
Araştırma Makalesi / Research Article

Mısır Fidelerinin Büyüme ve Gelişmesi Üzerine Progesteron ve Mifepristonun Etkilerinin Kıyaslamalı Olarak Değerlendirilmesi

Hülya TÜRK*

*Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi, Atatürk Üniversitesi, Erzurum
(ORCID: 0000-0002-4896-9887)*

Öz

Memeli cinsiyet hormonları arasında yer alan ve bitkilerde de doğal olarak bulunan progesteron, çimlenmeden çiçeklenmeye kadar tüm bitki gelişim safhaları üzerine önemli uyarıcı etkilere sahiptir. Ancak bu hormonun etki mekanizması halen tam olarak aydınlatılmadığı gibi, sebep olduğu etkilerin de doğrudan kendi özelliğinden mi kaynaklandığı yoksa farklı yollar üzerinden dolaylı olarak mı gerçekleştiği konusu da belirsizliğini korumaktadır. Bu amaçla, mevcut araştırmada progesteron reseptör bağlanma inhibitörü olan mifepriston kullanılmak suretiyle, progesteronun etkisinin doğrudan mı yoksa dolaylı mı olduğu belirlenmeye çalışılmıştır. 9 günlük mısır fideleri 4 gruba ayrılarak yapraklarına saf su (kontrol grubu), progesteron (10^{-8} mol.L⁻¹), mifepriston (5.8×10^{-5} mmol.L⁻¹) ve progesteron + mifepriston) solüsyonları püskürtülmüş ve tüm gruplar üç gün sonra hasat edilerek morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal analizler yapılmıştır. Progesteron uygulaması bitkilerin kök ve yaprak uzunlukları, total klorofil, total protein, total karbohidrat, nispi su ve kuru madde içerikleri ile yaprak yüzey alanı ve Ribuloz-1,5-bisfosfat karboksilaz/oksijenaz (RuBisCo) aktivitelerinde kontrol bitkilerine kıyasla önemli artışlara sebep olurken, mifepriston uygulanan bitkilerde bu parametrelerin tamamında belirgin düşüşler kaydedildi. Öte yandan, progesteron ile birlikte mifepriston uygulanan bitkilerde ise kontrol bitkilerine kıyasla mifepriston kaynaklı inhibisyonların önemli oranda azaldığı belirlendi. Tüm bu bulgular, mifepriston uygulamasının progesteronun bağlanmasını önlemek suretiyle progesteron bağlantılı metabolik faaliyetlerin gerçekleşmesine ket vurarak mısır fidelerinin büyüme ve gelişmesini inhibe ettiğini ve böylelikle progesteronun bitki metabolizması üzerine doğrudan etkiye sahip olduğunu açıkça ortaya koymaktadır.

Anahtar kelimeler: progesteron, mifepriston, mısır, bitki büyümesi.

Comparative Evaluation of the Effect of Progesterone and Mifepristone on Growth and Development of Maize Seedlings

Abstract

Progesterone, which is among mammalian sex hormones and is also naturally present in plants, has important stimulative effects on all developmental stages of plants, starting from germination to flowering. However, as the effect mechanism of this hormone is still not fully understood, it is still not known whether its effects originate directly or indirectly from different pathways. For this purpose, the present study tried to determine whether the effect of progesterone was direct or indirect by using mifepristone, a progesterone receptor binding inhibitor. Nine-day-old maize seedlings were divided into four groups and the leaves were sprayed with the following solutions: distilled water (control group), progesterone (10^{-8} mol.L⁻¹), mifepristone (5.8×10^{-5} mmol.L⁻¹), and progesterone plus mifepristone. All groups were harvested after 3 days to perform morphological, physiological and biochemical analysis. In comparison to control seedlings, while progesterone application resulted in significant increases in lengths of root and leaves, contents of total chlorophyll, total protein, relative water, and dry matter, leaf surface area, and Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCo) activity, marked decreases in all these parameters were recorded at mifepristone-applied seedlings. On the other hand, in mifepristone-applied seedlings along with progesterone it was determined that mifepristone-induced inhibitions declined significantly in comparison to control seedlings. All these findings clearly demonstrate that mifepristone inhibited the growth and development of maize seedlings via disruption of progesterone-associated metabolic activities through the prevention of the binding of progesterone, and thus these data proved that progesterone has a direct effect on plant metabolism.

Keywords: progesterone, mifepristone, maize, plant growth.

