T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

JUGLONUN SALATALIKTA (*Cucumis sativus)* ANTİOKSİDAN ENZİM AKTİVİTELERİ VE GEN İFADELERİ ÜZERİNE ETKİLERİ

EZGİ CİBALİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK PROGRAMI

DANIŞMAN
PROF. DR. İSMAİL KOCAÇALIŞKAN

İSTANBUL, 2018

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

JUGLONUN SALATALIKTA (*Cucumis sativus)* ANTİOKSİDAN ENZİM AKTİVİTELERİ VE GEN İFADELERİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Ezgi CİBALİ tarafından hazırlanan tez çalışması 20.04.18 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Prof. Dr. İsmail KOCAÇALIŞKAN

Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. İsmail KOCAÇALIŞKAN _____
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof.Dr. Gül CEVAHİR ÖZ
İstanbul Üniversitesi _____

Dr.Öğr.Üyesi Şenay VURAL KORKUT
Yıldız Teknik Üniversitesi

_____

Bu çalışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü' nün 2014-01-07-KAP01 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında Juglon allelokimyasalının salatalık bitkisi türü üzerindeki etkileri antioksidan enzim aktivitesi düzeyinde ve bu enzimlerin gen ekspresyonu düzeyinde incelenmiştir.

Juglon en çok bilinen allelokimyasallardan biridir. Buna karşın juglonun gen ifadesi üzerine etkileri hakkındaki çalışmalar çok yetersizdir. Salatalık bitkisinde juglonun genler üzerine etkisi hakkında bir çalışmaya rastlanmamıştır. Allelokimyasalların etki mekanizması bitkiden bitkiye farklılık gösterebilir. Bu etki pozitif ya da negatif olabilir. Bu tez çalışmasında salatalık üzerindeki etki durumu incelenmiştir.

Tez çalışmamın tüm sürecinde bilgi ve tecrübelerini aktaran değerli hocam Prof.Dr.İsmail KOCAÇALIŞKAN'a, çalışmanın başından sonuna kadar desteğini esirgemeyen değerli hocam Yrd.Doç.Dr. Şenay VURAL KORKUT'a, çalışmamızın tüm aşamalarında yanımda olan sabırlı ve kıymetli arkadaşım Merve YALÇIN'a, hayatıma sevgi ve güzellik katan sevgili Gökhan'a ve maddi manevi destek olarak beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan aileme sonsuz teşekkürler ederim.

Nisan, 2018

Ezgi CİBALİ

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGE LİSTESİ vii

KISALTMA LİSTESİ viii

ŞEKİL LİSTESİ ix

ÇİZELGE LİSTESİ x

ÖZET xi

ABSTRACT xii

BÖLÜM 1

GİRİŞ 1

1.1 Literatür Özeti 1

1.2 Tezin Amacı 2

1.3 Hipotez 3

1.4 Allelopati 3

1.4.1 Allelopatinin Tarihi 3

1.4.2 Allelopati Çalışmaları 5

1.4.3 Juglon 7

1.4.3.1 Juglonun çimlenme ve fide büyümesi üzerine etkisi 9

1.4.3.2 Juglonun antifungal etkisi 9

1.4.3.3 Juglonun herbisit etkisi 10

1.4.3.4 Juglonun antikanser etkisi 10

1.5 Antioksidan Enzimler 10

1.5.1 Antioksidan Enzimlerin Bitkilerdeki Fonksiyonları 11

1.5.2 Süperoksit Dismutaz 11

1.5.3 Katalaz 12

1.5.4 Peroksidaz 13

BÖLÜM 2

MATERYAL VE METOT 14

2.1 Kullanılan Kitler, Kimyasallar ve Tampon Çözeltiler 14
2.1.1 Kullanılan Tampon Çözeltiler 15
2.1.1.1 Juglon çözeltilerinin hazırlanması 15
2.1.1.2 Tris Tamponu (Enzim ekstraksiyon Tamponu) 15
2.1.1.3 Süperoksit Dismutaz Aktivite Tayininde Kullanılan Çözeltiler 15
2.1.1.4 Katalaz Aktivite Tayininde Kullanılan Çözeltiler 16
2.1.1.5 Askorbat Peroksidaz Aktivite Tayininde Kullanılan Çözeltiler 16
2.2 Cihazlar 16
2.3 Primerler 28
2.4 Salatalık tohumlarının temin edilmesi ve juglon uygulamaları 17
2.4.1 Yüzey Sterilizasyonu 17
2.4.2 Çimlenme Ortamının Hazırlanması ve Çimlendirme 17
2.4.3 Çimlenme yüzdesi ve fidelerin kök-gövde uzunluklarının belirlenmesi 17
2.5 Enzim ekstraksiyonuve protein miktarı tayini 18
2.6 Enzim aktivite ölçümleri 18
2.6.1 Katalaz Aktivite Ölçümü 18
2.6.2 Süperoksit Dismutaz Aktivite Ölçümü 19
2.6.3 Askorbat Peroksidaz Aktivite Ölçümü 19
2.7 Total RNA izolasyonu ve temizlenmesi 19
2.8 Komplementer DNA sentezi (cDNA) 21
2.9 Gerçek Zamanlı PCR Analizleri 22
2.10 İstatistik Analizler 22

BÖLÜM 3

ARAŞTIRMA BULGULARI 23

3.1 Bitkilerin kök ve gövde uzunlukları 23
3.2 Enzim Aktiviteleri 25
3.2.1 Katalaz 25
3.2.2 Süperoksit Dismutaz 26
3.2.3 Askorbat Peroksidaz 27
3.3 Gerçek Zamanlı PCR bulguları 28
3.3.1 Katalaz Geninin Ekspresyon Analizi 28
3.3.2 Süperoksit Dismutaz Geninin Ekspresyon Analizi 31
3.3.3 Askorbat Peroksidaz Geninin Ekspresyon Analizi 33
3.4 İstatistikler 36

BÖLÜM 4

SONUÇ VE ÖNERİLER 38

KAYNAKLAR 40

ÖZGEÇMİŞ 45

SİMGE LİSTESİ

H_2O_2	Hidrojen Peroksit
$C_{10}H_6O_3$5-	Hidroksi 1,4-naftakinon
NaOH	Sodyum Hidroksit
KH_2PO_4	Mono Potasyum Fosfat
NaOCl	Sodyum Hipoklorit

KISALTMA LİSTESİ

APX	Askorbat Peroksidaz
CAT	Katalaz
DNA	Deoksribo Nükleik Asit
EDTA	Etilendiamin Tetra Asetik Asit
HCl	Hidroklorik Asit
g	Gram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
µl	Mikrolitre
NBT	Nitro Mavi Tetrazolyum
RNA	Ribo Nükleik Asit
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SOD	Süperoksit Dismutaz

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1 Science dergisi kapağı,1964. 6
Şekil 1.2 Juglon'un kimyasal yapısı 8
Şekil 1.3 Ceviz ağacının meyve, yaprak ve ağaç görünümü 9
Şekil 1.4 Süperoksit Dismutaz enziminin 3 boyutlu yapısı 12
Şekil 1.5 Katalaz enziminin 3 boyutlu yapısı 13
Şekil 1.6 Peroksidaz enziminin 3 boyutlu yapısı 13
Şekil 2.1 Kullanılan BSA standart grafiği 18
Şekil 3.1 Juglun'un büyüme parametreleri üzerine etkisi 24
Şekil 3.2 Yetiştirilen salatalık tohumlarının Petrilerdeki fotoğrafları 25
Şekil 3.3 Kök ve yapraklarındaki CAT aktivitesi değerleri 26
Şekil 3.4 Kök ve yapraklarındaki SOD aktivitesi değerleri 27
Şekil 3.5 Kök ve yapraklarındaki APX aktivitesi değerleri 28
Şekil 3.6 Yapraklardaki CAT ekspresyonu değişimi 26
Şekil 3.7 Köklerdeki CAT ekspresyonu değişimi 30
Şekil 3.8 CAT geninin amplifikasyon eğrisi 30
Şekil 3.9 CAT genine ait erime noktası eğrisi 31
Şekil 3.10 Yapraklardaki SOD ekspresyonu değişimi 31
Şekil 3.11 Köklerdeki SOD ekspresyonu değişimi 32
Şekil 3.12 SOD geninin amplifikasyon eğrisi 33
Şekil 3.13 SOD genine ait erime noktası eğrisi 33
Şekil 3.14 Yapraklardaki APX ekspresyonu değişimi 34
Şekil 3.15 Köklerdeki APX ekspresyonu değişimi 35
Şekil 3.16 APX genine ait amplifikasyon eğrisi 35
Şekil 3.17 APX genine ait erime noktasi eğrisi 36

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1 Kullanılan kitler, kimyasallar ve markaları 14
Çizelge 2.2 Kullanılan cihazlar ve markaları 16
Çizelge 2.3 Real-time PCR'da kullanılan primerlerin dizi bilgileri 16
Çizelge 3.1 Juglon'un kök ve gövde uzunluğu üzerine etkisi 24
Çizelge 3.2 Morfolojik ölçümler ile enzim aktivasyonu arasındaki korelasyon 36
Çizelge 3.3 Morfolojik ölçümler ile gen ifadeleri arasındaki korelasyon 37
Çizelge 3.4 Enzim aktiviteleri ile gen ifadeleri arasındaki korelasyon 37

ÖZET

JUGLONUN SALATALIKTA -*Cucumis sativus*- ANTİOKSİDAN ENZİM AKTİVİTELERİ VE GEN İFADELERİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Ezgi CİBALİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Prof. Dr. ismail KOCAÇALIŞKAN

Bu tez çalışmasında Salatalık bitkisi tohumlarına farklı konsantrasyonlarda Juglon uygulanmıştır. Juglonun bu tohumlar üzerinde çimlenmeye etkisi, antioksidan enzimlerin aktivitelerine etkisi ve bu enzimleri kodlayan gen bölgelerindeki anlatıma etkisi incelenmiştir. Juglona maruz kalan tohumlarda SOD, CAT ve APX enzimlerinin aktivasyonu genellikle 0,25 mM konsantrasyona kadar farklı oranlarda olmak üzere artmış; tüm enzimler için 0,5 mM konsantrasyonda düşüş gözlenmiştir. CAT enziminin gen ifadesinde 0,1 mM konsantrasyonda kontrole oranla artış; SOD enziminin gen ifadesinde yaprakta artış, kökte düşük ekspresyon; APX enziminin gen ifadesinde ise kökte 0,1 mM konsantrasyonda, yaprakta ise 0,5 mM konsantrasyonda artış gözlemlenmiştir.

Yapılan korelasyon testlerinde: kök uzunluğu ile kökte APX gen ifadesi ile, gövde uzunluğu ile yaprakta SOD aktivitesi ile, kök uzunluğu ile yaprakta CAT gen ifadesi ile, gövde uzunluğu ile yaprakta SOD gen ifadesi ile, yaprakta APX aktivitesi ile kökte ve yaprakta CAT gen ifadesi ile pozitif korelasyon tespit edilmiştir. Kök uzunluğu ve yaprakta SOD gen ifadesi, kökteki SOD gen ifadesi ile kökteki CAT aktivitesi ve yapraktaki SOD enzim aktivitesi arasında ise negatif korelasyon tespit edilmiştir.

Bu çalışma sonuçlarının, gelecekte tarımsal uygulamalarda allelokimyasalların ürünlerde yaratabileceği hasarları azaltmak üzerine yapılan çalışmalara fayda sağlayabileceği yorumlanabilir.

Anahtar Kelimeler: Allelopati, Juglon, antioksidan enzimler, Salatalık (Cucumis Sativus)

ABSTRACT

ACTIVITY AND GENE EXPRESSION ANALYSIS OF ANTIOXIDANT ENZYMES IN JUGLONE APPLIED CUCUMBER

Ezgi CİBALİ

Department of Molecular Biology and Genetics

MSc. Thesis

Adviser: Prof. Dr. İsmail KOCAÇALIŞKAN

In this thesis study, Juglone was applied to cucumber plant seeds at different concentrations. The influence of the juglone on germination on these seeds, the effect on the activity of antioxidant enzymes and the effect of expression in the gene region encoding these enzymes have been examined. In seeds exposed to juglone, the activation of SOD, CAT and APX enzymes was increased at different rates, usually to a concentration of 0.25 mM; there was a decrease in the concentration of 0.5 mM for all enzymes. We observed increase in expression of CAT enzyme at 0.1 mM concentration relative to control; and for the SOD gene expression we observed increase at the leaves and decrease at the roots. For the gene expression of APX enzyme, an increase was observed at the concentration of 0.1 mM in the root and 0.5 mM in the leaf.

In the correlation tests made: we detected positive corelation between root length with APX gene expression in the roots, stem length with leaf SOD activity, root length with CAT gene expression in the leaf, stem length with leaf SOD gene expression, leaf APX activity with root and leaf CAT gene expression. There was negative correlation between root length and leaf SOD gene expression, root SOD gene expression and root CAT activity and leaf SOD enzyme activity.

It can be interpreted that the results of this study may be useful in future studies on reducing the damage that allelochemicals may cause in agricultural products.

Keywords: Allelopathy, Juglone, Antioxidant enzymes, Cucumber (Cucumis sativus)

BÖLÜM 1

GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Allelopati; bir bitki tarafından oluşturulan ve salıverilen bazı kimyasal maddelerin başka bir bitkiyi olumlu veya olumsuz yönde etkilemesi olarak tarif edilir. Bu olay bitkiler arasındaki kimyasal etkileşim olarak ta düşünülebilinir. Ancak mikroorganizmaları ve böcekleri de kapsar. Allelopatik etkiye sahip olan maddelere allelokimyasal madde veya 'Allelokimyasal' adı verilir. Bu maddeler bir bitki tarafından çevreye salıverilir ve daha sonra bu maddeyi alan diğer komşu bitkilerin büyümesi etkilenir. Bu konu sadece biyokimyasal etkileşimler ve fizyolojik olaylarla sınırlı olmayıp aynı zamanda allelokimyasalların moleküler seviyede etki mekanizmasıyla ilgilidir.[1]

Allelokimyasallar sekonder metabolitlerin alt gruplarındandır ve allelokimyasallar da sekonder metabolitler gibi metabolizmada ihtiyaç duyulmazlar. Negatif etki gösteren allelokimyasallar otçullara karşı bitki savunmasında önemli bir yere sahiptir. [2]

Allelokimyasalların üretimi, mevcut besin maddeleri gibi biyotik; sıcaklık ve pH gibi abiyotik faktörlerden etkilenir. Basit fenilpropanoitler ve benzoik asit türevlerinin allelopatik aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir. Kafeik ve ferulik asitler toprakta ölçülebilir düzeylere ulaşabilir ve bu bileşiklerin, laboratuvar koşullarında birçok bitkinin büyüme ve çimlenmesini engellediği gözlemlenmiştir.[3]

Allelopati bazı alg, mercan, bakteri, mantar ve bitkiler için karakteristiktir. Ayrıca allelopatik etkileşimler bitki topluluklarında tür dağılımı ve birey sayısında etkilidir özellikle de invazif, aşırı yayılan bitkilerin başarısında da allelokimyasalların rolu olduğu

düşünülmektedir.Bu sonuçlara rağmen, allelopatinin doğal ekosistemlerdeki önemi hala tartışmalıdır. Çoğu bilim insanı allelopatini bitkiler arasındaki ilişkilerde önemli bir etken olduğundan kuşku duymaktadır. Zira bu olguyu destekleyen kanıtları elde etmek kolay değildir. Laboratuvarda, bitkiden elde edilen özütlerin veya saf allelokimyasalların diğer bitkilerin büyümesini engelleyebileceğini göstermek kolaydır. Ancak asıl sorun, bu allelokimyasalların toprakta, yeterli derişimlerde bulunarak, diğer bitkilerin gelişmini engellediğini göstermektir. Bu olguyu destekleyecek yeterli kanıtlar olmasa da, zirai alanda uygulanabilirlik potansiyeli allelopatiyi ilgi çekici kılmaktadır. Genetik mühendisliği yöntemleri ile yabancı otlara karşı allelopatik özelliğe sahip bitkilerin geliştirilmesi gelecek için ümit verici bir yaklaşımdır.[4]

1.2 Tezin Amacı

Allelopati hakkındaki genel bilgilerde açıklandığı üzere juglon gibi allelokimyasallar diğer bitkilerin çimlenmesi, solunumu, verimi ve enzimlerinin aktivasyonunda olumlu ya da olumsuz etkilere sahiptir. Bu etkiler hakkında yapılan çalışmalarda moleküler çalışmalar yeterli değildir.

