruya ham eksüdatta tekrarlanmıştır. Sigara dumanı uygulanmış ve uygulanmamış bitkilerden toplanan eksüdatların hacimleri, her hangi bir çözügen ayrıştırması ve kromatografik ayrıştırma yapılmaksızın, rotavaporda 7.5 ml. 'ye kondanse edilmiştir. Daha sonra bunlar, içinde tek katlı filtre kağıdı bulunan 11 cm.'lik petrilere aktarılmıştır. Kalibrasyonlar bir önceki deneyde olduğu gibi hazırlanmıştır. 11 cm.'lik petrilere içindeki tek katlı filtre kağıtlarında kurutulan kalibrasyonlar 7.5 'ar ml saf suyla yukarıda anlatıldığı gibi eluasyona bırakılmışlardır. Yine yukarıda anlatıldığı şekilde yetiştirilen marul fidelerinden, her bir petriye 20 'şer adet gelecek şekilde transplante edilmişlerdir. Daha sonra yoğunlaştırılmış kök eksüdatlarının bulunduğu petrilere kalibrasyon amacıyla hazırlanmış GA_3 konsantrasyonları eluatlarının bulunduğu petrilere 23-24 °C 'de ve 4000 lux ışık şiddetinde devamlı floresans ışığı altında 70 saat süreyle bekletilmişlerdir. Bu süre sonunda bir milimetrik cetvel yardımıyla hipokotiller ölçülmüştür. Böylece ham eksüdatlara ve kalibrasyonlara tekabül eden biyolojik aktivite belirlenmiştir.

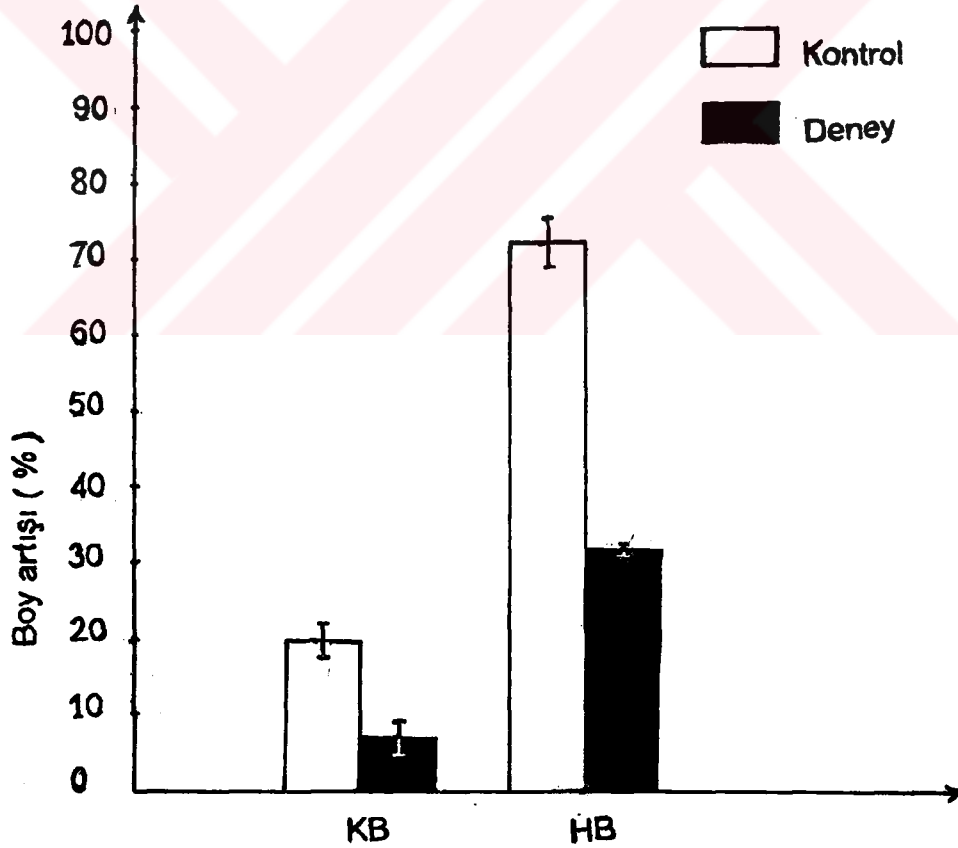
Kromatogramlarda histogramlar için uygulanan Tukey analizi dışında, diğer bütün parametrik veriler, ortalamanın standart hatası hesaplanarak istatistiki analize tabi tutulmuş ve bu değer grafiklerde dikey doğru parçaları şeklinde verilmiştir. Ortalamanın standart hatası ($SE_{\bar{x}}$), aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$SE_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n(n-1)}}$$

3. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

3.1. Sigara Dumanının Kök ve Hipokotil Büyümesi Üzerindeki Etkileri

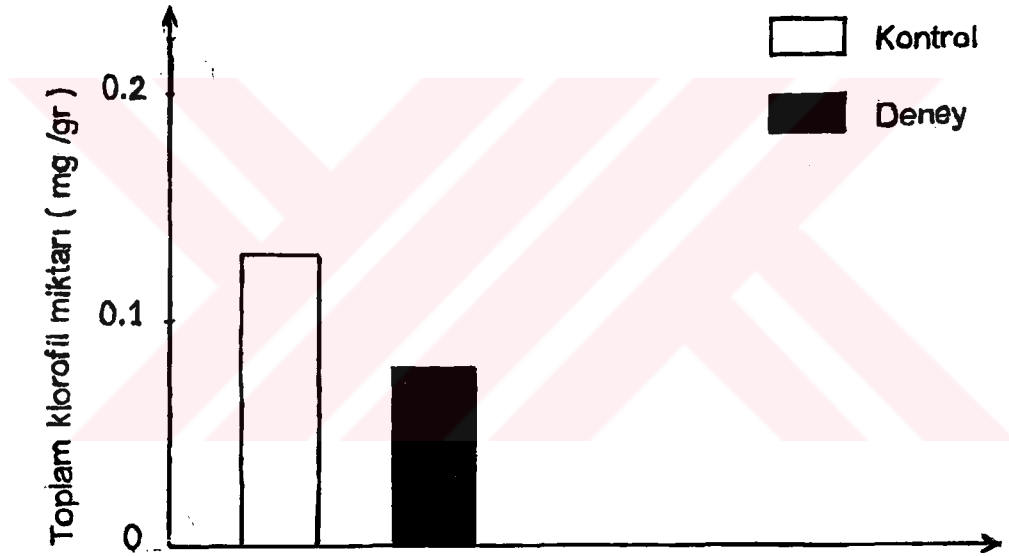
Fide gelişimini engelleyecek şekilde, sigara dumanı uygulanan ve uygulanmayan ortamlarda belirli bir süre gelişmeye bırakılan salatalık bitkilerinde, uygulama sonrası milimetrik olarak tespit edilen kök ve hipokotil uzama yüzdeleri Şekil 3.1.1 'de verilmiştir. Şekilde de görüleceği üzere sigara dumanı uygulanan bitkilerin kök ve hipokotil gelişimi inhibisyona uğramıştır.



