

Atf İçin: Çatav, Ş. S. ve Akbaş, K. (2023). Duman ve Duman Kökenli Bileşiklerin *Liquidambar orientalis* Mill. (Anadolu Sığla Ağacı)'in Tohum Çimlenmesi Üzerindeki Etkileri. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(4), 2393-2402.

To Cite: Çatav, Ş. S. & Akbaş, K. (2023). The Effects of Smoke and Smoke-Derived Compounds on Seed Germination of *Liquidambar orientalis* Mill. (Anatolian Sweetgum Tree). *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13(4), 2393-2402.

Duman ve Duman Kökenli Bileşiklerin *Liquidambar orientalis* Mill. (Anadolu Sığla Ağacı)'in Tohum Çimlenmesi Üzerindeki Etkileri

Şükrü Serter ÇATAV^{1*}, Kenan AKBAŞ²

Öne Çıkanlar:

- Duman, KAR₁ ve mandelonitril *L. orientalis*'in çimlenmesini uyardı
- Işığın çimlenme üzerinde pozitif bir etkisi vardı
- GA₃ ve ROT, dumanla indüklenen çimlenmede rol alabilir

Anahtar Kelimeler:

- Duman suyu
- Karrikinolid
- Giberellik asit
- Reaktif oksijen türleri
- Siyanohidrin

ÖZET:

Duman ve duman kökenli bileşikler, bitkilerde tohum çimlenmesi, somatik embriyogenez ve çiçeklenme gibi fizyolojik ve gelişimsel süreçleri düzenleyebilmektedir. Dumanla ilişkili çimlenme yanıtları, karrikinler, gliseronitril, siringaldehit, katekol ve 3,4,5-trimetilfuran-2(5H)-on gibi uyarıcı ve inhibe edici bileşiklerin mevcudiyeti nedeniyle oldukça karmaşık bir yapıya sahiptir. Bu çalışmada, duman suyu, karrikinolid (KAR₁), mandelonitril (MAN) ve katekol (KAT) uygulamalarının *Liquidambar orientalis* Mill.'in tohum çimlenmesi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Ayrıca KAR₁ ve siyanohidrin ile indüklenen tohum çimlenmesinde rol aldıkları düşünülen giberellik asit (GA₃) ve reaktif oksijen türleri de (ROT) deneylere dâhil edilmiştir. ROT uygulamaları için hidrojen peroksit ve metil violojen çözeltileri kullanılmıştır. Çimlenme deneyleri, 20 °C'ye ayarlanmış inkübatörlerde farklı ışık koşulları altında gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın sonuçları, *L. orientalis* tohumlarının dumana karşı duyarlı olduğunu göstermiştir. Buna ek olarak, 0.01 ve 0.1 µM KAR₁ ve 50 µM MAN solüsyonları hem karanlık hem de aydınlık koşullar altında çalışma türünün çimlenmesini teşvik etmiştir ($p < 0.05$). Öte yandan, KAT uygulamaları çimlenme üzerinde olumlu veya olumsuz bir etki yaratmamıştır. KAR₁ ve siyanohidrine hassas olan *L. orientalis* tohumları 10⁻⁵ ila 10⁻³ M konsantrasyon aralığında GA₃'e karşı pozitif bir çimlenme cevabı vermiştir. GA₃ uygulamaları yüksek çimlenme başarısı için ışığa olan gereksinimi de ortadan kaldırmıştır. ROT ile uyarılan çimlenme ise sadece ışık varlığında gözlemlenmiştir. Bu çalışmadan elde edilen bulgular, dar yayılışlı bir tür olan *L. orientalis*'in çimlenme başarısını arttırmak için kullanılabilir.

The Effects of Smoke and Smoke-Derived Compounds on Seed Germination of *Liquidambar orientalis* Mill. (Anatolian Sweetgum Tree)

Highlights:

- Smoke, KAR₁, and mandelonitrile stimulated the germination of *L. orientalis*
- The light had a positive impact on germination
- GA₃ and ROS may be involved in smoke-induced germination

Keywords:

- Smoke-water
- Karrikinolide
- Gibberellic acid
- Reactive oxygen species
- Cyanohydrin

ABSTRACT:

Smoke and smoke-derived compounds can regulate physiological and developmental processes, such as seed germination, somatic embryogenesis, and flowering in plants. Smoke-related germination responses are highly complex due to the presence of stimulatory and inhibitory compounds, such as karrikins, glyceronitrile, syringaldehyde, catechol, and 3,4,5-trimethylfuran-2(5H)-one. In this study, the effects of smoke water, karrikinolide (KAR₁), mandelonitrile (MAN), and catechol (CAT) treatments on seed germination of *Liquidambar orientalis* Mill. were investigated. Moreover, gibberellic acid (GA₃) and reactive oxygen species (ROS), which are thought to play a role in KAR₁- and cyanohydrin-induced seed germination, were also included in the experiments. Hydrogen peroxide and methyl viologen solutions were used for ROS treatments. Germination experiments were carried out under different light conditions in incubators set at 20 °C. The results of the study showed that *L. orientalis* seeds were sensitive to smoke. In addition, 0.01 and 0.1 µM KAR₁ and 50 µM MAN solutions promoted the germination of the study species under both dark and light conditions ($p < 0.05$). On the other hand, CAT treatments did not have a positive or negative effect on germination. *L. orientalis* seeds sensitive to KAR₁ and cyanohydrin gave a positive germination response to GA₃ in the concentration range of 10⁻⁵ to 10⁻³ M. GA₃ treatments also eliminated the requirement of light for high germination success. ROS-induced germination was only observed in the presence of light. The findings of this study can be used to increase the germination success of *L. orientalis*, a narrowly distributed species.