Kocaçalışkan ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada salatalık bitkisinin juglona duyarlı olduğunu; juglona maruz kalan fidelerde büyümenin olumsuz etkilendiğini ve bununla beraber enzim aktivitelerindeki değişiklileri incelediklerinde polifenol oksidaz enzim aktivitesinin azaldığını; katalaz ve süperoksit dismutaz enzimlerinin aktivitelerinde artış gözlemlemişlerdir.[5,6,7]

Juglonun salatalıktaki etkileri üzerine çalışmalar yapılmış olsa da gen anlatımı düzeyindeki etkiler hakkında antioksidan enzimlerden katalaz, askorbat peroksidaz ve süperoksit dismutaz enzimlerinin gen ifadeleri üzerine juglonun etkisi ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu durum baz alınarak bu tez çalışmasında juglon allelokimyasalının salatalık bitkisi üzerinde antioksidan enzimlerin gen anlatımı seviyesindeki etkilerine ortaya çıkarmak buradaki bilinmeyenlere ışık tutmak amaçlanmıştır.

1.3 Hipotez

Yapılan literatür taramaları ve şimdiye kadar yapılan çalışmalar, bize juglonun salatalıktaki antioksidan enzimlerin gen anlatımının bir seviyeye kadar artıracağı hipotezini oluştumamızı sağlamıştır. Bu çalışma farklı konsantrasyonlardaki juglon çözeltilerinin gen anlatımı üzerindeki etkilerini kıyaslamaya ve ülkemizdeki salatalık ekimlerinde çevre ortam için dikkat edilmesi gereken allelokimyasal konsantrasyonu ve etkisini belirlemeye odaklanmıştır.

1.4 Allelopati

Bitkiler ve bitkiler ile çevresindeki organizmalar arasındaki kimyasal etkileşime allelopati denir. Mikroorganizmalar ve bitkiler yaşadıkları ortama bazı organik madde salınımları yaparlar. Bitkiler aynı ortamda yaşadıklarından dolayıbu maddelere maruz kalabilirler. Bu maddelerin etkileri olumlu ya da olumsuz olarak ortaya çıkabilir. Bu etkilerden birini oluşturan organik maddelere allelokimyasal madde, bu maddeleri salgılayan bitkilere de allelopatik bitki denir.[52]

Allelokimyasallar sekonder metabolitlerin alt gruplarındandır ve allelokimyasallar da sekonder metabolitler gibi metabolizmada ihtiyaç duyulmazlar. Negatif etki gösteren allelokimyasallar otçullara karşı bitki savunmasında önemli bir yere sahiptir.

1.4.1 Allelopatinin Tarihi

Allelopati terimi Yunancada allelo- ve pati- , “karşılıklı, birbirine zarar” ya da “acı çekme” anlamına gelir. İlk kez 1937 yılında Avusturyalı profesör Hans Molisch tarafından “Der Einflusseiner Pflanzeaufdieandere – Allelopathie” (Bitkilerin birbirlerine etkileri) adlı kitabında kullanılmıştır. Hans Molisch bu terimi, başka bir bitki tarafından komşu bitkilerin büyümesini engelleyen biyokimyasal etkileşimleri tanımlamak için kullanmıştır.
1971’de Whittaker ve Feeny, Science dergisinde allelokimyasalları organizmalara arasındaki tüm kimyasal etkileşimler olarak tanımladıkları bir araştırma yayınladılar. 1984’te ElroyLeon Rice allelopati tanımını “bir bitkinin başka bir bitkiye ya da mikroorganizmaya doğrudan olumlu ya da olumsuz etkilerinin; biyokimyasal maddelerin doğal çevreye salınmasıyla gerçekleşmesi durumu” olarak genişletmiştir.[8]

Allelopati terimi sonraki on yıl boyunca bilim insanları tarafından organizmalar arasındaki daha geniş kimyasal etkileşimleri tanımlamak için kullanıldı ve 1996'da Uluslararası Allelopati Topluluğu (IAS) allelopatiyi "Bitkiler, algler, bakteri ve mantarlar tarafından üretilen, sekonder metabolitleri içeren, tarım ve biyolik sistemlerin büyüme ve gelişimini etkileyen herhangi bir proses" olarak tanımladı. Sonraki yıllarda bitki araştırmacıları "bir bitki tarafından başka bir bitkiyi inhibe eden madde" tanımına geri dönmüşlerdir. Zoologlar konuyu daha karışık hale getirerek bu terimi mercanlar ve süngerler gibi omurgasızlar arasındaki kimyasal etkileşimleri tanımlamak için kullandılar.

Allelopati terimi kullanılmadan çok önceleri de insanlar bitkilerin birbirlerine negatif etkilerini gözlemlemiştir. M.Ö. 300 yıllarında yaşayan Theophrastus domuz yeminin yonca üzerindeki inhibisyon etkilerini fark etmişti. M.S. 1. Yüzyılda Çin'de Shennong Ben CaoJing'in yazarı, allelopatik etkilere sahip olanlar da dahil olmak üzere böcek öldürme yeteneği olan 267 tane bitki tanımladı. 1832'de İsviçreli botanikçi De Candolle, ekinlerdeki salgı benzeri yapıların "toprak hastalığı" denilen bir sebebi olduğunu ileri sürmüştür. [9]

İki veya daha fazla organizmanın aynı sınırlığı kaynağı bir diğerinin zararına kullanmaya teşebbüsün rekabete aykırı olmadığını savunan ekolojistler tarafından allelopati kavramı universal olarak kabul görmemiştir.

1970'lerde, bazı araştırmacılar tarafından rekabetçi ve allelopatik etkileri ayırmaya büyük çaba harcanırken, diğerleri 1990'lı yıllarda etkilerin birbirine bağımlı olduklarını ve kolayca ayırdedilemeyeceğini savundu.[10]

Daha sonra, New England Üniversitesi Agronomi ve Toprak Bilimi Bölümü'nde 1994 D.L. Liu ve J.V. Lowett tarafından, *Journal of Chemical Ecology* dergisindeiki makale yazılmıştır. Bu yayınlarda, allelokimyasalların etkisini diğer rekabetçi etkilerden ayırarak, arpa bitkileri kullanımıyla ve allelokimyasalları doğrudan incelemek için bir protokol geliştirmişlerdir.[11,12]

1.4.2 Allelopati Çalışmaları

Allelopatiyle ilgili yapılan ilk deneysel çalışma 1928'de Amerika'da yapılmıştır. Bu çalışmada yağmur sonrası kara ceviz ağacı yapraklarından akan su toplanarak domates fidelerine uygulanmıştır. Sonucunda tüm domates fideleri kuruyarak ölmüştür. Daha sonra ceviz bitkisinin ürettiği bu madde izole edilmiş ve yapısı aydınlatılmış, bunun 5-hidroksi naftakinon olduğu belirlenmiş ve "Juglon" adı verilmiştir.

Allelokimyasalların üretimi, mevcut besin maddeleri gibi biyotik; sıcaklık ve pH gibi abiyotik faktörlerden etkilenir. Basit fenilpropanoitler ve benzoik asit türevlerinin allelopatik aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir. Kafeik ve ferulik asitler toprakta ölçülebilir düzeylere ulaşabilir ve bu bileşiklerin, laboratuvar koşullarında birçok bitkinin büyüme ve çimlenmesini engellediği gözlemlenmiştir.[3]

Allelopati bazı alg, mercan, bakteri, mantar ve bitkiler için karakteristiktir. Ayrıca allelopatik etkileşimler bitki topluluklarında tür dağılımı ve birey sayısında etkilidir özellikle de istilacı bitkilerin başarısında da allelokimyasalların rolü olduğu düşünülmektedir.

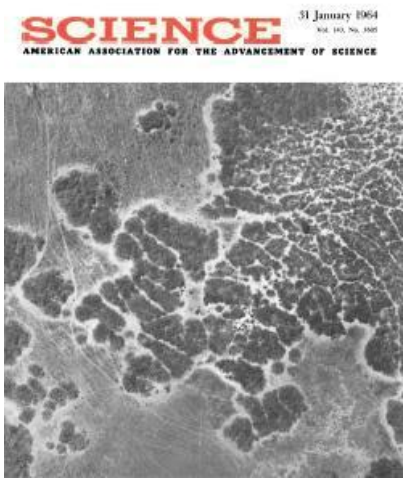
Bu sonuçlara rağmen, allelopatinin doğal ekosistemlerdeki önemi hala tartışmalıdır. Çoğu bilim insanı allelopatini bitkiler arasındaki ilişkilerde önemli bir etken olduğundan kuşku duymaktadır. Zira bu olguyu destekleyen kanıtları elde etmek kolay değildir. Laboratuvarda, bitkiden elde edilen özütlerin veya saf allelokimyasalların diğer bitkilerin büyümesini engelleyebileceğini göstermek kolaydır. Ancak asıl sorun, bu allelokimyasalların toprakta, yeterli derişimlerde bulunarak, diğer bitkilerin gelişmini engellediğini göstermektir. Bu olguyu destekleyecek yeterli kanıtlar olmasa da, zirai alanda uygulanabilirlik potansiyeli allelopatiyi ilgi çekici kılmaktadır. Genetik mühendisliği yöntemleri ile yabancı otlara karşı allelopatik özelliğe sahip bitkilerin geliştirilmesi gelecek için ümit verici bir yaklaşımdır.

Allelopatinin tarımda uygulanması, bir çok araştırmanın ana konusu olmuştur.[13] Mevcut araştırmalar, yabani otların bitkiler üzerindeki etkileri, bitkilerin yabani otlar üzerindeki ve bitkilerin yine bitkiler üzerindeki etkileri üzerine odaklanmaktadır.[14] Bu araştırma sürdürülebilir tarımın teşvik edilmesi için, allelokimyasal maddelerin büyüme düzenleyicileri ve doğal herbisitler olarak kullanılma olasılığını arttırmaktadır.[15] Bu gibi

çok sayıda allelokimyasal ticari olarak mevcuttur veya büyük ölçekli imalat sürecindedir. Örneğin, Leptospermon *Callistemon citrinus* tarafında üretilen termokimyasal bir maddedir. Her ne kadar ticari bir herbisit olarak zayıf olduğu tespit edilse de, bunun kimyasal bir analogu olan mezotriyon (ticari adı Callisto) etkili çok etkili olduğu bulunmuştur.[16] Mısır tarlalarındaki geniş yabani otları kontrol etmek için satılmaktadır, ancak çimlerde de çatal otu denilen yabani otlar için etkili bir kontrol olduğu görülmüştür. Sheeja (1993), seçilen büyük bitkiler üzerinde *Chromolaena odorata* ve *Lantana camara* yabani otlarının allelopatik etkileşimini bildirmiştir.

Birçok bitki çeşidi allelopatik etki göstermektedir, pirinç (*Oryza sativa*) en çok çalışılan ve güçlü allelopatik etkiye sahip bitkilerden biridir.[17,18,19] Pirincin allelopatik etkileri çeşidine ve kökenine bağlıdır; Japonica pirinci, Indica ve Japonica-Indica melezinden daha fazla allelopatiktir. Yakın zamanda pirinç allelopatisi üzerine yapılan bir çalışmada, yabani ot yönetimi için kullanılabileceği olasılığından ve pirincin allelopatik özelliklerinin kantitatif olarak miras kaldığından ve birkaç allelopati içerikli muamele yöntemi oluşturulduğu belirtilmiştir.[20]

Birçok istilacı bitki türü yerli bitkilere allelopati ile etki eder.[21,22] Ünlü bir allelopati vakası çöl çalılarıdır. En yaygın olarak bilinen erken örneklerden biri *Salvia leucophylla*'ydı, çünkü 1964 yılında Science dergisinin kapağındaydı.[23] Çalıların etrafındaki çıplak bölgelerin, çalılar tarafından yayılan uçucu terpenlerden kaynaklandığı öne sürülmüştür. Bu çıkarım doğal ekosistemin laboratuvar koşullarında yetersiz de olsa canlandırılmasıyla yapıldı. 1970'de Science dergisinde, bu çıplak bölgelerin kemirgenleri ve kuşları çalılardan uzak tutan allelopatik bir etki olduğu belirtilmiştir. (Şekil 1.1)



Şekil 1.1 Science dergisi kapağı,1964.

