



Türk Doğa ve Fen Dergisi
Turkish Journal of Nature and Science

<http://www.bingol.edu.tr/dergiler/turk-doga-ve-fen-dergisi.aspx>



Nitrik Oksit'in Mısır (*Zea mays* L) Bitkisinde Oksidatif Stres ve Antioksidan Enzimler Üzerine Etkisi

Nevzat Esim^{*1}, Ökkeş Atıcı²

Özet

Bu araştırmada, mısır (*Zea mays* L.) bitkisi yapraklarında hidrojen peroksit (H_2O_2) ile süperoksit ($O_2^{\cdot-}$) miktarı, lipid peroksidasyon seviyesi ve antioksidan enzimlerden peroksidaz (POD) ve süperoksit dismutaz (SOD) aktiviteleri üzerine nitrik oksit'in (NO) etkileri araştırılmıştır. Ekim gününe göre bitki yapraklarına 10. gün 0.0, 0.1, 1 ve 100 μ M sodyum nitroprusid (SNP), (NO vericisi), konsantrasyonları püskürtülerek uygulanmış ve bitkiler 14 günlük olduklarında yaprakları hasat edilmiştir. Uygulanan SNP konsantrasyonları kontrole göre H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$ ve lipid peroksidasyon seviyelerini düşürmüştür. SNP uygulamaları aynı zamanda hem SOD hem de POD antioksidan enzim aktivitelerini de artırmıştır.

Anahtar Kelimeler: Mısır, nitrik oksit, antioksidan enzim, lipid peroksidasyon, hidrojen peroksit

Effects of Nitric Oxide on oxidative stress and Antioxidant Enzyme Activities in Maize (*Zea mays* L.)

Abstract

In this study, effects nitric oxide on the activities of antioxidant enzymes (superoxide dismutase and peroxidase), hydrogen peroxide (H_2O_2) and superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) contents, lipid peroxidation level on the leaves of maize (*Zea mays* L.) were investigated. According to planting day, sodium nitroprusid (SNP), (a donor NO) concentrations of 0.0, 0.1, 1 and 100 μ M were applied by spraying on the plant leaves at 10th day and 14 days plants were harvested. H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$ and lipid peroxidation levels reduced by application SNP concentration compared to the control. At the same time, SNP concentrations also increased the activities of antioxidant enzymes such as SOD, POD.

Keywords: *Zea mays*, nitric oxide, antioxidant enzyme, lipid peroxidation, H_2O_2 hydrogen peroxide

1. Giriş

Uzun yıllardan beri canlılarda varlığı bilinen nitrik oksit (NO: azot monoksit), son yıllarda hem memelilerde hem de bitkilerde anahtar haberci molekül olarak dikkatleri üzerine çekmiştir [1-5]. NO, düşük molekül ağırlıklı, lipofilik özellikte olduğundan dolayı hücre membranlarından kolayca difüzyona uğrayabilen, renksiz ve gaz yapısında bir moleküldür [3-6]. Ayrıca çiftelenmemiş elektron taşıması nedeniyle serbest radikal olarak kabul edilen NO, başka moleküllerle kuvvetli reaksiyonlara girebilen, birkaç saniye yarı ömrü olan "fizyolojik haberci molekül" olarak tanımlanmaktadır [7, 8]. NO, normal koşullarda bitki hücrelerinde az miktarda sentezlenip salınmakta [9] olup, NO sentezi bitki türüne, dokusuna, bitkinin yetiştirme koşullarına bağlı olarak değişmektedir [1,2].

Birçok biyolojik süreçte görev alan NO, hem bitki savunma mekanizmasında bir sinyal molekül olarak hem de

büyüme ve gelişmede hormonal özelliklere sahip bir bileşik olarak rol oynamaktadır [10]. Bitki büyümesi üzerine NO'nun etkilerinde, NO konsantrasyonunun son derece önemli olduğu vurgulanmıştır [2, 11, 10]. NO'nun yüksek konsantrasyonlarının (40-80 ppm) domates, marul ve bezelye bitkisinde büyümeyi inhibe ettiği, düşük konsantrasyonlarının (0-20 ppm) ise büyümeyi teşvik ettiği ileri sürülmüştür [12, 13]. Eksojen olarak uygulanan NO veya NO donörlerinin, patojen [7], ışık [14], yerçekimi [15] ve oksidatif strese [14, 16, 17, 6] karşı bitki cevaplarını etkilemektedirler. Stres koşulları altında sinyal iletim yolunda görev alan NO reaktif oksijen türleri ile karşılıklı etkileşim halindedir. NO tarafından lipid peroksidasyonunun inhibisyonu, NO'nun potansiyel antioksidan rolüne işaret etmektedir [14, 10]. Eksojen olarak uygulanan NO, antioksidan enzimlerin aktivitelerine etki ederek süperoksit anyonunu elimine eder ve bitkiyi oksidatif zarardan korur [6].

