

**KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**TÜKENME TEHLİKESİ ALTINDAKİ MAVİ YILDIZ “*Amsonia
orientalis*” BİTKİSİNİN STRES PROTEİNLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

HALİL İBRAHİM TOYGAR

KOCAELİ 2017

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TÜKENME TEHLİKESİ ALTINDAKİ MAVİ YILDIZ “*Amsonia
orientalis*” BİTKİSİNİN STRES PROTEİNLERİNİN
ARAŞTIRILMASI

HALİL İBRAHİM TOYGAR

Yrd.Doç.Dr. Yonca YÜZÜGÜLLÜ KARAKUŞ
Danışman, Kocaeli Üniv.

Yrd.Doç.Dr. Yonca AVCI DUMAN
Jüri Üyesi, Kocaeli Üniv.

Doç.Dr. Yasemin ÖZDENER KÖMPE
Jüri Üyesi, Ondokuz Mayıs Üniv.

14.10.2017
Halil İbrahim Toygar
Yonca Avcı Duman
Yasemin Özdenir Kömpe

Tezin Savunulduğu Tarih: 30.05.2017

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Bu çalışma tükenme tehlikesi bulunan *Amsonia orientalis* bitkisinin stres proteinlerini incelemek için yapılmıştır.

Çalışma süresince hiçbir yardımını benden esirgemeyen, bilgi, öneri, deneyim ve görüşlerini her zaman benimle paylaşan değerli danışman hocam Yrd. Doc. Dr. Yonca YÜZÜGÜLLÜ KARAKUŞ'a, laboratuvarında çalışma ortamı yaratan, tecrübelerini benden esirgemeyen ve bilimsel vizyonumun oluşmasında büyük emeklerini gördüğüm, birlikte çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum saygı değer hocam Yrd. Doc. Dr. Yonca DUMAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Bitki örneklerinin temin edilmesinde büyük emeği olan Prof. Dr. Fazıl ÖZEN ve Ar. Gör. Arda ACEMİ'ye teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvarda bana verdikleri manevi desteklerinden dolayı çalışma arkadaşlarıma, pozitif desteklerinden dolayı her zaman yanımda olan değerli dostlarım Aygül KINA ve Ezgi Gizem PELİN'e, tez yazma sürecinde benden bilgilerini esirgemeyen doktora öğrencisi değerli dostum Aslı USTALAR'a teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca bıkmadan, usanmadan sabırla yanımda olan ve fedakarca desteklerini benden esirgemeyen, maddi manevi her zaman yanımda olan annem Emine TOYGAR ve babam Bekir TOYGAR'a, her türlü koşulda benim yanımda olan ve varlıklarıyla beni güçlendiren ablam Hatice TOYGAR, Reyhan TOYGAR ve Nermin TURAÇ'a çok teşekkür ediyorum.

Tezimin gerçekleşmesinde 113Z609 numaralı proje ile maddi destek sağlayan TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Mayıs – 2017

Halil İbrahim TOYGAR

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iv
TABLolar DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ÖZET.....	ix
ABSTRACT.....	x
GİRİŞ	1
1. GENEL BİLGİLER	3
1.1. Bitkilerdeki Stres Etmenleri	3
1.1.1. Bitkilerde tuz stresi	4
1.1.2. Bitkilerdeki kuraklık stresi	9
1.1.3. Bitkilerde ultraviyole stresi	11
1.1.4. Bitkilerde ağır metal stresi.....	13
1.2. Reaktif Oksijen Türleri ve Antioksidan Enzimler.....	15
1.3. Çalışmada Kullanılan Bitki Hakkında Genel Bilgiler	20
2. MATERYAL VE METOD	23
2.1. Materyal.....	23
2.2. Metod.....	23
2.2.1. Bitki eksplantların dezenfeksiyonu ve stres koşullarını oluşturma	23
2.2.2. Ham ekstraktın hazırlanması	25
2.2.3. Antioksidan enzim aktivite tayini	26
2.2.4. Lipid peroksidasyonunun belirlenmesi.....	27
2.2.5. H ₂ O ₂ içeriğinin belirlenmesi.....	28
2.2.6. Elektroforetik analizler	28
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	30
3.1. Tuz Stresinin İncelenmesi	30
3.1.1. Tuzluluk stresinin bitkinin sürgün ve kök parametrelerine etkisi.....	30
3.1.2. Tuz stresinin bitkinin antioksidan enzim aktiviteleri üzerine etkisinin incelenmesi	31
3.1.3. Tuz stresinin bitkinin lipid peroksidasyon seviyesi üzerine etkisi.....	35
3.1.4. Tuz stresinin bitkinin H ₂ O ₂ seviyesi üzerine etkisi	36
3.1.5. Tuz stresi koşullarında yetiştirilen bitkinin elektroforetik analizleri	37
3.2. Kuraklık Stresinin İncelenmesi	39
3.2.1. Kuraklık stresinin bitkinin sürgün ve kök parametrelerine etkisi.....	39
3.2.2. Kuraklık stresinin bitkinin antioksidan aktiviteleri üzerine etkisinin incelenmesi	41
3.2.3. Kuraklık stresinin bitkinin lipid peroksidasyon seviyesi üzerine etkisi.....	44

3.2.4. Kuraklık stresinin bitkinin H ₂ O ₂ seviyesi üzerine etkisi	45
3.2.5. Kuraklık stresi koşullarında yetiştirilen bitkinin elektroforetik analizleri	45
3.3. UV Stresinin İncelenmesi.....	48
3.3.1. UV stresinin bitkinin sürgün ve kök parametrelerine etkisi	48
3.3.2. UV stresinin bitkinin antioksidan enzim aktiviteleri üzerine etkileri.....	48
3.3.3. UV stresinin bitkinin lipid peroksidasyon seviyesi üzerine etkisi.....	51
3.3.4. UV stresinin bitkinin H ₂ O ₂ seviyesi üzerine etkisi.....	52
3.3.5. UV stresi koşullarında yetiştirilen bitkinin elektroforetik analizleri	52
3.4. Zn ⁺² Stresinin İncelenmesi	54
3.4.1. Zn ⁺² stresinin bitkinin sürgün ve kök parametrelerine etkisi	54
3.4.2. Zn ⁺² stresinin bitkinin antioksidan enzim aktiviteleri üzerine etkileri.....	55
3.4.3. Zn ⁺² stresinin bitkinin lipid peroksidasyon seviyesi üzerine etkisi.....	58
3.4.4. Zn ⁺² stresinin bitkinin H ₂ O ₂ seviyesi üzerine etkisi	59
3.4.5. Zn ⁺² stresi koşullarında yetiştirilen bitkinin elektroforetik analizleri	59
3.5. Mo ⁺⁶ Stresinin İncelenmesi	62
3.5.1. Mo ⁺⁶ stresinin bitkinin sürgün ve kök parametrelerine etkisi	62
3.5.2. Mo ⁺⁶ stresinin bitkinin antioksidan enzim aktiviteleri üzerine etkisi.....	63
3.5.3. Mo ⁺⁶ stresinin bitkinin lipid peroksidasyon seviyesi üzerine etkisi.....	66
3.5.4. Mo ⁺⁶ stresinin bitkinin H ₂ O ₂ seviyesi üzerine etkisi	67
3.5.5. Mo ⁺⁶ stresi koşullarında yetiştirilen bitkinin elektroforetik analizleri	67
4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	70
KAYNAKLAR	72
EKLER.....	82
KİŞİSEL YAYINLAR VE ESERLER	87
ÖZGEÇMİŞ	88

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1	<i>A. orientalis</i> (a. Genel görünüm, b. Çiçek ve meyve)	21
Şekil 3.1.	NaCl konsantrasyonunun <i>A. orientalis</i> 'in sürgün ve kök parametreleri etkisi	31
Şekil 3.2.	Kontrol (tuz stresinin olmadığı) koşullarda (A) ve olduğu koşullarda (B-G) <i>A. orientalis</i> 'in SOD enzim aktivitesini belirlemek üzere çizilen grafik.	32
Şekil 3.3.	Artan tuz konsantrasyonları varlığında <i>A. orientalis</i> 'in POD miktarı ve aktivitesinde gözlenen değişim	34
Şekil 3.4.	Artan tuz konsantrasyonları varlığında <i>A. orientalis</i> 'in CAT miktarı ve aktivitesinde gözlenen değişim	34
Şekil 3.5.	Artan tuz stresi varlığında <i>A. orientalis</i> 'in MDA içeriğinin değişimi	35
Şekil 3.6.	Artan tuz stresi koşullarında <i>A. orientalis</i> 'in H ₂ O ₂ değişimi	36
Şekil 3.7.	Artan tuz stresi koşullarında <i>A. orientalis</i> 'in SOD aktivitesi için zimogram resmi.	37
Şekil 3.8.	Artan tuz stresi koşullarında <i>A. orientalis</i> 'in POD aktivitesi için gerçekleştirilen zimogram resmi	38
Şekil 3.9.	Artan tuz stresi koşullarında <i>A. orientalis</i> 'in CAT aktivitesi için gerçekleştirilen zimogram resmi	38
Şekil 3.10.	Tuz stresi koşullarında <i>A. orientalis</i> 'in SDS-PAGE analizi.....	39
Şekil 3.11.	Farklı PEG6000 konsantrasyonlarının <i>A. orientalis</i> 'in sürgün ve kök parametrelerine etkileri.....	40
Şekil 3.12.	Kontrol (kuraklık stresinin olmadığı) koşullarda (A) ve olduğu koşullarda (B-E) <i>A. orientalis</i> 'in SOD enzim aktivitesini belirlemek üzere çizilen grafik	41
Şekil 3.13.	Artan kuraklık stresi koşullarında <i>A. orientalis</i> 'in SOD miktarı ve aktivitesinde gözlenen değişim	42
Şekil 3.14.	Artan kuraklık stresi koşullarında <i>A. orientalis</i> 'in POD miktarı ve aktivitesinde gözlenen değişim	43
Şekil 3.15.	Artan kuraklık stresi koşullarında <i>A. orientalis</i> 'in CAT miktarı ve aktivitesinde gözlenen değişim	44
Şekil 3.16.	Artan kuraklık stresi koşullarında <i>A. orientalis</i> 'in MDA miktarında gözlenen değişim.....	44
Şekil 3.17.	Artan kuraklık stresi koşullarında <i>A. orientalis</i> 'in H ₂ O ₂ içeriğinde gözlenen değişim	45
Şekil 3.18.	Artan kuraklık stresi koşullarında <i>A. orientalis</i> 'in SOD aktivitesi için gerçekleştirilen zimogram resmi	46
Şekil 3.19.	Artan kuraklık stresi koşullarında <i>A. orientalis</i> 'in POD aktivitesi için gerçekleştirilen zimogram resmi.....	46
Şekil 3.20.	Artan kuraklık stresi koşullarında <i>A. orientalis</i> 'in CAT aktivitesi için gerçekleştirilen zimogram resmi.....	46
Şekil 3.21.	Kuraklık stresİ koşullarında <i>A. orientalis</i> 'in SDS-PAGE analizi	47

Şekil 3.22.	UV uygulamalarının <i>A. orientalis</i> 'in sürgün ve kök parametrelerine etkileri.....	48
Şekil 3.23.	Kontrol (UV stresinin olmadığı) koşullarda (A) ve olduğu koşullarda (B-C) <i>A. orientalis</i> 'in SOD enzim aktivitesini belirlemek üzere çizilen grafik.	49
Şekil 3.24.	Artan UV stresi koşullarında <i>A. orientalis</i> 'in SOD miktarı ve aktivitesinde gözlenen değişim.....	50
Şekil 3.25.	Artan UV stresi koşullarında <i>A. orientalis</i> 'in POD miktarı ve aktivitesinde gözlenen değişim.....	50
Şekil 3.26.	Artan UV stresi koşullarında <i>A. orientalis</i> 'in CAT miktarı ve aktivitesinde gözlenen değişim.....	51
Şekil 3.27.	Artan UV stresi koşullarında <i>A. orientalis</i> 'in MDA içeriğinin değişimi.	51
Şekil 3.28.	Artan UV stresi koşullarında <i>A. orientalis</i> 'in H ₂ O ₂ miktarında gözlenen değişim	52
Şekil 3.29.	Artan UV stresi koşullarında <i>A. orientalis</i> 'in SOD aktivitesi için gerçekleştirilen zimogram resmi	52
Şekil 3.30.	Artan UV stresi koşullarında <i>A. orientalis</i> 'in POD aktivitesi için gerçekleştirilen zimogram resmi	53
Şekil 3.31.	Artan UV stresi koşullarında <i>A. orientalis</i> 'in CAT aktivitesi için gerçekleştirilen zimogram resmi	53
Şekil 3.32.	UV stresi koşullarında <i>A. orientalis</i> 'in SDS-PAGE analizi	54
Şekil 3.33.	ZnSO ₄ uygulamalarının <i>A. orientalis</i> 'in sürgün ve kök parametrelerine etkisi	55
Şekil 3.34.	Kontrol (Zn ⁺² stresinin olmadığı) (A) ve olduğu (B-G) koşullarda <i>A. orientalis</i> 'in SOD enzim aktivitesini belirlemek üzere çizilen grafik.	56
Şekil 3.35.	Artan Zn ⁺² stresi koşullarında <i>A. orientalis</i> 'in SOD miktarı ve aktivitesinde gözlenen değişim.....	57
Şekil 3.36.	Artan Zn ⁺² stresi koşullarında <i>A. orientalis</i> 'in POD miktarı ve aktivitesinde gözlenen değişim.....	58
Şekil 3.37.	Artan Zn ⁺² stresi koşullarında <i>A. orientalis</i> 'in CAT miktarı ve aktivitesinde gözlenen değişim.....	58
Şekil 3.38.	Artan Zn ⁺² stresi koşullarında <i>A. orientalis</i> 'in MDA içeriğinin değişimi	59
Şekil 3.39.	Artan Zn ⁺² stresi koşullarında <i>A. orientalis</i> 'de gözlenen H ₂ O ₂ değişimi	59
Şekil 3.40.	Artan Zn ⁺² stresi koşullarında <i>A. orientalis</i> 'in SOD aktivitesi için gerçekleştirilen zimogram resmi..	60
Şekil 3.41.	Artan Zn ⁺² stresi koşullarında <i>A. orientalis</i> 'in POD aktivitesi için gerçekleştirilen zimogram resmi	60
Şekil 3.42.	Artan Zn ⁺² stresi koşullarında <i>A. orientalis</i> 'in CAT aktivitesi için gerçekleştirilen zimogram resmi	61
Şekil 3.43.	Zn ⁺² stresi koşullarında <i>A. orientalis</i> 'in SDS-PAGE analizi.....	62
Şekil 3.44.	Na ₂ MoO ₄ uygulamalarının <i>A. orientalis</i> 'in sürgün ve kök parametrelerine etkileri.....	63
Şekil 3.45.	Kontrol (Mo ⁺⁶ stresinin olmadığı) (A) ve olduğu (B-C) koşullarda <i>A. orientalis</i> 'in SOD enzim aktivitesini belirlemek üzere çizilen grafik.	64

Şekil 3.46.	Artan Mo^{+6} stresi koşullarında <i>A. orientalis</i> 'in SOD miktarı ve aktivitesinde gözlenen değişim.....	65
Şekil 3.47.	Artan Mo^{+6} stresi koşullarında <i>A. orientalis</i> 'in POD miktarı ve aktivitesinde gözlenen değişim.....	66
Şekil 3.48.	Artan Mo^{+6} stresi koşullarında <i>A. orientalis</i> 'in CAT miktarı ve aktivitesinde gözlenen değişim.....	66
Şekil 3.49.	Artan Mo^{+6} stresi koşullarında <i>A. orientalis</i> 'in MDA içeriğinin değişimi	67
Şekil 3.50.	Artan Mo^{+6} stresi koşullarında <i>A. orientalis</i> 'de gözlenen H_2O_2 değişimi.....	67
Şekil 3.51.	Artan Mo^{+6} stresi koşullarında <i>A. orientalis</i> 'in SOD aktivitesi için gerçekleştirilen zimogram resmi. Şeklin üzerindeki rakamlar ise maruz bırakıldığı Mo^{+6} stresinin konsantrasyonunu ifade etmektedir.....	68
Şekil 3.52.	Artan Mo^{+6} stresi koşullarında <i>A. orientalis</i> 'in POD aktivitesi için gerçekleştirilen zimogram resmi	68
Şekil 3.53.	Artan Mo^{+6} stresi koşullarında <i>A. orientalis</i> 'in CAT aktivitesi için gerçekleştirilen zimogram resmi	69
Şekil 3.54.	Mo^{+6} stresi koşullarında <i>A. orientalis</i> 'in SDS-PAGE analizi.....	69

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1.1.	Bitkilerdeki stres faktörleri.....	3
Tablo 3.1.	Artan tuz stresi varlığında <i>A. orientalis</i> 'in SOD miktarı ve aktivitesinde gözlenen değişim.....	33
Tablo A.1.	BSA kalibrasyon grafiği için örnek hazırlanması	83
Tablo B.1.	SDS-PAGE jel solüsyonları	85
Tablo C.1.	Gümüş boyama solüsyonları	86



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Kısaltmalar

Al^{+3}	: Alüminyum
B	: Bor
Ba^{+2}	: Baryum
BSA	: Bovine Serum Albumin
Ca^{+2}	: Kalsiyum
CAT	: Katalaz
Cl^-	: Klor
CO_3^-	: Karbonat
F^-	: Flor
HCO_3^-	: Bikarbonat
K^+	: Potasyum
Li^+	: Lityum
MDA	: Malondialdehit
Mg^{+2}	: Magnezyum
Mn	: Mangan
Mo	: Molibden
Na^+	: Sodyum
Na_2MoO_4	: Molibdat
Na_2SO_4	: Sodyum Sülfat
NaCl	: Sodyum Klorür
NO_3^-	: Nitrat
POD	: Peroksidaz
Rb	: Rubidium
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamit Jel Elektroforezi
SiO_2	: Slikon Dioksit
SO_4^-	: Sülfat
SOD	: Superoksit Dismutaz
Sr	: Strasyum
UV	: Ultraviyole
Zn^{+2}	: Çinko

TÜKENME TEHLİKESİ ALTINDAKİ MAVİ YILDIZ “*Amsonia orientalis*” BİTKİSİNİN STRES PROTEİNLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Amsonia orientalis Decne. (Apocynaceae), dünyada sadece Türkiye’nin kuzeybatısı ve Yunanistan’ın kuzeydoğusu olmak üzere son derece dar bir alanda yayılış gösteren, nadir ve tükenme tehdidi altında olan bir bitki türüdür. Nesli tükenmekte olan bu bitkinin bünyesinde, Apocynaceae familyasının diğer birçok üyesi gibi tıbbi ve ekonomik öneme sahip çok sayıda glikozitler ve glikoalkaloitler bulundurduğu bilinmektedir. Yapısında tıbbi açıdan geniş bir spektrumda kullanılması muhtemel fenolik maddeleri bulunduran; ancak dar bir alanda yayılış gösteren “Mavi yıldız” bitkisinin ülkemizde bulunması önemlidir. Bu çalışmada kuraklık, ağır metal kirliliği, tuzluluk ve radyasyon gibi strese sebep olan abiyotik faktörlerin *A. orientalis* üzerindeki etkilerini araştırılmak üzere, antioksidan enzimlerinin (katalaz, peroksidaz, süperoksit dismutaz) biyokimyasal özellikleri, MDA (Malondialdehit) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) içeriği elektrofotometrik ve spektrofotometrik olarak analiz edilmiştir. Sonuç olarak, tuz stresinin SOD, POD ve CAT aktivitesinin kontrol grubuna oranla arttığı, en fazla artışın 75 mM ve 50 mM NaCl varlığında olduğu saptanmıştır. Kuraklık stresinde ise CAT, POD ve SOD spesifik aktivitesinin kontrol grubuna oranla yüksek çıktığı tespit edilmiştir. UV-B stresinde ise SOD ve POD aktivitesinin kontrol grubuna oranla arttığı, CAT aktivitesindeki en fazla artış 15 dakika UV-B stresinde meydana geldiği görülmüştür. Zn^{+2} stresinde ise bitkinin SOD aktivitesi düşmüş, CAT ve POD aktivitesi ise arttığı gözlenmiştir. Mo^{+6} stresinde ise SOD enzim aktivitesi değişmemiş olup, CAT ve POD aktivitesi artmıştır. Tüm stres koşullarında bitkinin MDA ve H_2O_2 miktarları kontrol grubuna oranla yüksek çıkmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Amsonia orientalis*, Antioksidan Enzimleri, Bitkilerde Stres, Reaktif Oksijen Türleri.

A DETAILED STUDY BASED ON STRESS PROTEINS OF ENDANGERED BLUE STAR “*Amsonia orientalis*”

ABSTRACT

Amsonia orientalis, belonging to a group of Apocynaceae family, is a kind of endangered plant which occurs only in the north-west of Turkey and the north-east of Greece. The genus *Amsonia* is known for providing many glycosides and glycoalkaloids having medicinal and economic significance like the other members of the Apocynaceae family. Although distributed in a narrow space, this plant, called 'bluestar', lives in our country and likely to be used in a wide range of medicine due to its phenolic compound nature; therefore immediate action should be taken in order to protect them. Thus, the aim of this study was designed to examine the production and biochemical characteristics of antioxidant enzymes (catalase, superoxide dismutase and peroxidase), MDA (Malondialdehyde) and hydrogen peroxide (H₂O₂) contents of *A. orientalis* under some abiotic stress factors including drought, heavy metal contamination, salt and radiation. In conclusion, it was determined that the salt stress increased compared to control group of SOD, POD and CAT activities, and the maximum increase was in the existence of 75 mM and 50 mM NaCl. In the case of drought stress, specific activity of CAT, CAT and POD were found to be higher than control group. In the UV-B stress, SOD and POD activities increased compared to control group, and the maximum increase in the CAT activity occurred in UV-B stress for 15 minutes. In Zn⁺² stress, SOD activity of the plant decreased and CAT and POD activity increased. In Mo⁺⁶ stress, SOD enzyme activity was unchanged, CAT and POD activity increased. In all stress conditions, MDA and H₂O₂ contents of the plant were higher than control group.

Keywords: *Amsonia orientalis*, Antioxidant Enzymes, Stress on Plants, Reactive Oxygen Species.

GİRİŞ

Türkiye, Avrupa ülkelerinin toplam alanının on beşte biri kadar bir alana sahip olmasına rağmen, Avrupa’da yaklaşık toplam 12000 adet eğrelti ve tohumlu bitki ile 2750 adet endemik tür varken, bu sayı ülkemizde 9000 civarında olup bunlardan yaklaşık 3000 adedi sadece ülkemizde bulunmaktadır. Floramızda bulunan bitkilerin tehlike kategorilerine göre dağılımına bakıldığında toplamda 4600 takson bir tehlike kategorisindedir. Bu sayı ülkemiz florasındaki toplam takson sayısının yaklaşık yarısına denktir ve bu durum ülkemizde koruma çalışmalarına duyulan ihtiyacı ortaya çıkarmaktadır (Ekim ve diğ., 2000).

Amsonia orientalis parlak mavi-mor çiçeklere sahip çiçek durumundan dolayı Batı Avrupa ve Amerika'daki bahçelerde süs bitkisi olarak da kullanılır. *Amsonia* türleri diğer Apocynaceae (Zakkumgiller) familyası üyeleri gibi lateksli gövdeye sahiptir. *Nerium* gibi kimi akrabalarının lateksi zehirli alkaloidlere sahip olsa da *Amsonia* türlerinin lateksi nisbeten zehirsizdir. Bu lateksin insanlara karşı zararlı olduğu bilinmektedir. Fakat bitkinin geyik ve diğer memeliler tarafından yenmesine engel olmaktadır. Bu durum da bitkinin bahçelerde, peyzaj düzenlemelerinde kullanılmasında avantaj sağlar (Darke ve diğ., 2005). *A. orientalis* üzerine yapılan bir çalışmada 6 yeni flavonoid glikozit izole edilmiştir ve bu bileşiklerin kimyasal yapıları tanımlanmıştır (Itoh ve diğ., 2002).

Flavonoidler doğada birçok bitkide yaygın olarak bulunan düşük molekül ağırlıklı fenolik bileşiklerdir. Bu gruba dahil olan glikozitler (flavonoid glikozitler) kardiyovasküler sistem düzenleyicileri olarak çok eskiden beri kullanılmaktadır. Flavonoidlerle *in vivo* ve *in vitro* olarak yapılan çalışmalar bunların kansere karşı koruyucu birçok mekanizmada rol oynadığını göstermiştir (Acemi ve diğ., 2017). Bunlar; östrojenik/antiöstrojenik aktivite, antiproliferasyon, hücre siklusunun durdurulması ve apoptozisin indüksiyonu, oksidasyonun engellenmesi, immun sistemin düzenlenmesi ve hücre içi sinyal iletimindeki değişikliklerdir (Atasever ve diğ., 2003). Bu bağlamda *A. orientalis*’in flavonoid içeriğinin önemi ortaya çıkmaktadır.

A. orientalis, başta abiyotik stres şartları (tuzluluk, kuraklık, besin elementlerinin eksiklik veya fazlalıkları, ağır metaller, hava kirliliği, radyasyon gibi) ve biyotik faktörler (hastalık oluşturan mantar, bakteri, virüs vb. ve zararlılar) olmak üzere çeşitli nedenlerle yeryüzünde giderek tükenmektedir. Bu faktörler, bitkinin büyüme ve gelişmesinde olumsuzluklara, bunlara bağlı olarak verim düşüklüğü ile sonuçlanan bir dizi gerilemeye neden olmaktadır. Bu çalışmada bitkinin stres şartlarına verdiği tepkilerin araştırılarak, bitkinin populasyon yoğunluğunun artırılması ve tüm canlı yaşamının garanti altına alınması hedeflenmiştir.



1. GENEL BİLGİLER

1.1. Bitkilerdeki Stres Etmenleri

Bitkiler, optimum gelişimlerini kendileri için en uygun olan ortamlarda gösterirler. Normal metabolizma işleyişine bağlı olarak, bitkiler günlük ve mevsimlik değişimler etkisiyle büyümelerine devam etmelerine karşın, beklenmedik bir zaman diliminde ve herhangi bir etmenin sürekli veya aralıklı olarak etkisine maruz kalmaları sonucunda, gelişmelerini ve hayatta kalmalarını etkileyecek hastalıklar ve fizyolojik değişimler meydana gelebilmektedir. Bitki için elverişsiz olan bu şartlara sebep olan faktörlere ‘stres’ adı verilmektedir. Bitkilerdeki stres etmenleri, “abiyotik faktörler” ve “biyotik faktörler” olmak üzere iki çeşittir. Bu stres faktörleri, bitki yaşamının herhangi bir döneminde ortaya çıkarak, bitki büyümesini ve gelişmesini etkileyen, farklı bitki türlerinde farklı etkiler ortaya çıkmasına neden olan çevresel etmenlerdir. Doğadaki çok çeşitli biyotik ve abiyotik çevre etmenleri bitkilerde strese neden olmaktadır. Biyotik ve abiyotik stres etmenlerinin etkisi altında bitkilerde ortaya çıkan değişimler de stres olarak tanımlanır. Stres, önemli fizyolojik ve metabolik değişimlere yol açmakla birlikte, bitkilerde büyüme ve gelişmeyi olumsuz şekilde etkileyebilmekte, üründe nitelik ve nicelik kaybına (ürün kalitesinin ve miktarının azalmasına), bitkinin veya organlarının ölümüne yol açabilmektedir.

Tablo 1.1. Bitkilerdeki stres faktörleri (URL-1)

Abiyotik Faktörler		Biyotik Faktörler
Fiziksel	Kimyasal	1.Hastalık etmenleri 2.Yabani bitkiler 3.Böcekler 4.Mikroorganizmalar 5.Hayvanlar
1.Kuraklık 2.Tuzluluk 3.Yüksek veya düşük sıcaklık 4.Radyasyon 5.Bitki besin maddesi 6.Işık stresi 7.Su baskını 8.Mekanik etkiler	1.Hava kirliliği 2.Bitki besin elementleri 3.Pestisitler 4.Toksinler 5.Tuzlar 6.Toprak pH'sı	

1.1.1. Bitkilerde tuz stresi

Doğal ve kültür formundaki bitkiler yaşam süreci boyunca çeşitli stres faktörlerinin etkisinde kalabilirler. Özellikle kültür formu bitkilerde ürün verimine ve kalitesine olumsuz etki eden en büyük çevresel etken tuzluluktur. Kurak ve yarı kurak bölgelerde ortaya çıkan tuzluluk, üretimi sınırlandıran en önemli sorunlardan biridir (Asraf ve diğ., 1999). Abiyotik streslerden biri olan tuz (mineral) stresi %20'lik oranıyla kuraklıktan (%26) sonra kullanılabilir alanları en fazla etkileyen stres faktörüdür (Blum ve diğ., 1986). Mineral stresin çoğunu da tuzluluk oluşturmakta ve dünyada tuzluluğa maruz kalmış alanların 9 milyon ha'dan fazla olduğunu söyleyebiliriz (Tuteja ve diğ., 2007). Dünya genelinde, sulanan alanların üçte birinde tuzluluk problemi vardır ve bu alanların yaklaşık olarak 950 milyon hektar olduğu tahmin edilmektedir (Shannon ve diğ., 1984). Birleşmiş Milletler Çevre Programının (UNEP) tahminlerine göre, dünyadaki verimli alanların yaklaşık %50'si ile tarım arazilerinin %20'sinin tuzluluk tehdidi altında olduğu düşünülmektedir (Flowers ve Yeo, 1995).

Tuzluluk, sularda veya topraklarda bulunan çözünmüş mineral tuzların yoğunluğundan ileri gelmektedir. Çözünmüş mineral tuzları, Na^+ , Ca^{+2} , Mg^{+2} , ve K^+ gibi katyonlar ve Cl^- , SO_4^{-2} , HCO_3^- , CO_3^{-2} ve NO_3^- anyonlarını içine alan başlıca çözünebilir maddeleri kapsamaktadır. Yüksek tuzluluk oranına sahip sularda B^{+3} , Sr^{+2} , Li^+ , SiO_2 , Rb^+ , F^- , Mo^{+6} , Mn^{+7} , Ba^{+2} ve Al^{+3} gibi mineral maddeler de tuzluluğa katkı sağlamaktadır (Marschner ve diğ., 1997; Shannon ve diğ., 1984; Tanji ve diğ., 1990).

Tuzluluk, dünyamızdaki verimli tarımı tehlikeye atarak besin ürünlerinin üretimini önemli düzeyde kısıtlayan çevresel faktörlerden birisidir (Botella ve diğ., 2005). Oluşma sebeplerine göre tuzluluğu “primer (doğal)” ve “sekonder” olarak ayırabiliriz. Primer tuzluluk; ana kayaçların ayrışması, okyanuslardaki tuzluluk ve iklimsel etmenler sonucu oluşmaktadır (Munns ve Tester, 2008). Sekonder tuzluluk ise; tarımsal alanlarda yoğun sulama faaliyetleri ile çeşitli tuzlar bakımından zengin yer altı suyu seviyesinin toprak yüzeyine kadar yükselmesi, aşırı otlatma, bir bölgenin doğal vejetasyonunu yok ederek tarım

arazilerinin açılması ve toprakların tuzluluğa sebep olan kimyasallarla kontaminasyonu sonucu gözlenmektedir (Pessarakli ve Szabolcs, 1999).

Dünya genelinde tuzdan etkilenmiş olan toprakların çoğu Na_2SO_4 ve NaCl tuzlarından kaynaklanmaktadır (Pessarakli ve Szabolcs, 1999). Son yıllarda yapılan araştırmalarda yüksek konsantrasyondaki Na^+ ve Cl^- iyonları, yüksek tuzluluk düzeyi ile eş anlamlı olarak değerlendirilir (Bohnert ve diğ., 1999; Grattan ve Grieve, 1994; Rhoades ve diğ., 1992).