Allelopatinin; bitkilerin büyüme bileşenlerini etkileyerek ormanların gelişmesi ve yenilenmesi için önemli bir rol oynadığı belirlenmiştir. Siyah ceviz ağacı *Juglans nigra* bazı türleri büyük ölçüde etkileyen bazı türlerde ise hiç etki göstermeyen allelokimyasal juglonu üretmektedir. Bazı Okaliptüs türlerinin yaprak döküntüler ve kök kalıntıları bazı toprak mikropları ve bitki türleri için allelopatiktir.[24] Cennet ağacı, *Ailanthus altissima*, köklerinde birçok bitkinin büyümesini engelleyen allelokimyasallar üretir. Doğadaki yüksek bitkiler tarafından salınan allelokimyasal maddelerin etki hızı hakkında çalışmalar, coğrafi alanların taranmasında gelecek vaat eden sonuçlar ile birlikte hızla hızlandırılmıştır.[25]

1.4.3 Juglon

Juglon *Juglandaceae* ailesindeki *Juglans regia, Juglans cinerea* ve *Juglans nigra* türlerinin kök, gövde, sekonder ksilem, meyveleri (epikarp) ve yapraklarında bulunur (Şekil 1.2). Allelokimyasal bir moleküldür.[26] Bitkilerin juglona verdiği tepkiler değişkendir. Domates, yonca, elma, tere, kızıl çam bitkilerinde negatif etki gösterirken; kavun, düğün çiçeği, zambak, üzüm, meşe gibi bitkiler üzerinde ise pozitif etkileri gözlemlenmiştir.[5,27] Juglon allelokimyasal özelliğinin yanında bazı böceklere toksik etki gösterir.[28]

Ceviz ağaçlarının diğer bitkiler üzerindeki zararlı etkileri en azından iki bin yıldır gözlenmektedir. Yunanistan ve Roma'nın eski uygarlıkları, cevizin sitotoksik özelliklerini kullanırken, Güney Amerika'da, kesilmiş bitki dokuları suya atılarak daha kolay balık yakamak amacıyla kullanılmıştır.[29]

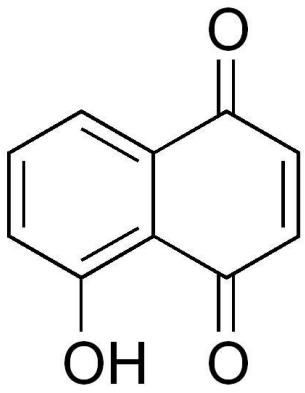
Juglone allelokimyasalı 1850'lere kadar izole edilmedi. İki bilim insanı, A. Vogel Jr. ve C. Reischauer, 1851'de ceviz ağacından bileşiği ayırmayı başardı. O zaman bileşik nucin olarak biliniyordu. Juglone daha sonra 1887'de A. Bernthsen ve A. Sempre tarafından sentezlendi ve karakterize edildi .

1921'deki Virginia Tarım Deneyleri Laboratuvarı'nda M.T. Cook, *Juglans nigra* etrafında ekili domates bitkilerinin olumsuz yönde etkilendiğini yapraklarının solmasını gözlemleyerek farketmiştir.[30]Schneiderhan, *Juglans nigra* ve *Juglans cinerea*'nın Virginia'daki elma ağaçlarına zarar verdiğini bulmuştur. Ceviz ağaçlarından ortalama 11,9 metre çevredeki ağaçlar ölü; 14,3 metre çevredeki ağaçlar ise hasar görmüştür. Buna ek

olarak, elma ağaçlarının bazı yerel varyasyonlarının cevizlere karşı daha dirençli olma eğiliminde olduklarını bulmuştur.[31]

A.B. Massey, yonca tarlalarında bulunan ceviz ağacının, yoncaların ölmesine neden olduğunu gözlemledi. Massey, birkaç başka deneyden sonra ceviz ağacında bulunan zehirli bileşiğin suda kolaylıkla çözünmediğini, bu nedenle kök ve kabuktaki bileşiğin ağaçtan ayrıldıktan sonra kimyasal olarak değişmesi gerektiği sonucuna vardı. 1928 yılına kadar bileşik E.F. Davis tarafından diğer bitkiler için toksik olduğu tespit edildi ve onaylandı.

Juglon köklerde sentezlenir ve ksilemle yapraklara taşınır. Oksitlenmeden önce hidrojuglon olarak bulunur. Oksitlendikten sonra allelokimyasal olan juglon'a (5-hidroksi-1,4 Naftakinon) dönüşür.[32]



Şekil 1.2 Juglon'un kimyasal yapısı

Juglon aynı zamanda yün ve kumaşlarda mürekkep için doğal bir boya olarak kullanılmıştır. Koyu turuncu, kahverengi lekeleri oluşturma eğilimi nedeniyle aynı zamanda saç boyaları ve kozmetik için de bir renklendirme maddesi olarak kullanılmaktadır.



Şekil 1.3 Ceviz ağacının meyve, yaprak ve ağaç görünümü

1.4.3.1 Juglonun çimlenme ve fide büyümesi üzerine etkisi

Yapılan çalışmalarda Juglon allelokimyasalı çimlenme ve fide büyümesi üzerine çeşitli etkiler göstermiştir. Konsantrasyonuna bağlı olarak farklı etkiler gözlemlenmiştir. Salatalıkta yapılan bir çalışmada gövde uzamasını baskıladığı gözlemlenmiştir.[53] Kocaçalışkan ve ark. 2001 yılında yaptıkları çalışmada Juglonun bir çok bitki üzerindeki kök ve gövde uzunluğuna etkisini karşılaştırmışlardır.[54] Bu çalışma sonucunda Juglon buğday, arpa, mısır, salatalık, karpuz, domates, tere üzerinde kök uzunluğunu negatif etkilerken kavun bitkisinin kök uzunluğunu pozitif etkilemiştir. Aynı sonuçlar gövde uzunluğu için de gözlemlenmiştir.

1.4.3.2 Juglonun antifungal etkisi

Mantarlar; gıda kalitesini, miktarını ve saklama süresini önemli ölçüde azaltan ve gıda sektörünün mücadele ettiği canlılardır. Mantarların direnç geliştirmesi, sağlık

sektörünün de bu canlılarla mücadelesini zorunlu kılmaktadır. Bu sebeplerle araştırmacılar doğal antifungal etki gösteren kimyasalları tanımlamak için çalışmalar yapmaktadır.

*Candida albicans, Aspergillus flavus ve Fusarium spp.*Türleriyle yapılan çalışmalarda Juglonun bu mantar türleri üzerinde antifungal etki gösterdiği ve gelişim ve direnci baskıladığı tespit edilmiştir. [55]

1.4.3.3 Juglonun herbisit etkisi

Herbisitler son yüzyılda bitki araştırmalarının odak noktalarından biridir. Uzun zaman kullanılan sentetik herbisitlerin onlara dayanıklı yabani otların gelişmesi ve bunun sonucunda ekolojik dengenin bozulması araştırmacıları Juglon gibi sentetik olmayan herbisit arayışına yönlendirmiştir. Doğal bileşikler sentetik olanlara göre doğada daha hızlı yokolur ve ekoloji dengesini bozmazlar.

Arpa ve buğday bitkileriyle yapılan çalışmalar göstermiştir ki Juglon doğal herbisit için potansiyel bir allelokimyasaldır. [56]

1.4.3.4 Juglonun antikanser etkisi

Juglon son yıllarda antikanser çalışmalarında kullanılmıştır. Juglona antikanser özellikleri kazandırabilecek potansiyel yollardan birinin semiquinon radikalini oluşturması ve bu radikalin de apoptozu tetikleyen süperoksit anyonlarına dönüşebilmesi olduğu düşünülüyor.[33] Juglonun semiquinona dönüştüğü yolak sitozol ve mitokondride gerçekleşmektedir.[34]

1.5 Antioksidan Enzimler

Bitkiler herhangi bir strese maruz kaldıklarında reaktif oksijen türleri ya da serbest radikaller olarak bilinen maddeleri sentezlemektedir. Bu serbest radikallerin fotosentez ve solunumu sınırlarlayarak hücrelere zarar verdikleri belirlenmiştir. Antioksidan enzimler bu serbest radikallere karşı hücreleri daha dayanıklı hale getirirler. Süperoksit Dismutaz, Askorbat Peroksidaz, Katalaz gibi enzimler reaktif oksijen ürünlerine karşı antioksidan etki gösteren en bilinen enzimlerdir.[35,36,37]

Oksidasyon; sonucunda serbest radikaller açığa çıkartan bir kimyasal reaksiyon türüdür. Bu serbest radikaller bir dizi reaksiyon sonucunda hücrelere zarar verirler. Antioksidanlar diğer moleküllerin oksidasyonunu baskılayarak dolaylı olarak bu serbest radikallerin açığa çıkmasını engelleyen moleküllerdir.

1.5.1 Antioksidan Enzimlerin Bitkilerdeki Fonksiyonları

Reaktif oksijen türleri hücreler için toksiktir ancak aynı zamanda hücre içi sinyal yolaklarında görev alırlar. Bu ikili durumdan ötürü bitkiler hücre içi reaktif oksijen ürünlerini düzenlemek için iki farklı mekanizma geliştirmiştir. Bu mekanizmalar enzimatik olmayan ve enzimatik olan mekanizmalardır.[38] Bu sistemlere "antioksidan koruma mekanizmaları" adı verilir.

Bitkilerin maruz kaldıkları streslere mutlaka süperoksit anyon radikalleri (O2-), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali (OH-), peroksil radikali (HOO-) ve singlet oksijen (10 02) dahil olmak üzere reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu eşlik eder, makromoleküllerin peroksidasyonuna ve bozunmasına, hücre membranlarına zarar verilmesine ve sonuçta hücrelerin ölümüne neden olurlar.

Bitki dokuları reaktif oksijen ürünleri seviyesini kontrol etmek ve stres koşulları altında hücreleri korumak için, süperoksit dismutaz, askorbat peroksidaz, katalaz, glutatyon redüktaz, monodehidroaskorbat redüktaz, glutatyon peroksidaz, alternatif oksidaz ve dehidroaskorbat redüktaz ve detoksifıye edici lipid peroksidasyon ürünleri glutatyon S-transferaz ve fosfolipid-hidroperoksit glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimler bulundururlar.[39]

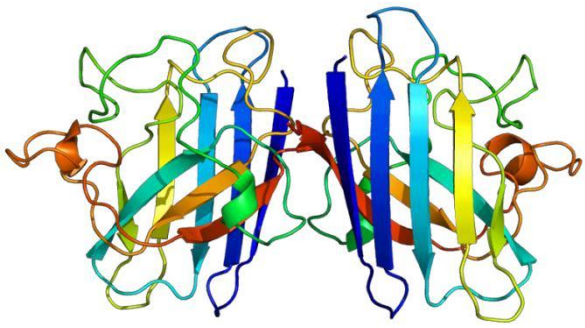
1.5.2 Süperoksit Dismutaz

Superoksit dismutazlar Süperoksit serbest radikalinin moleküler oksijen ve hidrojen peroksite H_2O_2 dismutasyonunu katalize eden metalloenzimlerdir.[40]

Aktif bölge ile etkileşim yapan bağlı metal kofaktörüne göre SOD'lar dört tipe ayrılabilir: demir (FeSOD), manganez (MnSOD), bakır / çinko (Cu / ZnSOD) ve nikel (NiSOD).[41] Farklı SODizoformların benzer işlevleri vardır, ancak farklı metal kofaktörlere, amino asit

dizilerine, kristal yapılara ve farklı subsellüler lokalizasyonlara sahiplerdir; ayrıca her biri ve in vitro H_2O_2 'ye farklı duyarlılık göstermektedir.[42]

Cu/ZnSOD tüm ökaryotik canlılarda ve bazı bakterilerde, çoğunlukla kloroplastlarda, sitoplazmada ve hücre dışı boşluklarda lokalizasyon göstermektedir.[43]



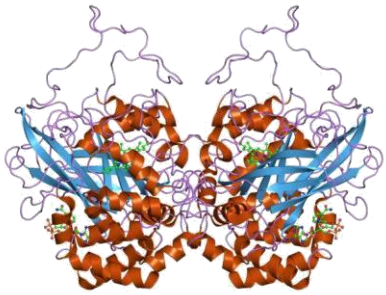
Şekil 1.4 Süperoksit Dismutaz enziminin 3 boyutlu yapısı

1.5.3 Katalaz

Katalaz, doğada oksijene maruz kalan hemen hemen tüm canlı organizmalarda bulunan yaygın bir enzimdir. Hidrojen peroksitin su ve oksijene ayrışmasını katalize eder.[44] Reaktif oksijen türleri ile hücrenin oksidatif hasarından korunmasında çok önemli bir enzimdir. Aynı şekilde katalaz, en yüksek verimli enzimlerden biridir; bir katalaz molekülü her saniye milyonlarca hidrojen peroksit molekülünü suya ve oksijene dönüştürür.[45]

Katalaz molekülü her biri 500 aminositten oluşan, 4 polipeptid zincirli bir tetramerdir.[46] Katalaz enzimi, hidrojen peroksit ile reaksiyona girmesine olanak veren 4 adet hem grubu içerir. Hem grupları demir içermektedir.

Katalaz genellikle peroksizom adı verilen hücresel bir organelde bulunmaktadır.[47] Bitki hücrelerindeki peroksizomlar, fotorespirasyon ve simbiyotik azot fiksasyonu ile ilgili yolaklarda görev alan enzimleri içerirler.

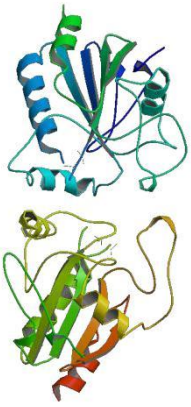


Şekil1.5 Katalaz enziminin 3 boyutlu yapısı

1.5.4 Peroksidaz

Peroksidazlar bir dizi oksidatif reaksiyonu katalizlemek için elektron alıcısı olarak hidrojen peroksit kullanan enzimlerdir. Bakteriler, mantarlar, hayvan vebitkilerde bulunurlar. Sınıf 3 peroksidazların dokuya spefisik birden fazla fonksiyonu vardır. Hidrojen peroksitin kloroplast ve sitozolden uzaklaştırılması, toksik bileşiklerin oksidasyonu, hücre duvarının biyosentezi, yaralanmaya karşı savunma tepkileri, etilen biyosentezi gibi. Peroksidazın geniş fonksiyonları sebebiyle substrata özgüllüğünde eksiklikler vardır. Bu açık peroksidaz izozimleriyle giderilmiştir.[48]

Bitki peroksidazları, 4 korunmuş disülfür köprüsü ve 2 kalsiyum iyonu içeren monomerikglikoproteinlerdir. Fıstık peroksidazının 3D yapısının, sınıf I ve II peroksidazlarla aynı helezon katına sahip olduğu gösterilmiştir. Bitkilerde istenmeyen koşullarda oksijen, süperoksit ve peroksit gibi reaktif oksijen ürünleri miktarında artış olur.[48] Reaktif oksijen türlerinin detoksifikasyonu bitki hücrelerinin ve organellerinin hayatta kalmasında çok önemli bir prosestir.[31]



Şekil 1.6 Peroksidaz enziminin 3 boyutlu yapısı

BÖLÜM 2

MATERYAL VE METOT

2.1 Kullanılan Kitler, Kimyasallar ve Tampon Çözeltiler

Çizelge 2.1 Kullanılan kitler, kimyasallar ve markaları

Kit ve Kimyasallar	**Marka**
TRizol	Invitrogen
Total RNA izolasyon Kiti	Qiagen
cDNA sentez Kiti	Jena Bioscience
Gerçek Zamanlı PCR Kiti	Jena Bioscience
Juglon	SIGMA- ALDRICH (H47003)
β-merkaptoetanol	SIGMA
Methionine	FLUKA (M0960000)
Riboflavin	FLUKA (1603006)
Nitro Blue Tetrazolium	SIGMA-ALDRICH (N5514)
Hydrogen peroxide	SIGMA (H1009)
Guaiacol	ALDRICH (W253200)
Sodium phosphate dibasic	SIGMA (S3264)
Sodium phosphate	ALDRICH (342483)
Sodium hydroxide	SIGMA-ALDRICH (221465)

2.1.1 Kullanılan Tampon Çözeltiler

2.1.1.1 Juglon çözeltilerinin hazırlanması

0,5 mM Juglon çözeltisi elde etmek için 87 mg Juglon hassas terazide tartıldı ve 1 L saf su içerisinde manyetik karıştırıcı kullanarak çözüldü. 0,25 mM Juglon çözeltisi elde etmek için 43,5 mg Juglon hassas terazide tartıldı ve 1 L saf su içerisinde manyetik karıştırıcı kullanarak çözüldü. 0,1 mM Juglon çözeltisi elde etmek için 21,75 mg Juglon hassas terazide tartıldı ve 1 L saf su içerisinde manyetik karıştırıcı kullanarak çözüldü. 0,01 mM Juglon çözeltisi elde etmek için 10,87 mg Juglon hassas terazide tartıldı ve 1 L saf su içerisinde manyetik karıştırıcı kullanarak çözüldü.