*Sorumlu yazar: hulya.turk@atauni.edu.tr

Geliş Tarihi: 22.10.2018, Kabul Tarihi: 12.03.2019

1. Giriş

Steroid hormonlar grubunda yer alan memeli cinsiyet hormonlarının bitkilerde varlığının tespit edilmesiyle birlikte birçok araştırmacı bu hormonların bitkilerde buldukları organ ve dokuları, çeşitlerini, konsantrasyonlarını, reseptörlerini ve çimlenmeden çiçeklenmeye kadar tüm gelişim evreleri üzerine olan etkilerini belirlemeye yönelik çok sayıda çalışmalar yapmışlardır [1-4]. Özellikle son yıllarda bu hormonların eksojen uygulamaları yapılmak suretiyle bir yandan bitkilerin büyüme ve gelişmesi ile çeşitli stres etmenlerine karşı toleranslarının artırılmasına, öte yandan metabolizmada oynadıkları roller ile etki mekanizmalarının aydınlatılmasına yönelik çalışmalar hız kazanmıştır [5-9]. Memeli cinsiyet hormonları arasında bitkiler üzerine etkileri en çok araştırılan hormonların başında progesteron gelmektedir. Diğer cinsiyet hormonları gibi, progesteronun da bitkilerin çimlenme aşamasından çiçeklenme aşamasına kadar tüm gelişim evreleri üzerine genel olarak uyarıcı bir etkiye sahip olduğu; hücre bölünmesi, kallus oluşumu, kök-gövde uzaması, polen çimlenmesi, protein, şeker, pigment, ve fenolik madde içerikleri gibi pek çok parametre üzerindeki etkileri belirlenmek suretiyle ortaya konmuştur. Ayrıca biyotik-abiyotik çeşitli çevresel stres etmenlerine karşı bitkilerin savunma sistemlerinde meydana getirdikleri değişimler de, gerek enzimatik ve non-enzimatik antioksidan savunma sistemleri, gerekse oksidatif stres parametrelerindeki değişimler belirlenmek suretiyle tespit edilmiştir [3, 8, 10-15]. Tüm bu çalışmalarda eksojen progesteron uygulamasının uygulandığı konsantrasyonlara bağlı olarak buğday, arpa, mısır, fasulye gibi çalışılan tüm bitki türlerinde büyüme ve gelişmeyi önemli oranda teşvik ettiği ve çevresel stres faktörlerine karşı bitki direncini artırdığı belirlenmiş olmasına rağmen, bu hormonun etki mekanizması halen tam olarak aydınlatılmamıştır. Dahası progesteronun sergilemiş olduğu bu etkilerin direkt olarak kendisi tarafından mı, yoksa farklı metabolik yollar veya bileşenleri etkilemek suretiyle dolaylı olarak mı meydana geldiği henüz tam olarak aydınlatılmamıştır. Bu amaçla son yıllarda bitkilerde progesteronun biyosentez yolları ve hücrelerde bulunan reseptörlerini belirlemeye yönelik çalışmalara ağırlık verilmeye başlanmış ve sitosol, çekirdek ve hücre membranlarında progesteron için spesifik bağlanma bölgeleri ve reseptörler tanımlanmıştır. Janeczko vd., (2013) tarafından yapılan bir çalışmada bitki hücrelerinde progesteron bağlanma bölgelerinin memeli hücrelerindeki benzer olduğu ve bu bağlamda progesteron biyosentez inhibitörleri ve reseptör bağlanma inhibitörleri kullanılmak suretiyle yapılan çalışmada buğday fidelerinin büyümesinde belirgin bir inhibisyon meydana geldiği tespit edilmiştir [8]. Aynı çalışmada, progesteronun RuBisCo proteinine karşı yüksek bir afiniteye sahip olduğu ve progesteron uygulamasının RuBisCo aktivitesini önemli derecede artırdığı da belirlenmiştir. Erdal ve Genisel (2016) ise yaptıkları çalışmada, bu hormonun mitokondriyal solunumu etkilemek suretiyle hücrelerde anabolik ve katabolik reaksiyonların hızlarını modüle ettiğini rapor etmişlerdir [12].

Mevcut çalışmada progesteron reseptör bağlanma inhibitörü olan mifepriston kullanılmak suretiyle, çeşitli morfolojik (kök ve yaprak uzunlukları), fizyolojik (kuru madde ve nispi su içerikleri) ve biyokimyasal (protein, şeker ve total klorofil içerikleri) parametreler temelinde, progesteronun mısır fidelerinin büyüme ve gelişmesi üzerine sahip olduğu etkilerin doğrudan kendi özelliğinden mi yoksa farklı metabolik yolları etkilemek suretiyle dolaylı olarak mı gerçekleştirdiğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. Materyal ve Metot

2.1. Bitki büyütülmesi ve uygulamaların yapılması

Yapılan çalışmada mısır (*Zea mays* cv. Hido) bitkisi kullanılmıştır. Tohumlar ekilmeden önce %96'lık alkol ile kısa süreli hızlıca yıkanmış ve %5'lik sodyum hipoklorit çözeltisi içerisinde 5 dk. yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuştur. Daha sonra tohumlar musluk suyu ile iyice yıkanmış en son olarak da 5 kez saf su ile yıkanarak, oda şartlarında saf su içerisinde yaklaşık 6 saat şişmeye bırakılmıştır. Tohumlar alt tabakasında iki kat filtre kağıdı içeren kaplara ekilmiş ve yine üzeri filtre kağıdı ile kapatılmıştır. Filtre kağıtlarının üzerinden yeterli gelecek ve hepsinde eşit olacak şekilde saf su ilavesi yapılmıştır. Kapların üzerlerine streç film kaplanmış ve hava alabilmesi için delikler açılmıştır. Yaklaşık 3 gün süre ile çimlenmeleri için 25°C'ye ayarlı olan çimlenme kabinine yerleştirilmiştir. Çimlenen mısır tohumları hidroponik ortama (1/2 Hoagland besiyeri) aktararak iklim odasında kontrol şartlarında

(25/20°C sıcaklık 14/10 saat ışık-karanlık periyodunda 20.000 lüks, %70 nem) büyütülmüştür. Her üç günde bir besin solüsyonu değiştirilmiştir. Dokuzuncu gün bitkiler “kontrol, progesteron (P grubu), mifepriston (M grubu) ve progesteron + mifepriston (P+M grubu)” olarak 4 gruba ayrılarak kontrol grubuna saf su, diğer uygulama gruplarına ise optimize edilen konsantrasyonlarda progesteron ve mifepriston çözeltileri foliar olarak uygulanmıştır. Mevcut çalışmada progesteron konsantrasyonu için $10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}$ ve 10^{-10} mol.L⁻¹ konsantrasyon aralığında ön çalışmalar yapılmış ve en iyi sonuçlar 10^{-8} mol.L⁻¹ progesteron uygulamasında alındığından çalışmaya optimize edilen bu konsantrasyon değeri ile devam edilmiştir. Mifepriston konsantrasyonu yine literatürde yer alan önceki çalışmalar dikkate alınarak 5.8×10^{-5} mmol.L⁻¹ olarak optimize edilmiştir. Uygulamadan 6 saat sonra bitkilerin besin çözeltileri değiştirilerek, iklimlendirme odasında yine aynı sıcaklık, ışık ve nem periyodunda 12. günün sonuna kadar yetiştirilmeye devam edilmiştir. Bu sürenin sonunda bitkiler hasat edilerek fizyolojik ve biyokimyasal parametrelerindeki değişimler belirlenmeye çalışılmıştır.

2.2. Kök ve yaprak uzunluğunun belirlenmesi

Hasat edilen mısır bitkilerinin kök ve yaprak kısımları bir cetvel yardımı ile ölçülerek sonuçlar cm cinsinden verilmiştir.