Reaktif oksijen türleri (ROT) bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük ve çok reaktif moleküller olarak tanımlanabilir. ROT'lar hücre içerisinde redoks sinyali ve

¹Bingöl Üniversitesi, Teknik Bilimler Meslek Yüksekokulu, 12000 Bingöl, TÜRKİYE

²Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 25240Erzurum, TÜRKİYE

*Sorumlu yazar eposta: nevzatesim@hotmail.com

antioksidan savunma mekanizmasını harekete geçirmede önemli rol oynarlar [10]. Normal koşullarda bitki hücrelerinde ROT'lar çok düşük konsantrasyonlar da bulunur. Özellikle çevresel stresler hücrel redoks dengesini bozarak oksidatif zarara ve ROT'ların fazla miktarda üretilmesine neden olur [18]. Oksidatif stres süresince, ROT'lar bitki hücresinin mitokondri, kloroplast, peroksizom ve nükleus gibi farklı kısımlarında meydana gelerek hücrede zarar ve hatta ölüme bile neden olabilirler. ROT'lar lipid, protein, karbohidrat ve nükleik asitler gibi hücrelerin temel bileşenleri üzerinde etkili olurlar. Özellikle çift bağların bulunduğu doymamış yağ asitlerini içeren lipidler, ROT'lar ile kolayca reaksiyona girmektedirler [19]. Membran yapısı ve fonksiyonu üzerinde ROT'ların etkilerinin en çok araştırılanlarından birisi lipid peroksidasyonudur. Lipid peroksidasyonu doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımıdır [19].

Bitki hücreleri ROT miktarını kontrol etmek ve stres koşullarında hücreleri artan ROT etkisinden korumak için ROT'u temizleyen bazı enzimler ihtiva ederler. Antioksidan enzimler olarak adlandırılan bu enzimler reaktif oksijen türlerini kademeli bir şekilde daha az toksik olan bileşiklere parçalayarak temizlerler. Bu enzimlerin bazıları süperoksit dismutaz, katalaz ve peroksidazlardır [19]. Süperoksit dimutaz (SOD) (E.C.1.15.1.1) enzimi, süperoksit radikalinin (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyen metal içeren bir enzimdir [20]. Peroksidaz (POD) (E.C.1.11.1.7); H_2O_2 'yi kullanarak fenoller ve hidrokinoonlar gibi çok sayıda aromatik bileşenlerin dehidrojenasyonunu katalizleyen ve *HEM* prostetik grubuna sahip bir proteindir [20].

Bu çalışmamızın amacı; bir sinyal molekül olarak NO 'nun normal şartlarda dışsal olarak mısır bitkisinin yapraklarına uygulandığında, yapraklardaki ROT'ların miktarı, lipid peroksidasyonu ve antioksidan enzim aktivitelerini nasıl etkilediğini belirlemektir.

2. Materyal ve Metod

2.1. Bitkilerin Büyütülmesi

Araştırmamızda bölgemizde de ekimi yapılan soğuşa hassas bir bitki olan mısır (*Zea mays* L. cv. Arifiye-2) kullanılmıştır. Tohumlar Sakarya Mısır Araştırma İstasyonundan temin edilmiştir. Mısır bitkisine ait tohumlar, ekimden önce etanol (%96) ile kısa süreli hızlıca yıkandı ve %5'lik sodyum hipoklorit içerisinde 5 dk. yüzey sterilizasyonuna tabi tutuldu. Daha sonra 5 kez saf su ile yıkanarak, oda şartlarında saf su içerisinde 6 saat şişmeye bırakıldı. Her saksıya saf su ile şişirilmiş tohumlar eşit miktarda ekildi. Bitkiler iklim dolabında kontrol şartlarında (25/22 °C) sıcaklık ve 16/8 saat ışık-karanlık periyodunda (20.000 lüks, %70 nem) 14 gün süreyle büyütüldü. Her saksı, kesileceği güne kadar, günlük eşit miktarda sulandı. 10. gün bitkilerin yapraklarına (0,0, 0,1, 1 ve 100 μ M) Sodyum nitroprüssid (SNP), (NO vericisi), konsantrasyonları uygulandı. 14. günde bitki yaprakları kesildikten sonra deneysel analizler için -80 °C de saklandı.