¹Şükrü Serter ÇATAV (Orcid ID: 0000-0002-9934-254X), Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Muğla, Türkiye

²Kenan AKBAŞ (Orcid ID: 0000-0002-0198-4668), Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Köyceğiz Meslek Yüksekokulu, Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü, Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Programı, Muğla, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Şükrü Serter ÇATAV, e-mail: sertercatav@mu.edu.tr

GİRİŞ

Yangınlar sonucu açığa çıkan dumanın, tohum çimlenmesi, kök büyümesi ve fotomorfogenez de dâhil olmak üzere bitkilerde çeşitli fizyolojik ve gelişimsel süreçleri etkileyen birçok bileşiği içerdiği bilinmektedir (Wang ve ark., 2017; Waters ve Nelson, 2023). Selüloz kökenli karrikinler (KAR) ve gliseronitril (bir siyanohidrin), tohum çimlenmesinin uyarılmasında rol alan başlıca duman kimyasallarıdır (Çatav ve ark., 2018). Karrikinler ile siyanohidrinlerin etkileşiminin çimlenme üzerinde aditif ve sinerjistik etkiler oluşturabileceği de bildirilmiştir (Çatav ve Akbaş, 2021). Ayrıca dumanda bulunan benzaldehit, hidrokinon ve siringaldehit gibi lignin kökenli bileşiklerin bazı türlerde (örneğin, *Heteropogon contortus* (L.) P.Beauv. ex Roem. & Schult. ve *Nicotiana attenuata* Torr. ex S.Watson) çimlenmeyi teşvik ettikleri gösterilmiştir (Cao ve ark., 2023). Bunlara ek olarak, dumanın önemli bir bileşeni olan katekolün, reaktif oksijen türleri (ROT) aracılı redoks sinyalizasyonu ile birincil kök büyümesini ve kök tüyü uzamasını etkileyebileceği ortaya konulmuştur (Wang ve ark., 2017). Öte yandan, duman, yüksek konsantrasyonlarda çimlenmeyi engelleyen veya KAR₁'e (karrikinolid) karşı antagonistik etki gösteren birçok bileşiği de ihtiva etmektedir (Baldwin ve ark., 1994; Lee ve ark., 2021). Genel olarak değerlendirildiğinde, dumanla ilişkili bitki yanıtları, çoklu uyarıcı ve inhibe edici kimyasalların varlığı ve etkileşimi nedeniyle oldukça karmaşık bir yapıya sahiptir.

Arabidopsis thaliana (L.) Heynh.'da gerçekleştirilen bir ileri genetik taramanın sonuçları karrikin sinyal yolunun keşfine yol açmıştır (Nelson ve ark., 2012). Karrikinlerin algılanmasında, α/β hidrolaz reseptör proteini KAI2/HTL (KARRIKIN INSENSITIVE2 / HYPOSENSITIVE TO LIGHT, buradan sonra KAI2 olarak adlandırılacaktır) önemli bir rol oynamaktadır. Bu protein, poliübikitinasyon ve proteazomal bozunma için SMAX1 (SUPPRESSOR OF MAX2 1) ve SMXL2 (SMAX1-LIKE2) baskılayıcı proteinlerini hedeflemek üzere E3 ubiquitin ligaz kompleksi SCF^{MAX2} (Skp1-Cullin-F-box^{MAX2}) ile birlikte çalışmaktadır. Baskılayıcı proteinlerin degradasyonunun, tohum çimlenmesi, fide fotomorfogenezi ve abiotik stres toleransı gibi süreçleri etkileyebileceği gösterilmiştir (Yao ve Waters, 2020; Waters ve Nelson, 2023). Tüm streptofitlerde bulunan KAI2 geninin yaklaşık bir milyar yıl önce yatay gen transferi yoluyla proteobakterilerden edinildiği ileri sürülmüştür (Wang ve ark., 2022). Yangınlara dair en eski kanıtların 420 milyon yıl öncesine tarihlendiği ve karrikinlerin de yanan bitki materyaliyle ilişkili olduğu düşünüldüğünde, KAI2'nin tanımlanamayan bir molekül için reseptör olduğu varsayılmaktadır. Bu nedenle, karrikinlerin veya olası karrikin metabolitlerinin “KAI2 ligandı (KL)” olarak da adlandırılan bu molekülü taklit ettikleri düşünülmektedir (Scott ve Glasspool, 2006; Yao ve ark., 2021). Yangını takip eden bazı türlerin karrikinlere olan aşırı hassasiyeti ise KAI2'nin duplikasyonu sonrasında paralog genlerden birinin KL'ye göre artan KAR₁ duyarlılığıyla açıklanmaktadır (Martinez ve ark., 2022).

Tohumlarda, duman bileşiklerine maruziyetle ilgili fizyolojik değişiklikleri anlamaya yönelik artan bir ilgi vardır. *Avena fatua* L. ve *A. thaliana*'da, KAR₁ ile uyarılan çimlenme için giberellin biyosentezine gereksinim olduğu belirlenmiştir (Nelson ve ark., 2009; Rudus ve ark., 2019). Buna ek olarak, KAR₁'le muamele edilmiş tohumlarda çimlenme ve dormansi ile ilişkili endojen hormon (örneğin, absisik asit ve etilen) seviyelerinin değiştiği tespit edilmiştir (Sami ve ark., 2021). Ayrıca marul tohumlarında alfa-amilaz ve lipaz aktivitelerinin KAR₁'e yanıt olarak arttığı ortaya konulmuştur (Gupta ve ark., 2019). Gliseronitrilin tohumlarda neden olduğu değişimlere yönelikse doğrudan bir çalışma bulunmamaktadır. Öte yandan, bu bileşiğin hidrolizi sonrasında açığa çıkan siyanürün çimlenmeyi indüklediği bilinmektedir (Flematti ve ark., 2015). Siyanürün aracılık ettiği dormansi

kırılmasına da ROT ile etilen biyosentetik yolunun dâhil olduğu öne sürülmüştür (Oracz ve ark., 2009; Gniazdowska ve ark., 2010).

Liquidambar orientalis Mill. (Anadolu sıgla ağacı veya günlük ağacı) Altingiaceae familyasında yer alan dar yayılışlı bir türdür. Doğal *L. orientalis* popülasyonları ülkemizin güneybatı kısımlarında (özellikle Köyceğiz, Marmaris ve Fethiye ilçeleri) ve Rodos adasında bulunmaktadır (Arslan ve Şahin, 2016). Tarım, turizm ve kentleşme gibi antropojenik faaliyetler nedeniyle *L. orientalis* ormanları bugün yalnızca 1500 ila 2000 hektarlık bir alanı kapsamaktadır (Ürker ve ark., 2014). *L. orientalis*'den elde edilen reçine (balsam, storax ve styrax şeklinde de adlandırılmaktadır) fitoterapide yaygın olarak kullanılırken, artan habitat tahribatı reçine üretimini de önemli ölçüde azaltmıştır (Öztürk ve ark., 2008; Nalbantsoy ve ark., 2016). *L. orientalis* yaprak ve reçine ekstraktlarının antimikrobiyal, antimutajenik ve hepatoprotektif etkilere sahip olduğu birçok araştırmada gösterilmiştir (Saraç ve Şen, 2014; Suzek ve ark., 2015; Keskin ve Güvensen, 2022).