2.3. Kuru madde içeriğinin belirlenmesi

Hasat edilen mısır bitkisinin her grubundan 3 adet bitki örneği alınarak 70°C’ye ayarlı etüve yerleştirilmiştir. 72 saatlik sürenin sonunda ağırlıkları sabitleştiğinde örnekler bir bitki olacak şekilde tartılıp kuru madde içeriği belirlenmiştir [16]. Sonuçlar bir bitki başına düşen mg kuru madde olacak şekilde verilmiştir.

2.4. Nispi su içeriğinin belirlenmesi

Hasat edilen mısır bitkilerinin her saksısından 2,5 gram yaş ağırlık tartılıp 70°C’ye ayarlı olan etüve yerleştirilmiştir. Örnekler 72 saat bekletilerek ağırlıklarının sabitlenmesi beklenmiştir. Ağırlıkları sabitlenen örnekler tekrar tartılarak kuru ağırlıkları belirlenmiş ve her gruptaki bitkilerin yapraklarındaki nispi su içeriği aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır [17].

$$NSİ (\%) = \frac{(Taze \ ağırlık - Kuru \ Ağırlık)}{(Dougun \ Ağırlık - Kuru \ Ağırlık)} \times 100 \quad (1)$$

2.5. Yaprak yüzey alanının belirlenmesi

Hasat edilen mısır bitkisinin her grubundan alınan yaprak örnekleri fotoğraflandırılıp yaprak yüzey alanı değerleri hesaplanarak yüzdeye çevrilmiştir [18].

2.6. Çözülebilir protein içeriğinin belirlenmesi

Mısır bitkisinin yapraklarından alınan 0,5 gram taze doku örnekleri kullanılarak protein ölçümü spektrofotometrik yolla tayin edilmiştir [19]. Sonuçlar mg protein/g taze doku” cinsinden hesap edilmiştir.

Bitkilerin sıvı azot kullanılarak toz haline getirilmiş yapraklarından 0,5 g alınarak 10 misli hacimdeki 0,1 M fosfat tamponunda (pH 6,75) ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Homojenat dört katlı tülbenkten süzülüş ve santrifüj tüplerine alınarak 15.000 rpm’de 15 dk. boyunca santrifüj edilmiştir. Protein tayini için tüplerin üst kısmındaki sıvı faz (süpernatant) kullanılmıştır.

Metot için gerekli standart grafik ise şu şekilde hazırlanmıştır; 1 ml’inde 1 mg protein içeren standart sığır albümin çözeltilerinden 0; 2,5; 5; 7,5; 10 ve 12 µg protein içeren hacimler mikro plakadaki kuyucuklara aktarılıp, saf su ile bütün tüplerin hacimleri 12 µl ’ye tamamlanmıştır. Bu tüplere 0,2 ml de BCA (bicionchonic asit+ FeCl₃) reaktifi ilave edilip karıştırılmıştır. Kör numune olarak sadece 0,2 ml BCA reaktifi kullanılmıştır. Plaka çalkalandıktan sonra 65°C’de 15 dk. bekletilmiştir. Yapılan spektrofotometrik ölçümler sonucunda, 562 nm’deki absorbans değişimine karşılık gelen protein

değerlerinden yararlanarak standart grafik elde edilmiş ve bu grafikten yararlanarak protein miktarları belirlenmiştir.

2.7. Total karbohidrat içeriğinin belirlenmesi

Total karbohidrat içeriği Dische (1947) tarafından belirlenen prosedürde bazı modifikasyonlar yapılarak belirlenmiştir [20]. 0,1 g yaprak örneği 5 ml soğuk 2,5 N HCl içerisinde homojenize edildikten sonra homojenatlar 3 saat 100°C sıcak su banyosunda bekletilmiştir. Üç saatlik sürenin sonunda örnekler soğuk su içerisine alınarak soğutulmuştur. Üzerlerine reaksiyon duruncaya kadar katı Na₂CO₃ ilave edilmiştir. Reaksiyon durduktan sonra üzerlerine 45 ml saf su ilave edilerek son hacim 50 ml'ye tamamlanmış ve 15.000 rpm' de 15 dk. santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra 50 ml içerisinden 1 ml süpernatant alınarak üzerine Antron çözeltisi (200 mg antron 100 ml soğuk %95'lik sülfirik asit içerisinde çözülür) ilave edilmiş ve tekrar soğuk suya konularak soğutulduktan sonra 630 nm'de ki absorbans değişimleri kaydedilmiştir. 0, 20, 40, 60, 80 ve 100 µg glukoz kullanılarak hazırlanan standart grafik yardımı ile mısır yaprak dokusundaki total karbohidrat içeriği gram dokudaki mg cinsinden hesaplanmıştır.

2.8. Total klorofil içeriğinin belirlenmesi

Witham vd., (1971) tarafından belirlenen prosedüre göre yaprak dokusunda ki toplam klorofil içeriği belirlenmiştir [21]. Mısır bitkisinden alınan yaprak örnekleri 1 gram tartılmış ve %80'lik soğuk aseton içerisinde son hacim 10 ml olacak şekilde homojenize edilmiştir. Daha sonra homojenat filtre kağıdından süzülerek elde edilen ekstrakt 3000 rpm'de 5 dk. santrifüj edilmiştir. Daha sonra süpernatantlar alınarak 645 ve 663 nm'de absorbans değerleri kaydedilmiştir. Kaydedilen absorbans değerleri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Total klorofil içeriği } \left(\frac{\text{mg}}{\text{g}} \text{ taze doku} \right) = (20,2 \times D_{645} + 8,02 \times D_{663}) \times \frac{V}{1000 \times W} \quad (2)$$

(D: Klorofil ekstraktının belirtilen dalga boylarındaki absorbans değeri; V: %80'lik asetonun son hacmi; W: Ekstre edilen dokunun gram olarak yaş ağırlığı)