2.1.1.2 Tris Tamponu (Enzim ekstraksiyon Tamponu)

50 mM Tris-HCl tamponu: 0, 6055 g Tris 80 ml saf suda çözüldükten sonra üzerine 2 g SDS ve 2 ml β-merkaptoetanol çözeltisi ilave edilir. pH, NaOH çözeltisi kullanılarak 6.8'e ayarlanır. Toplam hacim saf su yardımıyla 100 ml'ye tamamlandı. Bu tampon bitki kök ve yaprak örneklerinden simplastik CAT, SOD, ASP enzim ekstraksiyonu esnasında kullanıldı.

2.1.1.3 Süperoksit Dismutaz Aktivite Tayininde Kullanılan Çözeltiler

50 mM KH_2PO_4 tamponu: 2.9 g KH_2PO_4 200 ml saf suda çözülmüş ve son hacmi 250 ml'ye tamamlanmıştır.

13 mM metionin çözeltisi; 0.485 g metionin, 250 ml, 50 mM KH_2PO_4 (pH: 7.8) tamponu içerisinde çözülerek hazırlandı.

75 mM NBT (Nitroblue Tetrazolium Klorür); 0.015 g NBT, 250 ml, 50 mM KH_2PO_4 (pH: 7.8) tamponu içerisinde çözülerek hazırlandı.

0.1 mM EDTA (Etilen daimin tetra asetikasit); 0.075 g EDTA, 250 ml, 50 mM KH_2PO_4 (pH: 7.8) tamponu içerisinde çözülerek hazırlandı.

2 mM riboflavin; 0.038 g riboflavin, 1 L saf suda çözülmüş, bu çözeltiden 2 mM oluşturmak için, bundan 60 ml alındı ve 3 ml'lik reaksiyon karışımına pipetlendi.

2.1.1.4 Katalaz Aktivite Tayininde Kullanılan Çözeltiler

103 mM KH_2PO_4 tamponu: 1.4 g KH_2PO_4, 80 ml saf suda çözülmüş, 1 N NaOH ile pH: 7.5'e kadar titre edilmiş ve son hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

40 mM H_2O_2 çözeltisi; 408 µl % 30'luk H_2O_2 hacmi saf su ile 100 ml'yle tamamlanarak hazırlandı.

2.1.1.5 Askorbat Peroksidaz Aktivite Tayininde Kullanılan Çözeltiler

Substrat çözeltisi; 0.068 g KH_2PO_4 80 ml saf suda çözülüp daha sonra üzerine 0.0059 g EDTA ve 0.0090 g askorbik asit ilave edildi ve iyice karıştırıldı. pH, 6,75'e ayarlandıktan sonra 8.6 µL H_2O_2 ilave edilerek son hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

2.2 Cihazlar

Çizelge 2.2 Kullanılan cihazlar ve markaları

Cihaz Adı	**Marka / Model**
Spektrofotometre	Shimadzu / UV-1800 240V
Gerçek Zamanlı PCR Cihazı	BIO-RAD /
Yatay Elektroforez Cihazı	BIO-RAD / Wide Mini-Sub Cell GT
Nanodrop Spekrofotometre	PCR Max / Lambda

2.3 Primerler

Çizelge 2.3 Real-time PCR'da kullanılan primerlerin dizi bilgileri

Gen Adı	Primer Dizisi
Cucumis Sativus Actin	ActF1: 5'-CCACGAAACTACTTACAACTCCATC-3' ActR1: 5'-GGGCTGTGATTTCCTTGCTC-3'
Cucumis Sativus 18S Ribosomal RNA	RibF1: 5'GGCGGATGTTGCTTTAAGGA-3' RibF2: 5'GTGGTGCCCTTCCGTCAAT-3'
Cucumis Sativus Katalaz	CATF1: 5' TCCACTGGAAACCAACTTGCGG 3' CATR1: 5'ACCAATCTCCCCACCGGCTGTA3'
Cucumis Sativus Superoksit dismutaz	SODF1:5´:GACTGGGCCACA TTTCAACC-3´ SODR1: 5´:GCCTTGCCATCTTCACCAA-3´
Cucumis Sativus Peroksidaz	PER F1: 5'TTGTAATAATGGCGGCTT3' PER1R: 5'GTGTCATAGAAGGTGGAG3'

2.4 Salatalık tohumlarının temin edilmesi ve juglon uygulamaları

Bu tez çalışmasında kullanılan salatalık tohumları Bursa'daki AGROMAR firmasından temin edilmiştir. Tohumların varyetesi Beith Alpha'dır.

2.4.1 Yüzey Sterilizasyonu

Tohumların yüzey sterilizasyonu için %10'luk Sodyum Hipoklorit (NaOCl) kullanılmıştır. Tohumlar 15 dakika %10'luk NaOCl çözeltisinde ara ara karıştırılarak bekletildikten sonra steril saf su ile yarım saat aralıklarla yıkandı ve NaOCl tamamen arındırıldıktan sonra çimlendirme aşamasına geçildi.

2.4.2 Çimlenme Ortamının Hazırlanması ve Çimlendirme

Kaba filtre kağıtları Petrilerin boyutlarında yuvarlak olarak kesildi ve tüm Petrilere ikili olarak yerleştirildi. Sterilizasyon işlemi tamamlanan tohumlar her bir Petriye 10 tane olacak şekilde pens yardımıyla yerleştirildi. Her bir uygulama üç kez tekrarlanmış ve her ekimde 150 olmak üzere toplamda 450 tohum kullanılmıştır.

Kontrol grubundaki tohumlara Juglon içermeyen steril su uygulandı. Deney grubundaki tohumlara ise gruplar halinde 0.01 mM, 0.1 mM, 0.25 mM ve 0.5 mM juglon çözeltileri her bir petriye 7.5 ml olacak şekilde eklendi.

Aynı gruptan Petriler üçerli olarak alimünyum folyo ile sarıldı ve karanlık ortamda 27°C'de 11 gün boyunca çimlenmeye bırakıldı.

2.4.3 Çimlenme yüzdesi ve fidelerin kök-gövde uzunluklarının belirlenmesi

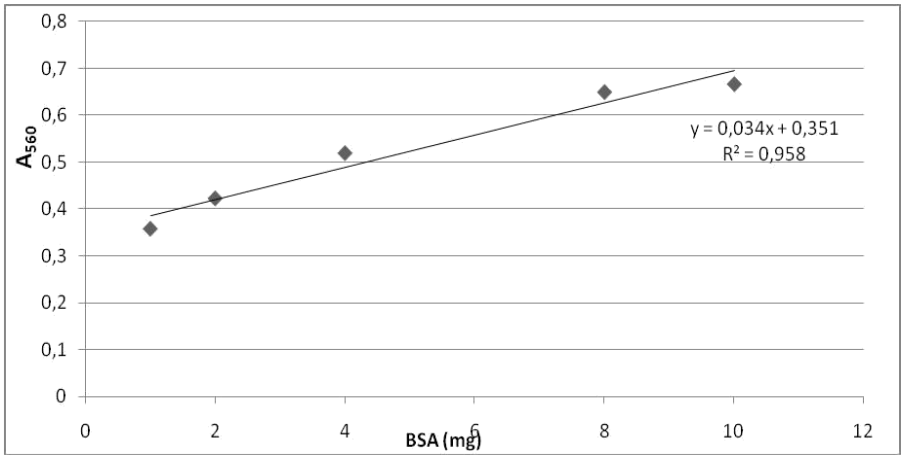
Çimlenmeye bırakılan tohumlar 11 günün sonunda ölçüm için Petrilerden toplandı. Kontrol grubu ve deney grubu ayrı olmak üzere tüm tohumların gövde ve kök uzunlukları ölçüldü. Her bir grup için tohumların çimlenme yüzdesi belirlendi. Yapraklar ve kökler sonraki çalışmalar için -80°C'de saklandı.

2.5 Enzim ekstraksiyonuve protein miktarı tayini

Enzim ekstraksiyonu için pH:6.8 olan Tris tamponu hazırlandı. Yaprak ve kökler 0.5 g olarak tartıldıktan sonra havanda sıvı azot yardımıyla küçük parçalara ayrıldı. Kullanılan her 0,5 g yaprak ve kök için 5 ml ekstraksiyon tamponu eklendi ve tortu kalmayacak şekilde havanda homojenize edildi. Homojenatlar filtre kağıtlarında süzüldü. Süzülen sıvı 10 dakika 10000 rpm'de +4°C'de santrifüj yapıldı. Süpernatantlar yeni tüplere aktarıldı ve enzim aktivite tayini çalışmalarında kullanılmak üzere -80°C'de saklandı.

Protein miktarı tayininde aşağıdaki BSA standart grafiği hazırlanmış ve bunun üzerinde miktar tayini yapılmıştır.

Şekil 2.1 Kullanılan BSA standart grafiği



2.6 Enzim aktivite ölçümleri

Enzim aktivite ölçümleri spektrofotometrik yöntemler kullanılarak gerçekleştirildi. Her bir enzim için kendi substratı kullanıldı ve aktivite ölçümleri yapıldı.

2.6.1 Katalaz Aktivite Ölçümü

Katalaz enzim aktivitesinin ölçümü substratı olan Hidrojen Peroksit'in (H2O2) parçalanarak miktarının değişiminin belirlenmesi esasına dayanır. H2O2'nin O2 ve H2O'ya dönüşümünde meydana gelen absorbans düşmesinin 240 nm dalga boyunda ölçümü esas alınır.[49]

Aktivite ölçümü için 0.7 ml'lik spektrofotometre küvetine, 103 mM KH_2PO_4 tamponundan 324 ul ve 40 mM'lık H_2O_2 substrat çözeltisinden 350 ul konulduktan sonra, 6 µl enzim ekstraktı ilave edilir. Küvet spektrofotometreye yerleştirildikten sonra 240 nm de 0. saniye ve 3. dakika ölçümleri kinetik olarak yapıldı.

2.6.2 Süperoksit Dismutaz Aktivite Ölçümü

Süperoksit Dismutaz nitroblue tetrazolium klorürün (NBT) indirgenmesini engelleyen bir enzimdir. Bir birim SOD; NBT redüksiyonun maksimum inhibisyonunun yarısına neden olan enzim miktarı olarak tanımlanır.[50]

Reaksiyon karışımı (1ml); 50 mM KH_2PO_4 (pH: 7.8), 13 mM metiyonin, 63 µM NBT ve 0.1 mM EDTA içermektedir. SOD aktivite ölçümü için 700 ul'lik spektrofotometre küvetlerine 602ul karışım, 91 ul riboflavin ve 7ul enzim ekstraktından eklendi. 15 dakika boyunca beyaz bır ışık kaynağında bekletildi. 15 dk sonunda 560 nm dalga boyunda spektrofotometrede okuma yapıldı. Kör olarak aynı karışımın örneksiz hali kullanıldı. SOD aktivitesinin 1 ünitesi, 560 nm 'de gözlenen NBT indirgenmesinin % 50 inhibisyonuna neden olan enzim miktarı, 1 enzim ünitesi olarak kabul edilir.[49]

2.6.3 Askorbat Peroksidaz Aktivite Ölçümü

Spektrofotometre küvetlerine 677ul substrat çözeltisinden eklendi. Üzerine 23 ul enzim ekstraktından eklendi. Spektrofotometrede 290nm'de 0. saniye ve 3. dakika ölçümleri kinetik olarak yapıldı. Kör olarak enzim ekstraktı içermeyen substrat çözeltisi kullanıldı. 1 dakikada, absorbansı 0.0023 artıran enzim miktarı 1 enzim ünitesi olarak kabul edilirek hesaplamalar yapıldı.[49]

2.7 Total RNA izolasyonu ve temizlenmesi

Total RNA izolasyonu TRIzol™ Reagent kullanılarak; kılavuzdaki protokole göre yapıldı. Çimlenme sonrası ayrılan kök ve yaprak örnekleri havan ve sıvı azot kullanılarak parçalandı. Sonrasında aşağıdaki protokol izlendi.

1- Homojenize edilen her 50-100 mg doku üzerine 1 ml TRIzol™ Reagent eklendi. Pipetaj yapılarak doku ve solüsyonun karışması sağlandı.

2- Karışım 12,000 xg +4°C'de 10 dk santrifüj yapıldı. Süpernatant yeni tüplere aktarıldı.

3- Yeni tüplere aktarılan süpernatant üzerine; protokol başında kullanılan her 1 ml TRIzol™ Reagent için 0,2 ml kloroform eklendi. Yaklaşık 15 sn boyunca tüpler çalkalandı.

4- Karışım oda sıcaklığında 2-3 dk inkube edildi.

5- Karışım 12,000 xg +4°C'de 15 dk santrifüj yapıldı. Tüp içinde 3 faz gözlemlendi: altta kırmızı fenol-kloroform fazı, ortada ince beyaz faz ve üstte renksiz faz.

6- Üstteki renksiz faz yeni tüplere aktarıldı.

7- Yeni tüplere aktarılan renksiz üst faz üzerine; protokol başında kullanılan her 1 ml TRIzol™ Reagent için 0,5 ml %100 izopropanol eklendi ve oda sıcaklığında 10 dk inkube edildi.

8- Karışım 12.000 xg +4°C'de 10 dk santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası tüplerin altında beyaz renkli RNA pelletleri gözlemlendi.

9- Süpernatant tamamen aspire edildi. Tüplerde sadece RNA pelleti bırakıldı.

10- Pellet üzerine protokol başında kullanılan her 1 ml TRIzol™ Reagent için 1 ml %75 etanol eklendi.

11- Tüpler kısa süre vortex yapıldı ve pelletlerin tüp dibinden kalıdırılması sağlandı.

12- Yıkanan pelletler 7500 xg +4°C'de 5 dk santrifüj yapıldı. Süpernatant dökülerek uzaklaştırıldı.

13- Alkolün uçması için 5-10 dk tüpler filtre kağıdı üzerinde ters çevrilerek açık olarak bekletildi.

14- Pelletler üzerine 40 ul RNase-free su eklenerek RNAların çözünmesi sağlandı.
Örnekler sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -80°C'ye kaldırıldı.

2.8 Komplementer DNA sentezi (cDNA)

RNA eldesinden sonra diğer işlem olan cDNA işlemi için hazır ticari kitler kullanıldı. Jena Bioscience firmasının (Alman menşeili Cat no: PCR511) script cDNA sentez kiti kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirildi. Tüm işlemler buz üzerinde çalışıldı.