Şekil 3.1.1 : Sigara dumanı uygulanan (deney) ve uygulanmayan (kontrol) ortamlarda belirli bir süre (24 saat) gelişmeye bırakılan 10 'ar salatalık bitkisinin, kök ve hipokotillerindeki uzama yüzdeleri (KB : kök boyu, HB : hipokotil boyu).

3.2. Sigara Dumanının Yapraklardaki Klorofil İçeriği Üzerindeki Etkileri

Fide gelişimini engelleyecek şekilde, sigara dumanı uygulanan ve uygulanmayan ortamlarda belirli bir süre gelişmeye bırakılan salatalık bitkilerinin yapraklarında, uygulama sonunda dokunun gramı başına mg olarak hesaplanan klorofil miktarları Şekil 3.2.1 'de verilmiştir. Şekilde de görüleceği üzere, sigara dumanı uygulanan bitki yapraklarında klorofil içeriği azalmıştır.



Şekil 3.2.1 : Sigara dumanı uygulanan (deney) ve uygulanmayan (kontrol) ortamlarda belirli bir süre (24 saat) gelişmeye bırakılan salatalık bitkilerinin yapraklarında uygulama sonunda, dokunun gramı başına mg olarak hesaplanan klorofil miktarı (Bu sonuçlar iki replikatin ortalaması alınarak tespit edilmiştir).

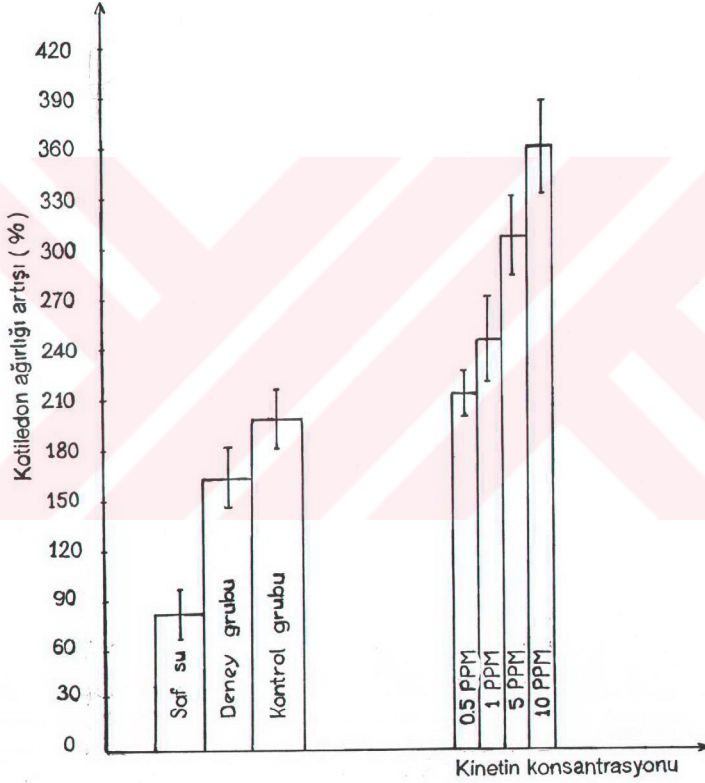
3.3.Sigara Dumanının Endogen Hormon Sentezi Üzerindeki Etkileri

3.3.1. Sigara dumanının içsel sitokinin sentezi üzerindeki etkileri

Fide gelişimini engelleyecek şekilde, sigara dumanı uygulanan ve uygulanmayan ortamlarda belirli bir süre gelişmeye bırakılan salatalık bitkilerinden elde edilen kök eksüdatlarının etil asetat ile ayrıştırılması sonunda, bazık maddeleri içeren su fazında bulunan endogen sitokininlerin (Baltepe, 1974), turp kotiledonu genişleme biyotesti ile saptanan aktiviteleri Şekil 3.3.1.1 ve Şekil 3.3.1.2 'de verilmiştir. Şekillerde de görüleceği üzere sigara dumanı uygulanan bitkilerden elde edilen kök eksüdatında içsel sitokininlerin düzeyinde ve dolayısıyla sentezinde bir azalma vardır.



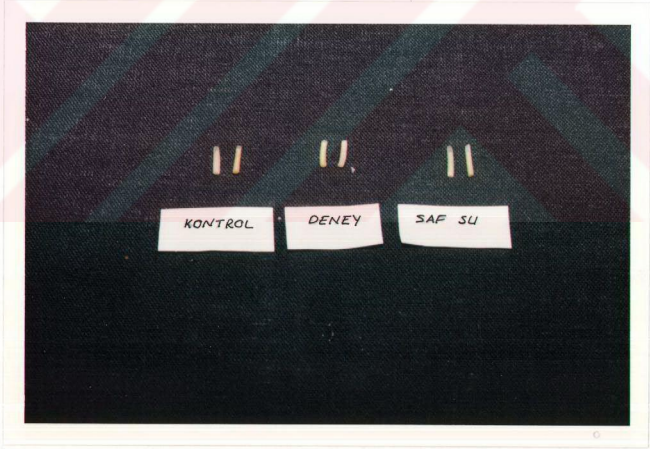
Şekil 3.3.1.1 : Turp kotiledonlarının, sigara dumanı uygulanan (deney) ve uygulanmayan (kontrol) salatalık bitkilerinden elde edilen kök eksüdatlarının su fazlarında, 500 lux ışık altında ve 60 saat sonra, belirlenen genel görünüşleri.



Şekil 3.3.1.2 : Sigara dumanı uygulanan (deney grubu) ve uygulanmayan (kontrol grubu) salatalık bitkilerinden elde edilen kök eksüdatlarının etil asetat ile ayrıştırılması sonunda geriye kalan ve bazık maddeleri içeren su fazlarında, turp kotiledonu genişleme biyotesti ile belirlenen sitokinin aktiviteleri.