2.9. Ribuloz-1,5-bisfosfat karboksilaz/oksijenaz enzim aktivitesinin belirlenmesi

Ribuloz-1,5-bisfosfat karboksilaz/oksijenaz aktivitesi (RuBisCo, EC 4.1.1.39) spektrofotometrik olarak ölçülmüştür [22]. Tartılan ve yüzeyleri ölçülen yaprak örnekleri 30 mg PVPP içeren 2 ml (100 mM Bicine pH 7.8, 1 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 0.002% BSA [w/v]) ekstraksiyon tamponunda homojenize edilmiştir. Örnekler 16.000xg'de santrifüj edildikten sonra 5 µl alınmış ve 745 µl (50 mM Bicine pH 8.0, 1 mM EDTA, 15 mM MgCl₂, 18.5 mM NaCl, 9.2 mM DTT, 0.6 mM RuBP, 9.2 mM NaHCO₃, 0.4 mM NADH, 0.5 mM ATP, 4.6 mM fosfokreatinin, 1.3 birim fosfokreatinin kinaz, 47 birim fosfogliserat kinaz ve gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz) reaksiyon tamponuna ilave edilmiştir. RuBisCo aktivitesi, 334 nm'de ölçülen absorbans değerinden 405 nm'de ölçülen absorbans değeri çıkartılmış ve $\epsilon = 6190 \text{ L mol}^{-1}$ katsayısı kullanılarak hesaplanmıştır.

2.10. İstatistiksel Analiz

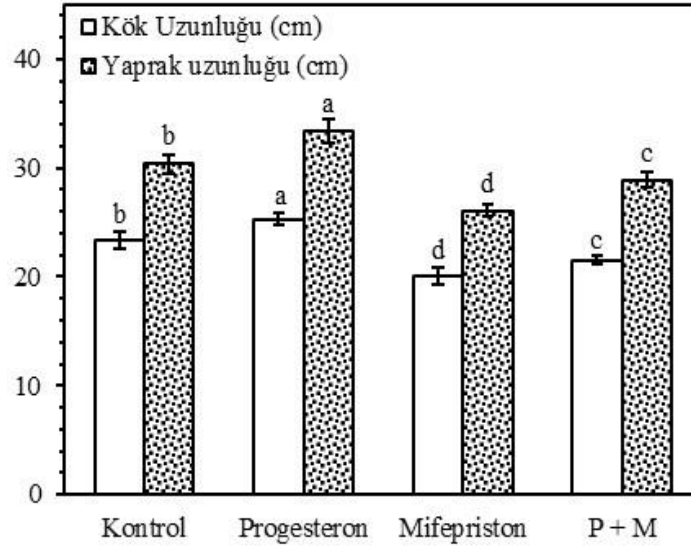
Elde edilen tüm veriler için tek yönlü varyans analizi olan ANOVA testi yapılarak ortalamalar Duncan'ın multiple range testiyle kıyaslanmıştır. P değerleri ≤0.05 önem aralığı olarak düşünülmüştür.

3. Bulgular ve Tartışma

Bitkilerde varlıklarının belirlenmesinden bu yana memeli cinsiyet hormonlarının bitki metabolizmasındaki etkileri üzerine yapılan çalışma sayısı gün geçtikçe artmasına rağmen henüz istenilen ilerleme kaydedilememiştir. Bu bağlamda mevcut araştırmada, memeli cinsiyet hormonları arasında yer alan progesteron ile onun reseptör bağlanma inhibitörü olan mifepristonun birlikte

uygulanması ile 12 günlük mısır fidelerinde çeşitli morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal parametrelerdeki değişimler belirlenmek suretiyle bu hormonun bitki metabolizmasında doğrudan mı yoksa diğer yollar üzerinden dolaylı bir etkiye mi sahip olduğunun belirlenmesi amaçlanmıştır.

Önceki araştırmacıların elde etmiş olduğu bulgulara benzer olarak, mevcut araştırmada progesteron uygulanan bitkilerin kök ve yaprak uzunluklarında kontrol bitkilerine kıyasla sırasıyla %8,4 ve %9,86'ya varan artışlar kaydedilmiştir (Şekil 1). Janeczko (2000) tarafından yapılan bir çalışmada progesteron uygulamasının kışlık buğday bitkisinde kök ve gövde uzunluğunu artırdığı rapor edilmiştir [23]. Yine mısır, nohut ve fasulye ile yapılan çalışmalarda progesteron uygulamasının kök ve gövde uzaması üzerine pozitif etkiye sahip olduğu bildirilmiştir [24-26]. Progesteronun bağlanma inhibitörü olan mifepriston uygulaması sonucunda ise kök ve yaprak uzunlukları sırası ile %14,18 ve %14,14 azalışla 20,02 cm ve 26,1 cm olarak ölçülerek kaydedilmiştir. Mifepriston ile birlikte progesteron uygulanması ise, kök ve yaprak uzunluğunda kaydedilen mifepriston kaynaklı inhibisyonları %6,38 ve %9,21 oranında azaltmıştır. Mısır fidelerinin kök ve yaprak uzunluklarında kaydedilen progesteron kaynaklı artışlar, onun hücre bölünmesi ve/veya hücre uzaması ile protein sentezi gibi çeşitli biyosentez reaksiyonları üzerine uyarıcı etkisinin yanı sıra [27, 28], bitki büyümesi üzerine etkili olan gibberellin biyosentezini uyarması ile de açıklanabilir [29]. Mifepriston uygulanan fidelerde kaydedilen büyüme geriliği ise, bu maddenin progesteronun hücre membranı ve çekirdekteki reseptörlere bağlanarak progesteronun bağlanmasını inhibe ettiği ve böylece progesteronun büyümeyi uyarıcı etkisini önlediği şeklinde açıklanabilir.