2.2. Hidrojen Peroksit [H_2O_2] Miktarının Belirlenmesi

Hidrojen peroksit [H_2O_2] miktarının belirlenmesi için; 0,5 gram yaprak alınarak 10 mL soğuk aseton içinde homojenize edildikten sonra homojenat 10.000 x g'de 10 dakika santrifüj edilir. Daha sonra elde edilen süpernatantın 1,5 mL'si, sırasıyla 0.15 mL %5'lik $Ti(SO_4)_2$ (titanium disülfat) ve 0.3 mL %19'luk NH_4OH (amonyum hidroksit) ile karıştırılır. Çökelek oluşuktan sonra karışım 10.000 x g'de 10 dakika daha santrifüj edilir. Tüpün süpernatant kısmı uzaklaştırıldıktan sonra elde edilen pelet 3 mL 2 M'lık

H_2SO_4 (sülfürik asit) içinde çözülür ve 415 nm'de absorbanı ölçülerek kaydedilir. Bu ortalama absorbanı değerleri, daha önceden hazırlanmış standart grafik yardımıyla nanogram cinsinden H_2O_2 miktarına dönüştürülür. Sonuçlar g yaprak başına düşen H_2O_2 miktarı (ngram /g yaprak) olarak sunulur [21].

2.3. Süperoksit Anyon Miktarının Belirlenmesi

0,5 g yaprak sıvı azot ile toz haline getirildikten sonra üzerine 2 mL 65 mM (pH: 7.8) fosfat tamponu ile homojenize edilir. Homojenat 5000 x g'de 10 dk. ve + 4 °C de santrifüj edilir. Süpernatantın 1 mL, 10 mM hydroxilamin'den 0,1 mL ve aynı fosfat tamponundan 0,9 mL alınır karıştırılır ve 25°C' de 20 dk. inkübe edilir. İnkübasyona bırakılan karışımın 1 mL'si alınır üzerine 1 mL 17 mM aminobenzene sülfonik asit ve 1 mL 17 mM 1-naftilamin eklenir ve tekrardan 25°C de 20 dk. inkübe edildikten sonra spektrofotometre de 530 nm'de ölçülür. Sonuçlar $NaNO_2$ standart grafiğine bakılarak değerlendirilir [22].

2.4. Lipid Peroksidasyon Aktivitesinin Belirlenmesi

Lipid peroksidasyonu için 0,5 g yaprak alınarak 5 mL %5 lik TCA içinde homojenize edildikten sonra elde edilen homojenat 10.000 x g'de 15 dakika santrifüj edilir. Tüpün süpernatant kısmından 4 mL alınarak üzerine 1 mL %0.5 lik TBA çözeltisi ilave edilir. Reaksiyon karışımı kaynar suda 30 dakika inkübe edilir ve reaksiyon tüplerinin buz banyosuna alınmasıyla durdurulur. Örnekler tekrar 10.000 x g'de 10 dakika santrifüj edilir. Süpernatant kısmı alınarak absorbanı 532 nm de okunur ve daha sonra 600 nm deki non-spesifik absorpsiyon için absorbanı değeri belirlenir. Lipid peroksidasyonun hesaplanması için; 532 nm'de ölçülen absorbanı değerinden 600 nm'de belirlenen değeri çıkarılır ve 1 ml çözeltideki MDA (nmol/g): $[(A532-A600)/155000] \times 10^6$ formülüyle hesaplanır. Sonuçlar MDA (nmol/gram doku) şeklinde verilir [23].

2.5. Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi, nitro blue tetrazoliumun (NBT) süperoksit radikalleri ile mavi renkli formazona fotokimyasal indirgenmesi reaksiyonunun SOD enzimi tarafından engellenmesinin spektrofotometrik olarak belirleme esasına dayanır. Reaksiyon karışımı (3 mL); 50 mM KH_2PO_4 (pH: 7.8), 13 mM metiyonin, 63 μ M NBT, 13 μ M riboflavin ve 0.1 mM EDTA içermektedir. Aktivite ölçümü için 3 mL spektrofotometre küvetine yukarıdaki riboflavin içermeyen reaksiyon karışımından 2,58 mL alınmış ve üzerine 30 μ L enzim ekstraktı pipetlenmiştir. Reaksiyon, tüp üzerine 13 μ M'lık riboflavin çözeltisinden 390 μ L pipetlenip karıştırıldıktan hemen sonra, beyaz bir ışık kaynağı önüne yerleştirmek suretiyle başlatılmıştır. Tüp, ışık kaynağının karşısında 15 dk. tutulmuş ve reaksiyon ışık kaynağının kapatılmasıyla durdurulmuştur. 15 dk. içerisinde NBT'nin renk açılma yoğunluğu 560 nm'de köre karşı okunmuştur. Köre; aynı işlemin enzimsiz örneğinden oluşmaktadır. SOD aktivitesinin 1 ünitesi, 560 nm'de gözlenen NBT indirgenmesinin %50 inhibisyonuna neden olan enzim miktarı, 1 enzim ünitesi olarak kabul edilmiş ve değerler EU/g yaprak olarak sunulmuştur [24].