1- cDNA sentezi öncesi tüm RNA konsantrasyonları 100ng/ul olacak şekilde eşitlendi.

2- Toplam hacim 20 ul olacak şekilde reaksiyon örnek başına aşağıdaki gibi gerçekleştirildi.

RNAse free su……. 10 ul

Script RT buffer..... 4 ul

dNTP mix ..... 1 ul

Oligo dT Primer..... 0.5 ul

DTT ..... 1 ul

RNAse Inhibitor ..... 1 ul

Enzim ..... 0.5 ul

RNA ürün……..2 ul

3- Enzim eklemeden önce tüpe konulan tüm reaktifler birkaç kez pipet ile karıştırıldı.

Tüm reaktifler ve örnek tüpe konulduktan sonra tüpler Bio-Rad termal cycler cihazına konularak cDNA reaksiyonu aşağıda belirtilen sıcaklık ve sürelerde gerçekleştirildi.

50 derecede ⟶ 60 dakika

42 derecede ⟶ 10 dakika

70 derecede ⟶ 10 dakika

Bu süre sonunda elde edilen cDNA real time PCR'da kullanılmak üzere -20 derecede saklandı.

2.9 Gerçek Zamanlı PCR Analizleri

cDNA eldesinden sonra diğer işlem olan Gerçek Zamanlı PCR (Qpcr) işlemi için hazır ticari kitler kullanıldı. Jena Bioscience firmasının (Alman menşeili Cat no: PCR306) qPCR GreenMaster with UNG/lowROX kiti kullanılarak Real time PCR gerçekleştirildi. Tüm işlemler buz içerisinde gerçekleştirildi.

Toplam hacim 20 ul olacak şekilde gerçekleştirildi.

PCR grade Su…….. 6.8 ul

Real Time Master Mix..... 10 ul

Forward Primer..... 0.6 ul

Reverse Primer..... 0.6 ul

cDNA ürün…… 2 ul

Daha sonra 96 well plate içine konulan standart ve örnek karışımları Biorad CFX Connect cihazına konularak reaksiyon aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi.

50 derecede ⟶ 2 dakika

95 derecede ⟶ 2 dakika

95 derecede ⟶ 15 saniye

55 derecede ⟶ 40 saniye

72 derecede ⟶ 30 saniye

40 siklus

Gerçek Zamanlı PCR reaksiyonu gerçekleştirildikten sonra, cT değerleri kullanılarak kontrol grubu ve juglon uygulanmış örnekler için SOD, CAT, APX enzimlerinin ekspresyon hesaplamaları yapıldı. Kontrol olarak Aktin ve 18S Ribozomal RNA genleri kullanıldı. Kat değişimi (foldchange) hesaplamak amacıyla karşılaştırmalı CT metodu kullanılarak ΔCT ve 2-ΔΔCT hesaplandı.

2.10 İstatistik Analizler

Bu araştırma üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Üç tekrara ait verilerin ortalama değerleri tablo ve grafiklerde gösterilmiştir. Juglon konsantrasyonlarının etkilerinin gen seviyesinde ve aktivasyon düzeyindeki verileri korelasyon testleri ile karşılaştırılmıştır.[57]

BÖLÜM 3

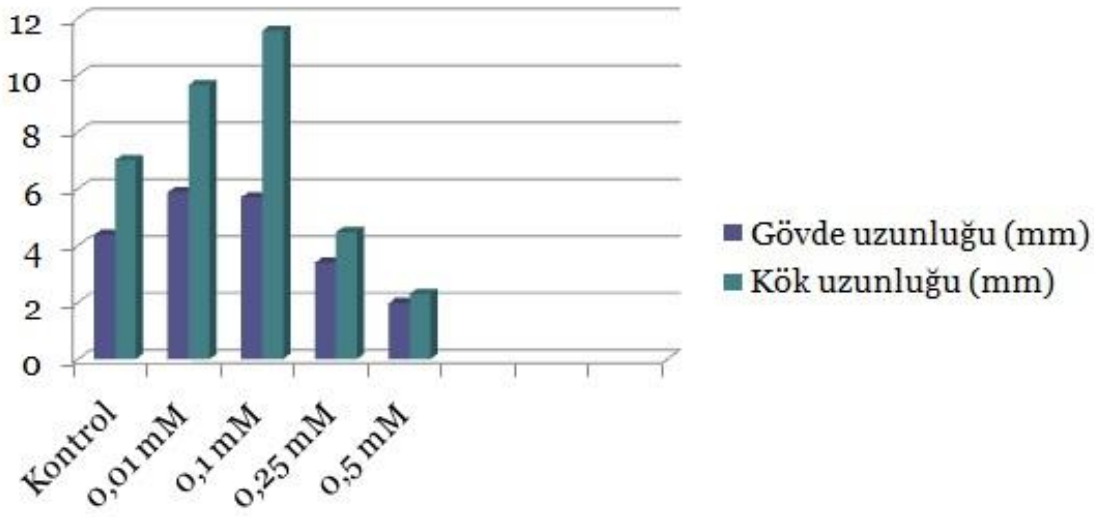
ARAŞTIRMA BULGULARI

3.1 Bitkilerin kök ve gövde uzunlukları

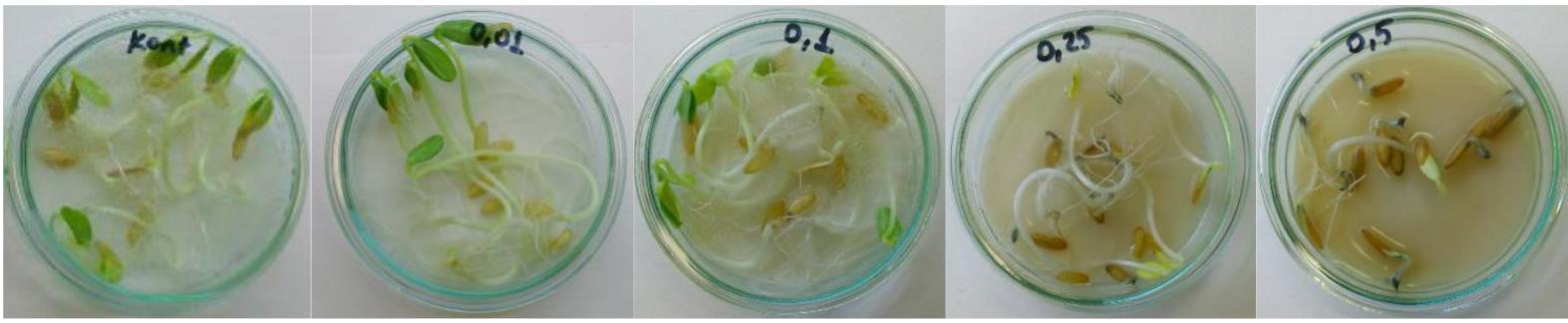
0,01 mM juglon çözeltisine maruz kalan tohumların kök uzunluğu kontrole kıyasla 2,64cm; gövde uzunluğu 1,5 cm daha uzun ölçülmüştür. Ancak çimlenme yüzdesi kontrole oranla %9 daha düşüktür. 0,1 mM juglon çözeltisine maruz kalan tohumların kök uzunluğu kontrole kıyasla 4,55 cm; gövde uzunluğu 1,32 cm daha uzun ölçülmüştür. Çimlenme yüzdesi kontrole oranla değişmemiştir. 0,25 mM juglon çözeltisine maruz kalan tohumların kök uzunluğu kontrole kıyasla 2,54 cm; gövde uzunluğu 0,98 cm daha kısa ölçülmüştür. Çimlenme yüzdesi kontrole oranla değişmemiştir. 0,5 mM juglon çözeltisine maruz kalan tohumların kök uzunluğu kontrole kıyasla 4,71 cm; gövde uzunluğu 2,4 cm daha kısa ölçülmüştür. Çimlenme yüzdesi kontrole oranla %7 düşmüştür (Çizelge 3.1, Şekil 3.1) . Yetiştirilen salatalık tohumlarının Petrideki görüntüleri Şekil 3.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1 Juglonun kök ve gövde uzunluklarına etkisi

Juglon (mM)	Kök Uzunluğu (cm)	Gövde Uzunluğu (cm)	Çimlenme Yüzdesi
Kontrol	7,00	4,37	82
0,01	9,64	5,87	73
0,10	11,55	5,69	83
0,25	4,46	3,39	81
0,50	2,29	1,97	75



Şekil 3.1 Juglonun büyüme parametreleri üzerine etkisi



Şekil 3.2 Yetiştirilen salatalık tohumlarının Petrilerdeki fotoğraflar, soldan sağa, Kontrol, 0,01 Mm, 0,1 Mm, 0,25 Mm, 0,5 mM

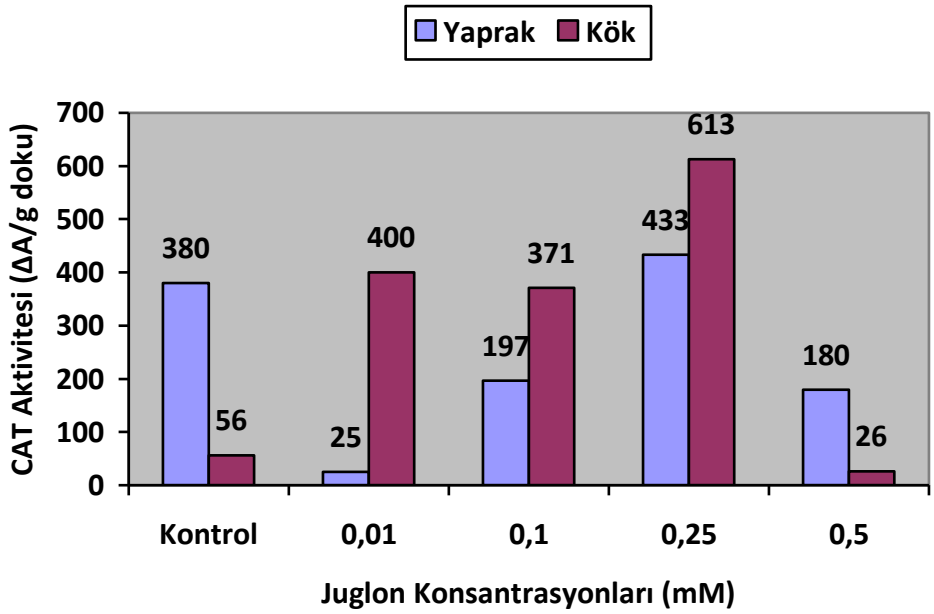
3.2 Enzim Aktiviteleri

Enzimlerin aktiviteleri hazırlanan BSA grafiği baz alınarak ortamdaki miktarları kontrol örneğiyle kıyaslanarak olarak belirlenmiştir.

3.2.1 Katalaz

0,01 mM Juglon uygulanmış tohumların fide yapraklarında CAT aktivitesi kontrole oranla büyük oranda düşmüştür. Uygulanan Juglonun konsantrasyonu arttıkça aktivitede kademeli olarak artış gözlemlenmiştir. Yapraklarda en yüksek aktivite 0,25 mM Juglon uygulanan grupta gözlemlenmiştir. 0,5 mM Juglon çözeltisine maruz kalan tohuların yapraklarında ise kontrole oranla düşüş gözlemlenmiştir.

0,01 mM Juglon uygulanmış tohumların fide köklerinde CAT aktivitesi kontrole oranla büyük ölçüde artmıştır. 0,1 mM Juglon uygulanmış tohumların fide köklerinde ise CAT aktivitesi kontrole oranla artış gözlenirken 0,01 mM'a göre düşük miktarda bir azalma gözlemlenmiştir. 0,25 mM konsantrasyon uygulanan grupta ise yapraklardaki aktivite ile korelasyonlu olarak en yüksek aktivite gözlemlenmiştir. Yine yaprakla korelasyonlu olarak 0,5 mM Juglon'a maruz bırakılan tohumların fide köklerinde CAT aktivitesi kontrole oranla düşmüştür. (Şekil 3.3)

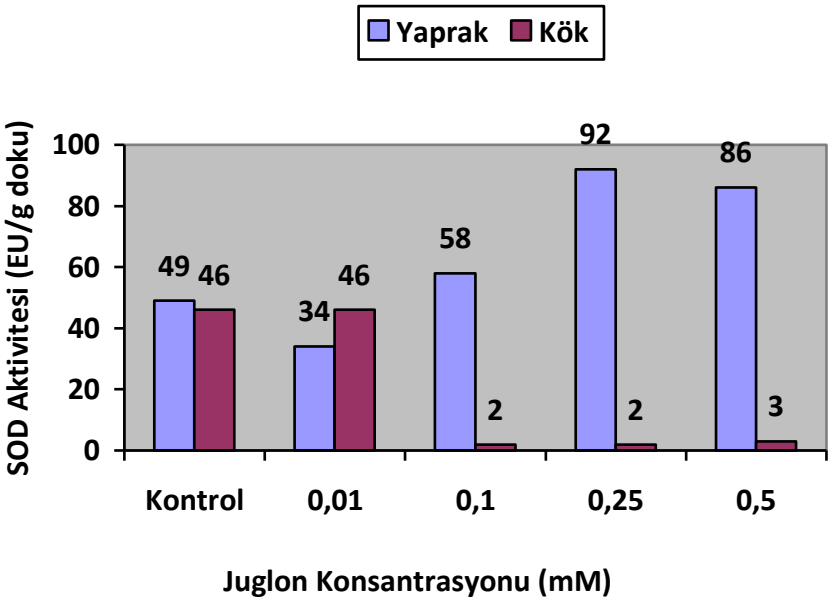


Şekil 3.3 Juglon'a maruz kalan tohumların kök ve yapraklarındaki CAT aktivitesi değerleri

3.2.2 Süperoksit Dismutaz

0,01 mM Juglon uygulanmış tohumların fide yapraklarında SOD aktivitesi kontrole oranla küçük oranda düşmüştür. Uygulanan Juglonun konsantrasyonu arttıkça aktivitede kademeli olarak artış gözlemlenmiştir. Yapraklarda en yüksek aktivite 0,25 mM Juglon uygulanan grupta gözlemlenmiştir. 0,5 mM Juglon çözeltisine maruz kalan tohumların yapraklarında ise SOD aktivitesinde kontrole oranla büyük oranda artış olurken 0,25 mM grubuna göre küçük bir düşüş gözlemlemiştir.