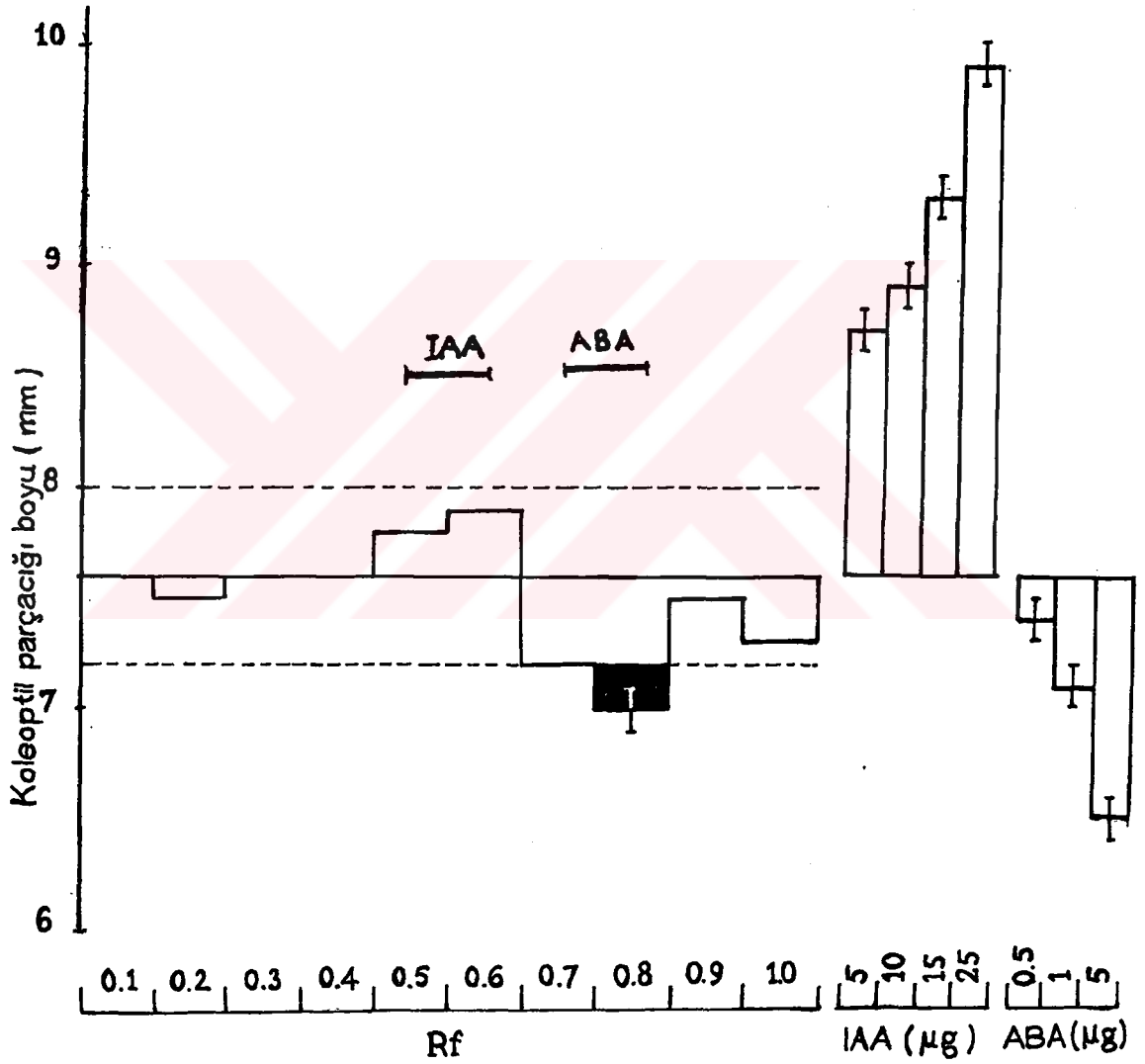
3.3.2. Sigara dumanının içsel IAA ve ABA sentezi üzerindeki etkileri

Fide gelişimini engelleyecek şekilde, sigara dumanı uygulanan ve uygulanmayan ortamlarda belirli bir süre gelişmeye bırakılan salatalık bitkilerinden elde edilen kök eksüdatının asidik-nötr maddeleri içeren etil asetat fazının kağıt kromatografisine uygulanmasından sonra, buğday koleoptili dik büyüme testi ile belirlenen buğday koleoptillerinin genel görünümleri Şekil 3.3.2.1 'de, içsel IAA ve ABA düzeyleri ise Şekil 3.3.2.2 ve Şekil 3.3.2.3 'de verilmiştir. Şekil 3.3.2.2 ile Şekil 3.3.2.3 'deki histogramların incelenmesinden de anlaşılacağı gibi kök eksüdatında IAA aktivitesine rastlanmamıştır ve sigara dumanı uygulanan bitkilerden elde edilen kök eksüdatında ABA seviyesi artmıştır. Bilindiği üzere bitkilerde bulunan fenolik bileşikler ABA ile yakın Rf 'ler-

