



Available at: www.journal.weedturk.com

Turkish Journal of Weed Science

© Turkish Weed Science Society



Araştırma Makalesi/ Research Article

Kızılback (Amaranthus retroflexus L.) Bitkisinde Kuraklık Toleransı ve Herbisit Direnci Arasındaki İlişkide Bazı Antioksidan Enzimlerin Rolünün Araştırılması

Giray KURCAN¹, Sevgi DONAT¹, Okan ACAR*¹

¹Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Çanakkale-TÜRKİYE

*Sorumlu yazar: ocacar@comu.edu.tr

ÖZET

Abiyotik stresler bitkide morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler değişiklikler yoluyla ürün verimini düşürür. Kuraklık stresi, hücredeki reaktif oksijen türlerinin (ROT) konsantrasyonlarını artırarak hücredeki fosfolipidlere, proteinlere ve nükleik asitlere zarar verir, klorozla sonuçlanır. Yazlık bir yabancı ot olan kızılback (*Amaranthus retroflexus* L.) kuraklığa dayanıklı, tek yıllık ve otsu bir bitkidir. Yol kenarları, ekili alanlar ve meyve bahçelerinde yaygındır. 2,4-D, dicamba, mecoprop, bromoxynil, glifosat gibi herbisitler *A. retroflexus* üzerinde etkilidir. Ancak birçok çalışma bu türde herbisit direncinin geliştiğini bildirmektedir. Bu araştırma, kısa süreli kuraklık ve glyphosate'ın *A. retroflexus*'ta neden olduğu bazı fizyolojik ve biyokimyasal yanıtlara odaklanmıştır. Bu amaçla, 21 günlük *A. retroflexus* fidelerinin yaprak dokusunda toplam klorofil, toplam protein, lipid peroksidasyon (MDA), H₂O₂ (Hidrojen peroksit) miktarı, hücre zarı geçirgenliği (elektrolit sızıntısı), APX (Askorbat peroksidaz) ve GR (Glutasyon redüktaz) aktiviteleri belirlenmiştir. Kuraklık stresi ve glifosat *A. retroflexus*'ta H₂O₂ miktarını ve hücre zarı geçirgenliğini arttırmış ve kloroza neden olmuştur. Sonuçlarımız *A. retroflexus*'a glifosat uygulaması sonrasında yüksek ROT zararı ve düşük ROT temizleme aktivitesi olduğunu göstermiştir. Bu, antioksidan kapasite temelinde *A. retroflexus*'un glyphosate'a duyarlı olduğunu işaret etmektedir. Ayrıca bu araştırma ile *A. retroflexus*'ta kuraklık ve glyphosate'ın APX ve GR aktivitelerini nasıl etkilediği ilk defa gösterilmektedir. Sonuçta, *A. retroflexus*'ta oksidatif stresin kısa süreli kuraklığa kıyasla glifosat ile daha çok zarara neden olduğu saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Amaranthus retroflexus*, glifosat, Kuraklık stresi, APX, GR

Investigation of the Role of Some Antioxidant Enzymes in the Relationship Between Drought Tolerance and Herbicide Resistance in Red Root Amaranth (*Amaranthus retroflexus* L.)

ABSTRACT

Abiotic stresses reduce crop yield of plants via morphological, physiological, biochemical, and molecular changes. Drought stress increases reactive oxygen species (ROS) concentrations in the cell, damaging to phospholipids, proteins, and nucleic acids and resulting in chlorosis. Red root amaranth (*Amaranthus retroflexus* L.) is drought-resistant, summer annual, and herbaceous plant. It is common along roadsides, cultivated areas, and orchards. Herbicides such as 2,4-D, dicamba, mecoprop, bromoxynil, glyphosate are effective on *A. retroflexus* but many studies report the development of herbicide resistance in this species. In this study, it has been focused on determining some physiological and biochemical responses of *A. retroflexus* to short-term drought stress and glyphosate. For this purpose, total chlorophyll, total protein, lipid peroxidation (MDA), H₂O₂ (Hydrogen peroxide) amount, cell membrane permeability (electrolyte leakage), APX (Ascorbate peroxidase), and GR (Glutasyon reductase) activities were determined in leaf tissue of 21-day-old *A. retroflexus* seedlings. Drought stress and glyphosate treatments increased H₂O₂ and cell membrane permeability and resulting chlorosis in *A. retroflexus*. Our results showed that *A. retroflexus* had high ROS damage and low ROS scavenging activity after glyphosate treatment. This indicates that *A. retroflexus* is sensitive to glyphosate based on antioxidant capacity. In addition, this research shows for the first time how short-term drought stress and glyphosate affect APX and GR activities in *A. retroflexus*. As a result, it was determined that oxidative stress causes more damage with glyphosate compared to short-term drought in *A. retroflexus*.

Key Words: *Amaranthus retroflexus*, Glyphosate, Drought stress, APX, GR

GİRİŞ

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

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

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

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

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

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

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

Bu araştırmada, bir tarla yabancı otu olan *A. retroflexus*'ta kuraklık toleransında ve herbisit direncinde antioksidan savunma sistemi enzimlerinden APX ile GR'nin etkinliğinin belirlenmesi ve kuraklık stresi potansiyel toleransın herbisit direnci ile ilişkili olup olmayacağı araştırılmıştır. Buna göre; kuraklık stresi ve herbisit uygulamasıyla *A. retroflexus*'ta pigment miktarı, protein miktarı, H₂O₂ miktarı, APX ve GR aktiviteleri belirlenmiştir. Bu türde, kuraklık stresi ve glifosat ile ilişkili olarak APX ve GR aktiviteleri ilk defa sunulmaktadır.

MATERYAL VE YÖNTEM

1. Materyal

Amaranthus retroflexus L. *Amaranthaceae* familyasına ait olup tek yıllık otsu ve yabancı ot olarak tanımlanmış bir bitkidir (Kadioğlu ve ark., 2015). Bu araştırmada kullanılan *Amaranthus retroflexus* tohumları 2017 yılında Adana il merkezindeki tarım arazilerindeki 5 farklı populasyondan toplanmıştır.