Bu çalışmada, ekolojik ve ekonomik açıdan önemli bir bitki olan *L. orientalis*'in duman ve duman bileşiklerine olan çimlenme cevabı incelenmiştir. Buna ek olarak, KAR₁ ve siyanür ile indüklenen çimlenmede rol aldıkları düşünülen GA₃ ve ROT da deneylere dâhil edilmiştir. Çalışma kapsamında aşağıdaki araştırma soruları ele alınmıştır. (1) *L. orientalis* tohumları dumana karşı duyarlı mıdır? (2) KAR₁ ve diğer duman kimyasalları çimlenmeyi uyarabilir mi? (3) *L. orientalis* tohumları KAR₁ ve siyanüre karşı hassas ise GA₃ ve ROT'a olan çimlenme yanıtları nedir? (4) Işığın çimlenme üzerinde bir rolü var mıdır? (5) Tohumların oda koşullarında kısa süreli muhafazası dormansi kaybına neden olur mu? Bu araştırma soruları doğrultusunda, *L. orientalis*'de tohum çimlenmesinin en az bir duman bileşiği tarafından tetiklenebileceği ve GA₃ veya ROT'un çimlenmeye dâhil olabileceği varsayılmıştır.

MATERYAL VE METOT

Çalışma Bölgesi, Bitki Materyali ve Tohumların Toplanması

Bu araştırmanın arazi çalışmaları, 2 Kasım 2017 tarihinde Köyceğiz ilçesi Toparlar mevkiindeki Sıgla ormanında gerçekleştirilmiştir. Çalışma bölgesinde Akdeniz iklimi görülmekte olup, yıllık ortalama sıcaklık ve toplam yağış miktarı sırasıyla 16,43 °C ve 861 mm'dir. *Liquidambar orientalis* Mill. meyveleri, aralarında en az 50 m mesafe bulunan 15 farklı bireyden toplanmış ve kâğıt zarflara yerleştirilmiştir. Meyveler laboratuvara getirildikten sonra oda koşullarında 3 hafta bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda, tohumlar ayıklanmış ve deneyler başlayana kadar kapalı cam şişelerde muhafaza edilmiştir. Bir tohumun ortalama ağırlığını belirlemek için 300 adet tohumun 4 farklı örneği tartılmış ve elde edilen veriler kullanılarak ortalama ve standart hata hesaplanmıştır (2.56 ± 0.08 mg, Pérez-Harguindeguy ve ark., 2013).

Çimlenme Protokolü

Dumanla uyarılan tohum çimlenmesi ile ilişkili mekanizmalara daha fazla ışık tutmak için bu çalışmada üç farklı deney gerçekleştirilmiştir. Bu deneylerde, aksi belirtilmedikçe aşağıdaki çimlenme protokolü uygulanmıştır. Sıgla ağacı tohumları, %1 (a/h) NaClO ve birkaç damla Tween-20 içeren 200 mL solüsyonla 10 dk boyunca sterilize edilmiş ve distile su (dH₂O) ile durulanmıştır. Tohumlar daha sonra 2 adet Whatman No. 1 filtre kâğıdı ile 4 mL dH₂O (kontrol) veya uygulama çözeltisi içeren steril petri kaplarına (60 mm) aktarılmıştır. Petri kapları parafilm ile kaplanarak, 20.0 °C'ye ayarlanmış 2 farklı inkübatöre yerleştirilmiştir. Bu inkübatörlerden biri daimî karanlık diğeri ise 16/8 fotoperiyot (75 µmol m⁻² s⁻¹) olacak şekilde programlanmıştır. Çimlenme kontrolleri haftada bir loş ışık altında yapılmış ve her bir kontrolde çimlenmiş tohumlar petri kaplarından çıkarılmıştır. 0.5 cm'den büyük

radikula çıkışı çimlenme kriteri olarak belirlenmiştir (ISTA, 1996). Deneyler başlangıç tarihlerinden 7 hafta sonra sonlandırılmıştır (Tavşanoğlu ve ark., 2017). Çimlenmeyen tohumların canlı olup olmadıklarını tespit etmek için kesme testi uygulanmıştır (Çatav ve Akbaş, 2021).

Çimlenme Deneyleri

Duman suyu, Çatav ve ark. (2018) tarafından belirtilen protokole göre buğday samanı yakılarak hazırlanmıştır. Çimlenme deneylerinde kullanılan kimyasallara ait genel bilgiler (kimyasalın kısaltması, seçilen konsantrasyonlar için referans makaleler vb.) ise Çizelge 1'de gösterilmiştir. Birinci deneyde, duman ve duman kökenli bileşiklerin çimlenme üzerindeki etkileri test edilmiştir. Bu kapsamda, DS (%2.5 ve %5), KAR₁ (0.01 ve 0.1 µM), MAN (10 ve 50 µM) ve KAT (10 ve 50 µM) solüsyonları kullanılmıştır. İkinci deneyde, *L. orientalis* tohumlarının GA₃ çözeltilerine (10⁻⁶, 10⁻⁵, 10⁻⁴ ve 10⁻³ M) olan çimlenme yanıtları belirlenmiştir. Üçüncü deneyde, H₂O₂ (1 ve 5 mM) ve MV (0.1 ve 1 mM) çözeltilerin çimlenme üzerindeki etkileri incelenmiştir. MV uygulamaları için tohumlar öncelikle 3 saat boyunca ilgili çözeltilerde bekletilmiş ve daha sonra dH₂O içeren petri kaplarına aktarılmıştır. Çimlenme deneylerinde gerçekleştirilen tüm uygulamalar için 20 tohumun 4 farklı örneği kullanılmıştır. Birinci deneye 11 Ocak 2018, ikinci ve üçüncü deneylere ise 9 Mart 2018 tarihinde başlanılmıştır.