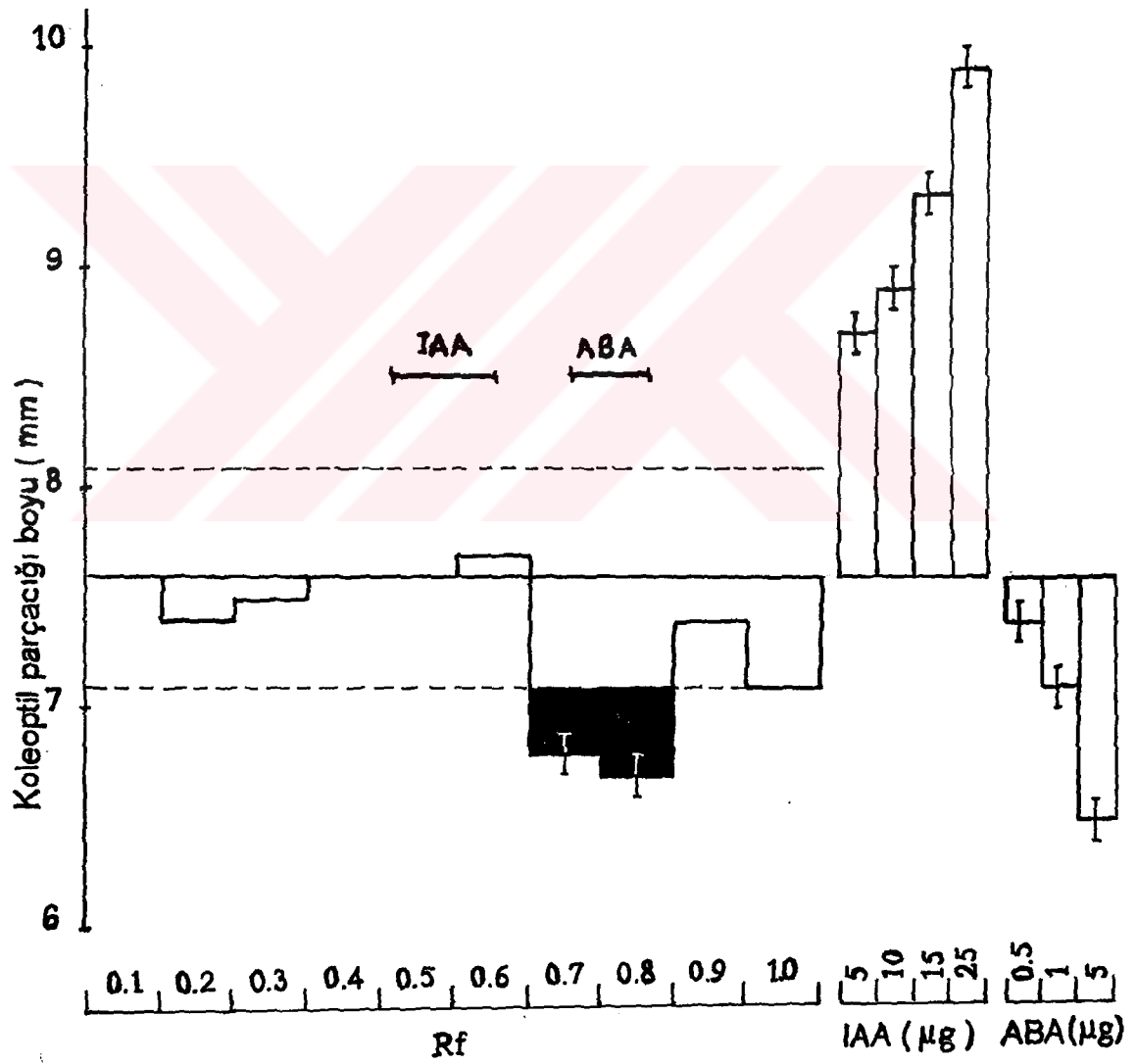


Şekil 3.3.2.1 : Buğday koleoptil parçacıklarının, sigara dumanı uygulanan (deney) ve uygulanmayan (kontrol) salatalık fidelerinden elde edilen kök eksüdatının nötr-asidik etil asetat fazının kağıt kromatografisi ile ayrıştırılması sonunda, marker ABA 'ya tekabül eden Rf 'te belirlenen genel görünümü.

de lokalize olmaktadır. Bu nedenle kromatogramlarımızda ABA 'e tekabül eden Rf bölgelerinde görülen inhibisyon aktivitesi yalnızca ABA'den kaynaklanmayabilir. Burada inhibitör - β kompleksinden bahsetmek daha doğru olur.



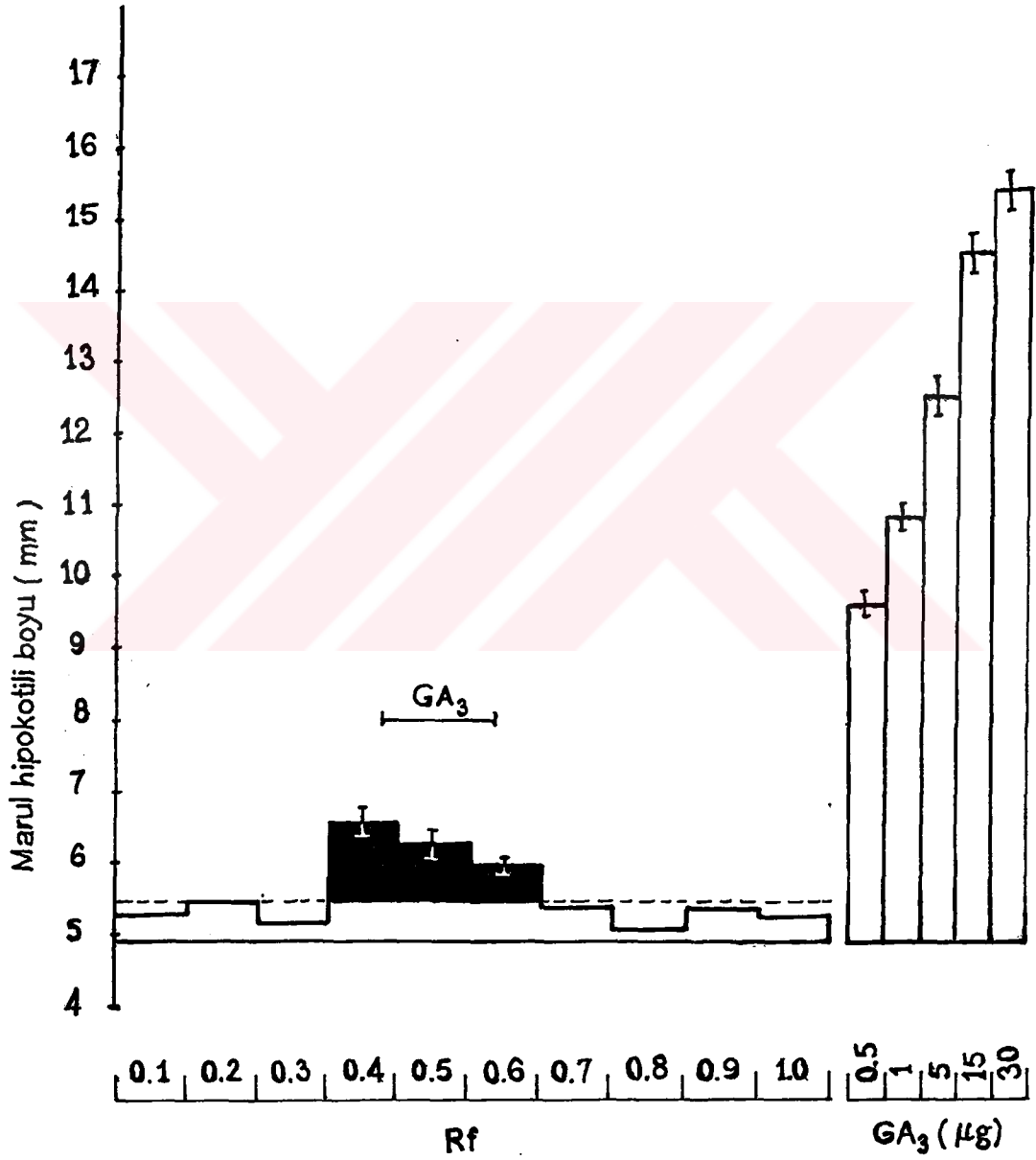
Şekil 3.3.2.2 : Sigara dumanı uygulanmamış salatalık fidelerinden elde edilen kök eksüdatının nötr-asidik etil asetat fazının kağıt kromatografisi ile ayrıştırılması sonunda, buğday koleoptili dik büyüme biyotesti ile ölçülen IAA ve ABA aktiviteleri