2.6. Peroksidaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Peroksidaz (POD) aktivite tayini, guaicol ve H_2O_2 'nin substrat olduğu reaksiyonun ürünü olan renkli bileşiğin meydana getirdiği absorbanı artışının 470 nm'de izlenmesi

esasına dayanmaktadır. Aktivite ölçümü için spektrofotometre kuvetine; 100 mL 0,1 M, NaH₂PO₄ (pH: 5,5) ve 5 mM guaiacol ve 5mM H₂O₂ içeren substrat çözeltisinden 3 mL konulduktan sonra, üzerine 10 µM enzim ekstraktı ilave edilmiştir. 470 nm’de 5 dakika boyunca absorbans artışı 1 dakika aralıklarla kaydedilmiş ve absorbansın doğrusal olarak arttığı kısımdaki absorbans artışı 1 dakikaya oranlanmıştır. 25 °C’de 1 dakikada, absorbans 0.01 abs artıran enzim miktarı 1 enzim ünitesi olarak kabul edilmiş ve sonuçlar g yaprak başına düşen enzim ünitesi (EU/g yaprak) olarak sunulmuştur [25].

2.7. İstatistiksel Analiz

Sonuçların karşılaştırılması, SPSS 13.0 paket programı kullanılarak tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile yapılmış $P<0.05$ önem seviyesinde Duncan’ın Çoklu Karşılaştırma Testi kullanılarak belirlenmiştir.

3. Bulgular

Bitki yapraklarına normal şartlarda uygulanan farklı oranlardaki SNP konsantrasyonları hidrojen peroksit (H₂O₂) miktarını etkilemiştir. 0.1, 1 ve 100 µM SNP uygulamaları kontrol bitkilerine göre H₂O₂ miktarını sırasıyla % 10, % 11 ve % 9 olarak düşürmüştür (Tablo 1). Kontrol bitkisinin yapraklarında 47.3 ng.g⁻¹ olarak belirlenen H₂O₂ miktarı 0.1, 1 ve 100 µM SNP uygulamaları ile sırasıyla 42,3, 42 ve 43,1 ng.g⁻¹’a kadar azaldığı belirlenmiştir (Tablo 1).

SNP konsantrasyonları kontrol uygulamasına göre süperoksit anyonu (O₂⁻) miktarını önemli ($P<0.05$) oranlarda sırasıyla %13, %16 ve %23 olarak düşürmüştür. Kontrol bitkilerinde 5.92 µg.g⁻¹ olarak belirlenen O₂⁻ miktarı 0.1, 1 ve 100 µM SNP uygulamaları ile sırasıyla 5,12, 4,94 ve 4,54 µg.g⁻¹’a kadar azaldığı belirlenmiştir (Tablo 1).

Lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan malondialdehid (MDA) miktarını kontrole göre SNP konsantrasyona bağlı olarak farklı şekillerde etkilemiştir. Kontrol uygulamasında 1.6 nmol.g⁻¹ olarak belirlenen MDA miktarı 0.1 µM, 1 ve 100 µM SNP uygulamaları ile sırasıyla 1,4, 1,2 ve 1,4 nmol.g⁻¹’ye kadar azaldığı belirlenmiştir (Tablo 1).

14 günlük bitki yapraklarında kontrole göre SNP konsantrasyonları SOD aktivitesinde önemli artışa neden olmuştur. Kontrol bitkisinin yapraklarındaki SOD aktivitesi 110 EU.g⁻¹ iken, 0.1 µM SNP uygulaması SOD aktivitesini %31 oranında artırarak 144 EU.g⁻¹ olarak tespit edilmiştir. 1 µM SNP uygulaması da SOD aktivitesi %27 oranında artırarak 140 EU.g⁻¹’e yükseltmiştir. 100 µM SNP uygulamasının ise kontrole göre aktivite üzerinde % 12’lik bir artışa neden olduğu belirlenmiştir (Tablo 1).