Çizelge 1. Çalışmada kullanılan kimyasalların genel özellikleri

Çözelti veya bileşik	Kısaltma	Özellik	Referans çalışma
Duman suyu	DS	Duman ile hazırlanan bir çözelti	Çatav ve ark. (2018)
Karrikinolid	KAR ₁	Dumanın yapısında bulunan bir bileşik	Çatav ve Akbaş (2021)
Mandelonitril	MAN	Bir siyanohidrin	Çatav ve Akbaş (2021)
Katekol	KAT	Dumanın yapısında bulunan bir bileşik	Wang ve ark. (2017)
Metil violojen	MV	ROT üreten bir bileşik	Cembrowska-Lech ve ark. (2015)
Hidrojen peroksit	H ₂ O ₂	Önemli bir ROT	Cembrowska-Lech ve ark. (2015)
Giberellik asit	GA ₃	Çimlenmede rol alan bir fitohormon	Rudus ve ark. (2019)

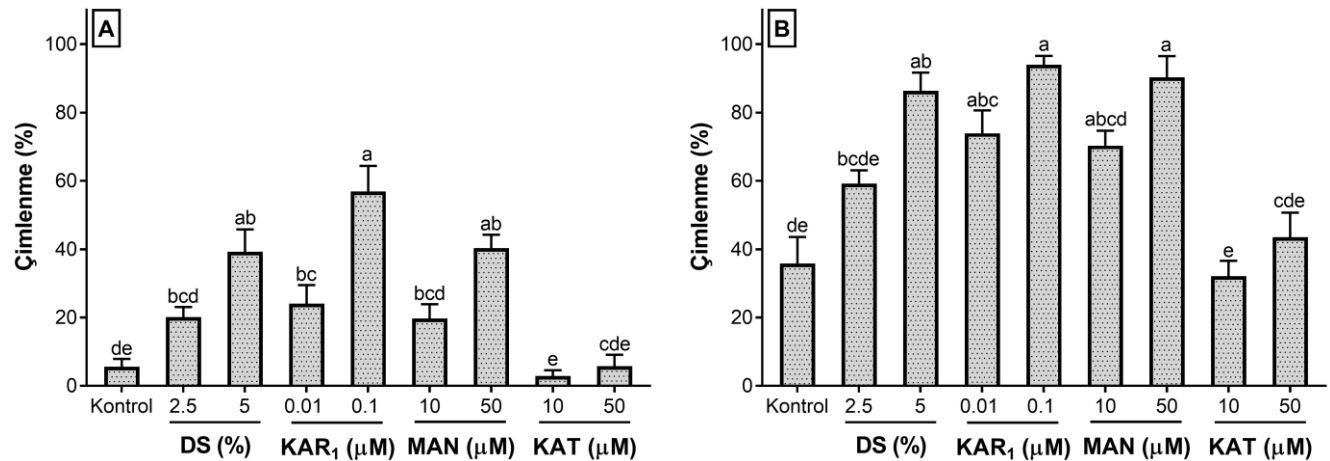
Data Analizi

İstatistiksel analizler öncesinde, çimlenme yüzdeleri 0 ile 1 arasındaki değerlere çevrilmiş ve arcsin-karekök dönüşümüne tabi tutulmuştur (Downes ve ark., 2013). Her bir çimlenme deneyi ve ışık koşulu için uygulamalar arasında fark olup olmadığı tek yönlü varyans analizi ile değerlendirilmiştir. Çoklu karşılaştırmalarda ise Tukey'in HSD testi kullanılmıştır. Buna ek olarak, uygulama ve ışık etkileşiminin çimlenme üzerindeki etkisini belirlemek için iki yönlü varyans analizinden faydalanılmıştır. Tüm analizler için anlamlılık seviyesi 0.05 olarak kabul edilmiştir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Bitki kökenli dumanın, tohum çimlenmesi, köklenme, çiçeklenme ve somatik embriyogenez gibi süreçleri uyarabildiği bilinmektedir (Light ve ark., 2007; Keþczyński, 2020; Martinez ve ark., 2022). Dumanla indüklenen tohum çimlenmesinde karrikinler ve gliseronitril etkin bir rol oynamaktadır (Cao ve ark., 2023). Dumanın önemli bir bileşeni olan katekolün ise 0.5-500 µg/mL (4.54 ila 4540 µM) konsantrasyon aralığında çimlenmeyi inhibe ettiği bildirilmiştir (Baldwin vd., 1994). Bunlara ek olarak, duman ve KAR₁'in bazı türlerde çimlenme için ışığa olan gereksinimi de kısmen karşılayabildikleri gösterilmiştir (Merritt ve ark., 2006; Abu ve ark., 2016). Bu çalışma kapsamında, duman ve dumanın yapısında bulunan bazı bileşiklerin *L. orientalis*'in çimlenmesi üzerindeki etkileri incelenmiştir. DS, KAR₁ ve MAN uygulamaları konsantrasyona bağlı olarak hem karanlık hem de aydınlık koşullar altında çimlenmeyi teşvik etmiştir (Şekil 1). KAT uygulamaları ise çimlenme

üzerinde negatif veya pozitif bir etkiye yol açmamıştır. Elde edilen bu sonuç, Baldwin ve ark. (1994)'nin bulgularıyla uyuşmamaktadır. İlgili çalışmada, 4.54 μM ve üzeri katekol konsantrasyonlarının *Nicotiana attenuata*'da çimlenmeyi baskıladığı rapor edilmiştir. Mevcut çalışmada ise 10 ve 50 μM katekolün *L. orientalis*'de tohum çimlenmesini etkilemediği ortaya konulmuştur. Bu çelişkiye, test edilen türlerin katekole karşı tolerans seviyelerindeki farklılıklar neden olabilir. Bu araştırmanın bir diğer önemli bulgusu da ışığın çimlenme üzerindeki uyarıcı etkisidir (Çizelge 2). *L. orientalis*'de karanlık koşullar altında uygulamalara ait ortalama çimlenme yüzdesi 23.8 iken, 16/8 (aydınlık/karanlık) fotoperiyot altında bu değer 65.1 olarak tespit edilmiştir.



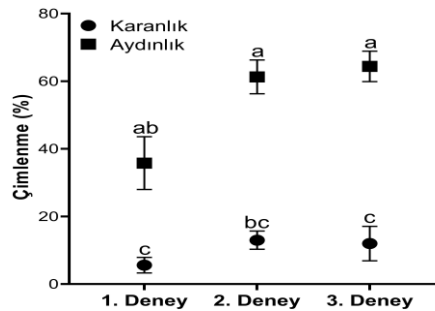
Şekil 1. Duman ve dumanın yapısında bulunan bazı bileşiklerin *L. orientalis*'de tohum çimlenmesi üzerine etkileri. A) Karanlık koşullar - B) 16/8 fotoperiyot. Sonuçlar, 4 tekrerrün ortalaması ve standart hatası şeklinde sunulmuştur. Hata çubukları üzerindeki farklı harfler çoklu karşılaştırma testine göre anlamlı ($p < 0.05$) farklılıkları belirtmektedir

Çizelge 2. İki yönlü varyans analizinin sonuçları. %, toplam varyasyon yüzdesini temsil etmektedir.