Tuz stresi bitkilerde çeşitli şekillerde kendini göstermektedir. Aşırı tuzluluk bitkilerde morfolojik ve anatomik değişikliklere sebep olan bir faktör olmasından dolayı, bitkileri tuza verdiği tepkiler açısından iki gruba ayırabiliriz: Yüksek tuz konsantrasyonlarına dayanıklı ‘halofit bitkiler’ ve tuzlu ortamlara duyarlı ‘glikofit bitkiler’ olarak tanımlanır. Halofit bitkiler, tuzlu koşullara uyum sağlayarak kendilerine zarar vermeyecek şekilde gerekli iyonları alır, yapraklarındaki osmotik potansiyeli dengeler ve metabolik olayları yerine getirerek gelişmelerini sürdürürler. Glikofit bitkilerin bir kısmı ise 200 mM NaCl konsantrasyonunda büyümeye devam etmekle birlikte, daha tuzlu ortamlara duyarlıdır ve zarar görebilir (Greenway ve Munns, 1980; Levitt ve diğ., 1980; Jennings ve diğ., 1980). Bununla birlikte bitki ister glikofit bir bitki ya da halofilik bir bitki olsun sitoplazmalarında bulunan yüksek orandaki tuzu tolere edemezler. Bu yüzden fazla miktardaki tuzu ya vakuollerde tutarlar ya da diğer metabolik faaliyetlerde kullanmak üzere lokalize ederler (Iyengar ve Reddy, 1996). Glikofit bitkiler ise Na^+ alımını sınırlandırır ya da yaşlı dokuları depo bileşeni olarak kullanarak fazla sodyumu bu dokularda biriktirirler (Cheeseman ve diğ., 1988).

Tuz stresi hemen hemen bütün bitkilerin gelişimini etkileyerek çeşitli biyokimyasal ve fizyolojik bozulmalara neden olmaktadır. Örneğin, bitkilerin büyümesini ve gelişmesini osmotik ve iyon stresine bağlı olarak engeller (Parida ve Das, 2005). Bitkilerde, kök rizosferlerinde tuzluluğun artmasıyla ilk olarak osmatik stres oluşmaktadır. Bu dışsal osmotik stres, kullanılabilir su miktarının da azalmasına sebep olur ve bu olay “fizyolojik kuraklık” olarak da adlandırılmaktadır (Tuteja ve diğ., 2007). Kullanılabilir su miktarının

azalmasıyla bitkilerde hücre genişlemesinin azalması ve sürgün gelişiminin yavaşlaması gibi etkiler ortaya çıkar.

Osmotik stresin devamında ortaya çıkan iyon stresi evresinde, ortamda artan Na^+ ve Cl^- iyonlarının K^+ , Ca^{+3} ve NO^- gibi gerekli besin elementleri ile rekabete girmesiyle bitkilerde, besin eksikliği veya besin dengesizliği meydana gelir (Hu ve Schmidhalter, 2005).

Toprak tuzluluğu, fizyolojik kuraklık ve iyon stresi dışında bitkinin transpirasyonunu, solunumunu ve kök gelişimini azaltmaktadır. Bu etkilerin sonucu olarak hormonal dengede yıkım meydana gelmekte, fotosentez azalmakta, nitrat alımı düşerek protein sentezinde azalma görülmekte ve bitki boyu kısalmaktadır. Bu durum, bitkinin yaş ve kuru ağırlığını etkilediğinden çiçek sayısını, meyve kalitesini azaltmakta ve verimin azalmasına neden olmaktadır (Bernstein ve diğ., 1967; Çakırlar ve Topçuoğlu, 1985; Robinson ve diğ., 1983; Sharma ve diğ., 1980).

Tuz stresinin bitkiler üzerindeki etkisi, organ düzeyinde, hücre düzeyinde ve organel düzeyinde olabilir.

Organ düzeyindeki etkileri, hücre bölünmesini ve uzamasını etkileyerek, bitkilerin kök ve gövdesindeki hücre sayısının, mitotik aktivitenin ve hücre bölünme oranının azalmasına neden olması şeklinde ortaya çıkar (Bursens ve diğ., 2000). Bu etkilere bağlı olarak, bitkinin kök, gövde ve ağırlığında ciddi azalmalar, yapraklarda küçülmeler ve sayısında azalmalar, yaprak yüzeyinde bulunan mumsu tabakada ve kutikula tabakasında incelmeler, vasküler doku farklılaşmasında ve gelişmesinde azalmalar ve bitkinin erken dönemlerinde kökte lignifikasyon oluşumu da gözlenebilir (Mohammad ve diğ., 1998; Reddy ve Iyengar, 1999). Kök tüyleri, artan tuz konsantrasyonuna bağlı olarak aktivitelerini kaybeder ve kaybolurlar (Ali ve diğ., 1999). Aşırı tuzluluk ile ortaya çıkan tuz stresi, bitkinin bütün gelişim süreçlerini etkilemesine rağmen, tohum oluşum sürecinin ve buna bağlı olarak tohum veriminin en fazla etkilendiği evre olduğunu söyleyebiliriz (Khatun ve Flowers, 1995). Ayrıca tuzluluk, bitkilerde reproduktif evrede çiçek sayısında azalmalara ve çiçeklenme zamanında değişimlere de neden olmaktadır (Munns ve diğ., 2002).

Tuz stresinin hücresel düzeydeki etkileri, hücre zarı, hücre duvarı ve iyon içeriğindeki etkilere bağlı olarak kendini belli etmektedir. Hücre duvarı, bitkilerde ve mantarlarda bulunan hücrenin en dış tabakasıdır. Hücrenin hacmini düzenleyen ve şeklini belirleyen bu kısmı, hücreden salgılanan polisakkarit ve polimerlerden oluşan destek örtüdür. Tuz stresi koşullarında apoplastta yüksek oranlarda sodyum birikir. Apoplastta biriken sodyum, hücre duvarında bulunan pektin gibi elemanların iyonik dengesini bozarak ve apoplastik enzimleri olumsuz yönde etkileyerek hücre duvarının temel işlevlerini yerine getirmesine engel olmaktadır (Rengel ve diğ., 1992). Tuz stresinin etkilediği diğer bir yapı ise, çift tanbakalı fosfolipid ve bu tabakaya gömülü olan proteinlerden oluşan, seçici geçirgen hücre zarıdır. Hücre zarının yapısındaki lipid kompozisyonun yapısını değiştirerek, zar hasarlarına neden olmaktadır. Lipid kompozisyonundaki bu değişimler, lipidlerin sentezlenmesinde görev alan enzimlerin aktivitesindeki değişimler, degradasyonlar (parçalanma, yıkılma) veya fosfolipid çeşitlerinin hidrolizi sonucu meydana gelir (Huang ve diğ., 2006) ve bu durum, zarın akışkanlığını, geçirgenliğini ve zar proteinlerinin aktivitesini etkiler (Wu ve diğ., 1998). Hücre zarında bulunan lipidler, hidrojen atomlarının komşu olduğu olefinik çifte bağlar açısından zengin olup hücreyi proteolize karşı korumaktadır. Bu olefinik bağlar, tuz stresine bağlı olarak ortaya çıkan oksidatif saldırıların hedefindedir. Bunun sonucu olarak zarda lipid oksidasyonu meydana gelmektedir (Parida ve Das, 2005). Olefinik bağları etkilemesi dışında tuz stresi, hücre zarında bulunan sterollerin serbest hale geçmesine, dolayısıyla hücre zarının akışkanlığının azalmasına neden olur (Reddy ve Iyengar, 1999).

Toprak çözeltisinde yüksek oranlarda bulunan tuzlar, topraktaki su potansiyelinin azalmasını ve buna istinaden bitkinin sudan yararlanabilirliğini azaltmaktadır. Su potansiyelindeki bu azalmanın devamında, turgor basıncının devamı için çözünen madde içeriğinin arttırılması sonucu ozmotik potansiyeldeki azalma ile dengelenmektedir. Tuzluluğun artışı ile birlikte, bitkilerin su ve ozmotik potansiyeli daha da negatifleşir (Mugdal ve diğ., 2010). Yüksek miktarlarda NaCl alımı hücrede, Na^+ ve Cl^- iyonlarının miktarının artmasına sebep olurken, Ca^{+2} , K^+ ve Mg^{+2} konsantrasyonlarının azalmasına sebep olmaktadır (Parida ve Das, 2005).

Hücre içine giren Na^+ zar potansiyelini bozar ve anyon kanalları vasıtasıyla hücre dışındaki Cl^- un pasif olarak hücre içine taşınmasını kolaylaştırmaktadır (Niu ve diğ., 1995; Tuteja ve diğ., 2007). Dış ortamda Na^+ miktarının artmasına bağlı olarak, hücreye Na^+ 'un girişi artarken, K^+ 'un hücreye alınımı azalır ve buna bağlı olarak da Na^+ - K^+ dengesi bozulur. Na^+ 'un, K^+ 'un bağlanacağı alanlar için K^+ ile yarışması bu olayın gerçekleşmesinin en önemli nedenidir (Tester ve Davenport, 2003). Hücrede yüksek oranlarda NaCl birikiminin mikrotübüllerin depolimerizasyonuna neden olduğu ve hücre bölünmesinde iğ ipliklerinin oluşumunu engellediği düşünülmektedir (Rengel ve diğ., 1992).

Tuz stresinin etkilediği bir diğer bölge ise hücre organelleridir. Strese bağlı olarak en belirgin değişimlerin meydana geldiği organel, kloroplastlardır (Koyro ve diğ., 2002). NaCl'ün kloroplastta tetiklediği en önemli değişim tilakoidlerin ve stromanın şişmesidir. NaCl'ün bulunduğu koşullarda kloroplastların ürettiği reaktif oksijen türleri oksidatif stres oluşumunu tetikler ve oluşan OH^- (hidroksil radikali) ile H_2O_2 (hidrojen peroksit), tilakoidlerin şişmesine ve dalgalı bir hal almasına sebep olur (Hernandez ve diğ., 1995; Miyake ve diğ., 2006). Tuz stresinden etkilenen bir diğer organel ise mitokondridir. Mitokondride tuz stresine bağlı olarak parçalanma, şişme, kristalarda azalma, vakuol oluşumunda artış ve elektron transportunun azalması gibi etkilerle karşılaşılabilir (Koyro ve diğ., 2002). Kloroplast ve mitokondri dışında tuz stresi, çekirdek boyutunda değişimlere, degradasyonlara ve bu degradasyonları takiben yıkımlara, endoplazmik retikulumda kısmi şişmelere ve vakuolizasyona; tonoplastta vesikülasyon ve parçalanma ile golgi aparatında hipertrofiye (aşırı büyüme) sebep olmaktadır (Katsuhara ve Kawasaki, 1996; Rahman ve diğ., 2000).

Yüksek NaCl varlığına bağlı olarak ortaya çıkan tuz stresi, ortamdaki osmotik basıncı arttırarak kullanabilir su oranını azaltmaktadır. Kullanılabilir su içeriğinin azalmasına bağlı olarak bitkilerin, transpirasyon ile su kaybını azaltmak için verdikleri ilk tepki stomaların kapanmasıdır. Stomaların kapanması transpirasyonu engelleyerek stoma iletkenliğinin azalmasıyla sonuçlanmaktadır (Munns ve Tester, 2008). Stomaların kapanmasını tetiklemesinin yanı sıra, kloroplast tilakoidlerinde yer alan proteinlerin yapısını değiştirerek, elektron transfer sistemini de etkilemektedir (Ferroni ve diğ., 2007).

Stoma iletkenliğinin azalması ile kloroplastlara giren CO₂ miktarı sınırlandırılmış olur (Degl’Innocenti ve diğ., 2009).

1.1.2. Bitkilerdeki kuraklık stresi

Dünya üzerindeki kullanılabilir alanlar stres faktörlerine göre sınırlandırıldığında, %26’lık payıyla en büyük payı kuraklık stresi içermektedir (Blum ve diğ., 1986). Genel anlamda kuraklık, toprağın su içeriği ile bitki gelişiminde gözle görülür azalmaya neden olacak kadar uzun süren yağışsız dönemdir. Yağışsız dönemin kuraklık oluşturması; toprağın su tutma kapasitesi ve bitkiler tarafından gerçekleştirilen evapo-transpirasyon hızına bağlı olarak gerçekleşmektedir (Jones, 1992; Kozkowsk ve diğ., 1997).

Bitki hücrelerinde, belirgin oranda su kaybı gerçekleştiği zaman turgor kaybıyla kendini gösteren primer stres kuraklıktır (Levitt, 1980). Hücreden su kaybıyla beraber, membran yapısı değişikliğe uğramaktadır; fosfolipidlerin hidrofilik baş kısımları birbirine yaklaşır ve membranlar kompakt bir görünüm alır. Su kaybına bağlı olarak hücrede hacim de azalır ve plazma membranı, hücre duvarından ayrılarak yalnız plazmodezmler aracılığıyla ilişkisini sürdürür (plazmoliz). Gerilim altındaki plazma membranı, yırtılmalara yol açabilir ve bu durum, zarlar üzerinde yerleşmiş olan hidrolitik enzimlerin serbest kalması ve dolayısıyla sitoplazmanın otoliziyle sonuçlanabilir. Bu etki, normal hücresel metabolizmayı kalıcı olarak bozmaktadır (McKersie ve diğ., 1994; Salisbury ve diğ., 1992).

Hücre içeriğinin büyük bir kısmını oluşturan suyun azalması sonucu, normal regülasyon devam edemez ve metabolizma bozulur. Hücresel reaksiyonlar ve işlevler için çok büyük role sahip olan suyun yokluğuna bağlı olarak gerçekleşen iyon birikimi, membran bütünlüğünün ve proteinlerin yapısının bozulmasına yol açarak hücreye zarar verebilir. Hücredeki makromoleküller üzerinde de kuraklığın olumsuz etkileri bulunmaktadır. Örneğin, proteinlerin yapısında bulunan hidrofobik ve hidrofilik aminoasitlerin su ile etkileşimi bozularak proteinin yapısının bozulmasına ve enzim inhibisyonuna neden olmaktadır (Bray ve diğ., 1997). Ayrıca kuraklık, DNA ve RNA’da parçalanmalara sebep olabilir (Kessler ve diğ., 1961).

Kuraklık stresinin etkilediği bir diğer mekanizma ise fotosentezdir. Kuraklığa maruz kalan bitkilerde fotosentezin gerilemesi büyük ölçüde stomaların kapanmasına bağlı olarak gerçekleşen stomatal sınırlamalardır. Bu durum, kloroplastlarda CO₂ difüzyonunu kısıtlamaktadır (Lima ve diğ., 2002; Muller ve diğ., 1996). Köklerde sentezlenen ve transpirasyon akıntısıyla bekçi hücrelerine taşınan absisik asidin (ABA), bekçi hücrelerindeki hipotetik ABA reseptörüne bağlanarak, kuraklık stresi koşulları altında stomaların kapanmasını sağlamaktadır. Stoma kapanmasının yapraktaki su potansiyelinden çok, toprağın su potansiyeline bağlı olduğu görülmüştür. Şiddetli su eksikliğine maruz bırakılan bitkilerden izole edilen kloroplastlarda fotosentetik elektron transportu ve fotofosforilasyon kapasitelerinin azaldığı gösterilmiştir (Teiz ve diğ., 1998).

Fotosentetik elektron zincir reaksiyonlarının inhibisyonu, fotoindirgeyici ya da fotooksidatif hasara neden olabilen aktif oksijen türlerinin oluşumuna neden olabilir. Suyu erişimin kısıtlı olduğu dönemlerde bitkilerin vejetatif dokularında oksidatif stres meydana gelmektedir. Bu stresin kaynağı olarak, kloroplastlarda meydana gelen ışık-klorofil etkileşimleri düşünülmektedir (Farrant ve diğ., 2000). Kurak dönemlerde daha fazla su kaybetmemek için stomalarını kapayarak fotosentezde fiksasyon için gerekli CO₂'nin alınımının kısıtlanmasıyla birlikte bitkilerde, kuantum verimi azalır ve fotosentetik aparatın uyarma enerjisi yükselir (Stuhlfauth ve diğ., 1990). Bu durumda; NADP⁺ (fotosentezdeki elektron akseptörü) kısıtlı hale gelir ve ferrodoksin NADP⁺ yerine oksijeni indirger; böylece, fotosistem I (PSI)'in elektronları O₂'ye transferi sonucunda reaktif O₂⁻ radikali üretilir (Mehler reaksiyonu) (Tambussi ve diğ., 2000). Kuraklık stresiyle artan O₂⁻ oluşumu membranların bütünüyle zarar görmesine neden olur. Süperoksitin kendisi fazla reaktif değildir ve daha çok OH⁻ ve H₂O₂ oluşturmak suretiyle etkili olur. H₂O₂, fotosentezin Calvin döngüsündeki birçok enzimin inaktivasyonuna yol açmaktadır (Halliwell ve diğ., 1989; Sgherry ve diğ., 1996).

1.1.3. Bitkilerde ultraviyole stresi

Çoğunlukla antropojenik etkiler sonucu ozon tabakasında meydana gelen incelmeler, yeryüzüne düşen UV miktarında artışlar meydana getirir. Büyüme ve gelişme üzerinde olumsuz etkilere sahip olan UV-B ışınları, ozon tabakası tarafından tutulmaktadır. Fakat son yıllarda kloroflorokarbon (CFC) gazları gibi bazı hava kirleticileri nedeniyle ozon tabakasında incelmeler meydana gelmiştir. Bu incelmenin önümüzdeki 50 yıl içinde her yıl yaklaşık %0,3-1 oranında artmaya devam edeceği ileri sürülmektedir. Bu nedenle, her geçen yıl yeryüzüne ulaşan UV-B ışınlarının miktarının ve buna paralel olarak küresel ısınma oranının da artacağı düşünülmektedir (Chameides ve diğ., 1994). Işık spektrumunun küçük bir alanını kaplamasına rağmen, taşıdığı enerjinin yüksek olması nedeniyle UV'nin biyolojik süreçler üzerindeki etkisi azımsanmayacak kadar çoktur. UV, dalga boylarına göre 3 gruba ayrılır.

Bunlardan, canlılar için en zararlısı, 200-280 nm dalga boyuna sahip olan UV-C, normal koşullarda yeryüzüne ulaşmaz. UV-B ise 280-315 nm dalga boyuna sahiptir ve bitki gelişim süreçlerinde değişiklikler meydana getirmektedir. Son olarak ise, canlılar için daha az zararlı olarak bilinen ve 315-400 nm dalga boyları arasındaki UV-A'dır (Tevini ve diğ., 2004).

Moleküler düzeyde UV radyasyonuna maruz kalmak organizmalar için ölümcül sonuçlar doğurabilir. Bir fotonun bir moleküle çarpması, organizmada çeşitli hasarlara yol açabilmektedir. UV-B, özellikle DNA molekülünü hedef alması sonucu nükleik asitlerin yapısını bozar (Bieza ve Lois 2001). UV radyasyonunun bilinen en yaygın DNA hasarı "siklobütan primidin dimeri" ve "(6-4) foto-ürün" olan primidin adüksiyonlarıdır. Bu hasar sonucu, aynı zincirde bulunan pirimidinler birleşerek DNA'nın heliks yapısını bozmaktadır. Organizmada bulunan "fotoliyaz" enzimi sayesinde uygun sıcaklıklarda hasarı etkin bir biçimde onarabilmektedir (Caldvell ve diğ., 1998). Bitkilerin UV'ye karşı verdikleri tepkiler, sıcaklık, besin ve su gibi faktörlerin etkisine bağlı olarak değişmektedir.

Nükleik asitler, protein, lipid ve bitki hormonları gibi UV absorblayan biyolojik moleküllerle etkileşimleri nedeniyle UV-B, önemli çevresel stres faktörüdür

(Tevini ve diğ., 2004). UV-B, aminoasitleri de hedef alarak protein ve enzimlerin yapılarını ve lipid peroksidasyonu ile membran yapısını bozmaktadır (Hightower ve diğ., 1994). Bu nedenle, membranlardaki taşıyım engellenmektedir. Engellenen membran taşıması da fotosentetik aktiviteyi olumsuz yönde etkilemektedir (Allen ve diğ., 1998).

Artan UV-B radyasyonu ile, bitkilerin epidermal hücrelerinde, palizat parankimasında ve bekçi hücrelerinde morfolojik ve anatomik değişimler meydana gelmektedir (Zu ve diğ., 2010). UV-B radyasyonu çiçeklenme zamanının yanı sıra, belli türlerdeki çiçeklerin sayısını da değiştirebilmektedir. Bunun yanında bitkilerin üreme organları, UV-B radyasyonunun zararlı etkilerine duyarlı olabilmektedirler. Ancak, polen ve ovül, sepal, petal ve ovaryum gibi bitkilerin üreme kısımlarının çoğu güneş kaynaklı UV-B radyasyonuna karşı korunmuş durumdadır (Caldwell ve diğ., 1998).

UV-B radyasyonunun asıl hedefi biyomembranlardır. UV-B radyasyonunun artmasıyla birlikte, plazma membranlarında ATPaz miktarında azalmaların meydana geldiği, membran geçirgenliğinin arttığı ve doymamış yağ asitlerin etkilendiği bilinmektedir (An ve diğ., 2000). Bitkilerde stres belirtisi olan ve lipid peroksidasyonunun son ürünlerinden biri olarak gösterilen malondialdehit (MDA) analizleriyle membranlardaki etkileri yansıtılmaktadır (Büyük ve diğ., 2012).

Bitkilerin UV-B radyasyonuna maruz kalması, fotosentetik pigmentlerin miktarında düşüş, membran hasarıyla bağlantılı olarak tilakoid bütünlüğünde kayıp, stomatal iletkenlikte artma ve Rubisco aktivitesinde azalma ile sonuçlanmaktadır (Jansen ve diğ., 1998). Fotosentez gibi önemli bir olayın gerçekleştiği kloroplast, çevresel stres faktörlerine maruz kalmasına rağmen yapısal bütünlüğünün korunması çok önemlidir. Çevresel değişimlerden ilk etkilenen organellerden biri olan kloroplast, oksijen radikallerine en çok maruz kalan yapıdır. Stres koşulu altında, yaprak canlılığının yitirilmesi sırasında en önemli olay membran lipidlerinin parçalanmasıyla kloroplastların bütünlüğünün bozulmasıdır (Zang ve diğ., 2010).

Stres koşulları durumunda, tilakoid membranının hasar görmesi mutlaka fotosentezde önemli bir düşüşe ve özellikle tarım bitkilerinde ürün veriminde azalmaya sebep olur (Büyük ve diğ., 2012). Klorofil a/b oranındaki artış, UV-B radyasyonunun sebep olduğu pigment miktarlarındaki değişimi ve tilakoid membranlardaki bozulmayı göstermektedir (Zu ve diğ., 2010).

Yüksek UV-B radyasyonunun ışık reaksiyonlarını etkilemesinin yanı sıra, Calvin döngüsündeki enzimlerin kaybına ve stomanın kapanmasına neden olduğu düşünülmektedir (Keiller ve diğ., 2003). Calvin döngüsü ile PSI ve PSII'nin görev aldığı ışık reaksiyonlarının, değişen çevresel koşullarda dengeli olması önemlidir (Ensminger ve diğ., 2006; Jansen ve diğ., 1998; Laposi ve diğ., 2009). Stres koşulları ile bu denge bozulduğunda, CO₂ fiksasyonunda görev alan enzimlerin aktivitesinin değişikliğe uğradığı ve sakkaroz sentezinin inhibe olduğu ileri sürülmektedir. Bu nedenle, kloroplast ile sitozol arasında madde alışverişi olmadığından ATP sentezinin engellendiği ve kloroplastlarda fosforlanmış ara ürünlerin biriktiği saptanmıştır (Verinieri ve diğ., 2001).

1.1.4. Bitkilerde ağır metal stresi

Günümüzde, özellikle antropojenik etkiler sonucu ekosistemlerin toprak, su ve hava gibi ortamlarında yaygın bir şekilde birikmeye başlayan ağır metaller, dünya yüzeyindeki tüm canlıları etkileyen bir faktör haline gelmektedirler. Endüstriyel faaliyetler, motorlu taşıtların egzozlarından çıkan zehirli gazlar, maden yatakları ve işletmeleri, tarımda kullanılan gübre ve ilaçlar gibi insan etkileri sonucunda doğada birikebildikleri gibi, volkanik faaliyetler sonucu doğal olarakta çevreye yayılabilirler (Stresty ve Madhava Rao, 1999). Spesifik ağırlıkları 5 g/cm³'ten daha büyük olan elementler ağır metal olarak isimlendirilmektedir. Demir (Fe), mangan (Mn), molibden (Mo), nikel (Ni), çinko (Zn), bakır (Cu) gibi elementler, bitkilerde normal büyüme ve metabolik faaliyetlerini yerine getirebilmeleri için gerekli olan önemli mikrobesein elementleridir (Vangronsveld ve Clijters, 1994). Diğer yandan kadmiyum (Cd), kurşun (Pb), krom (Cr) ve civa (Hg) ise önemli olmayan ve canlılar için son derece toksik olan elementlerdir (Devi ve Prasad 1998; Rai ve diğ., 2004; Sebastiani ve diğ., 2004).

Ağır metaller, bitkilerde solunum, fotosentez, transpirasyon, enzim aktivitesi, protein sentezi, membran stabilitesi, hormonal denge, hücre büyümesi ve bitki-su ilişkisi gibi fizyolojik süreçleri inhibe eder (Vangronsveld ve Clijsters, 1994, Zornoza ve diğ., 2002). Bitkinin gelişimi için mutlak olsun ya da olmasın ağır metallerin doku ve organlarında aşırı birikimi bitkilerin vejetatif ve generatif organlarının gelişimini olumsuz yönde etkilemektedir (Gür ve diğ., 2004). Hücre membranlarındaki hasar, bitkilerde ağır metal toksik etkisinin ilk etkilendiği yerdir. Ağır metallerin bitkilerdeki toksisitesi, metalden metale, strese maruz kalma süresine ve türden türe değişebilmektedir.

Ağır metallerden biri olan çinko (Zn^{+2}), insan ve hayvanlarda olduğu gibi bitkilerde de çok çeşitli ve önemli metabolik işlevlere sahiptir. Enzim aktivasyonu, solunum ve biyolojik membran stabilitesinin yanı sıra, protein ve karbonhidrat sentezi gibi çok önemli metabolik süreçlerdeki rolü nedeniyle ürün miktarı ve kalitesini direkt olarak etkilemektedir (Rout ve Das, 2003).

Endüstride metal kaplama ve alaşımlarda, mürekkep, kopya kağıtları, kozmetik sektöründe kullanılan çinko, sanayileşmenin yoğun olduğu alanlardaki atık sularıyla, kanalizasyon sularıyla ve asit yağmurları aracılığı ile toprağa ulaşmaktadır (Vaillant ve diğ., 2005). Topraklardaki toplam Zn^{+2} konsantrasyonu 10-300 ppm arasında değişebilmektedir. Bitkiler tarafından kullanılan Zn^{+2} oranı ise 3.6-5.5 ppm arasındadır. Bitkilerde görülen toksik etkiler ise 400 ppm'den sonra başlamaktadır (Özbek ve diğ., 1995). Çinko toksisitesine maruz kalmış bitkilerde, kök ve sürgün büyümesi azalır, kökler inceler, genç yapraklar kıvrılır ve kloroz (sarma) görülür, hücre büyümesi ve uzaması engellenir, hücre organelleri parçalanır ve klorofil sentezi azalır ve engellenir (Rout ve Das, 2003). Yüksek oranda çinkonun klorofil sentezini engellemesinin nedeni ise, ortamda yeterli miktarda demir bulunması halinde bile bitkinin bundan yararlanmasını engellemesi ve klorofilin merkezinde bulunan magnezyumun yerine geçmesi olarak gösterilmektedir (Van Assche ve Clijsters, 1990). Çinko, kök meristem hücrelerinde bölünecek olan hücrelerde birikerek profazın sonundaki olayları dolayısıyla da mitoz bölünmeyi engellemektedir. Ayrıca hücrelerin ligninleşmesini sağlayarak hem kök hem gövde büyümesini engellediği görülmüştür (El-Ghamery ve diğ., 2003).

Bitkiler için gerekli besin elementlerinden biri olan ve toprakta en düşük miktarda bulunan bir diğer element ise molibdendir (Mo^{+6}). Boya endüstrisinde, nükleer enerji uygulamalarında, çelik sanayinde kullanılan molibden, sodyum molibdat (Na_2MoO_4) şeklinde bitkiler tarafından eser miktarlarda kullanılır. Normal bir tarım toprağında, alınabilir molibden miktarı 0,2 ppm kadardır. Bitkilerin molibden ihtiyacı çok düşük miktarda olduğu için, bu elementin eksikliği çok sık rastlanan bir durum değildir. Molibdenin biyolojik fonksiyonları genelde bakır metabolizması ile ilişkilidir. Bakır ile ilişkili olmayan fonksiyonlardan en önemlileri; ksantin oksidaz, aldehid oksidaz ve sülfid oksidaz enzimlerinin yapısına ayrıca sitokrom C ile ksantin oksidaz reaksiyonuna ve aldehid oksidaz ile sitokrom C'nin indirgenme reaksiyonuna katılmasıdır. Bitkilerdeki noksanlığında şiddetli sararmalar ve cüceleşmeler görülebilmektedir. Yapraklarda kıvrılmalar ve sonunda kurumalar meydana gelebilmektedir.

1.2. Reaktif Oksijen Türleri ve Antioksidan Enzimler

Çevre ile sürekli etkileşim içinde olan bitkiler, içinde bulundukları çevrede uygun olmayan durum ile karşılaştıklarında, adaptasyon eksikliğine bağlı olarak stres koşullarına maruz kalabilirler. Bitkiler, hayvanlar gibi herhangi bir strese maruz kaldıklarında ortamdan kaçınma gibi bir seçeneğe sahip olmadıkları için strese direkt olarak maruz kalmaktadırlar. Bitkilerde stres koşullarına karşı oluşan cevap mekanizmalarından bir tanesi reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu ve detoksifikasyonudur.

ROS, bitkilerde endojen olarak kloroplasttaki fotosentez reaksiyonları sonucu, plastit ve peroksizomlarda, NADPH oksidaz, hücre duvarı peroksidazları ve amino oksidaz gibi enzimlerin etkisiyle oluşan serbest radikallerdir (Van Breusegem ve diğ., 2006; Van Camp ve diğ., 1998). Radikal olmayan bir atom veya molekülden bir elektron çıkmasıyla ya da atom ve moleküle bir elektron ilavesiyle oluşmaktadırlar. Diğer moleküllere elektron verebildiklerinden veya onlardan elektron alabildiklerinden dolayı organizmada indirgeyici veya yükseltgeyici olarak davranmaktadırlar (Flora ve diğ., 2007; Halliwell ve diğ., 1998). Hücrede başlıca bilinen ROS'lar, singlet oksijen ($^1\text{O}_2$), süperoksit anyonu

(O₂⁻), hidrojen peroksit (H₂O₂) ve hidroksil radikali (OH⁻) olup normal koşullarda hücredeki seviyeleri sürekli denge halindedir (Halliwell ve diğ., 1998).

Singlet oksijen (¹O₂), normal oksijenin yüksek enerjili formudur. ¹O₂, elektron taşıma sisteminde görevli olan O₂ molekülünün fazladan enerji almasıyla kendi dönüş yönünden tersi yönde olan farklı bir yörüngeye yer değiştirmesi sonucu oluşabildiği gibi; O₂⁻ radikalinin nitrik asit (NO) ile reaksiyonu ve H₂O₂'nin hipoklorit (ClO⁻) ile reaksiyonu sonucunda oluşabilmektedir. Birçok biyolojik moleküle benzeyen kuantum durumuna sahip oldukları için kolaylıkla onlarla reaksiyona girebilir. OH⁻ radikali gibi lipoksijenaz özelliği göstermektedir. Özellikle karbon-karbon çift bağları singlet oksijenin tepkimeye girebildiği bağlardır. Sistein, metionin, triptofan, tirozin ve hisitidin gibi aminoasitlerin yapısında bulunan çift bağlardan kaynaklanan yüksek elektron yoğunluğundan veya kükürt kısımlarından dolayı singlet oksijen ile oksidasyona uğramaları muhtemeldir (Halliwell ve diğ., 1998; Stadtman ve diğ., 1997).

Süperoksit anyonu (O₂⁻), kloroplastta, fotosistem I ve II'de elektron taşıma sisteminde görev alan moleküler oksijenin (O₂) bir elektron transferi sonucu indirgenmesi ile oluşmaktadır. Moleküler oksijenin ferrodoksin (Fd_{red}) aracılığı ile indirgenmesiyle oluşur. Hücrel koşullarda üretilen süperoksit, oksitleyici veya indirgeyici ajan olarak davranabilmektedir. Aldığı elektronu metal iyonuna, sitokrom-c'ye veya bir radikale vererek tekrar oksijene oksitlenebilir. Oksijenden daha oksitleyici özelliği olan süperoksit bir elektron daha alarak peroksit anyonuna indirgenir (Mehlar, 1951; Harbinson, 1993). Süperoksit, metal iyonlarını indirgeyerek bağlı olduğu proteinlerden salınımına neden olabilir. Ayrıca kofaktörlerin oksidasyon düzeylerini bozar ve metal iyonlarının katıldığı hidroksil radikali yapım tepkimelerini hızlandırır (Harbinson ve diğ., 1993; Mehlar ve diğ., 1951).