Çalışmada aktivitesi ölçülen diğer bir antioksidan enzim olan POD aktivitesi de SNP konsantrasyonları ile farklı oranlarda etkilenmiştir. 0.1 µM SNP uygulaması POD

aktivitesinin aktivitesi üzerine önemli bir etki yapmamıştır. Ancak 1 ve 100 µM SNP uygulamaları POD aktivitesini önemli oranlarda artırdığı belirlenmiştir. 1 µM SNP uygulaması kontrole göre aktivite üzerinde % 55’lik bir artışa neden olurken, 100 µM SNP uygulaması % 100 den daha fazla oranda aktiviteyi artırmıştır (Tablo 1).

4.Tartışma ve Sonuç

Bitkilerde çeşitli biyokimyasal ve fizyolojik olaylarda ikincil haberci molekül olarak rol oynayan NO, eksojen uygulamaları bitkilerde büyüme ve gelişme, çimlenme, de-etiyolasyon, klorosis, senesens gibi fizyolojik olayların yanında, bazı stres koşullarında oluşturulan savunma mekanizmalarında da yer aldığı çeşitli araştırmacılar tarafından ortaya konulmuştur [14, 8, 27]. Birçok çalışmada dışarıdan NO veya NO donörleri [SNP gibi] uygulamasının bitkiyi birçok çevresel strese karşı koruyabildiği ile ilgili bilgiye rastlanılmaktadır [14, 8, 27].

Mevcut çalışmada mısır yapraklarına dışsal olarak uygulanan SNP konsantrasyonları H₂O₂ ve O₂⁻ seviyelerini düşürmüştür (Tablo 1). Hem normal şartlarda hem de abiyotik stres şartlarındaki bitkilerde dışsal olarak uygulanan NO’nun H₂O₂ miktarını azalttığına dair pek çok çalışma mevcuttur. Tuzluluk [12, 26], düşük sıcaklık [28], ağır metal [29] gibi abiyotik streslerde artan H₂O₂ miktarının uygulanan NO tarafından azaltıldığı belirtilmiştir. Diğer bir ROT olan O₂⁻ miktarının da uygulanan NO ile pamuk kalluslarında [30], arpada [31], yabani hardal süspansiyon kültüründe [28], *Hydrilla verticillata* bitkisinde [32] azaldığı rapor edilmiştir. Çalışmamızın sonuçları literatür ile paralellik göstermektedir.

Bir reaktif oksijen türü olan H₂O₂, biyolojik sistemlerde normal metabolizma sonucu üretilmekte ve birçok biyokimyasal ve fizyolojik sürece etki etmektedir. Bir stres indikatörü olarak kullanılan bu bileşiğin düşük miktarları, bitki savunma sisteminin aktive edilmesine pozitif bir etki göstermekte iken, antioksidan enzim aktivitesinin yeterince aktive edilemediği veya yetersiz kaldığı durumlarda hücrede yüksek miktarlarda bulunduğu zaman dokularda oksidatif hasarlara yani strese neden olmaktadır [28]. Diğer bir ROT molekülü olan O₂⁻ oldukça reaktif olup lipidlerin yanı sıra diğer biyokimyasal bileşenlerin de oksidasyonuna sebep olur. Bu molekülün artışı önemli hücre hasarlarına neden olmaktadır [5]. Çalışmamızın sonuçlarına göre; NO uygulaması ile artan antioksidan enzim aktivitesinin, bitki büyümesiyle birlikte üretimi artan ve H₂O₂ ile O₂⁻ ‘yi de içeren ROT miktarlarını önemli derecede azaltarak, özellikle H₂O₂’ nun bitki savunma sisteminin uyarılmasındaki sinyal görevini aktive etmesiyle bitki büyüme hızının devamlılığının sağlandığını gösterici nitelikte olmuştur.

Tablo 1. Mısır yapraklarının biyokimyasal parametreleri üzerine farklı SNP konsantrasyonlarının etkisi

Bitki grupları	H ₂ O ₂ miktarı (ng.g ⁻¹)	O ₂ ⁻ miktarı (ng.g ⁻¹)	MDA miktarı (nmol.g ⁻¹)	SOD aktivitesi (EU.g ⁻¹)	POD aktivitesi (EU.g ⁻¹)
Kontrol	47.3 ± 1.78 ^a	5.92 ± 0.062 ^b	1.6 ± 1.09 ^a	110 ± 2.98 ^c	3320 ± 41.8 ^c
0.1 µM SNP	42.3 ± 1.67 ^c	5.12 ± 0.043 ^c	1.4 ± 0.98 ^b	144 ± 3.6 ^{ab}	3210 ± 37.5 ^c
1 µM SNP	42.1 ± 1.04 ^c	4.94 ± 0.071 ^d	1.2 ± 0.85 ^c	140 ± 3.2 ^{ab}	5160 ± 53.1 ^b
100 µM SNP	43.1 ± 1.99 ^b	4.54 ± 0.086 ^a	1.4 ± 0.77 ^b	124 ± 2.6 ^b	6940 ± 43.2 ^a