1.1. Bitki Materyalinin Yetiştirilmesi

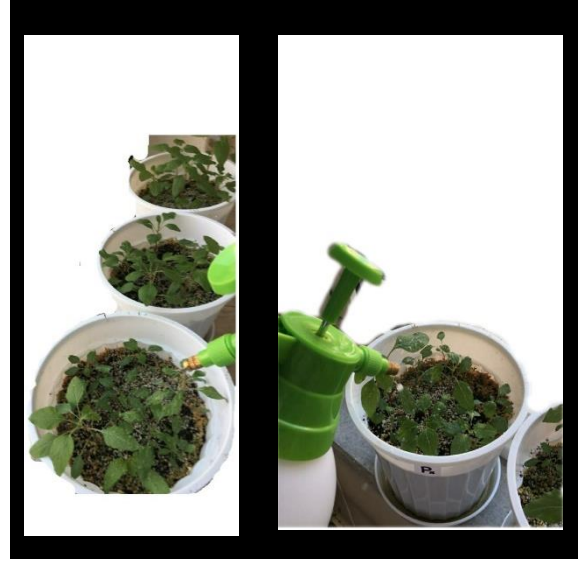
A. retroflexus tohumları %0,5'lik sodyum hipoklorit çözeltisi içinde 5 dk bekletilip, steril saf su ile 3 kez 2.5 dk yıkanarak sterilize edilmişlerdir. Sterilize tohumlar çimlenme için içerisinde nemli kurutma kâğıtları bulunan petri kaplarında bekletilmişlerdir. Çimlenen tohumlar, içerisinde torf bulunan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

2. Yöntem

2.1. Kuraklık Stresi ve Herbisit Uygulamaları

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

Kuraklık stresi 7 gün su kıtlığı şeklinde uygulanmıştır. Araştırmada kullanılan ticari herbisitinin etken maddesi Glifosat izopropilamin olup önerilen dozu 300 ml/da'dır. Buna göre önerilen dozu 300 ml/da (X) ve önerilen dozun 2 katı 600 ml/da (2X) olacak şekilde hazırlanan herbisit 2 L hacimli mekanik basınçlı püskürtücü yardımıyla uygulama gruplarına dekara 20 L su olacak şekilde püskürtülmüştür. Kuraklık ve herbisit uygulamasını takiben 1. ve 4. günlerde bitkilerden yaprak doku örnekleri alınmış ve bu örnekler analizlerde kullanılmışlardır.



Şekil 1. 21 günlük *Amaranthus retroflexus* L. fidelerine herbisit uygulaması

2.2 Bitki Ölçümleri ve Analiz Yöntemleri

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

2.2.1 Toplam Klorofil Analizi

Toplam klorofil miktarının belirlenmesi klorofil metre cihazıyla (Minolta SPAD-502, Osaka, Japonya) gerçekleştirilmiştir (Peryea ve Kammereck, 1997). Bu amaçla, hasat günlerinde her bir gruptan 3 farklı fideden gelişmesini tamamlamış genç yapraklardan, 15 tekerrürlü olarak ölçüm yapılmıştır.

2.2.2 Toplam Protein Analizi

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

2.3 Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

2.3.1 Askorbat Peroksidaz (APX; EC 1.11.1.11) Aktivitesi

Yaprak dokuları 1 ml 2 mM askorbik asit, 1 mM EDTA₂.2H₂O içeren 50 mM Na-P tamponu (pH 7,8) ile homojenize edildikten sonra süpernatantlar analizde kullanılmıştır (Nakano ve Asada, 1981) (ε = 2,8 mM⁻¹ cm⁻¹). Bir enzim ünitesi, dakikada okside olan 1 µmol ml⁻¹ askorbat miktarı olarak hesaplanmıştır.

2.3.2 Glutasyon Redüktaz (GR; EC 1.6.4.2) Aktivitesi

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

2.3.3 Lipit Peroksidasyonun (MDA Miktarının) Belirlenmesi

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

2.3.4 Hücre Zarı Geçirgenliği (Elektrolit Sızıntısı)

Dionisio-Sese ve Tobita (1998)' ya göre hücre zarı geçirgenliği belirlenmiştir. Bunun için 100 mg yaprak örneği 10 mL deiyonize su içeren falkon tüplerine transfer edilerek 32 °C' lik bir su banyosunda 2 saat inkübe edilmiştir. Ortamın elektrik iletkenliği EC metre ile ölçülüp (EC1), daha sonra örnekler 121 °C' de 20 dk boyunca otoklavlanmıştır. Oda sıcaklığında 25 °C'ye kadar soğutulmuş bu ortamdaki elektrik iletkenliği ölçülüp (EC2), elektrolit sızıntısı (ES) aşağıdaki formüle uygulanarak hesaplanmıştır. Ölçümler sırasında İsolab masa tipi EC metre cihazı kullanılmıştır.

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

2.3.5 Hidrojen peroksit (H₂O₂)

Bitki dokusu (0,1 g), 3 ml H₂SO₄ ve soğuk aseton karışımı homojenizasyon tamponu ile homojenize edilip santrifüjlenmiştir. Süpernatantlar H₂SO₄, saf su, ferrus amonyum sülfat, ksenol orange, sorbitol ve ethanol içeren (e-FOX) okuma tamponu ile 550-800 nm'de suya (kör) karşı okunmuştur ($\mu\text{g/ml}$) (Cheeseman, 2006).

2.3.6 İstatistik Analiz:

İstatistikler SPSS 22.0 kullanılarak tek yönlü varyans analizi (One Way ANOVA) ile değerlendirilmiştir (p<0.05 düzeyindedir).

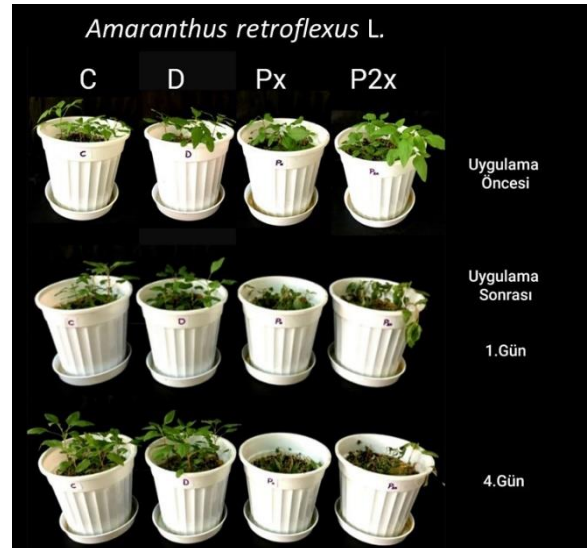
BULGULAR

Bir tarla yabancı otu olan *A. retroflexus*'ta kuraklık toleransında ve glifosat uygulamasında antioksidan savunma sisteminin iki enzimi olan APX ile GR aktivitelerinin belirlenmesi ve kuraklık stresine potansiyel toleransın herbisit uygulamasından nasıl etkilendiği araştırılmıştır. Bunlara ek olarak toplam klorofil miktarı, H₂O₂ miktarı, toplam protein miktarı, lipit peroksidasyon ve hücre zarı geçirgenliği analizleri de gerçekleştirilmiştir.