Hidrojen peroksit (H₂O₂), aerobik canlılarda süperoksitlerin katalitik aktivitesi çok yüksek bir enzim olan süperoksit dismutaz (SOD) tarafından katalizlenmesi ile oluşmaktadır. Ayrıca suyun yüksek enerjili iyonlaştırıcı radyasyona maruz kalması sonucunda oluşabilmektedir. Biyolojik sistemlerdeki en hasar verici

radikaldir. Hidrojen peroksit oksitleyici bir tür olarak bilinir; bunun en önemli nedeni, demir ve bakır gibi metal iyonlarının varlığında $\text{OH}^\cdot$ radikalinin öncülü olarak davranmasıdır. H_2O_2 özellikle proteinlerdeki “hem” grubunda bulunan demir ile tepkimeye girer ve yüksek oksidasyon düzeyindeki reaktif demir formlarını oluşturur. Bu formdaki demir çok güçlü oksitleyici özelliklere sahip olmakla birlikte, hücre zarlarında lipid peroksidasyonu gibi radikal tepkimeleri başlatabilmektedir. Oksitleyici özelliği nedeniyle biyolojik sistemlerde oluşan H_2O_2 ’nin derhal ortamdan uzaklaştırılmaları gerekir (Asada ve diğ., 1974).

Hidroksil radikali ($\text{OH}^\cdot$), hücredeki en reaktif oksidantlardan bir tanesidir. Hücrelerin $\text{OH}^\cdot$ ’yi elimine edebilecek bir enzim sistemi olmadığından kolayca tüm biyolojik moleküller ile bu radikaller reaksiyona girebilir ve fazla miktarda üretildiklerinde hücrelerin ölümüne sebep olabilirler. $\text{OH}^\cdot$ radikali, nispeten daha az zararlı olan hidrojen peroksit (H_2O_2) ve $\text{O}_2^\cdot$ anyonunun metal iyonları varlığında Haber–Weiss (Cu^+ , Cu^{+2} , Fe^{+2} , Fe^{+3}) veya fenton (Fe^{+2} ve diğer geçiş metalleri; Cu, Zn, Mn, Cr, Co, Ni, Mo) reaksiyonu ile oluşabilir (Smirnoff ve diğ., 1993).

Bitkiler oksidatif stres altında yaşamlarına devam edebilmek ve stres ile baş edebilmek için reaktif oksijen türlerinin kontrolünü ve detoksifikasyonunu sağlayan bir takım antioksidanlara sahiptirler. Antioksidanlar düşük konsantrasyonlarda oksidasyon yapabilme yeteneğine sahip bir substratın oksidasyonunu azaltan (elektron aktarımıyla) veya engelleyen yani oksidasyona karşı mücadele eden maddelerdir. Antioksidanlar, serbest radikallere karşı korunmada ve canlılarda pek çok hastalığın önlenmesinde önemli görev üstlenmişlerdir. Oksidatif strese karşı bu etkilerini zincirleme şekilde ilerleyen lipid peroksidasyonu gibi serbest radikal üreten basamaklara etki ederek, direkt olarak ROS konsantrasyonunu azaltarak, serbest radikal üretimini başlatan ilk radikali etkisiz hale getirerek ya da geçiş metalleri ile şelat oluşturarak göstermektedirler (Çaylak, 2011).

Antioksidanlar bitkilerin savunma mekanizmasında önemli role sahiptirler. Temel işlevleri, metabolik olaylar sonucu meydana gelen reaktif oksijen bileşiklerini (ROS, reactive oxygen species) ortamdan uzaklaştırarak bitkiyi bu

radikallerin zararlı etkisinden korumaktır (Scandalios ve diğ., 2005). Bunlar arasında en önemli olan antioksidanlar, katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD) ve peroksidazdır (POD).

Katalazlar (E.C.1.11.1.6), H₂O₂'in su ve moleküler oksijene parçalanmasını katalizleyen enzimlerdir ve doğada yaygın olarak bulunmaktadır (Kurakov ve diğ., 2001). Katalazlar, genellikle peroksizom olarak adlandırılan hücre organellerinde bulunmakta ve metalloenzimler grubuna dahil olup çoğunlukla tetramer halindedirler. Monomerleri birbirine benzemekle birlikte 60-90 kDa arasında değişen molekül ağırlığına sahiptirler. Her bir monomer ayrıca yapısında ferriprotoporfirin içermektedir. Katalazları genel olarak üç gruba ayırabiliriz: monofonksiyonel hem (heme, haem) grubu içeren katalazlar, katalaz peroksidazlar, demir/hem içermeyip Mn içeren katalazlar (Loewen ve diğ., 2015). Katalazların katalizlediği reaksiyon genel olarak H₂O₂'in su ve moleküler oksijene parçalanması şeklindedir. Reaksiyon (1.1)'deki gibi;



Katalaz peroksidazlar hem içeren ve monofonksiyonel katalazlara benzeyen enzimlerdir. Uygun organik elektron vericinin ortamda bulunmasıyla ve hidrojen peroksit seviyesinin düşük olduğu durumda peroksidaz aktivitesi de gösterebilmektedirler. Mn içeren enzimler ise aynı zamanda yalancı katalazlar olarak da tanımlanabilir. Bu tip katalazlar hem içeren katalazlara göre daha az yaygındırlar. Bitkilerde katalazların çoklu izozim formları bulunmaktadır. Mısır bitkisinde CAT1, CAT2 ve CAT3 olmak üzere 3 farklı izoform bulunmaktadır. Bu izoformlar ayrı kromozomlar üzerinde yer alan genler tarafından birbirinden farklı olarak ifade olmakta ve birbirinden bağımsız bir şekilde düzenlenmektedir. Peroksizomlar ve sitoplazmada CAT1 ve CAT2, mitokondride ise CAT3 lokalize olmaktadır. Artan katalaz aktiviteleri, bitkilerin zor şartlara adapte olmalarına ve metabolik aktivitelerini sürdürmelerine, toksik düzeydeki H₂O₂'i minimize ederek yardımcı olmaktadır (Scandalios, 1990).

Süperoksit dismutaz (E.C.1.15.1.1) (SOD) ise molekül ağırlığı 32,5 KDa olan bir proteindir. Aerobik olan tüm organizmalarda bulunmaktadır. Bitkilerde de yaygın olarak bulunmakla birlikte olağanüstü katalitik etkinlikte çalışan

metallaproteinlerdir. Esas fonksiyonu süperoksit radikalini (O_2^-) hidrojen peroksit (H_2O_2) dönüştürmektir; reaksiyon ürünü olan H_2O_2 ise yukarıda belirtildiği gibi katalaz enzimi ile ortamdan uzaklaştırılır. SOD'ların aktif merkezlerinde yer alan metal iyonlarına göre üç izoenzimi vardır. Bunlar bakır ve çinko içeren Cu/ Zn SOD, mangan içeren Mn-SOD ve demir içeren Fe SOD'lardır (Scandalios, 1993; 2005). Bunlardan Fe-SOD (prokaryotik organizmalarda, kloroplast stromasında) ve Mn-SOD (prokaryotik organizmalarda ve okaryotların mitokondrisinde) yapısal olarak benzerlik göstermesine karşın Cu/Zn-SOD (sitozolde ve kloroplastlarda) diğer ikisinden farklı bir yapıya sahiptir. Fe-SOD bitkilerde en fazla rastlanan izozim olmamakla birlikte, bulunduğu kloroplast ile bağlantılı olduğu görülmüştür (Ferreira ve diğ., 2002). Bu enzimler H_2O_2 'e olan farklı duyarlılıklarına göre lokalize olmaktadır. SOD'un aşırı ifade olması, oksidatif stresin negatif etkileriyle mücadele etmede ve bitkilerin yaşamlarının devamında önemlidir (Bannister ve diğ., 1987).

Peroksidazlar (E.C.1.11.1.7) (POD), elverişsiz dış faktörler altında üretilen zararlı oksijen radikallerinin seviyesini düzenler ve süperoksit dismutaz ve CAT'ı da içeren bitki hücresinin koruyucu enzim kompleksinin parçasıdır. Molekül ağırlıkları 35-100 kDa arasında değişmektedir. Peroksidazlar Hem'i çevreleyen iki farklı kısma bölünmüş ve birbirine sarılıp dönen 10-11 heliksten oluşmuştur. Ligninleşme, hücre duvarındaki polisakkaritlerin çapraz bağlanması ve proteinlerin toplanması gibi pek çok önemli fizyolojik olaylarda görev almaktadır. Bunun yanı sıra düşük sıcaklık, tuzluluk, kuraklık, parazit enfeksiyonu, patojenler, sıcaklık stresi, UV ışık tesirleri gibi çeşitli stres faktörlerinin varlığında artan peroksidaz aktivitesi, bu enzimin stres enzimi olarak anılmasına sebep olmaktadır. Fiziksel, kimyasal ve biyolojik stresin değişikliğine tepki olarak bitkilerde POD aktivitesi artmaktadır (Kim ve diğ., 2000). Bitkisel peroksidaz yapraklarda, yaralanan gövdelerde, kotiledon yapraklarda, çiçek saplarında bulunmuş ve bu doku hücrelerinde nükleus, mitokondri, ribozom, hücre duvarı ve hücre membranlarında, ayrıca ekstraselüler bölgelerde de lokalize olmuştur. Peroksidaz enziminin çok sayıda fizyolojik

olayda rol oynadığı ve bir çok metabolik olayın gerçekleşmesine yardımcı olduğu bilinmektedir (Tasgın ve diğ., 2006).

1.3. Çalışmada Kullanılan Bitki Hakkında Genel Bilgiler

Amsonia orientalis Decne. (Apocynaceae), dünyada sadece Türkiye'nin kuzeybatısı ve Yunanistan'ın kuzeydoğusu olmak üzere son derece dar bir alanda yayılış gösteren, nadir ve tükenme tehdidi altında olan bir bitki türüdür. Ülkemizde Balıkesir, Bursa ve İstanbul olmak üzere 3 yerde rapor edilmiştir. Özen (2006) bu bitki ile ilgili yaptığı arazi çalışmalarında, bitkinin Türkiye popülasyonunun giderek azaldığını ve hatta bazı yerlerde tamamen ortadan kalktığını tespit etmiştir. Sonradan da Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabında “çok tehlikede” (CR; critically endangered) olarak tanımlanan tehlike kategorisinde gösterilip Bern Sözleşmesi gereği Avrupa Konseyi tarafından Avrupa ölçeğinde mutlak korunması gereken bitki türleri listesinde yer almıştır. Nesli tükenmekte olan bu bitkinin bünyesinde, Apocynaceae familyasının diğer birçok üyesi gibi tıbbi ve ekonomik öneme sahip çok sayıda glikozitler ve glikoalkaloitler bulundurduğu bilinmektedir. Kimyasal yapıları tanımlanmış olan bu maddelerin özellikle kalp ve kanser hastalıkları olmak üzere çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılabileceği belirtilmiştir. Bitki aynı zamanda antimikrobiyal aktiviteye de sahiptir. Farmakolojik öneminin yanında, “Mavi yıldız” veya “Doğu razyası” gibi yaygın isimlerle anılan *A. orientalis*, yıldız şeklinde gösterişli mavi-mor çiçeklere sahip olması nedeniyle Avrupa'daki bazı bahçelerde süs bitkisi olarak da yetiştirilmektedir.

A. orientalis (Mavi Yıldız) (Şekil 1.1), 30-60 cm uzunluğa, dallanmış latekse sahip, çok yıllık bir bitkidir. Mayıs-Haziran ayında çimlenmeye başlayan bitkinin, Temmuz ayının ortalarına kadar çiçeklenme evresi devam etmektedir. Meyvesi Temmuz ayının sonlarına doğru olgunlaşmaya başlar. Yazın diğer aylarında ve sonbahar aylarını vejetatif dönemde geçiren bitki, kış aylarında toprakaltı kısımları (rizomları) hariç toprak üstünde kalan kısımları kaybolmaktadır. Balıkesir çevresinde yüksekliği 119-261 metreyi bulan, kışın akan ve yazın tamamen kuruyan dere kenarlarında ya da dere içindeki suyun kuruduğu bölgelerde yayılış göstermektedir. Kum ve silt oranı yüksek yerlerde

yetişmektedir. Bitki tam güneşli ya da kısmen gölgeli yerlerde iyi gelişme göstermektedir (zen, 2002; 2006).



şekil 1.1. *A. orientalis* (zen, 2002)

A. orientalis bünyesindeki fenolik maddelerin tanımlanması ve bu bileşiklerin biyolojik rolleri hakkında az sayıda çalışma mevcuttur. Bunlardan *A. orientalis* kökleri üzerine yapılan bir çalışmada sekologanın denilen bir bileşişe rastlanmıştır. Sekologanın, isopirenoid glikozit olan bir biyoanahtardır. Çeşitli biyosentez yolaklarının merkez pozisyonunda bulunur ve diğerk birçok doğal ürünün başlangıç bileşiğidir. Köklerdeki sekologanın içeriğinin ortalama değeri %3.27 (w/w) olarak bulunmuş ve bu nedenle *A. orientalis*'in farmasotik (eczacılık) endüstri için uygun bir hammadde kaynağı olabileceğine işaret edilmiştir. Özellikle, *A. orientalis* zerinde alkaloit içeriği yönünden önemli çalışmalarda bu taksonun 12 çeşit alkaloit bulundurduğu rapor edilmiştir (Dabin Lengyel ve diğ., 1986). Bu alkaloitlerin bir kısmı anti kanser özellikleriyle tıbbi öneme sahiptirler (zen ve diğ., 2006). *A. orientalis* genetik çeşitliliğini ilişkin yapılan çalışmalar da bulunmaktadır (Gürkanlı ve diğ., 2014). Aynı bitki ile yapılan başka bir çalışmada ise bitki bünyesindeki çeşitli kardiyoaktif glikozitler, glikoalkaloitler ve yeni glikozitler izole edilerek bu bileşiklerden ikisinin glikozit, birinin aglikon ve bir tanesinin de glikoalkaloit olduğu, bu glikoalkaloitin daha önce literatürde *Rhazya* (syn. *Amsonia*) *stricta*'dan tanımlanan scictosamide olduğu belirtilmiştir (Akın ve diğ., 2001). *A. orientalis* ile yapılan bir diğerk çalışma ise bitkinin kuru toprak üstü

kısımlarından izole edilen altı yeni flavonoid glikozit ile ilgilidir (Itoh ve diğ., 2002).

Amsonia (syn. *Rhazya*) genusunun *A. orientalis* dışındaki diğer türleri üzerinde yapılan bazı araştırmalara da literatürde rastlamak mümkündür. Bunlardan biri; *A. tabernaemontana*'da büyüme düzenleyicilerinin bulunduğu sıvı besiyerinde bitki üretiminin araştırılması üzerine olup sonuç olarak gövde eksplantından bir hafta içinde yeni tomurcuklar, iki hafta içinde ise kök oluşumu gözlenmiştir (Molnar ve diğ., 1986). Başka bir araştırmada Arizona'da yayılış gösteren *A. grandiflora*'nın triterpenoitleri çalışılmış, bu türün koruma altına alınması gerekliliği vurgulanmıştır (Wahyuono ve diğ., 1987). *A. elliptica*'nın kökü kullanılarak yapılan doku kültürü çalışmalarında ise besiyeri olarak B5 (Gamborg ve diğ., 1968) ve büyüme düzenleyicisi olarak naftalen asetik asit kullanıldığında, bitki rejenerasyonu ve alkaloit üretiminde artış olduğunu rapor edilmiştir (Sauerwein ve diğ., 1991). Yine, *A. elliptica*'nın hücre kültüründe yapılan sterol analizinde, bitkide bulunan temel sterolün campesterol olduğu tespit edilmiştir (Uomori ve diğ., 1992).

Assaeed ve Al-Doss (2001)'un gerçekleştirdiği bir çalışmada ise, *R. stricta* ve *Lasiurus scindicus*'un su stresine karşı fide oluşturma rekabeti araştırılmış ve *R. stricta*'nın su stresinde fide verme oranının *L. scindicus*'a göre daha düşük olduğu tespit edilmiştir.

Yukarıda belirtildiği gibi *Amsonia* cinsi sadece tıbbi ve ekonomik önemi bakımından değil, ülkemiz ve yerkürenin biyoçeşitliliğinin korunması bakımından da önem taşıyan bir bitki olmasına rağmen *A. orientalis* üzerinde dünya literatüründe yukarıda sayılanlardan başka sadece birkaç bilimsel çalışmanın bulunması (Özen, 2002; 2006), bu bitki ile ilgili büyük bir veri eksikliği olduğunu ortaya koymaktadır.

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Materyal

Tükenme tehlikesi altındaki *Amsonia orientalis* bitkisinin stres proteinlerinin araştırıldığı bu çalışmada, Kocaeli Üniveristesi Biyoloji bölümüne ait sit alanında yetiştirilen Mavi Yıldız (*A. orientalis*) bitkisi kullanılmıştır. Protein miktarı ve enzim aktivitesi Bio-Rad Smartspec 3000 (ABD) cihazı ile tayin edildi. Homojenize işleminin ardından pellet ve süpernatant kısımları Sigma 4-16 K (ABD) santrifüj cihazı ile birbirinden ayrıldı. Bitki stres ortamlarında kullanılan kimyasallar NaCl, PEG6000, ZnSO₄, Na₂MoO₄ olup ayrıca sitokinin grubu hormon olan benzilamin pürin (BAP) ve besi ortam olarak Murashige & Skoog (MS) kullanıldı. Kimyasallar Merck (Almanya), Bio-Rad (ABD), Sigma-Aldrich (Almanya) firmalarından temin edildi.

2.2. Metod

2.2.1. Bitki eksplantların dezenfeksiyonu ve stres koşullarını oluşturma

Ex vitro koruma parsellerinde yetiştirilen *A. orientalis* bitkisinden alınan nodal eksplantların önce %70 (v/v) etil alkol içerisinde 2 dakika ardından %1 (v/v) sodyum hipoklorit içerisinde 10-12 dakika bekletilip yüzeysel sterilizasyonları sağlanmıştır. Sonrasında eksplantlar 40 mL 1,0 mg/L benzilamino pürin (BAP) içeren Murashige & Skoog (MS) sürgün çoğaltım ortamına ekilmiş ve 1 aylık kültür periyodu sonunda tuzluluk, kuraklık, UV, ağır metal (Zn⁺², Mo⁺⁶) stresleri denemelerinde kullanılacak nodları içeren sürgünler elde edilmiştir. Aynı işlem, *in vitro* sürgünler kullanılarak sürekli olarak tekrar edilmekte ve gerekli eksplant kaynağı bu yöntemle sağlanmaktadır (Acemi ve diğ., 2013).

Tuz stresi oluturulması için, 200 mM NaCl konsantrasyonuna kadar ön uygulama yapılmış olup, bitkinin bu konsantrasyonda yaşamadığı kaydedilmiştir. Daha sonra, *in vitro* kuşullarda elde edilen sürgünlerden alınan nodal explantlar 25, 50, 75, 100, 125 ve 150 mM NaCl içeren MS besi ortamında kültüre

alınmışlardır. Bir aylık kültür periyodunun sonunda gerekli morfometrik ölçümler (sürgün uzunluğu, sürgün sayısı, kök uzunluğu, kök sayısı) yapılmıştır.

UV stresini oluşturabilmek için, 90 dakikaya kadar ön uygulama yapıldı ancak bitkide bu sürede nekrozlar oluştuğu kaydedilmiştir. Daha sonra, *in vitro* koşullarda üretilen sürgünlerden nodal eksplantlar alınarak MS besi ortamına aktarılmışlardır. Kültürlerin oluşturulduğu bu kaplar kültürün 1. gününde kontrol grubunun dışında 15, 30 ve 60 dakikalık süreler boyunca en az 15 cm uzaklıktan UV-B (100-280 nm) radyasyonuna maruz bırakılmışlardır. Bu işlem kültürün 15. ve 30. gününde aynı sürelerle tekrarlanmıştır. Bir aylık kültür periyodunun sonunda gerekli morfometrik ölçümler (sürgün uzunluğu, sürgün sayısı, kök uzunluğu, kök sayısı) yapılmıştır. UV-B stresinin oluşturulmasında 16 W gücünde (OSRAM, PURITEC HNS) germisidal lamba kullanılmıştır. Uygulama laminar kabin içerisinde gerçekleştirilmiştir.

Kuraklık stresini oluşturabilmek için, %6 (w/v) Polietilen glikol(PEG) – 6000 konsantrasyonu ön uygulama olarak denenmiş ancak bitkinin bu konsantrasyonda yaşamadığı kaydedilmiştir. Daha sonra, *in vitro* koşullarda üretilen sürgünlerden nodal eksplantlar alınarak, kontrol, %0,5 (w/v), %1 (w/v), %2 (w/v) ve %4 (w/v) Polietilen glikol(PEG) – 6000 içeren MS besi ortamında kültüre alınmışlardır. Bir aylık kültür periyodunun sonunda gerekli morfometrik ölçümler (sürgün uzunluğu, sürgün sayısı, kök uzunluğu, kök sayısı) yapılmıştır.

Zn⁺² stresini oluşturmak için *in vitro* koşullarda üretilen sürgünlerden alınacak nodal eksplantlar kontrol grubunun dışında ayrı ayrı 0,1, 0,5, 1, 2,5, 5 ve 10 mM çinko sülfat (ZnSO₄) ilave edilmiş MS besi ortamına aktarılmışlardır. Bir aylık kültür periyodunun sonunda gerekli morfometrik ölçümler (sürgün uzunluğu, sürgün sayısı, kök uzunluğu, kök sayısı) yapılmıştır. Halihazırda MS besiyerinin içerisinde (standart formülasyonunda) 8,6 mg/L konsantrasyonda ZnSO₄.7H₂O bulunmaktadır.

Mo⁺⁶ stresini oluşturmak için *in vitro* koşullarda üretilen sürgünlerden alınacak nodal eksplantlar kontrol grubunun dışında ayrı ayrı 0,1, 0,5, 1, 2,5, 5 ve 10 mM sodyum molibdat (Na₂MoO₄) ilave edilmiş MS besi ortamına aktarılmışlardır. Bir aylık kültür periyodunun sonunda gerekli morfometrik ölçümler (sürgün

uzunluğu, sürgün sayısı, kök uzunluğu, kök sayısı) yapılmıştır. Halihazırda MS besiyerinin içerisinde (standart formülasyonunda) 0,25 mg/L konsantrasyonda $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ bulunmaktadır.

Çalışmadaki tüm deneysel ölçümlerin istatistik testleri için IBM SPSS 19 istatistik programı kullanıldı.

Kültür şartları büyütme kabininde $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fotosentetik foton yoğunluğundaki ışık altında 16/8 ışıklandırma periyodunda, $23 \pm 1^\circ\text{C}$ de ve %65 nispi nem olarak uygulanmıştır. Tüm stres faktörü denemelerinde aynı kültür şartları uygulanmıştır.

2.2.2. Ham ekstraktın hazırlanması

Bitki ekstraktların oluşturulması ve takibindeki tüm deneyler Kocaeli Üniversitesi Fen-Edebiyat fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Hedeflenen çalışmaları gerçekleştirmek üzere artan stres koşulları varlığında yetiştirilen bitki materyallerinden ham ekstraktlar hazırlanmıştır. Kontrol (2,92 g) ve 25, 50, 75, 100, 125 ve 150 mM tuz stresi varlığındaki bitki (sırasıyla; 1,5, 2,08, 1,57, 2,85, 1,54 ve 2,63 g) 20 katı hacimdeki 50 mM sodyum fosfat (pH 7,0) tampon ile homojenize edilmiştir.

15, 30, 60 dakika UV stresine (100-280 nm) maruz bırakılan bitkilerden sırasıyla 2,32 g, 2,12 g ve 1,85 g ağırlığında bitki elde edildi ve bu bitkilerin ağırlığının 20 katı hacminde 50 mM sodyum fosfat (pH 7,0) tampon ile homojenize edildi.

%5, %10, %20 ve %40 (w/v) konsantrasyonlarındaki PEG6000 çözeltisi ile kuraklık stresine maruz bırakılan bitkilerden sırasıyla 2,32 g, 2,22 g, 2,55 g ve 1,27 g'lık bitkiler elde edildi ve bu bitkilerin ağırlığının 20 katı hacminde 50 mM sodyum fosfat (pH 7,0) tampon ile homojenize edildi.

0,1, 0,5, 1, 2,5, 5 ve 10 mM çinko sülfat (ZnSO_4) ile muamele edilmiş bitkilerden sırasıyla 2,30 g, 2,26 g, 2,27 g, 1,79 g ve 1,10 g ağırlığında bitkiler

elde edildi ve bu bitkilerin ağırlığının 20 katı haciminde 50 mM sodyum fosfat (pH 7,0) tampon ile homojenize edildi.

0,1, 0,5, 1, 2,5, 5 ve 10 mM molibdat (Na_2MoO_4) ile muamele edilmiş bitkilerden sırasıyla 1,58 g, 1,85 g, 1,55 g, 1,89 g, 0,79 g ve 0,30 g ağırlığında bitkiler elde edildi ve bu bitkilerin ağırlığının 20 katı haciminde 50 mM sodyum fosfat (pH 7,0) tampon ile homojenize edildi.

Elde edilen tüm homojenizatlar kaba filtre kağıdı ile filtre edilmiş 14000g ve $+4^\circ\text{C}$ 'de 15 dakika santrifüj edilmiştir (Sigma 4-16 K). Süpernatant kısmı bitkinin stres varlığında biyokimyasal parametrelerinin incelenmesi için kullanılmıştır.

2.2.3. Antioksidan enzim aktivitesinin incelenmesi

Çeşitli stres varlığında ve yokluğunda (kontrol olarak) antioksidan enzim aktiviteleri (SOD; süperoksit dismutaz, POD; peroksidaz, CAT; katalaz) spektrofotometrik ve elektrofotometrik olarak incelenmiştir.

SOD aktivitesi; NBT (Nitroblue tetrazolium)'nin 560 nm'de fotokimyasal redüksiyonunun incelenmesi ile belirlenmiştir (Beauchamp ve Fridovich, 1973). Reaksiyon, 75 mM NBT, 18 mM l-methionine, 0,1 mM EDTA (Etilendiamin tetraasetik), 2 μM riboflavin ve enzim içeren toplam 3 mL 50 mM sodyum fosfat tamponunda (pH 7,0) gerçekleştirilmiştir. Riboflavin en son karanlık ortamda ilave edilmiştir ve reaksiyon karışımı 30-W floresan ışığı altında 15 dakika inkübe edilmiştir. 1 ünite SOD aktivitesi %50 redüksiyon inhibisyonunu sağlayan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

POD aktivitesi; pyrogallol oksidasyon yöntemi ile incelenmiştir. Reaksiyon; 10 mM pyrogallol, 100 μL seyreltilmiş enzim ve 5 mM H_2O_2 içeren toplam 2 mL 50 mM sodyum fosfat tamponu içinde gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon karışımı 25°C 'de 5 dakika inkübe edilmiş ve enzimatik reaksiyon 1 mL 2,5 N H_2SO_4 ile sonlandırılmış 425 nm'de artan absorbanslar kaydedilmiştir. Enzim aktivitesi; 425 nm'de fosfat tampon içinde pyrogallol için ϵ (extinction coefficient) 2640 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ alınarak eşitlik 1'de gösterildiği gibi hesaplanmıştır. Enzim aktivitesi; 5

dakikada 1 mg purpurogallin oluşması için gerekli olan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır (Valetti ve Picó, 2013.). Enzim aktivitesi Denklem (2.1)'deki gibi hesaplanmıştır.

$$\text{POD aktivitesi} = \frac{\left(\frac{\text{OD}_{425}}{\epsilon}\right) \times \text{Reaksiyon hacmi (mL)}}{\text{İnkübasyon süresi(Dakika)} \times \text{Enzim hacmi (mL)}} \quad (2.1)$$

CAT aktivitesi; 240 nm'deki absorbans azalması takip edilerek ölçülmüştür. Reaksiyon 50 mM pH 7,0 sodyum fosfat tamponunda 10 mM H₂O₂ ve uygun oranda seyreltilmiş enzimin 37°C'de 2 dakika inkübe edilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon 1M HCl ile sonlandırılmıştır. Bir unite enzim aktivitesi 1 µmol H₂O₂ parçalanması için gerekli olan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır (H₂O₂ için ε değeri 0,039 cm²µmol⁻¹) (Aebi ve diğ., 1974). Enzim aktivitesi Denklem (2.2)'deki gibi hesaplanmıştır.

$$\text{CAT aktivitesi} = \frac{\left(\frac{\text{OD}_{425}}{\epsilon}\right) \times \text{Reaksiyon hacmi (mL)}}{\text{İnkübasyon süresi(Dakika)} \times \text{Enzim hacmi (mL)}} \quad (2.2)$$

Tüm örnekler için protein miktar tayini Bradford yöntemine göre yapılmıştır (EK-A).

2.2.4. Lipid peroksidasyonunun belirlenmesi

Lipid peroksidasyon seviyesi; malondialdehyde (MDA) içeriğinin belirlenmesine göre gerçekleştirilmiştir (Turan ve Tripathy, 2013).

MDA içeriği thiobarbituric acid (TBA) reaksiyonun göre belirlenmiştir. 0,2 mL ham enzim ekstraktı 0,4 mL TBA reaktifi ile karıştırılmıştır. TBA reaktifi 0,25 M HCl içinde %15 (w/v), TCA (trikloroasetik) asit ve %0,375 (w/v), TBA içermektedir. Karışım 95°C'de 15 dakika karıştırılmış ardından buz banyosunda soğurulmuş ve 13000g'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Örneklerin 532 ve 600 nm'deki absorbansları kaydedilmiştir. MDA içeriği ε değeri 156 mM⁻¹cm⁻¹ alınarak Denklem (2.3)'deki gibi hesaplanmıştır.

$$[(A_{532}-A_{600}) / 156] \times 10^3 \times \text{Seyrelme Faktörü} \quad (2.3)$$

2.2.5. H₂O₂ içeriğinin belirlenmesi

H₂O₂ içeriği; potasyum iyodür (KI) reaksiyonu sonrası spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Reaksiyon karışımı toplam 2,5 mL 50 mM sodyum fosfat tamponunda (pH 7,0) %0,1 (w/v) TCA, 1M KI ve 0,5 mL ham enzim ekstraktı içermektedir. H₂O₂ içeriğini hesaplamak için bilinen H₂O₂ konsantrasyonlarında standart eğri hazırlanmıştır (Doupis ve diğ., 2011).

2.2.6. Elektroforetik analizler

SDS-PAGE analizi Bio-Rad Mini-Protean sistemi kullanılarak; %4 (v/v) yükleme jeli ve %12 (v/v) ayırma jeli hazırlanarak gerçekleştirilmiştir (EK-B) (Laemmli ve diğ., 1970). Örnekler indirgeme ajanı (SDS ve merkaptotanol) içeren yükleme tampon ile 100°C'de 5 dakika kaynatılmışlardır. Protein markör'ü olarak SeeBlue® Plus2 Pre-stained Protein Standard (LC5925) kullanılmıştır. Elektroforez 100 V'da 10 dakika ardından 120 V'da 2-3 saat yürütülerek gerçekleştirilmiştir. Yürütülen jeller gümüş boyama ile boyanmıştır (EK-C) (Blum ve diğ., 1987).

SOD, POD ve CAT enzimlerinin elektrofotomerik analizleri denatüre edici özelliği olmayan %4 (v/v) yükleme ve %12 (v/v) yürütme jeli hazırlanarak, 4°C'de, ilk 10 dakika 100 V ardından 1-3 saat 120 V'da Biorad mini protean II elektroforez sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Jel üzerinde SOD aktivite tayini şu yöntemle yapılmıştır: yürütülen jel 30 saniye aralıklarla 3 defa saf su ile yıkanıp ardından 750 µM NBT, 0,13 mM metiyonin ve 20 mM riboflavin ile iki adet 30 W'lık floresan ışık altında bantlar belirginleşene kadar inkübe edilmiştir. SOD bantları koyu mavi-mor arka alanda transparan olarak belirlenmiştir. SOD'un izoformlarını belirlemek için yürütülen jeller ayrı ayrı 8 mM KCN ve 10 mM H₂O₂ ile inkübe edilmiştir (Pan ve diğ., 2006).

Jel üzerinde POD aktivitesi, yürütülen jelin oda sıcaklığında; 50 mM (pH 7,0) fosfat tamponunda hazırlanan 10 mM pyrogallol ve 5 mM H₂O₂ ile inkübe edilmesi sonucu turuncu-kahverengi bantların oluşumu ile takip edilmiştir.