Şekil 1. Progesteron ve mifepriston uygulamalarının 12 günlük mısır fidelerinin kök ve yaprak uzunlukları üzerine etkisi

Bitkilerde dışsal farklılaşmalar, iç dokularda bulunan protein ve karbohidratların çeşit ve seviyelerindeki değişiklikler ile şekillenir. Bu nedenle çözünür protein ve karbohidrat içeriğinde meydana gelen değişimler büyüme ve gelişmenin indikatörleri olarak kabul edilirler [30]. Özellikle protein içeriğinde meydana gelen azalmalar bitki büyümesini negatif yönde etkilemektedir. Mevcut çalışmada mısır fidelerinin kök ve yaprak uzunluklarında meydana gelen değişimleri açıklayabilmek için protein ve karbohidrat içerikleri belirlendi. Kontrol bitkilerinin yapraklarında sırasıyla 18,1 ve 4,1 mg.g⁻¹ olarak ölçülen protein ve karbohidrat içerikleri, önceki araştırmacıların raporları ile uygunluk gösterir bir şekilde progesteron uygulaması ile %25,9 ve %19,5'lik artışlarla 22,8 ile 4,9 mg.g⁻¹'a kadar yükseldi (Tablo 1). Nohut, mısır ve buğdayda yapılan çalışmalarda progesteron uygulamasının çözünür protein içeriğini artırdığı [5, 6, 31], progesteron ve diğer memeli cinsiyet hormonlarının da kontrol koşullarında çözünür protein içeriğini artırdığı bildirilmiştir [4, 32]. Yine yapılan başka bir çalışmada karbohidrat içeriğinde de progesteron uygulaması ile artış belirlendiği rapor edilmiştir [4]. Protein ve karbohidrat içeriklerinde belirlenen progesteron indüklü artışın aksine, mifepriston uygulanan fidelerde bu parametrelerde belirgin bir azalma kaydedildi. Mifepriston ile birlikte progesteron uygulanan fidelerde ise bu parametreler üzerine tek başına mifepriston uygulamasının neden olduğu indirgenme

belirli bir oranda yatıştırıldı. Bu bulguların kök ve yaprak uzunluklarında kaydedilen değişimler ile paralel olması, progesteronun protein ve karbohidrat içerikleri üzerine sahip olduğu indükleyici etkinin mifepriston tarafından engellendiğini ve böylece büyüme geriliğine neden olduğunu açıkça ortaya koymaktadır. Çünkü protein içeriğindeki artışı bitki büyüme ve gelişimi için gerekli olan sentez reaksiyonlarının hızlandırılmasına bağlanabilirken, karbohidrat içeriğinde meydana gelen artış ise özellikle yaprak yüzey alanı, klorofil içeriği ve Rubisco enzim aktivitesindeki artışla beraber karbondioksit fiksasyonunun hızlanmış olmasına bağlanabilir.

Tablo 1. Mısır fidelerinin yapraklarında yaprak yüzey alanı ile kuru madde, nispi su, total protein ve karbohidrat içerikleri üzerine progesteron ve mifepriston uygulamalarının etkileri

Uygulamalar	Nispi su içeriği (%)	Kuru madde içeriği (mg.bitki ⁻¹)	Yaprak yüzey alanı (%)	Total protein içeriği (mg.g ⁻¹ TD)	Total karbohidrat içeriği (mg.g ⁻¹ TD)
Kontrol	86,3b	2,2b	100b	18,1b	4,1b
Progesteron (P)	91,6a	2,5a	116a	22,8a	4,9a
Mifepriston (M)	80,6c	1,8c	82d	14,3d	3,0d
P + M	83,2bc	2,1b	91c	16,3c	3,6c

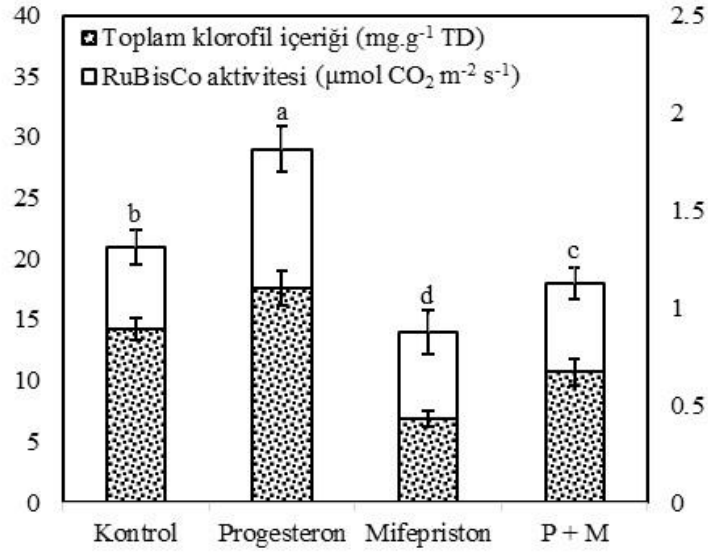
İyi bilinmektedir ki, hücredeki fizyolojik ve biyokimyasal olayların devamlılığı için su dengesinin sürdürülmesi hayati önem arz etmektedir. Bitkideki su durumunun en önemli indikatörlerinden biri olan yapraklardaki nispi su içeriği, aynı zamanda dokulardaki metabolik aktiviteler hakkında da önemli bilgi verir [33]. Tablo 1’de gösterildiği gibi, mısır fidesinin yapraklarında ölçülen nispi su içeriği progesteron uygulaması ile kontrole (%86,3) kıyasla önemli bir artış göstermiş (%91,6), mifepriston uygulaması neticesinde ise %6’ya yakın bir azalış göstererek %80,6 olarak kaydedilmiştir. Mifepriston ve progesteronun birlikte uygulandığı fidelerin yapraklarında ise kontrole kıyasla istatistiksel olarak önemli olmayan bir azalma meydana gelmiştir (%83,2). Progesteron uygulaması ile kaydedilen artış, önceki araştırmacıların elde ettikleri bulgular ile paralellik göstermiştir. Soğuk stresi altında büyütülen nohut bitkisindeki soğuk kaynaklı azalan nispi su içeriği progesteron uygulaması ile yatıştırılmış ve kontrole yakın bir değer elde edilmiştir [31].