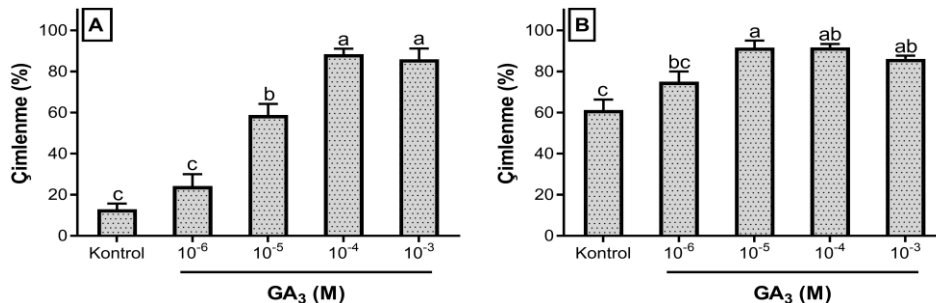
Deney	Uygulama		Işık		Uygulama x Işık		Kalıntı (Hata)
	%	p	%	p	%	p	
1. Duman ve bileşenleri	43.64	< 0.0001	44.73	< 0.0001	0.67	0.908	10.96
2. Giberellik asit	54.47	< 0.0001	22.47	< 0.0001	13.67	< 0.0001	9.39
3. ROT	3.09	0.095	81.78	< 0.0001	4.47	0.028	10.65

Tohumlarda olgunlaşma sonrası dönemde (after-ripening period), oda koşullarında muhafazanın dormansi kaybına yol açabileceği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Kępczyński ve ark., 2013; Tavşanoğlu ve ark., 2017; Nguyen ve ark., 2022). Örneğin, dormant *Avena fatua* tohumlarında 2, 4, 8 ve 12 haftalık kuru muhafaza sonrasında çimlenme testleri gerçekleştirmiştir. Dört haftalık kuru muhafazanın tohum dormansisini azalttığı belirlenmiştir. On iki haftalık kuru muhafaza sonrasında ise tohumların tamamı çimlenmiştir (Kępczyński ve ark., 2013). Atay (1985), *L. orientalis* tohumlarında hafif bir çimlenme engelinin olduğunu ve dormansi kaybına uğramış tohumlarda ortalama %70 çimlenme görüldüğünü rapor etmiştir. Mevcut çalışmada, oda koşullarında 70 ve 127 gün boyunca muhafaza edilen *L. orientalis* tohumların çimlenme yüzleri karşılaştırılmıştır. Karanlık koşullar altında %5.6 ila %13.0, aydınlık koşullar altındaysa %35.8 ila %64.4 çimlenme gözlemlenmiştir (Şekil 2). Her bir inkübasyon koşulu için 70 ve 127 günlük tohumlar arasında çimlenme yüzdesi açısından kayda değer bir farklılık bulunmamıştır ($p > 0.05$). Öte yandan, 127 gün boyunca muhafaza edilen tohumların ışığa olan hassasiyeti kısmen artmıştır. Sonuçlarımız, *L. orientalis* tohumlarında hafif-orta düzey bir dormansi olduğunu ve tohumların uzun süreli muhafazasının çimlenme engelini giderebileceğini göstermektedir.

Giberellinler (GA), tohum dormansisi ve çimlenmenin düzenlenmesinde yer alan önemli bir fitohormon grubudur. Su alımı sonrasında, tohumlarda GA biyosentezinden sorumlu genlerin (örneğin, *GA3ox1* ve *GA3ox2*) ekspresyonu artmakta ve embriyoda *de novo* GA sentezi gerçekleşmektedir (Yan ve Chen, 2020). Dumanla indüklenen çimlenmede, GA'nın bir rolünün olup olmadığı çeşitli çalışmalarda incelenmiştir. Bu kapsamda, eksojen GA_3 uygulamalarının KAR_1 'e duyarlı birçok türün çimlenmesini tetiklediği gösterilmiştir (Nelson ve ark., 2012; Cembrowska-Lech ve ark., 2015). Buna ek olarak, paclobutrazol ve ancymidol gibi GA biyosentez inhibitörlerinin KAR_1 ile uyarılan çimlenmeyi baskıladıkları belirlenmiştir (Kępczyński, 2018). KAR_1 'in ayrıca *A. thaliana* tohumlarındaki *GA3ox1* ve *GA3ox2* genlerinin ifadelerini arttırdığı bildirmiştir (Nelson ve ark., 2009). Öte yandan, duman ve KAR_1 'in endojen GA seviyeleri üzerindeki etkilerine yönelik farklı sonuçlar bulunmaktadır (Schwachtje ve Baldwin, 2004; Nelson ve ark., 2009; Sami ve ark., 2021). Bu çalışmada, KAR_1 'e duyarlılık gösteren *L. orientalis* tohumlarının GA_3 'e olan çimlenme yanıtı da test edilmiştir. 10^{-6} M hariç tüm GA_3 konsantrasyonları hem karanlık hem de aydınlık koşullar altında çimlenmeyi teşvik etmiştir (Şekil 3). 10^{-5} M GA_3 ile muamele edilen *L. orientalis* tohumlarında aydınlık koşullarda %91.7 çimlenme elde edilmiştir. İki yönlü varyans analizinin sonuçları, "uygulama x ışık" etkileşiminin anlamlı olduğunu göstermiştir (Çizelge 2). Örneğin, 10^{-4} ve 10^{-3} M GA_3 uygulamaları ışığa olan gereksinimi neredeyse ortadan kaldırmıştır (Şekil 3A). Mevcut bulgular, önceki çalışmalarla uyumlu olup, KAR_1 'e duyarlılık ve GA_3 'e yanıt arasında pozitif bir ilişkinin olduğunu vurgulamaktadır.