Mevcut araştırma sonuçları, SNP uygulaması sonrasında mısır bitkilerinin kök ve yapraklarında ki MDA içeriklerinde önemli azalmaların meydana geldiğini göstermiştir. Mısır bitkilerinde en düşük MDA seviyesi, maksimum antioksidan enzim aktivitelerinin kaydedildiği konsantrasyonda belirlenmiştir. Bu konsantrasyon 1 µM SNP olarak kaydedilmiştir. MDA içeriğindeki azalmalar artan antioksidan enzim aktivitelerine bağlanabilir. Zira en düşük MDA içeriklerinin en yüksek antioksidan aktivitesinin belirlendiği konsantrasyonda belirlenmesi, bu düşüncüyü destekleyici nitelikte olmuştur. Tüm bu sonuçlar göz önüne alındığında, eksojen olarak uygulanan NO'nun lipid peroksidasyon (MDA) seviyesini azaltarak hücre zarlarının hasar görmesini engellediği ve artan bitki büyümesiyle birlikte hücre zarlarının üzerlerine düşen görevleri daha etkin bir şekilde yerine getirebilmesine katkıda bulunduğu sonucu çıkarılabilir. MDA miktarının dolayısıyla lipid peroksidasyon seviyesinin uygulanan NO uygulaması ile azaldığına dair literatürde bazı çalışmalar mevcut olup; yabancı hardal süspansiyon kültüründe [28], salatalıkta [6, 26], kanola da [33], çeltikte [34] MDA miktarının, dışsal uygulanan NO tarafından azaltıldığı belirtilmiştir. Çalışmamızın sonuçları literatür ile iyi bir uyum göstermiştir.

Çalışmamızın sonucunda mısır yapraklarına uygulanan SNP 'nin hem SOD hem de POD enzim aktivitelerini artırdığı belirlenmiştir (Tablo 1). Başlıca antioksidan enzimlerden olan SOD ve POD aktivitelerinin birbirlerine göre dengede bulunması; hücrelerdeki O₂⁻ ve H₂O₂'in kararlı düzeylerde tutularak zararlı etkilerinin önlenmesi açısından büyük önem taşımaktadır [19, 4]. Literatürde eksojen uygulamalarla NO'nun SOD ve POD aktiviteleri üzerine etkisi ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır. Yabancı hardal süspansiyon kültüründe ortama ilave edilen NO'nun SOD aktivitesini artırdığı belirlenmiştir [28]. Aynı şekilde çeltikte [35], salatalıkta [6] NO'nun SOD aktivitesini artırdığı belirtilmiştir. Bununla beraber NO'nun salatalık, çeltik, buğday ve *Hydrilla verticilla* da POD aktivitesini artırdığı tespit edilmiştir [35, 36, 6, 32].

Hem normal hem de stres şartlarında metabolizmada oluşan ROT'ların temizlenmesinde görev alan SOD ve POD enzimlerinin aktive olması, bitkinin oksidatif strese karşı tolerans sağlamasında büyük bir öneme sahiptir. Bu antioksidan enzimlerin tek başına aktive olması, her zaman yeterli olmayabilir. Oksidatif strese tolerans sağlanması, büyüme ve gelişmenin olması içi, hem antioksidan enzimlerin aktive olması, hem de ROT'ların miktarı ve LPO seviyesinin düşmesi beklenir. Çalışmamızda kullandığımız NO konsantrasyonları (0.1, 1 ve 100 µM), SOD ve POD aktivitelerini artırırken, aynı zamanda ROT'ların miktarını ve LPO seviyesini ise düşürmüştür. Antioksidan enzim aktivitelerinde ki artış, olumsuz çevresel faktörler nedeniyle ROT'ların bitki hücrelerinde ortaya çıkışında ki artışa bağlı olarak gerçekleşebilmekte ve bu durum bitkinin değişen çevre şartlarına uyum sağlamasına yardımcı olmaktadır. Bu sebeple, NO'nun antioksidan enzim aktivitelerini uyarıcı etki göstermesi ve çok düşük konsantrasyonlarda bile söz konusu enzim aktivitelerinde önemli artışlara sebep olması oldukça önemlidir. NO'nun antioksidan enzimlerin aktivitelerini artırıcı yöndeki etkisi, bitkinin olumsuz çevre koşullarına karşı direncinin artmasına ve adaptasyonunun kolaylaşmasını sağlayabilir.