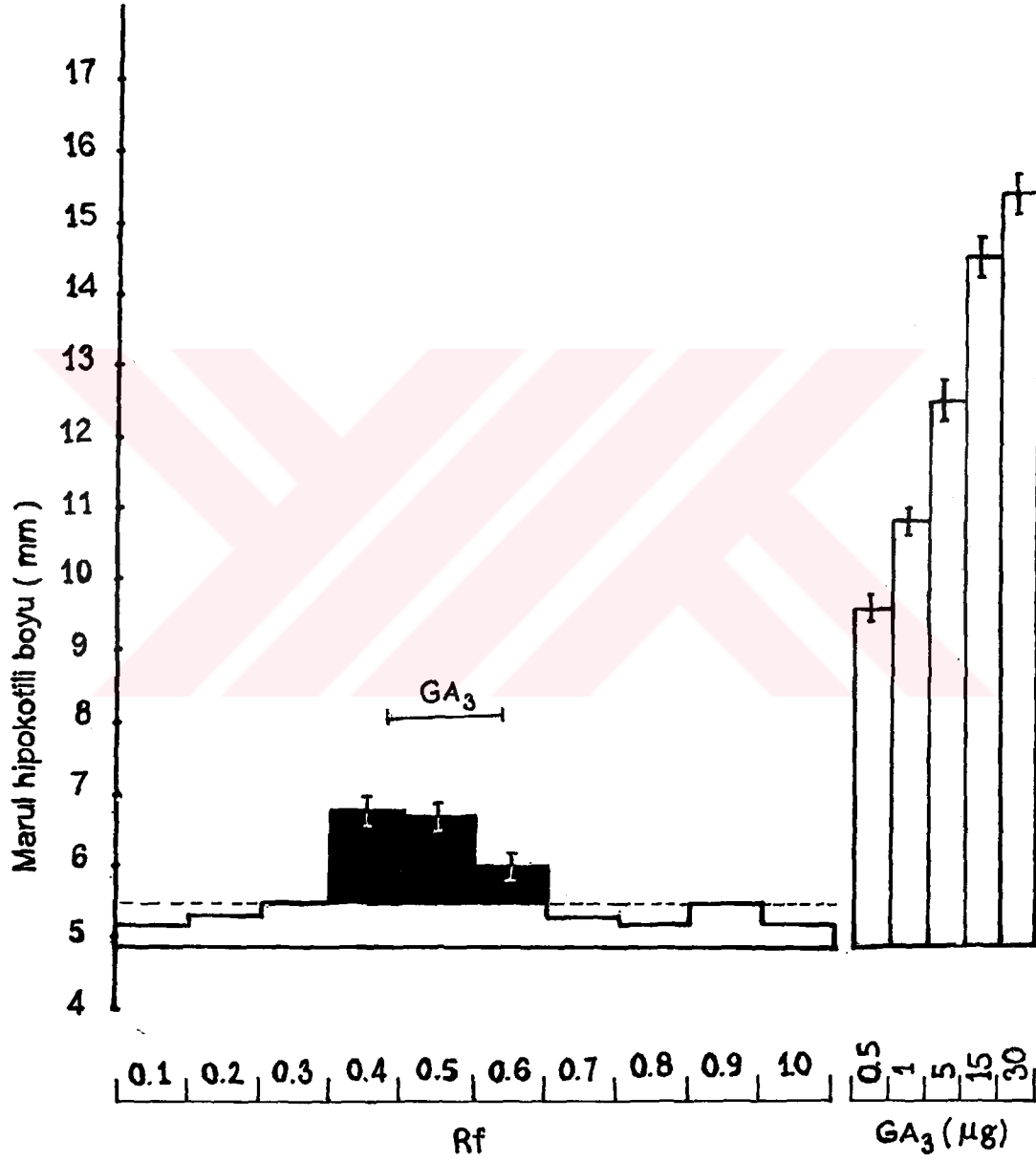
Şekil 3.3.2.3 : Sigara dumanı uygulanması ile gelişimi engellenmiş salatalık fidelerinden elde edilen kök eksüdatının nötr-asidik etil asetat fazının kağıt kromatografisi ile ayrıştırılması sonunda, buğday koleoptili dik büyüme biyotesti ile ölçülen IAA ve ABA aktiviteleri.

3.3.3. Sigara dumanının içsel gibberellin sentezi üzerindeki etkileri

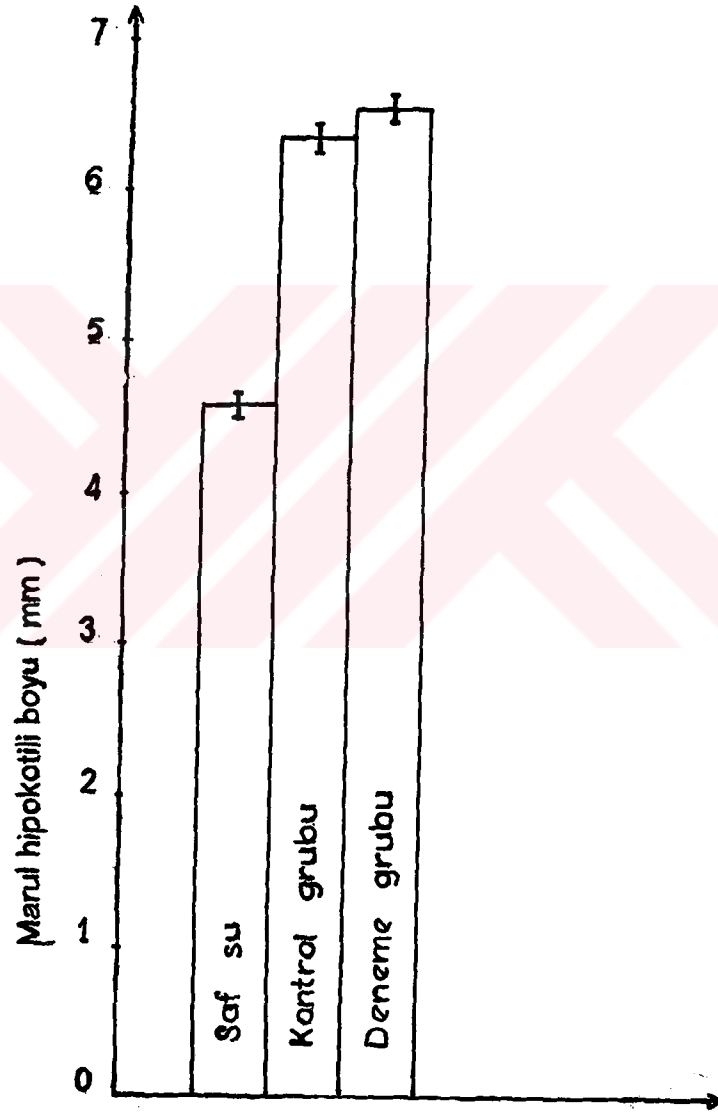
Fide gelişimini engelleyecek şekilde, sigara dumanı uygulanan ve uygulanmayan ortamlarda belirli bir süre gelişmeye bırakılan salatalık bitkilerinden elde edilen kök eksüdatının asidik-nötr maddeleri içeren etil asetat fazının ince tabaka kromatografisi ile ayrıştırılmasından sonra, sadece gibberellinlere özgü bir biyotest olan marul hipokotili büyüme testi ile belirlenen içsel gibberellin düzeyleri Şekil 3.3.3.1 ve Şekil 3.3.3.2 'de verilmiştir. Histogramların incelenmesinden de anlaşılabacağı üzere gibberellinler birden fazla R_f 'e dağıldığı için, fide gelişimi engellenmiş salatalık bitkilerinde stres faktörünün bu hormonların düzeylerine etkisi belirlenememiştir. Kromatografik ayrıştırma yapılmadan, direk ham eksüdatta tekrarlanan marul hipokotili büyüme testi ile belirlenen içsel gibberellin düzeyleri Şekil 3.3.3.3 'de verilmiştir.