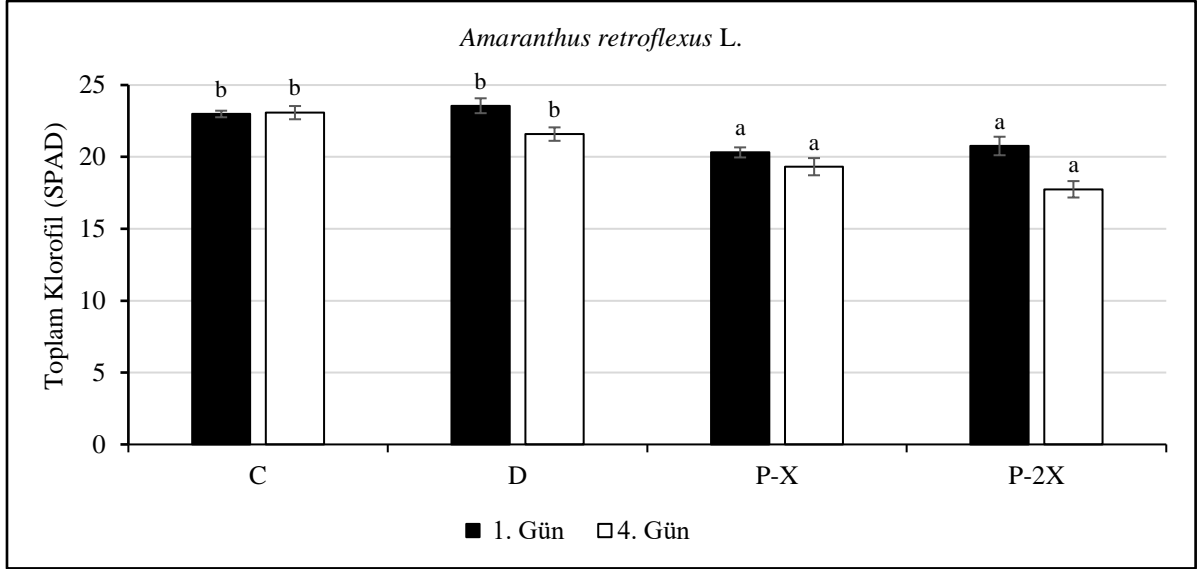
Bulgularımız genel olarak *A. retroflexus*'un kuraklık uygulamasına kıyasla herbisit uygulamalarından daha olumsuz etkilendiğini ve kısa sürede öldüklerini göstermiştir (Şekil 2). Bu nedenle ikinci örnekleme günü olarak 4. günde örnekleme yapılmıştır.

1. Toplam Klorofil İçeriği

Toplam klorofil içeriği 1. günde kontrole kıyasla kuraklık (D) uygulaması ile %3 artarken, önerilen doz (P-X) ve önerilen dozun iki katı (P-2X) uygulamaları ile sırasıyla %12 ve %1 azalmıştır. Denemenin 4. gününde ise D, P-X ve P-2X uygulamaları klorofil içeriğini kontrole kıyasla sırasıyla %7, %16 ve %23 azaltmıştır (Şekil 2, Şekil 3). Sonuçlarımıza göre, deneme başlangıcında kuraklık uygulaması ile *A. retroflexus* L.'ta kloroz meydana gelmemiştir, fakat deneme sonunda tüm uygulamalar ile toplam klorofil içeriği azalmıştır.



Şekil 2. 21 günlük *Amaranthus retroflexus* L.'ta kuraklık ve herbisit uygulamalarının uygulama öncesi ve sonrası etkisi (C: Kontrol, D: Kuraklık, P-X: Önerilen doz herbisit, P-2X: Önerilen dozun iki katı herbisit).

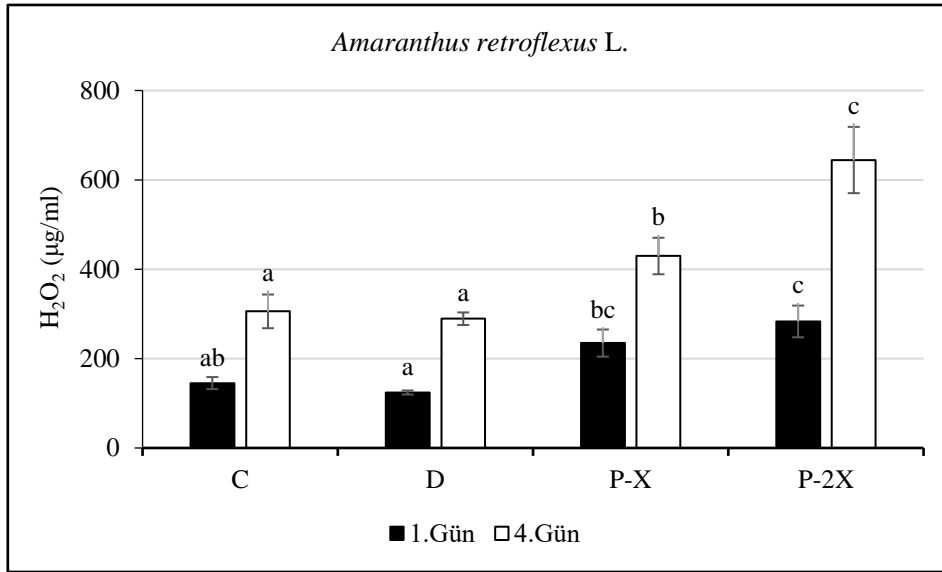


Şekil 3. *Amaranthus retroflexus L.*'ta toplam klorofil içeriğinde meydana gelen değişimler (SPAD) (C: Kontrol, D: Kuraklık, P-X: Önerilen doz herbisit, P-2X: Önerilen dozun iki katı herbisit).

2. Hidrojen Peroksit Miktarı (H_2O_2)

A. retroflexus L.'un H_2O_2 miktarı denemenin 1. gününde kontrole kıyasla D uygulaması ile %15 azalmıştır. Bununla birlikte P-X ve P-2X uygulamaları ile kontrole kıyasla sırasıyla 3 kat ve 3.5 kat artmıştır.

Denemenin 4. gününde ise kuraklık uygulaması ile H_2O_2 miktarı %5 azalırken, çarpıcı bir şekilde P-X uygulaması ile %40, P-2X uygulaması ile ise 2 kat artmıştır (Şekil 4). Sonuçlar kuraklığa kıyasla P-X ve P-2X uygulamaları ile H_2O_2 miktarının deneme sonunda daha fazla arttığına işaret etmektedir.