Sonuç olarak, NO'nun mısır bitkisinin antioksidan aktivitelerinde artışlar sağlaması ve lipid peroksidasyon seviyesini düşürmesi, stres şartlarında yetişen bitkilerin direncini artırmada kullanılabileceği fikrini ortaya çıkarmaktadır. Bu nedenle çalışmamız, günümüzde artan stres şartlarına karşı bitkilerin direncini artırmak için

NO'nun kullanılabilirliği ile ilgili çalışmalara bir ön ayak olabilir.

Kaynaklar

- [1] Barroso JB., Corpas FJ., Carreras A., Sandalio LM., Valderrama R., Palma JM., Lupianez JA., del Rio LA. Localization of Nitric Oxide Synthase in Plant Peroxisomes. *Journal of Biological Chemistry* 274: 36729-36733, 1999.
- [2] Pedroso MC., Magalhaes JR., Durzan D. A Nitric Oxide Burst Precedes Apoptosis in Angiosperm and Gymnosperm Callus Cells and Foliar Tissues, *Journal of Experimental Botany* 51: 1027-1036, 2000.
- [3] Lamattina C., Garcia-Mata M., Graziano & G. Pagnussat. Nitric oxide: The versatility of an extensive signal molecule. *Annuals Reviews Plant Biology* (54) 109-136, 2003.
- [4] Esim N., Nitrik oksitin mısırdaki (Zea mays) düşük sıcaklık stresi toleransı üzerine etkisi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, (Doktora Tezi), Erzurum, 2011.
- [5] Esim N., Atici Ö. Nitric oxide improves chilling tolerance of maize by affecting apoplastic antioxidative enzymes in leaves. *Plant Growth Regulation* 72 (1):29-38, 2014.
- [6] Shi Q., Ding F., Wang X., Wei M. Exogenous nitric oxide protect cucumber roots against oxidative stress induced by salt stress. *Plant Physiol Biochem* 45: 542-550, 2007.
- [7] Durner J., Klessig DF. Nitric Oxide as a Signal in Plants. *Current Opinion in Plant Biology* (2): 369-374, 1999.
- [8] Neill SJ., Desikan R., Hancock JT. Nitric Oxide Signalling in Plants, *New Phytologist* 159: 1469-1481, 2003.
- [9] Wildt J., Kley D., Rockel A., Rockel P., Segsneider HJ. Emission of NO from several higher plant species. *Journal of Geophysical Research* 102: 5919-5927, 1997.
- [10] Siddiqui MH., Al-Wahaibi MH., Basalah MO. Role of nitric oxide in tolerance of plants to abiotic stress. *Protoplasma* 248(3):447-55, 2010.
- [11] Zottini M., Formentin E., Scattolin M., Carimi F., Schiavo FL., Terzi M. Nitric oxide affects plant mitochondrial functionality in vivo. *FEBS Lett* 515: 75-78, 2002.
- [12] Huaifu F., Shirong G., Yansheng J., Runhuna Z., Juan L. Effects of exogenous nitric oxide on growth, active oxygen species metabolism and photosynthetic characteristics in cucumber seedlings under NaCl stress. *Front. Agric. China*, (1): 308-314, 2007.
- [13] Leshem YY., Haramaty E. The Characterisation and Contrasting Effects of the Nitric Oxide Free Radical in Vegetative Stress and Senescence of Pisum sativum Linn. *Foliage. Journal of Plant Physiology* (148): 258-263, 1996.
- [14] Beligni MV., Lamattina L. Nitric oxide in plants: the history is just beginning. *Plant, Cell and Environment* (24): 259-264, 2001.