Şekil 3.3.3.1 : Sigara dumanı uygulanmamış salatalık fidelerinden elde edilen kök eksüdatının nötr-asidik etil asetat fazının ince tabaka kromatografisi ile ayrıştırılması sonunda, marul hipokotili büyüme testi ile ölçülen gibberellin aktiviteleri.



Şekil 3.3.3.2 : Sigara dumanı uygulanması ile gelişimi engellenmiş salatalık fidelerinden elde edilen kök eksüdatının nötr-asidik etil asetat fazının ince tabaka kromatografisi ile ayrıştırılması sonunda, marul hipokotili büyüme testi ile ölçülen gibberellin aktiviteleri.



Şekil 3.3.3.3 : Sigara dumanı uygulanması ile gelişimi engellenmiş (deney grubu) ve sigara dumanı uygulanmamış (kontrol grubu) salatalık fidelerinden elde edilen ham kök eksüdatında, marul hipokotili büyüme testi ile ölçülen gibberellin aktiviteleri.

Deney serilerinden elde edilen veriler, bir bütün olarak değerlendirildiğinde şu sonuçlara varmamız mümkündür; Sigara dumanı fide gelişimini önemli ölçüde engellemektedir (Vaadia ve ark., 1961; Godzik ve ark., 1985). Bu inhibisyon, kök büyümesinde hipokotil büyümesinden daha belirgin bir şekilde ortaya çıkmaktadır (Jones ve ark., 1982). Strese giren deney bitkisinin yapraklarında klorozis, nekrozis ve şekil bozuklukları gözlenmiştir (Heck, 1964; Naegele, 1974; Godzik ve ark., 1985; Türkan, 1986; Munzuroğlu ve Baltepe, 1994). Ayrıca uygulama sonunda, deney materyalimizde klor eksikliğinden kaynaklandığını düşündüğümüz kök şişkinlikleri görülmüştür.

Sigara dumanı uygulanmasıyla fide gelişimi engellenmiş bitkilerin kök eksüdatlarında sitokinin aktivitesi azalmaktadır (Itai ve Vaadia, 1965; Itai, 1967; Çetingül ve Baltepe, 1982). Kökün sitokininlerin esas sentez merkezi olduğu (Wareing ve ark., 1977) düşünülürse, bu durum sitresli bitkinin yapraklarındaki kloroziside açıklamaktadır (Baltepe, 1986; Kende, 1964; Van Staden ve Wareing, 1972). Endogen sitokinin düzeyindeki bu azalma, hormonun inaktif hale dönüşmesinden ya da sentezlenememesinden kaynaklanabilir (Çetingül ve Baltepe, 1982).

Stres faktörüne adaptif bir tepki olarak, ABA aktivitesi kök eksüdatında artmaktadır (Smit - Spinks ve ark., 1984; Itai ve ark., 1973). Yaşlanan dokularda IAA sentezi artarak (Sheldrake, 1973), bir senesens hormonu olan etilen sentezini stimüle etmektedir (Burg ve Burg, 1966). Sonuçta artan etilen düzeyi ABA sentezini teşvik etmektedir (Hananya ve ark., 1976). Deney materyalimizde gözlediğimiz senesens belirtileri ABA sentezinin bu şekilde arttığını doğrular niteliktedir.

Kök eksüdatında gibberellinlerin düzeyi konusunda, hormonun tek bir Rf zonunda toplanamaması ve önceden strese dayalı olarak, bu konuda kök eksüdatında fazla çalışılmamış olmasından dolayı yorum yapılamamıştır. Ancak gibberellinlerin kök ucundan üst kısımlara doğru kök eksüdatı içinde taşındığı bilinen bir husustur.

Bildiğimiz kadarı ile ilk kez tarafımızdan yapılan bu çalışmada, çok sayıda bitki fizyoloğu tarafından farklı stres faktörleriyle elde edilen sonuçları sigara dumanı için de doğrulamış bulunmaktayız. Ancak laboratuvarlarımızda henüz mümkün olmayan daha duyarlı metodlarla, çalışmanın çok yönlü olarak devam

ettirilmesi kanımızca yarar sağlayacaktır. Bu konuyu ileride floemde taşınan sıvı ile mukayeseli olarak ele almayı da amaçlamış bulunuyoruz.



4. KAYNAKLAR

- ALONI, R., (1987 a). The Induction of Vascular Tissues by Auxin. In; P.J.Davies (ed.), **Plant Hormones and Their Role in Plant Growth and Development**. Martinus Nijhoff Publishers, Boston, Pages 363 - 374.
- ALONI, R., (1987 b). Differentiation of Vascular Tissues. **Annual Review of Plant Physiology**, 38: 179 - 204.
- ATKIN, R.K., BARTON, G.E., and ROBINSON, D.K., (1973). Effect of Root Growing Temperature on Growth Substances in Xylem Exudate of *Zea mays*. **J Exp Bot** 24: 475 - 487.
- BALTEPE, Ş., (1974). Sitokininler İçin Basit Ekstraksiyon ve Biyolojik Test Metodları. **Acta Biologica**, 24: 21 - 28.
- BALTEPE, Ş., (1986). Bitkilerde Senesens ve Yaprak Senesensinin Hormonal İlişkileri. **C. Ü. Fen - Edebiyat Fakültesi Fen Bil. Der.**, 4.
- BEEVERS, L., (1976). Senescence. In; Bonner J., Varner JE. (eds.). **Plant Biochemistry**. Academic press. New York, 771-794.
- BHALLA, R.R., ARNOLD, R.C., and SABHARWAL, P.S., (1976). Cytological Responses of Root-tip Cells of *Allium sativum* to Smoke Puffs from Various Types of Cigarettes. **Cytologia**, 41: 543-551.
- BURG, S.P., and BURG, E.A., (1966). The Interaction Between Auxin and Ethylene and Its Role in Plant Growth, **Proc. Nat. Sci. U.S.A.**, 55: 262-269.
- BRIAN, I., and HALEVY, A.H., (1973). Endogenous Levels of Growth Regulators and Their Relationship to the Rooting of Dahlia Cuttings. **Physiol. Plant.**, 28: 436-442.
- COLLINS, J.C., and KERRIGAN, A.P., 1974. The Effect of Kinetin and Absciscic Acid on Water and Ion Transport in Isolated Maize Roots, **New Phytol.**, 73, 309-314.
- CRAM, W.J., and PITMAN, M.G., (1972). The Action of Absciscic Acid on Ion Uptake and Water Flow in Plant Roots , **Aust. J. Biol. Sci.**, 25, 1125-1132.
- ÇETİNGÜL, V., ve BALTEPE, Ş., (1982). Tuz Stresine Maruz Bırakılmış Bitkilerin Yapraklarında ve Eksüdasyon Sıvılarındaki Hormonal Değişimler. **Atatürk Üniv. Fen Fak. Der.**, Cilt 1. S: 1: 360 - 373.