CAT aktivitesi ise, yürütülen jelin; 50 mM (pH 7,0) sodyum fosfat tamponunda hazırlanan 10 mM H₂O₂ ile 5 dakikalık inkübasyonu ardından koyu mavi arka alanda transparan bantlar görünene dek 50 mM (pH 7,0) sodyum fosfat tamponunda hazırlanan 30 mM TEMED (Tetramethylethylenediamine), 2,5 mM NBT (Nitro blue tetrazolium), 5 mM riboflavin içeren çözeltide inkübasyonu sonucu belirlenmiştir (Manchenko ve diğ., 2002).



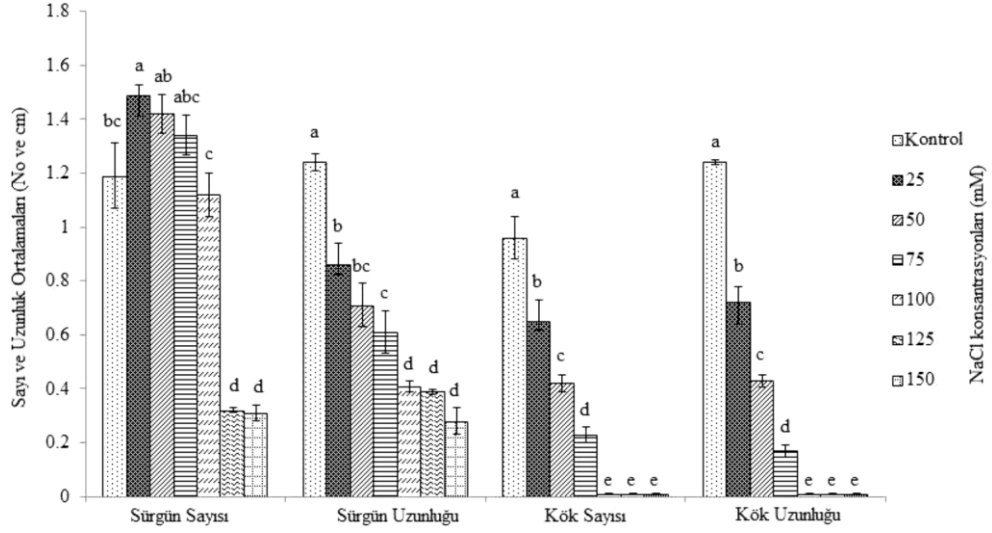
3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. Tuz Stresinin İncelenmesi

3.1.1. Tuzluluk stresinin bitkinin sürgün ve kök parametrelerine etkisi

A. orientalis'in çeşitli tuz konsantrasyonlarına karşı tepkilerini ölçmek için tasarlanan deneyde 1 aylık kültür periyodu sonucunda çeşitli morfometrik veriler toplanmıştır. Buna göre, 25 mM NaCl konsantrasyonuna kadar sürgün sayısı artarken daha yüksek konsantrasyonlarda doza bağlı olarak azalma gözlenmiştir. Sürgün sayısının ayrıca 100 mM üzerindeki konsantrasyonlara karşı daha hassas olduğu gözlemlenmiştir. Diğer yandan, sürgün uzunlukları artan NaCl konsantrasyonlarından negatif yönde etkilenmişlerdir (Şekil 3.1). *A. orientalis* halofit bir bitki olmadığı halde, veriler açıkça göstermektedir ki kültür ortamına eklenen 25 mM konsantrasyondaki NaCl sürgün çoğaltımını artırmaktadır. Bu ortam bitki üzerinde gerçekleştirilebilecek diğer çoğaltım çalışmalarında da alternatif bir seçenek olarak kullanılabilir. Kök gelişimi ise 100 mM NaCl konsantrasyonuna kadar azalarak devam etmiş, bu konsantrasyondan sonraki seviyelerde ise tamamen baskılanmıştır. Kök gelişiminde gözlenen büyük orandaki baskılanma, sodyum ve klorür iyonlarının birikimine ve buna bağlı olarak ksilemden oksin aktarımının durdurulmasına bağlı olabilir (Galvan-Ampudia ve Testerink, 2011).

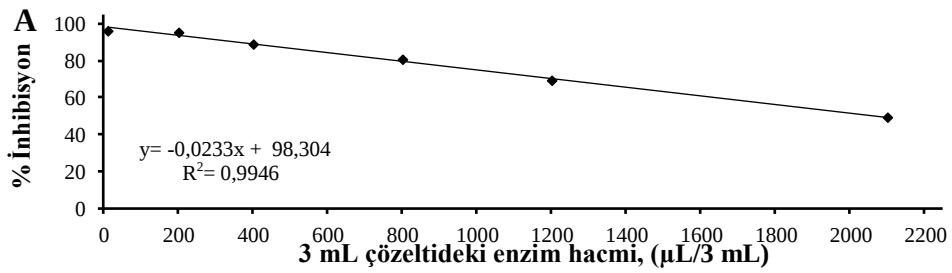
Bitkiler tuz stresini ortadan kaldırmak için çeşitli savunma stratejileri geliştirmiştir. Bunlardan bir tanesi dokularında absisik asit ve sitokin seviyelerinin yeniden düzenlenmesidir. Buna göre, sitokin seviyesi, kısa süreli veya orta şiddette tuz stresine maruz kalındığında artırılırken, uzun süreli kuraklık ve tuz stresine maruz kalındığında azaltılır veya tamamen baskılanır (Ha ve diğ., 2012). Bu yüzden düşük konsantrasyondaki NaCl eklenmiş besi ortamlarından elde edilen sürgün sayısındaki artış, sitokinin seviyelerindeki bu geçici yükselişe bağlanabilir.



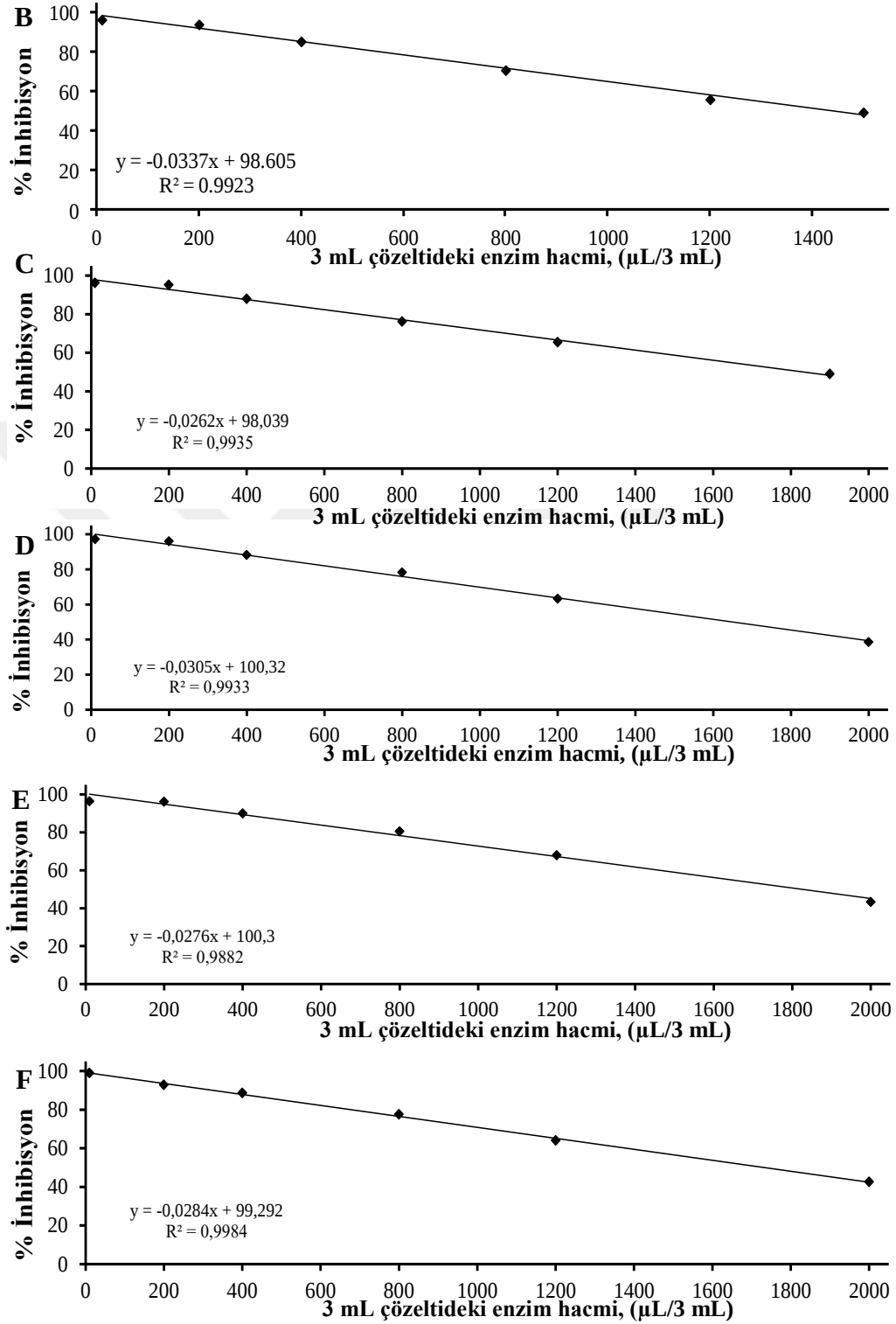
Şekil 3.1. NaCl konsantrasyonunun *A. orientalis*'in sürgün ve kök parametreleri etkisi

3.1.2. Tuz stresinin bitkinin antioksidan enzim aktiviteleri üzerine etkilerinin incelenmesi

Bitkilerde tuz stresi varlığında ROS seviyelerindeki artışa bağlı olarak antioksidan enzim aktivitelerinde değişiklik gözlenir (Wang ve diğ., 2005). SOD, ROS tarafında oluşturulan oksidasyon hasarının tamiri açısından önemli bir antioksidan enzimdir (Gao ve diğ., 2008). Şekil 3.2 artan tuz stresinde bitkinin SOD enzim aktivitesine maruz bırakılan değişiklikleri gözlemlemek için çizilen grafikleri göstermektedir.



Şekil 3.2. Tuz stresinin olmadığı (kontrol) koşullarda (A) ve olduğu koşullarda (B-G) *A. orientalis*'in SOD enzim aktivitesindeki değişikliği belirlemek üzere çizilen grafik



Şekil 3.2. (Devam) Tuz stresinin olmadığı (kontrol) koşullarda (A) ve olduğu koşullarda (B-G) *A. orientalis*'in SOD enzim aktivitesindeki değişikliği belirlemek üzere çizilen grafik

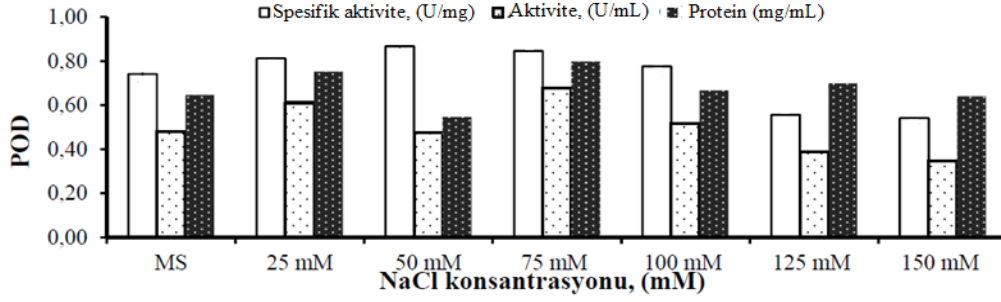
Elde edilen tüm grafik denklemlerinden yararlanılarak her bir stres koşulu için SOD aktivitesi belirlenmiştir. Tüm stres koşulları için protein analizlerinden yararlanılarak oluşturulan aktivite (U/mL), protein (mg/mL) ve spesifik aktiviteyi (U/mg) içeren veriler Tablo 3.1’de verilmiştir.

Tablo 3.1. Artan tuz stresi varlığında *A. orientalis*’in SOD miktarı ve aktivitesinde gözlenen değişim

Örnek	Aktivite (U/mL)	Protein (mg/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg)
Kontrol (MS)	0,48	0,65	0,75
25 mM NaCl	0,69	0,75	0,92
50 mM NaCl	0,55	0,55	1,00
75 mM NaCl	0,60	0,80	0,76
100 mM NaCl	0,55	0,67	0,81
125 mM NaCl	0,57	0,70	0,82
150 mM NaCl	0,45	0,74	0,71

Artan tuz stresi varlığında *A. orientalis*’in SOD enzim aktivitesinde bir artış gözlenmiştir. Buna karşın en fazla spesifik aktivite artışı, 50 mM NaCl konsantrasyonu varlığında tespit edilmiştir (Tablo 3.1). Artan antioksidan enzim aktivitesi bitkinin tuz stresini tolere edebilme kapasitesini göstermektedir. Benzer sonuçlar tuza toleranslı arpa, bezelye, yabani pancar, mısır ve susamda da elde edilmiştir (Azevedo-Neto ve diğ., 2005; Bor ve diğ., 2003; Hernandez ve diğ., 2000; Koca ve diğ., 2006; Seçkin ve diğ., 2010).

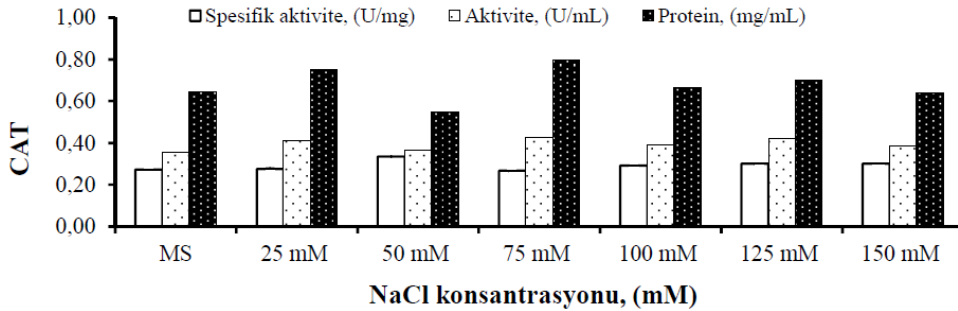
SOD’un yanı sıra POD; birçok yüksek bitkide bulunan ve lignifikasyon, bitkinin tuz stresine ve ağır metal stresine karşı direnç göstermesi gibi pek çok önemli süreçte yer alan önemli bir antioksidan enzimdir (Gao ve diğ., 2008). Tüm stres koşulları için protein analizlerinden yararlanılarak oluşturulan POD aktivitesi (U/mL), miktarı (mg/mL) ve spesifik aktivitesindeki değişimler şekil 3.3’de verilmiştir.



Şekil 3.3. Artan tuz konsantrasyonları varlığında *A. orientalis*'in POD miktarı ve aktivitesinde gözlenen değişim (MS: kontrol)

Buna göre artan tuz konsantrasyonları varlığında POD aktivitesi artmış ancak 125 ve 150 mM NaCl konsantrasyonlarında POD enzim aktivitesi kontrole oranla sırasıyla %24 ve %27 oranlarında azalmıştır. En fazla POD spesifik aktivite 50 mM NaCl konsantrasyonu varlığında gözlenmiştir. POD aktivite bulguları ile birlikte büyüme parametreleri de göz önüne alınırsa yüksek tuz konsantrasyonlarının bitkinin POD enzim aktivitesini inhibe ettiği görülmüştür. Yapılan birçok çalışmada tuz stresine bağlı olarak üretilen H_2O_2 'i elemine etmek için POD enzim aktivitelerinde belirli bir seviyeye kadar artışın meydana geldiği bildirilmektedir (Bor ve diğ., 2003; Meloni ve diğ., 2003; Radic ve diğ., 2006).

SOD ve POD enzimine ek olarak, CAT hidrojen peroksidi (H_2O_2) su ve moleküler oksijene yıkarak canlı sistemi oksidatif yıkımdan koruyan bir başka önemli antioksidan enzimdir. Artan tuz stresi varlığında bitkinin CAT enzim aktivitesinin değişimi Şekil 3.4'de gösterilmiştir.



Şekil 3.4. Artan tuz konsantrasyonları varlığında *A. orientalis*'in CAT miktarı ve aktivitesinde gözlenen değişim (MS: Kontrol)

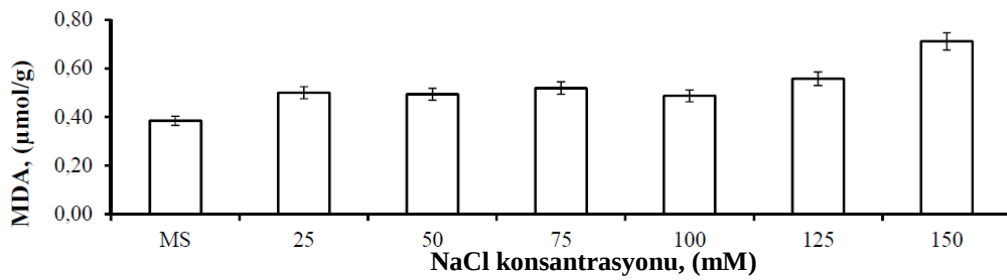
Şekil 3.4'de görüldüğü gibi *A. orientalis* CAT'nin spesifik aktivitesi artan tuz konsantrasyonu varlığında artmış, ve en yüksek değere (%123'lük artış ile) POD aktivitesinde olduğu gibi 25 mM tuz konsantrasyonu varlığında ulaşmıştır. CAT

için spesifik aktivite (ve aktivite) artan tüm tuz konsantrasyonlarında kontrolden daha fazla bulunmuştur. CAT aktivitesinde gözlenen bu artış bitkinin türüne bağlı olarak tuz stresi koşullarına karşı gösterdiği savunma olarak yorumlanabilir. Bulgularımıza paralel olarak tuza toleranslı *Hordeum marinum* L. (Seçkin ve diğ., 2010), *Plantago maritima* L. (Sekmen ve diğ., 2007), *Suaeda salsa* Pall. (Cai-Hong ve diğ., 2005), *Bruguiera gymnorhiza* (L.) Lamk. (Takemura ve diğ., 2000) türlerinde yapılan çalışmalarda da CAT seviyelerinin tuz stresi altında arttığı rapor edilmiştir.

Artan tuz stresi varlığında aktivite değişimi incelenen CAT ve POD antioksidan enzimin de 50 mM tuz konsantrasyonu varlığında, SOD antioksidan enziminde ise 75 mM tuz konsantrasyonun artışı gözlenmiş olup, en fazla CAT aktivitesinin artış yönünde indüklendiği ancak POD aktivitesinin tuz stresine yanıt olarak azaldığı gözlemlenmiştir.

3.1.3. Tuz stresinin bitkinin lipid peroksidasyon seviyesi üzerine etkisi

ROS membran lipidlerinin oksidasyonuna sebep olarak membran geçirgenliğini değiştirmekte ve hücrenin ölümüne sebep olabilmektedir. MDA membran lipid peroksidasyonunun bir ürünüdür ve hücre hasarının seviyesini gösterir. Şekil 3.5 *A. orientalis*'in artan tuz stresi varlığında MDA içeriğinde gözlenen değişim göstermektedir.



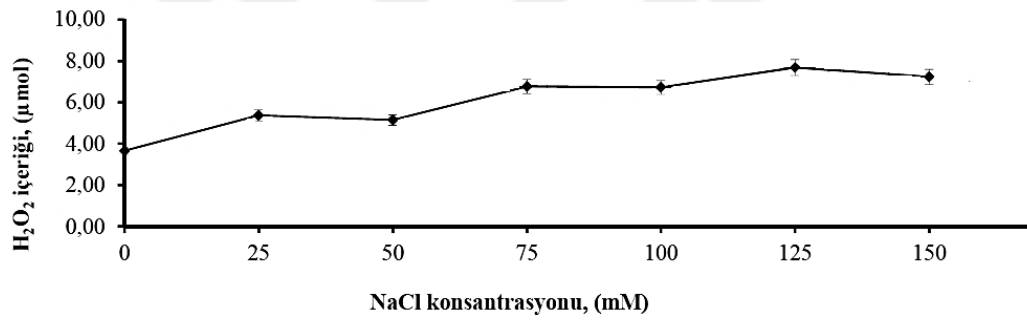
Şekil 3.5. Artan tuz stresi varlığında *A. orientalis*'in MDA içeriğinin değişimi (MS: Kontrol)

Buna göre artan tuz stresi ortamında MDA içeriği en fazla 150 mM NaCl varlığında görülmüştür. Bu durum bitkinin düşük tuz konsantrasyonunu tolere ederken yüksek tuz konsantrasyonu varlığında bitkide hücresel hasarın oluştuğunun göstergesidir. Düşük tuz varlığında gözlenen tolerasyonun bitkinin

artan tuz stresi varlığında artan SOD, POD ve CAT aktivitelerinden dolayı olduğu sanılmaktadır. Yıldıztuğay (2011) tarafından *Centaurea lycaonica* gerçekleştirilen yaptığı çalışmada da benzer sonuçlar gözlenmiştir. MDA seviyesi 150 mM tuz stresi altında kontrol grubuna oranla arttığını tespit etmiştir.

3.1.4. Tuz stresinin bitkinin H₂O₂ seviyesi üzerine etkisi

Stres koşullarında; H₂O₂, ROS sinyal molekülü olarak rol oynar. Bu nedenle, bitkinin savunma sistemi için büyük önem taşır. ROS'un enzimatik yıkımı SOD, POD ve CAT gibi antioksidan enzimler ile gerçekleştirildiğinden H₂O₂ bu antioksidan enzimlerin aktivite artışına da sebep olabilmektedir. Bu çalışmada artan tuz stresi koşullarında bitkinin H₂O₂ seviyesi artmış olup ve değişim Şekil 3.6'da gösterilmiştir.

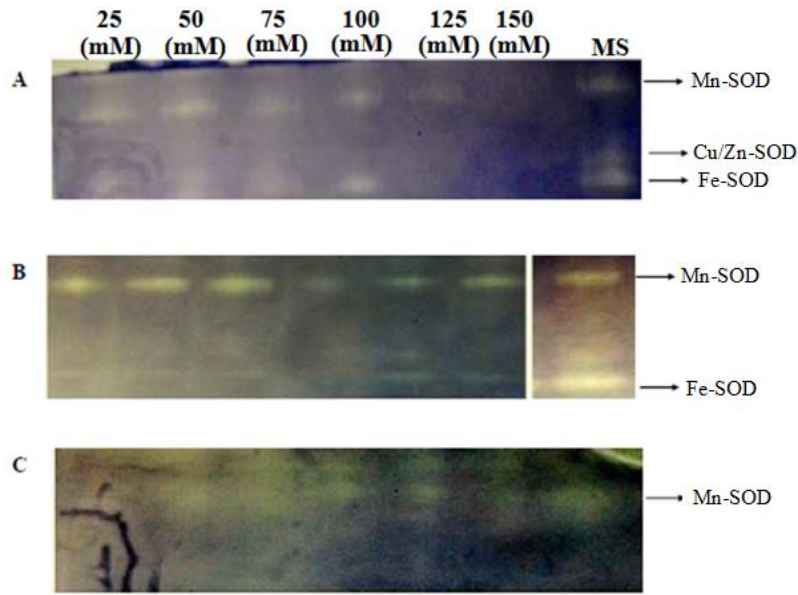


Şekil 3.6. Artan tuz stresi koşullarında *A. orientalis*'in H₂O₂ değişimi

Yapılan denemeler sonucunda tuz stresi altında büyütülen bitkinin H₂O₂ seviyesinde artış belirlenmiş olup, en fazla artışın 125 ve 150 mM NaCl stresinde olduğu görülmüştür (Şekil 3.6). Benzer şekilde, Tuna (2016) domates (*Lycopersicon esculentum* Mill.) bitkisiyle yaptığı çalışmada tuz konsantrasyonun artmasına bağlı olarak H₂O₂ miktarında arttığını, en yüksek H₂O₂ miktarında 150 mM NaCl varlığında olduğunu saptamıştır. Artan tuz stresine bağlı olarak H₂O₂ seviyelerindeki değişimin birbirini takip eden artış ve duraksama şeklinde olduğu gözlenmiştir. Bu durumun stres sonucu artan SOD aktivitesindeki artışın önce H₂O₂'nin artışına sebep olması, ancak akabinde POD ve CAT aktivitelerinin de artışı ile H₂O₂'nin bir kısmının yıkılması sonucu ROS seviyesinin stabil kalmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

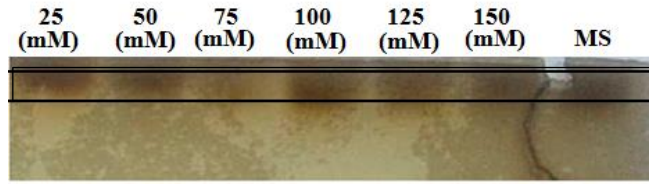
3.1.5. Tuz stresi koşullarında yetiştirilen bitkinin elektroforetik analizleri

Şekil 3.7 artan tuz stresi koşullarında bitkiye ait SOD enziminin zimogramını göstermektedir. Tuz stresine maruz bırakılan ve bırakılmayan bitkide SOD aktivitesi için üç farklı bant belirlenmiştir. Bantların hangi izozime ait olduğunu belirlemek için KCN ve H₂O₂ ile muamele edilmesi gerekir. KCN tuzu, SOD izozimlerinden Cu/Zn-SOD aktivitesini inhibe ederken H₂O₂ ise Cu/Zn-SOD ve Fe-SOD aktivitelerini aynı anda inhibe etmektedir. Bu bilgiler ışığında şekil 3.7’de gözlenen ilk bant her iki inhibitörden etkilenmediği için Mn-SOD olarak adlandırılmıştır. İkinci bant ise her iki inhibitörden etkilenmiştir. Bu nedenle Cu/Zn-SOD olarak tayin edilmiştir. son bant ise KCN’den etkilendiği için Fe-SOD olarak adlandırılmıştır.



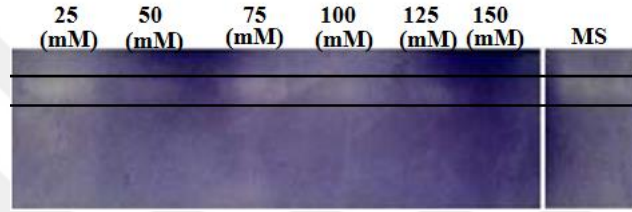
Şekil 3.7. Artan tuz stresi koşullarında *A. orientalis*’in SOD aktivitesi için zimogram resmi. A: inhibitörsüz koşullardaki SOD aktivitesi, B: 8 mM KCN varlığında, C: 10 mM H₂O₂ varlığında. Şeklin üzerindeki rakamlar ise maruz bırakıldığı NaCl konsantrasyonunu ifade etmektedir (MS: Kontrol)

POD enziminin zimogram analizi sonucu *A. orientalis*’te tek bant oluşumu gözlemlenmiştir (Şekil 3.8). Ayrıca artan tuz konsantrasyonuna bağlı olarak bantın yoğunluğunda bir azalma gözlenmemiştir. Bu sonuç POD aktivitesinin spektrofotometrik sonuçları ile de uyumludur.



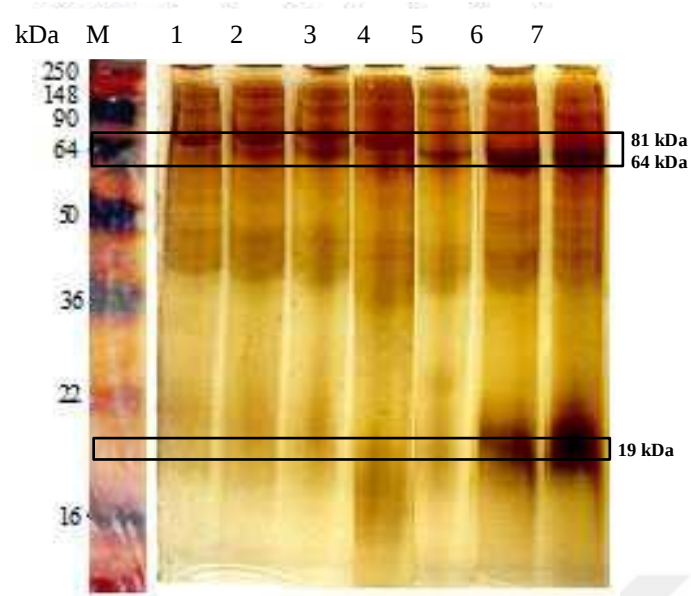
Şekil 3.8. Artan tuz stresi koşullarında *A. orientalis*'in POD aktivitesi için gerçekleştirilen zimogram resmi

CAT enziminin zimogram analizi Şekil 3.9'da gösterilmektedir. POD aktivitesinde olduğu gibi jel üzerinde CAT enzimine ait tek bant gözlenmiştir. Bu sonuç CAT aktivitesinin spektrofotometrik sonucu ile uyumludur.



Şekil 3.9. Artan tuz stresi koşullarında *A. orientalis*'in CAT aktivitesi için gerçekleştirilen zimogram resmi

Spektrofotometrik analizin yanı sıra tuz stresine maruz bırakılmış ve bırakılmamış bitkinin protein miktarları SDS-PAGE analiz olarak da incelenmiş ve bulgular Şekil 3.10'da gösterilmiştir. Buna göre, Şekil 3.10'a göre; diğer tuz konsantrasyonlarında görünür iken; 100, 125 ve 150 mM NaCl konsantrasyonlarında uygulanan tuz stresinde 81 kDa'luk protein gözlenebilirliğini yitirmiştir. Fakat aynı yüksek tuz konsantrasyonlarında 64 kDa'luk yeni bir protein gözlenmiştir. 64 kDa'luk tuz konsantrasyonlarında (25, 50 ve 75 mM NaCl) ve kontrol grubunda görülmemektedir. Ayrıca 125 ve 150 mM NaCl stresi varlığında 19 kDa'luk keskin bir bandın varlığı belirlenmiştir. Bu durum stres koşullarında bazı polipeptidlerin sentezinin baskılandığı bazılarının ise artış yönünde indüklenmesi ile açıklanabilir.

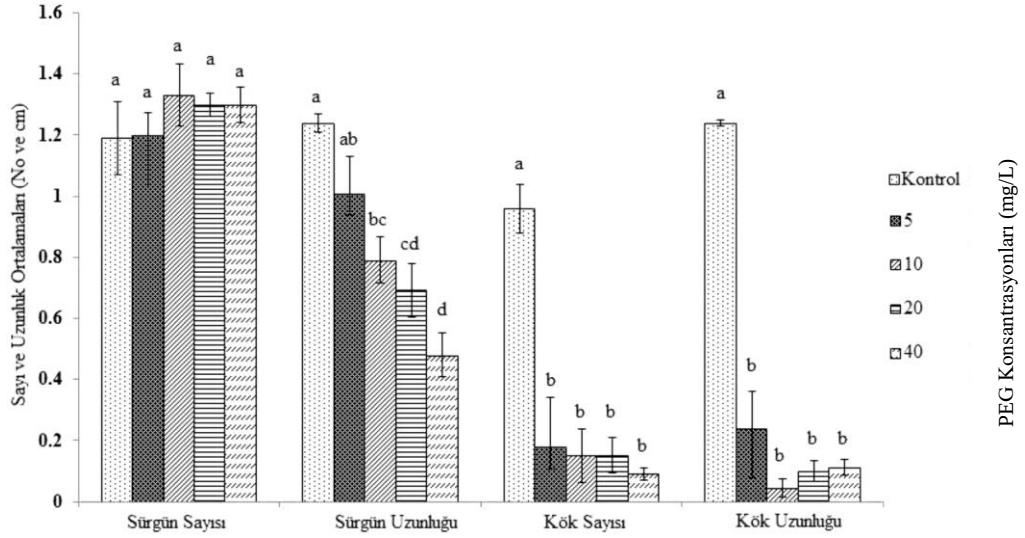


Şekil 3.10. Tuz stresi koşullarında *A. orientalis*'in SDS-PAGE analizi. M: Protein markör, 1, 2, 3, 4, 5, 6 ve 7 numaralı kuyucuklar sırasıyla kontrol, 25, 50, 75, 100, 125 ve 150 mM NaCl konsantrasyonuna maruz bırakılan bitki ekstraktlarını ifade etmektedir. Her kuyucuğa 15 µg protein yüklenmiştir

3.2. Kuraklık Stresinin İncelenmesi

3.2.1. Kuraklık stresinin bitkinin sürgün ve kök parametrelerine etkisi

Bitki üzerinde denenen tüm polietilenglikol 6000 (PEG6000) konsantrasyonları sürgün sayısı üzerinde önemli bir etki yapmazlarken sürgün uzunluğunu 5 mg/L den itibaren negatif yönde etkilenmiştir. Konsantrasyon arttıkça sürgün uzunluğunun azaldığı görülmektedir. Kök sayısında kontrole kıyasla en düşük konsantrasyondaki uygulama dahi yaklaşık %75 oranında azalma belirlenmiştir (Şekil 3.11). Aynı durum kök uzunlukları için de geçerli olmuştur.