0,01 mM Juglon uygulanmış tohumların fide köklerinde, SOD aktivitesinde kontrole oranla bir değişiklik gözlemlenmemiştir. 0,1 mM, 0,25 mM, 0,5 mM Juglon uygulanmış tohumların fide köklerinde ise SOD aktivitesi kontrole oranla büyük ölçüde düşmüştür. Bu gruplarda SOD aktivitesi durma noktasına gelmiştir. (Şekil 3.4)

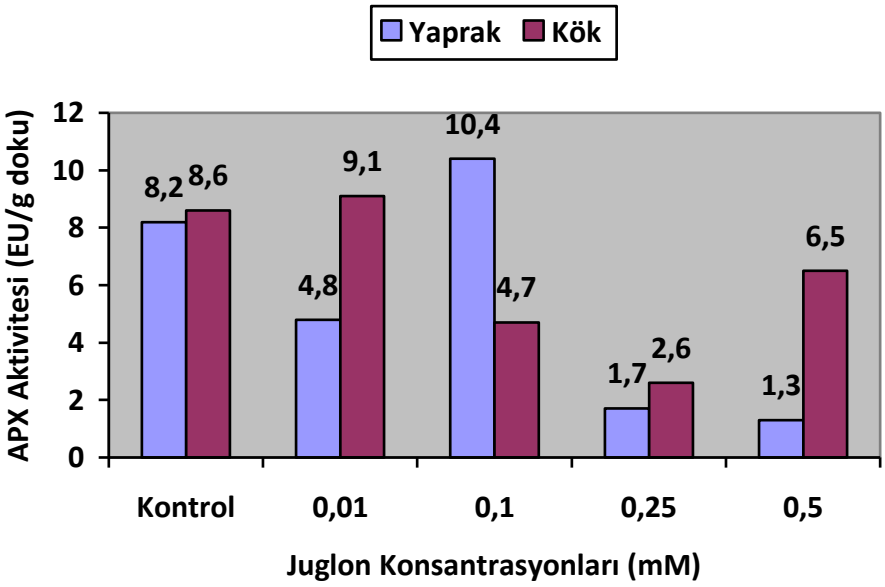


Şekil 2.4 Juglon'a maruz kalan tohumların kök ve yapraklarındaki SOD aktivitesi değerleri

3.2.3 Askorbat Peroksidaz

0,01 mM Juglon uygulanmış tohumların fide yapraklarında APX aktivitesi kontrole oranla düşmüştür. Yapraklarda en yüksek aktivite 0,1 mM Juglon uygulanan grupta gözlemlenmiştir. 0,25 mM Juglon çözeltisine maruz kalan tohumların yapraklarında ise APX aktivitesinde kontrole oranla büyük oranda düşüş göstermiş; 0,5 mM grubunda bu düşüş devam etmiştir.

0,01 mM Juglon uygulanmış tohumların fide köklerinde APX aktivitesi kontrole oranla artmıştır. 0,1 mM ve 0,25 mM Juglon uygulanmış tohumların fide köklerinde ise APX aktivitesinde kontrole oranla düşüş gözlenirken 0,5 mM Juglon uygulanmış tohumların fide köklerinde kontrole göre daha az aktivite gözlense de bu konsantrasyon 0,1 mM ve 0,25 mM gruplarında daha fazla APX aktivitesi oluşturmuştur. (Şekil 3.5)



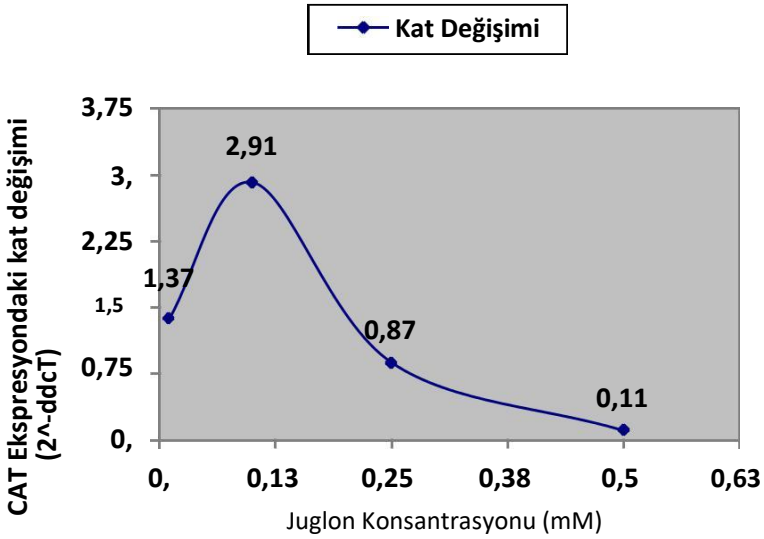
Şekil 3.5 Juglon'a maruz kalan tohumların kök ve yapraklarındaki APX aktivitesi değerleri

3.3 Gerçek Zamanlı PCR bulguları

Gerçek zamanlı pcr reaksiyonları sonucunda elde edilen Ct değerleri kullanılarak ΔCT ve 2^ΔΔCT değerleri hesaplandı. Hesaplamalar yapılırken kullanılan 2 housekeeping genlere ait cT değerlerinin ortalaması esas alındı. Bu değer; farklı konsantrasyonlarda juglon uygulanan tohumlardaki belirlenen bölgelerdeki ekspresyonların kat değişimi olarak değerlendirildi.[51]

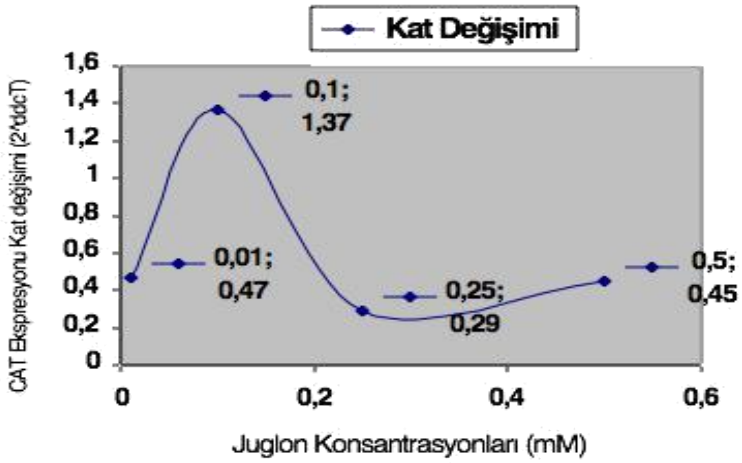
3.3.1 Katalaz Geninin Ekspresyon Analizi

0,01 mM Juglon'a maruz bırakılan tohumların fide yapraklarında CAT ekspresyonu kontrole göre 1,37 kat artmıştır. Yapraklarda en yüksek CAT ekspresyonu 0,1 mM Juglon uygulanan grupta gözlemlenmiştir ve ekspresyon kontrole göre 2,91 kat artmıştır. 0,25 mM ve 0,5 mM Juglon çözeltisine maruz kalan tohumların yapraklarında ise kontrole oranla düşüş gözlemlenmiştir. En düşük ekspresyon 0,5 mM grubunda gözlemlenmiştir ve ekspresyon kontrole göre 9 kat düşmüştür (Şekil 3.6).



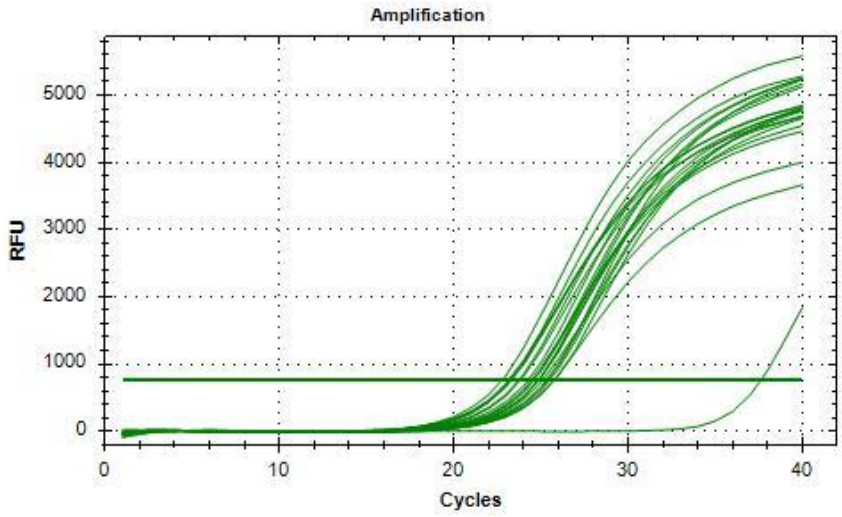
Şekil 3.6 Yapraklardaki CAT ekspresyonu değişimi

0,01 mM Juglon uygulanmış tohumların fide köklerinde CAT ekspresyonu kontrole oranla 2.1 kat düşmüştür. 0,1 mM Juglon uygulanmış tohumların fide köklerinde en yüksek CAT ekspresyonu gözlemlenmiş ve ekspresyon 1,37 kat artmıştır. En düşük ekspresyon 0,25 mM grubunda gözlemlenmiştir. 0,5 mM Juglon'a maruz bırakılan tohumların fide köklerinde CAT ekspresyonu kontrole oranla 2,2 kat azalmış; 0,25 mM grubuna göre artmıştır (Şekil 3.7).

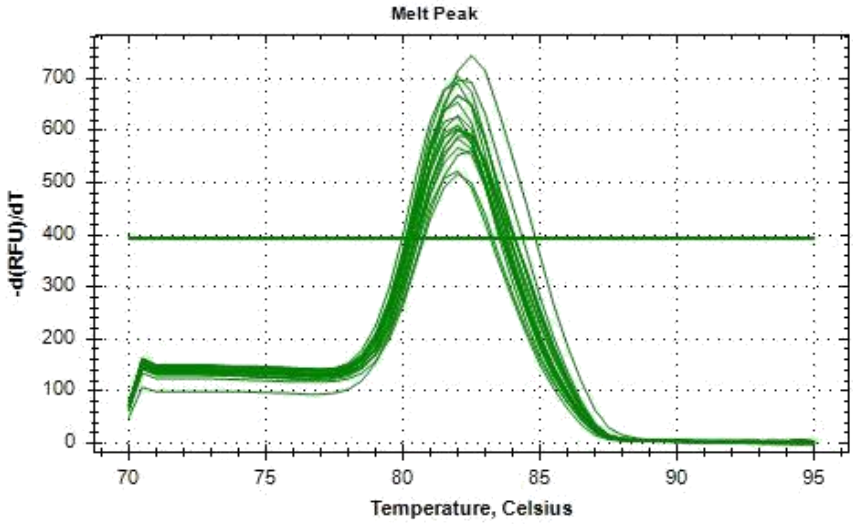


Şekil 3.7 Köklerdeki CAT ekspresyonu değişimi

CAT ekspresyonuna ait cihazdan alınan amplifikasyon ve erime eğrisi görüntüleri alınarak reaksiyon sırasında CAT genine ait tek gen bölgesinin çoğaldığı gösterilmiştir (Şekil 3.8, Şekil 3.9)



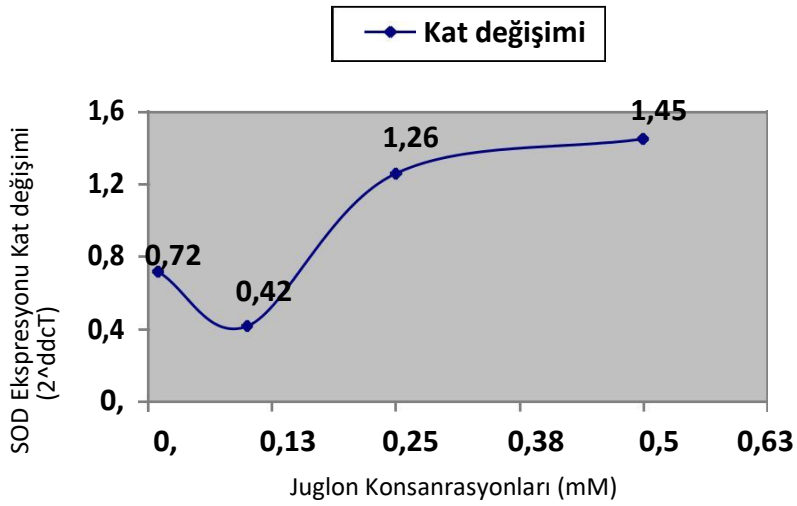
Şekil 3.8 CAT geninin amplifikasyon eğrisi



Şekil 3.9 CAT genine ait erime noktası eğrisi

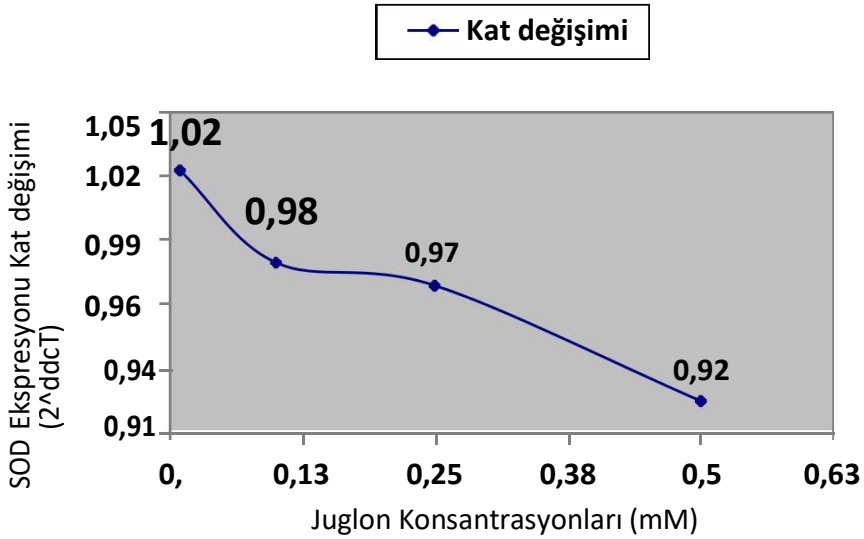
3.3.2 Süperoksit Dismutaz Geninin Ekspresyon Analizi

0,01 mM Juglon'a maruz bırakılan tohumların fide yapraklarında SOD ekspresyonu kontrole göre 1,38 kat düşmüştür. 0,1 mM Juglon çözeltisine maruz kalan tohumların yapraklarında kontrole oranla 2.38 kat düşüş gözlemlenmiştir. Artan dozlarda SOD ekspresyonunun arttığı gözlemlenmiştir. Yapraklarda en yüksek SOD ekspresyonu 0,5 mM Juglon uygulanan grupta gözlemlenmiştir ve ekspresyon kontrole göre 1,45 kat artmıştır (Şekil 3.10).