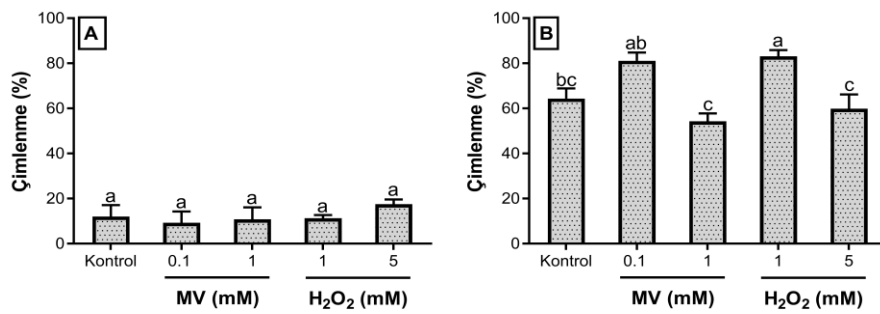
Şekil 2. 70 ve 127 gün boyunca kuru muhafaza edilen *L. orientalis* tohumlarının kontrol koşullarındaki çimlenme yüzdeleri. 1. deneyde 70 günlük, 2. ve 3. deneylerde ise 127 günlük tohumlar kullanılmıştır. Sonuçlar, 4 tekrerrün ortalaması ve standart hatası şeklinde sunulmuştur. Hata çubukları üzerindeki farklı harfler çoklu karşılaştırma testine göre anlamlı ($p < 0.05$) farklılıkları belirtmektedir.



Şekil 3. Farklı GA_3 uygulamalarının *L. orientalis*'de tohum çimlenmesi üzerine etkileri. A) Karanlık koşullar - B) 16/8 fotoperiyot. Sonuçlar, 4 tekrerrün ortalaması ve standart hatası şeklinde sunulmuştur. Hata çubukları üzerindeki farklı harfler çoklu karşılaştırma testine göre anlamlı ($p < 0.05$) farklılıkları belirtmektedir.

Hidrojen peroksit ve hidroksil radikali gibi ROT'lar, "oksidatif pencere" olarak da tanımlanan statik ve toksik seviyeler arasındaki bir konsantrasyon aralığında, tohum dormansisinin ve çimlenmenin düzenlenmesinde görev alırlar (Bailly ve Merendino, 2021). Su alımı sonrasında, metabolik aktivitenin artması nedeniyle tohumların ROT içeriğinde belirgin bir yükselme

gözlenmektedir. NADPH oksidazlar, mitokondriyal elektron taşıma zinciri ve peroksizomlar çimlenmekte olan tohumlarda ROT'un ana kaynaklarıdır (Gomes ve Garcia, 2013). ROT'un çimlenme sırasında nükleer gen ifadesi, protein oksidasyonu, ABA ve GA sinyalizasyonu, hücre duvarının gevşemesi, aleuron tabakasında programlanmış hücre ölümü ve mikropilar endospermin zayıflatılması gibi süreçler üzerinde doğrudan veya dolaylı bir etkiye sahip olduğu bilinmektedir (Oracz ve Karpiński, 2016; Bailly, 2019). ROT'un siyanürün aracılık ettiği dormansi kırılmasında da yer aldığı gösterilmiştir (Puglia ve ark., 2022). Örneğin, siyanürün ROT oluşumu ve sinyalizasyonu ile ilişkili genleri (*NADPHox*, *POX*, *SerThrPK* vb.) regüle ettiği ve H_2O_2 ile süperoksit anyonu içeriklerini arttırdığı belirlenmiştir. Dahası, metil violojen ve H_2O_2 'nin siyanüre duyarlı ayçiçeği tohumlarında çimlenmeyi indüklediği ortaya konulmuştur (Oracz ve ark., 2009; Yu ve ark., 2022). Tüm bu bulgular doğrultusunda, siyanohidrine hassas olan *L. orientalis* tohumlarında da ROT ile uyarılan çimlenmenin görülebileceğini varsaydık. Sonuçlarımız, H_2O_2 ve MV uygulamalarının karanlık koşullar altında çimlenmeyi etkilemediklerini göstermiştir (Şekil 4A). Öte yandan, 1 mM H_2O_2 aydınlık koşullar altında çimlenme yüzdesini önemli ölçüde ($p < 0.05$) arttırmıştır (Şekil 4B). 0.1 mM MV ile muamele edilen tohumların çimlenme yüzdesinde de kontrole göre anlamlı olmayan bir artış kaydedilmiştir ($p = 0.084$). ROT uygulamalarının karanlık koşullar altında çimlenmeyi arttırmamasının sebebi test edilen H_2O_2 ve MV konsantrasyonlarıyla ilişkili olabilir. Limitli tohum sayısı nedeniyle bu çalışmada ROT uygulamaları için sadece 2 farklı H_2O_2 ve MV konsantrasyonu kullanılmıştır. Bununla birlikte, bazı araştırmalar, ROT'un çimlenmeyi ışığa bağımlı bir şekilde düzenleyebileceğini öne sürmektedir. Örneğin, H_2O_2 'nin farklı ışık dalga boylarına maruz kalan *A. thaliana* tohumlarında çimlenmeyi teşvik veya inhibe edebileceği gösterilmiştir (Lariguet ve ark., 2013). ROT'un siyanohidrinle uyarılan tohum çimlenmesindeki rolünü daha iyi kavramak için farklı ışık koşulları altında kapsamlı deneylerin yapılması gerekmektedir.



Şekil 4. H_2O_2 ve MV uygulamalarının *L. orientalis*'de tohum çimlenmesi üzerine etkileri. A) Karanlık koşullar - B) 16/8 fotoperiyot. Sonuçlar, 4 tekrerrün ortalaması ve standart hatası şeklinde sunulmuştur. Hata çubukları üzerindeki farklı harfler çoklu karşılaştırma testine göre anlamlı ($p < 0.05$) farklılıkları belirtmektedir

SONUÇ

Bu çalışmada, *L. orientalis*'in duman, duman bileşikleri (KAR₁, MAN ve KAT), GA₃ ve ROT'a olan çimlenme cevabı incelenmiştir. Sonuçlarımız, *L. orientalis* tohumlarının %5'lik duman suyuna karşı duyarlı olduğunu göstermiştir. Buna ek olarak, KAT dışındaki duman bileşikleri çalışma türünün çimlenmesini tetiklemiştir. KAR₁ ve siyanohidrine hassas olan *L. orientalis* tohumları hem karanlık hem de aydınlık koşullar altında GA₃'e pozitif bir çimlenme yanıtı vermiştir. Öte yandan, ROT'la uyarılan çimlenme sadece aydınlık koşullarda gözlemlenmiştir. Işığın çimlenme üzerindeki etkisinin ise pozitif olduğu tespit edilmiştir. Son olarak, tohumların oda koşullarında kısa süreli muhafazasının ışığa olan duyarlılığı arttırdığı ortaya konulmuştur. Bu çalışmadan elde edilen bulgulardan, ekonomik

ve ekolojik açıdan önemli bir bitki olan *L. orientalis*'in çimlenme başarısını arttırmak için yararlanılabilir.