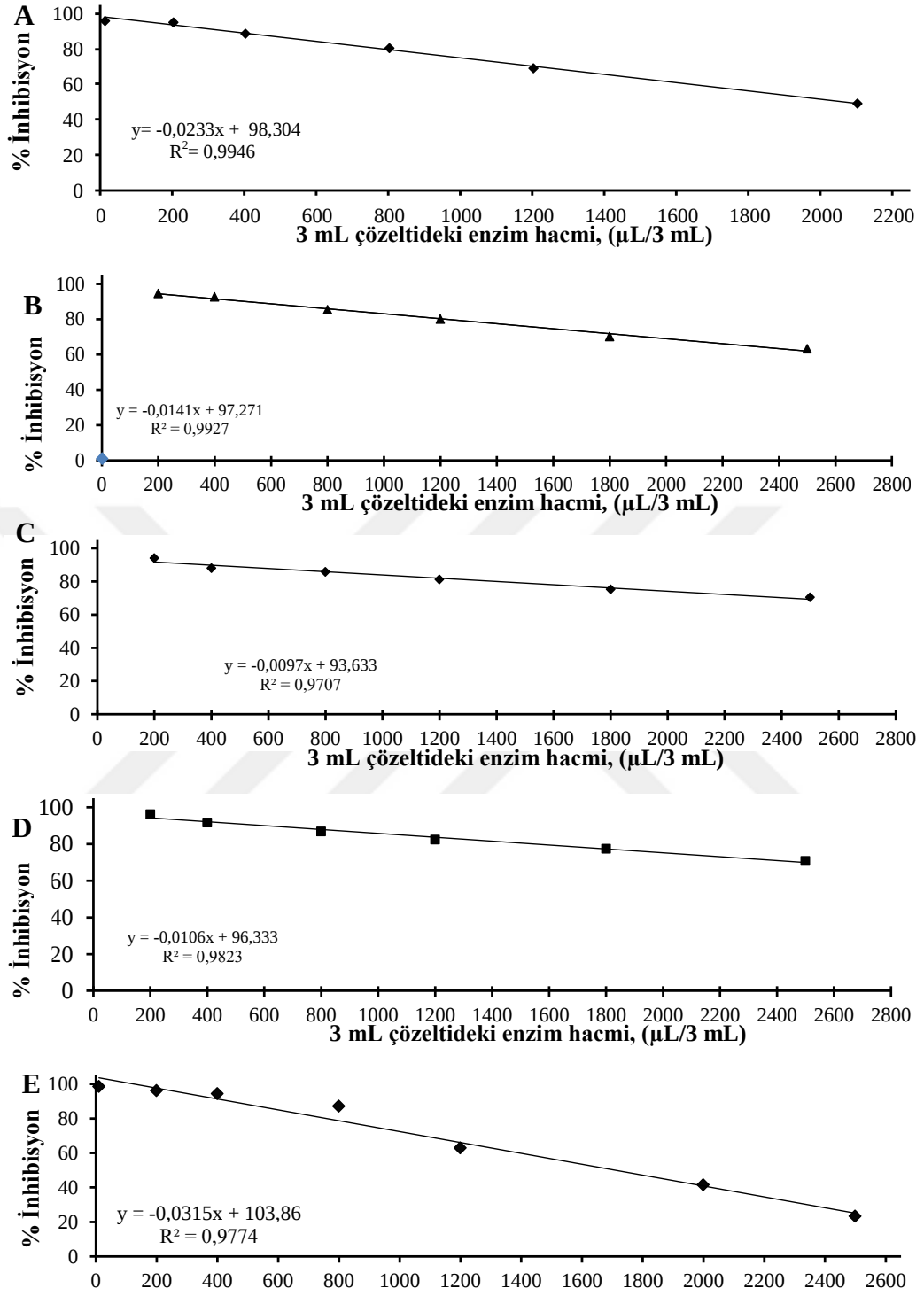


Şekil 3.11. PEG6000 konsantrasyonlarının *A. orientalis*'in sürgün ve kök parametrelerine etkileri

Artan PEG konsantrasyonlarında özellikle kök gelişim parametrelerinin tamamen baskılandığı görülmektedir (Şekil 3.11). Bu stres faktörünün sürgün gelişimine negatif etkileri ise köke olan etkilerine kıyasla daha sınırlı kalmıştır. Bu yüzden bitkinin dış ortama alıştırma çalışmalarında ve doğaya aktarımında etkin bir köklendirme protokolünün geliştirilmesi önemli görülmektedir.

3.2.2. Kuraklık stresinin bitkinin antioksidan aktiviteleri üzerine etkisi

Kuraklık stresinin ROS üretimini arttırmasından dolayı bitkinin fizyolojik ve biyolojik özellikleri üzerinde etkili olduğu bilinmektedir (Cruz de Carvalho, 2008). Şekil 3.12 artan kuraklık stresinde bitkinin SOD enzim aktivitesindeki değişiklikleri gözlemlemek için çizilen grafikleri göstermektedir.

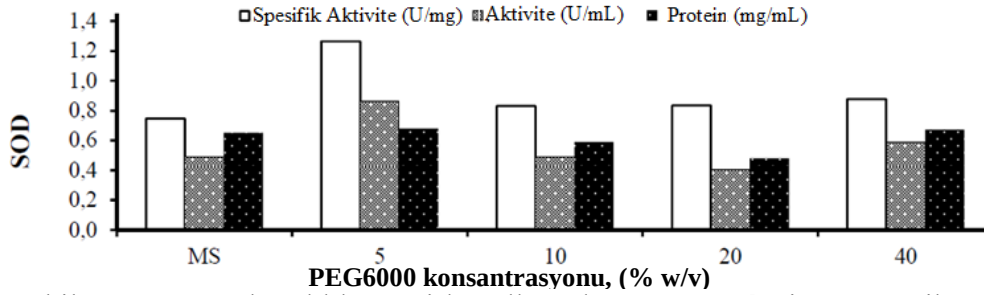


Şekil 3.12. Kuraklık stresinin olmadığı (Kontrol) koşullarda (A) ve olduğu koşullarda (B-E) *A. orientalis*'in SOD enzim aktivitesini belirlemek üzere çizilen grafik

Elde edilen grafik denklemlerinden yararlanılarak her bir stres koşulu için SOD aktivitesi belirlenmiştir. Tüm stres koşulları için protein analizlerinden yararlanılarak oluşturulan aktivite (U/mL), protein (mg/mL) ve spesifik

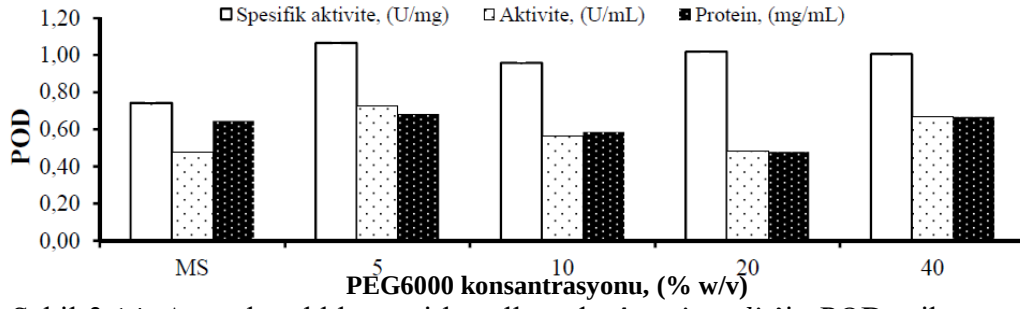
aktiviteyi (U/mg) içeren veriler Şekil 3.13’de gösterilmiştir. Buna göre, Artan kuraklık stresi varlığında *A. orientalis*’in SOD enzim aktivitesi (U/mL) de artmış, en yüksek artış %168 oran ile %5’lik (w/v) PEG6000 konsantrasyonu varlığında belirlenmiştir.

Oksidatif stres sonucu ortaya çıkan aktif oksijen türevlerinden süperoksit radikalının yok edilmesinden sorumlu olan SOD enzim aktivitesi tuz ve kuraklık stres koşullarında süreye bağlı olarak artış göstermiştir. Karanlık (2001) bitkilerin tuz stresi süresince artan düzeyde O_2^- ürettiğini ve bünyelerinde SOD enzim aktivitesinin artışı ile bu radikallerin yok etmeye çalıştıklarını ifade etmiştir. Türkan ve diğ. (2005), fasulye (*Phaseolus vulgaris*) ve tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) türlerinde kuraklık stresi sonucu SOD enzim aktivitesinde artış meydana geldiğini, bu artışın kuraklığa dayanıklı olan tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) türünde ise daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. Yong ve diğ. (2006), kuraklık stresi sonucu SOD enzim aktivitesinde artış meydana geldiğini ancak ilerleyen stres sonucu enzim aktivitesinde azalma meydana gelebileceğini bildirmiştir. Bu çalışmalar, elde edilen bulguları doğrular niteliktedir.



Şekil 3.13. Artan kuraklık stresi koşullarında *A. orientalis*’in SOD miktarı ve aktivitesinde gözlenen değişim (MS: Kontrol)

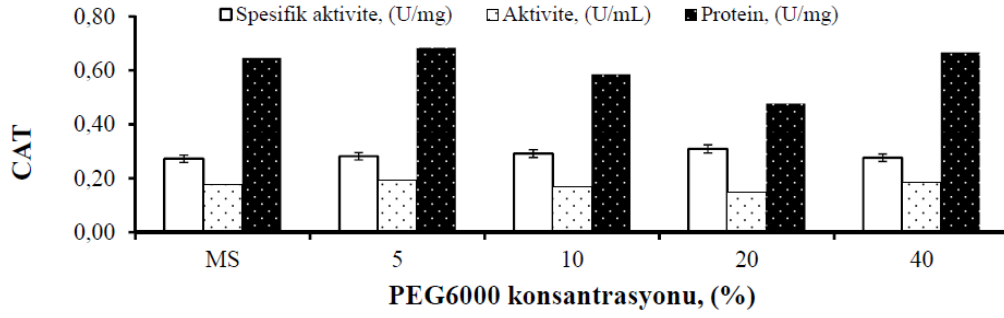
Kuraklık stresinin diğer bir antioksidan enzim olan POD üzerine etkisi de çalışılmıştır. Şekil 3.14’de görüldüğü gibi kuraklık stres koşulları *A. orientalis*’in POD aktivitesini arttırmış ve buna bağlı olarak tüm kuraklık stresi koşullarında POD spesifik aktivitesi de artmıştır. Reddy ve diğ. (2004) dut meyvesinde, Sharma ve Dubey (2004) çeltikte, Liu ve diğ. (2009) hıyarda yaptıkları çalışmalarda kuraklık stresi sonucu POD aktivitesinde artış meydana geldiğini ifade etmişlerdir.



Şekil 3.14. Artan kuraklık stresi koşullarında *A. orientalis*'in POD miktarı ve aktivitesinde gözlenen değişim (MS: Kontrol)

Artan kuraklık stresi koşullarında bitkinin CAT enzim aktivitesinde gözlenen değişim grafiği Şekil 3.15'de gösterilmiştir. Şekil 3.15'de görüldüğü gibi *A. orientalis* CAT aktivitesi artan kuraklık stresi koşullarından etkilenmemekle birlikte değişen stres koşullarına bağlı olarak, değişen protein miktarlarından dolayı kuraklık stresi arttıkça CAT enzimini spesifik aktivitesinde değişimler gözlenmiştir.

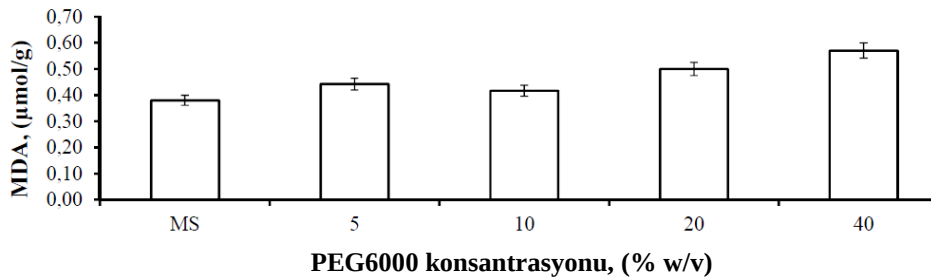
Kuraklık stresi koşullarında büyütülen diğer bitkilerde test edilen CAT aktivite analizlerine yönelik çalışmalarda mevcuttur. Jung ve diğ. (2004), *Arabidopsis* bitkisinde kuraklık stresi sonucu, genç yapraklarda CAT aktivitesinin azalma gösterdiği, yaşlı yapraklarda ise % 33 düzeyinde arttığı saptamıştır. Türkan ve diğ. (2005), kuraklık stresinin bitkide biyokimyasal değişimleri beraberinde getirdiğini ifade ederken, fasulye (*Phaseolus vulgaris*) ve tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) türelerinde kuraklık stresi ile birlikte CAT aktivitesinin artış gösterdiğini bulunmuştur. Ayrıca, Reedy ve diğ. (2004) dut meyvesinde; Yong ve diğ. (2006) geven (*Radix astragalio*) türünde; Sanchez-Rodriguez ve diğ. (2010) domateste yaptıkları çalışmalarda kuraklık stresinin CAT enzim aktivitesinde artışa neden olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacıların ortaya koymuş oldukları sonuçlar bu çalışmayla paralellik göstermektedir.



Şekil 3.15. Artan kuraklık stresi koşullarında *A. orientalis*'in CAT miktarı ve aktivitesinde gözlenen değişim (MS: Kontrol)

3.2.3. Kuraklık stresinin bitkinin lipid peroksidasyon seviyesi üzerine etkisi

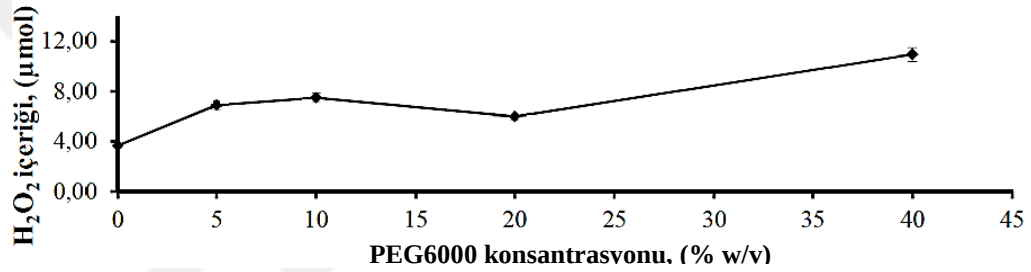
Şekil 3.16 *A. orientalis*'in artan kuraklık stresi koşullarında MDA içeriğini göstermektedir. Buna göre, artan kuraklık stresinin *A. orientalis*'in MDA içeriğinde önemli bir değişikliğe neden olmadığı söylenebilir. MDA içeriğindeki en fazla artış %40 (w/v) PEG6000 varlığında belirlenmiştir. Bu durum bitki hücrelerindeki hasarın en fazla %40'lık (w/v) PEG6000'de olduğunu göstermektedir. Lanlan ve diğ. (2006) kuraklık stresinde MDA miktarında artış meydana geldiğini ifade etmiştir. Türkan ve diğ. (2005); Valentovic ve diğ. (2006) mısırdaki; El-Tayeb (2006) baklada yaptıkları çalışmalarda kuraklık stresinin bitkide MDA miktarında artışa neden olduğunu vurgulamışlardır. Literatürden elde edilen bulgular, çalışma bulgularıyla uyumludur.



Şekil 3.16. Artan kuraklık stresi koşullarında *A. orientalis*'in MDA içeriğinin değişimi (MS: Kontrol)

3.2.4. Kuraklık stresinin bitkinin H₂O₂ seviyesi üzerine etkisi

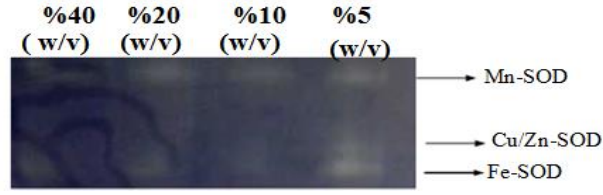
Kuraklık stresinin bitkinin H₂O₂ içeriğine etkisi Şekil 3.17’de gösterilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi, %5’lik (w/v) PEG6000 konsantrasyonundan itibaren bitkinin H₂O₂ içeriğinde artış gözlenmiştir. Ancak daha yüksek kuraklık şartlarında (%40 w/v PEG6000) bitkinin H₂O₂ seviyesinde dramatik artış belirlenmiştir. Benzer durum MDA içeriğinde de gözlenmiş olup bitkinin yüksek kuraklık şartlarında artan tahribatıyla ilgili olduğu düşünülmektedir. Bağcı (2010) nohut (*Cicer arietinum* L.) ile yaptığı çalışmada H₂O₂ içeriğinin kuraklık uygulaması nedeniyle önemli düzeyde arttığı tespit edilmiştir.



Şekil 3.17. Artan kuraklık stresi koşullarında *A. orientalis*’in H₂O₂ seviyelerinde gözlenen değişim grafiği

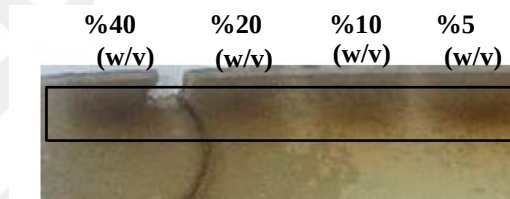
3.2.5. Kuraklık stresi koşullarında yetiştirilen bitkinin elektroforetik analizleri

Stres altında büyütülen bitkilerde SOD, POD ve CAT enzimlerinin zimogram analizleri gerçekleştirildi. Şekil 3.18 artan kuraklık stresi koşullarında bitkinin SOD enziminin zimogram analizini göstermektedir. Kuraklık stresinin artmasına bağlı olarak SOD izozim bantlarının keskinliğinde azalmalar gözlenmiştir. Bu bulgu, SOD aktivitesinin spektrofotometrik sonuçları ile uyumludur.



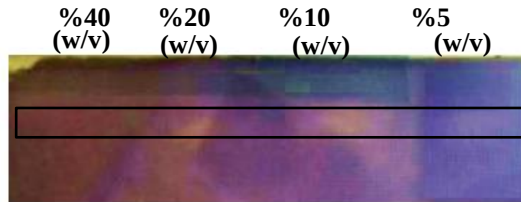
Şekil 3.18. Artan kuraklık stresi koşullarında *A. orientalis*'in SOD aktivitesi için zimogram resmi. Şeklin üzerindeki rakamlar maruz bırakıldığı NaCl konsantrasyonunu ifade etmektedir

A. orientalis'in artan kuraklık stres, koşullarındaki POD enzimi için yapılan zimogram analizi Şekil 3.19'da gösterilmektedir. Strese bağlı olarak POD aktivite şiddetinin değişmediği söylenebilir. Bu sonuç POD aktivitesinin spektrofotometrik sonuçları ile de uyumludur.



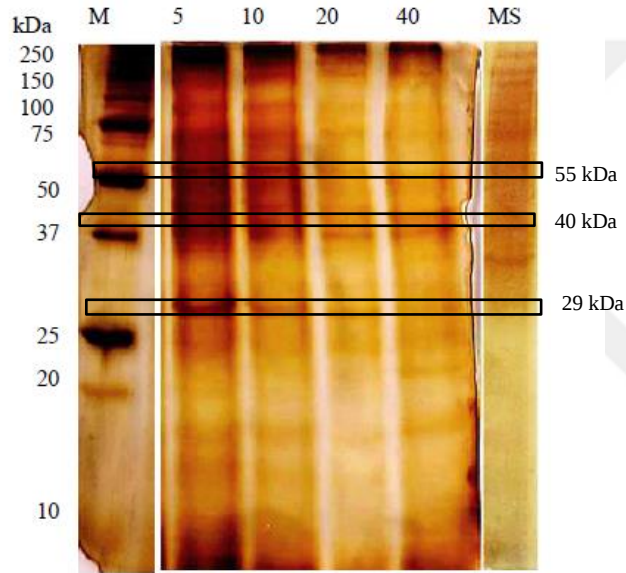
Şekil 3.19. Artan kuraklık stresi koşullarında *A. orientalis*'in POD aktivitesi için gerçekleştirilen zimogram resmi

CAT aktivitesinin zimogram analizi ise Şekil 3.20'de gösterilmektedir. Artan kuraklık stresi koşullarında da jel üzerinde CAT aktivitesi gözlenmiştir. Bu sonuç CAT aktivitesinin spektrofotometrik sonuçları ile de uyumludur.



Şekil 3.20. Artan kuraklık stresi koşullarında *A. orientalis*'in CAT aktivitesi için gerçekleştirilen zimogram resmi

Son olarak kuraklık stresine maruz bırakılmış ve bırakılmamış protein profili SDS-PAGE analizi yapılarak incelenmiş ve Şekil 3.21’de gösterilmiştir. Şekil 3.21’e göre; artan kuraklık stresi koşullarında 29 kDa’luk yeni bandın oluşumu gözlenmiştir ve bu bandın keskinliği %5 (w/v) PEG6000 konsantrasyonunda daha şiddetli olarak gözlenmiştir. Bunun yanı sıra şiddeti her bir kuraklık koşulunda farklı olmasına rağmen uygulanan tüm kuraklık stresleri 55 ve 40 kDa’luk yeni protein bantlarının oluşmasına sebep olmuştur. Bu bulgu, kuraklık stresinin protein sentez mekanizmasını etkileyerek bazı proteinlerin üretilmesini uyardığına işaret etmektedir.

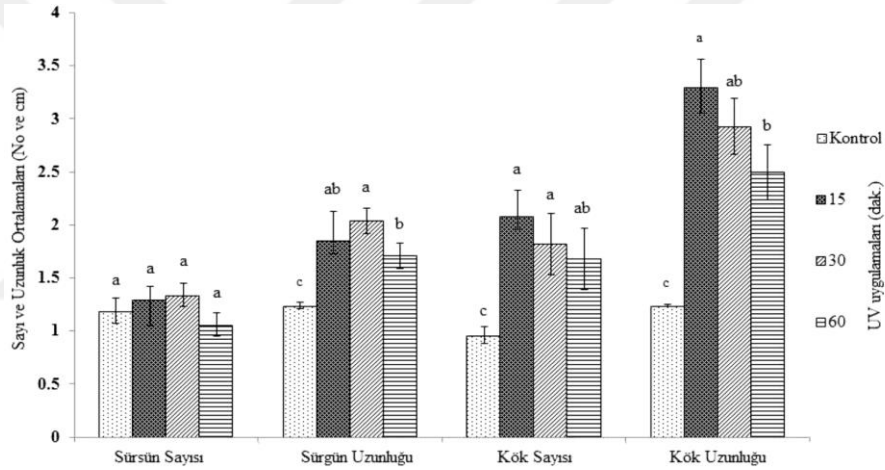


Şekil 3.21. Kuraklık stresi koşullarında *A. orientalis*’in SDS-PAGE analizi. M: Protein markör, 5, 10, 20 ve 40 numaralı kuyucuklar sırasıyla kontrol, %5 (w/v), %10 (w/v), %20 (w/v) ve %40 (w/v) PEG6000 konsantrasyonlarını ve MS kontrol örneği (kuraklık stresine maruz bırakılmayan) ifade etmektedir. Her kuyucuğa 15 µg protein yüklenmiştir

3.3. UV Stresinin İncelenmesi

3.3.1. UV stresinin bitkinin sürgün ve kök parametrelerine etkisi

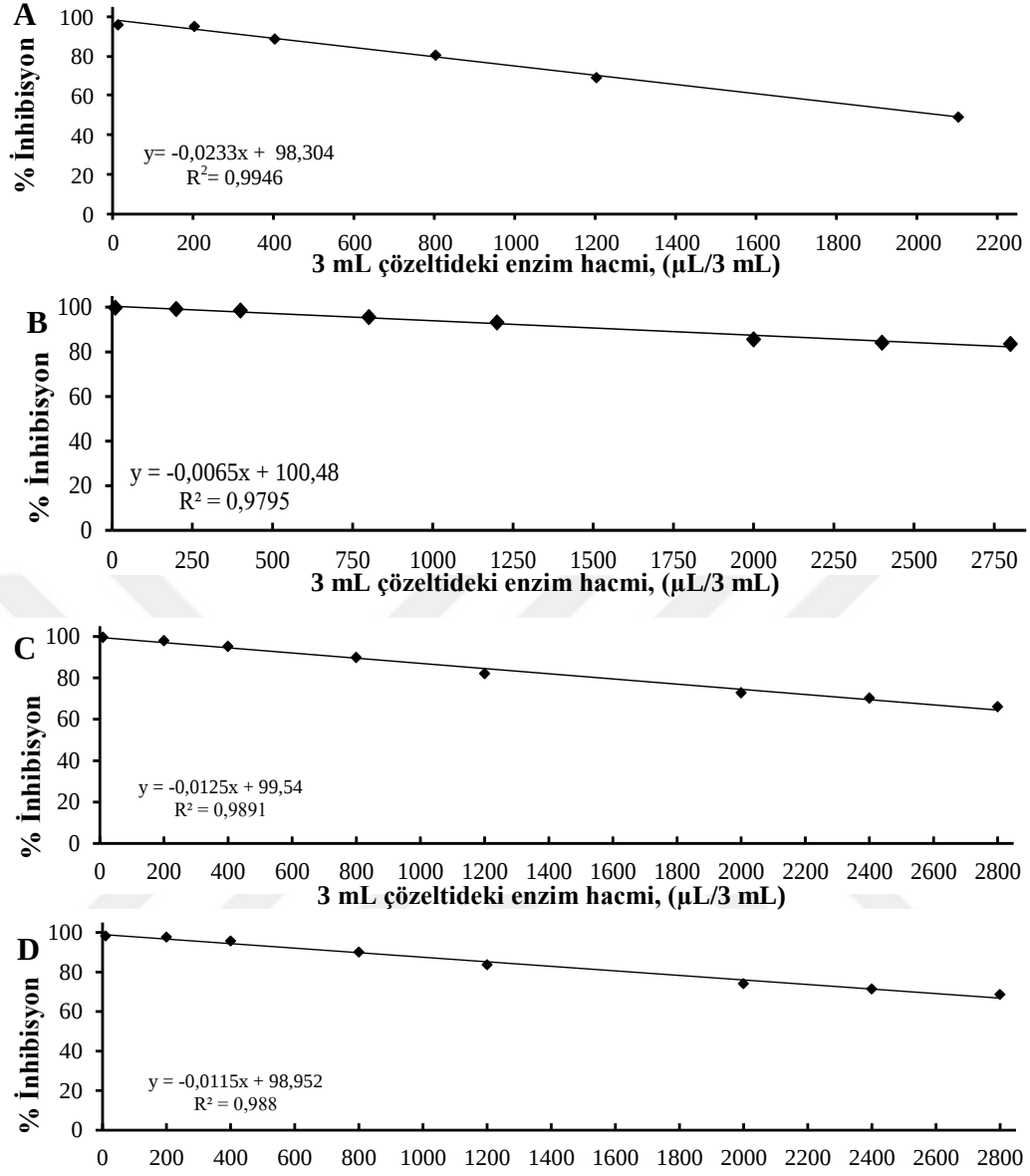
UV sadece epidermal değil aynı zamanda mezofil hücrelerine de olumsuz etki yaptığı bilinmektedir (Bornman ve diğ., 1983). UV radyasyonu, sürgün sayısı üzerinde önemli bir etki yapmadığı ancak kısa süreli UV-B uygulaması sürgün uzunluğunu arttırdığını göstermiştir (Şekil 3.22). Diğer yandan, Ravindran ve diğ. (2010) *Indigofera tinctoria* L. ile yaptığı çalışmada, UV-B radyon uygulanmasının artması sonucunda sürgün uzunluğu, taze ağırlık ve yaprak alanında azalmalar olduğunu saptamıştır. Teramura ve Murali (1986) UV-B stresinin soya fasulyesinin büyümesini azalttığını tespit etmiştir.



Şekil 3.22. UV uygulamalarının *A. orientalis*'in sürgün ve kök parametrelerine etkileri

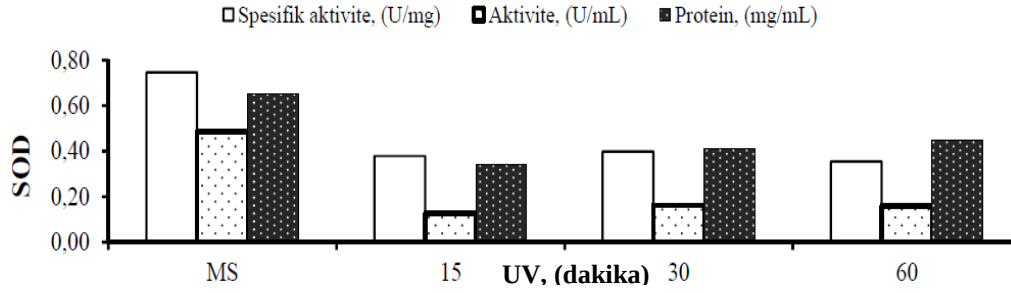
3.3.2. UV stresinin bitkinin antioksidan enzim aktiviteleri üzerine etkileri

Antropojenik yaşam ozon tabakasındaki stratosferik ozonun azalmasına neden olmakta ve bu da ultraviyole ışınlarının yeryüzüne ulaşmasına neden olmaktadır. Bu stres faktörüne karşı bitkinin savunma mekanizmasının anlaşılması için SOD, POD ve CAT antioksidan enzimlerinin aktiviteleri incelenmiştir. SOD enzim aktivitesi değerleri Şekil 3.23'de gösterilmiştir.



Şekil 3.23. UV-B stresinin olmadığı (Kontrol) koşullarda (A) ve olduğu koşullarda (B-C) *A. orientalis*'in SOD enzim aktivitesini belirlemek üzere çizilen grafik

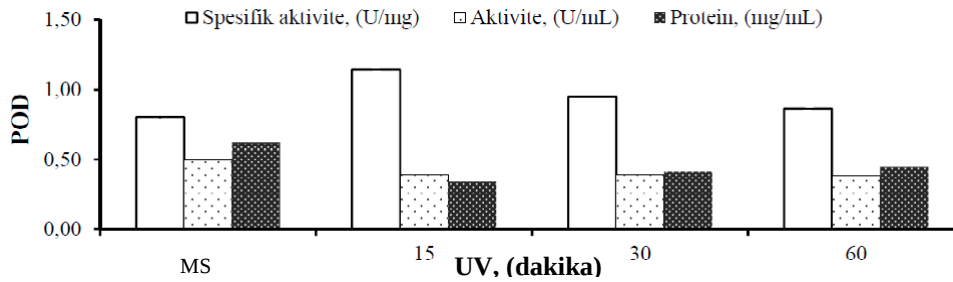
Elde edilen tüm grafik denklemlerinden yararlanılarak her bir stres koşulu için SOD aktivitesi belirlenmiştir. Tüm stres koşulları için protein analizlerinden yararlanılarak oluşturulan ve aktivite (U/mL), protein (mg/mL) ve spesifik aktiviteyi (U/mg) içeren veriler Şekil 3.24'de verilmiştir.



Şekil 3.24. Artan UV-B stresi koşullarında *A. orientalis*'in SOD miktarı ve aktivitesinde gözlenen değişim (MS: Kontrol)

Artan UV stresi, *A. orientalis*'in SOD enzim aktivitesini (U/mL) ve protein değerini önemli ölçüde düşürmüştür, bu durum da enzimin spesifik aktivitesinin azalmasına neden olmuştur. Elde edilen bulgu tesadüf değildir. Çünkü UV'nin aminoasitleri hedef alarak protein ve enzim yapılarında değişikliğe sebep olarak aktiviteleri üzerinde olumsuz etki gösterdikleri bilinmektedir (Hightoner ve diğ., 1994).