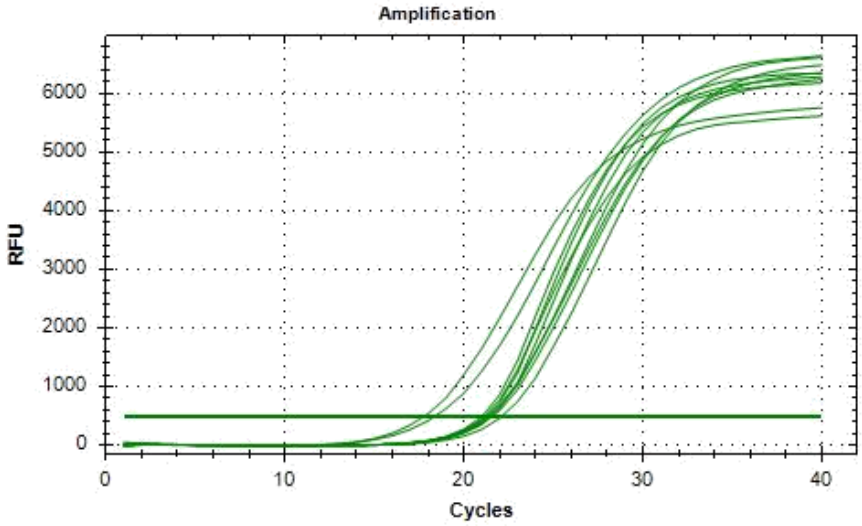
Şekil 3.10 Yapraklardaki SOD ekspresyonu değişimi

0,01 mM Juglon uygulanmış tohumların fide köklerinde SOD ekspresyonu kontrole oranla büyük değişiklik göstermemiştir. Uygulanan juglon konsantrasyonu arttıkça SOD ekspresyonu giderek düşmüştür. En düşük ekspresyon 0,5 mM grubunda gözlemlenmiştir. 0,5 mM Juglon'a maruz bırakılan tohumların fide köklerinde SOD ekspresyonu kontrole oranla 1,08 kat düşmüştür (Şekil 3.11)

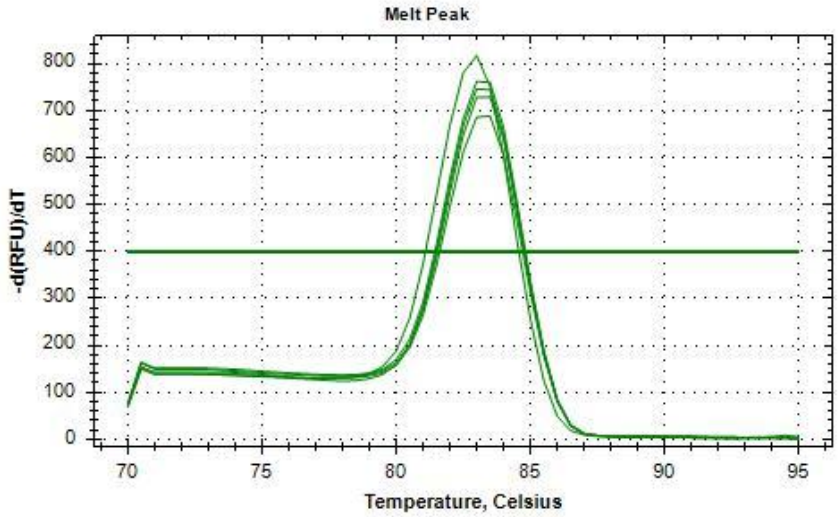


Şekil 3.11 Köklerdeki SOD ekspresyonu değişimi

SOD ekspresyonuna ait cihazdan alınan amplifikasyon ve erime eğrisi görüntüleri alınarak reaksiyon sırasında SOD genine ait tek gen bölgesinin çoğaldığı gösterilmiştir (Şekil 3.12, Şekil 3.13)



Şekil 3.12 SOD geninin amplifikasyon eğrisi

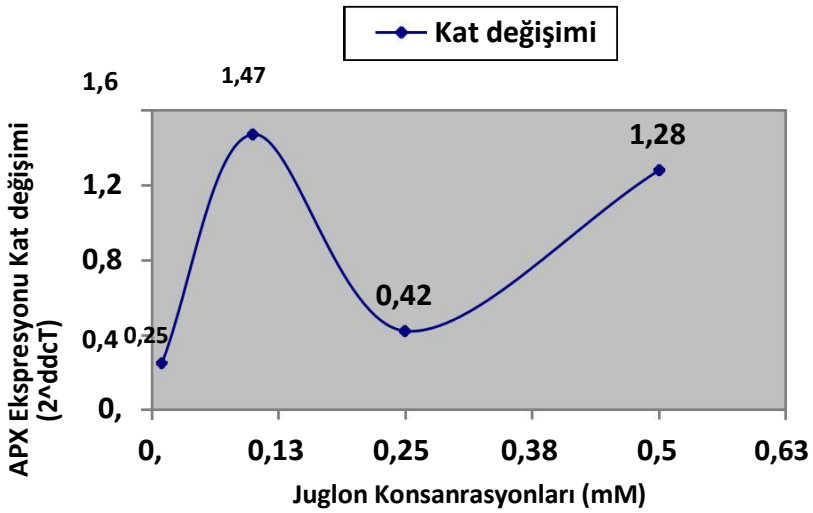


Şekil 3.13 SOD genine ait erime noktası eğrisi

3.3.3 Askorbat Peroksidaz Geninin Ekspresyon Analizi

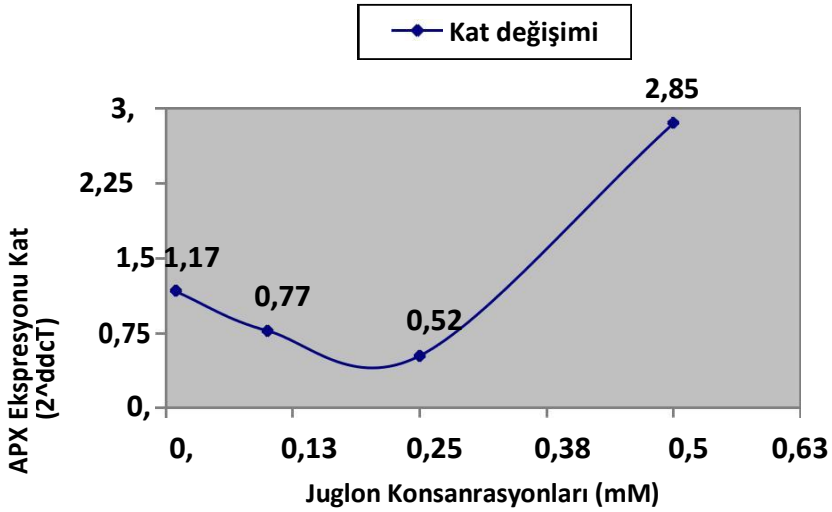
0,01 mM Juglon'a maruz bırakılan tohumların fide yapraklarında APX ekspresyonu kontrole göre 4 kat düşmüştür. Yapraklarda en yüksek APX ekspresyonu 0,1 mM Juglon uygulanan grupta gözlemlenmiştir ve ekspresyon kontrole göre 1,47 kat artmıştır. 0,25 mM Juglon çözeltisine maruz kalan tohumların yapraklarında ise kontrole oranla 2,38

kat daha düşük APX ekspresyonu gözlemlenmiştir. 0,5 mM grubunda kontrole oranla 1,28 kat ekspresyon artışı gözlemlenmiştir (Şekil 3.14)



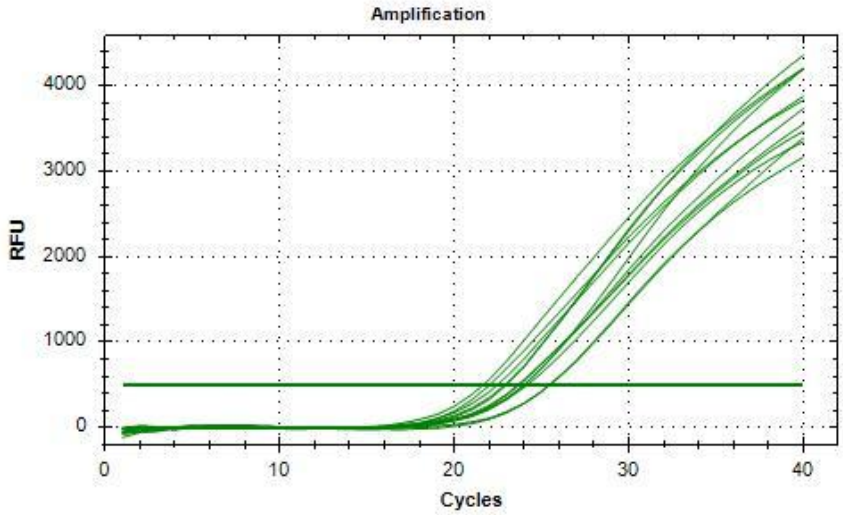
Şekil 3.14 Yapraklardaki APX ekspresyonu değişimi

0,01 mM Juglon uygulanmış tohumların fide köklerinde APX ekspresyonu kontrole oranla 1,17 kat artmıştır. 0,1 mM Juglon uygulanmış tohumların fide köklerinde ekspresyon 1,29 kat düşmüştür. En düşük ekspresyon 0,25 mM grubunda gözlemlenmiş ve 1,92 kat düşmüştür. Diğer enzimlerde gözlemlenenlerden farklı olarak 0,5 mM Juglon'a maruz bırakılan tohumların fide köklerinde APX ekspresyonu ani bir artış göstermiş ve kontrole oranla 2,85 kat artmıştır (Şekil 3.15)

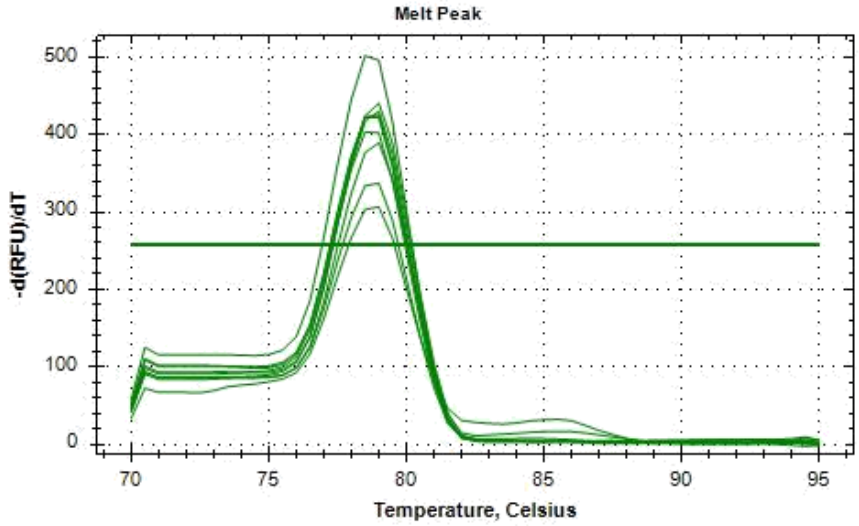


Şekil 3.15 Köklerdeki APX ekspresyonu değişimi

APX ekspresyonuna ait cihazdan alınan amplifikasyon ve erime eğrisi görüntüleri alınarak reaksiyon sırasında APX genine ait tek gen bölgesinin çoğaldığı gösterilmiştir (Şekil 3.16, Şekil 3.17)



Şekil 3.16 APX genine ait amplifikasyon eğrisi



Şekil 3.17 APX genine ait erime noktasi eğrisi

3.4 Korelasyonlar

Çizelge 3.2 Morfolojik ölçümler ile enzim aktiviteleri arasındaki korelasyon

Morfoloji	CAT Aktivitesi - Kök	CAT aktivitesi - Yaprak	SOD Aktivitesi - Kök	SOD Aktivitesi- Yaprak	APX Aktivitesi - Kök	APX Aktivitesi - Yaprak
Çimlenme (%)	-0,344	0,321	-0,275	0,178	-0,492	0,570
Kök Uzunluğu	-0,053	0,310	0,313	-0,761	0,218	0,833**
Gövde Uzunluğu	0,060	0,159	0,472	0,826*	0,297	0,733

Tablodaki değerler korelasyon katsayısıdır.

**Korelasyon 0,01 seviyesinde önemli.
* Korelasyon 0,05 seviyesinde önemli.

Çizelge 3.3 Morfolojik ölçümler ile gen ifadeleri arasındaki korelasyon

Tablodaki değerler korelasyon katsayısıdır.

Morfoloji	CAT gen ifadesi - Kök	CAT gen ifadesi - Yaprak	SOD gen ifadesi - Kök	SOD gen ifadesi - Yaprak	APX gen ifadesi - Kök	APX gen ifadesi - Yaprak
Çimlenme (%)	0,633	0,483	0,056	-0,263	-0,606	0,417
Kök Uzunluğu	0,686	0,915 *	0,731	-,995 **	0,584	0,038
Gövde Uzunluğu	0,523	0,812	0,868	0,941*	-0,652	0,198

**Korelasyon 0,01 seviyesinde önemli.
* Korelasyon 0,05 seviyesinde önemli.

Çizelge 3.4 Enzim aktiviteleri ile gen ifadeleri arasındaki korelasyon

Aktivite	CAT gen ifadesi Kök	CAT gen ifadesi Yaprak	SOD gen ifadesi Kök	SOD gen ifadesi Yaprak	APX gen ifadesi Kök	APX gen ifadesi Yaprak
CAT aktivitesi - Kök	-0,239	0,374	-0,806**	-0,273	-0,707	0,574
CAT aktivitesi- Yaprak	-0,006	-0,201	-0,165	0,400	-0,386	0,040
SOD aktivitesi- Kök	0,032	-0,071	0,765*	-0,233	-0,159	-0,440
SOD aktivitesi- Yaprak	-0,416	-0,447	-0,835**	0,714	0,262	0,181
APX aktivitesi- Kök	0,102	-0,144	0,451	-0,170	0,294	-0,104
APX aktivitesi- Yaprak	0,952**	0,825**	0,522	-0,845**	-0,470	0,440

Tablodaki değerler korelasyon katsayısıdır.

**Korelasyon 0,01 seviyesinde önemli.
* Korelasyon 0,05 seviyesinde önemli.

BÖLÜM 4

SONUÇ VE TARTIŞMA

Juglonun salatalıkta tohum çimlenmesine etkisi hakkında, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, farklı konsantrasyonları farklı etkiler oluşturduğu görülmüştür. 0,01 mM juglon konsantrasyonu kök ve gövde uzamasını olumlu etkilerken özellikle 0,25 ve 0,50 mM juglon konsantrasyonları hem kök hemde gövde uzamasını engellemiştir. Kök uzaması gövdeye göre daha olumsuz etkilenmiştir.0,25 mM juglon kontrole göre yaklaşık %50 oranında ve 0,5 mM juglon ise %70 oranında kök uzamasını azaltmıştır. Kök ve gövde uzunluklarını etkileme açısından pozitif korelasyon tespit edilmiştir.

Yapılan korelasyon testleri sonucunda özellikle kök uzunluğu ile APX enziminin aktivasyonu, CAT ve SOD enzimlerinin gen ifadeleri arasında pozitif korelasyon tespit edilmiştir. Bu durum; bitkinin kök uzunluğu arttıkça maruz kaldığı juglonun artması ve dolaylı olarak da antioksidan enzimlerin ekspresyonunun artması ile ilişkilendirilebilir.

Yapılan çalışmalar allelokimyasallara maruz kalan bitkilerde oksidatif hasarın arttığını; bu hasarın artması sonucunda da antioksidan enzim aktivitelerinde ve gen ifadelerinde artış olduğunu göstermiştir.[58] Bizim çalışmamızdaki veriler de bunu juglonun belli bir konsantrasyonuna kadar desteklemiştir. Özellikle SOD enziminin yapraktaki aktivite değerleri salatalık bitkisinin allelokimyasalların yarattığı oksidatif hasarla bir konsantrasyona kadar mücadele ettiğini ancak 0,25 mM ve 0,5 mM konsantrasyonlarının bitkide yarattığı ve morfolojik olarak da gözlemlenen hasardan dolayı oksidatif hasarla mücadelede üretilen antioksidan enzimlerin üretilmediğini ya da aktivasyonunun sıfır düzeyine düştüğü gözlemlenmiştir.