TEŞEKKÜR

Yazarlar, bu çalışmaya olan desteğinden ötürü Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı (ÖYP) Koordinatörlüğü'ne teşekkür eder.

Çıkar Çatışması

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

Yazar Katkısı

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

KAYNAKLAR

- Abu, Y., Romo, J. T., Bai, Y., & Coulman, B. (2016). Priming seeds in aqueous smoke solutions to improve seed germination and biomass production of perennial forage species. *Canadian Journal of Plant Science*, 96(4), 551-563.
- Arslan, M., & Şahin, H. (2016). Unutulan Bir Orman Ürünü Kaynağı: Anadolu Sığıla Ağacı (*Liquidambar orientalis* Miller). *Bartın Orman Fakültesi Dergisi*, 18(1), 103-117.
- Atay, İ. (1985). Sığıla Ağacı (*Liquidambar orientalis* L.) nin önemi ve silvikültürel özellikleri. *Journal of the Faculty of Forestry Istanbul University*, 35(1), 15-21.
- Bailly, C. (2019). The signalling role of ROS in the regulation of seed germination and dormancy. *Biochemical Journal*, 476(20), 3019-3032.
- Bailly, C., & Merendino, L. (2021). Oxidative signalling in seed germination and early seedling growth: an emerging role for ROS trafficking and inter-organelle communication. *Biochemical Journal*, 478(10), 1977-1984.
- Baldwin, I. T., Staszak-Kozinski, L., & Davidson, R. (1994). Up in smoke: I. Smoke-derived germination cues for postfire annual, *Nicotiana attenuata* torr. Ex. Watson. *Journal of Chemical Ecology*, 20(9), 2345-2371.
- Cao, D., Baskin, J. M., Baskin, C. C., & Li, D.-Z. (2023). Burning lignin: overlooked cues for post-fire seed germination. *Trends in Plant Science*, 28(4), 386-389.
- Çatav, Ş. S., & Akbaş, K. (2021). Yedi Akdeniz Lamiaceae Türünün Duman ve Duman Kökenli Bileşiklere Olan Çimlenme Tepkisi. *Journal of Advanced Research in Natural and Applied Sciences*, 7(4), 478-485.
- Çatav, Ş. S., Küçükakyüz, K., Tavşanoğlu, Ç., & Pausas, J. G. (2018). Effect of fire-derived chemicals on germination and seedling growth in Mediterranean plant species. *Basic and Applied Ecology*, 30, 65-75.
- Cembrowska-Lech, D., Koprowski, M., & Kępczyński, J. (2015). Germination induction of dormant *Avena fatua* caryopses by KAR₁ and GA₃ involving the control of reactive oxygen species (H₂O₂ and O₂⁻) and enzymatic antioxidants (superoxide dismutase and catalase) both in the embryo and the aleurone layers. *Journal of Plant Physiology*, 176, 169-179.
- Downes, K. S., Light, M. E., Pošta, M., Kohout, L., & van Staden, J. (2013). Comparison of germination responses of *Anigozanthos flavidus* (Haemodoraceae), *Gyrostemon racemiger* and *Gyrostemon ramulosus* (Gyrostemonaceae) to smoke-water and the smoke-derived compounds karrikinolide (KAR₁) and glyconitrile. *Annals of Botany*, 111(3), 489-497.
- Flematti, G. R., Dixon, K. W., & Smith, S. M. (2015). What are karrikins and how were they 'discovered' by plants? *BMC Biology*, 13(1), 108.
- Gniazdowska, A., Krasuska, U., & Bogatek, R. (2010). Dormancy removal in apple embryos by nitric oxide or cyanide involves modifications in ethylene biosynthetic pathway. *Planta*, 232, 1397-1407.
- Gomes, M., & Garcia, Q. (2013). Reactive oxygen species and seed germination. *Biologia*, 68(3), 351-357.

- Gupta, S., Plačková, L., Kulkarni, M. G., Doležal, K., & Van Staden, J. (2019). Role of smoke stimulatory and inhibitory biomolecules in phytochrome-regulated seed germination of *Lactuca sativa*. *Plant Physiology*, 181(2), 458-470.
- ISTA (International Seed Testing Association). (1996). International rules for seed testing: The germination test. *Seed Science and Technology*, 24, 155-202.
- Keçyczyński, J. (2018). Induction of agricultural weed seed germination by smoke and smoke-derived karrikin (KAR₁), with a particular reference to *Avena fatua* L. *Acta Physiologiae Plantarum*, 40, 87.
- Keçyczyński, J. (2020). Progress in utilizing plant-derived smoke water and smoke-derived KAR₁ in plant tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 140, 271-278.
- Keçyczyński, J., Cembrowska-Lech, D., & Van Staden, J. (2013). Necessity of gibberellin for stimulatory effect of KAR₁ on germination of dormant *Avena fatua* L. caryopses. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35(2), 379-387.
- Keskin, D., & Güvensen, N. C. (2022). Investigation of antimicrobial properties and chemical composition of different extracts of sweet gum leaves (*Liquidambar orientalis*). *International Journal of Agriculture Environment and Food Sciences*, 6(1), 13-18.
- Lariguet, P., Ranocha, P., De Meyer, M., Barbier, O., Penel, C., & Dunand, C. (2013). Identification of a hydrogen peroxide signalling pathway in the control of light-dependent germination in *Arabidopsis*. *Planta*, 238, 381-395.
- Lee, I., Kim, E., Choi, S., Kim, D., Hong, W., Choi, J., et al. (2021). A Raf-like kinase is required for smoke-induced seed dormancy in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(14), e2020636118.
- Light, M. E., Kulkarni, M. G., Ascough, G. D., & Van Staden, J. (2007). Improved flowering of a South African *Watsonia* with smoke treatments. *South African Journal of Botany*, 73(2), 298-298.
- Martinez, S. E., Conn, C. E., Guercio, A. M., Sepulveda, C., Fiscus, C. J., Koenig, D., et al. (2022). A *KARRIKIN INSENSITIVE2* paralog in lettuce mediates highly sensitive germination responses to karrikinolide. *Plant Physiology*, 190(2), 1440-1456.
- Merritt, D. J., Kristiansen, M., Flematti, G. R., Turner, S. R., Ghisalberti, E. L., Trengove, R. D., & Dixon, K. W. (2006). Effects of a butenolide present in smoke on light-mediated germination of Australian Asteraceae. *Seed Science Research*, 16(1), 29-35.
- Nalbantsoy, A., Kariş, M., Karakaya, L., & Akgül, Y. (2016). Antioxidant, cytotoxic and iNOS activity of *Liquidambar orientalis* Mill. resin extracts. *Turkish Journal of Biochemistry*, 41(3), 198-205.
- Nelson, D. C., Flematti, G. R., Ghisalberti, E. L., Dixon, K. W., & Smith, S. M. (2012). Regulation of seed germination and seedling growth by chemical signals from burning vegetation. *Annual Review of Plant Biology*, 63, 107-130.
- Nelson, D. C., Riseborough, J.-A., Flematti, G. R., Stevens, J., Ghisalberti, E. L., Dixon, K. W., & Smith, S. M. (2009). Karrikins discovered in smoke trigger *Arabidopsis* seed germination by a mechanism requiring gibberellic acid synthesis and light. *Plant physiology*, 149(2), 863-873.
- Nguyen, T.-N., Tuan, P. A., & Ayele, B. T. (2022). Jasmonate regulates seed dormancy in wheat via modulating the balance between gibberellin and abscisic acid. *Journal of Experimental Botany*, 73(8), 2434-2453.
- Oracz, K., El-Maarouf-Bouteau, H., Kranner, I., Bogatek, R., Corbineau, F., & Bailly, C. (2009). The mechanisms involved in seed dormancy alleviation by hydrogen cyanide unravel the role of reactive oxygen species as key factors of cellular signaling during germination. *Plant Physiology*, 150(1), 494-505.
- Oracz, K., & Karpiński, S. (2016). Phytohormones signaling pathways and ROS involvement in seed germination. *Frontiers in Plant Science*, 7, 864.
- Öztürk, M., Çelik, A., Güvensen, A., & Hamzaoğlu, E. (2008). Ecology of tertiary relict endemic *Liquidambar orientalis* Mill. forests. *Forest Ecology and Management*, 256(4), 510-518.