- DAVISON, A.W., and BAILEY, I.F., (1982). *Natura*, 297,400-402.
- DUYSEN, M.E., and FREEMAN, T.P., (1976). Promotion of Plastid Pigment Accumulation in Water Stressed Wheat Leaf Sections by Hormone Treatment, *Amer. J. Bot.*, 63(8): 1134-1141.
- FELDMAN, L.J., (1979). Cytokinin Biosynthesis in Corn Roots. *Planta* 145: 315-321.
- FRAKLAND, B., and WAREING, P.F., (1960). Effect of Gibberellic Acid on Hypocotyl Growth of Lettuce Seedlings. *Nature* (London), 185,255-256.
- GODZIK, J., ASHMORE, M.R., and BELL, J.N., (1985). Responses of Radish Cultivars to Long Term and Short Term Exposures to Sulphur Dioxide, Nitrogen Dioxide and Their Mixtures, *New Phytol.*, 100, 191-197.
- GOĞALA, N., (1989). Growth Substances in Root Exudate of *Pinus sylvestris*- Their Influence on Mycorrhizal Fungi (Effects of jasmonic acid). *Agriculture, Ecosystems and Environment*, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam Printed in Czechoslovakia, 28: 151 - 154 .
- HECK, W.W., (1964). Plant Injury Induced by Photochemical Reaction Products of Propylene-Nitrogen Dioxide Mixtures. *J. Air Pollut. Contr. Ass.*, 14, 225-261.
- HALE, M.G., and ORCUTT, D.M., (1987). The Role of Phytohormones in Stressed Plants. *The Physiology of Plants under Stress*. WILEY - Interscience a division of John WILEY & Sons Inc. 605 Third Avenue, New York. 10: 145 - 146.
- HALE, M.G., and ORCUTT, D.M., (1987). Stress Tolerance through Biotechnology. *The Physiology of Plants under Stress*. WILEY - Interscience a division of John WILEY & Sons Inc. 605 Third Avenue, New York. 11: 171 - 174.
- HANANYA, E.B., GOLDSCHMIDT, E.E., and GOREN, R., (1976). Ethylene Induced Formation of ABA in Citrus Peel as Related to Chloroplast Transformations. *Plant Physiol.*, 58:377.
- HESELTINE, E., RIBOLI, E., and SHUKER, L., (1988). *Tobacco or Health, Smoke-Free Europe: 4*, Published by WHO Regional Office for Europe. IARC and Commission of the European Community.
- ITAI, C., and VAADIA, Y., (1965). Kinetin- like Activity in Root Exudate of Water-Stressed Sunflower Plants. *Physiologia Plantarum*, Vol. 18.

- ITAI, C., (1967). Shoot and Root Interaction under Different Water Regimes. Ph.D. Thesis. Heebrew Univ., Jerusalem.
- ITAI, C., and VAADIA, Y., (1971). Cytokinin Activity in Water Stressed Shoots. *Plant Physiol.*, 47:87-90.
- ITAI, C., and BEN-ZIONI, A., (1973). Short- and Long-Term Effects of High Temperatures (47-49°C) on Tobacco Leaves. II. O₂ uptake and Amylolytic Activity. *Physiol. Plant.* 28: 490-492.
- ITAI, C., BEN-ZIONI, A., and ORDIN, L., (1973). Correlative Changes in Endogenous Hormone Levels and Shoot Growth Induced by Short Heat Treatments to the Root. *Physiol. Plant.* 29: 355-360.
- ITAI, C., and BEN-ZIONI, A., (1976). Water Stress and Hormonal Response. *Water and Plant Life*. Ed.: O.L. Lange , L. Kappen, E. Schultze p. : 225-242, Springer- Verlag.
- JACOBS, W.P., (1979). *Plant Hormones and Plant Development*. Cambridge University Press, Cambridge.
- JONES, T., and MANSFIELD, T.A., (1982). Studies on Dry Matter Partitioning and Distribution of C- labelled Assimilates in Plants of *Phleum Pratense* Exposed to SO₂ Pollution. *Environ. Pollut. (Series A)*. 28, 199-207.
- KARMOKER, J.L., and VAN STEUENINCK, R.F.M., (1978). Stimulation of Volume Flow and Ion Flux by Abscissic Acid in Excised Root Systems of *Phaseolus vulgaris* L. cv. Redland Pioneer , *Planta*, 141,37-43.
- KENDE, H., (1964). Preservation of Chlorophyll in Leaf Sections by Substances Obtained from Root Exudate. *Science*, 145: 1066.
- KULAEVA, O.N., (1962). *Soviet Plant Physiol.* (English trans.) 9,182.
- LARCHER, W., (1980). *Ökologie den Pflanzen. Auf Physiologischer Grundlage*. Verlag-Eugen Ulmer. Stuttgart.
- LENDZLAN, K.J., and UNSWORTH, M.H., (1981). Ecophysiological Effects of Atmospheric Pollutants. *Physiological Plant Ecology JV*. Edited by O.L. Lange, P.S. Nobel, C.B. Osmond and H.Ziegler. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York. PP: 465-502.
- LETHAM, D.S., (1971). Regulation of Cell Division in Plant Tissues. XII. Cytokinin Bioassay Using Excised Radish Cotyledons. *Physiol. Plant.*, 25,391-396.

- LOVEYS, B.R., and KRIEDEMANN, P.E., (1973). Rapid Changes in Abscissic Acid - like Inhibitors Following Alterations in Vine Leaf Water Potential. *Physiol. Plant.*, 28:476.
- MEYER, R.E., and GINGRICH, J.R., (1964). Osmotic Stress : Effects of Its Application to a Portion of Wheat Root Systems. *Science*, 144:1463-1464.
- MIZRAHI, Ş., BLUMENFELD, A., BITNER, S., and RICHMOND, A.E., (1971). Abscissic Acid and Cytokinin Contents of Leaves in Relation to Salinity and Relative Humidity , *Plant Physiol.*, 48:732-755.
- MUNZUROĞLU, Ö., (1994). Sigara Dumanının Monokotil ve Dikotil Bitkilerde Büyüme Etkisinin Hormonal İlişkilerinin araştırılması. Doktora Tezi.Fırat Üniv. Fen Bilim. Ens. Elazığ.
- MUNZUROĞLU, Ö., ve BALTEPE, Ş., (1994). Trafik Araçlarından Kaynaklanan Hava Kirlenmesinin Buğday (*Triticum aestivum* L.) Bitkisi Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi.Fırat Üniversitesi. Fen Fak., Elazığ.(Baskıda)
- MOTHES, K., (1964). The Role of Kinetin in Plant Regulation. Int. Conf. of Plant Growth of Substances. *Regulateurs Naturels de la Croissance Vegetale*. C.N. R. S. Paris 123, pp. 131-140.
- NAEGELE, J.A., (1974). Effect of Pollution on Plants, *Industrial Pollution*. Ed.:N.I. Sax, Van Nostrand Reinhold Co., 82,99.
- NEUFELD, H.S., JERSTED, J.A., and HAINES, B.L., (1985). Direct Foliar Effect of Acid Rain. I. Damage, growth and gas exchange, *New Phytol.*, 99, 389-405.
- NIEMAN, R.H., (1965). Expansion of Bean Leaves and Its Suppression by Salinity. *Plant Physiol.*, 40:156.
- NITSCH, J.P., and NITSCH, C., (1955). The Separation of Natural Plant Growth Substances by Paper Chromatography. *Beitr. Biol. Pflanzen*, 31, 387-408.
- NITSCH, J.P., and NITSCH, C., (1956). Studies of The Growth of Coleoptile and First Internode Sections. A new sensitive straight growth test for auxins. *Plant. Physiol.*, 31, 94 - 111.
- OSBORNE, D.J., and McCALLA, D.R., (1961). *Plant Physiol.* 36, 219.