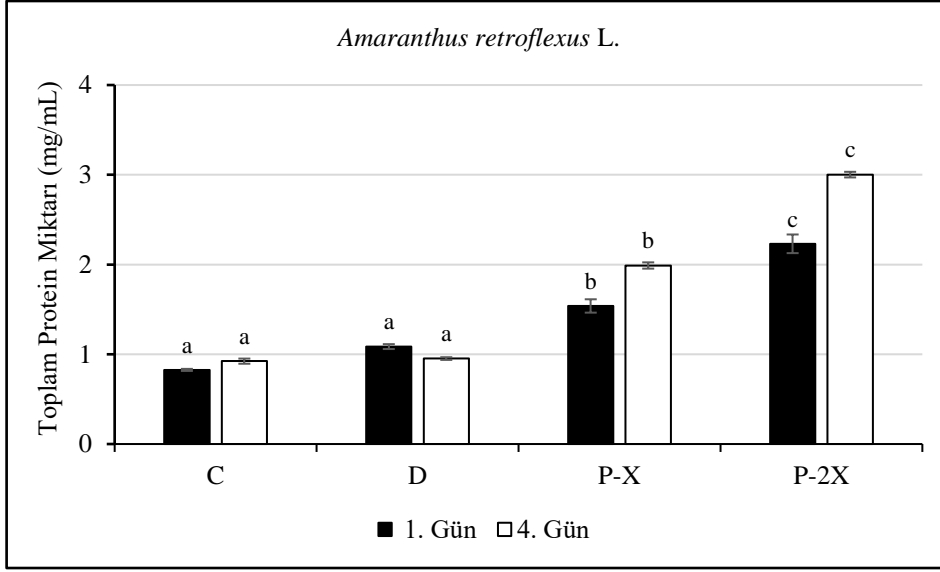


Şekil 4. *Amaranthus retroflexus L.* türünün H_2O_2 miktarında ($\mu\text{g/ml}$) meydana gelen değişimler (C: Kontrol, D: Kuraklık, P-X: Önerilen doz herbisit, P-2X: Önerilen dozun iki katı herbisit).

3. Toplam Protein Miktarı

Toplam protein 1. günde kontrole kıyasla tüm uygulamalar ile artmıştır. Bu artışlar D, P-X ve P-2X uygulamaları ile kontrole kıyasla sırasıyla 1, 1.8 kat ve 2.6 kat olarak belirlenmiştir. Deneme sonunda tüm

uygulamalar ile toplam protein miktarı artarken özellikle P-X ve P-2X gruplarında kontrole kıyasla sırasıyla 2 kat ve 3 kat artmıştır (Şekil 5). Sonuçlar toplam protein miktarının kuraklık dışında herbisit uygulaması sonucu her iki hasat gününde de arttığını göstermektedir.

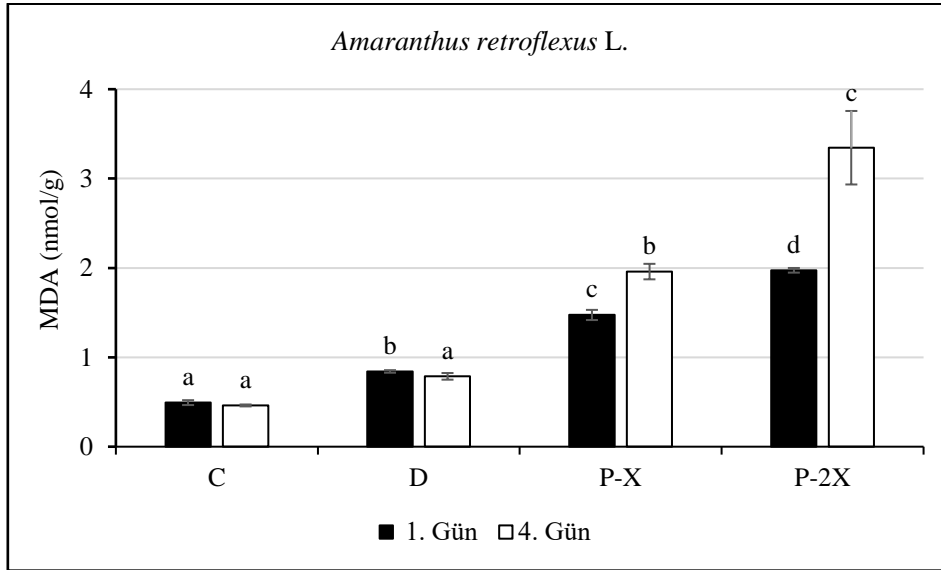


Şekil 5. *Amaranthus retroflexus L.*'ta toplam protein miktarında meydana gelen değişimler (C: Kontrol, D: Kuraklık, P-X: Önerilen doz herbisit, P-2X: Önerilen dozun iki katı herbisit).

4. Lipit Peroksidasyon (MDA)

Malondialdehit (MDA) miktarı 1. günde kuraklık uygulaması ile kontrole kıyasla D, P-X, P-2X uygulamaları ile sırasıyla 1.8, 3 ve 4 kat artmıştır. Deneme sonunda tüm uygulamalar ile artmıştır. Bu

artışlar özellikle P-X ve P-2X uygulamaları ile sırasıyla 4.2 ve 7.2 kat olarak gerçekleşmiştir (Şekil 6). Buna göre, deneme boyunca MDA kuraklığa kıyasla P-X ve P-2X uygulamalarıyla daha çok artmıştır.

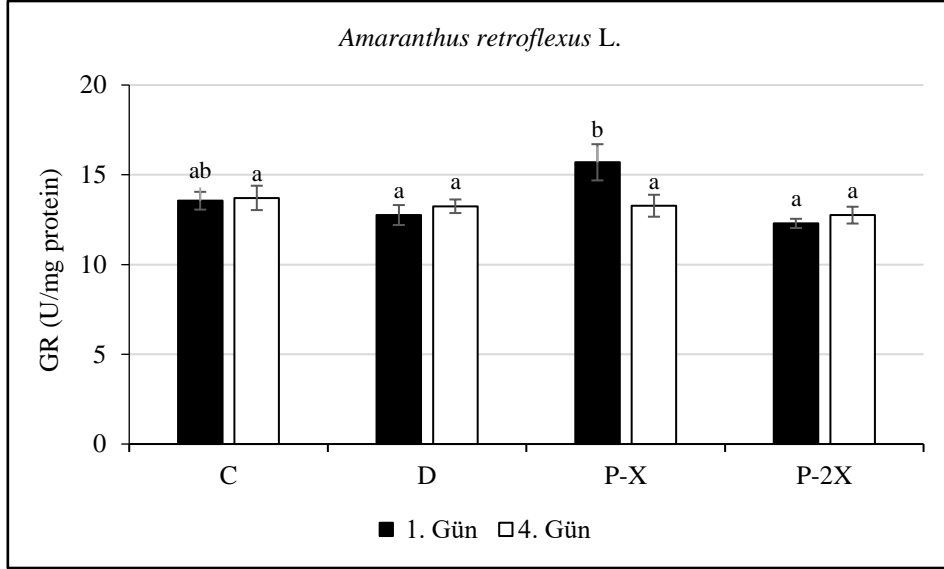


Şekil 6. *Amaranthus retroflexus L.* türünün MDA miktarında meydana gelen değişimler (nmol/gr) (C: Kontrol, D: Kuraklık, P-X: Önerilen doz herbisit, P-2X: Önerilen dozun iki katı herbisit).