- Perez-Harguindeguy, N., Diaz, S., Garnier, E., Lavorel, S., Poorter, H., Jaureguiberry, P., & ve ark. (2016). Corrigendum to: New handbook for standardised measurement of plant functional traits worldwide. *Australian Journal of Botany*, 64(8), 715-716.
- Puglia, G. D., Balestrasse, K., Bustos, J. S., & Huarte, H. R. (2022). New insights into the role of alternating temperatures and cyanide in the ROS-mediated cardoon seed dormancy termination. *Horticulturae*, 8(10), 960.
- Ruduś, I., Cembrowska-Lech, D., Jaworska, A., & Kępczyński, J. (2019). Involvement of ethylene biosynthesis and perception during germination of dormant *Avena fatua* L. caryopses induced by KAR₁ or GA₃. *Planta*, 249, 719-738.
- Sami, A., Rehman, S., Tanvir, M. A., Zhou, X. Y., Zhu, Z. H., & Zhou, K. (2021). Assessment of the germination potential of *Brassica oleracea* seeds treated with karrikin 1 and cyanide, which modify the ethylene biosynthetic pathway. *Journal of Plant Growth Regulation*, 40, 1257-1269.
- Sarac, N., & Şen, B. (2014). Antioxidant, mutagenic, antimutagenic activities, and phenolic compounds of *Liquidambar orientalis* Mill. var. *orientalis*. *Industrial Crops and Products*, 53, 60-64.
- Schwachtje, J., & Baldwin, I. T. (2004). Smoke exposure alters endogenous gibberellin and abscisic acid pools and gibberellin sensitivity while eliciting germination in the post-fire annual, *Nicotiana attenuata*. *Seed Science Research*, 14(1), 51-60.
- Scott, A. C., & Glasspool, I. J. (2006). The diversification of Paleozoic fire systems and fluctuations in atmospheric oxygen concentration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(29), 10861-10865.
- Suzek, H., Celik, I., Dogan, A., & Yildirim, S. (2016). Protective effect and antioxidant role of sweetgum (*Liquidambar orientalis*) oil against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity and oxidative stress in rats. *Pharmaceutical biology*, 54(3), 451-457.
- Tavşanoğlu, Ç., Ergan, G., Çatav, Ş. S., Zare, G., Küçükakyüz, K., & Özüdoğru, B. (2017). Multiple fire-related cues stimulate germination in *Chaenorhinum rubrifolium* (Plantaginaceae), a rare annual in the Mediterranean Basin. *Seed Science Research*, 27(1), 26-38.
- Ürker, O., Yılmaz, T., Öztürk, Ş., & Çobanoğlu, N. (2014). Anadolu Sığla Ormanları'nın Çevre Sosyolojisi Kapsamında İncelenmesi. *Sosyoloji Araştırmaları Dergisi*, 17(2), 152-187.
- Wang, M., Schoettner, M., Xu, S., Paetz, C., Wilde, J., Baldwin, I. T., & Groten, K. (2017). Catechol, a major component of smoke, influences primary root growth and root hair elongation through reactive oxygen species-mediated redox signaling. *New Phytologist*, 213(4), 1755-1770.
- Wang, Q., Smith, S. M., & Huang, J. (2022). Origins of strigolactone and karrikin signaling in plants. *Trends in Plant Science*, 27(5), 450-459.
- Waters, M. T., & Nelson, D. C. (2023). Karrikin perception and signalling. *New Phytologist*, 237(5), 1525-1541.
- Yan, A., & Chen, Z. (2020). The control of seed dormancy and germination by temperature, light and nitrate. *The Botanical Review*, 86, 39-75.
- Yao, J., Scaffidi, A., Meng, Y., Melville, K. T., Komatsu, A., Khosla, A., et al. (2021). Desmethyl butenolides are optimal ligands for karrikin receptor proteins. *New Phytologist*, 230(3), 1003-1016.
- Yao, J., & Waters, M. T. (2020). Perception of karrikins by plants: a continuing enigma. *Journal of Experimental Botany*, 71(6), 1774-1781.
- Yu, L.-L., Liu, C.-J., Peng, Y., He, Z.-Q., & Xu, F. (2022). New insights into the role of cyanide in the promotion of seed germination in tomato. *BMC Plant Biology*, 22(1), 28.