Öte yandan, mevcut araştırmada kök ve yaprak uzunluğu ile nispi su içeriğinde ve özellikle protein ve karbohidrat içeriklerinde meydana gelen değişimler ile kuru madde içeriğinde meydana gelen değişimler arasında pozitif bir korelasyon belirlenmiştir. Kuru madde içeriği kontrole (2,2 mg.bitki⁻¹) kıyasla progesteron uygulanan fidelerde yaklaşık %13,6 oranında artış göstererek 2,5 mg.bitki⁻¹ olarak, mifepriston uygulanan fidelerde %18,18 oranında bir azalış göstererek 1,80 mg.bitki⁻¹ olarak kaydedilmiştir. Mifepriston ve progesteronun birlikte uygulandığı bitkilerde ise kontrol bitkilerine kıyasla kuru madde içeriğinde istatistiki olarak önemli bir değişim meydana gelmemiştir (2,1 mg.bitki⁻¹). Erdal (2012) tarafından yapılmış olan bir çalışmada, tuz stresi altında yetiştirilen buğday fidelerinin kuru madde içeriklerinde tuz kaynaklı azalmanın progesteron ve diğer cinsiyet hormonları tarafından yatıştırıldığı [5], başka bir çalışmada ise memeli cinsiyet hormonlarının mısır fidelerinin gövde kuru ağırlığını önemli derecede artırdığı rapor edilmiştir [34].

Mevcut araştırmada mısır fidelerinin yaprak yüzey alanlarında meydana gelen değişimler de belirlenmeye çalışılmış, kontrol bitkilerine (%100) kıyasla progesteron uygulaması yapılan fidelerin yaprak yüzey alanlarında %16 oranında belirgin bir artış kaydedilmiştir. Mifepriston uygulaması ise yaprak yüzey alanlarında %18 oranında bir azalmaya neden olmuştur. Mifepriston ve progesteronun birlikte uygulandığı fidelerde ise kontrole kıyasla %9’luk bir azalma kaydedilmiştir. Progesteron uygulanan fidelerde kuru ağırlıkla birlikte yaprak yüzey alanlarında meydana gelen artışlar, büyüme parametrelerinin (protein biyosentezi ve karbohidrat içeriğindeki artışlar) progesteron tarafından doğrudan uyarılması ile ilişkili olabilir. Protein ve şekerlerin sentezi bitkilerin vejetatif gelişimi için gerekmektedir. Steroid hormonların bitkide protein sentezini [35], klorofil sentezini [36] ve karbondioksit fiksasyonunu [37] artırdığı bilinmektedir.

Mevcut araştırmada yaprak yüzey alanında meydana gelen değişimlerin total klorofil içeriğindeki değişimler ile pozitif korelasyon gösterdiği de belirlenmiştir (Şekil 2). Total klorofil içeriği kontrol bitkisinde 0,8 mg.g⁻¹ iken, progesteron uygulanan bitkilerde 0,9 mg.g⁻¹ olarak ölçülmüş, mifepriston uygulanan bitkilerde ise 0,5 mg.g⁻¹ olarak kaydedilmiştir. Mifepriston ve progesteronun birlikte uygulandığı bitkilerde ise 0,6 mg.g⁻¹ olarak ölçülmüş ve kontrole kıyasla azaldığı tespit edilmiştir. Janeczko vd., (2015) tarafından yapılan bir çalışmada progesteron ve mifepriston

uygulamasının kuraklık stresi altında klorofil içeriğini önemli ölçüde değiştirmediği rapor edilmiştir [3]. Tuz stresi altında yetiştirilen buğday bitkilerinde ise progesteronun protein, şeker ve klorofil içeriklerinde meydana gelen stres kaynaklı inhibisyonu yatıştırarak değerlerin kontrol bitkilerine yakın bir seviyeye gelmesine katkı saęladığđ belirlenmiştir [5].



şekil 2. Progesteron ve mifepriston uygulamalarının 12 günlük mısır fidelerinin toplam klorofil içerikleri ve RuBisCo aktivitesi üzerine etkileri

Klorofil içeriğine paralel olarak fotosentezin önemli bir parçası olan ve CO₂ bağlama özelliğine sahip RuBisCo aktivitesine de bakılmış ve kontrol bitkilerine kıyasla bu enzimin aktivitesinde progesteron tarafından belirgin bir artış meydana getirildiği tespit edilmiştir. Progesteron bağlanma inhibitörü olan mifepriston uygulamasının ise bu enzimin aktivitesinde önemli bir dşse sebep olduğu, progesteronla birlikte uygulandığında inhibisyonun belirli bir dereceye kadar lendiği belirlenmiştir. Mevcut araştırmada elde edilen bulguları destekler şekilde, iki farklı buğday kltivarında yapılmış olan çalışmada progesteron uygulamasının RuBisCo enzim aktivitesini artırdığđ, mifepriston uygulamasının ise inhibe ettiği rapor edilmiştir [3]. Total klorofil ve karbohidrat içeriklerinde meydana gelen değişimler ile bu enzimin aktivitesinde kaydedilen değişimler arasında pozitif korelasyon olması, ayrıca RuBisCo proteininin progesterona bağlanma afinitesinin de bulunması, uygulanan progesteronun RuBisCo enzime bağlanmak suretiyle aktivitesini artırdığđ ve böylelikle CO₂ fiksasyonunu artırarak fotosentez mekanizmasını stimüle ettiği söylenebilir. Tek başına ve progesteronla birlikte mifepriston uygulanan bitkilerde ise bu parametrelerde önemli inhibisyonların belirlenmesi ise, progesteronun bitki metabolizması üzerine doğrudan etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