- [15] Pedroso MC., Durzan DJ. Effect of Different Gravity Environments on DNA Fragmentation and Cell death in *Kalanchoë* Leaves, *Ann. Bot* 86: 983–994, 2000.
- [16] Xing H., Tan LL., An LZ., Zhao ZG., Wang SM., Zhang CL. Evidence for the involvement of nitric oxide and reactive oxygen species in osmotic stress tolerance of wheat seedlings: Inverse correlation between leaf abscisic acid accumulation and leaf water loss. *Plant Growth Regulation* 42: 61–68, 2004.
- [17] Zhao MG., Chen L., Zhang LL., Zhang WH. Nitric Reductase-Dependent Nitric Oxide Production Is Involved In Cold Acclimation and Freezing Tolerance In *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 151: 755–767, 2009.
- [18] Mittler R., Oxidative Stress, Antioxidants and Stress Tolerance, *Trends Plant Sci.*, 7, 405–410, 2002.
- [19] Halliwell B., Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology* (141): 312–322, 2006.
- [20] Sairam RK., Srivastava GC. Induction of oxidative stress and antioxidant activity by hydrogen peroxide treatment in tolerant and susceptible wheat genotypes. *Biologia Plantarum* 43(3): 381–386, 2000.
- [21] He YL., Liu YL., Cao WX., Huai MF., Xu BG., Huang BG. Effects of salicylic acid on heat tolerance associated with antioxidant metabolism in Kentucky bluegrass. *Crop Science* 45: 988–995, 2005.
- [22] Elstner EF., Heupel A. Formation of hydrogen peroxide by isolated cell walls from horseradish. *Planta* 130: 175–180, 1976.
- [23] Ananieva EA., Alexieva VS., Popova LP. Treatment with salicylic acid decreases the effects of paraquat on photosynthesis. *Journal of Plant Physiology* 159: 685–693, 2002.
- [24] Agarwal S., Pandey V. Antioxidant enzyme responses to NaCl stress in *Cassia angustifolia*. *Biologia Plantarum* 48(4): 555–560, 2004.
- [25] Yee Y., Tam NFY., Wong YS., Lu CY., Growth and physiological responses of two mangrove species (*Bruguira gymnorrhiza* and *Kandelia candel*) to waterlogging. *Environ. Exp. Bot.* 1–13, 2002.
- [26] Li QY., Niu HB., Yin J., Wang MB., Shao HB., Deng DZ., Chen XX., Ren JP., Li YC. Protective role of exogenous nitric oxide against oxidative-stress induced by salt stress in barley (*Hordeum vulgare*). *Colloids and Surfaces B; Biointerfaces* 65: 220–225, 2008.
- [27] Crawford NM., Guo FQ. New Insights into Nitric Oxide Metabolism and Regulatory Functions. *Trends in Plant Science* 10: 195–200, 2005.
- [28] Liu Y., Jiang H., Zhao Z., An L. Nitric oxide synthesis like activity-dependent nitric oxide production protects against chilling induced oxidative damage in *Chorispora bungeana* suspension cultured cells. *Plant physiology and Biochemistry* 48: 936–944, 2010.
- [29] Hsu YT., Kao CH. Cadmium toxicity is reduced by nitric oxide in rice leaves. *Plant Growth Regulation* 42: 227–238, 2004.
- [30] Vital SA., Fowler RW., Virgen A., Gossett DR., Banks SW., Rodriguez J. Opposing Roles for Superoxide and Nitric Oxide in the NaCl-Induced Up-Regulation of Antioxidant Enzyme Activity In Cotton Callus Tissue. *Environ Exp Bot* 62: 60–68, 2008.
- [31] Chen F., Wang F., Sun H., Cai Y., Mao W., Zhang G., Vincze E., Wu F. Genotype- dependent effect of exogenous nitric oxide on Cd-induced changes in antioxidative metabolism, ultra structure, and photosynthetic performance in barley seedlings (*Hordeum vulgare*). *Journal of Plant Growth Regulation* 29: 394–408, 2010.
- [32] Wang C., WeiLi S., Wang L. Nitric oxide supplementation alleviates ammonium toxicity in the submerged macrophyte *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74: 67–73, 2011.
- [33] Kazemi N., Khavari-Nejad AR., Fahimi H., Saadatmand S., Nejad-Sattari T. Effects of exogenous salicylic acid and nitric oxide on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in leaves of *Brassica napus* L. under nickel stress. *Scientia Horticultura*, 126, 402–407, 2010.
- [34] Singh PH., Kaur S., Daizy R., Batish Ved P., Sharma N., Ravinder K. Nitric oxide alleviates arsenic toxicity by reducing oxidative damage in the roots of *Oryza sativa* (rice). *Nitric Oxide* 20: 289–297, 2009.
- [35] Uchida A., Jagendorf AT., Hibino T., Takabe T., Takabe T. Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice. *Plant Sci* 163: 515–523, 2002.
- [36] Yu CC., Hung KT., Kao CH. Nitric oxide reduces Cu toxicity and Cu-induced NH₄⁺ accumulation in rice leaves. *Journal of Plant Physiology* (162): 1319–1330, 2005.