5. Glutasyon Redüktaz (GR) Aktivitesi

A. retroflexus türünde GR aktivitesi kuraklık uygulamasıyla kontrole kıyasla 1. günde %6 azalmıştır. Fakat P-X uygulaması ile aktivite %15 artmıştır. Uygulama dozu iki katına çıkarıldığında ise aktivite %9 oranında gerilemiştir. Uygulamanın 4.

gününde kontrole kıyasla D ve P-X uygulamalarında %3 azalma gerçekleşirken, P-2X uygulamasında ise bu azalma %7 olmuştur (Şekil 7). Sonuçlar deneme başlangıcında P-X uygulaması ile GR aktivitesinin arttığını ancak diğer tüm uygulamalar ile deneme sonunda değişmediğini göstermiştir.

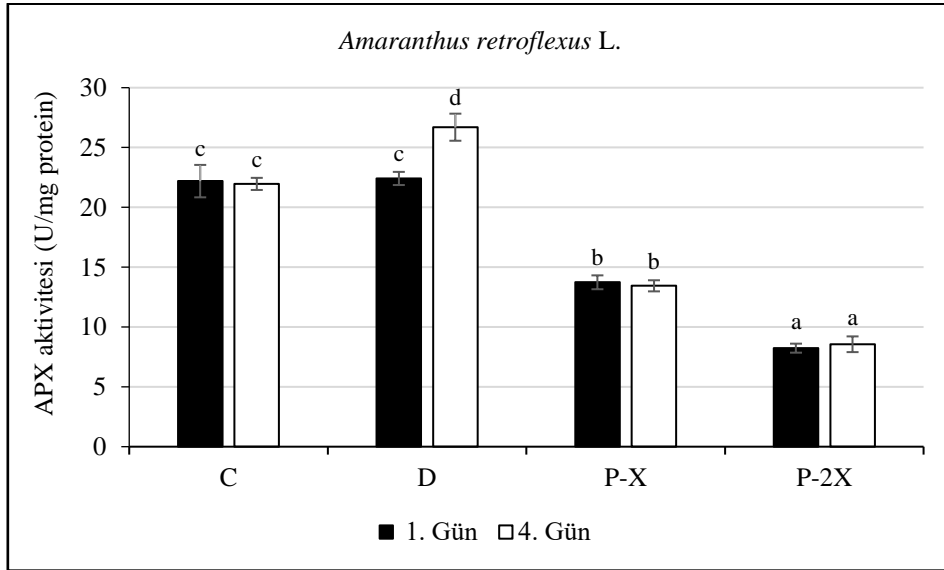


Şekil 7. *Amaranthus retroflexus* L.'de GR aktivitesinde meydana gelen değişimler (U/mg protein) (C: Kontrol, D: Kuraklık, P-X: Önerilen doz herbisit, P-2X: Önerilen dozun iki katı herbisit).

6. Askorbat Peroksidaz (APX) Aktivitesi

APX aktivitesi 1. günde P-X ve P-2X uygulamaları ile kontrole kıyasla sırasıyla %38 ve %63 oranında azalmıştır. Denemenin 4. gününde ise D uygulaması ile %22 artmış, P-X ve P-2X uygulaması ile kontrole

kıyasla sırasıyla %39 ve %61 oranında azalmıştır (Şekil 8). Sonuçlarımız deneme sonunda kuraklıkla artan APX aktivitesine zıt şekilde, artan glifosat dozuna paralel azalan APX aktivitelerine işaret etmektedir.

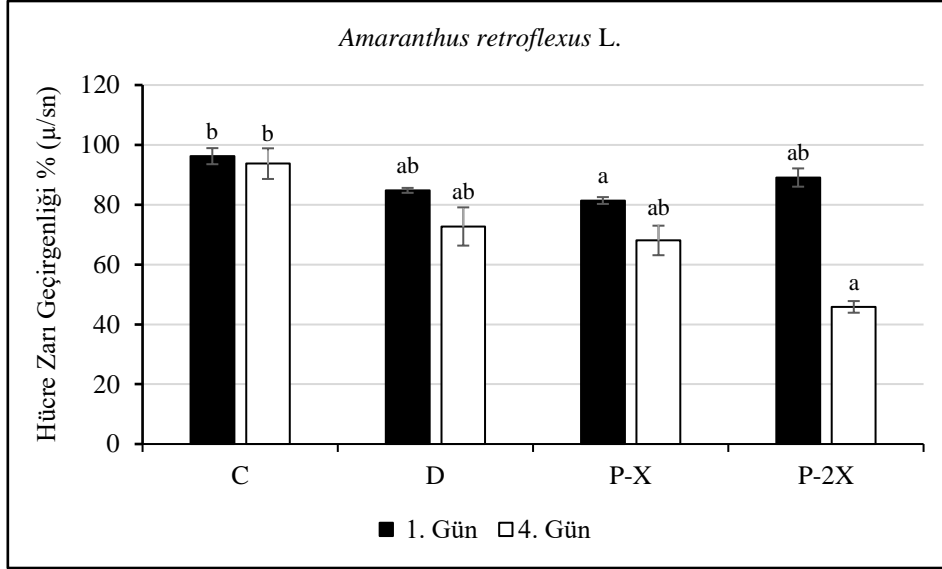


Şekil 8. *Amaranthus retroflexus* L.'ta APX aktivitesinde meydana gelen değişimler (U/mg protein) (C: Kontrol, D: Kuraklık, P-X: Önerilen doz herbisit, P-2X: Önerilen dozun iki katı herbisit).

7. Hücre Zarı Geçirgenliği (HZG)

Elektrolit sızıntısının bir göstergesi olan HZG *A. retroflexus*'ta D, P-X ve P-2X uygulamaları ile kontrole kıyasla sırasıyla %12, %15 ve %7 azalmıştır.

Denemenin 4. gününde ise HZG kontrole kıyasla D, P-X ve P-2X uygulamaları ile sırasıyla %22, %27 ve %51 azalmıştır (Şekil 9). Buna göre, deneme sonunda özellikle artan herbisit dozlarına paralel olarak HZG'de dramatik azalışlar belirlenmiştir.