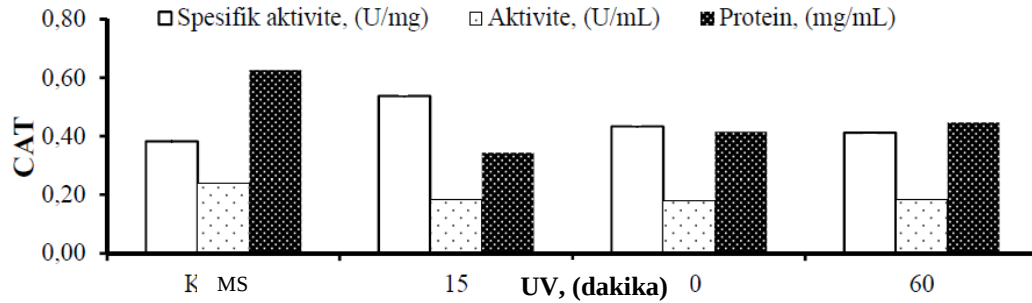
UV stresinin bitkinin POD enzim aktivitesi üzerine etkisini gösteren veriler Şekil 3.25'de verilmiştir. Artan UV stresi koşullarında *A. orientalis*'in POD aktivitesi (U/mL) ve protein miktarı (mg/mL) azalmıştır. Fakat buna bağlı olarak enzimin spesifik aktivitesinde artış gözlenmiş olup en fazla artış 15 dakikalık UV stres koşulunda kaydedilmiştir. Benzer bir şekilde, Yannarelli ve diğ. (2006) yaptığı çalışmada, UV-B radyasyonuna bağlı olarak POD spesifik aktivitesinde kontrole oranla artma olduğu rapor edilmiştir.



Şekil 3.25. Artan UV-B stresi koşullarında *A. orientalis*'in POD miktarı ve aktivitesinde gözlenen değişim (MS: Kontrol)

Artan UV stresi koşullarında bitkinin CAT enzim aktivitesinin değişimi Şekil 3.26'da gösterilmiştir. Şekil 3.26'da görüldüğü gibi *A. orientalis* CAT aktivitesinde ve spektrofotometrik olarak ölçülen protein miktarında azalma gözlenmiş, buna bağlı olarak da enzimin artan UV-B stresi koşullarında spesifik

aktivite değerlerinde azalış tespit edilmiştir. Yannarelli ve diğ. (2006) yaptığı çalışmada UV-B stresinin *Arabidopsis thaliana*'nın katalaz aktivitesinde bu çalışmaya benzer şekilde azalma gözlenmiştir.

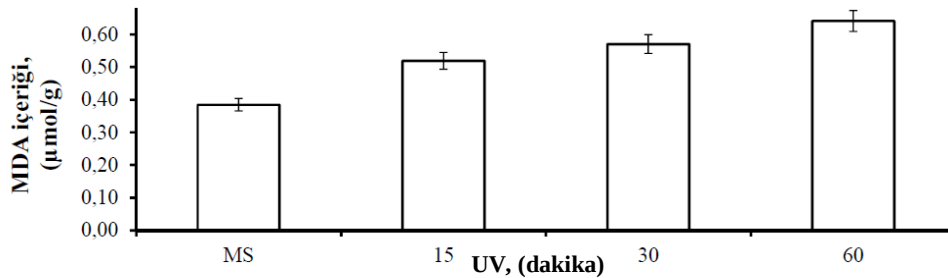


Şekil 3.26. Artan UV stresi koşullarında *A. orientalis*'in CAT miktarı ve aktivitesinde gözlenen değişim (MS: Kontrol)

Spekrofotometrik analizler UV-B stresine maruz kalan bitkilerde süreye bağlı olarak SOD, POD ve CAT enzim aktivitelerinde azalma olduğu ortaya çıkmıştır. Diğer yandan, UV-B stresine 15 dakika maruz bırakılan bitkilerde bitki başına üretilen POD ve CAT miktarları strese karşı verilen tepki niteliğinde artmıştır.

3.3.3. UV stresinin bitkinin lipid peroksidasyon seviyesi üzerine etkisi

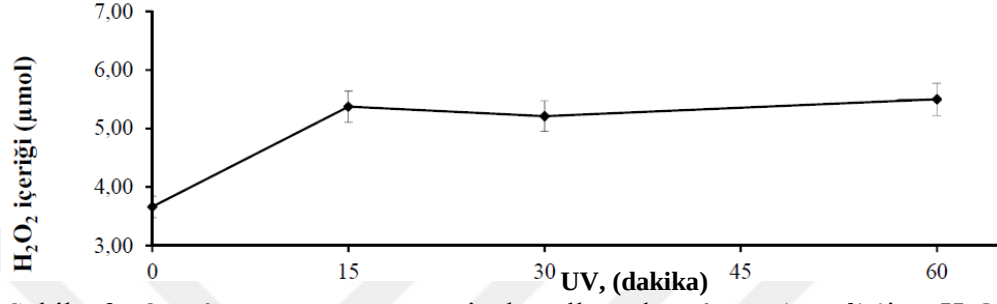
Şekil 3.27 *A. orientalis*'in artan UV stresi koşullarında MDA içeriğini göstermektedir. Artan UV-B stresine bağlı olarak *A. orientalis*'in MDA içeriğinin de arttığı gözlenmiştir. MDA içeriğindeki en fazla artış 60 dakikalık UV stres koşulunda belirlenmiştir. Bu durum bitki hücrelerindeki hasarın en fazla 60 dakika UV uygulamasında olduğunu göstermektedir. Benzer sonuçlar, Queiroz ve diğ. (1998) *Coffea arabica*, Bailly ve diğ. (1996)'nın ise *Helianthus annuus* ile yaptığı çalışmalarla vurgulanmıştır.



Şekil 3.27. Artan UV-B stresi koşullarında *A. orientalis*'in MDA içeriğinin değişimi (MS: Kontrol)

3.3.4. UV stresinin bitkinin H₂O₂ seviyesi üzerine etkisi

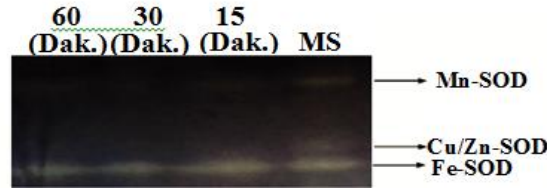
UV stresinin bitkinin H₂O₂ içeriğine etkisi Şekil 3.28’de gösterilmiştir. Buna göre, UV-B ışınına maruz kalma süresi arttıkça hücredeki H₂O₂ seviyesi de arttırmıştır. Artan UV-B stres koşullarında antioksidan enzimlerde gözlenen azalmanın H₂O₂ miktarında artışa sebep olduğu söylenebilir.



Şekil 3.28. Artan UV-B stresi koşullarında *A. orientalis*’in H₂O₂ seviyelerinde gözlenen değişim

3.3.5. UV stresi koşullarında yetiştirilen bitkinin elektroforetik analizleri

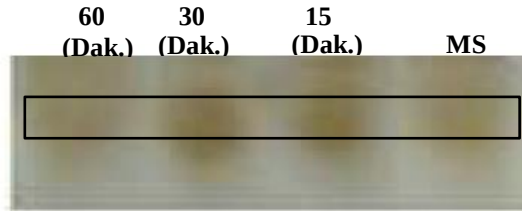
UV-B stresine farklı sürelerde maruz bırakılan bitkilerdeki SOD, POD ve CAT aktivitelerindeki değişim ayrıca elektrofotometrik olarak analiz edilmiştir. Şekil 3.29 artan UV stresi koşullarında bitkinin SOD enziminin zimogram analiz sonucunu göstermektedir.



Şekil 3.29. Artan UV stresi koşullarında *A. orientalis*’in SOD aktivitesi için gerçekleştirilen zimogram resmi. Şeklin üzerindeki rakamlar ise maruz bırakıldığı UV stresinin dakikasını ifade etmektedir

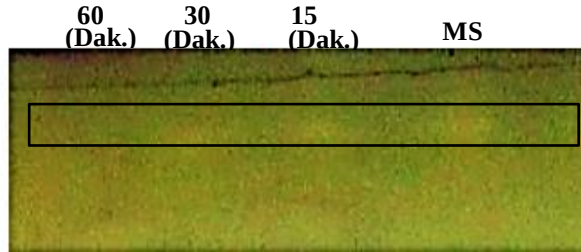
UV stresinin artışına bağlı olarak SOD enzim aktivitesinde kontrol grubuna oranla süre artışına bağlı olarak spektrofotometrik azalma belirlenmiştir. Bu azalma jel üzerinde de doğrulanmıştır. SOD izozimlerinden Mn-SOD ve Cu/Zn-SOD’lara ait bantların keskinliğinde stres artışına bağlı olarak azalma gözlenmiştir (Şekil 3.29).

A. orientalis'in artan UV stres koşullarındaki POD enzimi için zimogram analiz sonucu Şekil 3.30'da gösterilmektedir. Şekil 3.30'da da görüldüğü gibi 15 ve 30 dakikalık UV-B ışınına maruz bırakılan bitkilerde POD aktivitesi jel üzerinde keskin olarak görülmekte, 60 dakika maruz bırakılan bitkilerde daha az yoğunlukta olmasına rağmen gözlemlenmiştir.



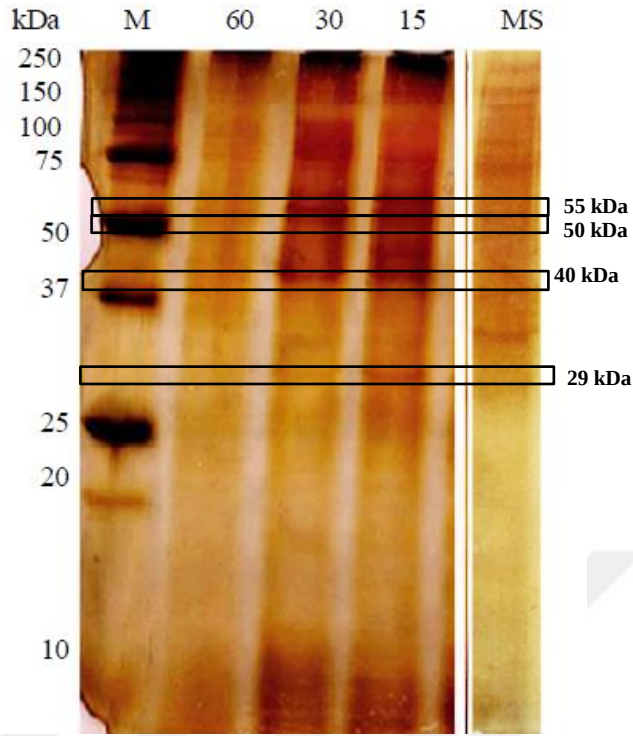
Şekil 3.30. Artan UV-B stresi koşullarında *A. orientalis*'in POD aktivitesi için gerçekleştirilen zimogram resmi (MS: Kontrol)

CAT aktivitesinin zimogram analizi Şekil 3.31'de gösterilmektedir. Artan UV stresi koşullarında da spektrofotometrik analizde olduğu gibi jel üzerinde CAT aktivitesi gözlenmiştir. Bu bulgu CAT aktivitesinin spektrofotometrik sonuçları ile uyumludur.



Şekil 3.31. Artan UV stresi koşullarında *A. orientalis*'in CAT aktivitesi için gerçekleştirilen zimogram resmi (MS: Kontrol)

Elektrofotometrik analizlerde son olarak UV-B stresine maruz bırakılmış ve bırakılmamış bitkinin protein profili irdelenmiştir. Şekil 3.32'de gösterildiği üzere proteinlere ait bantların keskinliği UV-B stresine maruz bırakılan süre arttıkça azalmıştır.



Şekil 3.32. UV stresi koşullarında *A. orientalis*'in SDS-PAGE analizi. M: Protein markör, 60, 30, 15 kuyucuklar sırasıyla 60, 30 ve 15 dakika UV ışığına maruz bırakılan bitki örneklerini, MS kontrol örneği (UV stresine maruz bırakılmayan) ifade etmektedir. Her kuyucuğa 15 µg protein yüklenmiştir

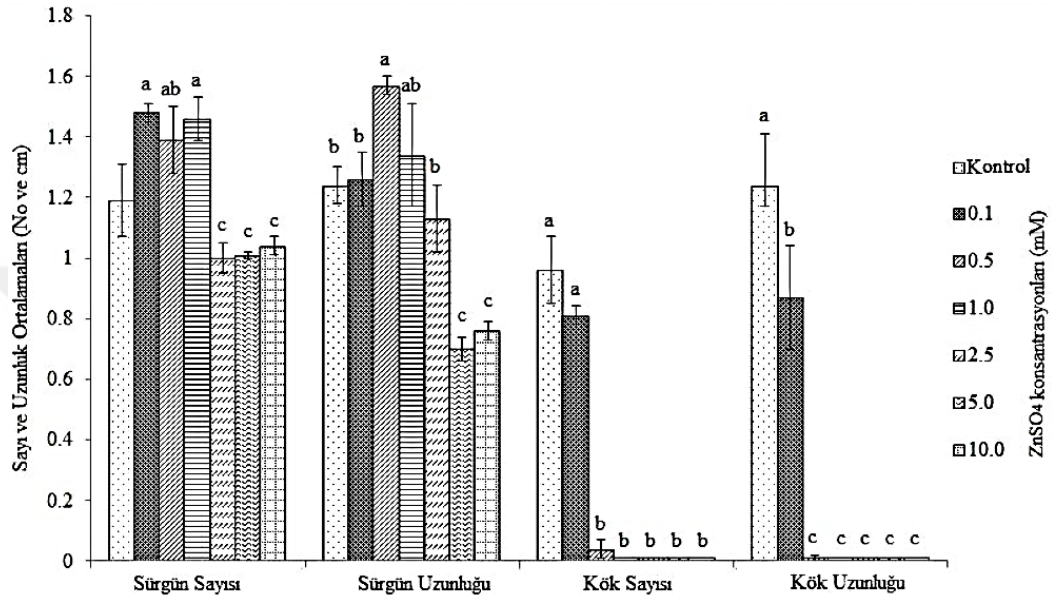
15 ve 30 dakikalık UV-B stresi koşullarında özellikle 29, 40, 50 ve 55 kDa'luk yeni protein bantlarının oluştuğu fakat bu bantların 60 dakikalık UV-B stres koşulunda tamamen kaybolduğu gözlenmiştir. Bu durum stresle baş etmek üzere bazı proteinlerin sentezinin uyarıldığı, ancak artan stres koşullarında proteinlerin yapısında meydana gelen bozulmalar sebebiyle UV-B stresi altında kaybolduklarını düşündürmektedir.

3.4. Zn^{+2} Stresinin İncelenmesi

3.4.1. Zn^{+2} stresinin bitkinin sürgün ve kök parametrelerine etkisi

Deneylerden elde edilen sonuçlara göre kontrol grubuna oranla sürgün sayısındaki artış düşük konsantrasyonlardaki ilk üç uygulama grubunda (0,1, 0,5 ve 1,0 mM) gözlemlenmiş bu konsantrasyonların üzerindeki seviyelerde (2,5, 5 ve 10 mM) ise negatif yönde etkilenme ortaya çıkmıştır. Sürgün uzunluğuna en

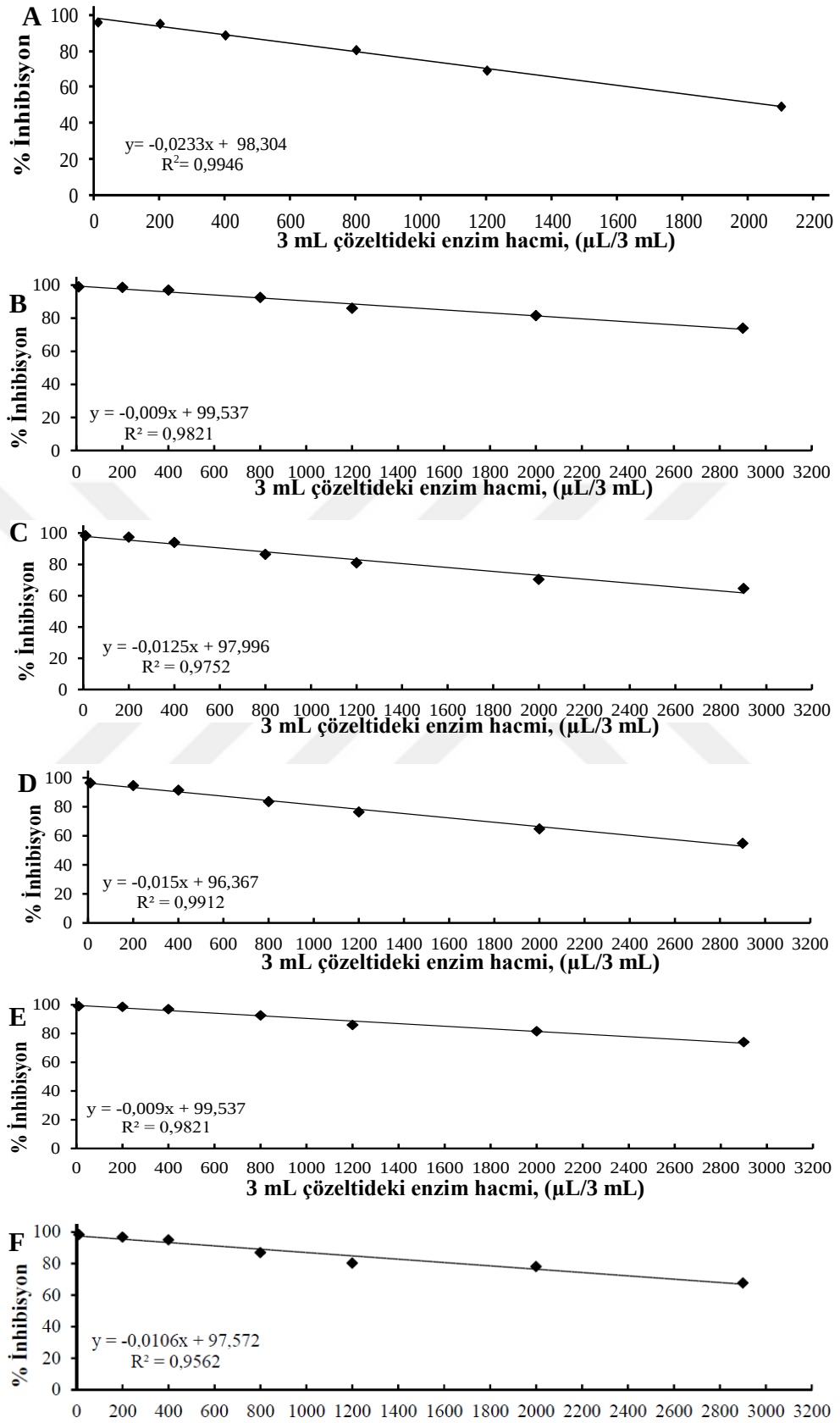
olumlu etkiyi 0,5 mM ZnSO₄ konsantrasyonu ile takviye edilen besi ortamı yapmıştır. 1,0 mM konsantrasyondan yüksek seviyelerde ise sürgün uzunluğu kontrole oranla azalmıştır (Şekil 3.33). Literatürde çinko stresinin, sürgün sayısı ve uzunluğu, kök sayısı ve uzunluğuna olan etkisine benzer bir çalışmanın bulunmaması bu çalışmada elde edilen bulgular literatürde ilk olacaktır.



Şekil 3.33. ZnSO₄ uygulamalarının *A. orientalis*'in sürgün ve kök parametrelerine etkileri

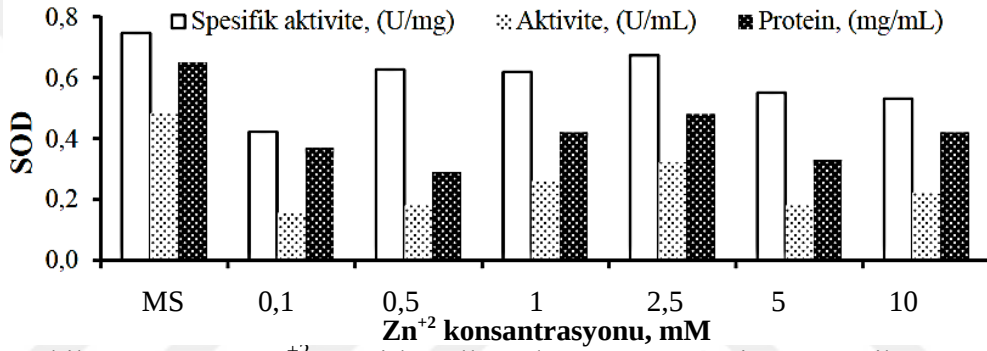
3.4.2. Zn⁺² stresinin bitkinin antioksidan enzim aktiviteleri üzerine etkileri

Zn⁺² 0,1, 0,5, 1, 2,5, 5 ve 10 mM konsantrasyonlarının bitkinin fizyolojik ve biyolojik parametreleri üzerine etkileri spektrofotometrik olarak incelenmiştir. Artan Zn⁺² konsantrasyonlarından oluşan ağır metal stresi varlığında SOD enzim aktivite değerleri Şekil 3.34'de gösterilmiştir.



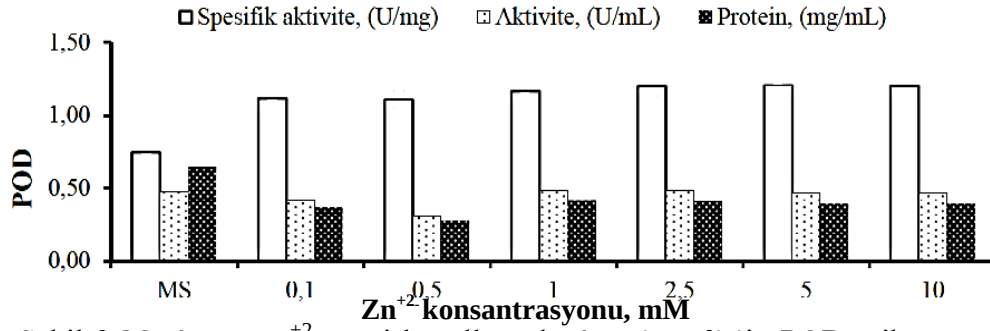
Şekil 3.34. Zn^{+2} stresinin olmadığı (Kontrol) (A) ve olduğu (B-F) koşullarda *A. orientalis*'in SOD enzim aktivitesini belirlemek üzere çizilen grafik

Elde edilen tüm grafik ve grafik denklemlerinden yararlanılarak her bir stres koşulu için SOD aktivitesi belirlenmiştir. Tüm stres koşulları için protein analizlerinden yararlanılarak oluşturulan ve aktivite (U/mL), protein (mg/mL) ve spesifik aktiviteyi (U/mg) içeren veriler Şekil 3.35’de verilmiştir. Artan Zn^{+2} stresi *A. orientalis*’in SOD enzim aktivitesini (U/mL) ve protein değerini önemli ölçüde düşürmüş, artan ağır metal stresi ile bitkinin spesifik aktivitesi ise azalmıştır. Tavallalı (2009) *Pistacia vera* L. ile yaptığı çalışmada benzer sonuçlar elde edilmiştir. Çinkonun yüksek konsantrasyonlarda enzim üzerinde göstermiş olduğu olumsuz etki enzimin doğal kofaktörü yerine geçerek aktiviteyi inhibe etmesi şeklinde açıklanabilir (Van Assche ve diğ., 1990).



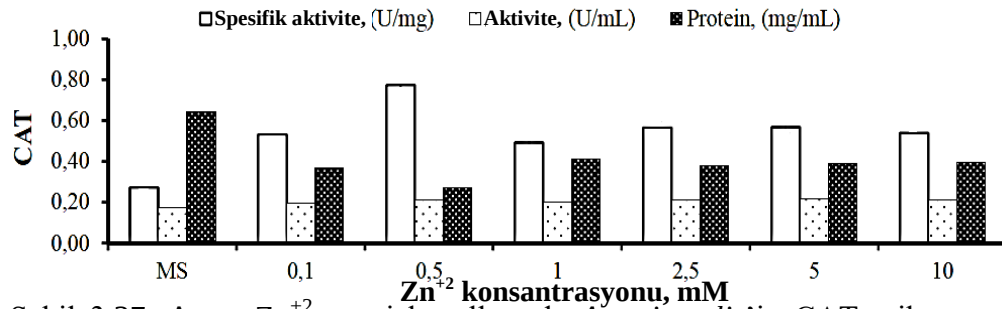
Şekil 3.35. Artan Zn^{+2} stresi koşullarında *A. orientalis*’in SOD miktarı ve aktivitesinde gözlenen değişim

Zn^{+2} stresinin bitkinin POD enzim aktivitesi üzerine etkisini gösteren veriler Şekil 3.36’da verilmiştir. Artan Zn^{+2} stresi koşullarında *A. orientalis*’in POD aktivitesi en fazla 0,5 mM Zn^{+2} konsantrasyonunda düşmüş bunun dışındaki konsantrasyonlarda aktivite fazla değişikliğe uğramamış ve neredeyse değişmeden kalmıştır. Ancak çalışılan stres konsantrasyonlarında protein değeri de düştüğünden enzimin spesifik aktivite değeri artmıştır. Biber (*Capsicum annuum* L.) ile yapılan bir çalışmada çinko konsantrasyonunun artmasına bağlı olarak peroksidaz aktivitesinde azalma olduğunu saptanmıştır (Koç ve diğ., 2012). Biberle karşılaştırıldığında *Amsonia*’nın çinkonun toksik etkisiyle baş edebilmesi bakımından daha başarılı olduğu düşünülmektedir.



Şekil 3.36. Artan Zn⁺² stresi koşullarında *A. orientalis*'in POD miktarı ve aktivitesinde gözlenen değişim (MS: Kontrol)

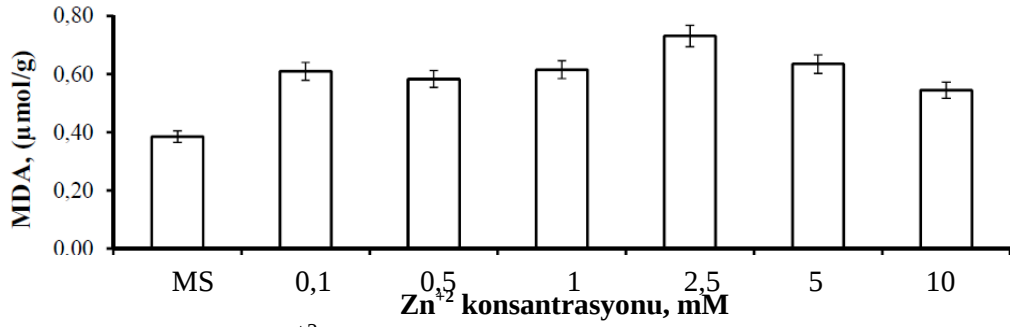
Artan Zn⁺² stresi koşullarında bitkinin CAT enzim aktivitesinin değişimi Şekil 3.37'de gösterilmiştir. Şekil 3.37'de görüldüğü gibi *A. orientalis* CAT aktivitesi neredeyse değişmeden kaldığı halde spektrofotometrik olarak ölçülen protein miktarında kontrole oranla %50 oranında azalma olduğu için enzimin spesifik aktivite değeri %50 oranında artmıştır. Tavallalı (2009)'nın *Pistacia vera* L. ile yaptığı çalışma bu çalışma ile benzer sonuçlar elde etmiştir.



Şekil 3.37. Artan Zn⁺² stresi koşullarında *A. orientalis*'in CAT miktarı ve aktivitesinde gözlenen değişim (MS: Kontrol)

3.4.3. Zn⁺² stresinin bitkinin lipid peroksidasyon seviyesi üzerine etkisi

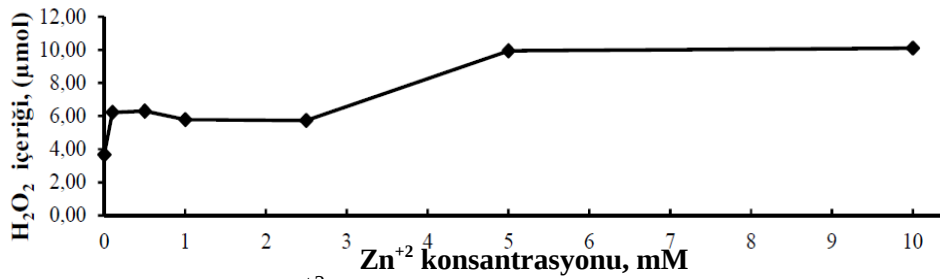
Şekil 3.38 *A. orientalis*'in artan Zn⁺² stresi koşullarında MDA içeriğini göstermektedir. Artan Zn⁺² stresi ile *A. orientalis*'in MDA içeriğinin dramatik olarak arttığı belirlenmiştir. MDA içeriğindeki en fazla artış 2,5 mM Zn⁺² stres koşulunda belirlenmiştir. Bu durum bitki hücrelerindeki hasarın en fazla 2,5 mM Zn⁺² uygulamasında olduğunu göstermekle birlikte tüm konsantrasyonların hücre hasarına etkisi olduğu görülmektedir.



Şekil 3.38. Artan Zn^{+2} stresi koşullarında *A. orientalis*'in MDA içeriğinin değişimi (MS: Kontrol)

3.4.4. Zn^{+2} stresinin bitkinin H_2O_2 seviyesi üzerine etkisi

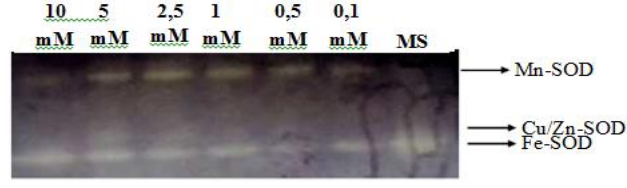
Zn^{+2} stresinin bitkinin H_2O_2 içeriğine etkisi Şekil 3.58'de gösterilmiştir. Artan Zn^{+2} stresi koşullarında bitkinin H_2O_2 içeriği de artmış, en şiddetli artış 5 ile 10 mM Zn^{+2} konsantrasyonlarında belirlenmiştir. Stres koşullarının artmasına bağlı olarak antioksidan enzim üretiminde gözlenen azalmaların, bitkinin H_2O_2 miktarında artışa sebep olduğu düşünülmektedir. Benzer sonuçlar, Koç (2012)'un Biber (*Capsicum annuum* L.) ile yaptığı çalışmada, artan çinko stresi koşullarına bağlı olarak H_2O_2 miktarında gözlenen artış şeklinde rapor edilmiştir.



Şekil 3.39. Artan Zn^{+2} stresi koşullarında *A. orientalis*'de gözlenen H_2O_2 değişimi

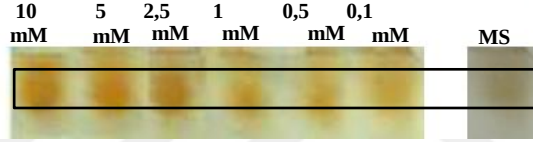
3.4.5. Zn^{+2} stresi koşullarında yetiştirilen bitkinin elektroforetik analizleri

Şekil 3.40 artan Zn^{+2} stresi koşullarında bitkinin SOD enziminin zimogramını göstermektedir. Zn^{+2} stresinin artışı ile SOD enzim aktivitesinin kontrole göre spektrofotometrik olarak azaldığı belirlenmiştir. Bu azalma jel üzerinde de gözlenmiş olup, Şekil 3.40'da en şiddetli azalmanın 10 mM Zn^{+2} stresi koşulunda olduğu belirlenmiştir.



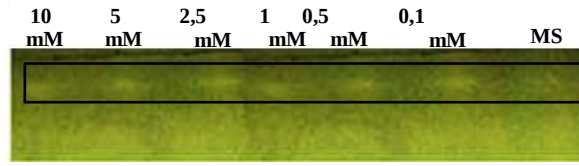
Şekil 3.40. Artan Zn^{+2} stresi koşullarında *A. orientalis*'in SOD aktivitesi için gerçekleştirilen zimogram resmi. Şeklin üzerindeki rakamlar ise maruz bırakıldığı Zn^{+2} stresinin konsantrasyonunu ifade etmektedir

A. orientalis'in artan Zn^{+2} stres koşullarındaki POD enzimi için zimogram analizi Şekil 3.41'de gösterilmektedir. POD analizlerinin spektrofotometrik analizleri sonucu artan Zn^{+2} konsantrasyonları varlığında enzimin aktivitesinin neredeyse değişmeden korunduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar enzimin jel üzerindeki aktivitesi ile de uyumludur.