Bir diğer allelokimyasal çalışması sonucunda da yüksek konsatrasyonlarda bitki büyüme gelişmesi baskılandığından antioksidan enzim aktivitesinde ve gen ifadelerinde düşüş gözlemlenirken; düşük konsantrasyonlarda allelokimyasala maruz kalan bitkilerde bitki savunma sisteminin daha aktif olduğu ve antioksidan enzim seviyesinde artış gözlemlenmiştir.[59] Bu çalışma verileri ile bizim çalışmamızın verileri ile uyumluluk göstermiştir.

Antioksidan enzimlerden SOD'un gen ifadesi üzerine juglonun etkisi yaprakta ve kökte kontrolle kıyaslandığında dikkate değer bir artış veya azalma görülmemiştir. APX gen ifadesi juglon tarafından yine dikkate değer bir değişim göstermemiştir. CAT ise gen ifadesi kökte 0,5 mM juglon tarafından kontrole göre 9 kat azaltılmıştır. Diğer konsantrasyonlarda da bir azalma olmakla birlikte çok dikkat çeken bir azalma değildir. Literatüre baktğımızda juglonun bu enzimlerin gen ifadesi üzerine etkisi ile ilgi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Sadece antioksidanlarda Glutatyon transferaz enziminin gen ifadesi üzerine etkisi hakkında bir çalışma mevcuttur.[60]
Buna göre juglon mısır fidelerinin kök ve koleoptil dokularında 0,0001-0,01 mM arası 5 farklı konsantrasyonda uygulandığında artan konsantrasyona göre lineer şekilde gen ifadesinin de arttığı ve 0,01 mM da en yüksek gen ifadesi artışı belirlenmiştir. Bizim çalışmamızda ise bu enzim çalışılmamış olmakla beraber aynı gruptan diğer enzimler çalışılmış ve genelde antioksidan enzimlerin gen ifadeleri juglon tarafından azaltılmıştır. Ancak bu azalma çok kayda değer bir azalma değildir. Önceki çalışmayla bu çalışmanın farklı çıkması çalışılan bitki türlerinin ve juglon konsantrasyonlarının farkından kaynaklanabilir.

Juglonun allelopatik etkisinin sebebi bu sonuçlardan çıkarılabilir. Juglon antioksidan enzimlerin gen ifadesini baskılayarak serbest radikallerle mücadeleyi de dolaylı yoldan inhibe ederek bitkinin savunma sistemini zayıflatarak etkisinin gösteriyor olabilir. Bu da bitkide strese karşı savunma geliştirme şansını düşürerek bitkiyi olumsuz etkileyebilir.

KAYNAKLAR

[1] Kocaçalışkan, İ., (2006). Allelopati, Bizim Büro Basım Yayın, İstanbul.

[2] Stamp, N., (2003), "Out of the quagmire of plant defense hypotheses", The Quarterly Review of Biology, 78 (1): 23–55.

[3] Inderjit. (1996), "Plant phenolics in allelopathy" Botanical Review 62, 186-202.

[4] Taiz ve Zeiger, (2008). Bitki Fizyolojisi, Çeviren: Prof. Dr. İsmail Türkan, 13: 292-293.

[5] Terzi, I., Kocaçalişkan İ., Benlioglu O., Solak A., (2003). "Effects of juglone on growth of cucumber seedlings with respect to physiological and anatomical parameters", Acta Phsyiologiae Planatarum, 25, 353-356.

[6] Kocaçalişkan İ., Ceylan M., Terzi I., (2009). "Effects of juglone on seedling growth in intact and coatless seeds of cucumber (Cucumis sativus cv. Beith Alpha)", Scientific Research and Essay, 4, 39-41.

[7] Altıkat, S., Terzi,I., Kocaçalışkan, İ., Kuru, H.,I., (2013) "Allelopathic effects of juglone on growth of cucumber and muskmelon seedlings with respect to antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation", Journal of environmental protection and ecology.

[8] Rice,E., (1984), "Allelopathy" Academic Press, 422.

[9] Chou, C.,H., (2006). Introduction to allelopathy, 1, 1-9.

[10] Willis, R., J., (2007). The History of Allelopathy, Springer Press, 6, 23-24.

[11] Liu, D., Lovett, J., (1994) "Biologically active secondary metabolites of barley I Developing techniques and assessing allelopathy in barley Journal of Chemical Ecology 19, 2217-2230.

[12] Liu, D., Lovett, J., (1994). "Biologically active secondary metabolites of barley. II. Phytotoxicity of barley allelochemicals", Journal of Chemical Ecology 19:2231-2244.

[13] Kong, C.H., Li, H.B., Hu, F., Xu, X.H., Wang, P., (2006). "Allelochemicals released rice roots and residues in soil", Plant and Soil, 288: 47-56.

[14] Kong, C.H., Hu, F., Wang, P., Wu, J.L., (2008). " Effect of allelopathic rice varieties combined with cultural management options on paddy field weeds". Pest management Science, 64: 276-282.

[15] Chen, X.H., Hu, F., Kong, C.H., 2008. Varietal improvement in rice allelopathy. Allelopathy Journal, 22: 379-384.

[16] Cornes, D., (2005). "Callisto: a very successful maize herbicide inspired by allelochemistry". Proceedings of the Fourth World Congress on Allelopathy.

[17] Pheng, S., Olofsdotter, M., Jahn, G. and Adkins, S. W. (2009-12) Potential allelopathic rice lines for weed management in Cambodian rice production. Weed Biology and Management, 9 4: 259-266.

[18] Pheng, S., Olofsdotter, M., Jahn, G., Nesbitt, H. and Adkins, S.W. (2009-12) "Allelopathic potential of Cambodian rice lines under field conditions". Weed Biology and Management. 94: 267-275.

[19] Pheng, S., M. Olofsdotter, G. Jahn and S. Adkins. (2010). "Use of phytotoxic rice crop residues for weed management". Weed. Biol. Manage. 10: 176-184.

[20] Khanh, T.D, Xuan, T.D.and Chung, I.M.(2007). " Rice allelopathy and the possibility for weed management", Annals of Applied Biology.

[21] Craig, M., Gerber, E., Krebs, C., (2011) ." Invasive Knotwwed Affects Native Plants Through Allelopathy"American Journal of Botany, 98(1): 38-43.

[22] Douglass, C., H., Leslie A., Wolfe, D., (2011). " Phytotoxicity and Potential Allelopathy in Pale (Cynanchum rossicum) and Black swallowwort (C.nigrum)" Invasive Plant Science and Management, 4(1):133-141.

[23] Muller, C.H., Muller, W.H., Haines, B.L. (1964). " Volatile growth inhibitors produced by aromatic shrubs." Science 143: 471-473.

[24] Sasikumar, K., Vijayalakshmi, C., Parthiban,K.,T., (2001). "Allelopathic effects of four eucalyptus species on redgram (*Cajanus cajan L*.)", Journal of Tropical Agriculture, 39: 134-138.

[25] Khanh, T.D, Hong, N.H., Xuan, T.D. Chung, I.M. (2005). "Paddy weed control by medical and leguminous plants from Southeast Asia". Crop Protection, 36-37.

[26] Wayback., M., "Juglone toxicity Archived " 2015-02-12 at the Wayback Machine.

[27] Turan E. (2003). Juglon'un kavun fidelerinde protein ve enzim parametreleri üzerine etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı, Kütahya.

[28] Lindroth RL, Anson BD, Weisbrod AV. (1990). Effects of protein andjuglone on gypsymoths: growth performance andd etoxification enzyme activity. Journal of Chemical Ecology 16, 2533–2547.

[29] Soderquist, Charles J. (1973). "Juglone and allelopathy". Journal of Chemical Education. 50 (11): 7823.

[30] Cook, M.T. (1921). "Wilting caused by walnut trees". Phytopathology. 11:346.

[31] Caverzan A, Passaia G, Rosa SB, Ribeiro CW, Lazzarotto F (2012) : “Plant response to stresses: Role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection”. Genet. Mol. Biol.4: 1011-9.

[32] Juan Segura Aguilar, Inger Hakman, Jan Ryfström (1992) “The effect of 5 OH-1,4 naphthoquinone on Norway spruce seeds during germination”. Plant Physiology, Dec;100(4): 1955-1961

[32] Ji, Yu-Bin; Qu, Zhong-Yuan; Zou, Xiang (2011). "Juglone-induced apoptosis in human gastric cancer SGC-7901 cells via the mitochondrial pathway". Experimental and Toxicologic Pathology. 63 (1–2): 69–78

[33] Inbaraj, J. Johnson; Chignell, Colin F. (2004). "Cytotoxic Action of Juglone and Plumbagin: A MechanisticStudy Using HaCaT Keratinocytes". Chemical Research in Toxicology. 17 (1): 55–62.

[34] Çakmak ve Marschner, 1992; "Magnesium Deficiency and High Light Intensity Enhance Activities of Superoxide Dismutase, Ascorbate Peroxidase, and Glutathione Reductase in Bean Leaves" Environmental and Stress Physiology.

[35] Cakmak, I. (1994) Activity of Ascorbate-Dependent H2O2-Scavenging Enzymes and Leaf Chlorosis Are Enhanced in Magnesium-Deficient and Potassium Deficient Leaves, but Not in Phosphorus-Deficient Leaves. Journal of Experimental Botany, 45, 1259-1266.

[37] Gossett DR, Millhollon EP, Lucas MC, Banks SW, Marney MM (1994 b). The effects of NaCl on antioxidant activities in callus tissue of salt-sensitive cotton cultivars (Gosspium hirsitum L.). Plant Cell Reports 13: 498-503.

[38] Mittler, I. (2002): “Oxidative stres, antioxidants and stres tolerance” Trends in Plant Science: 7, pp. 405-410.

[39] Blokhina O., Virolainen E, Fagerstedt K. V. (2003) “ Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stres: a review ” Annals of Botany: 91, pp. 179-194.

[40] Superoxide Dismutases CONSTANTINE N. GIANNOPOLITIS AND STANLEY K. RIES Department of Horticulture, Michigan State University, East Lansing, Michigan 48824 Plant Physiol. (1977) 59, 309-314.

[41] Genome-Wide Identification and Transcriptional Expression Analysis of Cucumber Superoxide Dismutase (SOD) Family in Response to Various Abiotic Stresses Yong Zhou,1 Lifang Hu,2,3 Hao Wu Hindawi International Journal of Genomics Volume 2017, Article ID 7243973, 14

[42] J. J. Yan, L. Zhang, R. Q. Wang et al., “The sequence characteristics and expression models reveal superoxide dismutase involved in cold response and fruiting body development in Volvariella volvacea,” International Journal of Molecular Sciences, vol. 17, pp. 34–46, 2016.

[43] M. Pilon, K. Ravet, and W. Tapken, “The biogenesis and physiological function of chloroplast superoxide dismutases,” Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, vol. 1807,pp. 989–998, 2011.

[44] Chelikani P, Fita I, Loewen PC (January 2004). " Diversity of structures and properties among catalases" (PDF). Cellular and Molecular Life Sciences. 61 (2): 192–208.

[45] Goodsell DS (2004). "Catalase". Molecule of the Month. RCSB Protein Data Bank. Retrieved 2016-08-23.

[46] Boon EM, Downs A, Marcey D. "Catalase: H2O2: H2O2 Oxidoreductase". Catalase Structural Tutorial Text. Retrieved 2007-02-11.

[47] Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. Molecular biology of the cell. 4th edn.

[48] David J Schuller, Nenad Ban, Robert B vanHuystee, Alexander Mcpherson, Thomas L Poulos (1996) "The crystal structure of peanutperoxidase". Structure. 4(3): 311-321

[49] Kanbur,S.,(2016), Benzoik Asidin Soğuk Stresine Maruz Bırakılan Farklı Buğdaylar (*Triticum aestivum L*.) Üzerine Etkilerinin İncelenmesi, Doktora Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Kimya Anabilim Dalı, Biyokimya Programı, İstanbul.

[50] Winterbourn, C., "Reactions Involving Superoxide and Normal and Unstable Haemoglobins " et al. (1975) Biochem. J. (1976) 155, 493-502.

[51] Livak KJ1, Schmittgen TD**.** " Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method."

[52] İsmail Kocaçalışkan, (2012), "Bitki Fizyolojisi", Bizim Büro Basım Yayın, İstanbul.

[53] Kocacalıskan, I.,(2013), " Allelopathic effects of Juglone on growth of cucumber and muskmelon seedlings with respect to antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation", Journal of Environmental Protection and Ecology 14, No:3A, 1244-1253.

[54] Kocacalıskan, I., Terzi, I., (2001), " Allelopathic effects of walnut leaf extracts and juglone on seed germination and seedling growth", Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 76 (4), 436-440.

[55] Arasoglu, T., Mansuroglu, B., Derman S, Gumus, B., Kocyigit, B., Acar, T., Kocacaliskan I , (2016) "Enhancement of Antifungal Activity of Juglone (5-Hydroxy-1,4-naphthoquinone) Using a Poly(d,l-lactic-co-glycolic acid) (PLGA) Nanoparticle System.", Journal of Agricultural and Food Chemistry, 64, 7087-7094.

[56] Kocacalıskan, I., Topal, S., Arslan, O., (2006), " Herbicidal Effects of Juglone as an Allelochemical", Phyton, Vol 46, Fast 2, 259-269.

[57] Kocaçalışkan, İ., (2017), Biyoistatistik, Geliştirilmiş 3. Basım, Nobel Akademi Yayıncılık, Fatih- İstanbul.

[58] Ortega, R., C., Núñez, A. L., Anaya A., L., (2007): "Allelochemical Stress Can Trigger Oxidative Damage in Receptor Plants", 2:4- 269-270.

[59] Liu, C., Li, J., Wang, D., (2017) "Allelopathic Effects, Physiological Responses and Phenolic Compounds in Litter Extracts of Juniperus rigida", Chemistry&Biodiversity.

[60] Garbuzov, M., Reidinger, S., Hartley, S., E. , (2011) "Interactive effects of plant-available soil silicon and herbivory on competition between two grass species, 108: 1355-1363.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı :Ezgi CİBALİ

Doğum Tarihi ve Yeri :01.06.1991 Ankara

Yabancı Dili :İngilizce

E-posta :ben@ezgicibali.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Moleküler Biyoloji ve Genetik	Yıldız Teknik üniversitesi	2018
Lisans	Moleküler Biyoloji ve Genetik	İstanbul Kültür Üniversitesi	2014
Lise		Bandırma Anadolu Lisesi	2009

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
2017/07	Molgen Biyoteknoloji	Aplikasyon Uzmanı

YAYINLAR

PROJE

1. BAP PROJESİ : "Juglon Uygulanan Salatalık Fidelerinde Bazı Enzimlerin Aktivite ve Gen Anlatımlarının Analizi" , Proje No: 2014-01-07-KAP01