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

TARTIŞMA

Yabancı otlar tarım alanlarında çok yaygın bir problem olup ekonomik zarar eşiğine ulaşmış yabancı ot türleri ile mücadele edilmesi gereklidir. Bununla birlikte yabancı otlar sulama/yağış rejimindeki değişimlere bağlı kuraklık stresiyle de sürekli mücadele etmektedirler. Ürün çeşidine bağlı olarak, tarım alanlarının sulama rejimi değişse de tarlada ve civarında yabancı ot ile mücadelede herbisitler çok yaygın bir kullanıma sahiptirler. Güney Amerika kökenli bir bitki olan *Amaranthus* cinsi Türkiye'deki bazı tarım alanları için sorun oluşturmaktadır. Bu araştırma, *A. retroflexus*'un yaygın bir herbisit olan glifosata ve kısa süreli kuraklık stresi yanıtta fizyolojik ve biyokimyasal tepkilerini belirlemeye odaklanmıştır. Bu amaçla, laboratuvar koşullarında yetiştirilen 21 günlük *A. retroflexus* fidelerinin yaprak dokusunda toplam klorofil, toplam protein, lipid peroksidasyon (MDA), H₂O₂ miktarı, hücre zarı geçirgenliği (elektrolit sızıntısı), APX ve GR aktiviteleri belirlenmiştir.

Herbisitlerin bir kısmı bitkiler için fotosentetik verimin temel bileşeni olan kloroplastları hedef almaktadır. Benzer şekilde kuraklık stresi de kloroplastlarda herbisitler gibi metabolik karmaşaya neden olarak, özellikle ROT konsantrasyonlarında artışa bağlı lipid peroksidasyon zar yapısını bozar ve kloroz başlar. Farklı *Amaranthus* türlerinde kuraklığa bağlı kloroz gelişimi rapor edilmiştir. Buna göre *A. tricolor*'da kuraklık stresi altında pigment miktarının

azaldığı (Sarker ve Oba, 2018) ve kurağa dayanıklı biyotipte kurağa duyarlı biyotipe kıyasla daha az kloroz geliştiği saptanmıştır (Sarker ve ark., 2018). Ek olarak, *A. cruentus*'ta nem stresinin klorofil içeriğini azalttığı gösterilmiştir (Masekoa ve ark., 2019). Benzer şekilde, araştırmamızda *A. retroflexus*'ta kuraklık ile klorofil içeriği azalmıştır. Ancak bu azalma glifosata uygulaması sonucunda çok daha dramatik şekilde gerçekleşmiştir. *A. retroflexus*'ta kuraklığa kıyasla glifosatin daha fazla kloroz neden olması glifosatin etki mekanizmasıyla ilişkili olabilir. Çünkü glifosata içeren herbisitler bitkilere ve bazı mikroorganizmalara özgü bir metabolik yolak olan şikimik asit yolağındaki 5-enol pürüvil şikimat-3-fosfat (EPSP) enzimini inhibe eder. Bu ise protein sentezi ve büyüme için kritik aromatik amino asitlerde azalmaya yol açar. Sonuçta bitkide bodur büyüme, kloroz ve doku ölümü meydana gelir (Tomlin, 2006; Lawrence, 2002; Franz ve ark., 1997; WHO, 1996).

Reaktif oksijen türleri, bitkilerin biyotik ve abiyotik streslere maruz kalması sonucunda doğal konsantrasyonlarının üzerine çıkarak lipidler, proteinler ve karbonhidratlarla reaksiyona girebilir. Oksidatif stres sonucunda hücre zarlarında ve organellerde yapısal zarar meydana gelir (Özkur ve ark., 2009). Süperoksit radikalının (O₂⁻) su ile reaksiyonu sonucunda oluşan ve diğer ROT'lara kıyasla daha kararlı bir molekül olan H₂O₂, başta kloroplast ve mitokondri olmak üzere birçok organelde ve hücre zarında bulunur (Asada, 1999). Sudan karaya çıkışlarından bu yana bitkiler için majör bir stres olan kuraklık nedeniyle H₂O₂ ve diğer

ROT'ların miktarı artmaktadır (Batra ve ark., 2014). *A. tricolor*'da kuraklıkla artan H₂O₂ seviyelerinin (Sarker ve Oba, 2018), kurağa duyarlı biyotipte dramatik artışlara neden olurken kurağa dayanıklı biyotipte değişmediği gösterilmiştir (Sarker ve ark., 2018). Her ne kadar araştırmamızda *A. retroflexus*'ta kısa süreli kuraklık H₂O₂ seviyelerini arttırmamış olsa da glifosat uygulaması artan doza bağlı olarak H₂O₂ miktarını şiddetli şekilde arttırmıştır.

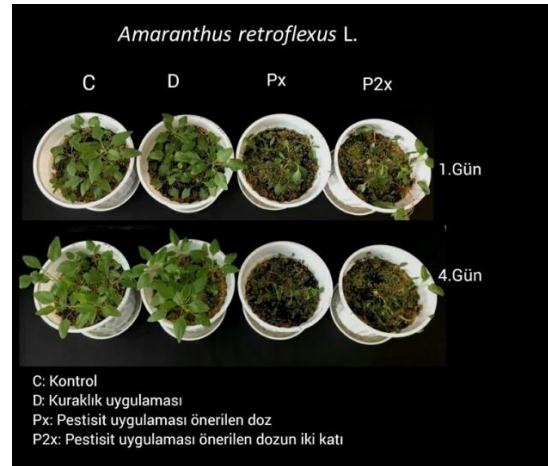
Bitkilerde artan ROT konsantrasyonları nedeniyle oksidatif stres meydana gelmektedir (Asada, 1999). Oksidatif stres özellikle hücre ve organel zarlarındaki lipitlerin oksidasyonuna neden olur. Sonuçta lipit peroksidasyon hücre ve/veya organel zarlarına zarar vererek hücrel ve hücre altı seviyede hasara yol açar (Elstner ve Osswald, 1994). Lipit peroksidasyonun bir ölçüsü olarak kullanılan MDA miktarının *A. tricolor*'da kuraklık ile arttığı rapor edilmiştir (Sarker ve Oba, 2018). Buna zıt şekilde, araştırmamızda *A. retroflexus*'ta kısa süreli kuraklığın MDA miktarını değiştirmedeği belirlenmiştir. Glifosat uygulamaları ise aynı süre içerisinde artan H₂O₂ miktarına uyumlu şekilde MDA miktarlarını arttırmıştır.