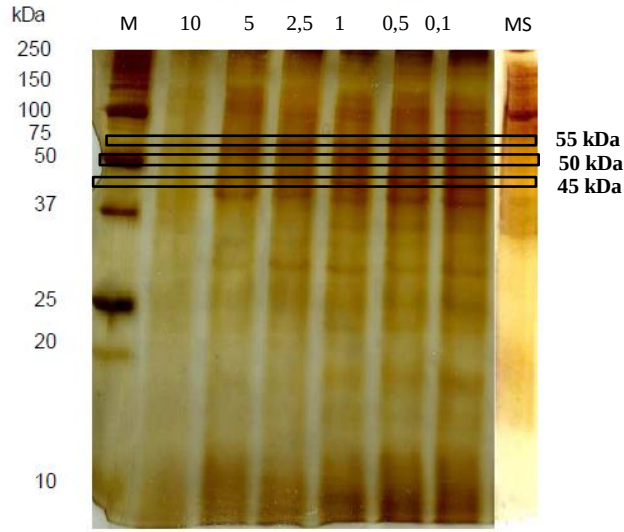
Şekil 3.41. Artan Zn^{+2} stresi koşullarında *A. orientalis*'in POD aktivitesi için gerçekleştirilen zimogram resmi. Şeklin üzerindeki rakamlar ise maruz bırakıldığı Zn^{+2} stresinin konsantrasyonunu ifade etmektedir. (MS: Kontrol)

CAT aktivitesinin zimogram analizi Şekil 3.42'de gösterilmektedir. Artan Zn^{+2} stresi koşullarında da spektrofotometrik analizde olduğu gibi jel üzerinde CAT aktivitesi gözlenmiştir. Bu sonuçlar enzimin jel üzerindeki aktivitesi ile de uyumludur.



Şekil 3.42. Artan Zn^{+2} stresi koşullarında *A. orientalis*'in CAT aktivitesi için gerçekleştirilen zimogram resmi. Şeklin üzerindeki rakamlar ise maruz bırakıldığı Zn^{+2} stresinin konsantrasyonunu ifade etmektedir. (MS: Kontrol)

Zn^{+2} stresine maruz bırakılmış ve bırakılmamış bitkinin protein profili SDS-PAGE analizi ile de ayrıca incelenmiştir. Şekil 3.43, Zn^{+2} stres konsantrasyonu arttıkça bantların keskinliğinin azaldığını göstermektedir. Ayrıca 0,1, 0,5 ve 1 mM Zn^{+2} konsantrasyonlarında gözlenen 45 kDa'luk bant, 2,5, 5, 10 mM Zn^{+2} konsantrasyonlarında gözlenebilirliğini yitirmiştir. Benzer şekilde, 0,1, 0,5, 1, 2,5 mM Zn^{+2} konsantrasyonlarında gözlenen 55 kDa'luk bant 5 ve 10 mM Zn^{+2} konsantrasyonlarında gözlenebilirliğini yitirmiştir. Son olarak, 0,1, 0,5, 1, 2,5 ve 5 mM Zn^{+2} konsantrasyonlarında gözlenen 50 kDa'luk bant ise 10 mM Zn^{+2} varlığında gözlenebilirliğini yitirmiştir. Bu bulgular, çinko stresinin proteinlerin konsantrasyon artışına bağlı olarak yapılarını bozduğuna işaret etmektedir. Daha önceden de belirtildiği üzere divalent katyon olarak çinko atomu yüksek miktarlarda enzimin kofaktörünün yerine geçerek protein aktivitesini olumsuz yönde değiştirebilmektedir (Van Assche ve Clijle, 1990).

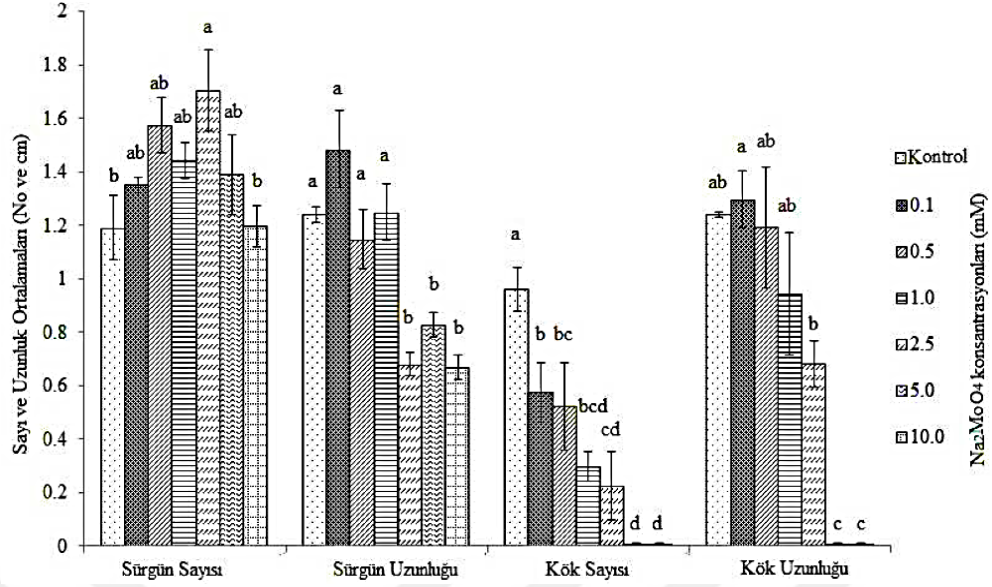


Şekil 3.43. Zn^{+2} stresi koşullarında *A. orientalis*'in SDS-PAGE analizi. M: Protein markör, 10, 5, 2,5, 1, 0,5, 0,1 numaralı kuyucuklar sırasıyla 10, 5, 2,5, 1, 0,5, 0,1 mM Zn^{+2} konsantrasyonlarını, MS kontrol örneği (Zn^{+2} stresine maruz bırakılmayan) ifade etmektedir. Her kuyucuğa 15 μ g protein yüklenmiştir

3.5. Mo^{+6} Stresinin İncelenmesi

3.5.1. Mo^{+6} stresinin bitkinin sürgün ve kök parametrelerine etkisi

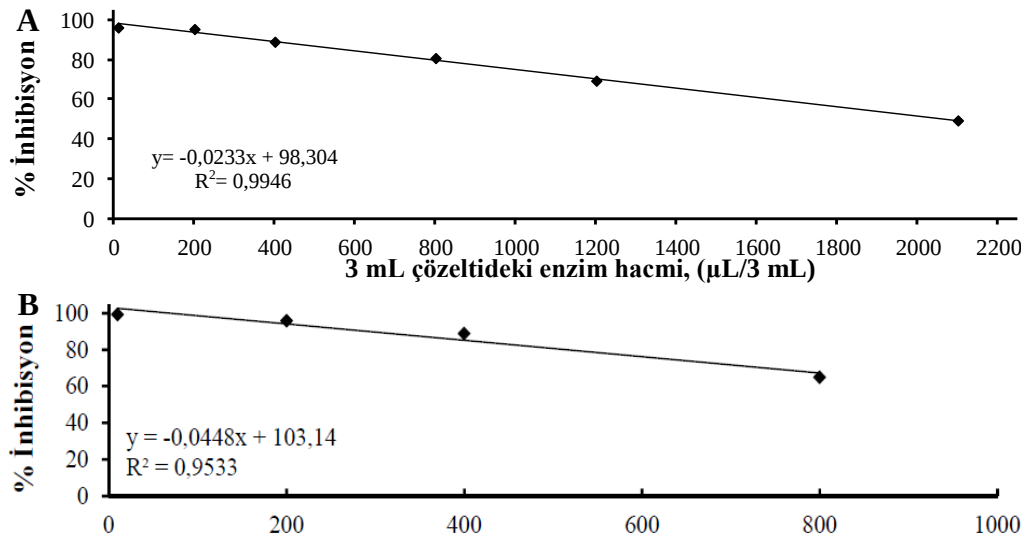
Deneylerden elde edilen sonuçlara göre yüksek konsantrasyonlardaki molibden uygulamaları, özellikle 2,5 mM seviyesinin üzerindeki derişimlerde ortalama sürgün sayısına olumsuz etki yapmıştır. Bu konsantrasyondan düşük seviyedeki değerler ise sürgün sayısı üzerinde olumlu etkiye sahiptir. Besi ortamına eklenen 0,1 mM konsantrasyondaki molibden sürgün uzunluğunu artırmıştır. Bu olumlu etkinin gözlemlendiği konsantrasyon 25 kat arttırıldığında yani 2,5 mM konsantrasyonda ise molibden stresinin etkilerinin ortaya çıktığı görülmektedir. Kök sayısı parametresinde denenen tüm konsantrasyonlar olumsuz etki yapmıştır. Bu nedenle bitkinin kök sisteminin molibden stresine karşı dirençsiz olabileceği düşünülmektedir. En düşük konsantrasyon olan 0,1 mM uygulaması kök uzunluğunu az da olsa artırmış fakat bunun üzerindeki seviyeler kök uzunluklarının ortalamasını önemli derecede düşürmüştür. Özellikle 5 ve 10 mM konsantrasyonlarda kök gelişimi görülmemektedir (şekil 3.44).



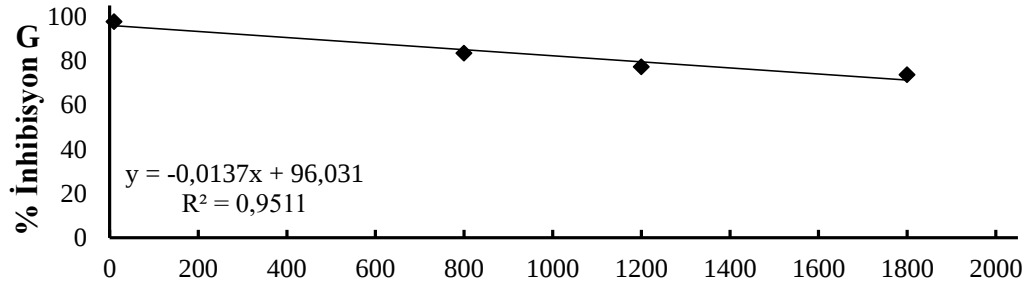
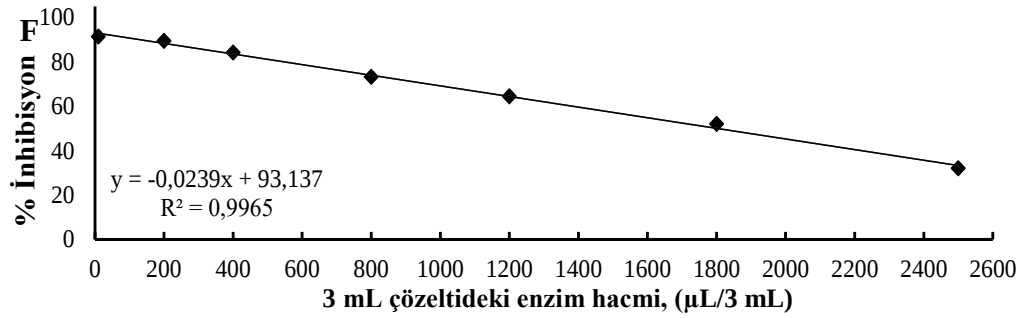
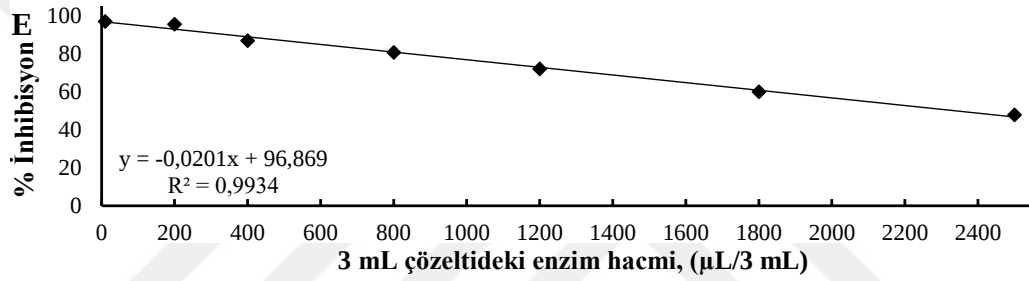
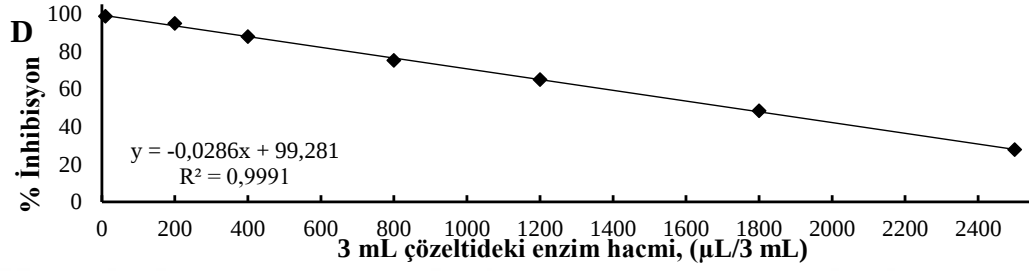
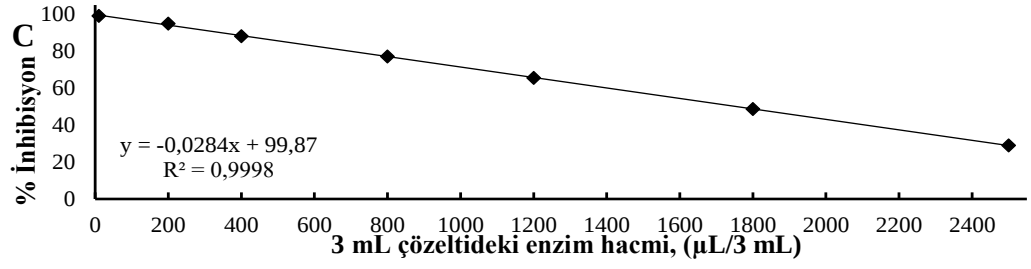
Şekil 3.44. Na_2MoO_4 uygulamalarının *A. orientalis*'in sürgün ve kök parametrelerine etkileri

3.5.2. Mo^{+6} stresinin bitkinin antioksidan enzim aktiviteleri üzerine etkisi

Molibden'in 0,1, 0,5, 1, 2,5, 5 ve 10 mM konsantrasyonlarının bitkinin fizyolojik ve biyolojik parametreleri üzerine etkileri incelenmiştir. Artan Mo^{+6} konsantrasyonlarından oluşan ağır metal stresi varlığında SOD enzim aktivitesi değerleri Şekil 3.45'de gösterilmiştir.



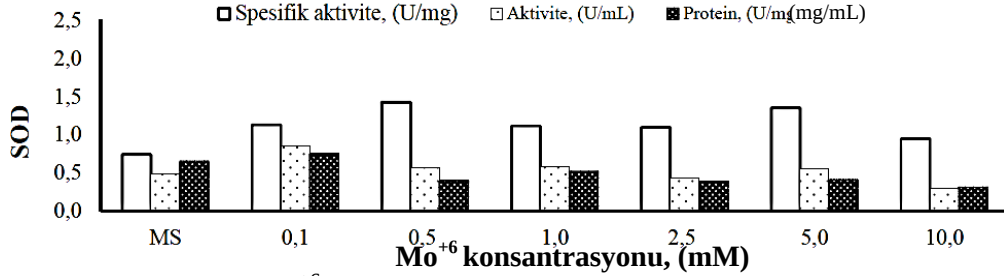
Şekil 3.45. Mo^{+6} stresinin olmadığı (Kontrol) (A) ve olduğu (B-C) koşullarda *A. orientalis*'in SOD enzim aktivitesini belirlemek üzere çizilen grafik



Şekil 3.45. (Devam) Mo^{+6} stresinin olmadığı (Kontrol) (A) ve olduğu (B-C) koşullarda *A. orientalis*'in SOD enzim aktivitesini belirlemek üzere çizilen grafik

Elde edilen tüm grafik denklemlerinden yararlanılarak her bir stres koşulu için SOD aktivitesi belirlenmiştir. Tüm stres koşulları için protein analizlerinden

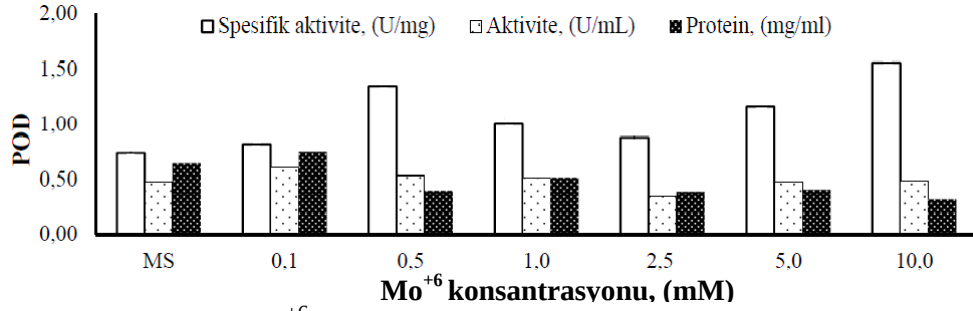
yararlanılarak oluşturulan aktivite (U/mL), protein (mg/mL) ve spesifik aktiviteyi (U/mg) içeren veriler Şekil 3.46’da verilmiştir.



Şekil 3.46. Artan Mo^{+6} stresi koşullarında *A. orientalis*’in SOD miktarı ve aktivitesinde gözlenen değişim

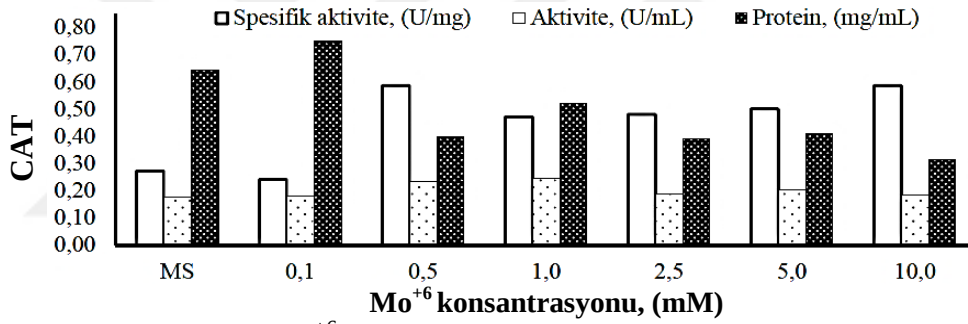
Artan Mo^{+6} stresi 5 mM konsantrasyona kadar *A. orientalis*’in SOD enzim aktivitesini değiştirmese de çalışılan ağır metal konsantrasyonlarında bitkinin spektrofotometrik protein miktarında kontrole göre önemli ölçüde (%44-%66) azalmalar gözlenmiştir. Bu azalmalar enzimin çalışılan Mo^{+6} konsantrasyonlarında enzimin spesifik aktivitesinde artışlara neden olmuştur. SOD enzimindeki en önemli düşüş %66 olarak 10 mM Mo^{+6} varlığında gözlenmiştir. Benzer şekilde, *Triticum aestivum* ile yapılan çalışmada, Mo^{+6} stresinin SOD aktivitesinde artışa sebep olduğu gözlemlenmiştir.

Artan Mo^{+6} stresinin bitkinin POD enzim aktivitesi üzerine etkileri Şekil 3.47’de gösterilmiştir. Artan Mo^{+6} stresi koşullarında *A. orientalis*’in POD aktivitesi en fazla 0,1 mM Mo^{+6} konsantrasyonunda artmış olup (%127), en düşük aktivite ise 2,5 mM Mo^{+6} konsantrasyonunda belirlenmiştir (%70). Enzim aktivitesi yüksek Mo^{+6} konsantrasyonlarından etkilenmemiştir. Fakat, 0,5, 1,0, 2,5, 5 ve 10 mM Mo^{+6} konsantrasyonları varlığında spektrofotometrik olarak ölçülen protein miktarları sırasıyla %39, %20, %39, %20 ve %52 azaldığı için spesifik aktivite değeri en fazla 10 mM Mo^{+6} konsantrasyonunda belirlenmiştir. Benzer sonuç, Wu (2014)’nın *Triticum aestivum* ile yaptığı çalışmada da gözlemlenmiştir.



Şekil 3.47. Artan Mo⁺⁶ stresi koşullarında *A. orientalis*'in POD miktarı ve aktivitesinde gözlenen değişim (MS: Kontrol)

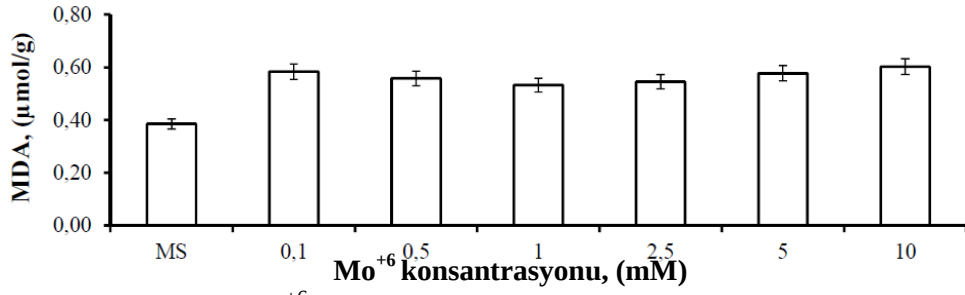
Artan Mo⁺⁶ stresi koşullarında bitkinin CAT enzim aktivitesinin değişimi Şekil 3.48'de gösterilmiştir. Kontrol grubuna oranla 0,5 mM molibden stresi altında gelişen bitkinin CAT aktivitesinde en yüksek artış gözlenmiştir. CAT aktivitesinde gözlenen artış benzer şekilde molibden varlığında büyütülen *Brassica oleracea* 'de de gözlenmiştir (Kumcahai ve diğ., 2013).



Şekil 3.48. Artan Mo⁺⁶ stresi koşullarında *A. orientalis*'in CAT miktarı ve aktivitesinde gözlenen değişim (MS: Kontrol)

3.5.3. Mo⁺⁶ stresinin bitkinin lipid peroksidasyon seviyesi üzerine etkisi

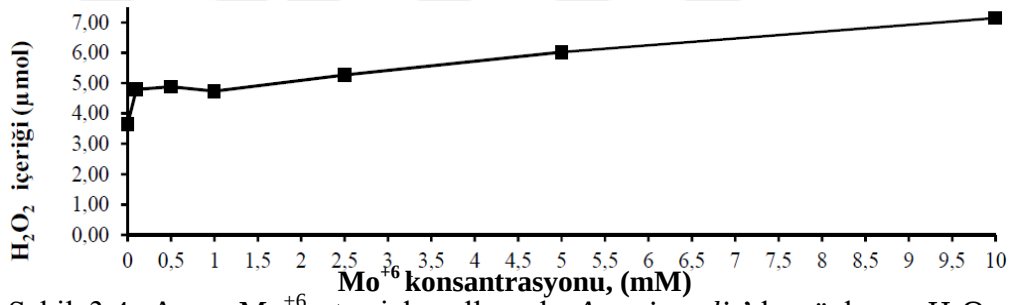
Şekil 3.49 *A. orientalis*'in artan Mo⁺⁶ stresi koşullarında MDA içeriğini göstermektedir. Artan Mo⁺⁶ stresi ile *A. orientalis*'in MDA içeriğinin de arttığı belirlenmiştir. Bu durum bitki hücrelerindeki hasara tüm Mo⁺⁶ konsantrasyonlarının sebep olduğunu göstermektedir.



Şekil 3.49. Artan Mo⁺⁶ stresi koşullarında *A. orientalis*'in MDA içeriğinin değişimi

3.5.4. Mo⁺⁶ stresinin bitkinin H₂O₂ seviyesi üzerine etkisi

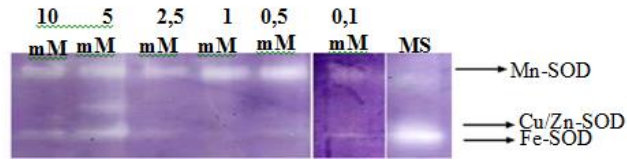
Mo⁺⁶ stresinin bitkinin H₂O₂ içeriğine etkisi Şekil 3.50'de gösterilmiştir. Artan Mo⁺⁶ stresi koşullarında 0,1 mM Mo⁺⁶ ile bitkinin H₂O₂ içeriği artmış ve en şiddetli artış 5 ila 10 mM Mo⁺⁶ konsantrasyonlarında belirlenmiştir.



Şekil 3.4. Artan Mo⁺⁶ stresi koşullarında *A. orientalis*'de gözlenen H₂O₂ değişimi

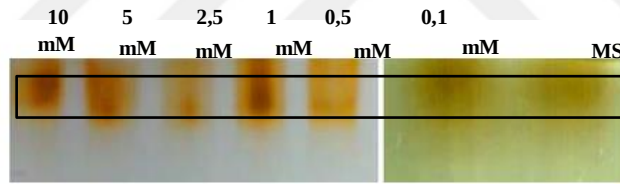
3.5.5. Mo⁺⁶ stresi koşullarında yetiştirilen bitkinin elektroforetik analizleri

Şekil 3.51 artan Mo⁺⁶ stresi koşullarında bitkinin SOD aktivitesinin zimogramını göstermektedir. Mo⁺⁶ stresinin artışı ile Fe-SOD izoenzim aktivitesini ifade eden bandın keskinliğinin azaldığı görülmüştür. Bu sonuç spektrofotometrik sonuçla benzerlik göstermektedir.



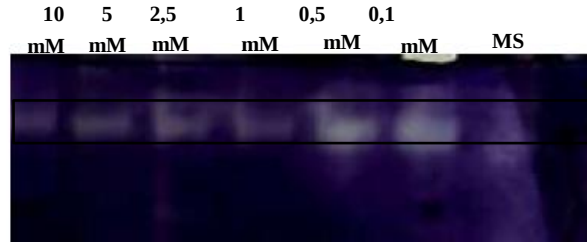
Şekil 3.5. Artan Mo^{+6} stresi koşullarında *A. orientalis*'in SOD aktivitesi için gerçekleştirilen zimogram resmi. Şeklin üzerindeki rakamlar ise maruz bırakıldığı Mo^{+6} stresinin konsantrasyonunu ifade etmektedir

A. orientalis'in artan Mo^{+6} stres koşullarındaki POD enzimi için yapılan zimogram sonucu Şekil 3.52'de gösterilmektedir. POD analizlerinin spektrofotometrik analizleri sonucu artan Mo^{+6} konsantrasyonları varlığında enzimin aktivitesinde azalmaya neden olmadığı, hatta özellikle 0,1 mM Mo^{+6} stres koşulunda enzim aktivitesinin kontrole göre %127'ye çıktığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar enzimin jel üzerindeki aktivitesi ile de uyumludur. Artan Mo^{+6} stresi koşullarında enzimin jel üzerindeki bantlarının keskinliğinde değişiklik gözlenmemiştir.



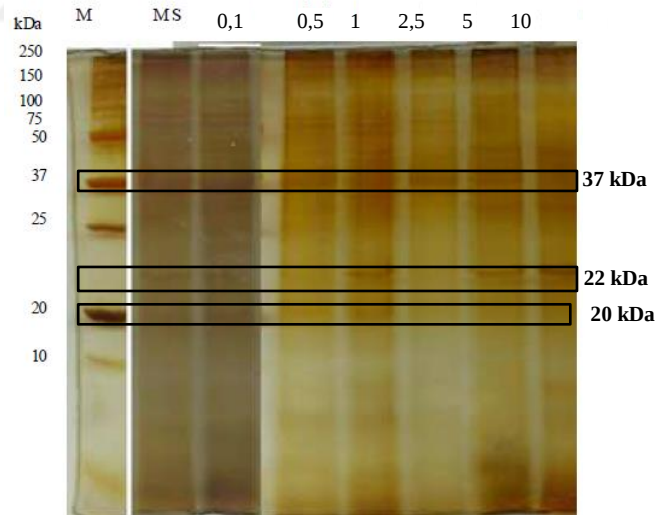
Şekil 3.6. Artan Mo^{+6} stresi koşullarında *A. orientalis*'in POD aktivitesi için gerçekleştirilen zimogram resmi. Şeklin üzerindeki rakamlar ise maruz bırakıldığı Mo^{+6} stresinin konsantrasyonunu ifade etmektedir. (MS: Kontrol)

CAT aktivitesinin zimogram analizi Şekil 3.53'de gösterilmektedir. Artan Mo^{+6} stresi koşullarında CAT aktivitesi jel üzerinde tüm konsantrasyonlarda aynı yoğunlukta gözlenmiştir. Bu sonuçlar enzimin spektrofotometrik analiz sonuçları ile de uyumludur.



Şekil 3.7. Artan Mo^{+6} stresi koşullarında *A. orientalis*'in CAT aktivitesi için gerçekleştirilen zimogram resmi. Şeklin üzerindeki rakamlar ise maruz bırakıldığı Mo^{+6} stresinin konsantrasyonunu ifade etmektedir. (MS: Kontrol)

Mo^{+6} stresine maruz bırakılmış ve bırakılmamış bitkinin protein profili SDS-PAGE yöntemiyle analiz edilmiştir. Son olarak molibden stresi, bazı protein bantların molibdenin yüksek konsantrasyonlarında keskinliklerinin azaldığı gözlenmiştir. Örneğin, MS, 0,1, 0,5, 1 ve 2,5 mM Mo^{+6} stres koşullarında gözlenen 37 kDa'luk protein bandının 5 ve 10 mM Mo^{+6} mM stres koşulunda gözlenmediği belirlenmiştir. Bu sonuç spektrofotometrik sonuç ile benzerlik göstermektedir.



Şekil 3.8. Mo^{+6} stresi koşullarında *A. orientalis*'in SDS-PAGE analizi. M: Protein markör, 10, 5, 2,5, 1, 0,5, 0,1 numaralı kuyucuklar sırasıyla 10, 5, 2,5, 1, 0,5, 0,1 mM Mo^{+6} konsantrasyonlarını, MS kontrol örneği (Mo^{+6} stresine maruz bırakılmayan) ifade etmektedir. Her kuyucuğa 15µg protein yüklenmiştir

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Genel olarak bitkiler yaşamları boyunca tuzluluk, kuraklık, kirlilik, sıcak, soğuk gibi benzer birçok faktörle karşılaşmakta normal büyümeleri ve gelişimleri olumsuz yönde etkilenmektedir. Bu koşullarda bitkilerde meydana gelen değişiklikler stres olarak tanımlanmaktadır. Tıbbi ve ekonomik öneme sahip *Amsonia orientalis* bitkisi bu stres koşullarından önemli derecede etkilenmektedir. Neslinin tükenme tehlikesi bulunan bitkinin stres koşullarıyla baş edebilme yollarından biri olan antioksidan enzimlerindeki değişimler, MDA ve H₂O₂ miktarındaki değişimler araştırılmıştır.

Artan tuzluluk stresi koşullarında yetiştirilen bitkinin, halofit bitki olmamasına rağmen hafif tuzluluk (25 mM NaCl) koşullarında bitki ağırlığında artış gözlenmiş olup, tuzluluk stresinin artmasıyla birlikte gelişimi olumsuz yönde etkilenmiştir. Tuz stresinin artmasıyla protein miktarında azalmalar meydana gelmiştir. SOD aktivitesinde kontrol grubuna oranla en dramatik artış 50 mM NaCl konsantrasyonunda gözlemlenmiş olup, bu konsantrasyondan sonra stresin artmasını takiben SOD aktivitesinin azaldığı kaydedilmiştir. Stresin artmasıyla birlikte POD aktivitesinin de arttığı ancak 125 ve 150 mM NaCl konsantrasyonlarında kontrol grubuna oranla azaldığı tespit edilmiştir. CAT aktivitesi en yüksek değere 50 mM NaCl konsantrasyonunda ulaşmış olup stres konsantrasyonunun artmasıyla azaldığı tespit edilmiştir. MDA ve H₂O₂ seviyeleri tuz stresi koşullarının artışıyla birlikte artış göstermiştir.

Kuraklık stresi dünya çapında başta tarla bitkileri olmak üzere bitki üretimini engelleyen başlıca stres faktörüdür. Çalışmada kuraklık stresinin bitkinin kök ve sürgün gelişimin olumsuz yönde etkilediği, en düşük sonuçların en yüksek konsantrasyonlarda elde edildiği gözlemlendi. SOD aktivitesi tüm kuraklık stresi koşullarında kontrol grubuna oranla artmıştır. CAT ve POD aktivitesi ile MDA ve H₂O₂ miktarları tüm kuraklık stresi koşullarında kontrol grubundan yüksek çıkmıştır.

Bu çalışmada SOD aktivitesinin tüm UV-B streslerinde kontrol grubuna oranla arttığı gözlemlendi. POD aktivitesinde de benzer sonuçlar elde edilmiştir. CAT aktivitesinde ise en yüksek artış 15 dakika UV-B stresinde meydana gelmiştir. MDA ve H₂O₂ miktarlarında tüm UV-B streslerinde artış gözlenmiştir.

Yapılan bu çalışmada düşük seviyelerdeki Zn⁺² stresinin bitkinin sürgün sayısının artmasına neden olurken yüksek seviyelerde negatif etkilediği ortaya çıkmıştır. Zn⁺² stresine maruz kalan bitkinin protein değerleri önemli oranla düşmüş ve SOD aktivitesi azalmıştır. POD ve CAT spesifik aktiviteleri ile MDA ve H₂O₂ miktarı artmıştır.