- OSBORNE, D.J., (1962). Effect of Kinetin on Protein and Nucleic Acid Metabolism in *Xanthium* Leaves During Senescence. *Plant Physiol*, 37,595.
- ÖZÖRGÜCÜ, B., ÇIVİCİ, İ. ve TÜRKAN, İ., (1986). Kolşisin ve Sigara Dumanı Uygulanmış Köklerin DNA İçeriği Üzerinde Gözlemler. VIII. Ulusal Biyoloji Kongresi (3,5 Eylül) Bildiri Metinleri. Cilt I, E.Ü. Fen. Fak., İzmir, 613-627.
- PATE, J.S., (1989). Synthesis, Transport and Utilization of Products of Symbiotic Nitrogen Fixation. In J. E. Poulton, J. T. Romero and E. E. Conn (ed.), *Plant Nitrogen Metabolism*. Plenum, New York. Pages 65 - 115.
- RIKIN, A., ATSMON, D., and GITLER, G., (1979). Chilling Injury in Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) : Prevention by Absciscic Acid. *Plant Cell Physiol*. 20: 1537 - 1546.
- REID, D.M., and CROZIER, A., (1971). Effects of Waterlogging on the Gibberellin Content and Growth of Tomato Plants. *J Exp Bot* 22: 39-48.
- REDDY, M.N., POKOJSKA, A., KAMPERT, M., and STRZELCZYK, E., (1989). Auxin-, Gibberellin- like Substances and Cytokinins in the Seed and Root Exudates of Groundnut. *Plant and Soil* 113. 283-286.
- ROSS, C.W., (1974). *Plant Physiology Laboratory Manual*, Wadsworth Publ. Co. U.S.A p: 3,6,184.
- SALISBURY, F.B., and ROSS, C.W., (1985). *Plant Physiology*, 3rd Edition, Wadsworth Publ. Co. Calif., USA, 540 sayfa.
- SALISBURY, F.B., and ROSS, C.W., (1992). *Plant Physiology*, Editor Carey, J.C., In: *Stress Physiology*, 26:575.
- SCOTT, T.K., (1972). Auxins and Roots. *Annu Rev Plant Physiol* 23: 235 - 258.
- SHANER, D.L., MERTZ, S.M., and ARNTZEN, C.J., (1975). Inhibitions of Ion Accumulation in Maize Roots by Absciscic Acid , *Planta*, 122, 79-90.
- SHELDRAKE, A.R., (1973). The Production of Hormones in Higher Plants, *Biol. Rev.* 48: 509-559.
- SMIT-SPINKS, B., SWANSON, B.T., and MARKHART, A.H., (1984). Changes in Water Relations, Water Flux, and Root Exudate Absciscic Acid Content with Cold Acclimation of *Pinus sylvestris* L. *Aust. J. Plant Physiol.*, 11,431-41.

- STILES, W., (1950). **An Introduction to the Principles of Plant Physiology**, London, 434.
- THOMSON, W.W.J., DUGGER, W.M., and PALMER, R.L., (1965). Effects of Peroxyacetyl Nitrate on Ultrastructure of Chloroplasts, *Bot Gaz.*, 126,66-72.
- TODD, G.W., and GARBER, M.J., (1958). Some Effects of Air Pollutants on the Growth and Productivity of Plants. *The Botanical Gazette*, 120(2): 75-80.
- TÜRKAN, İ., (1988). Egsoz Gazının Salatalık (*Cucumis sativus* L.) ve Buğday (*Triticum aestivum* subsp. Vulgare) Üzerinde Morfolojik ve Anatomik Etkenlikleri. IX. Ulusal Biyoloji kongresi. 21-23 Eylül, Sivas.
- TUKEY, J.W., (1953). Some Selected Quick and Easy Methods for Statistical Analysis. *Transactions of New York Acad. Sci.*, 88-97.
- VAADIA, Y., RANEY, F.L., and HAGAN, R.M., (1961). Plant Water Deficits and Physiological Processes. *Ann. Rev. Plant . Physiol.* 12:265-292.
- VAN STADEN, J., and WAREING, P.F., (1972). The Effect of Photoperiod on Levels of Endogenous Cytokinins in *Xanthium strumarium*. *Physiol. Plant.* 27: 331 - 337.
- WINNER, W.E., and ATKINSON, C.J., (1986). Absorbtion of Air Pollution by Plants and Consequences for Growth. *Trends In Ecol and Evolat.* Vol.1(1): 15-18.
- WALTON, D.C., HARRISON, M.A., and COTE, P., (1976). The Effects of Water Stress on Absciscic Acid Levels and Metabolism in Roots of *Phaseolus vulgaris* L. and Other Plants, *Planta* , 131,141-144.
- WAREING, P.F., HORGAN, R., HANSON, I.E., and DAVIS, W., (1977). Cytokinin relations in the Whole Plant. Pilet PE(ed.) **Plant Growth Regulation**. Springer, Berlin Heidelberg New York PP 147-153.
- WINKLER, R.G., BLEVINS, D.G., POLACCO, J.C., and RANDALL, D.D., (1988). Ureide Catabollism in Nitrogen Fixing legumens. *Trends Biochemical Sciences* 13: 97 - 100.
- WAGNER, B.M., and BECK, E., (1993). Cytokinins in the Perennial Herb *Urtica-Dioica* L as Influenced by Its Nitrogen Status, *Planta*, Vol 190, pp:511-518.
- YAKAR-OLGUN, N., (1959). Action of Cigarette Smoke Tar on Root Tips. *İstanbul Üni. Fen Fakültesi Mecmuası. Seri B, Cilt 24 , Sayı 3-4.*

**YANG, S.F., and SALEH, M.A., (1973). Destruction of Indole-3-acetic Acid
During the Aerobic Oxidation of Sulfite, *Phytochemistry*, 12, 1463-1466.**