Askorbat-Glutatyon döngüsü enzimleri ROT detoksifikasyonunda etkilidir (Edreva, 2005). Bu döngüdeki APX ve GR'nin SOD ve CAT gibi diğer antioksidan enzimler ile kuraklığa maruz kalan *A. tricolor*'da kalıcı ve dramatik artışa sahip olduğu gösterilmiştir. Bu artış aynı zamanda askorbat ve glutatyon içeriğindeki artışla da desteklenmektedir (Sarker ve ark., 2018). Sonuçlarımız, *A. retroflexus*'ta kuraklık ile APX aktivitesinin deneme sonunda arttığını ancak GR aktivitesinin buna eşlik etmediğini göstermiştir. Her ne kadar kısa süreli kuraklık (Zhang ve ark., 2020) veya uzun süreli kuraklık (Avashthi ve ark., 2020) çoğu bitkide her iki enzim aktivitesini artırıyor olsa da *A. retroflexus* için GR aktivitesinde elde ettiğimiz sonuçlar, bunun kuraklık stresinin kısa süreli olmasından kaynaklandığını düşündürmektedir. Diğer yandan, deneme sonunda glifosat uygulaması APX aktivitesini dramatik şekilde azaltırken, GR aktivitesinde ise anlamlı bir değişim saptanmamıştır. Glifosat içeren herbisitlerin etki mekanizması temelinde, APX aktivitesinde kloroz kaynaklı bir düşüş beklenebilir. Ayrıca artan H₂O₂ ve HZG seviyeleri de bunu desteklemektedir.

Total bir herbisit olan glifosatın uygulandığı kültür alanlarında bulunan tüm yabancı otları öldürdüğü bilinmektedir. Bu durum *Amaranthus* biyotiplerinde iki nesil boyunca glifosata duyarlılığı azaltmaktadır (Vieira ve ark., 2018). Yüksek tohum üretme potansiyeline sahip *Amaranthus* türlerinde

(Kadıoğlu ve ark., 2015), glifosata dirençli biyotipler gelişmekte ve buna neden olan mutasyonların belirlenmesine halen devam edilmektedir (Huang ve ark., 2019; Murphy ve ark., 2019). Araştırmamızda glifosat uygulanmış bitkilerin gelişimi durmuştur. Kuraklık uygulaması ise glifosata kıyasla daha az zararlı etki göstermiştir (Şekil 10). *A. caudatus*'un kuraklığa adaptif özellikleri olduğu ve su kullanım etkenliğinin iyi olduğu rapor edilmiştir (Valdayskikh ve ark., 2019). Bir başka araştırmada ise artan sulama periyotları ve stres varlığının *A. retroflexus*'u çok daha başarılı ve çok daha rekabetçi, yaptığı vurgulanmıştır (Asadi ve ark., 2019). Bu durum, *A. retroflexus*'un uzun süreli kuraklıktan nasıl etkilendiğinin de araştırılması gerektiğine işaret etmektedir.

Sonuç olarak, *A. retroflexus*'ta kuraklık stresi ve glifosat uygulamaları kloroza neden olmuşlardır. Buna artan H₂O₂ ve HZG seviyeleri eşlik etmiştir. *A. palmeri*'nin glifosata dirençli biyotiplerinde düşük ROT zararı ve yüksek ROT temizleme aktivitesi rapor edilmiştir (Maroli ve ark., 2015). Buna zıt şekilde, sonuçlarımız *A. retroflexus*'a glifosat uygulaması sonrasında yüksek ROT zararı ve düşük ROT temizleme aktivitesi olduğunu göstermiştir. Antioksidan kapasite bağlamında, *A. retroflexus*'un glifosata duyarlı olduğu söylenebilir. Ayrıca bu araştırma ile kuraklık ve glifosatın *A. retroflexus*'ta etkisi ile APX ve GR aktivitesini nasıl etkilediği ayrı ayrı gösterilmiştir. Sonuçta, *A. retroflexus*'ta kuraklığa kıyasla glifosat ile daha fazla oksidatif zararın meydana geldiği saptanmıştır.



Şekil 10. 21 günlük *Amaranthus retroflexus* L.'ta kuraklık ve herbisit uygulamaları sonrasındaki etki (Üstten görünüş) (C: Kontrol, D: Kuraklık, P-X: Önerilen doz herbisit, P-2X: Önerilen dozun iki katı herbisit).

TEŞEKKÜR

Bu çalışma TÜBİTAK 2209-A Üniversite Öğrencileri Araştırma Projeleri Destekleme Programı kapsamında 1919B011902488 nolu proje tarafından desteklenmiştir. Bu nedenle adı geçen kuruma teşekkür ederiz.

Ayrıca araştırmada kullanılan *Amaranthus retroflexus* tohumlarını sağlayan Zir. Yüksek Müh. Figen EFİL'e ve enzim analizlerinde yardımcı olan Uzm. Gamze BALTACIER'e teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- Asada K. (1999). The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1999; 50: 601-39.
- Asadi S., Abadi HA., A-Zadeh PS. (2019). The effect of different irrigation periods on growth indicators of some weed species. *Applied Ecology and Environmental Research* 17(5):10929-10940.
- Avasathi, H., Pathak RK., Gaur VS., Singh S., Gupta VK., Ramteke PW., Kumar A. (2020). Comparative analysis of ROS-scavenging gene families in finger millet, rice, sorghum, and foxtail millet revealed potential targets for antioxidant activity and drought tolerance improvement. *Netw Model Anal Health Inform Bioinforma* 9: 33.
- Batra NG., Sharma V., Kumari N. (2014). Drought-induced changes in chlorophyll fluorescence, photosynthetic pigments, and thylakoid membrane proteins of *Vigna Radiate*. *J. Plant Interact.* 1: 712–721.
- Botella MA., Rosado RA., Hasegawa PM. (2005). Plant adaptive responses to salinity stress. *Plant Abiotic Stress*, Blacwell Publishing Ltd, 270 p.
- Boyer JS. (1982). Plant productivity and environment. *Science*, 218(4571): 443-448.
- Bradford M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.
- Büyük İ., Soydam-Aydın S., Aras S. (2012). Bitkilerin stres koşullarına verdiği moleküler cevaplar. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 69(2): 97-110.
- Cheeseman JM. (2006). Hydrogen peroxide concentrations in leaves under natural conditions, *J of Experimental Botany* 57: 2435–44.
- Davies KJA. (1987). Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. General Aspects. *J. Biol. Chem.* 262: 9895-9901.
- Demirbaş S., Acar O. (2008). Superoxide dismutase and peroxidase activities from antioxidative enzymes in *Helianthus annuus* L. roots during *Orobanche cumana* Wallr. Penetration. *Fresenius Environ. Bull.*, 17 (8a): 1038-1044.
- Dionisio-Sese ML., Tobita S. (1998). Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress. *Plant Science*, 135: 1-9.
- Edreva A. (2005). Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: A submolecular approach. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 106: 119–133.
- Elstner EF., Osswald W. (1994), Mechanisms of oxygen activation during plant stress, *Proc. R. Soc. Edinb.*, 102 B: 131-154.
- Foyer CH., Descourvières P., Kunert KJ. (1994). Protection against oxygen radicals: An important defense mechanism studied in transgenic plants. *Plant, Cell & Environment Journal*, 17(5): 507–523.
- Foyer CH., Halliwell B. (1976). Presence of Glutathione and Glutathione Reductase in Chloroplasts: A Proposed Role in Ascorbic Acid Metabolism. *Planta*, 133: 21-25.
- Foyer CH., Noctor G. (2009). Redox regulation in photosynthetic organisms: Signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxidants & redox signaling*, 11(4): 861-905.
- Franz JE., Mao MK., Sikorski JA. (1997). Glyphosate: A unique global herbicide; *American Chemical Society: Washington, DC*, pp 521-527, 604-605, 615.
- Fridovic I., 1986. Superoxide Dismutases, *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, Vol: 58
- Hay MM., Dille JA., Peterson DE. (2019). Management of pigweed (*Amaranthus spp.*) in grain sorghum with integrated strategies. *Weed Technology*, 33(5): 701-709.
- Huang Z., Huang H., Chen J., Chen J., Wei S., Zhang C. (2019). Nicosulfuron-Resistant *Amaranthus retroflexus* L. in Northeast China. *Crop Protection*, 122: 79-83.
- Kadioğlu İ., Başaran B., Kaya Y. (2015). *Amaranthus retroflexus* L.: An invasive plant. *Türkiye Herboloji Dergisi*, 18(3): 74-76.
- Karimmojeni H., Bazrafshan AH., Majidi MM., Torabian S., Rashidi B. (2014). Effect of maternal nitrogen and drought stress on seed dormancy and germinability of *Amaranthus retroflexus*. *Plant Species Biology*, 29(3): E1-E8.