Mo⁺⁶ stresine bağlı olarak 2,5 mM seviyesinin üzerindeki ortalama sürgün sayısını olumsuz yönde etkilemiştir. Mo⁺⁶ stresinin tüm konsantrasyonlarında kök uzunluğu olumsuz etkilenmiştir. Artan Mo⁺⁶ stresi 5 mM konsantrasyona kadar SOD enzim aktivitesini değiştirmemiş olup, protein miktarında önemli ölçüde azalmalar gözlemlenmiştir. POD ve CAT aktivitelerinin stres koşulunun artmasına bağlı olarak arttığı kaydedilmiştir. Artan Mo⁺⁶ stresi köklerine bağlı olarak MDA ve H₂O₂ miktarları da artmıştır.

Sonuç olarak, *Amsonia orientalis* bitkisinin karşılaşılabileceği temel streslere verdiği tepkiler aydınlatılmış olup, bu bilgiler ışığında bitkinin popülasyon yoğunluğunun arttırılmasına yönelik yeni çalışmalar yürütülebilir.

KAYNAKLAR

Acemi A., Duruksu G., Özen F., Cytostatic Effects of Methanolic Extracts of *Amsonia orientalis* Decne. on MCF-7 and DU145 Cancer Cell Lines, *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 2017, **45**(1), 36-42.

Acemi A., Özen F., Kıran R., In vitro propagation of *Amsonia orientalis* from nodal segments of adult plants, *Propagation of Ornamental Plants*, 2013, **13**(1), 25-32.

Ali G., İbrahim A. A., Srivastava P. S., Iqbal M., Structural Changes in Root and Shoot of *Bacopa monniera* in Response to Salt Stress, *Journal of Plant Biology*, 1999, **42**(3), 222-225.

Allen D. J., Nogues S., Baker N. R., Ozone depletion and increased UV-B radiation: is there a real threat to photosynthesis, *Journal of Experimental Botany*, 1998, **49**, 1775-1788.

An L., Feng H., Tang X., Wang X., Changes of microsomal membrane properties in spring wheat leaves (*Triticum aestivum* L.) exposed to enhance ultraviolet-B radiation, *Journal of Photochemistry and Photobiology Biology*, 2000, **57**, 60-65.

Apse M. P., Blumwald E., Engineering salt tolerance in plants, *Current Opinion in Biotechnology*, 2002, **13**, 146-150.

Asada K., Kiso K., Yoshikawa K., Univalent reduction of molecular oxygen by spinach chloroplasts on illumination, *J Biol Chem*, 1974, **249**(7), 2175-2181.

Atasever B., Dar K. A., Kuruca S. E., Turan N., Seyhanlı V., Meriçli A., *Cynara syriaca*'dan elde edilen flavonoidlerin lösemi hücreleri üzerine etkisi, *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 2003, **32**(3), 143-150.

Azevedo Neto A. D., Prisco J. T., Eneas J., Filho J. E., Lecarda C. F., Silva J. V., Costa P. H., Gomes E., Effects of Salt Stress on Plant Growth, Stomatal Response and Solute Accumulation of Different Maize Genotypes, *Braz. J. Plant Physiol.*, 2004, **16**(1), 31-38.

Bannister J. V., Bannister W. H. and Rotilio G., Aspects of the structure, function and applications of superoxide dismutase, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 1987, **22**, 111-180.

Beauchamp C. O. and Fridovich I., Isozymes of superoxide dismutase from wheat germ., *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure*, 1973, **317**(1), 50-64.

Bieza K., Lois R., An Arabidopsis mutant tolerant to lethal ultraviolet-B levels shows constitutively elevated accumulation of flavonoids and other phenolics, *Plant Physiology*, 2001, **126**(3), 1105-1115.

Blum A., Breeding Crop Varieties for Stress Environments, *Critical Reviews in Plant Sciences*, 1986, **2**, 199-237.

Blum H., Beier H., Gross H. J., Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels, *Electrophoresis*, 1987, **8**(2), 93-99.

Bohnert H. J., Su H., Shen B., *Molecular Responses to Cold, Drought, Heat and Salt Stress in Higher Plants*, 1st ed., Science Publishers, Michigan, 1999.

Bor M., Ozdemir F., Türkan I., The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in leaves of sugar beet *Beta vulgaris* L. and wild beet *Beta maritima* L. *Plant Sci.*, 2003, **164**, 77-84.

Botella M. A., Rosado A., Bressan R. A., Hasegawa P. M., *Plant Abiotic Stress*, 1st ed., Blackwell Publishing, Indiana, 2005.

Bray E. A., Plant Responses to Water Deficit, *Trends Plant Science*, 1997, **2**, 48-54.

Burssens S., Himanen K., Cotte B. V., Beeckman T., Montagu M. V., Inze D. Verbruggen N., Expression of Cell Cycle Regulatory Genes and Morphological Alterations in Response to Salt Stress in *Arabidopsis thaliana*, *Planta*, 2000, **211**, 632-640.

Büyük İ., Soydam A. S., Aras S., Bitkilerin stres koşullarına verdiği moleküler cevaplar, *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 2012, **69**, 97-110.

Caldwell M. M., Björn L. O., Bornman J. F., Flint S. D., Kulandaivelu G., Teramura A. H., Tevini, M., Effects of increased solar ultraviolet radiation on terrestrial ecosystems, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 1998, **46**, 40-52.

Chameides W. L., Kasibhatla P. S., Yienger J., Levy H., Growth of continental-scale metro-agro-plexes, regional ozone pollution, and world food production, *National Library of Medicine*, 1994, **264**, 74-77.

Cheeseman J. M., Mechanism of Salinity Tolerance in Plants, *Plant Physiology*, 1998, **87**, 547-550.

Chelikani P., Fita I., Loewen P. C., Diversity of structures and properties among catalases, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2003, **61**, 192-208.

Cruz de Carvalho M. H., Drought stress and reactive oxygen species: production, scavenging and signaling., *Plant signaling & behavior*, 2008, **3**(3), 156-165.

Çaylak E., Hayvan ve bitkilerde oksidatif stres ile antioksidanlar, *Çankırı Karatekin Üniversitesi Tıp Araştırmaları Dergisi*, 2011, **9**(1), 73-83.

Dabiné Lengyel E., Turiak G., Nyaradiné-Szabady J., Zambo I., Tétényi P., Hermecz I., Determination of Secologanin Content from Shoots of *Rhazya orientalis* (Decne) A. DC. Using the Hplc Method, *Herba Hungarica*, 1986, **25**(2), 141-150.

Darke R., *Amsonia* in cultivation, *The Plantsman*, 2005, **4**(2), 72-75.

Degl'Innocenti E., Hafsi C., Guidi L., Navari-Izzo F., The Effect of Salinity on Photosynthetic Activity in Potassium-deficient Barley Species, *Journal of Plant Physiology*, 2009, **166**, 1968-1981.

Demiral T., Türkan İ., Comparative Lipid Peroxidation, Antioxidant Defense Systems and Proline Content in Roots of Two Rice Cultivars Differing in Salt Tolerance, *Environmental and Experimental Botany*, 2005, **53**, 247-257.

Doupis G., Chartzoulakis K., Beis A., Patakas A., *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 2011, **17**, 36-42.

El-Ghamery A. A., El-Kholy M. A., El- Yousser A., Evaluation of cytological effects of Zn^{+2} in relation to germination and root growth of *Nigella sativa* L. And *Triticum aestivum* L., *Mutation Research*, 2003, **537**, 29-41.

Ensminger L., Busch F., Huner N. P. A., Photostasis and cold acclimation: sensing low temperature through photosynthesis, *Physiologia Plantarum*, 2006, **126**, 28-44.

Farrant J. M., A comparison of mechanisms of desiccation tolerance among three angiosperm resurrection plant species, *Plant Ecology*, 2000, **151**, 29-39.

Ferreira R. R., Fornazier R. F., Vitoria A. P., Lea P. J., Azevedo R. A., Changes in antioxidant enzyme activities in soybean under cadmium stress, *J. Plant Nutr.*, 2002, **25**, 327-342.

Ferroni L., Baldisserotto C., Pantaleoni L., Billi P., Fasulo M. P., Pancaldi S., High Salinity Alters Chloroplast Morpho-physiology in a Fresh Water *Kirchneriella species* (Selenastraceae) from Ethiopian Lake Awasa, *American Journal of Botany*, 2007, **94**(12), 1972-1983.

Flora S. J., Role of free radicals and antioxidants in health and disease, *Cell Molecular Biology*, 2007, **53**, 1-2.

Flowers T. J., Yeo A. R., Breeding for salinity resistance in crop plants where next., *Australian Journal of Plant Physiology*, 1995, **22**, 875-884.

Gamborg O. L., Miller R. A., Ojima K., Nutrient Requirements of Suspension Cultures of Soybean Root Cells, *Experimental Cell Research*, 1968, **50**, 151-158

Gao S., Ouyang C., Wang S., Xu Y., Tang L., Chen F., Effects of salt stress on growth, antioxidant enzyme and phenylalanine ammonia-lyase activities in *Jatropha curcas* L. seedlings., *Plant Soil Environ*, 2008, **54**(9), 374-381.

Gouia H., Gorbel M. H., Meyer C., Effects of cadmium on activity of nitrate reductase and on other enzymes of the nitrate assimilation pathway in bean, *Plant Physiology Biochemistry*, 2000, **38**, 629-638.

Gür N., Topdemir A., Munzuroğlu Ö., Çobanoğlu D., Ağır Metal İyonlarının (Cu^{+2} , Pb^{+2} , Hg^{+2} , Cd^{+2}) *Clivia* sp. Bitkisi Polenlerinin Çimlenmesi ve Tüp Büyümesi Üzerine Etkileri. *Fırat Üniversitesi Fen ve Matematik Bilimleri Dergisi*, 2004, **16**(2), 177-182.

Gürkanlı C. T., Özkoç İ., Aydın E. B., Acemi A., Özen F., Genetic diversity of *Amsonia orientalis*, *Biologia*, 2014, **69**(6), 742-749.

Halliwell B., Gutteridge J. M. C., *Free radicals in biology and medicine*, 2nd ed., Clarendon Press, Oxford, 188-196, 1987.

Harbinson J., Hedley C. L., Changes in P-700 oxidation during the early stages of the induction of photosynthesis, *Plant Physiol*, 1993, **103**, 649-660.

Hernandez J. A., Jimenez A., Mullineaux P. and Sevilla F., Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long term salt stress is associated with induction of antioxidant defences, *Plant Cell and Environment*, 2000, **23**, 853-862.

Hernandez J. A., Olmos E., Corpas F. J., Sevilla F., Del Rio L. A., Salt-induced Oxidative Stress in Chloroplasts of Pea Plants, *Plant Science*, 1995, **105**, 151-167.

Hightower K. R., McCready J. P., Borchman D., Membrane damage in UV-irradiated lenses, *Photochemistry and Photobiology*, 1994, **4**, 485-90.

Hu Y., Schmidhalter U., Drought and Salinity, A Comparison of Their Effects on Mineral Nutrition of Plants, *Journal of Plant Nutrient and Soil Science*, 2005, **168**, 541-549.

Itoh A., Kumashiro T., Tanahashi T., Nagakura N., Nishi T., Flavonoid Glycosides from *Rhazya orientalis*, *J. Nat. Prod.*, 2002, **65**(3), 352-357.

Jansen M. A. K., Gaba V., Greenberg B. M., Higher plants and UV-B radiation: balancing damage, repair and acclimation, *Trends in plant science*, 1998, **3**(4), 131-135.

Jung S., Variation in antioxidant metabolism of young and mature leaves of *Arabidopsis thaliana* subjected to drought, *Plant Sci.*, 2004, **166**, 459-466.

Katsuhara M., Kawasaki T., Salt Stress Induced Nuclear and DNA Degradation in Meristematic Cells of Barley Roots, *Plant Cell Physiology*, 1996, **37**(2), 169-173.

Keiller D. R., Mackerness S. A., Holmes M. G., The action of a range of supplementary ultraviolet (UV) wavelengths on photosynthesis in *Brassica napus* L. in the natural environment: effects on PS II, CO₂ assimilation and level of chloroplast proteins, *Photosynthesis Research*, 2003, **75**, 139-150.

Khatun S., Flowers T. J., Effects of Salinity on Seed Set in Rice, *Plant Cell and Environment*, 1995, **18**, 61-67.

Kim K. Y., Kwon S. Y., Lee H. S., Hur Y., Bang C. W., Choi K. S., Kwak S. S., Differential expression of four sweet potato peroxidase in response to abscisic acid and ethaphon., *Phytochemistry*, 2000, **54**, 19-22.

Koca H., Bor M., Özdemir F., Türkan D., The effect of salt stress on lipid peroxidation, antioxidative enzymes and proline content of sesame cultivars, *Environmental and Experimental Botany*, 2007, **60**, 344-351.

Koyro H. W., Effect of salinity on growth, photosynthesis, water relations and solute composition of the potential cash crop halophyte *Plantago cronopus* (L.), *Environmental and Experimental Botany*, 2006, **56**, 136-146.

Kumchai J., Huang J. Z., Lee C. Y., Chen F. C., Chin S. W., Proline partially overcomes excess molybdenum toxicity in cabbage seedlings grown in vitro, *Genet Mol Res.*, 2013, **12**, 5589–5601

Kurakov A. V., Kupletskaya M. B., Skrynnikova E. V., Somova N. G., Search for Micromycetes Producing Extracellular Catalase and Study of Conditions of Catalase Synthesis, *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2001, **37**, 59-64.

Laemmli U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 1970, **227**, 680-685.

Laposi R., Veres S., Lakatos G., Olah V., Fieldsend A., Meszaros I., Responses of leaf traits of European beech (*Fagussylvatica* L.) saplings to supplemental UV-B radiation and UV-B exclusion, *Agricultural and Forest Meteorology*, 2009, **149**, 745-755.

Levitt J., *Responses of Plants to Environmental Stresses*, 1st ed., Academic Press, New York, 1980.

Lima A. L. S., DaMatta F. M., Pinheiro H. A., Totola M. R., Loureiro M. E., Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions, *Environment Experimental Botany*, 2002, **47**, 239-247.

Mehlar A. H., Studies on reactions of illuminated chloroplasts: I. Mechanism of the reduction of oxygen and other hill reagents, *Arch Biochemistry Biophysic*, 1951, **33**(1), 65-77.

Meloni D. A., Oliva M. A., Martinez C. A. and Campria J., Photosynthesis and Activity of Superoxide Dismutase, Peroxidase and Glutathione Reductase in

Cotton under Salt Stress, *Environmental and Experimental Botany*, 2003, **49**, 69-76.

Miyake H., Mitsuya S., Rahman M. S., Ultrastructural Effects of Salinity Stress in Higher Plants, Abiotic Stress Tolerance in Plants, *Toward the Improvement of Global Environment and Food*, 2006, **275**, 215-226.

Mohammad M., Shibli R., Ajlouni M., Nimri L., Tomato Root and Shoot Responses to Salt Stress Under Different Levels of Phosphorus Nutrition, *Journal of Plant Nutrition*, 1998, **21**(8), 1667-1680.

Mugdal V., Madaan N., Mudgal A., Biochemical mechanisms of salt tolerance in plants: a review, *International Journal of Botany*, 2010, **6**(2), 136-143.

Muller J. E., Whitshitt M. S., Plant cellular responses to water deficit, *Plant Growth Regulation*, 1996, **20**, 41-46.

Munns R., Comparative Physiology of Salt and Water Stress, *Plant Cell and Environment*, 2002, **25**, 239-250.

Neto A. D. A., Prisco J. T., Eneas-Filho J., Abreu C. E. B., Gomes-Filho E., Effect of salt stress on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes, *Environmental and Experimental Botany*, 2006, **56**, 87- 94.

Niu X., Bressan R. A., Hasegawa P. M., Pardo J. M., Ion Homeostasis in NaCl Stress Environments, *Plant Physiology*, 1995, **109**, 735-742.

Özen F., *Amsonia orientalis* Decne (Apocynaceae), *The Karaca Arboretum Magazine*, 2002, **6**(4), 169-172.

Özen F., Türkiye’de Tükenme Tehlikesinde Olan Bir Türün Otekolojisi: *Amsonia orientalis* Decne. (Apocynaceae), *Balıkesir Üniversitesi Fen Bil. Enst. Dergisi*, 2006, **8**(1), 4-9.

Pan Y., Wu L. J., Yu Z. L., Effect of salt and drought stress on antioxidant enzymes activities and SOD isoenzymes of liquorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch), *Plant Growth Regulation*, 2006, **49**, 157-165.

Parida A. K., Das A. B., Salt Tolerance and Salinity Effects on Plants: a Review, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2005, **60**, 324-349.

Rahman M. S., Matsumuro T., Miyake H., Takeoka Y., Salinity-induced Ultrastructural Alterations in Leaf Cells of Rice (*Oryza sativa* L.), *Plant Production Science*, 2000, **3**(4), 422-429.

Reddy A. R., Chatanya K. V., Jutur P. P., Sumithra K., Differential Antioxidative Responses to Water Stress Among Five Mulberry (*Morus alba* L.) Cultivars, *Environmental and Experimental Botany*, 2004, **52**, 33-42.

Rengel Z., The Role Calcium in Salt Toxicity, *Plant Cell and Environment*, 1999, **15**, 625-632.

Rhodes A. D., Quaternary ammonium and tertiary sulphonium compounds in higher plants, *Annual Review. Plant Physiology Plant Molecular Biology*, 1993, **44**, 357-384.

Robinson S. P., Downton W. J. S., Millhouse J. A., Photosynthesis and Ion Content of Leaves and Isolated Chloroplasts in Relation to Ionic Compartmentation in Leaves, *Agricultural Biochemistry Biology*, 1983, **228**, 197-206.

Rout G. R., Das P., Effect of metal toxicity on plant growth and metabolism: I. Zinc, *Agronomie*, 2003, **23**, 3-11.

Sauerwein M., Ishimaru K. and Shimomura K., Indole alkaloids in hairy roots of *Amsonia elliptica*, *Phytochemistry*, 1991, **30(4)**, 1153-1155.

Scandalios J. G., Oxidative stress: Molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2005, **38**, 995-1014.

Scandalios J. G., Oxygen stress and superoxide dismutase, *Plant Physiol*, 1993, **101**, 7-12.

Scandalios J. G., Response of plant antioxidant defense genes to environmental stress, *Adv. Genet.*, 1990, **28**, 1-41.

Seçkin B., Türkan İ., Sekmen A. H., Özfıdan C., The role of antioxidant defense systems at differential salt tolerance of *Hordeum marinum* Huds. (sea barleygrass) and *Hordeum vulgare* L. (cultivated barley), *Environmental and Experimental Botany*, 2010, **69**, 76–85.

Sgherry C. L. M., Pinzino C., Navari-Izzo F., Sunflower seedlings subjected to increasing water stress by water deficit: changes in O₂ production related to the composition of thylakoid membranes, *Physiol Plant*, 1996, **96**, 446-452.

Sharma S., Dubey R. S., Ascorbate Peroxidase From Rice Seedlings: Properties of Enzyme Isoforms, Effects of Stresses and Protective Roles of Osmolytes, *Plant Science*, 2004, **167**, 541–550.

Sheoran I. S., Singal H. R. and Singh R., Effect of cadmium and nickel on photosynthesis and enzymes of the photosynthetic carbon reduction cycle in pigeon pea (*Cajanus cajan* L.), *Photosynthesis Research*, 1990, **23**, 345-351.

Sivakumar P., Sharmila P., Saradhi P. P., Proline Alleviates Salt-stress-induced Enhancement in Ribulose-1,5-bisphosphate Oxygenase Activity, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000, **279**, 512-515.

Smirnoff N., The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation, *New Phytol*, 1993, **125**, 27-58.

Stadtman E. R., Barlett B. S., Free Radical-Mediated Modification of Proteins, In: Wallace KB, Free Radical Toxicology, *CRC Press Boca Raton*, 1997, **32**, 71-87.

Stresty T. V. S. ve Madhava Rao K. V., Ultrastructural alterations in response to zinc and nickel stress in the root cell of pigeonpea, *Environ Exp Bot.*, 1999, **41**, 3-13.

Stuhlfauth T., Scheuermann R. and Fock H. P., Light energy dissipation under water stress conditions, *Plant Physiol.*, 1990, **92**, 1053-1061.

Tambussi E. A., Bartoli C. G., Beltrano J., Guamet J. J. and Araus, J. L., Oxidative damage to thylakoid proteins in water-stressed leaves of wheat (*Triticum aestivum*), *Physiol. Plant.*, 2000, **108**, 398-404.

Tanji K. K., Agricultural Salinity Assesment and Management, *American Society of Civil Engineers*, 1990, **13**, 281-297.

Targovnik A. M., Cascone O., Miranda M. V., Extractive purification of recombinant peroxidase isozyme c from insect larvae in aqueous two-phase systems., *Separation and purification technology*, 2012, **98**, 199-205.

Tasgin E., Atıcı Ö., Nalbantoglu B., Popova P. L., Effects of salicylic acid and cold treatments on protein levels and on the activities of antioxidant enzymes in the apoplast of winter wheat leaves., *Phytochemistry*, 2006, **67**, 710-715.

Tester M., Davenport R., Na⁺ Tolerance and Na⁺ Transport in Higher Plants, *Annals of Botany*, 2003, **91**, 503-527.

Turan S., Tripathy B. C., Salt and genotype impact on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in two rice cultivars during de-etiolation, *Protoplasma*, 2013, **250**(1), 209-222.

Tuteja N., Mechanisms of High Salinity Tolerance in Plants, *Methods in Enzymology*, 2007, **428**, 419-438.

Türkan I., Bor M., Özdemir F. and Koca H., Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought-tolerant *P. Acutifolius* Gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress, *Plant Sci.*, 2005, **168**, 223-231.

Uomori A., Nakagawa Y., Yoshimatsu S., Seo S., Sankawa U. and Takeda K., Biosynthesis of campesterol and dihydrobrassicasterol in cultured cells of *Amsonia elliptica*, *Phytochemistry*, 1992, **31**(5), 1569-1572.

URL-1 : http://www.tarimmarketi.com/st_a_stres.aspx/, (Ziyaret Tarihi : 25 Temmuz 2016).

Vaillant N., Monnet F., Hitmi A., Sallanon H. and Coudret A., Comparative study of responses in four *Datura* species to a zinc stress, *Chemosphere*, 2005, **59**, 1005-1013.

Valetti N. W., Picó G., A friendly method for *Raphanus sativus* L. (wild radish) peroxidase purification by polyelectrolyte precipitation, *Separation Purification Technology*, 2013, **119**, 1–6.

Van Assche F. V. and Clijsters H., Effects of metals on enzyme activity in plants, *Plant Cell Environ.*, 1990, **13**, 95-206.

Van Breusegem F., Dat J. F., Reactive oxygen species in plant cell death, *Plant Physiol*, 2006, **141**, 384-390.

Van Camp W., Van Montagu M., Inze D., H₂O₂ and NO: Redox signals in disease resistance, *Trends Plant Sci*, 1998, **3**, 330-334.

Vernieri P., Lenzi A., Figaro M., Tognoni F., Pardossi A., How the roots contribute to the ability of *Phaseolus vulgaris* L. to cope with chilling-induced water stress, *Journal of Experimental Botany*, 2001, **52**, 2199-2206.

Wahyuono S., Hoffmann J. J., Jolad S. D., Dentali S. J., Triterpenoids of *Amsonia grandiflora*, *Phytochemistry*, 1987, **26**(4), 1213-1213.

Wang Y., Wisniewski M., Meilan R., Cui M., Webb R. and Fuchigami L., Overexpression of cytosolic ascorbate peroxidase in tomato confers tolerance to chilling and salt stress., *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 2005, **130**(2), 167-173.

Wu J., Seliskar D. M. and Gallagher J. L., Stress Tolerance in the Marsh Plant *Spartina patens*: Impact of NaCl on Growth and Plasma Membrane Lipid Composition, *Physiologia Plantarum*, 1998, **102**, 307-317.

Yasar F., Ellialtıoğlu S., Özpay T., Uzal Ö., Tuz stresinin karpuzda (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Mansf.) antioksidatif enzim (SOD, CAT, APX ve GR) aktivitesi üzerine etkisi, *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarım Bilimleri Dergisi (J. Agric. Sci.)*, 2008, **18**(1), 61-65.

Yong T., Zongsua L., Hongba S., Feng D., Effects of Water Deficits on the Activity of Anti- Oxidative Enzymes and Osmoregulation Among Three Different Genotypes of *Radix astragali* at Seeding Stage, *Biointerfaces*, 2006, **49**, 60-65.

Yong T., Zongsuo L., Hongbo S. and Feng D., Effect of water deficits on the activity of anti-oxidative enzymes and osmoregulation among three different genotypes of *Radix astragali* at seeding stage, *Colloid. Surface. B.*, 2006, **49**, 59-64.

Zengin K. F ve Munzuroğlu Ö., Fasulye Fidelerinin (*Phaseolus vulgaris* L.Strike) Klorofil ve Karotenoid Miktarı Üzerine Bazı Ağır Metallerin (Ni⁺², Co⁺², Cr⁺³, Zn⁺²) Etkileri, *F.Ü. Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 2005, **17**(1), 164-172.

Zhang M., Zhang C., Yu G., Jiang Y., Strasser R., Yuan Z., Yang X., Chen G., Changes in chloroplast ultrastructure fatty acid components of thylakoid

membrane and chlorophyll a fluorescence transient in flag leaves of a super-high-yield hybrid rice and its parents during the reproductive stage, *Journal of Plant Physiology*, 2010, **167**, 277-285.

Zhu J. K., Understanding and improving salt tolerance in plants, *Crop Science*, 2005, **45**, 437-448.

Zornoza P., Vazquez S., Esteban E., Fernandez-Pascual M., Carpena R., Cadmium-stress in nodulated white lupin: strategies to avoid toxicity, *Plant Physiology Biochemistry*, 2002, **40**, 103-107.

Zu Y., Pang H., Yu J., Li D., Wei X., Gao Y., Tong L., Responses in the morphology, physiology and biochemistry of *Taxus chinensis* var. *mairei* grown under supplementary UV-B radiation, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2010, **98**, 152-158.





EKLER

EK-A

Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi

0,6 g Coomassie Blue G-250, 1 litre %2'lik (v/v) perklorik asitte çözülür. Çözelti kaba süzgeç kağıdından geçirilir. Siyah şişede muhafaza edilir. Bu süzüntüden bir öiktar alınarak 469 nm'de okuma yapılır. Okunan değer 1,3-1,5 arasında olmalıdır.

Tüm protein tayinlerinde Bovine Serum Albumin (BSA) kullanılarak standart eğri oluşturulur. Değişik konsantrasyonlarda BSA örnekleri hazırlanır ve kullanılacak tayin yöntemi bu örneklere uygulanarak standart eğri elde edilir.

BSA Kalibrasyon Grafiğinin Hazırlanması

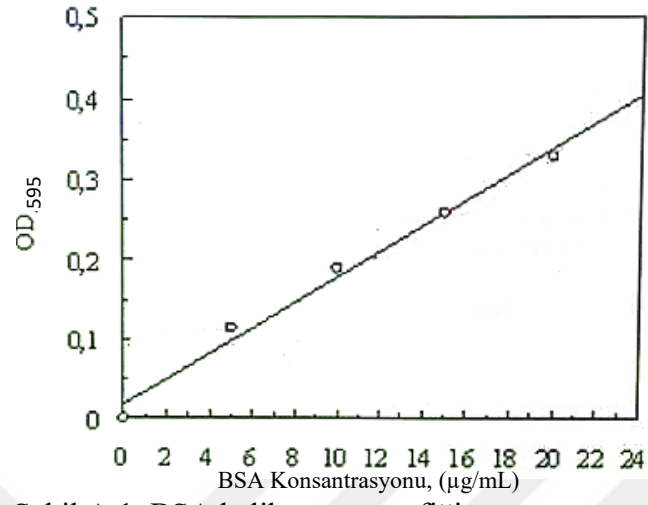
10 mg BSA 10 mL suda çözülür ve bu çözeltiden 1 mL alınır ve 9 mL su ilave edilir. Bu çözelti uygun oranlarda dH₂O ile karıştırılarak standart grafik için örnekler hazırlanır.

Tablo A.1. BSA kalibrasyon grafiği için örnek hazırlanması

	Blank	Örnek-1	Örnek-2	Örnek-3	Örnek-4	Örnek-5
dH ₂ O (mL)	2	1,9	1,8	1,7	1,6	1,5
BSA stok çözeltisi (mL)	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Hazırlanan çözeltinin konsantrasyonu (µL/mL)		5	10	15	20	25

Hazırlanan örneklerin her birinden 1 mL tüplere alınır ve üzerine 1 mL renklendirme çözeltisi ilave edilir. Karışımlar 595 nm dalga boyunda, spektrofotometrede ölçülür. BSA konsantrasyonuna karşı okunan absorbans değerleri çizilerek standart grafik oluşturulur.

EK-A (Devam)



Şekil A.1. BSA kalibrasyon grafiği

EK-B

SDS-PAGE Jel Solüsyonlarının Hazırlanması

Tablo B.1. SDS-PAGE jel solüsyonları

	Ayırma jeli		Sabitleme jeli
Jel oranı (%)	12	Jel oranı (%)	4
H ₂ O (mL)	3,3	H ₂ O (mL)	3
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8) (mL)	2,5	0,5 M Tris-HCl (pH 6,8) (mL)	1,25
%30 Poliakrilamid (mL)	4	%30 Poliakrilamid (mL)	0,675
%10 SDS (mL)	0,1	%10 SDS (mL)	0,05
%10 Amonyum persulfat (mL)	0,1	%10 Amonyum persulfat (mL)	0,05
TEMED (mL)	0,005	TEMED (mL)	0,005
Toplam hacim (mL)	10	Toplam hacim (mL)	5

EK-C

Gümüş Boyama Solüsyonlarının Hazırlanması

Tablo C.1. Gümüş boyama solüsyonları

1. Solüsyon	%50 (v/v) H ₂ O + %40 (v/v) ETOH + %10 (v/v) Asetik asit
2. Solüsyon	%30 (w/v) ETOH
3. Solüsyon	%0,02 (w/v) Na ₂ S ₂ O ₃
4. Solüsyon	100 mM (w/v) AgNO ₃ + %0,2 (v/v) Formaldehit
5. Solüsyon	%2 Na ₂ CO ₃ (w/v) + %0,4 (v/v) Formaldehit
6. Solüsyon	%5 (v/v) Asetik Asit
7. Solüsyon	%1 (v/v) Asetik Asit

Gümüş Boyama Protokolü

30 dakika 1. solüsyonda bekletilir. Ardından, 20 dakika 2. solüsyonda bekletilir. 1 dakika 3. solüsyonla yıkanır. 30 saniye su ile yıkama işlemi uygulanır. 20 dakika 4. solüsyon ile muamele edilir. 3 kere 15 saniye boyunca su ile yıkama yapılır. Bantlar görünene kadar solüsyon 5 uygulanır. Reaksiyonu durdurmak için solüsyon 6 kullanılır. 7. solüsyonda muhafaza edilmek üzere saklanır.

KİŞİSEL YAYINLAR VE ESERLER

Duman Y., Acemi A., **Toygar H. İ.**, Yüzügüllü Y., Özen F., Tuz stresi ve BAP varlığında *Amsonia orientalis*'in antioksidan enzim aktivitelerinin incelenmesi, *CBÜ Fen Bil. Dergisi*, 2016, **12**(3), 543-551.

Duman Y., **Toygar H. İ.**, Acemi A., Kına A., Yüzügüllü Y., Özen F., Tuz Stresinin *Amsonia orientalis*'in Biyolojik Özellikleri Üzerine Etkisinin İncelenmesi, *18. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi*, Konya, Türkiye, 18-19 Aralık 2015.

Duman Y., **Toygar H. İ.**, Acemi A., Kına A., Balcı S., Yüzügüllü Y., Özen F., Responses of Biochemical Parameters to Drought Stress of Medicinal Important Plant: *Amsonia orientalis*, *International Conference on Biochemistry and Molecular Biology*, Paris, Fransa, 22-23 Nisan 2015.

Duman Y., **Toygar H. İ.**, Acemi A., Kına A., Balcı S., Yüzügüllü Y., Özen F.: Zn²⁺ Effect on Biological Properties of *Amsonia orientalis*, *International Conference on New Trends in Chemistry*, Dubai, BAE, 24-28 Mart 2015.

ÖZGEÇMİŞ

25 Aralık 1992 yılında Kocaeli’nde doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Kocaeli’nde tamamladı. 2010 yılında Kocaeli Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde lisans eğitimine başladı ve 2015 yılında Biyolog olarak mezun oldu. Aynı yıl Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde yüksek lisans eğitimine başladı.