Oldukça popüler inhibitörler arasında yer alan mifepriston, gelişim süreçlerinin düzenlenmesini içeren progesteron reseptörlerini bloklamak suretiyle bitki gelişimi üzerine inhibisyon etkisi göstermektedir [3]. Bitkilerde bulunan progesteron bağlanma proteinleri memelilerdekiler ile yapısal benzerlikler göstermektedir [8, 38]. nceki çalışmalarda spesifik progesteron bağlanma bölgeleri bitki hücrelerinin sitoplazmasında ve nükleusunda tanımlanmıştır [8]. Bitki büyüme ve gelişiminin uyarılması veya inhibisyonu için sadece steroid düzenleyicilerin miktarı değil, aynı zamanda bu bileşiklerin reseptörlerinin varlığı ve uygunluğu da büyük önem arz etmektedir. Literatürde mifepriston uygulamasının etkilerinin arařtırıldıęđ çalışma sayısı oldukça az sayıdadır. Memelilerde yapılan çalışmalarda mifepriston uygulamasının progesteron miktarını azalttıęđ [39,40], iki farklı buğday kltivarında yapılan çalışmada ise mifepriston uygulamasının memelilerdekine benzer olarak aynı etkiyi sergilediği rapor edilmiştir [3]. Mifepristonun memelilerde progesteronun ana prekürsörü olan kolesterol sentezini azaltarak bu işlemi gerçekleştirdiği ifade edilse de [40], kolesterolun bitkilerde steroidlerin prekürsörü olarak oldukça çok az rol oynadıęđ ve diğer sterol türevlerinin steroid kökenli düzenleyicilerin sentezine öncül olarak katılarak katkı saęladıęđ da ifade edilmiştir [2, 41]. Ancak yukarıda da bahsedildiği gibi mifepristonun progesteron içeriğini azaltmasından ziyade onun bağlanma reseptörlerini bloklaması şeklinde etki göstermesi kuvvetle muhtemeldir. Mifepriston bu etkisinin yanı

sıra, memelilerde olduğu gibi progesteron biyosentezinin erken safhasını da etkileyebilmektedir [3]. Ayrıca progesteron hormonunun ortamda aşırı miktarda bulunması da sinyal rol oynarak bu hormonun üretiminin azaltılması için bir geri bildirim mekanizması oluşmasına da katkı sağlamaktadır.

4. Sonuç ve Öneriler

Mevcut araştırmada, eksojen progesteron uygulamasının mısır bitkilerinin kök ve yaprak uzunluğu, kuru madde içeriği, nispi su içeriği, yaprak yüzey alanı, protein, karbohidrat ve klorofil içerikleri ile RuBisCo enzim aktivitesi üzerine uyarıcı etkiye sahip olduğu; bağlanma inhibitörü olan mifepriston uygulamasının ise progesteronun uygun reseptöre bağlanmasını engellemek, progesteron içeriğini azaltmak veya biyosentez sürecini etkilemek suretiyle bu parametreler üzerinde önemli bir inhibisyon etkisi meydana getirdiği görülmektedir. Mifepristonun etkisi hangi yolla gerçekleşirse gerçekleşsin, mevcut araştırma bulguları progesteronun bitki metabolizması üzerine doğrudan etkiye sahip olduğunu açıkça gözler önüne sermiştir. Sonraki çalışmalarda, bitkilerde progesteron içeriğinin ve biyosentez yollarının detaylı olarak araştırılması ile progesteronun etki mekanizmasının daha detaylı olarak ortaya konulması sağlanmış olacaktır.

Kaynaklar

- [1] Janeczko A., Barna B., Gullner G., Skoczowski A., Dubert F. 2005. Specific Physiological Activity of 24-Epibrassinolide Injected into Apoplast of Spring Rape Tissues Prior to Cold Treatment, *Acta Physiologiae Plantarum*, 27: 52-52.
- [2] Janeczko A. 2012. The Presence and Activity of Progesterone in the Plant Kingdom, *Steroids*, 77: 169-173.
- [3] Janeczko A., Oklestkova J., Novak O., Sniegowska-Swierk K., Snaczke Z., Pociğcha E. 2015. Disturbances in Production of Progesterone and Their Implications in Plant Studies, *Steroids*, 96: 153-163.
- [4] Erdal S., Dumlupinar R. 2011. Mammalian Sex Hormones Stimulate Antioxidant System and Enhance Growth of Chickpea Plants, *Acta Physiologia Plantarum*, 33: 1011-1017.
- [5] Erdal S. 2012. Alleviation of Salt Stress in Wheat Seedlings by Mammalian Sex Hormones, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92: 1411-1416.
- [6] Erdal S. 2012. Exogenous Mammalian Sex Hormones Mitigate Inhibition in Growth by Enhancing Antioxidant Activity and Synthesis Reactions in Germinating Maize Seeds Under Salt Stress, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92: 839-843.
- [7] Chaoui A., El Ferjani E. 2014. Heavy Metal-induced Oxidative Damage is Reduced by beta-Estradiol Application in Lentil Seedlings, *Plant Growth Regulation*, 74: 1-9.
- [8] Janeczko A., Oklest'kova J., Siwek A., Dziurka M., Pociğcha E., Kocurek M., Novak O. 2013. Endogenous Progesterone and its Cellular Binding Sites in Wheat Exposed to Drought Stress, *Journal of Steroid Biochemistry*, 138: 384-394.
- [9] Hu C., Hermann G., Pen-Mouratov S., Shore L., Steinberger Y. 2011. Mammalian Steroid Hormones can Reduce Abundance and Affect the Sex Ratio in a Soil Nematode Community, *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 142: 275-279.
- [10] Agarwal M.K. 1993. Receptors for Mammalian Steroid-Hormones in Microbes and Plants, *Febs Letters*, 322: 207-210.
- [11] Dumlupinar R., Genisel M., Erdal S., Korkut T., Taspınar M.S., Taskin M. 2011. Effects of Progesterone, beta-Estradiol, and Androsterone on the Changes of Inorganic Element Content in Barley Leaves, *Biological Trace Element Research*, 143: 1740-1745.
- [12] Erdal S., Genisel M. 2016. The Property of Progesterone to Mitigate Cold Stress in Maize is Linked to a Modulation of the Mitochondrial Respiratory Pathway, *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, 28: 385-393.
- [13] Erdal S., Genisel M., Turk H., Gorcek Z. 2012. Effects of Progesterone Application on Antioxidant Enzyme Activities and K⁺/Na⁺ Ratio in Bean Seeds Exposed to Salt Stress, *Toxicology and Industrial Health*, 28: 942-946.