- Lawrence KS. (2002). Herbicide Handbook, 8th ed. Vencill, WK.(Ed), Weed Science Society of America, p 231-234.
- Levitt J. (1980). Responses of Plants to Environmental Stresses. Academic Press, New York.
- Madhava R KV., Sresty TVS. (2000). Antioxidative parameters in the seedlings of Pigeon pea (*Cajanus cajan* L. Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses. Plant Sci., 157: 113-128.
- Maroli AS., Nandula VK., Dayan FE., Duke SO., Gerard P., Tharayil N. (2015). Metabolic profiling and enzyme analyses indicate a potential role of antioxidant systems in complementing glyphosate resistance in an *Amaranthus palmeri* biotype. Journal of agricultural and food chemistry, 63(41): 9199-9209.
- Masekoa I., Ncube B., Mabhaudhia T., Tesfayb S., Chimonyo VGP., Arayac HT., Fessehazionc M., Du Plooyc CP. (2019). Moisture stress on physiology and yield of some indigenous leafy vegetables under field conditions. South African Journal of Botany, 126: 85-91.
- Møller IM., Jensen PE., Hansson A. (2007). Oxidative modifications to cellular components in plants. Annu Rev Plant Biol, 58: 459-81.
- Murphy BP., Larran AS., Ackley B., Loux MM., Tranel PJ., (2019). Survey of glyphosate, atrazine-and lactofen-resistance mechanisms in Ohio Waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*) populations. Weed Science, 67(3): 296-302.
- Nakano Y., Asada K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant and cell physiology, 22(5): 867-880.
- Özkur O., Ozdemir F., Bor M., Turkan I. (2009). Physiochemical and antioxidant responses of the perennial xerophyte *Capparis ovata* Desf. to drought. Environmental and experimental botany, 66(3): 487-492.
- Peryea FJ., Kammereck R. (1997). Use of Minolta SPAD-502 chlorophyll meter to quantify the effectiveness of mid-summer trunk injection of iron on chlorotic pear trees. Journal of plant nutrition, 20(11): 1457-1463.
- Saraswathi SG., Paliwal K. (2011). Drought induced changes in growth, leaf gas exchange and biomass production in *Albizia lebbek* and *Cassia siamea* seedlings. Journal of environmental biology, 32(2): 173-178.
- Sarker U., Oba S. (2018). Catalase, superoxide dismutase and ascorbate-glutathione cycle enzymes confer drought tolerance of *Amaranthus tricolor*. Scientific reports, 8(1): 1-12.
- Slabbert MM., Krüger GHJ. (2014). Antioxidant enzyme activity, proline accumulation, leaf area and cell membrane stability in water stressed *Amaranthus* leaves. South African Journal of Botany, 95: 123-128.
- Steward FC. (1983). Plant Physiology, Academic Press, New York and London, 797p.
- Tomlin CDS. (2006). The pesticides manual: a world compendium. British Crop Protection Council, 14: 351.
- Tozlu G., Çoruh İ., Gültekin L. (2010). Türkiye’de *Amaranthus* (Amaranthaceae) türlerine karşı biyolojik mücadelede böceklerin kullanımı. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 41(2): 169-176.
- Valdyskikh, V.V., Voronin, P.Y., Artemyeva, E.P., Rymar, V.P. (2019). Amaranth responses to experimental soil drought. In AIP Conference Proceedings (Vol. 2063, No. 1, p. 030023). AIP Publishing LLC.
- Vieira, B.C., Samuelson, S.L., Alves, G.S., Gaines, T.A., Werle, R., Kruger, G.R. (2018). Distribution of glyphosate-resistant *Amaranthus* spp. in Nebraska. Pest management science, 74(10): 2316-2324.
- WHO (1996). Data Sheets on Pesticides: Glyphosate; International Programme on Chemical Safety, World Health Organization, Food and Agriculture Organization: Geneva, Switzerland.
- Zhang, H., Duan, W., Xie, B., Wang B., Hou F., Li A., Dong S., Qin Z., Wang Q., Zhang L. (2020). Root yield, antioxidant capacities, and hormone contents in different drought-tolerant sweet potato cultivars treated with ABA under early drought stress. Acta Physiol. Plant 42: 132.

©Türkiye Herboloji Derneği, 2020

Geliş Tarihi/ Received:Ekim/OctoberAgust, 2020
Kabul Tarihi/ Accepted: Aralık/December, 2020

To Cite : Kurcan G., Donat S. and Acar O. (2020). Investigation of the Role of Some Antioxidant Enzymes in the Relationship Between Drought Tolerance and Herbicide Resistance in Red Root Amaranth (*Amaranthus retroflexus* L.) (In Turkish with English Abstract). Turk J Weed Sci, 23(2):165-175

Alıntı için: Kurcan G., Donat S. ve Acar O. (2020). Kızılbacak (*Amaranthus retroflexus* L.) Bitkisinde Kuraklık Toleransı ve Herbisit Direnci Arasındaki İlişkide Bazı Antioksidan Enzimlerin Rolünün Araştırılması. Turk J Weed Sci, 23(2):165-175