- [14] Simersky R., Novak O., Morris D.A., Pouzar V., Strnad M. 2009. Identification and Quantification of Several Mammalian Steroid Hormones in Plants by UPLC-MS/MS, *Journal of Plant Growth Regulation*, 28: 125-136.
- [15] Su X.Y., Wu S., Yang L., Xue R.L., Li H., Wang Y.X., Zhao H.J. 2014. Exogenous Progesterone Alleviates Heat and High Light Stress-induced Inactivation of Photosystem II in Wheat by Enhancing Antioxidant Defense and D1 Protein Stability, *Plant Growth Regulation*, 74: 311-318.
- [16] Jumrani K., Bhatia V.S. 2018. Impact of Combined Stress of High Temperature and Water Deficit on Growth and Seed Yield of Soybean, *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 24: 37-50.
- [17] Barrs H.D., Weatherley P.E. 1962. A Re-Examination of the Relative Turgidity Techniques for Estimating Water Deficits in Leaves, *Australian Journal of Biological Sciences*, 15: 413-428.
- [18] Serdar U., Demirsoy H. 2006. Non-destructive Leaf Area Estimation in Chestnut, *Scientia Horticulturae*, 108 (2): 227-230.
- [19] Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D.C. 1985. Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid, *Analytical Biochemistry*, 150: 76-85.
- [20] Dische Z. 1947. New Characteristic Color Reactions of Carbohydrates with SH Compounds in H₂SO₄, *Federation Proceedings*, 6: 248.
- [21] Witham F.H., Blaydes B.F., Devlin R.M. 1971. *Experiments in Plant Physiology*, Van Nostrand Reinhold, New York, USA, 167-200.
- [22] Sharkey T.D., Savitch L.V., Butz N.D. 1991. Photometric-Method for Routine Determination of Kcat and Carbamylation of Rubisco, *Photosynthesis Research*, 28: 41-48.
- [23] Janeczko A. 2000. Influence of Selected Steroids on Plant Physiological Processes – Especially Flowering Induction, Agricultural University, Phd thesis, Krakow, Poland.
- [24] Erdal S., Dumlupinar R. 2010. Progesterone and beta-Estradiol Stimulate Seed Germination in Chickpea by Causing Important Changes in Biochemical Parameters, *Zeitschrift für Naturforschung C*, 65: 239-244.
- [25] Erdal S., Dumlupinar R., Cakmak T., Genisel M. 2010. Mammalian Sex Hormones Influence Germination Velocity and Enzyme Activities in Germinating Maize Seeds, *Fresenius Environmental Bulletin*, 19: 1458-1465.
- [26] Erdal S. 2009. Effects of Mammalian Sex Hormones on Antioxidant Enzyme Activities, H₂O₂ Content and Lipid Peroxidation in Germinating Bean Seeds, *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 40: 79-85.
- [27] Yang Y., Wei X., Lu J., You J., Wang W., Shi R. 2010. Lead-induced Phytotoxicity Mechanism Involved in Seed Germination and Seedling Growth of Wheat (*Triticum aestivum* L.), *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73: 1982-1987.
- [28] Genisel M., Turk H., Erdal S., Demir Y., Genc E., Terzi I. 2015. Ameliorative Role of beta-Estradiol Against Lead-induced Oxidative Stress and Genotoxic Damage in Germinating Wheat Seedlings, *Turkish Journal of Botany*, 39: 1052-1060.
- [29] Kopcewicz J. 1969. Influence of Estrone on Growth and Endogenous Gibberellins Content in Dwarf Pea, *Bulletin de L'Academie Polonaise des Sciences*, 17 (11): 727-731.
- [30] Dogra R., Thukral A.K. 1994. Effect of Steroid and Plant Hormones on Growth of Maize cv. Canga 5, *Crops Research*, 2: 42-47.
- [31] Genisel M., Turk H., Erdal S. 2013. Exogenous Progesterone Application Protects Chickpea Seedlings Against Chilling-induced Oxidative Stress, *Acta Physiology Plantarum*, 35: 241-251.
- [32] Dogra R., Thukral A.K. 1991. Effect of Steroids on Some Growth and Biochemical Parameters of *Triticum aestivum* L. During Germination, *Crops Research*, 8: 611-620.
- [33] Kaur G., Kumar S., Thakur P., Malik J.A., Bhandhari K., Sharma K.D., Nayyar H. 2011. Involvement of Proline in Response of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) to Chilling Stress at Reproductive Stage, *Scientia Horticulturae*, 128: 174-181.
- [34] Dogra R., Thukral A.K. 1989. Effect of Steroid and Plant Hormones on Growth of Maize cv. Ganga 5, *Crops Research*, 2: 42-48.
- [35] Omalley B.W., Means A.R. 1974. Female Steroid-Hormones and Target-Cell Nuclei, *Science*, 183: 610-620.
- [36] Gioelli F. 1942. Die Wirkung des Follikelhormons (Ostradiol, Dihydrofollikulin) auf Kulturen Pflanzlicher Gewebe in vitro, *Archives of Biological Sciences*, 28: 311.

- [37] Swamy K.N., Rao S.S.R. 2009. Effect of 24-Epibrassinolide on Growth, Photosynthesis, and Essential Oil Content of *Pelargonium graveolens* (L.) Herit, Russian Journal of Plant Physiology, 56: 616-620.
- [38] Yang X.H., Xu Z.H., Xue H.W. 2005. Arabidopsis Membrane Steroid Binding Protein 1 is Involved in Inhibition of Cell Elongation, Plant Cell, 17: 116-131.
- [39] Mori D., Ogino N., Yonezawa T. 2011. Kawaminami M., Kurusu S., Anti-ovulatory Effects of RU486 and Trilostane Involve Impaired Cyclooxygenase-2 Expression and Mitotic Activity of Follicular Granulosa Cells in Rats, Prostaglandins Other Lipid Mediators, 94: 118-123.
- [40] Rung E., Friberg P.A., Shao R., Larsson D.G., Nielsen E., Svensson P.A., Carlsson B., Carlsson L.M., Billig H. 2005. Progesterone-receptor Antagonists and Statins Decrease de novo Cholesterol Synthesis and Increase Apoptosis in Rat and Human Perioovulatory Granulosa Cells in vitro, Biology of Reproduction, 72: 538-545.
- [41] Yokota T., Nomura T., Nakayama M. 1997. Identification of Brassinosteroids that Appear to be Derived from Campesterol and Cholesterol in Tomato Shoots, Plant and Cell Physiology, 38: 1291-1294.